

膀胱灌注青藤碱对 MNU 诱发雄性 SD 大鼠膀胱癌的抑制作用

汤敏¹, 唐建¹, 罗坤¹, 吴海峰¹, 朱理¹, 彭旭辉¹, 汪翼^{1*}, 罗红梅^{2*}

(1. 南华大学附属第二医院泌尿外科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学组胚教研室, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 研究膀胱灌注青藤碱对 N-甲基亚硝基脒(MNU)诱发大鼠膀胱癌的肿瘤免疫及细胞凋亡的影响。将 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、青藤碱组、青藤碱+1/2BCG 组、卡介苗(BCG)组等 5 组,建立大鼠膀胱癌模型,检测大鼠 CTLA-4、PD-1、B7-H3 的水平,评估大鼠膀胱病理结果。结果提示青藤碱组、青藤碱+1/2BCG 组 CTLA-4、PD-1 均显著低于模型组,青藤碱+1/2BCG 组、BCG 组相比差异无显著性;膀胱炎症及 HE 染色评分均显著低于模型组。结果表明青藤碱能显著抑制大鼠膀胱癌 CTLA-4、PD-1 的表达,降低膀胱炎症及 HE 染色评分,抑制膀胱癌进展。

关键词: MNU; 青藤碱; 膀胱癌; 肿瘤免疫

中图分类号:R737.14 文献标识码:A

Intervention effect of intravesical infusion of sinomenine on tumor immunity induced by MNU in male SD rats with bladder cancer

TANG Min¹, TANG Jian¹, LUO Kun¹, WU Haifeng¹, ZHU Li¹, PENG Xuhui¹,
WANG Yi^{1*}, LUO Hongmei^{2*}

(1. Department of Urology, Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Department of Embryology, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China)

Abstract: To study the effects of bladder perfusion of sinomenine on tumor immunity and apoptosis of bladder cancer induced by N-methylnitrosourea (MNU) in rats. In the course of study, SD rats were randomly divided into five groups: control group, model group, sinomenine group, sinomenine+ half dose BCG group and BCG group. The purpose of this study was to evaluate the pathological results of rat bladder by establishing a rat Bladder cancer model to detect the levels of CTLA-4, PD-1, and B7-H3 in rats. The results showed that the scores of CTLA-4 and PD-1 were significantly lower than those in model group, and there was no significant difference between sinomenine+ half dose BCG and BCG group; cystitis and HE staining in sinomenine group and sinomenine+ half dose BCG group were significantly lower than those in model group. In summary, it has been confirmed that sinomenine can significantly inhibit the expression of bladder cancer CTLA-4 and PD-1 in rats, thus reducing the score of cystitis and HE staining, and finally inhibiting the progress of bladder cancer.

Key words: MNU; sinomenine; bladder cancer; tumor immunity

膀胱癌属于比较常见的泌尿外科肿瘤,发病率逐年上升。近年来浅表性膀胱癌仍然是在肿瘤电切术的基础上,膀胱灌注卡介苗(Bacillus Calmette Guerin, BCG)进行免疫治疗或化疗药物灌注治疗。

一系列病理生理学和免疫学研究表明,BCG 通过诱导炎症反应,激活机体免疫反应而发挥抗肿瘤效应。资料^[1-2]表明,膀胱灌注 BCG 后复发率较高。人们为此尝试不同的药物,以期改善膀胱癌的治愈率。肿瘤的发生、进展与肿瘤免疫密切相关。青藤碱(Alkaloid sinomenine, SIN)是从青风藤提取出来的有效活性单体,已被证实具有抑制肿瘤细胞增殖的作用^[3-6]。有文献^[7]报道,MNU 和 N-正丁基-N-(4-羟基-丁基)亚硝胺(BBN)均属于强致癌剂,通常应用于大鼠膀胱灌注诱癌,其中 BBN 组诱癌率

收稿日期:2019-07-17;修回日期:2019-12-28

基金项目:湖南省教育委员会基金(10C1164);湖南省教育厅重点项目(16A188);衡阳市科学技术发展计划项目(2018KJ135)。

* 通信作者, E-mail: wangwang0906@163.com; E-mail: luoh1225@163.com.

