

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.32.006

芒柄花黄素对人胃癌细胞 MKN-45 荷瘤裸鼠模型的抑制作用及机制研究*

董陈诚, 钟 漓[△], 张广钰, 王振冉, 冉福林, 陈 霄
(桂林医学院附属医院胃肠外科, 广西桂林 541002)

[摘要] **目的** 研究芒柄花黄素对人胃癌细胞 MKN-45 荷瘤裸鼠模型的抑制作用及作用机制。**方法** 建立人胃癌 MKN-45 细胞荷瘤裸鼠癌症模型, 经环磷酰胺(20 mg/kg)和芒柄花黄素(10、20、40 mg/kg)干预 14 d, 观察荷瘤重量变化及应用 TUNEL 染色评估荷瘤组织中细胞凋亡数量, 并用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测荷瘤内源性 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)及细胞周期蛋白(CyclinD)表达。**结果** 与模型对照组比较, 芒柄花黄素明显抑制胃癌细胞 MKN-45 荷瘤裸鼠肿瘤的生长($P < 0.01$), 并且肿瘤组织中细胞凋亡计数增加($P < 0.01$)。同时, 芒柄花黄素干预组肿瘤组织中的 p38MAPK 蛋白表达增加, CyclinD 蛋白水平减少($P < 0.01$)。**结论** 芒柄花黄素具有明显抑制胃癌细胞 MKN-45 增殖作用, 其机制与激活细胞内 MAPK 信号转导通路而诱导细胞凋亡有关。

[关键词] 芒柄花黄素; 胃肿瘤; 细胞凋亡

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)32-4482-02

Inhibitory effect and mechanism of formononetin on nude mouse model bearing human gastric cancer cells MKN-45*

Dong Chencheng, Zhong Li[△], Zhang Guangyu, Wang Zhenran, Ran Fulin, Chen Xiao

(Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibitory effect of formononetin on the nude mouse model bearing human gastric cancer cells MKN-45 and its possible mechanism. **Methods** The nude mouse cancer model bearing human gastric cancer cells MKN-45 was established. Then the weight change of tumor bearing mouse was observed after 14 d intervention by 20 mg/kg of cyclophosphamide and 10, 20, 40 mg/kg of formononetin. The cellular apoptosis count was evaluated by using the TUNEL staining method. The endogenous p38MAPK and CyclinD protein expressions in tumor tissue were determined through the Western blot assay. **Results** Compared with model control group, formononetin significantly inhibited the growth of nude mouse bearing gastric cancer cells MKN-45 ($P < 0.01$), moreover the cellular apoptotic count was increased ($P < 0.01$). Meanwhile, expression of P38MAPK protein in the tumor tissue of formononetin intervention group was increased and the CyclinD protein level was decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Formononetin has obviously inhibitory effect on the proliferation of gastric cancer cells MKN-45, its mechanism may be related with the activation of intracellular MAPK signal transduction pathway and inducing cellular apoptosis.

[Key words] formononetin; gastric neoplasms; cellular apoptosis

胃癌病死率较高, 是仅次于食道癌的常见恶性肿瘤之一^[1]。当前, 胃癌治疗一般采用手术、放射或化学疗法, 但进展期胃癌的单纯手术治疗可能会存在肉眼或镜下残留灶, 使复发转移率大大增加^[2]。目前临床上使用的烷化剂类抗肿瘤药环磷酰胺, 在肝微粒体酶系催化下代谢转化为烷化作用更强的氯乙基磷酰胺, 能发挥细胞毒作用而杀灭肿瘤细胞, 但其有着毒副作用较大的缺点^[3]。近年发现, 细胞内促分裂素原活化蛋白激酶(MAPK)通路与调控细胞增殖、分化和细胞凋亡密切相关, 因此抑制该信号通路是药物抗癌作用的新导向^[4]。芒柄花黄素, 又名刺芒柄花素, 具有抗癌药理活性, 可防治前列腺癌及乳腺癌等癌症, 同时具有降血脂和抗氧化作用^[5]。本实验首先建立人胃癌细胞 MKN-45 荷瘤裸鼠动物模型, 然后探讨芒柄花黄素对胃肿瘤细胞的抗增殖活性, 进而阐明其抗癌作用机制并为今后的临床开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 MKN-45 人胃癌细胞株购自中科院上海细胞生物

