

. 实验研究 .

白藜芦醇对裸鼠胶质瘤模型肿瘤生长的抑制作用

胡 森 张 慧 步星耀 冯森森 王帮庆 王君毅 杨 斌 杨华超

【摘要】目的 探讨白藜芦醇(RES)不同途径给药对裸鼠胶质瘤模型肿瘤生长的抑制效果。**方法** 取 80 只雄性无胸腺裸鼠(BALB/c-nu; 21~27 日龄, 体重 10~12 g), 采用 U87 细胞建立人裸鼠脑胶质瘤原位移植模型, 采用随机数字表法分为 RES 干预组(造模后 10 d, 开始给药, 1 次/d, 40 mg/kg)和溶剂对照组(造模后 10 d, 开始给药, 1 次/d, 10 mg/kg; 溶剂为 0.5% 羧甲基纤维素钠), 根据给药途径, RES 干预组又分为 RES 灌胃组和 RES 经鼻组, 溶剂对照组又分为溶剂灌胃组和溶剂经鼻组, 每组 20 只。经鼻给药采用经鼻滴入法。采用 Kaplan-Meier 法分析生存曲线; 造模后 14、21、28、35 d 测定肿瘤体积; 采用 CD31 标记胶质瘤血管内皮细胞并计算微血管密度(MVD), 采用免疫组化方法检测胶质瘤血管内皮生长因子(VEGF)以及 Ki-67 表达, 采用 TUNEL 法检测胶质瘤细胞凋亡。**结果** 与溶剂对照组相比, RES 干预组裸鼠生存时间明显延长($P<0.05$), 造模后 28、35 d 肿瘤体积明显缩小($P<0.05$), 肿瘤组织 MVD 明显减小($P<0.05$), 肿瘤组织 VEGF 和 Ki-67 表达水平明显降低($P<0.05$), 肿瘤细胞凋亡率明显增加($P<0.05$), 而且, RES 经鼻给药较灌胃给药作用更明显($P<0.05$)。**结论** RES 可有效抑制裸鼠胶质瘤模型肿瘤生长, 机制可能与抑制肿瘤血管生成和促进肿瘤细胞凋亡有关。与灌胃给药相比, 经鼻给药肿瘤抑制效果更好。

【关键词】 胶质瘤; U87 细胞; 裸鼠胶质瘤模型; 白藜芦醇; 肿瘤生长; 肿瘤血管生成; 肿瘤细胞凋亡

【文章编号】 1009-153X(2019)09-0543-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41

Resveratrol inhibits tumor growth in nude mice model of glioma

HU Sen¹, ZHANG Hui², BU Xing-yao³, FENG Miao-miao³, WANG Bang-qing³, WANG Jun-yi¹, YANG Bin³, YANG Hua-chao¹. 1. Basic Medical School, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Department of Rehabilitation, The Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 3. Department of Neurosurgery, Henan Province People's Hospital/People's Hospital of Zhengzhou University/People's Hospital of Henan University, Zhengzhou 450052, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of resveratrol (RES) on tumor growth in nude mice model of glioma. **Methods** Eighty nude mice models of glioma were established by injection of U87 cells into the cerebral tissues, then these nude mice were randomly divided into RES intervention group (administration 10 days after injection of U87 cells, 40 mg/kg) and solvent control group (administration 10 days after injection of U87 cells, once a day, 10 mg/kg; the solvent was 0.5% sodium carboxymethyl cellulose). According to the route of administration, the RES intervention group was then divided into RES intragastric group and RES transnasal group, and the solvent control group was divided into solvent intragastric group and solvent transnasal group, with 20 mice in each group. The survival time was analyzed by Kaplan-Meier method, the tumor volume was measured at 14, 21, 28 and 35 days after injection of U87 cells, the microvessel density (MVD) was calculated by labeling the vascular endothelial cells with CD31, the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and Ki-67 were detected by immunohistochemical staining, and the apoptosis of glioma cells was detected by TUNEL method. **Results** Compared with the solvent control group, the survival time of nude mice was significantly prolonged ($P<0.05$), the tumor volume was significantly reduced ($P<0.05$), the MVD of tumor tissue was significantly decreased ($P<0.05$), the expressions of VEGF and Ki-67 in tumor tissue was significantly decreased ($P<0.05$), and the apoptosis rate of tumor cells was significantly increased in RES intervention group ($P<0.05$). Moreover, the tumor inhibitory effect of RES by transnasal administration was significantly better than RES by intragastric administration ($P<0.05$). **Conclusion** RES can effectively inhibit the tumor growth in nude mice model of glioma, which may be related to the inhibition of tumor angiogenesis and the promotion of tumor cell apoptosis. Compared with the intragastric administration, transnasal administration of RES has better tumor inhibitory effect.

