

再灌注时间有关。

4 参考文献

- Sanada S ,Komuro I ,Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning ,postconditioning and translational aspects of protective measures (J). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* ,2011; 301 (5) : H1723-41.
- Hedström E ,Åström-Olsson K ,Ohlin AK ,et al. Initial results of inflammatory response ,matrix remodeling and reactive oxygen species following PCI in acute ischemic myocardial injury in man (J). *J Invasive Cardiol* , 2011; 23(9) : 371-6.
- 向道康 ,阎兴治 ,杨世虞 ,等. 左卡尼汀对体外循环心瓣膜替换术心肌的保护作用 (J). *中华医学杂志* 2003; 83(21) : 1887-90.
- 周涛 ,向道康 ,秦国伟. 左卡尼汀强化 St. Thomas No. 2 液对长时间冷保存离体心脏能量代谢的影响 (J). *中国心血管病研究* 2010; 8 (11) : 851-4.
- Augustyniak A ,Skrzydłowska E. L-Carnitine in the lipid and protein pro-

tection against ethanol-induced oxidative stress (J). *Alcohol* ,2009; 43 (3) : 217-23.

- Liao PH ,Hung LM ,Chen YH ,et al. Cardioprotective effects of luteolin during ischemia-reperfusion injury in rats (J). *Circ J* 2011; 75(2) : 443-50.
- Makrecka M ,Kuka J ,Liepinsh E ,et al. The regulation of mitochondrial energy metabolism by L-carnitine lowering agents in ischaemia-reperfusion injury (J). *Heart* 2011; 97(24) : e8.
- Alves MG ,Oliveira PJ ,Carvalho RA. Mitochondrial preservation in celsior versus histidine buffer solution during cardiac ischemia and reperfusion (J). *Cardiovasc Toxicol* 2009; 9(4) : 185-93.
- Oyanagi E ,Yano H ,Kato Y ,et al. L-Carnitine suppresses oleic acid-induced membrane permeability transition of mitochondria (J). *Cell Biochem Funct* 2008; 26(7) : 778-86.

(2012-04-16 收稿 2012-09-10 修回)

(编辑 曹梦园)

灰树花多糖联合顺铂对 H₂₂ 肝癌移植瘤小鼠的抑瘤作用研究

吕冬霞 杜伟 范晓艳 王晓丽¹ 李玉¹ (佳木斯大学基础医学院 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要 目的 研究灰树花多糖(PGF)联合顺铂对 H₂₂ 荷瘤小鼠抗肿瘤作用。方法 PGF和顺铂单独或联合作用于 H₂₂ 小鼠,观察肿瘤生长情况,计算肿瘤体积;免疫组化法检测瘤组织中半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-3、Caspase-8、细胞色素 C(Cytc)蛋白表达。结果 与空白对照组比较,PGF组、顺铂组和联合组肿瘤体积均有差异($P < 0.05$),联合组肿瘤体积有显著差异($P < 0.01$);联合组肿瘤组织内的 Caspase-3、Caspase-8、Cytc 阳性表达率明显高于对照组和单纯用药组。结论 联合用药对 H₂₂ 小鼠移植瘤生长抑制作用较单独用药组有明显增强;联合组可能通过促进 Caspase-8 和 Cytc 表达,进而促进 Caspase-3 表达诱导 H₂₂ 肿瘤细胞凋亡。

关键词 灰树花多糖;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶;顺铂;细胞凋亡

(中图分类号) R730.52 (文献标识码) A (文章编号) 1005-9202(2014)08-2165-02; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2014.08.069

灰树花多糖(PGF)是从优质灰树花子实体中提取的有效活性成分,研究表明 PGF 具有抗肿瘤作用^(1,2)。本研究采用免疫组化法检测半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-3、Caspase-8、细胞色素 C(Cytc)在 PGF 联合顺铂诱导 H₂₂ 肿瘤细胞凋亡过程中的变化,观察 PGF 联合顺铂对肿瘤生长的影响,探讨其抑瘤作用机制和细胞凋亡通路。

1 材料与方

1.1 材料 瘤株: H₂₂ 肝癌细胞购于哈尔滨医科大学附属肿瘤医院动物中心;实验动物:昆明种近交系雄性小鼠,体重(20±2.0)g,佳木斯大学实验动物中心提供,许可证号:黑动字第 99101001,普通级,普通环境饲养。PGF 粉末:浙江方格药业有限公司,多糖含量为 90%。顺铂粉剂:山东齐鲁制药厂。

