

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.03.017

当归红芪超滤物对 TM40D 人乳腺癌荷瘤小鼠的放射增敏作用

寇 炜^{*}, 马卫红¹, 岳一平¹, 刘 凯², 雷立昇¹, 周云松¹, 曾茂兰¹

(1. 西北民族大学医学院, 甘肃省兰州市西北新村 1 号, 730030; 2. 甘肃中医学院)

基金项目: 甘肃省兰州市科技发展计划项目 (2011-2-59)

摘要 目的 探讨当归红芪超滤物是否对 TM40D 人乳腺癌荷瘤小鼠具有放射增敏效应, 并探讨其效应的可能机制。方法 40 只 TM40D 人乳腺癌荷瘤小鼠随机分为对照组、药物组、放射组和联合组, 每组 10 只。各组小鼠待肿瘤体积为 120 mm^3 时, 对照组给予 0.9% NaCl 溶液 0.3 ml/d 灌胃; 药物组给予当归红芪超滤物 1.44 g/kg 灌胃; 放射组给予一次性 6Gy 射线照射; 联合组给予当归红芪超滤物 1.44 g/kg 灌胃和一次性 6Gy 射线照射。各组连续灌胃 30 d 后, 观察小鼠移植瘤重量和抑瘤率、肿瘤生长延迟时间 (TGD)、肿瘤体积生长至放射治疗前 3 倍所需时间 (TGT3) 及联合组的增敏系数 (EF), 检测各组小鼠肿瘤组织中 p53 mRNA 及其蛋白的表达。结果 联合组小鼠移植瘤重量显著低于对照组、药物组、放射组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 联合组的抑瘤率显著高于药物组和放射组 ($P < 0.01$)。联合组小鼠 TGT3、TGD 较药物组和放射组明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), EF 为 1.95。联合组 p53 mRNA 及蛋白表达亦明显高于药物组、放射组 ($P < 0.05$)。结论 当归红芪超滤物可以增强 TM40D 人乳腺癌荷瘤小鼠的放射敏感性, 其机制可能是通过上调 p53 蛋白及其 mRNA 表达而发挥作用。

关键词 当归红芪超滤物; 乳腺癌; 放射增敏; 抑瘤率; p53

乳腺癌是严重威胁女性健康的恶性肿瘤之一, 放疗是早期乳腺癌治疗的重要手段, 但患者在接受放疗时可能出现乏氧性的放射抗拒、肿瘤复发、细胞周期再分布等因素影响了放疗疗效, 因此, 寻找一种高效低毒的放疗增敏剂成为研究的热点。放疗增敏药与放疗的联合使用可以更好地提高疗效, 同时降低放射剂量, 从而减轻高剂量放射引起的副作用。有研究显示, 部分中药有效部位具有肯定的增强机体免疫功能及抗肿瘤、增加放射敏感性的作用^[1]。当归、红芪为甘肃道地药材, 具有扶正祛邪、益气固本的功效。本研究探讨了当归红芪超滤物对 TM40D 人乳腺癌荷瘤小鼠放射敏感性的影响及其可能作用机制, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物与细胞株

SPF 级昆明种小鼠 40 只, 雌性, 体重 18 ~ 22 g, 5 ~ 6 周龄, 购于兰州大学实验动物中心, 实

验动物许可证号: SCXK (甘) 2010-0006; 人乳腺癌 TM40D 细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所。

1.2 药品、试剂与仪器

当归、红芪均购自甘肃岩昌, 经甘肃中医学院生药学教研室鉴定当归为伞形科植物的干燥根, 红芪为多序岩黄芪的干燥根茎, 当归红芪超滤物 (1:5) 由甘肃省膜科学研究所与甘肃中医学院科研实验中心联合制备^[2-3]。0.9% NaCl 溶液 (批号: 09123102) 购于广东艾希德药业有限公司, DMEM (批号: NXB0528)、胎牛血清 (批号: 110809) 购自杭州四季青生物工程公司, Trizol (批号: 15573-036) 购自美国 Invitrogen 公司, HRP 标记的羊抗兔抗体 (批号: MO822-12)、SP-9000 及 DAB 染色试剂 (批号: 60882725) 购于北京中杉金桥生物技术有限公司, PVDF 膜 (批号: FFP30)、RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (批号: DRR012A) 购自美国 Takara 公司, ECL 发光试剂盒 (批号: P0012A) 购于上海碧云天生物技术有

