

泮托拉唑改善小鼠肿瘤恶病质骨骼肌消耗

郭敦伟, 王朝义, 王强, 乔忠鹏, 游松, 唐华
(重庆医科大学附属第一医院胃肠外科, 重庆 400016)

摘要:【目的】研究泮托拉唑对肿瘤恶病质骨骼肌消耗的缓解作用。【方法】将24只BALB/c小鼠随机分为3组,分别为正常组(NN)、恶病质组(CC)、干预组(PPI),每组8只。荷瘤小鼠采用腋下接种小鼠结肠癌细胞(c26),建立肿瘤恶病质模型。每日监测各组小鼠体质量、肿瘤大小及精神毛发等一般情况。接种后第12天干预组采取泮托拉唑灌胃,其余组采取生理盐水灌胃。干预后第12天处死小鼠收集标本。称量腓肠肌及肿瘤质量,测量肿瘤大小,HE染色观察骨骼肌形态变化,血清ELISA法检测IL-6、TNF- α 水平,qRT-PCR和Western blot分别检测腓肠肌MuRF1、MAFBx、Myod1和myf5的mRNA和蛋白表达水平。【结果】与CC组相比,PPI组小鼠及腓肠肌质量分别增加39.8%和24.2%,腓肠肌纤维横切面积增加25.4%;PPI组Myod1和myf5的mRNA水平及蛋白表达水平明显高于CC组($P < 0.05$);PPI组血清IL-6及TNF- α 水平较CC组分别降低30.7%和18.9%;PPI组MuRF1、MAFBx蛋白表达水平明显低于CC组($P < 0.05$)。【结论】泮托拉唑对肿瘤恶病质骨骼肌消耗具有保护作用,其机制可能与抑制炎症及泛素蛋白酶体途径(UPS),上调生肌调节因子(MRF)有关。

关键词:泮托拉唑;肿瘤恶病质;炎症;泛素蛋白酶体途径;生肌调节因子

中图分类号:R730.5

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2017)02-0254-06

Effect of Pantoprazole on Skeletal Muscle Loss in a Mouse Model of Cancer Cachexia

GUO Dun-wei, WANG Chao-yi, WANG Qiang, QIAO Zhong-peng, YOU Song, TANG Hua

(Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Corresponding to: TANG Hua, E-mail: tanglihua6969@sina.com

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect of pantoprazole on skeletal muscle wasting in cancer cachexia and the possible mechanism. 【Methods】 24 male BALB/c mice were randomly divided into control group (NN), cancer cachexia group (CC), pantoprazole treatment group (PPI). The mice in CC and PPI were inoculated subcutaneously with mouse colon adenocarcinoma C26 cells to establish a model of cancer cachexia. The mice in PPI group were gavaged with 75 mg/kg pantoprazole dissolving in physiological saline, while those in NN and CC group were gavaged with 0.1 mL/10 g physiological saline. The mice were killed 12d after treatment. The weight of gastrocnemius and tumour and the size of tumour were measured. The morphological change of skeletal muscle were evaluated by the method of stain with hematoxylin and eosin (H&E). The levels of IL-6 and TNF- α in serum were tested by ELISA. qRT-PCR was used to assess the expression of mRNA of Myod1 and myf5 in skeletal muscle. The protein expressions of MuRF1, MAFBx, Myod1 and myf5 were measured by Western blot. 【Results】 Compared with CC group, pantoprazole can increase the weight of mice and gastrocnemius (39.8% and 24.2%, respectively), cross section area (25.4%), levels of mRNA and protein of Myod1 and myf5 ($P < 0.05$), while the levels of IL-6 and TNF- α decreased (30.7% and 18.9%, respectively), as well as the levels of protein expression of MuRF1 and MAFBx ($P < 0.05$). 【Conclusion】 Pantoprazole can attenuate the wasting of skeletal muscle, the potential mechanism may be related to the inhibition of inflammatory factors and UPS, and up-regulation of Myod1 and myf5.