基金项目:黑龙江省卫生厅科研课题(No. 2009-343)

1 吉林农业大学食药菌教育部工程研究中心

通讯作者:李玉(1944-),男,教授,博士生导师,主要从事菌物学研究。

第一作者:吕冬霞(1965-),女,教授,硕士生导师,主要从事肿瘤发生机制与生物学治疗研究。

Caspase-3、Caspase-8、Cytc 抗体:南京基美生物。SP-9001 试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒:北京中杉金桥。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立 取昆明种近交系小鼠 40 只,分别接种 1×10^7 /ml 细胞悬液于右侧腋下,随机分成四组,每组 10 只。

1.2.2 实验分组及给药方式 用生理盐水溶解顺铂和 PGF。接种 24 h 后开始给药。给药时间:每日早上进行灌胃 1 次,晚上进行腹腔注射 1 次,间隔时间 12 h,连续给药 14 d。具体给药方法见表 1。

表 1 实验动物的给药种类、方式与用量

组别	灌胃(0.4 ml)	腹腔注射(0.2 ml)
对照组	生理盐水	生理盐水
PGF 组	180 mg/kg PGF	生理盐水
顺铂组	生理盐水	2 mg/kg 顺铂
联合组	180 mg/kg PGF	2 mg/kg 顺铂

1.2.3 皮下肿瘤生长实验 实验结束后,观察肿瘤状态,完整剥取肿瘤后测量移植瘤质量和体积。平均瘤体积 = (a × b²) /

2 (a、b 分别为肿瘤长径和短径)。q 值 = $E(A+B) / EA + EB(1-EA)$ [EA、EB、E(A+B) 分别为 PGF 组、顺铂组及联合组的抑瘤率] 根据 q 值判断联合用药的疗效 q < 0.85 为拮抗 q 值 0.85 ~ 1.15 为相加 q > 1.15 为协同。

1.2.4 Caspase-3、Caspase-8、Cytc 表达检测 采用 SP 法进行免疫组化操作。分别观察制片后的 Caspase-3、Caspase-8、Cytc 表达, Caspase-3 为细胞膜和细胞质着色, Caspase-8 和 Cytc 为细胞浆着色, 着色成棕黄色或褐色的是阳性细胞。显微镜下选取每个区域不重复随机 10 个高倍视野 (×400), 观察所选择视野中的所有细胞, 记录阳性染色细胞百分数并计分。

评分标准如下: IHS=A×B。A 为阳性细胞数分级 0 ~ 1% = 0、1% ~ 10% = 1、10% ~ 50% = 2、50% ~ 80% = 3、80% ~ 100% = 4; B 为阳性细胞显色强度分级 0 (阴性)、1 (弱阳性)、2 (阳性)、3 (强阳性)。对所得数值进行完全随机设计两样本均数比较 t 检验。

1.3 统计学方法 采用 SPSS10.0 软件, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用完全随机设计两样本均数比较 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 皮下肿瘤生长实验 接种后, 小鼠成瘤率 100%, 在第 1 ~ 3 天, 各组移植瘤生长情况基本相同; 第 4 ~ 14 天, 对照组移植瘤生长快于其他组, 联合组肿瘤生长最慢; 解剖可见肿瘤质硬, 表面有血管生长分布。从平均瘤块体积来看, 用药组瘤块体积低于对照组 (P < 0.05, P < 0.01); 与联合组比较, PGF 组、顺铂组均有差异 (P < 0.05), 而对照组有显著性差异 (P < 0.01)。各组平均瘤块体积、瘤质量及抑瘤率, 见表 2。

表 2 各组平均瘤质量及瘤块体积 ($\bar{x} \pm s$ n=10)

组别	体积 (mm ³)	质量 (g)	肿瘤抑制率 (%)	q 值
对照组	1 843.13 ± 306.21 ⁴⁾	2.57 ± 0.54 ⁴⁾	-	
PGF 组	561.97 ± 100.57 ¹⁾³⁾	1.58 ± 0.31 ¹⁾³⁾	38.52	
顺铂组	469.06 ± 89.86 ¹⁾³⁾	1.08 ± 0.12 ¹⁾	57.98	
联合组	184.11 ± 35.64 ²⁾	0.86 ± 0.07 ²⁾	66.54	0.90