* 通讯作者: yxkw@xbmu.edu.cn, 13893483407

限公司, RNA 引物由上海生工生物工程有限公司合成。蛋白质印迹法 (Western blot) 试剂盒 (批号: BS392-MS) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。二氧化碳培养箱 (日本 Sanyo 公司), P1303 电子天平 (上海越平科学仪器有限公司), PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司), PRIMUS 型医用电子直线加速器 (德国 Siemens 公司)。

1.3 细胞培养及荷瘤小鼠模型建立^[4]

人乳腺癌 TM40D 细胞用含 10% 小牛血清、10g/L 双抗 (100 mg/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素) 的 DMEM 全培养液置于 37℃ 含 50 ml/L CO₂ 温箱内中培养, 48 ~ 72 h 换液 1 次, 取对数生长期细胞进行实验。将培养的 TM40D 细胞配成单细胞悬液, 每只裸鼠背部皮下按 0.2 ml 接种, 每只小鼠平均接种 2×10^7 个细胞, 共 40 只。移植瘤长至直径为 5 mm 时认为接种成功。

1.4 动物分组及处理

将 TM40D 荷瘤小鼠按照体重简单随机分成对照组、药物组、放射组和联合组, 每组 10 只。各组小鼠待肿瘤体积为 120 mm³ 时, 对照组给予 0.9% NaCl 溶液 0.3 ml/d 灌胃, 药物组给予当归红芪超滤物 1.44 g/kg 灌胃, 放射组给予一次性 6Gy 射线照射, 联合组给予当归红芪超滤物 1.44 g/kg 灌胃和一次性 6Gy 射线照射。连续灌胃 30 天后采用断颈法处死荷瘤小鼠, 进行指标检测。

1.5 观察指标及方法

①观察各组小鼠一般情况, 如活动、进食; ②停药次日称重并处死小鼠, 剥离瘤块, 称瘤重和测量肿瘤体积, 计算抑瘤率。肿瘤体积 = $\pi/6$ (长径 × 短径²), 抑瘤率 = $(1 - \text{实验组移植瘤体积} / \text{对照组移植瘤体积}) \times 100\%$; ③肿瘤生长延迟时间 (TGD): 肿瘤体积生长至放射治疗前 3 倍所需时间为肿瘤 3 倍倍增时间 (TGT3), 实验组的 TGT3 与对照组的 TGT3 之差为 TGD; ④增敏系数 (EF) = 联合组 TGD / 放射组 TGD, EF > 1 提示有放射增敏效应; ⑤RT-PCR 法检测肿瘤组织 p53 mRNA 的表达, p53 的上游引物为 5'-CCACCATC-CACTACAACATACAT-3', 下游引物为 5'-AGGACAG-GCACAAACACG-3', 内参照 β -actin 的上游引物 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3', 下游引物 5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA3', 反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 30 s、56℃ 30 s、72℃ 1 min 扩增 32 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。UVP 凝胶图像分析系统摄片并测定分析其光密度, 计算各个样本 p53 mRNA 表达水平, 表达量的相对值 = 待测

基因扩增条带的灰度值 / β -actin 基因扩增条带的灰度值; ⑥Western blot 检测 p53 蛋白的表达, 为消除组内差异, 组内各例样品等量混合。剪碎组织, 加入蛋白提取液, 于冰上充分裂解, 用考马斯亮蓝试剂盒提取总蛋白, BCA 法测蛋白浓度后。取 40 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 将电泳后的蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭后, 分别用抗 Cap43 和 β -actin 的一抗孵育 (1 : 1000), 4℃ 冰箱过夜, HRP 标记的羊抗兔二抗 (1 : 1000) 孵育, ECL 化学发光显色, 由 Bio-Rad 凝胶成像仪摄取凝胶图像, 测定其结果的面积及灰密度值, 每项实验重复 3 次。以 Marker 指示目的蛋白分子量部位出现特异性蛋白条带且该条带半定量结果大于其癌旁正常对照为阳性判断标准。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析, 计量数据均以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况

