

## 茉莉酸甲酯对人肝癌细胞 HepG-2 裸鼠皮下移植瘤生长抑制作用的研究

卢永刚<sup>1)</sup>, 谭晶<sup>1)</sup>, 张洁<sup>2)</sup>, 马岚青<sup>3)</sup>, 郭峰<sup>3)</sup>, 郭永章<sup>1)</sup>

(1) 昆明医学院第二附属医院外一科, 云南昆明 650101; 2) 昆明医学院云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650031; 3) 昆明医学院第一附属医院, 云南昆明 650032)

**[提要]** **目的** 通过建立人肝癌裸鼠皮下移植瘤模型, 观察茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 对移植瘤的生长抑制作用. **方法** 实验分为对照组和 MeJA 组、全反式维甲酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 组、MeJA+ATRA 3 种处理组. 观测裸鼠成瘤情况和周围血甲胎蛋白以及肿瘤组织形态学变化; RT-PCR 检测瘤体中 Bcl-2 及 Bax 的 mRNA 表达. **结果** 与对照组比较, 3 种处理组移植瘤体积变小, 重量减轻 ( $P < 0.05$ ); HE 病理切片观察处理组可见癌细胞密度减少, 瘤组织分化渐成熟; 各处理组外周血甲胎蛋白值降低 ( $P < 0.05$ ); 各处理组瘤体 Bcl-2 mRNA 表达均减弱 ( $P < 0.05$ )、Bax mRNA 表达均增强 ( $P < 0.05$ ). **结论** MeJA 对人肝癌细胞 HepG-2 裸鼠皮下移植瘤生长具有抑制作用, 其机制可能与诱导肿瘤细胞分化, 启动凋亡, 使肿瘤的增殖失控发生逆转, 细胞表型和功能向正常转化有关.

**[关键词]** 茉莉酸甲酯; 全反式维甲酸; HepG-2 人肝癌细胞; 裸鼠; 皮下移植瘤; 凋亡

**[中图分类号]** R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2007) 06-0024-05

## Study of Growth Inhibitory Action for Athymic Mouse Transplantation Tumor in Subcutaneously Treated by Human Hepatocarcinoma Cell HepG-2 Functed under Methy Jasmonate

LU Yong-gang<sup>1)</sup>, TAN Jing<sup>1)</sup>, ZHANG Jie<sup>2)</sup>, MA Lan-qing<sup>3)</sup>, GUO Feng<sup>3)</sup>, GUO Yong-zhang<sup>1)</sup>

(1) Department of Sugery One, The 2nd Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650101;  
2) Kunming Medical College, Yunnan Pharmacologica Laboratory of Natural Products, Kunming 650031;  
3) The 1st Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the inhibitory action of methyl jasmonate (MeJA) for transplantation tumor by establishing model of athymic mouse treated by human hepatocarcinoma cell transplantation tumor in subcutaneously. **Methods** Athymic Mouse were divided into control group and three kinds of treatment groups of MeJA, all-trans retinoic acid ATRA (ATRA) and MeJA + ATRA in experiment. The change of forming tumor, AFP in peripheral blood and pathological tissue morphology were detected. Bcl-2 mRNA and Bax mRNA in tumor tissue were detected by RT-PCR. **Results** The volume and weight of transplantation tumor in subcutaneously decreased in treatment group ( $P < 0.05$ ). Tumor cell density reduced and tumor tissue differentiation was gradually mature observed by HE routine pathological mechanism section, compared with control group. In all treatment groups, AFP

**[作者简介]** 卢永刚 (1970~), 男, 辽宁朝阳市人, 博士研究生, 主治医师, 主要从事肝胆胰肿瘤外科基础与临床研究.

decreased obviously in peripheral blood ( $P < 0.05$ ), Bcl-2 mRNA expression reduced and Bax mRNA expression increased in tumor tissue ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** MeJA can inhibit growth of athymic mouse transplantation tumor treated subcutaneously by human hepatocarcinoma cell HepG-2, its mechanism is probably involved in inducing tumor cell differentiation, starting apoptosis, reversing proliferation out of control and converting phenotype and function of tumor cells to normal.