72.7%,而 MNU 组诱癌率达 94.4%。本研究建立大鼠膀胱癌模型,探讨膀胱灌注 SIN 对大鼠膀胱癌的肿瘤免疫的干预作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

从南华大学动物实验中心购买 75 只清洁级雄性 SD 大鼠,均为 18~20 个月龄,体重均为 250~270g。购入后将其放入饲养笼,动物房内保持清洁,并且通风良好,保持温度恒定(23~25℃)、相对湿度恒定(40%~60%),喂养食物为颗粒等级饲料,水源为自来水,使其适应一周后方进入实验。实验过程严格遵守并执行南华大学颁发的《动物实验伦理准则》。

1.2 主要药品

N-甲基亚硝基脒(Solarbio)、盐酸青藤碱粉剂(湖南正清制药有限公司)、BCG 冻干制剂(瑞楚制药)。

1.3 试验方法

1.3.1 配制 MNU 液、BCG 溶液和青藤碱溶液 按照王艺臻^[8]的 MNU 配制方法,将 1.0 g MNU 溶于 50 mL 枸橼酸钠缓冲液,充分溶解后置入 20℃ 冰箱避光保存;将 50 mg BCG 冻干制剂分别溶于 20 mL、40 mL 生理盐水,分别配制成 1.25 mg/mL、2.5 mg/mL 等 2 个浓度。按照屈绍思^[9]的实验方法,将青藤碱粉剂加入生理盐水,配置成 40 mg/mL 的青藤碱溶液。

1.3.2 实验分组和大鼠膀胱癌模型的建立 将 SD 大鼠分为 5 组,每组 15 只。分为对照组、模型组、青藤碱组、青藤碱+1/2 BCG 组、BCG 组等 5 组。除了对照组,其他四组共计 60 只大鼠参考王艺臻^[8]的实验设计方法,建立大鼠膀胱癌模型。大致过程如下:以 20 mg/kg 的剂量向大鼠经腹腔注射戊巴比妥液进行麻醉,满意后将大鼠固定,碘伏消毒尿道口,采用 5 cm 硬膜外导管经尿道口垂直插入,至硬膜外导管内可见尿液滴出,证实硬膜外导管顺利抵达膀胱。取胰岛素注射器作为膀胱灌注的推药器具,从硬膜外导管远端缓缓注入 0.1 mL MNU 溶液进行膀胱灌注(灌注时程为每 2 周 1 次,持续 10 周)。操作结束后,放回饲养笼中。

10 周后,对照组和模型组以生理盐水每只 0.2 mL 按照如上操作方法进行膀胱灌注处理;青藤碱组膀胱灌注 0.2 mL 青藤碱溶液;青藤碱+1/2 BCG 组在青藤碱组基础上,同时加用浓度 1.25 mg/mL

的 BCG 0.2 mL 膀胱灌注;BCG 组给予浓度 2.5 mg/mL BCG 0.2 mL 膀胱灌注。以上操作均每周 1 次,持续 4 周。14 周后采用颈椎脱臼法处死大鼠后,迅速移除腹腔内容物,从大鼠下腔静脉无菌采血,分离血清,-20℃ 环境保存;摘取膀胱后,置于-80℃ 冰箱中保存。

1.4 观察指标

1.4.1 大鼠一般生活情况 每日观察大鼠毛色,以及大鼠一般行为,如进食、饮水等。

1.4.2 采用荧光定量-聚合酶链反应(Real Time PCR)检测膀胱组织 CTLA-4 和 PD-1 严格按照实验步骤,经过匀浆、吸打、离心、纯化 RNA 等,提取样本总 RNA,进行反转录反应,使 RNA 反转录为 cDNA。最后进行扩增,荧光定量 PCR 仪进行 PCR,采用相对定量计算公式进行定量分析。