所细胞库。将 MKN-45 培育在 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清, 150 U/mL 青霉素和 120 U/mL 的链霉素), 于 5% CO₂、37℃ 条件下培养。雄性 BALB/c 裸鼠, 18~20 g, 购自广东省医学实验动物中心。动物饲养在良好的实验控制环境中, 标准化的饲料喂养和科学化的管理。

1.2 药物与试剂 芒柄花黄素(纯度大于 98.0%); 上海佳和生物科技有限公司。环磷酰胺: 江苏恒瑞医药股份有限公司。DMEM 培养基: 美国 Gibico 公司。胎牛血清: 美国 Gibico 公司。胰蛋白酶: 上海 Sigma-Aldrich 公司。TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒: 上海碧云天生物技术研究所。DAB(3,3-二氨基联苯胺)染色试剂盒: 武汉博士德生物工程有限公司。p38 分裂原活化的蛋白激酶(p38MAPK)、细胞周期蛋白(CyclinD)及磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH): 上海 Sigma-Aldrich 公司。蛋白裂解液: 上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 主要仪器 HWS-150 恒温培养箱(上海森信实验仪器有限公司)。Series8000 直热式 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Scien-

* 基金项目: 广西高校科学技术研究项目(LX2014270)。 作者简介: 董陈诚(1981—), 副主任医师, 硕士, 主要从事胃肠肿瘤外科的研究。

[△] 通讯作者, E-mail: zhongli0302@163.com。

tific 公司)。W-CJ-1CU 双人单面水平超净工作台(南京莱步仪器有限公司)。SpectraMax 190 全波长酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。DM IRB(型号)倒置显微镜(德国 Leica 仪器有限公司)。ECL(电子化学发光)检测系统(美国 Thermo Scientific 公司)。GelDoc 2000 伯乐凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 方法

1.4.1 荷瘤动物与药物干预 将 0.1 mL 无菌 MKN-45 细胞 (3×10^7 个/mL)皮下注射到裸鼠体内,观察肿瘤生长情况。当移植肿瘤长到直径约 20 mm 时,MKN-45 荷瘤裸鼠被分为 5 组:模型对照组,环磷酰胺(20 mg/kg)阳性组和芒柄花黄素(10、20、40 mg/kg)给药组,每天腹腔注射 1 次,持续 14 d。同时记录实验裸鼠体重(W)与肿瘤质量,并计算肿瘤抑制率。肿瘤抑制率(%)=(1-W 给药/W 模型)×100%。

1.4.2 指标检测 分离皮下肝癌肿瘤组织,应用 TUNEL 染色评估肿瘤组织中细胞凋亡数,并用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肿瘤内源性 p38MAPK 及 CyclinD 蛋白的表达。实验步骤操作均按照试剂供应商说明书严格进行。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,计数资料采用率表示,组间采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芒柄花黄素对荷瘤裸鼠肿瘤增殖的影响 实验结果表明,芒柄花黄素能抑制胃癌细胞 MKN-45 荷瘤裸鼠肿瘤的生长,随着芒柄花黄素浓度的增加肿瘤质量不断减小,呈剂量依赖性,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 芒柄花黄素抑制 MKN-45 荷瘤裸鼠肿瘤增殖($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量(mg/kg)	肿瘤质量(g)	抑制率(%)
模型对照组	0	1.42±0.53	0
环磷酰胺组	20	0.62±0.36*	59.26
芒柄花黄素组	10	0.91±0.41*	31.74
芒柄花黄素组	20	0.68±0.39*	54.08
芒柄花黄素组	40	0.36±0.19*	65.39