与对照组比较: 1) P < 0.05 2) P < 0.01; 与联合组比较: 3) P < 0.05 4) P < 0.01; 下表同

2.2 单独及联合治疗对 H₂₂ 肝癌移植瘤细胞 Caspase-3、Caspase-8、Cytc 表达影响 见表 3。与对照组比较, 顺铂组与

表 3 小鼠移植瘤 Caspase-3、Caspase-8、Cytc 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$ n=10)

组别	Caspase-3	Caspase-8	Cytc
对照组	0.556 ± 0.018 ⁴⁾	0.444 ± 0.018 ⁴⁾	0.267 ± 0.022 ⁴⁾
PGF 组	1.000 ± 0.204 ¹⁾³⁾	1.966 ± 0.036 ¹⁾³⁾	0.989 ± 0.064 ¹⁾³⁾
顺铂组	1.889 ± 0.293 ²⁾³⁾	2.555 ± 0.067 ²⁾³⁾	1.833 ± 0.046 ²⁾³⁾
联合组	3.333 ± 0.693 ²⁾	4.088 ± 0.079 ²⁾	3.887 ± 0.063 ²⁾

PGF 组 Caspase-3、Caspase-8、Cytc 的阳性率差别有统计意义 (P < 0.05); 与联合组比较, 对照组差别有显著统计学意义 (P < 0.01), 各单药组差别有统计学意义 (P < 0.05)。

3 讨论

顺铂是目前临床上治疗肿瘤最常用和较有效的化疗药物之一, 大量或较长期使用, 容易产生毒副作用、多药耐药性。本研究表明 PGF 和顺铂联合体内抗肿瘤具有相加作用, 说明 PGF 可通过增加顺铂对癌细胞的敏感性而增强抗癌作用。

诱导细胞凋亡的因素很多, 这些因素都需要激活不同的 Caspase 家族成员, 才能导致细胞凋亡, 故 Caspase 被认为是细胞凋亡的核心执行者即凋亡的共同通路^(3,4)。Caspase-3 属于效应 Caspase⁽⁵⁾, 是多数细胞凋亡途径中的末端效应蛋白酶。Caspase-8 是死亡受体介导的凋亡途径中关键的启动因子, 细胞凋亡依赖一类对 Caspase 产生的级联反应, 能够通过自身切割活化, 激活下游 Caspase, 产生凋亡效应^(6,7)。Cytc 是一种可溶性多肽, 定位于膜间隙, 并与线粒体内膜疏松结合。近来, 有一系列的研究表明, Cytc 是通过和 dATP 与 Apaf1 及 Caspase-9 结合, 从而活化 Caspase-3 而起作用⁽⁸⁾。

综上, 顺铂、PGF、联合组既通过死亡受体途径又通过线粒体途径诱导 H₂₂ 肿瘤细胞凋亡, 且 PGF 可通过增加顺铂对癌细胞的敏感性而增强抗癌作用。

4 参考文献

- 1 杜景卫, 夏作理, 李清初, 等. 灰树花多糖抗 S180 肉瘤的实验研究 (J). 泰山医学院学报, 2005; 25(2): 195-7.
- 2 吕冬霞, 杜伟, 范晓艳, 等. 灰树花多糖联合顺铂对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡的影响 (J). 黑龙江医药科学, 2011; 34(3): 72.
- 3 Bradham CA, Qian T, Streetz K, et al. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome C release (J). Mol Cell Biol, 1998; 18(11): 6353-64.
- 4 Rao RV, Hermel E. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation (J). J Biol Chem, 2001; 276(36): 33869-74.
- 5 Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis (J). Nature, 1995; 376(6535): 37-43.
- 6 Zhang W, Shi HY, Zhang M. Maspin overexpression modulates tumor cell apoptosis through the regulation of Bcl-2 family proteins (J). BMC Cancer, 2005; 5(1): 50.
- 7 Werner AB, Vries E, Tait SW, et al. Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax (J). J Biol Chem, 2002; 277(25): 22781-8.
- 8 Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade (J). Cell, 1997; 91(4): 497-89.

(2013-03-26 收稿 2013-07-13 修回)

(编辑 袁左鸣)