【Key words】 Glioma; Resveratrol; Nude mice model of glioma; Tumor angiogenesis; Tumor growth; Tumor cell apoptosis

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2019.09.010
基金项目:河南省科技攻关重点项目(CYQ20190050);河南省医学科技攻关计划省部共建项目(201601016)
作者单位:450046 郑州,河南中医药大学基础医学院(胡 森、王君毅、杨华超);450052 郑州,郑州大学第三附属医院康复科(张 慧);450052 郑州,河南省人民医院/郑州大学人民医院/河南大学人民医院神经外科(步星耀、冯森森、王帮庆、杨 斌)
共同第一作者:胡 森、张 慧
通讯作者:步星耀, E-mail: buxingyao@126.com

胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤,目前主要采用手术切除加放、化疗^[1,2]。肿瘤细胞摄取药物不足、药物生物利用度低、肿瘤化疗耐药性^[3]以及副作用等诸多不足,严重影响化疗效果。因此,研发胶质瘤靶向给药系统,从而提升胶质瘤局部药物浓度以及减少全身不良反应,具有重要意义。白藜芦醇(resveratrol, RES)具有抗氧化、抗肿瘤的功效。由于疏水性和肝脏首过代谢,以至 RES 很难达到有效的药物浓度,所以其疗效受到严重影响。本研究通过建立 BALB/C-nu 裸鼠脑胶质瘤原位移植模型,探讨 RES 经鼻给药对肿瘤生长的作用。

1 材料和方法

1.1 脑胶质瘤裸鼠原位移植瘤模型的建立 80 只无胸腺裸鼠(BALB/c-nu),雄性,21~27 日龄,体重 10~12 g,购自北京维通利华实验动物有限公司[许可证号(SCXK(京)2012-0001)]。SPF 级饲养 1 周,采用步星耀等^[4]方法进行 U87 人脑胶质瘤原位移植造模。U87MG 细胞购自上海中科院细胞库。采用 10%水合氯醛腹腔注射进行麻醉(4 μ l/g),头部固定于立体定向仪上,剪开头皮,于颅骨中线右侧 2 mm、冠状缝前 0.5 mm 交点处,微量注射器从颅骨表面插入 4 mm,接种人脑胶质瘤 U87MG 细胞,注射时间 20 min。接种后停留 5 min 拔针。针孔用骨蜡覆盖,切口用创伤胶水封闭。

1.2 实验分组 将 80 只小鼠随机分为 4 组:RES 经鼻组、RES 灌胃组、溶剂经鼻组、溶剂灌胃组,每组 20 只。种植肿瘤细胞 10 d 后,开始给药,1 次/d,连续 10 d。经鼻给药为采用经鼻滴入法。RES(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, CAS 号 1185247-70-4)剂量为 40 mg/kg;溶剂为 0.5%羧甲基纤维素钠(sodium carboxymethylcellulose, CMC;天津爱勒易医药材料有限公司),剂量为 10 mg/kg。

