

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.08.013

槲皮素联合白藜芦醇对小鼠 Lewis 肺癌细胞生长的抑制作用

张 隽,曹培国,潘宇亮

Inhibitory Effects of Quercetin in Combined with Resveratrol on Growth of Lewis Lung Cancer in Mice

Zhang Jun, Cao Peiguo, Pan Yuliang

Department of Oncology, The Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China

Corresponding Author: Cao Peiguo, E-mail: caopeiguo@cscs.org.cn

Abstract: Objective To explore the inhibitory effects and mechanism of quercetin plus resveratrol on the growth of lewis lung cancer in mice. **Methods** Forty C57BL/6 mice with transplanted Lewis lung cancer were randomly divided into 4 groups with 10 mice in each group: control group, quercetin group, resveratrol group and combined group. Different treatments were served from day 4 and all mice were sacrificed on day 24 after transplantation. Tumor volume, weight and inhibitory rate were compared among the 4 groups. The expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and apoptosis index (AI) were detected by immunohistochemistry, western blot and TUNEL, respectively. **Results** Tumor growth was significantly inhibited in drug-treated groups. Tumor volume and weight in drug-treated groups was lower than that of the control group ($P < 0.05$ or 0.01). The anti-tumor efficacy of quercetin plus resveratrol was significantly higher compared with quercetin or resveratrol alone ($P < 0.05$). Expression levels of VEGF and MMP-2 were decreased in drug-treated groups compared with the control group ($P < 0.05$ or 0.01). AI increased in drug-treated groups compared with the control group ($P < 0.05$ or 0.01). There was significant difference in the VEGF and MMP-2 expression as well as AI between combined group and drug-treated alone group ($P < 0.01$). **Conclusion** Quercetin in combination with resveratrol had a strong inhibitory effect on the growth of lung cancer which might be related to the down-regulation of VEGF and MMP-2 and as well as the induction of cell apoptosis.

Key words: Lung cancer; Quercetin; Resveratrol; Vascular endothelial growth factor; Matrix metalloproteinase-2

摘要:目的 观察槲皮素联合白藜芦醇对小鼠 Lewis 肺癌细胞生长的作用及机制。**方法** 建立 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌移植瘤模型,随机分为对照组、槲皮素组、白藜芦醇组和联合用药组,每组 10 只,连续用药 20 天,于接种后第 24 天处死全部小鼠,比较各组肿瘤体积、肿瘤质量和抑瘤率,并用免疫组织化学、Western blot、TUNEL 分别检测血管内皮生长因子 (VEGF)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 表达及凋亡指数 (AI)。**结果** 各用药组肿瘤的生长明显受到抑制,肿瘤体积和肿瘤质量明显低于对照组 ($P < 0.05$ 或 0.01),联合用药组较单独用药组抑瘤作用显著增强 ($P < 0.05$)。各用药组较对照组 VEGF、MMP-2 表达降低 ($P < 0.05$ 或 0.01),AI 升高 ($P < 0.05$ 或 0.01)。与单独用药组比较,联合用药组 VEGF、MMP-2 表达下调,AI 升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 槲皮素联合白藜芦醇对小鼠 Lewis 肺癌细胞生长具有明显的抑制作用,其机制可能与下调 VEGF 和 MMP-2 表达、促进细胞凋亡有关。

关键词: 肺癌;槲皮素;白藜芦醇;血管内皮生长因子;基质金属蛋白酶-2

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2012)08-0936-04

0 引言

肺癌是当今世界上发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,造成其死亡率高的原因有多种,其中重要因素之一是现有的治疗手段对中晚期患者的疗效仍较差^[1]。近年来,从中药及天然植物中提取不良反应低的抗肿瘤有效成分,已成为肿瘤治疗的新途径。

收稿日期:2011-10-29;修回日期:2012-01-18

作者单位:410013 长沙,中南大学湘雅三医院肿瘤科

通信作者:曹培国, E-mail: caopeiguo@cscs.org.cn

作者简介:张隽 (1977-),女,硕士,主治医师,主要从事肺癌的防治研究工作

众多研究显示槲皮素和白藜芦醇在体内外均具有良好的抗肺癌作用^[2-3],但两者联用的效果如何,尚未见报道。本实验采用 Lewis 肺癌细胞建立 C57BL/6 小鼠移植瘤模型,观察槲皮素联合白藜芦醇对 Lewis 肺癌细胞生长的作用,并探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞株、药品及试剂