Key words: pantoprazole; cancer cachexia; inflammation; UPS; MRF

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(2):254-259]

收稿日期:2016-09-05

基金项目:重庆市研究生科研创新项目(CYS15135)

作者简介:郭敦伟,硕士研究生,研究方向:肿瘤恶病质,1411283932@qq.com;唐华,通信作者,E-mail:tanglihua6969@sina.com

肿瘤恶病质(cancer cachexia, CC)是晚期肿瘤患者常见的一种并发症,其特点是进行性的骨骼肌消耗,伴或不伴有脂肪组织的减少,且不能被传统的营养支持完全逆转^[1]。骨骼肌的消耗是肿瘤恶病质最重要的临床表现,严重影响着患者的预后及生活质量。恶病质状态下的骨骼肌萎缩机制,目前尚未研究清楚,但炎症因子参与的炎症反应在其发生发展中具有重要作用^[2-3]。有报道肿瘤恶病质模型的血清TNF- α 水平显著升高^[4], Bonetto等^[5]也发现IL-6在恶病质骨骼肌萎缩进程中发挥重要作用。进一步的研究也表明TNF- α 及IL-6等炎症因子能导致厌食、激活骨骼肌蛋白降解、抑制蛋白合成,并且全身的炎症反应还会进一步加剧恶病质的进程^[6-7]。泮托拉唑是临床上常用的一种质子泵抑制剂,属于二烷基吡啶类化合物,具有抑制胃酸分泌的作用^[8]。近年来有研究发现泮托拉唑还具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤及化疗增敏等作用,且这些作用并不能用抑制胃酸来解释,这表明泮托拉唑还具有调节其他通路的功能^[9-10]。目前国内外尚缺乏泮托拉唑治疗肿瘤恶病质骨骼肌消耗的相关研究。本实验用泮托拉唑干预肿瘤恶病质模型小鼠,通过观察骨骼肌相关蛋白MuRF1、MAFBx、Myod1、myf5的表达变化情况,并检测与肿瘤恶病质密切相关的细胞因子IL-6及TNF- α 水平变化,探讨泮托拉唑对肿瘤恶病质骨骼肌消耗的保护作用以及相关的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF级6~8周雄性BALB/c小鼠,体质量18~20 g,购于重庆医科大学实验动物中心;ELISA试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司;MuRF1、MAFBx、Myod1、myf5、GAPDH抗体和二抗购于Proteintech公司;Western blot相关试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;qRT-PCR引物及相关试剂盒购自TaKaRa公司;泮托拉唑(40 mg)购于辽宁诺维诺制药股份有限公司。

1.2 实验分组

24只小鼠按照随机数字表法分为正常组(NN)、恶病质组(CC)、干预组(PPI),每组8只。取对数生长期c26细胞悬浮于PBS缓冲液,接种于小鼠右前肢腋下^[11],每只小鼠0.1 mL(约 1×10^6

个细胞),正常组注射等量PBS缓冲液。每日监测各组小鼠体质量、肿瘤大小及精神毛发等一般情况,肿瘤体积($V=ab^2/2$), a 、 b 分别表示肿瘤的长与宽^[12]。荷瘤小鼠平均体质量下降较对照组有统计学意义,并出现活动减少、虚弱和精神不振等,即进入恶病质状态^[11-12],按照分组给予不同干预。

1.3 干预方法

待小鼠进入恶病质状态后开始予以药物干预。PPI组,泮托拉唑7.5 g/L溶于9 g/L NaCl溶液,每只小鼠灌胃量为0.01 mL/g,其余组给予等量9 g/L NaCl溶液灌胃。连续灌胃12 d。

1.4 标本采集

药物干预12 d后,称量小鼠体质量。摘除眼眶取血,静置1 h后4500 r/min(离心机半径 $r=10$ cm),离心7 min,取上清,-80℃低温保存。称量去瘤质量和右下肢腓肠肌质量,一部分腓肠肌组织经40 g/L多聚甲醛溶液固定,其余组织-80℃冻存。

1.5 血清IL-6和TNF- α 水平检测

严格采取ELISA试剂盒说明书方法和步骤,检测血清样本中IL-6、TNF- α 水平。

1.6 肌组织Myod1和myf5 mRNA水平测定

Trizol提取腓肠肌组织总RNA,测定浓度后逆转录合成cDNA。严格按照试剂盒说明进行扩增。结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算各个基因mRNA的相对表达量(引物序列见表1)。

表1 引物序列

Table 1 The primers for qRT-PCR assay

Gene	Primer sequences (5'→3')	Length(bp)
Myod1	CCGACGGCCTTCTGCTCCTT	200
	GCGCACATGCTCATCCTCACGA	
myf5	CCACCTCCAACCTGCTCTGAC	189
	GCTCGGATGGCTCTGTAGAC	
GAPDH	GGTGAAGGTCGGTGTGAACG	233
	CTCGCTCCTGGAAGATGGTG	