移植性实体瘤接种成功率为 100%, 实验结束时荷瘤小鼠均全部成活。小鼠在接种肿瘤细胞的 5 d 内, 活动饮食正常, 外观无明显变化, 第 5 日后可在皮下触及米粒样肿块, 后肿瘤逐日增大。对照组肿瘤生长较快, 并且小鼠饮食减少, 活动减少, 毛发杂乱、无光泽, 竖毛现象明显; 其他各组肿瘤生长相对缓慢, 联合组小鼠比药物组、放射组的小鼠活泼, 皮毛有光泽, 竖毛现象不明显。

2.2 各组小鼠移植瘤重量及抑瘤率比较

表 1 示, 药物组、放射组及联合组的移植瘤重量明显低于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 联合组小鼠移植瘤重量较药物组、放射组亦明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。放射组和联合组小鼠抑瘤率高于药物组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并且联合组小鼠抑瘤率亦高于放射组 ($P < 0.01$)。图 1 示, 各组小鼠移植瘤的体积随时间延长均呈增大变化, 对照组的增幅最大, 联合组增幅最小。

表 1 各组小鼠移植瘤重量及抑瘤率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	重量 (g)	抑瘤率 (%)
对照组	10	1.782 ± 0.298	—
药物组	10	1.415 ± 0.217*	28.84 ± 3.12
放射组	10	1.120 ± 0.192*	39.76 ± 5.31 Δ
联合组	10	0.598 ± 0.113** $\Delta\Delta$	70.62 ± 6.24 $\Delta\Delta$

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与药物组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与放射组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

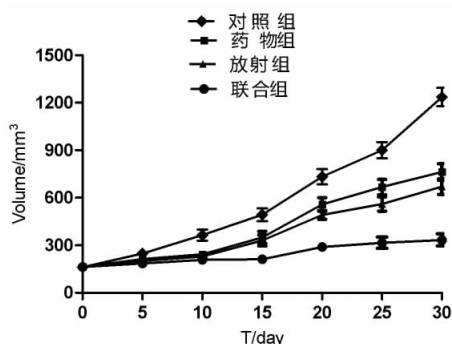


图1 各组小鼠移植瘤生长体积曲线图

2.3 各组小鼠 TGT3、TGD 比较

表2示, 药物组、放射组、联合组小鼠 TGT3 较对照组明显延长 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 联合组小鼠 TGT3、TGD 较药物组和放射组明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。联合组的 $EF = 1.95$, 表明当归红芪超滤物能抑制肿瘤生长, 能增加荷瘤小鼠对放射线的敏感性。

表2 各组小鼠 TGT3、TGD 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TGT3	TGD
对照组	10	7.5 ± 0.21	—
药物组	10	14.2 ± 0.26*	7.0 ± 0.17
放射组	10	17.2 ± 0.34*	9.7 ± 0.20
联合组	10	26.5 ± 0.43**△▲▲	19.0 ± 0.31△▲

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与药物组比较, △ $P < 0.01$; 与放射组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

2.4 各组小鼠肿瘤组织 p53 mRNA 及其蛋白表达比较

表3示, 与对照组比较, 药物组、放射组和联合组 p53 mRNA 及其蛋白表达逐渐升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。联合组 p53 mRNA 及其蛋白表达亦明显高于药物组、放射组 ($P < 0.05$)。各组小鼠 p53 mRNA 及其蛋白电泳图见图2、图3。

表3 各组小鼠肿瘤组织 p53 mRNA 及其蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	p53 mRNA	p53 蛋白
对照组	10	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.02
药物组	10	0.58 ± 0.04*	0.39 ± 0.04*
放射组	10	0.63 ± 0.05**	0.43 ± 0.04*
联合组	10	0.87 ± 0.06**△▲	0.67 ± 0.05**△▲

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与药物组比较, △ $P < 0.05$; 与放射组比较, ▲ $P < 0.05$