1.3 肿瘤大小的测定 造模后 14、21、28、35 d 每组各随机选取 3 只裸鼠,经心脏灌注固定后解剖取出脑组织,HE 染色,测量肿瘤长轴(a)和短轴(b),体积 $V(\text{mm}^3)=(a \times b)^2 \times 0.5$ ^[5],并绘制肿瘤生长曲线。

1.4 微血管数密度(microvessel density, MVD)的测定 每组剩余 8 只裸鼠自然死亡后将全脑取出(存活时间 39~70 d),4%多聚甲醛固定,脱水透明。浸蜡包埋,冠状位切片,片厚 5 μ m。每组取 5 张切片采用 CD31 抗体标记血管内皮细胞并计算 MVD,肿瘤区域内凡被染成棕黄色或棕褐色的内皮细胞簇或单个内皮细胞,只要它们和周围的微血管、肿瘤细胞及其

他结缔组织不相连,就可作一个微血管计数^[6]。切片脱蜡至水, PBS 冲洗;滴加山羊血清(上海研谨生物科技有限公司);PBS 冲洗;一抗为鼠抗人 CD31 单克隆抗体(MAB-0720,福州迈新生物技术开发有限公司);PBS 冲洗;二抗生物素标记山羊抗兔 IgG(ab205718, abcam 公司), PBS 冲洗;滴加辣根酶标记链霉卵白素与 DAB 液(上海机纯实业有限公司),进行显色,显微镜下观察。

1.5 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)免疫反应测定 实验步骤同 MVD 的测定。一抗改为兔抗人 VEGF 多克隆抗体(RAB-0157,福州迈新生物技术开发有限公司)。免疫反应评分(immunoreactivity score, IRS)由每个视野阳性细胞所占视野的百分数计分与染色强度计分相乘所得,总共选取 3 个视野^[5]。

1.6 Ki-67 的测定 实验步骤与 MVD 的测定相同。Ki-67 以细胞核出现棕黄色颗粒为阳性,一抗改为鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体(ab8191, abcam 公司)。标记指数(label index, LI)指 Ki-67 阳性染色的细胞数($\times 400$)在 100 个细胞中的百分比^[7]。

1.7 TUNEL 染色检测细胞凋亡 在裸鼠死亡后,取原位移植瘤组织石蜡包埋切片检测。依照 TUNEL 检测试剂盒说明书操作。凋亡细胞半定量分析:根据凋亡细胞分布情况在 400 倍光镜下,每组切片拍摄 5 个阳性视野,每个视野计数 200 个细胞总数,计算每个视野凋亡细胞数所占细胞总数的百分比。染色细胞呈现染色质浓缩、边缘化,核膜裂解,染色质分割成块状/凋亡小体,即为凋亡细胞。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件分析;定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 *t* 检验;采用 Kaplan-Meier 法分析生存曲线; $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 各组裸鼠生存曲线及肿瘤生长曲线的比较 与溶剂对照组相比,RES 明显延长裸鼠生存时间($P < 0.05$),明显缩小造模 28、35 d 肿瘤体积($P < 0.05$);而且,与灌胃给药相比,RES 经鼻给药作用效果更明显($P < 0.05$)。溶剂经鼻组与溶剂灌胃组之间均无统计学差异($P > 0.05$)。见图 1、2。

2.2 各组原位移植瘤组织 Ki-67 表达水平的比较 RES 干预组 Ki-67 的 LI 明显低于溶剂干预组($P < 0.05$),而且 RES 经鼻给药较灌胃给药作用效果更明显($P < 0.05$)。溶剂经鼻组与溶剂灌胃组之间均无统计学差异($P > 0.05$)。见图 3、表 1。

2.3 各组原位移植瘤组织 VEGF 蛋白表达水平的比较 溶剂干预组大部分细胞出现棕褐色染色,RES 干预组明显较少,RES 经鼻给药阳性染色肿瘤细胞数量最少。RES 干预组 VEGF IRS 明显低于溶剂干预组($P<0.05$),而且 RES 经鼻给药较灌胃给药作用效果更明显($P<0.05$)。溶剂经鼻组与溶剂灌胃组之间