*: $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 芒柄花黄素对荷瘤裸鼠肿瘤组织细胞凋亡的影响 TUNEL 染色结果显示,MKN-45 荷瘤裸鼠肿瘤组织中模型对照组 TUNEL 阳性细胞数量较少。而芒柄花黄素(10、20、40 mg/kg)组,TUNEL 阳性细胞计数随浓度逐渐增加,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 2。

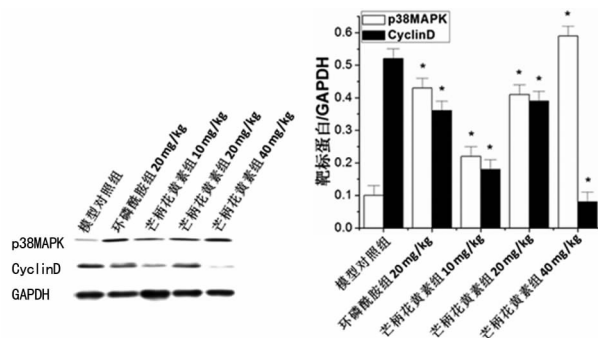
表 2 芒柄花黄素增加 MKN-45 荷瘤裸鼠肿瘤组织 TUNEL 阳性细胞数量($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量(mg/kg)	TUNEL 阳性细胞(个/mm ²)
模型对照	0	3.04±0.52
环磷酰胺组	20	17.48±3.29*
芒柄花黄素组	10	9.57±1.26*
芒柄花黄素组	20	15.38±3.08*
芒柄花黄素组	40	24.67±4.25*

*: $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.3 芒柄花黄素对荷瘤裸鼠肿瘤组织 CyclinD 及 p38MAPK 蛋白表达的影响 Western blot 结果表明,MKN-45 荷瘤裸鼠

内源性 p38MAPK 表达较低,处于抑制其表达状态,而 CyclinD 蛋白表达较高。经芒柄花黄素干预后,肿瘤组织中 p38MAPK 蛋白表达明显上调,而 CyclinD 蛋白水平明显减少,与对照组比较差别有统计学意义($P < 0.01$),见图 1。



*: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 1 芒柄花黄素增加荷瘤裸鼠肿瘤组织 p38MAPK 水平及下调 CyclinD 表达

3 讨论

目前,胃癌的病因至今未被完全阐明,但与直接或长期破坏胃黏膜屏障导致促癌因子被激活有关^[6]。在癌变发展中,癌细胞失控生长会逐渐形成恶性癌,并进一步侵入附近组织^[7]。目前的临床化疗药物治疗有限,并有很大的毒副作用。因此,寻找能抑制肿瘤生长并且高效低毒的药物一直是近年研究的热点。

在本研究中,以环磷酰胺和芒柄花黄素作用于 MKN-45 荷瘤裸鼠模型,结果相比 MKN-45 荷瘤裸鼠模型对照组,环磷酰胺和芒柄花黄素组的荷瘤裸鼠肿瘤组织减小,且肿瘤增殖抑制率与芒柄花黄素的剂量成正比,说明了芒柄花黄素能有效发挥抗肿瘤细胞增殖作用。在接下来的肿瘤组织 TUNEL 染色实验中作者发现, MKN-45 荷瘤裸鼠模型对照组 TUNEL 阳性细胞计数显著减少,而环磷酰胺和芒柄花黄素组 TUNEL 阳性细胞数量增多,并且呈剂量依赖性,这与上述实验结果相一致,提示芒柄花黄素可能是通过诱导 MKN-45 细胞凋亡而抑制其增殖。