1.4.3 蛋白免疫印迹反应(Western-Blot)测定膀胱组织 CTLA-4 和 PD-1 严格参照操作要求,经过配制工作液、提取总蛋白、制胶、电泳、转膜、封闭与抗体孵育和显影等步骤,最后用凝胶成像系统成像,再用 Quantity One 软件分析各条带灰度值,得到目标蛋白与 β -actin 的灰度比值,即为目标蛋白相对表达值。

1.4.4 采用 ELISA 法测定大鼠血清 B7/H3 的表达 采用双抗体夹心法,按照说明书要求,依次经过包被-加样-加酶标抗体-加底物液显色-终止反应-结果判定等一系列过程,在波长 450 nm 处采用酶标仪测定 OD 值,绘制标准曲线,横坐标为标准品浓度,纵坐标为 OD 值,依据标准曲线计算结果。

1.4.5 采用 HE 染色法进行大鼠膀胱组织病理检查 依次经过甲醛固定、各梯度乙醇脱水、二甲苯透明化、滴蜡包埋、切片、脱蜡、脱二甲苯、洗涤、苏木素染色、伊红染色、脱水、透明化和封片处理后,使用 400 倍光学显微镜进行观察。病理结果描述参照《KOSS 诊断细胞学及其组织病理学基础》,采用 HE 染色评分进行分类及分级:0 分提示未见癌组织;0.5 分为轻微增生;1 分为上皮无异型性或者仅为轻度异型性、轻度增生者;2 分为上皮中度增生、异型性;3 分为重度增生、高度异型性;4 分对应乳头状癌;5 分提示肿瘤浸润及远处转移。膀胱炎症评分:0 分提示无炎症;1 分提示膀胱表面和微血管周围可见炎症细胞浸润;2 分提示膀胱组织内可见炎细胞 1~20 个/片;3 分提示膀胱组织内可见炎细胞 21~100 个/片;4 分提示膀胱组织内可见炎细胞大于 100 个/片。将各组相对应的数据累加,即为病理学总评分。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 22.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 各组计量资料的比较采用单因素方差分析; 计数采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠一般情况

观察到第 14 周, 大鼠均无死亡现象发生。对照组、青藤碱+1/2BCG 组及 BCG 组大鼠毛色光滑, 进食正常, 对外来刺激敏感; 模型组和青藤碱组大鼠欠光滑, 进食量及饮水量均有所减少, 对外来刺激反应稍显迟钝。

2.2 各组大鼠检测结果比较

5 组大鼠的 CTLA-4mRNA, 对照组显著低于其余各组 ($P < 0.05$), 而模型组显著高于其余各组 ($P < 0.05$); BCG 组显著低于青藤碱组 ($P < 0.05$); 青藤碱+1/2BCG 组、BCG 组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。5 组大鼠的 PD-1mRNA, 对照组显著低于其余各组 ($P < 0.05$), 而模型组显著高于其余各组 ($P < 0.05$); 青藤碱+半量 BCG 组、BCG 组显著低于青藤碱组 ($P < 0.05$); 青藤碱+1/2BCG 组、BCG 组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。5 组大鼠的 B7-H3 蛋白, 对照组显著低于其余各组 ($P < 0.05$); 青藤碱+半量 BCG 组、BCG 组显著低于模型组、青藤碱组 ($P < 0.05$); 青藤碱+1/2BCG 组、BCG 组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。详见表 1、图 1。