雄性 C57BL/6 小鼠 40 只,5 周龄,体质量(20 ± 2)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司。Lewis 肺癌细胞株由中科院上海细胞研究所提供,使用 DMEM(含 10 ml/L 灭活胎牛血清、100 u/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素)培养液,置于 37℃、50 ml/L CO₂培养箱中培养。槲皮素和白藜芦醇购自美国 Sigma 公司。兔抗鼠 VEGF 单抗购自福州迈新生物技术开发有限公司。TUNEL 凋亡检测试剂盒、兔抗鼠 MMP-2 单抗及 SP 免疫组织化学试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 模型制备与分组给药

收集对数生长期的细胞,胰酶消化后,1 000 r/min 离心 10 min,PBS 洗涤,无血清的 DMEM 制成细胞悬液,细胞浓度达到 1 × 10⁷ cells/ml,用 1 ml 的注射器于 C57BL/6 小鼠右腋下皮下接种 0.2 ml 细胞悬液。40 只 C57BL/6 小鼠接种后随机分为 4 组:对照组、槲皮素组、白藜芦醇组和联合用药组,每组 10 只。对照组:丙二醇 0.2 ml + 0.9%氯化钠溶液 0.1 ml,腹腔注射,1 次/天;槲皮素组:槲皮素 50 mg/kg 溶于丙二醇 0.2 ml + 0.9%氯化钠溶液 0.1 ml,腹腔注射,1 次/天;白藜芦醇组:丙二醇 0.2 ml + 白藜芦醇 10 mg/kg 溶于 0.1 ml 0.9%氯化钠溶液,腹腔注射,1 次/天;联合用药组:槲皮素 50 mg/kg 溶于丙二醇 0.2 ml + 白藜芦醇 10 mg/kg 溶于 0.1 ml 0.9%氯化钠溶液,腹腔注射,1 次/天。各组均于接种后第 4 天给药,连续给药 20 天,给药期间,每隔 2 天用游标卡尺测量小鼠皮下瘤结节大小,计算肿瘤体积 V(mm³) = 0.52ab²(a 为瘤体最长径,b 为最短径)。于接种后第 24 天将所有小鼠颈椎脱臼处死,剥离皮下瘤,称瘤重,计算抑瘤率,抑瘤率 = [(对照组平均瘤重 - 治疗组平均瘤重) / 对照组平均瘤重] × 100%。随后立即将瘤块分成两块,一块以常规 10%中性甲醛固定,制成石蜡切片后行 HE 染色、免疫组织化学及 TUNEL 检测,另一块迅速放置液氮冻存,待提取蛋白,检测肿瘤组织中 MMP-2 蛋白的表达。

1.3 病理学与免疫组织化学检测

肿瘤组织行常规 HE 染色,光镜下观察各组肿瘤组织病理学变化特征。采用免疫组织化学 SP 法检测血管内皮生长因子(VEGF)的表达。VEGF 的

判定标准:高倍镜下计数 100 个细胞,肿瘤细胞胞质及胞膜中呈棕黄色阳性细胞 < 10% 为阴性,≥ 10% 为阳性,采用全自动图像分析系统测定肿瘤组织中 VEGF 的平均光密度值。

1.4 Western blot 检测移植瘤组织 MMP-2 蛋白表达

取不同处理组的肿瘤组织液氮碾磨,三去污裂解液裂解。BCA assay reagent 测定蛋白浓度,50 μg 蛋白与加样缓冲液混合,在 10%不连续十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳胶中电泳分离,电转移至 PVDF 膜,孵育一抗、二抗,用 ECL 发光法显色,曝光、显影、定影。胶片采用薄层扫描仪测定印迹区带的吸光度值。

1.5 细胞凋亡

用 TUNEL 原位凋亡法检测。细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性细胞。凋亡细胞半定量分析:在 400 高倍视野下,每张切片计数 5 个高倍视野,分别计算每个视野细胞核数及凋亡阳性细胞核数,取均值,计算凋亡指数(apoptosis index, AI): AI(%) = 凋亡阳性的细胞核数 / 总计数的细胞核数 × 100%。

1.6 统计学方法

所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用组间 *t* 检验,多本均数间多重比较的方差分析及 *q* 检验,数据分析采用 SPSS13.0 统计软件完成, *P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组药物对小鼠肿瘤生长的影响