3 讨论

当归为甘肃道地药材, 其主要活性组分为多糖、阿魏酸、挥发油等, 现代药理研究表明, 当归

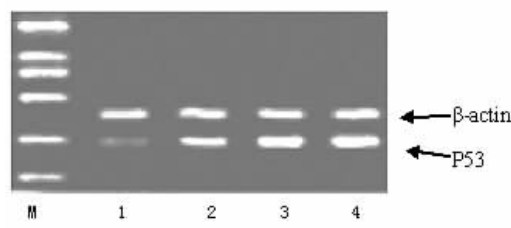


图2 各组小鼠肿瘤组织 p53 mRNA 电泳图

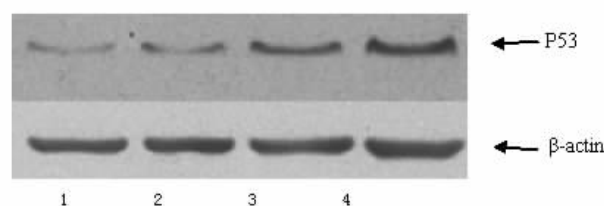


图3 各组小鼠肿瘤组织 p53 蛋白电泳图

具有提高免疫力、抗肿瘤、抗辐射和清除自由基等功效^[5-7]。曹蔚等^[8]研究发现, 当归多糖可明显抑制肿瘤细胞增殖, 呈现明显的时—效与量—效关系, 当归多糖还可通过调节细胞周期的关键点来达到辐射保护的目的。红芪为豆科岩黄芪属植物, 《中华人民共和国药典》^[9] 2010 年版收载的常用中药红芪为多序岩黄芪的根, 因与黄芪药效相近, 所以在我国很多地区以红芪代黄芪入药, 红芪具有扶正祛邪、益气固本的功效, 其主要成分有红芪多糖、黄芪总黄酮 (TFA) 等活性组分。李云志等^[10]采用硅胶柱色谱及 Sephadex LH-20 等方法分离其成分, 其中首次研究并确定的化合物 IX 为紫檀烷类化合物, 结果显示, 其对 HepG2 具有一定的抗肿瘤活性。我们前期研究发现, 红芪超滤物对人肝癌 HepG2 细胞具有辐射增敏作用, 其辐射增敏机制可能通过下调 Survivin mRNA 表达与促进细胞凋亡有关^[11]。

较为理想的放射增敏剂除了要求有较高的放射增敏系数和抑瘤率外, 其治疗剂量下的不良反应越低越好^[12]。本研究结果显示, 各组移植瘤的体积随时间延长均呈增大变化, 但对对照组的增幅最大, 联合组增幅最小, 联合组的抑瘤率显著高于药物组和放射组 ($P < 0.01$)。联合组能增加辐射敏感性, 增敏系数 EF 为 1.95, 表明当归红芪超滤物能抑制肿瘤生长, 能增加 TM40D 人乳腺癌荷瘤小鼠对放射线的敏感性。