**[key words]** Methyl jasmonate MeJA; All-trans retinoic acid ATRA HepG-2 human hepatocarcinoma cell; Athymic mouse; Transplantation tumor in subcutaneously; Apoptosis; Induced differentiation.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

HepG-2 人肝癌细胞株购于中国科学院上海生物研究所; 茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 购于 Sigma 公司; 全反式维甲酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 购于 Sigma 公司; RT-PCR 试剂盒购于 Promega 公司.

BALB/c-nu/nu 裸鼠, 4~5 周龄, 雌雄不拘, 40 只, 平均体重约 25 g 左右, 购于上海斯莱克实验动物有限公司 (合格批号: 02167632808), 饲养于昆明医学院实验动物中心 (动物实验室合格证号: SCKK (滇) 2005-0008).

### 1.2 方法

**1.2.1 人肝癌 HepG-2 细胞培养及分组** 将冻存的 HepG-2 细胞株复苏, 培养, 传代. 根据对培养细胞加入的试剂不同进行分组. MeJA 及 ATRA 均先溶于 DMSO 后, 以 RPMI1640 细胞培养液加以稀释 (DMSO 浓度为 0.01%, 预实验证实对细胞基本无影响作用). (1) 对照组: 加入含终浓度为 0.01% DMSO 的 RPMI1640 细胞培养液; (2)

MeJA 处理组: 加入含终浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$  MJ 的 RPMI1640 细胞培养液; (3) ATRA 处理组: 加入含终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  ATRA 的 RPMI1640 细胞培养液 (DMSO 浓度为 0.01%, 预实验证实对细胞基本无影响作用); (4) 联合处理组 (MeJA + ATRA): 同时加入含有终浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$  MeJA 和 10  $\mu\text{mol/L}$  ATRA 的 RPMI1640 细胞培养液. 各组细胞常规培养 12 h 后在裸鼠背部皮下接种.

**1.2.2 接种** 接种前将裸鼠随机分为阴性对照组、MeJA、ATRA 和联合处理共 4 组, 每组 10 只; 每组动物用带 6 号针头的注射器抽取 0.2 mL 不同组别的 HepG-2 人肝癌细胞悬液接种裸鼠, 每只裸鼠注射部位为裸鼠颈背部皮下, 注射 0.2 mL/只肿瘤细胞悬液, 含活细胞  $5 \times 10^6/0.2 \text{ mL}$ .

**1.2.3 裸鼠成瘤情况观察测量** 裸鼠在接种 HepG-2 肝癌细胞前分别称重, 每只裸鼠在接种肿瘤细胞后 7 d、14 d、21 d、28 d 观察肿瘤的生长情况, 测量.

**1.2.4 计算肿瘤生长抑制率 (%)** 脱颈处死裸鼠, 电子天平称取瘤重, 取平均值, 计算抑瘤率, 公式如下:

$$\text{肿瘤生长抑制率 (\%)} = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{处理组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

**1.2.5 光镜组织形态学观察** HE 染色光镜组织形态学观察肿瘤组织学特点及癌周血管变化情况.

**1.2.6 周围血甲胎蛋白检测** 接种 28 d 后, 采用摘眼球采血方法获得血液, 检测 AFP 分泌量.

**1.2.7 RT-PCR 检测瘤体中 Bcl-2 及 Bax 的 mRNA 表达** 引物序列采用 primer 5.0 软件设计, 由上海生工生物有限公司合成.

$\beta$ -actin: 上游 GGGACCTGACTGACTACCTC, 下游 ACTCGTCATACTCCTGCTTG, 引物片段 546bp.

Bcl-2: 上游 AGTCCTTTAGTCTTACCCAGTG, 下游 TTGATTGAGCGAGCCTTT 引物片段 259bp.

Bax: 上游 CAGGATGCGTCCACCAA, 下游 CCG-GAGGAAGTCCAATGTC, 引物片段 282bp.