均无统计学差异($P>0.05$)。见图 3、表 1。

2.4 各组原位移植瘤组织 MVD 的比较 肿瘤微血管呈疏密不一式分布,呈棕色阳性染色区域都集中在瘤内,肿瘤边缘则为高密度区,微血管于肿瘤间质以细长扭曲、错乱排列方式存在。RES 干预组 MVD 明显小于溶剂干预组($P<0.05$),而且 RES 经鼻给药较灌胃给药作用效果更明显($P<0.05$)。溶剂经鼻组与溶剂灌胃组之间均无统计学差异($P>0.05$)。见图 3、表 1。

2.5 各组原位移植瘤组织细胞凋亡的比较 RES 干预组细胞凋亡率明显高于溶剂干预组($P<0.05$),而且 RES 经鼻给药较灌胃给药作用效果更明显($P<0.05$)。溶剂经鼻组与溶剂灌胃组之间均无统计学差异($P>0.05$)。见图 3、表 1。

3 讨论

RES 体外抗肿瘤作用明显,其机制涉及原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src、VEGF、缺氧诱导因子 1 α 等在内的细胞生存关键信号通路^[8],还涉及活化 P53 促进细胞凋亡等。虽然 RES 体外抗肿瘤功效显著,然而受到 RES 理化属性影响,其体内生物利用度较低,诸如稳定性不佳、肝脏首过代谢、疏水性。在疏水性上,RES 的 logP 值在“欧洲药典”内所示只有 3.1,判定为水溶性极低。此项属性使得需将 RES 置于牛奶(或油)内溶解再口服。因此,探讨 RES 新的给药方式弥补其药代动力学与理化属性方面的不足,促进 RES 在局部靶细胞(或组织)内浓度水平提升,具有重要意义。

鼻腔表面积大且内皮细胞膜多孔性,以及血供丰富,经鼻给药方式具备可随时给药、无首过代谢等优势,可被当做一类替代途径被用在药物局部利用方面^[9]。从解剖结构上看,鼻腔直接相连着中枢神经系统(central nervous system, CNS),通过此部位将药物递送给 CNS,无肝脏首过代谢问题,同时能够防止药物流向非靶点部位,使给药剂量与不良反应下

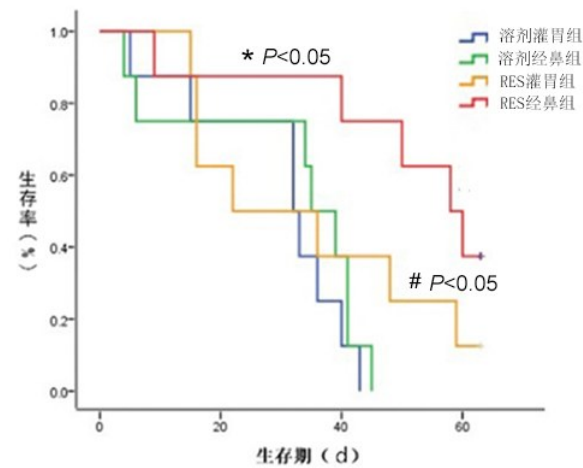


图1 各组荷瘤裸鼠Kaplan-Meier生存曲线
与溶剂灌胃组、溶剂经鼻组、RES灌胃组相比,* $P<0.05$;与溶剂灌胃组、溶剂经鼻组相比,# $P<0.05$;RES. 白藜芦醇