研究表明,p38MAPK 激活时发生核转移,启动蛋白激酶和转录因子的磷酸化,同时 p38 通路介导的细胞凋亡过程通过细胞周期起作用,因此 p38 信号通路与细胞增殖、分化及细胞凋亡密切相关^[8]。而 CyclinD 是调控细胞周期关键蛋白之一,当其过度表达可缩短 G₁ 期,并减少细胞对生长因子的依赖性。研究发现,CyclinD 在人胃癌细胞中的表达较高,同时其阳性表达与癌症的恶性程度呈正相关性,其中 CyclinD 通过调控细胞内 MAPK 途径发挥负性调控作用,促进胃癌细胞的生长和转移趋势^[9]。因此,调控肿瘤细胞内的 MAPK 信号通路或减少 CyclinD 表达有助于控制胃癌的发生、发展^[10-11]。本研究的实验结果与以上的研究成果是相一致的。本研究中,经 10、20、40 mg/kg 浓度的芒柄花黄素干预后,裸鼠肿瘤组织中 p38MAPK 蛋白水平明显上调,而 CyclinD 蛋白水平降低,肿瘤增殖受到明显抑制,因此笔者推测芒柄花黄素抑制胃癌细胞 MKN-45 增殖活性与激活细胞内 MAPK 信号通路而介导细胞凋亡有关。

综上所述,通过本研究,证明了芒柄花黄素能抑制胃癌细胞 MKN-45 生长,其作用机制与激活细胞内 MAPK 信号通路而介导细胞凋亡有关,为下一步临床应用于胃癌的治疗提供了理论基础。(下转第 4486 页)

甲状腺的病理组织学变化与 Shelke 等对水牛甲状腺的观察结果相类似。有研究认为,单纯性甲状腺肿的发生,可能是由于土壤和水中所含碘的浓度过低、怀孕时需求增加、患者的身体条件及摄取硫脲嘧啶、大豆、甘蓝等可以导致甲状腺肿的物质过多所造成^[7]。Maxie 等^[12]也认为,碘量不足是甲状腺有机合成下降的主要原因。在本实验中,动物在接受手术前后均以碘化食物喂养。因此,动物不可能由于碘摄入不足,而影响甲状腺素的合成。因此,在甲状腺神经切断后,T4 分泌减少,其原因是:由于交感神经对甲状腺素的分泌具有调控作用,手术将其切断后,引起甲状腺滤泡的萎缩,最终导致甲状腺素分泌的减少。而甲状腺素分泌的下降,可反馈性刺激垂体释放 TSH。这就是为什么实验组动物 TSH 水平升高的原因。Maxie 等^[12]认为甲状腺激素的合成减少,会刺激垂体释放更多的 TSH 来增加其产量,这也是导致单纯性甲状腺肿即甲状腺上皮细胞增殖、肥大的原因。由于本实验观察的时间有限,所以尚未观察到实验组甲状腺上皮细胞有否增殖肥大的表现。本实验结果表明,ELN 发出的甲状腺神经对甲状腺素的分泌具有调控作用。课题组前期工作发现 ELN 发出的甲状腺神经含有交感神经节后纤维,而后者可通过调控甲状腺血管的收缩状态,从而影响甲状腺的分泌^[10-11]。本实验结果为甲状腺分泌调控的机制研究提供了实验基础。另一方面,众所周知,喉上神经外支损伤是甲状腺手术及颈部其他手术的严重并发症之一。因此,术中如何保护该神经,国内外基础及临床工作者进行了大量的研究。本文结果提示,该神经的甲状腺支切断后,对甲状腺的功能将造成影响。因此,术中如何保护该神经,以及损伤后如何维持甲状腺的正常功能是值得深入研究的课题。

参考文献

- [1] Kochilas X, Bibas A, Xenellis J, et al. Surgical anatomy of the external branch of the superior laryngeal nerve and its clinical significance in head and neck surgery [J]. Clin Anat, 2008, 21(2): 99-105.
- [2] Lang J, Nachbaur S, Fischer K, et al. The superior laryngeal nerve and the superior laryngeal artery: an anatomical study [J]. Clin Anat, 2002, 15(4): 271-275.