Trizol 提取各组瘤体总 RNA, 鉴定. RT-PCR 反应严格按试剂盒进行操作. 电泳条带在 Gel Doc 凝胶成像分析系统上扫描定量. 以  $\beta$ -actin 为内参, 根据各条带的 OD 值分析 Bcl-2、Bax 的 mRNA 表达水平.

$$\text{mRNA 相对表达量} = \text{目的基因条带 OD} / \beta\text{-actin 条带 OD.}$$

### 1.3 统计学分析

应用 SPSS12.0 统计软件包进行分析. 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用方差分析. 以  $P < 0.05$  判定有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 MeJA 对人 HepG-2 细胞裸鼠皮下移植瘤组织形态学变化影响

裸鼠肿瘤组织中, 细胞特点与原细胞株完全一致, 瘤周组织中, 有大量新生血管形成, 肿瘤

成分叶结节状生长, 质地较韧, 包膜完整. HE 染色显微镜观察: 肿瘤细胞大小不一, 成不规则形, 核大深染, 核仁明显, 核分裂现象多见.

MeJA、ATRA、MeJA+ATRA 3 个处理组瘤组织中癌细胞密度减少, 细胞皱缩, 胞浆红染, 间质结缔组织增多, 淋巴细胞浸润, 瘤组织分化渐成熟.

### 2.2 MeJA 对 HepG-2 细胞裸鼠皮下移植瘤生长抑制作用

结果显示: MeJA、ATRA 和联合组作用后 HepG-2 细胞移植瘤体积和瘤重明显小于对照组,

表 1 各组不同时间点肿瘤体积的变化

Tab.1 The volume of tumors at different time points in different groups

组别	肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )			
	7 d	14 d	21 d	28 d
对照组	390.71 ± 40.27	1674.65 ± 29.13	3136.67 ± 72.45	5124.68 ± 54.96
MeJA 组	191.16 ± 21.43 <sup>a</sup>	556.67 ± 27.36 <sup>a</sup>	813.49 ± 64.46 <sup>a</sup>	971.47 ± 31.47 <sup>a</sup>
ATRA 组	189.61 ± 26.44 <sup>a</sup>	568.35 ± 26.41 <sup>a</sup>	845.71 ± 46.74 <sup>a</sup>	985.68 ± 43.36 <sup>a</sup>
MeJA + ATRA 组	187.48 ± 24.36 <sup>a</sup>	546.92 ± 33.56 <sup>a</sup>	831.85 ± 49.78 <sup>a</sup>	981.47 ± 41.77 <sup>a</sup>

与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; MeJA 组、ATRA 组和 MeJA + ATRA 组三者比较  $P > 0.05$ .

### 表 2 MJ、ATRA 及 MeJA + ATRA 对 HepG-2 细胞移植瘤肿瘤生长抑制率的影响

Tab.2 The inhibition rate of HepG-2 hepatocarcinoma in different groups

组别	瘤重 (g)	肿瘤生长抑制率 (%)
对照组	5.472	-
MeJA 组	2.376 <sup>a</sup>	56.58
ATRA 组	2.393 <sup>a</sup>	56.27
MeJA + ATRA 组	2.404 <sup>a</sup>	56.07

与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$

有显著差异 ( $P < 0.05$ ); MeJA 组较 ATRA 组和 MeJA+ATRA 组肿瘤抑制率均略高, 但组间相比较无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1, 表 2.

### 2.3 MeJA 对 HepG-2 细胞荷瘤裸鼠影响

放免法测定结果显示: 人原发性肝癌裸鼠移植瘤仍保持外周血甲胎蛋白 (AFP) 的分泌特性; 裸鼠颈部皮下接种 HepG-2 肝癌细胞后 4 周, 对照组 AFP 的分泌量为 (585.41 ± 46.21) ng/mL, MeJA

组为 (157.22 ± 35.16) ng/mL, ATRA 组为 (166.74 ± 23.41) ng/mL, MeJA + ATRA 组为 (154.45 ± 27.38) ng/mL. 各处理组与对照组比较均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ).

### 2.4 MeJA 对瘤体中 Bcl-2 及 Bax 的 mRNA 表达的影响

琼脂糖凝胶电泳结果显示, 与对照组相比, MeJA 组、ATRA 组、MeJA+ATRA 组 Bcl-2 mRNA 表达水平明显下降, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而 Bax mRNA 表达明显增加 ( $P < 0.05$ ), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 1、图 2 和表 3.