1.7 肌组织MuRF1、MAFBx、Myod1和myf5蛋白水平测定

腓肠肌提取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,Western blot法检测蛋白表达情况。蛋白质经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,电转到PVDF膜,脱脂牛奶封闭,4℃摇床孵育一抗过夜,第2天TBST洗膜后室温孵育二抗1 h,洗膜,ECL法显影。凝

胶/发光图像分析系统进行灰度分析。

1.8 腓肠肌组织形态学观测

经 40 g/L 多聚甲醛溶液固定后的组织,程序脱水,石蜡包埋固定,5 μm 连续切片,HE 染色,光镜下采集 200 倍图片,使用 Image Pro Plus 6.0 软件计算 200 个肌纤维的平均横切面积。

1.9 统计学分析

采用 SPSS17.0 进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

接种 c26 细胞前,各组小鼠体质量差异无统计学意义。接种 7 d 后,荷瘤小鼠腋下可触及肿瘤结节;接种 11 d 后,肿瘤明显增大,平均体质量较正常组明显下降($P < 0.05$),并出现活动减少、虚弱和精神不振等,进入恶病质状态。药物干预 12 d 后,PPI 组小鼠去瘤体质量明显高于 CC 组($P < 0.05$),肿瘤质量及大小则明显低于 CC 组($P < 0.05$;表 2)。

表 2 小鼠体质量、肿瘤质量和肿瘤体积

Table 2 The body weight, the mass and volume of tumor

($\bar{x} \pm s$)

Group	Original body mass/g	Mass at 11d/g	Body mass after tumor removal/g	Mass of tumor/g	Volume of tumor/cm ³
NN	20.71 \pm 0.28	26.59 \pm 0.95	28.64 \pm 1.52	-	-
CC	20.63 \pm 1.40	24.56 \pm 1.08 ²⁾	15.94 \pm 1.43 ¹⁾	2.75 \pm 0.90	1.52 \pm 0.42
PPI	21.26 \pm 0.74	25.18 \pm 0.48 ²⁾	22.29 \pm 0.66 ¹⁾³⁾	1.85 \pm 0.57 ⁴⁾	1.02 \pm 0.37 ⁴⁾
<i>F</i>	0.8964	9.878	177.5		
<i>P</i>	0.4231	0.0009	< 0.0001	0.0414	0.0332

SNK- q test after ANOVA, $n = 8/\text{group}$, 1) $P < 0.01$ vs NN; 2) $P < 0.05$ vs NN; 3) $P < 0.01$ vs CC; 4) $P < 0.05$ vs CC

表 3 小鼠腓肠肌质量和肌纤维横切面积及血清 TNF- α 和 IL-6 水平

Table 3 The weight of gastrocnemius muscle, the cross-sectional area of muscle fiber and the level of TNF- α and IL-6

($\bar{x} \pm s$)

Group	Weight of gastrocnemius muscle/mg	Cross-sectional area of muscle fiber/ μm^2	TNF- α /(ng/L)	IL-6(ng/L)
NN	140.8 \pm 13.8	2898 \pm 217	34.5 \pm 2.1	22.9 \pm 1.1
CC	65.6 \pm 5.7 ¹⁾	1279 \pm 216 ¹⁾	124.4 \pm 14.7 ¹⁾	158.8 \pm 13.8 ¹⁾
PPI	81.5 \pm 8.0 ¹⁾³⁾	1604 \pm 227 ¹⁾²⁾	100.8 \pm 13.3 ¹⁾²⁾	110.1 \pm 12.4 ¹⁾²⁾
<i>F</i>	117.4	477.3	114.5	286.0
<i>P</i>	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

SNK- q test after ANOVA, $n = 8/\text{group}$, 1) $P < 0.01$ vs NN; 2) $P < 0.01$ vs CC; 3) $P < 0.05$ vs CC

2.2 小鼠腓肠肌质量

CC 组和 PPI 组腓肠肌质量均明显低于 NN 组($P < 0.05$)。在泮托拉唑干预后,PPI 组腓肠肌质量较 CC 组增加 24.2%($P < 0.05$;表 3)。