接种后,成瘤率为 100%,各组皮下移植瘤的体积逐渐增大,肿瘤呈局部结节状生长,接种后的第 1~4 天,肿瘤生长基本相同,第 12~24 天,对照组肿瘤生长明显快于其他组,联合用药组生长最慢。实验结束后,各用药组肿瘤体积和肿瘤质量均显著低于对照组(*P* < 0.05 或 0.01),联合用药组肿瘤体积和肿瘤质量较单独用药组降低,抑瘤率则升高,差异均有统计学意义(*P* < 0.05),见表 1。

表 1 药物对移植瘤生长的影响

Table 1 Effect of quercetin and(or) resveratrol on the growth of transplanted tumor

Groups	<i>n</i>	Tumor volume (cm ³)	Tumor weight (g)	Inhibitory rate (%)
Control	10	6.53 ± 1.12	5.74 ± 0.98	0
Quercetin	10	4.11 ± 0.83 ^{ac}	3.62 ± 0.51 ^{ac}	36.93 ^c
Resveratrol	10	3.85 ± 0.79 ^{ac}	3.45 ± 0.64 ^{ac}	39.89 ^c
Combined	10	2.57 ± 0.43 ^b	2.38 ± 0.39 ^b	58.54

Note: ^a: *P* < 0.05, ^b: *P* < 0.01 vs. control group; ^c: *P* < 0.05 vs. combined group

2.2 肿瘤组织病理学改变

对照组小鼠肿瘤细胞轮廓清晰,细胞核大而深染,核浆比大,异型性明显,核分裂相较多见;槲皮素组、白藜芦醇组和联合用药组小鼠肿瘤细胞排列较整齐,基质和间质减少,少许细胞出现核固缩,似凋亡细胞。

2.3 各组肿瘤组织 VEGF 的表达

免疫组织化学染色显示,VEGF 蛋白阳性物质呈棕黄色颗粒状,位于胞质及胞膜,见图 1。槲皮素组、白藜芦醇组、联合用药组 VEGF 表达水平均显著低于对照组 ($P < 0.05$ 或 0.01),与槲皮素组、白藜芦醇组比较,联合用药组 VEGF 表达明显下降,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见表 2。

2.4 各组肿瘤组织 MMP-2 表达

Western blot 结果显示,各用药组 MMP-2 蛋白表达水平均较对照组下降 ($P < 0.05$ 或 0.01),联合用药组其表达亦低于单独用药组 ($P < 0.01$),但槲皮素组与白藜芦醇组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 2、表 2。

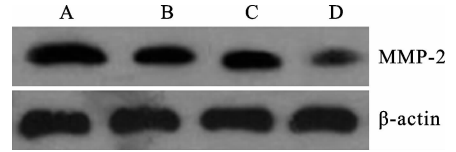
表 2 各组肿瘤组织 VEGF、MMP-2 表达及 AI 比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of the expression levels of VEGF and MMP-2 as well as AI in tumor tissues in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	VEGF	MMP-2	AI(%)
Control	10	0.57 ± 0.11	0.84 ± 0.21	16.37 ± 3.54
Quercetin	10	0.41 ± 0.07 ^{ac}	0.61 ± 0.17 ^{ac}	27.65 ± 4.21 ^{ac}
Resveratrol	10	0.34 ± 0.05 ^{ac}	0.53 ± 0.14 ^{bc}	29.17 ± 4.68 ^{ac}
Combined	10	0.19 ± 0.03 ^b	0.34 ± 0.09 ^b	46.79 ± 5.92 ^b

Note: ^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$ vs. control group; ^c: $P < 0.01$ vs. combined group

2.5 各组肿瘤细胞凋亡

TUNEL 染色显示,凋亡细胞明显固缩,核致密,深染为棕黄色多叶状或新月状颗粒,常聚集在核周边,未凋亡的细胞核呈蓝绿色,见图 3。各用药组 AI 较对照组升高 ($P < 0.05$ 或 0.01),联合用药组 AI 显著高于槲皮素组和白藜芦醇组 ($P < 0.01$),见表 2。