## 3 讨论

采用人肝癌细胞 HepG-2 建立裸鼠皮下人肝癌移植瘤模型, 周期短, 成功率达 100%, 其生长行为与人类肝癌相似<sup>[9]</sup>, 能较好地模拟肝癌在人体内的

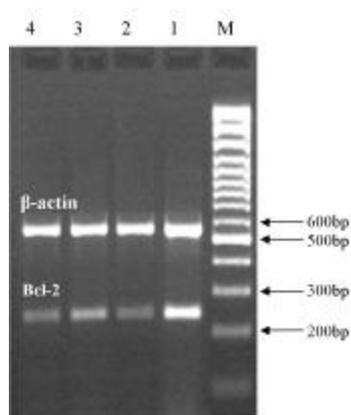


图 1 各组瘤体 Bcl-2 mRNA 的表达

Fig.1 The Bcl-2 mRNA expression in each group tumor

M: Marker; 1: 对照组; 2: MeJA 组; 3: ATRA 组;

4: MeJA + ATRA 组.

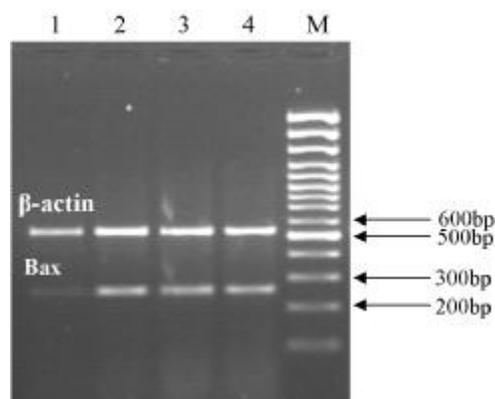


图 2 各组瘤体 Bax mRNA 的表达

Fig.2 The Bax mRNA expression in each group tumor

M: Marker; 1: 对照组; 2: MeJA 组; 3: ATRA 组;

4: MeJA + ATRA 组.

表 3 各组裸鼠瘤体中 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达的变化

Tab.3 The Bcl-2 mRNA expression and bax mRNA in ahyemic mouse tumor of different groups

组别	n	Bcl-2 / $\beta$ -actin (OD 值)	Bax / $\beta$ -actin (OD 值)
对照组	10	0.741 $\pm$ 0.127	0.069 $\pm$ 0.031
MeJA 组	10	0.547 $\pm$ 0.102 <sup>a</sup>	0.269 $\pm$ 0.141 <sup>a</sup>
ATRA 组	10	0.576 $\pm$ 0.116 <sup>a</sup>	0.266 $\pm$ 0.135 <sup>a</sup>
MeJA + ATRA 组	10	0.552 $\pm$ 0.124 <sup>a</sup>	0.271 $\pm$ 0.153 <sup>a</sup>

与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ .

生物学行为.

茉莉酸甲酯 (Methyl Jasmonate, MeJA) 是新型植物激素 - 茉莉酸的甲基衍生物. Demole 等<sup>[2]</sup> 首先从一种真菌中分离到. 随着研究的深入, 发现茉莉酸广泛存在于植物界<sup>[3]</sup>. 国内对于茉莉酸甲酯的文献报道仅限于林学等植物学方面的研究, 其作用主要为促进器官衰老, 诱导果实成熟<sup>[4]</sup>, 诱导植物对病虫害产生防卫应答<sup>[5]</sup>. 国外有文献报道: 茉莉酸甲酯对人髓细胞性白血病细胞具有诱导分化, 抑制增殖作用<sup>[6]</sup>; 茉莉酸甲酯可以诱导成淋巴细胞性白血病细胞分化、凋亡, 而对正常淋巴细胞没有损伤作用<sup>[7]</sup>. 然而, 茉莉酸甲酯对于人肝癌细胞荷瘤裸鼠生长影响的研究国内外未见文献报道. 本实验结果发现: MeJA、ATRA、MeJA+ATRA 三种处理能够使移植瘤组织体积变小, 重量明显减轻, 癌细胞密度减少, 细胞皱缩, 胞浆红染, 瘤组织分化渐成熟, 提示 MeJA 具有较强的抑制肝癌细胞增殖作用.