2.3 肌纤维横切面积

CC 组和 PPI 组腓纤维横切面积均明显小于 NN 组($P < 0.05$)。泮托拉唑治疗后,PPI 组腓肠肌横切面积较 CC 组增加 25.4%(表 3,图 1)。

2.4 腓肠肌组 Myod1 和 myf5 mRNA 水平

CC 组和 PPI 组 Myod1 和 myf5 mRNA 相对水平明显低于 NN 组($P < 0.05$);泮托拉唑干预后,PPI 组 Myod1 和 myf5 mRNA 相对水平较 CC 组明显升

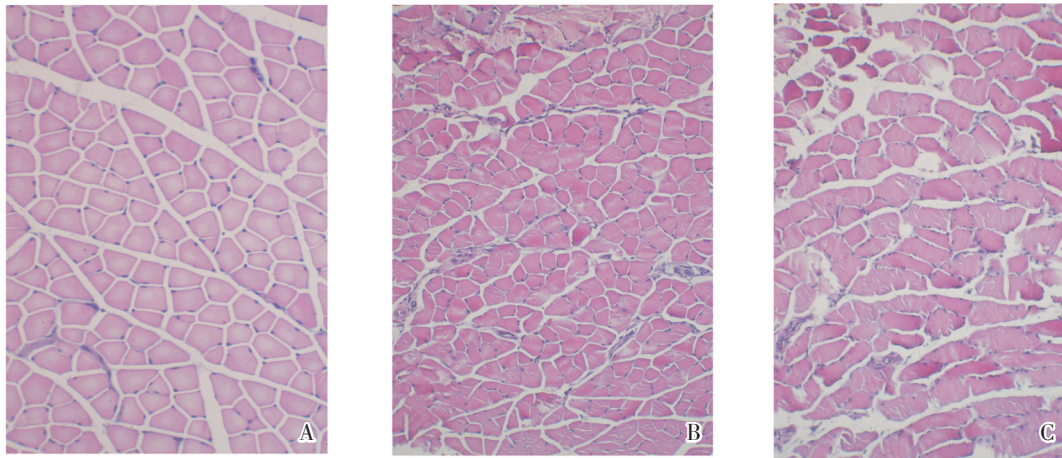
高($P < 0.05$;图 2)。

2.5 腓肠肌组织 MuRF1、MAFBx、Myod1 和 myf5 蛋白表达水平

CC 组和 PPI 组 MuRF1 和 MAFBx 蛋白表达水平明显高于 NN 组,而 Myod1 和 myf5 蛋白表达水平明显则明显低于 NN 组($P < 0.05$);泮托拉唑干预后,PPI 组 MuRF1 和 MAFBx 蛋白表达水平明显低于 CC 组,Myod1 和 myf5 蛋白表达水平较 CC 组明显升高($P < 0.05$;图 3)。

2.6 血清 IL-6、TNF- α 水平

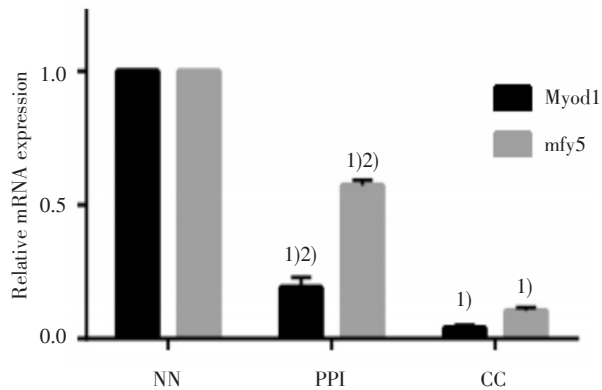
与 NN 组相比,CC 组和 PPI 组血清 IL-6 及 TNF- α 水平明显升高($P < 0.05$)。泮托拉唑干预



A: NN group, $\times 200$; B: PPI group, $\times 200$; C: CC group, $\times 200$.