- [3] Romanchishen AF, Levanovich VV, Karpatski IV. Surgical anatomy of the external branch of the superior laryngeal nerve: clinical-anatomical investigation [J]. Vestnik Khirurgii Imeni Grekova, 2008, 167(4): 67-70.
- [4] Furlan JC. Sympathetic fiber origin of the superior laryngeal nerve and its branches: an anatomical study [J]. Clin Anat, 2002, 15(4): 271-275.
- [5] Hwang SB, Lee HY, Kim WY, et al. The anatomy of the external branch of the superior laryngeal nerve in Koreans [J]. Asian J Surg, 2013, 36(1): 13-19.
- [6] Yalcin B, Develi S, Tubbs RS, et al. A detailed study of the relationship between the external laryngeal nerve and superior thyroid artery, including its glandular branches. [J] Clin Anat, 2013, 26(7): 814-822.
- [7] Patnaik U, Nilakantan A, Shrivastava T. Anatomical variations of the external branch of the superior laryngeal nerve in relation to the inferior constrictor muscle: cadaveric dissection study [J]. Laryngol Otol, 2012, 126(9): 907-912.
- [8] 许士叶,董剑平,孙善全,等.人与狗迷走/交感干的比较解剖及其喉上神经外支纤维成分 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2012, 30(4): 431-434.
- [9] Huang HX, Sun SQ, Ren ZH, et al. Superior laryngeal nerve loop: patterns and surgical implications [J]. Surg Radiol Anat, 2012, 34(10): 977-985.
- [10] Huang HX, Sun SQ, Ren ZQ, et al. Superior laryngeal nerve loop: patterns and surgical implications. [J] Surg Radiol Anat, 2012, 34(10): 977-985.
- [11] Ramnarayan KV, Sun SQ, Dong JP, et al. Fiber components of the external laryngeal nerve. A morphological and histochemical analysis. [J]. Indian Sci Res, 2012, 3(1): 13-19.
- [12] Maxie DV. Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals [M]. New York, London, Academic Press: 368-396.

(收稿日期:2016-06-19 修回日期:2016-08-07)

(上接第 4483 页)

参考文献

- [1] 李守英,徐同磊,徐红.早期胃癌筛查方法应用的新进展 [J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(1): 187-189.
- [2] 陈丽苹,贾鑑慧,于清蕊.进展期胃癌辅助治疗的现状与进展 [J]. 医学与哲学, 2016, 37(3B): 58-60.
- [3] Cejka D, Preusser M, Woehrer A, et al. Everolimus (RAD001) and anti-angiogenic cyclophosphamide show long-term control of gastric cancer growth in vivo [J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7(9): 1377-1385.
- [4] Yamashita AS, Geraldo MV, Fuziwara CS, et al. Notch pathway is activated by MAPK signaling and influences papillary thyroid cancer proliferation [J]. Transl Oncol, 2013, 6(2): 197-205.
- [5] Auyeung KK, Law PC, Ko JK. Novel anti-angiogenic effects of formononetin in human colon cancer cells and tumor xenograft [J]. Oncol Rep, 2012, 28(6): 2188-2194.
- [6] Raderer M, Püspök A, Stummvoll G, et al. Early cancer of the stomach arising after successful treatment of gastric

MALT lymphoma in patients with autoimmune disease [J]. Scand J Gastroenterol, 2003, 38(3): 294-297.

- [7] Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity [J]. Cell, 2011, 147(5): 992-1009.
- [8] 夏春咸,苗永昌,梁辉. p38MAPK 通路在消化系统肿瘤研究中的新进展 [J]. 实用肿瘤杂志, 2008, 23(5): 488-490.
- [9] Hayakawa Y, Hirata Y, Nakagawa H, et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1 and cyclin D1 compose a positive feedback loop contributing to tumor growth in gastric cancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(2): 780-785.
- [10] 石彦,钱锋,郝迎学,等.二氧化碳气腹对胃癌 MKN-45 细胞侵袭能力的影响 [J]. 中华消化外科杂志, 2007, 6(6): 449-451.
- [11] 徐学超,李玉民,刘涛,等.二甲双胍诱导胃癌细胞 MKN-45 发生自噬的作用 [J]. 中华消化外科杂志, 2014, 13(9): 716-721.

(收稿日期:2016-05-18 修回日期:2016-08-06)