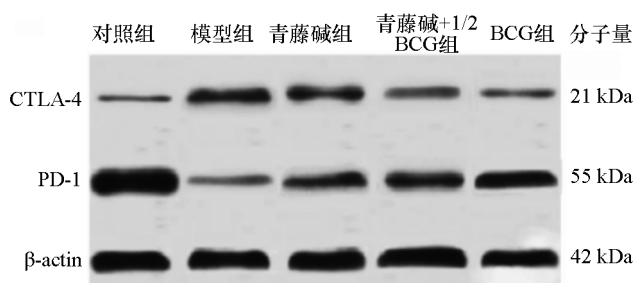


图 1 各组 CTLA-4、PD-1 表达比较

表 1 各组大鼠各指标结果比较

分组	CTLA-4	PD-1	B7-H3
对照组	12.30 $\pm$ 2.65	15.53 $\pm$ 4.72	1.34 $\pm$ 0.52
模型组	33.54 $\pm$ 4.92 ^a	36.54 $\pm$ 6.45 ^a	6.42 $\pm$ 1.47 ^a
青藤碱组	26.04 $\pm$ 4.57 ^{ab}	28.30 $\pm$ 5.18 ^{ab}	5.86 $\pm$ 1.38 ^a
青藤碱+1/2BCG 组	23.85 $\pm$ 4.71 ^{ab}	21.59 $\pm$ 7.04 ^{abc}	2.63 $\pm$ 0.90 ^{abc}
BCG 组	17.97 $\pm$ 4.48 ^{abc}	19.51 $\pm$ 5.74 ^{abc}	2.31 $\pm$ 0.76 ^{abc}

与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与青藤碱组比较, ^c $P < 0.05$. ($n = 15$)

2.3 各组大鼠病检结果比较

对照组未见细胞异型性, 评分 0.79 $\pm$ 0.31; 模型组细胞排列紊乱, 多数高度异型增生并中-重度炎细胞浸润, 评分 3.18 $\pm$ 1.33; 青藤碱组细胞排列紊乱, 部分为高度异型增生, 多数为中度异型增生, 评分 2.31 $\pm$ 0.84; 青藤碱+1/2BCG 组细胞排列紊乱, 多数为中度异型增生伴炎细胞浸润, 评分为 1.39 $\pm$ 0.65; BCG 组细胞排列紊乱, 多数为轻-中度异型增生伴轻度-中度炎细胞浸润, 评分 1.16 $\pm$ 0.52。对照组评分显著低于其余各组 ($P < 0.05$); 模型组显著高于其余各组 ($P < 0.05$); 青藤碱组显著高于青藤碱+1/2BCG 组、BCG 组 ($P < 0.05$); 青藤碱+1/2BCG 组、BCG 组相比差异无显著性 ($P > 0.05$), 见图 2。

3 讨 论

近年来, 免疫检查点抑制剂如抗细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 (CTLA-4)、抗程序性死亡受体 1 (PD-1) 和抗程序性死亡配体 1 (PD-L1) 等用于治疗肿瘤具有非常光明的前景^[10]。CTLA-4 不仅可与 CD28 竞争结合 APC 表面的 B7 分子配体, 抑制免疫细胞共刺激信号, 还可产生其他抑制性信号, 抑制 CTL 的增殖与活化, 最终产生的效应为抗肿瘤作用大大减弱^[11]。因此, 如果 CTLA-4 过度表达, 会导致 T 细胞的活化受到抑制, 肿瘤细胞无法得到有效杀伤, 从而使其达到免疫逃逸的目的。反之, 抑制 CTLA-4 的表达可降低 CTLA-4 与 B7 结合的亲和力, 使得 T 细胞的活性大为增强, 机体抗肿瘤免疫能力大大增强^[12]。本研究中各组大鼠致癌后, 大鼠膀胱组织 CTLA-4 蛋白显著增高, 提示大鼠患膀胱癌, 机体的免疫功能失衡。对致癌大鼠分别应用 SIN、BCG 或 SIN 联合半量 BCG 进行膀胱灌注, 大鼠膀胱组织 CTLA-4 蛋白表达量均显著下降, 提示上述各干预措施对大鼠膀胱癌细胞增殖都起到了一定的抑制作用。而将 SIN、BCG 或 SIN 联合半量 BCG 进行膀胱灌注的各组大鼠进行对比, 发现 SIN 联合半量 BCG 进行膀胱灌注的大鼠膀胱组织与 CTLA-4 和 BCG 进行膀胱灌注的大鼠对比差异无显著性, 表明了 SIN 和 BCG 进行膀胱灌注疗效具有协同性, 提示了 SIN 可作为治疗膀胱癌的有效辅助用药。本研究的 SIN 浓度的配置参考了屈绍思^[8]的实验设计浓度, 考虑到该文献中高浓度 SIN 组大鼠出现死亡的现象, 且不能明确是否属于 SIN 的毒副作用, 因此将其中等浓度 SIN 作为本研究的实验设计浓度。