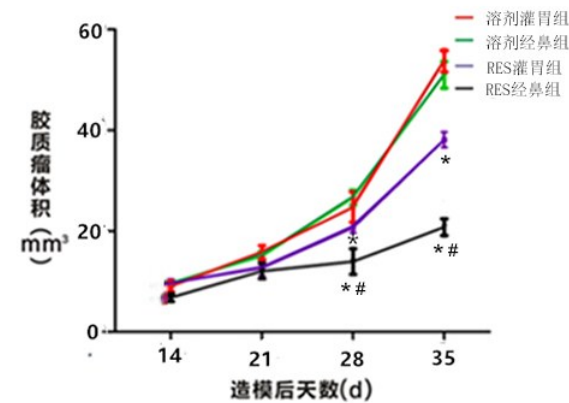


图2 各组荷瘤裸鼠肿瘤生长曲线
与溶剂灌胃组、溶剂经鼻组、RES灌胃组相比,# $P<0.05$;与溶剂灌胃组、溶剂经鼻组相比,* $P<0.05$;RES. 白藜芦醇

表1 各组裸鼠移植瘤组织 MVD、Ki-67、VEGF 表达及细胞凋亡率的比较

组别	Ki-67 LI	细胞凋亡率	VEGF IRS	MVD
溶剂灌胃组	79.88±5.87	6.63±2.54	64.90±2.91	77.35±4.45
溶剂经鼻组	69.65±10.18	9.95±3.55	58.20±4.23	67.93±3.85
RES 灌胃组	35.75±4.12*	20.91±5.18*	28.10±3.77*	35.33±6.40*
RES 经鼻组	17.50±2.75**	40.18±4.71**	14.23±1.04**	19.03±2.64**

注:与溶剂灌胃组、溶剂经鼻组相比,* $P<0.05$;与 RES 灌胃组相比,# $P<0.05$;RES. 白藜芦醇;LI. 标记指数;VEGF IRS. 血管内皮细胞生长因子免疫反应评分;MVD、血管密度