p53 是一类转录调节因子, 是过去 20 年里被

研究得最为频繁的肿瘤抑制因子之一^[3], 定位于 17q13.1 上, 编码由 393 个氨基酸残基组成的 p53 蛋白, 细胞凋亡过程被认为依赖于 p53 基因^[4]。本研究结果显示, 药物组和放射组均能上调 p53 蛋白及其 mRNA 表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而联合组上调 p53 蛋白及其 mRNA 表达效果较药物组和放射组更加显著 ($P < 0.05$)。由此可见, 我们认为当归红芪超滤物可以增加 TM40D 人乳腺癌荷瘤小鼠的辐射敏感性, 其机制可能是通过上调肿瘤抑制因子 p53 蛋白及其 mRNA 表达, 加强诱导凋亡而发挥作用, 但是否还通过其他途径提高辐射敏感性, 尚有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 杨莹, 张宇忠. 天然中药抗肿瘤机制的研究进展 [J]. 医学综述, 2010, 16(3): 363-365.
- [2] 樊秦, 李应东, 舒畅, 等. 超滤膜分离纯化当归补血汤的研究 [J]. 中成药, 2010, 32(8): 1438-1440.
- [3] 韩永萍, 林强, 何绪文. 膜分离技术在传统中药生产中的应用 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(8): 1983-1985.
- [4] 吴广洲, 沈振亚, 刘国锋, 等. 三氧化二砷对人肺腺癌细胞 A549/DDP 裸鼠体内的多药耐药逆转作用 [J]. 苏州大学学报(医学版), 2011, 31(1): 79-83.
- [5] 陈曦, 曹蔚, 孙阳, 等. 当归多糖 APS2bII 的结构特征及体外抗肿瘤作用 [J]. 科学技术与工程, 2010, 10(8): 1839-1842.
- [6] 孙元琳, 顾小红, 李德远, 等. 当归多糖对急性辐射损伤小鼠的防护作用研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(2): 305-308.
- [7] 孙文平, 罗红, 杨光, 等. 当归多糖激发免疫反应的特征研究 [J]. 大连医科大学学报, 2009, 31(3): 262-264.
- [8] 曹蔚, 李小强, 侯颖, 等. 当归多糖-ICII 的抗肿瘤活性研究 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(12): 1018-1021.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国科技医药出版社, 2010: 142.
- [10] 李云志, 黄静, 郭弘川, 等. 红芪化学成分和抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1195-1198.
- [11] 寇伟, 李应东, 刘凯, 等. 红芪超滤物对人肝癌 HepG2 细胞辐射敏感性的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(2): 220-224.
- [12] 沈俞. 肿瘤放疗相关研究的进展 [J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2005, 14(1): 71-72.
- [13] Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(4): 275-283.
- [14] Nayak SK, Panesar PS, Kumar H. p53-Induced apoptosis and inhibitors of p53 [J]. Curr Med Chem, 2009, 16(21): 2627-2640.

Radiosensitization Effect of Angelica-Radix Hedysari Ultrafiltration Membrane Extract in TM40D Human Breast Tumor-Bearing Mice

KOU Wei¹, MA Weihong¹, YUE Yiping¹, LIU Kai², LEI Liyi¹, ZHOU Yunsong¹, ZENG Maolan¹

(1. Medical School of Northwest University for Nationalities, Gansu Province 730030; 2. Gansu University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To study the radiosensitization effect of Angelica-Radix Hedysari ultrafiltration membrane extract in TM40D human breast tumor-bearing mice and its possible mechanism. **Methods** Forty TM40D human breast tumor-bearing mice were randomized into the control group, drug group, radiation group and combination group, with 10 in each. The control group was gavaged with 0.3 ml/d of normal saline, drug group was gavaged with 1.44 g/kg of Angelica-Radix Hedysari ultrafiltration membrane extract, radiation group was given a one-time 6Gy ray, and combination group was given 1.44 g/kg of Angelica-Radix Hedysari ultrafiltration membrane extract and a one-time 6Gy ray when the tumor volume in mice was 120mm³. The tumor weight, tumor-inhibition rate, tumor-growth delay (TGD), time required for tumor volume growth to 3 times as before radiation (TGT3) and enhancement factor (EF) in the combination group was observed after 30 days of administration. The expressions of p53 mRNA and its protein were detected. **Results** The tumor weight in the combination group was significantly lower than that in the control group, drug group and radiation group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The tumor-inhibition rate in the combination group was significantly higher than that in the drug group and radiation group ($P < 0.01$). The TGT3 and TGD in the combination group was significantly increased as compared with the drug group and radiation group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The EF in the combination group was 1.95. The expressions of p53 mRNA and its protein in the combination group were significantly higher than those in the drug group and radiation group ($P < 0.05$). **Conclusion** Angelica-Radix Hedysari ultrafiltration membrane extract can enhance the radiosensitivity of TM40D human breast tumor-bearing mice probably by upregulating the expression of p53 mRNA and its protein.

Keywords Angelica-Radix Hedysari ultrafiltration membrane extract; breast cancer; radiosensitization; tumor-inhibition rate; p53

(收稿日期: 2013-06-18; 修回日期: 2013-11-19)

编辑: 邓 媛