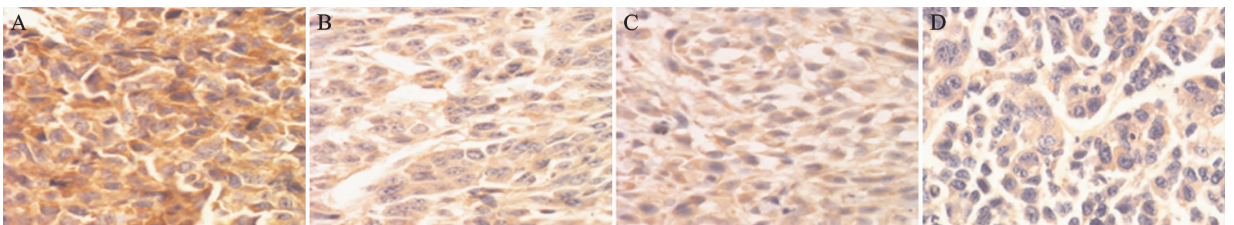
A: control group; B: quercetin group; C: resveratrol group; D: combined group

图 2 Western blot 检测各组肿瘤组织 MMP-2 的表达
Figure 2 Expression of MMP-2 measured by Western blot in the tumor tissues in the 4 groups

3 讨论

槲皮素是一种天然的黄酮类化合物,体外实验证实其对白血病、前列腺癌、肝癌、肺癌、结肠癌等有抑制作用^[4]。白藜芦醇属非黄酮类多酚化合物,在肿瘤的启动、促进及发展三个过程中都具有抗肿瘤作用,而且可以抑制肿瘤血管形成^[5]。本实验研究表明,联合用药组移植瘤的生长速度与其他各组比较明显减慢,最后的肿瘤重量和体积明显减少,抑瘤率显著高于其他组,且在实验过程中,各组均未发现明显不良反应,提示槲皮素和白藜芦醇具有抑瘤效果好而不良反应小的优点,两者联合应用有协同作用。

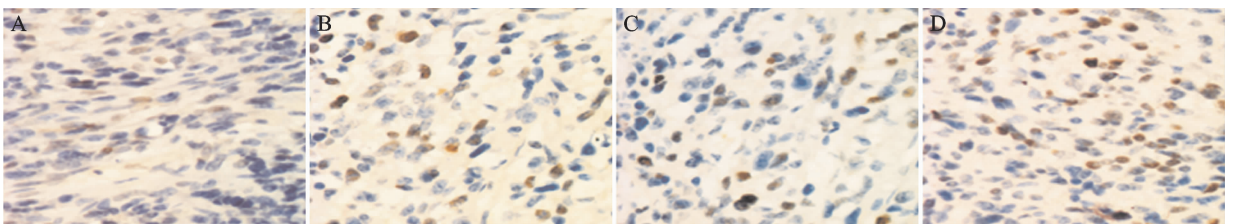
肿瘤发生与发展离不开新生血管的形成,新生血管为肿瘤细胞增殖、生长提供营养代谢。研究发现



A: control group; B: quercetin group; C: resveratrol group; D: combined group

图 1 各组肿瘤组织 VEGF 表达 (SP × 400)

Figure 1 Expression of VEGF in the tumor tissues in the 4 groups (SP × 400)



A: control group; B: quercetin group; C: resveratrol group; D: combined group

图 3 各组肿瘤细胞凋亡 (TUNEL × 400)

Figure 3 Apoptosis of the tumor cells in the 4 groups (TUNEL × 400)

肿瘤发生发展的每一步都与血管的形成密切相关,血管的生成贯穿了肿瘤发生与发展过程的始终,因此抑制肿瘤组织血管的生成可发挥良好的抗肿瘤作用^[6]。VEGF 作为一种最重要的血管生长因子在血管生成中起中心作用,能特异性地刺激血管内皮细胞和肿瘤细胞的增殖和迁移。因此,VEGF 被认为是预测肿瘤转移、复发和预后的一项重要指标,并被用于检测肿瘤血管对抗血管生成药物敏感度的常用指标^[7]。本实验结果显示,对照组 VEGF 高表达,且在癌肿浸润的边缘表达更为明显,表明 Lewis 肺癌细胞在生长过程中高表达 VEGF,形成了丰富的新生血管,从而促进了肿瘤的生长和转移,当单独或联合使用槲皮素和白藜芦醇进行干预治疗后,VEGF 表达降低,其中以联合用药组降低最为明显,表明槲皮素联合白藜芦醇在体内能明显地下调 VEGF 的表达,抑制肿瘤血管生成,从而达到抑制肿瘤生长与增殖的目的。