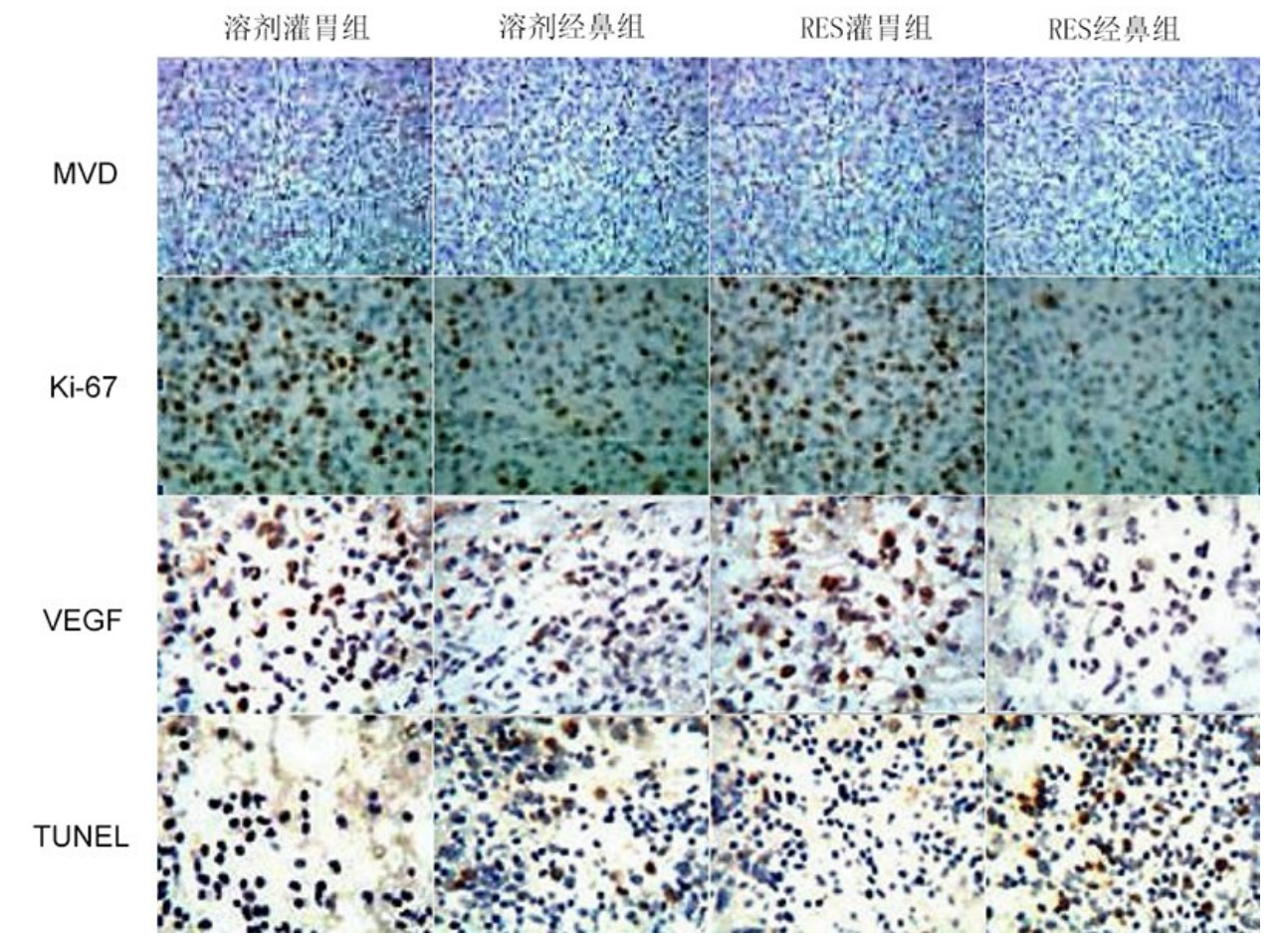


图3 采用酶桥法免疫组化染色结果以及采用TUNEL法检测细胞凋亡
与溶剂对照组相比,RES明显减少肿瘤组织肿瘤新生血管生成,减少肿瘤血管异常生长,抑制肿瘤细胞增殖,促进细胞凋亡,RES经鼻给药效果较灌胃给药更明显;MVD为200倍镜下检测结果;Ki-67、VEGF、TUNEL均为400倍镜下检测结果

降。本文结果显示,RES经鼻给药能明显提高其体内抗肿瘤效应。

【参考文献】

[1] 李建明. 三维适形放疗联合替莫唑胺化疗对恶性脑胶质瘤术后残留的疗效分析[J]. 中国临床神经外科杂志, 2017,22(5):316-317,321.

[2] 张申起,彭 彬,陈治标,等. 局灶性脑干胶质瘤的临床特点及显微手术治疗[J]. 中国临床神经外科杂志,2017,22(9):609-612.

[3] 汪超甲,王 辉. 脑胶质瘤化疗现状及耐药机制的研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志,2017,22(11):791-794.

[4] 步星耀,章 翔,Laug WE. 人脑胶质瘤细胞裸鼠原位移植动物模型的建立[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2006,5(2):100-105.

[5] Friedrichs K, Gluba S, Eidmann H, *et al.* Overexpression of

p53 and prognosis in breast cancer [J]. Cancer, 1993, 72(12): 3641-3647.

[6] Weidner N, Semple JP, Welch WR, *et al.* Tumor angiogenesis and metastasis-- correlation in invasive breast carcinoma [J]. N Engl J Med, 1991, 324(1): 1-8.

[7] Sadeghipour A, Mahouzi L, Salem MM, *et al.* Ki67 labeling correlated with invasion but not with recurrence [J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2017, 25(5): 341-345.

[8] Bake SH, Kojh H, Lee H, *et al.* Resveratrol inhibits STAT3 signaling pathway through the induction of SOCS- 1: role in apoptosis induction and radiosensitization in head and neck tumor cells [J]. Phytomedicine, 2016, 23(5): 566-577.

[9] 韩安国,李焕平. 鼻腔内点滴氯丙嗪治疗脑出血后呃逆的临床观察[J]. 中国临床神经外科杂志, 2008, 13(12): 748-749.

(2019-01-18收稿,2019-06-26修回)