AFP 是一种具有人类胚胎抗原特性的蛋白质, 存在于内胚层细胞分化而来的肿瘤细胞表面, 在胎儿期血液中可以存在, 胎儿出生后很快消失, 当有恶性肿瘤发生时血液中浓度明显升高. 本研究结果显示: 经 MeJA 作用后, 外周血 AFP 含量较对照组明显减少, 肝癌细胞恶性表型发生逆转, MeJA 具有良好的诱导肝癌细胞分化作用.

与正常细胞相比, 肿瘤细胞丧失了增殖与凋亡平衡的调控以及对周围环境凋亡刺激信号的敏感性, 其中一个突出表现就是 Bcl-2 家族成员在肿瘤中的表达出现异常, 即抑凋亡蛋白表达上调和促凋亡蛋白下调或失活, 同时 Bcl-2 通过与 Bax 形成异二聚体, 阻碍 Bax 等促凋亡蛋白的功能. 本实验结果显示: MeJA 作用于肝癌细胞后, 使促凋亡基因 Bax mRNA 表达上调, 下调抑制凋亡基因 Bcl-2 mRNA 表达, 重新启动了凋亡, 使肿瘤的增殖失控发生逆转, 使肝癌细胞结构和功能向正常转化.

全反式维甲酸是目前研究最多, 作用机制阐述比较清楚的一种诱导肿瘤分化、凋亡的药物。目前认为分化诱导的机制为<sup>[9]</sup>: 分化诱导剂诱导癌细胞向终末阶段分化, 最终趋向于死亡。主要表现为: ①细胞分化基因群重新启动和表达, 同时恶性基因受抑制或失活, 二者的结果均导致细胞结构或功能上的正常化; ②通过影响癌细胞表面膜使癌细胞恶性表型发生逆转, 主要为肿瘤细胞增高表达的增殖性受体的被封闭或抑制; ③在启动细胞分化机制的同时启动了细胞死亡程序, 有些表现为先分化后凋亡, 有些表现为分化与凋亡同时发生, 代表此类分化诱导剂的是维甲酸和砷剂。但是维甲酸治疗后存在停药后易复发反弹、骨髓抑制, 某些肿瘤对诱导物还可产生耐药性<sup>[9]</sup>。本实验结果显示, 茉莉酸甲酯和维甲酸两种药物联合处理组与单一药物处理组效果接近, 没有达到预期较好的相加作用。MeJA 与 ATRA 作用效果相近, 茉莉酸甲酯有望克服 ATRA 的副作用, 成为一种新型低毒的植物激素类抗癌药物。

#### [参考文献]

- [1] 李军, 李福涛, 开丽, 等. 采用 HepG-2 细胞株建立裸鼠肝癌模型的方法 [J]. 四川生理科学杂志. 2002, 24 (2): 80-81
- [2] DEMOLE E, LEDERER E, MERCIER O. Isolement et détermination de la structure de jasmonate de méthyle constituant odorant caractéristique l'essence de jasmin [J]. *Helv Chim Acta*, 1962, 45: 675-685
- [3] 吴劲松, 种康. 茉莉酸作用的分子生物学研究 [J]. *植物学通报*. 2002, 19 (2): 164-170.
- [4] 王大伟, 高庆荣, 张爱民, 等. 茉莉酸甲酯对小麦颖的作用 [J]. *麦类作物学报* 2007, 27 (2): 293-297
- [5] 席征, 程新胜, 杨丽文, 等. 茉莉酸甲酯诱导烟草抗斜纹夜蛾的作用 [J]. *烟草科技*, 2007, 236, (3): 51-54
- [6] ISHII Y, KIYOTA H, SAKAI S, et al. Induction of differentiation of human myeloid leukemia cells by jasmonates, plant hormones [J]. *Leukemia*, 2004, 18: 1413-1419
- [7] FINGRUT O, FLESCHER E. Plant stress hormones suppress the proliferation and induce apoptosis in human cancer cells. [J]. *Leukemia*, 2002, 16: 608-616
- [8] 陈意生, 史景泉. 肿瘤分子细胞生物学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2004: 29
- [9] HUANG M E, YEYC, CHEN S R, et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. [J]. *Blood*, 1988, 72 (2): 567-572

(2007-07-10 收稿)