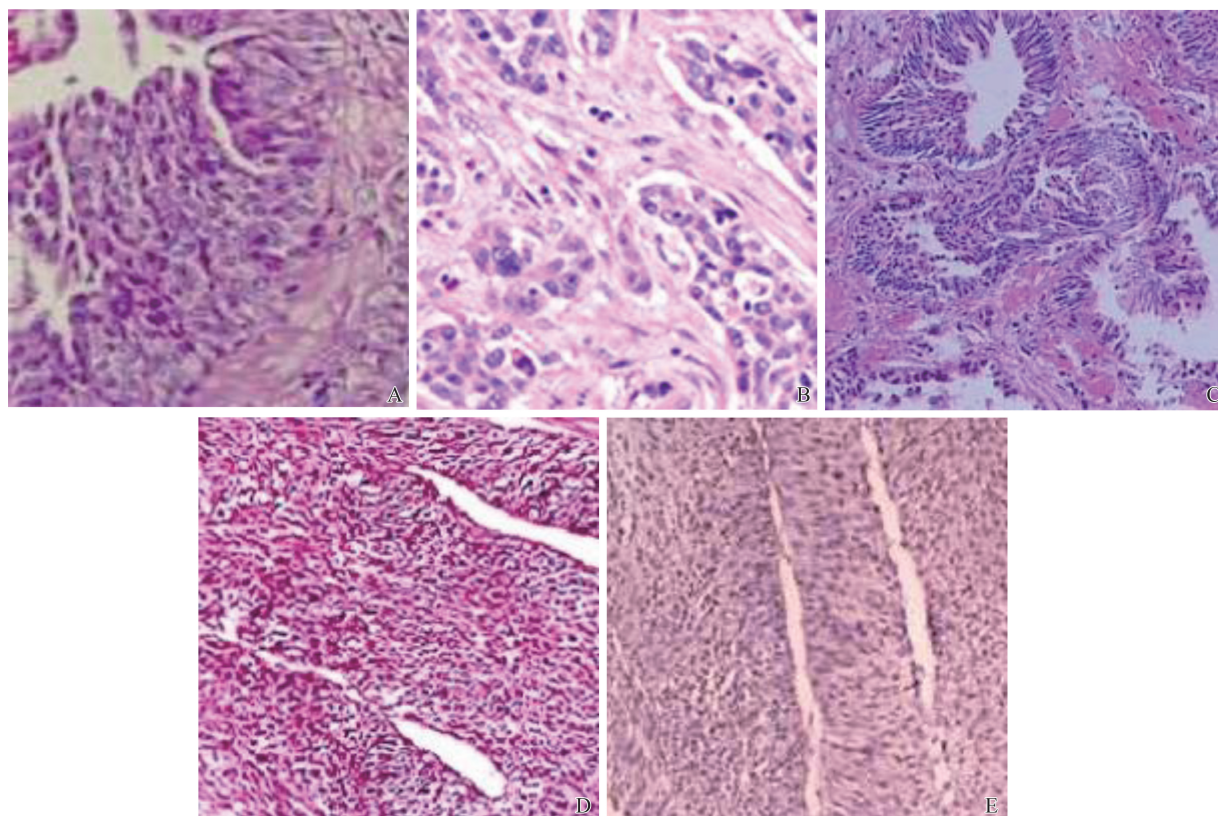


图2 各组病理学改变(HE染色法×400)