MMP-2 不仅可以降解基底膜和基质、突破基质屏障、促进肿瘤侵袭和转移,而且还可通过毛细血管内生成及新生血管生成等方式促进肿瘤生长和扩散。李红梅等^[8]研究提示肿瘤侵袭转移的能力与其产生或诱导产生金属蛋白酶的能力呈正相关。有研究表明,MMP-2 在肺癌组织中的表达明显增加,其表达与肿瘤的生长、进展、转移及预后密切相关^[9]。本研究结果显示,各用药组均能下调 MMP-2 蛋白的表达,其中以联合用药组最显著,证实槲皮素与白藜芦醇都有可能通过抑制 MMP-2 活性而发挥抗肿瘤作用,且两药联用效果明显优于单一用药。

肿瘤的发生、发展不仅是由于肿瘤细胞过度增殖,还与肿瘤细胞凋亡的速度过慢有关,细胞凋亡对肿瘤的发生、发展起到负调控作用^[10]。因此,诱导细胞凋亡是研究治疗肿瘤的重要途径。本研究显示,各用药组都能显著提高肿瘤细胞的 AI,尤其以联合用药组增加最明显,说明槲皮素和白藜芦醇都能促进肿瘤细胞凋亡,而联合应用则使促凋亡作用进一步增强,并且说明具有不同抗癌机制的药物联合应用有增强抗癌活性的效果。

综上所述,本实验研究表明槲皮素联合白藜芦醇对小鼠 Lewis 肺癌细胞生长具有明显的抑制作用,且两药联用作用优于单独用药,其机制可能与下调 VEGF 和 MMP-2 表达、促进细胞凋亡有关,但是具体机制还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Sève P, Dumontet C. Chemoresistance in non-small cell lung cancer[J]. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2005, 5(1): 73-88.
- [2] Murakami A, Ashida H, Terao J. Multitargeted cancer prevention by quercetin[J]. *Cancer Lett*, 2008, 269(2): 315-25.
- [3] Weng CJ, Yang YT, Ho CT, et al. Mechanisms of apoptotic effects induced by resveratrol, dibenzoylmethane, and their analogues on human lung carcinoma cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(12): 5235-43.
- [4] Long QD, Xiong SQ, Zhao X. Research progress of quercetin chemical prevention of cancer and antitumor function [J]. *Zhonghua Fu You Lin Chuang Yi Xue Za Zhi(Dian Zi Ban)*, 2008, 4(4): 56-9. [龙奇达,熊绍权,赵霞.槲皮素的癌化学预防和抗肿瘤作用研究进展[J].中华妇幼临床医学杂志(电子版),2008,4(4):56-9.]
- [5] Hu LY, Wang HN, Pei JJ, et al. Research progress of resveratrol anticancer action and molecular mechanism[J]. *Shandong Yi Yao*, 2010, 50(s): 111-2. [胡凌云,王海钠,裴俊俊,等.白藜芦醇防癌抗癌作用及其分子机制研究进展[J].山东医药,2010,50(5):111-2.]
- [6] Mulkeen AL, Silva T, Yoo PS, et al. Short interfering RNA mediated gene silencing of vascular endothelial growth factor: Effects on cellular proliferation in colon cancer cells[J]. *Arch Surg*, 2006, 141(4): 367-74.
- [7] Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, et al. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: A systematic review of the literature and meta analysis [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(9): 2941-55.
- [8] Li HM, Fang WG, Zheng J, et al. Zymographic analysis of MMPs in human carcinoma cell lines with different metastasis potential[J]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 1998, 27(5): 341-3. [李红梅,方伟岗,郑杰,等.不同转移潜能的人肿瘤细胞系金属蛋白酶活性分析[J].中华病理学杂志,1998,27(5):341-3.]
- [9] Liu XZ, Song Z. The expression and its clinical significance of MMP-2 and NM23 in the tissues from non-small cell lung cancer and paracancerous tissues[J]. *Shi Yong Ai Zheng Za Zhi*, 2010, 25(3): 2000-2. [刘旭之,宋卓. MMP-2、NM23 在非小细胞肺癌组织和癌旁组织中表达及其临床意义[J].实用癌症杂志,2010,25(3):2000-2.]
- [10] Feng Y, Tian Z, Wan M. Bioeffects of Low-Intensity Ultrasound In Vitro: Apoptosis, Protein Profile Alteration, and Potential Molecular Mechanism [J]. *J Ultrasound Med*, 2010, 29(6): 963-74.

[编辑校对:刘红武]