A: 对照组; B: 模型组; C: 青藤碱组; D: 青藤碱+1/2BCG组; E: BCG组

PD-1/PD-L1 抑制剂与 CTLA-4 抑制剂效果相似,能够抑制 T 细胞的活化与增殖,但在作用机制上两者有所不同。CTLA-4 抑制剂主要在 T 细胞活化的早期起作用,而 PD-1 抑制剂主要作用于 T 细胞活化的晚期。与 CTLA-4 相比,PD-1 的抑制作用更强。PD-1 是 T 细胞上主要存在的一种抑制性受体,肿瘤发生时机体内的肿瘤微环境会使浸润性 T 细胞高表达 PD-1,同时肿瘤细胞中 PD-L1 的表达上调,与 PD-1 受体相结合,导致肿瘤微环境中 PD-1 通路持续开放,进而导致 T 细胞凋亡,肿瘤细胞则逃脱机体的免疫监视,发生肿瘤免疫逃逸^[13],因此通过抑制 PD-1 的表达可阻断以上生物过程,达到增强免疫活性来杀伤肿瘤细胞的效应^[14]。有学者研究将 PD-1/PD-L1 抑制剂应用于膀胱癌患者,发现 PD-1/PD-L1 抑制剂能显著延长膀胱癌患者总体生存期^[15-17]。本研究中各组大鼠膀胱癌组织 PD-1 蛋白表达呈现出与 CTLA-4 蛋白相似的趋势,提示对致癌大鼠分别应用 SIN、BCG 或 SIN 联合半量 BCG 进行膀胱灌注,大鼠膀胱组织 CTLA-4 蛋白表达量均显著下降,提示上述各干预措施对大鼠膀胱癌细胞增殖都起到了一定的抑制作用。B7-H3 也是近年来兴起的研究较热的免疫检查点分子之一。

我国最近的一项临床研究中,证实了 B7-H3 在大多数 NSCLC 患者的血液中高表达,并且与预后差有关^[18]。也有研究发现了其在非小细胞肺癌患者的恶性胸腔积液中普遍高表达,且与预后差相关^[19]。本研究中各组大鼠致癌后,大鼠血清 B7-H3 表达量显著增高。SIN 进行膀胱灌注后,大鼠血清 B7-H3 表达量均无显著性变化,提示 SIN 对 MNU 致癌的膀胱癌大鼠进行膀胱灌注无法有效降低大鼠血清 B7-H3。SIN 联合半量 BCG 进行膀胱灌注后,大鼠血清 B7-H3 显著降低,可能是因为 BCG 发挥了积极有效的抗肿瘤效应。上述结果可能表明在膀胱癌发生和进展的免疫失衡机制中,SIN 对于在 B7-H3 这个免疫检查点分子似乎不起作用。这个研究结果提示 SIN 不能显著降低膀胱癌大鼠血清 B7-H3 的表达,反过来验证了肿瘤发病机制的多样性和复杂性,以及治疗肿瘤进行联合用药的必要性。

病理学诊断是诊断肿瘤良恶性的金标准,直接决定了肿瘤患者的预后。本研究中,除了正常对照组没有建立大鼠膀胱癌模型外,其余建模组均成功致癌。根据 5 组病检总评分结果,可见单用 SIN 进行膀胱灌注的 15 只大鼠病检结果较模型组显著改善,提示对膀胱癌大鼠给予 SIN 进行膀胱灌注,能有

效改善其病理评分。当 SIN 联合半量 BCG 进行膀胱灌注后,病理评分进一步降低,这充分展现了联合用药的协同效应,直观地体现了 SIN 在膀胱癌中抗肿瘤的积极效应,证实了 SIN 能有效改善膀胱癌预后,是一种治疗膀胱癌的有效化疗辅助用药。

综上所述,肿瘤的发生发展过程呈现多通路、多机制的特点。青藤碱能显著抑制膀胱癌大鼠 CTLA-4、PD-1 的表达,降低膀胱炎症及 HE 染色评分,可能通过下调膀胱癌的免疫检查点分子表达而抑制膀胱癌进展。

参考文献:

- [1] KOGA H, KURODA M, KUDO S, et al. Adverse drug reactions of intravesical bacillus Calmette-Guerin instillation and risk factors of the development of adverse drug reactions in superficial cancer and carcinoma in situ of the bladder[J]. *Int J Urol*, 2005, 12(2): 145-51.
- [2] LAMM DL, VANDERMEIJDEN AP, MORALES A, et al. Incidence and treatment of complications of bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy in superficial bladder cancer[J]. *J Urol*, 1992, 147(31): 596-600.
- [3] 郑建, 班丽英, 洪成雨, 等. 青藤碱对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及 COX-2 和 VEGF 表达的影响[J]. *中国临床研究*, 2017, 30(1): 42-4.
- [4] 施荣东, 田秀珠. 青藤碱联合顺铂对人宫颈癌 Hela 细胞增殖作用的影响[J]. *中国药物与临床*, 2010, 10(10): 1117-9.
- [5] SONG L, LIU D, ZHAO Y, et al. Sinomenine reduces growth and metastasis of breast cancer cells and improves the survival of tumor-bearing mice through suppressing the SHh pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98(1): 687-93.
- [6] LI X, WANG K, REN Y, et al. MAPK signaling mediates sinomenine hydrochloride-induced human breast cancer cell death via both reactive oxygen species-dependent and-independent pathways: an in vitro and in vivo study[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(7): e1356.
- [7] 张祥, 许天源, 夏磊磊, 等. 原位膀胱癌大鼠建模方法比较及超声鉴定方法[J]. *现代泌尿生殖肿瘤杂志*, 2015, 7(2): 99-103.
- [8] 王艺臻. 阻断 B7-H1/PD-1 通路对卡介苗抗大鼠膀胱癌免疫效应影响的研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2017.
- [9] 屈绍思. 膀胱灌注青藤碱对 N-甲基亚硝基脲诱发大鼠膀胱癌的抗肿瘤作用初步研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2018.
- [10] 冀寿健, 徐建明. 免疫检查点抑制剂相关不良反应的研究进展[J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2018, 25(7): 894-6.
- [11] GROSSO JF, JURE-KUNKEL MN. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research[J]. *Cancer Immun*, 2013, 13: 5.
- [12] 黎可人, 孙诚谊. 肝癌的免疫治疗进展[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2018, 25(17): 1266-70.
- [13] NIRSCHL CJ, DRAKE CG. Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(18): 4917-24.
- [14] SHARMA P, RETZ M, SIEFKER-RADTKE A, et al. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (Check-Mate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(3): 312-22.
- [15] 韩滕, 唐丽萍. PD-L1 的表达与妇科恶性肿瘤预后关系的研究进展[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2018, 32(5): 468-70.
- [16] BELLMUNT J, DE WIT R, VAUGHN DJ, et al. Pembrolizumab as secondline therapy for advanced urothelial carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(11): 1015-26.
- [17] Powles T, O'Donnell PH, Mansard C, et al. Efficacy and safety of dexamethasone in locally advanced or metastatic urothelial carcinoma: updated results from a phase 1/2 open-label study[J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(9): e172411.
- [18] ALTAN M, PELEKANOU V, SCHALPER KA, et al. B7-H3 expression in NSCLC and its association with B7-H4, PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(17): 5202-9.
- [19] CHEN L, ZHANG G, SHENG S, et al. Upregulation of soluble B7-H3 in NSCLC-derived malignant pleural effusion: a potential diagnostic biomarker correlated with NSCLC staging[J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 457: 81-5.

(本文编辑: 蒋湘莲)