图1 各组小鼠腓肠肌横切面HE染色

Fig.1 The myofiber cross-section of mice gastrocnemius in each group by HE staining



PCR results show that pantoprazole can increase the mRNA expression of Myod1 and myf5. $n = 8/\text{group}$, 1) $P < 0.01$ vs NN; 2) $P < 0.01$ vs CC

图2 各组小鼠腓肠肌 Myod1 和 myf5 mRNA 表达水平

Fig.2 The level of relative mRNAs expression

的PPI组IL-6及TNF- α 水平则明显低于CC组($P < 0.05$),较CC组分别降低30.7%、18.9%(表3)。

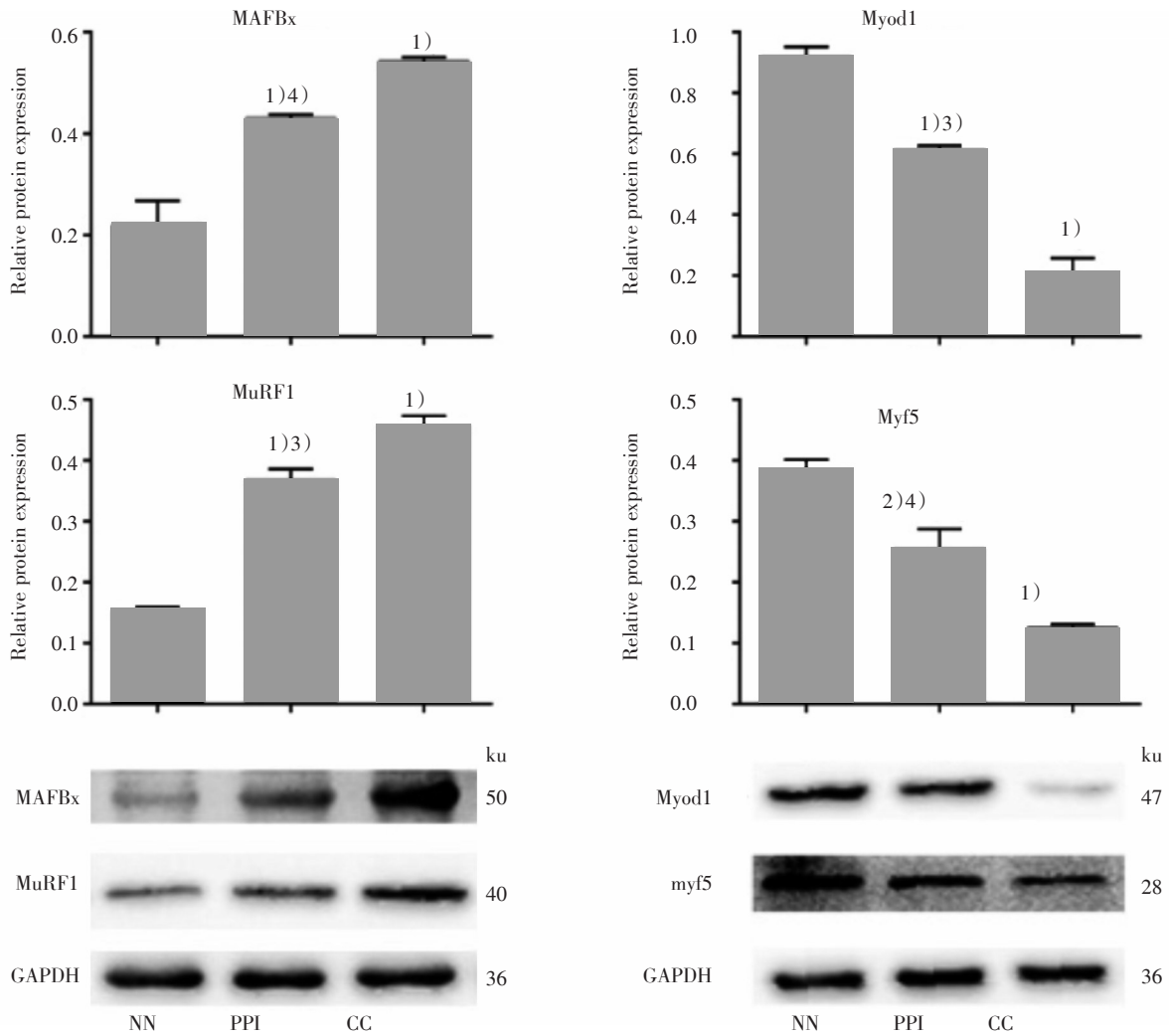
3 讨论

肿瘤恶病质是很多晚期肿瘤患者并发的一种临床综合征。据统计,大约20%的肿瘤病人直接死于恶病质,而非肿瘤本身^[13]。肿瘤恶病质的主要表现是进行性的体质量下降、骨骼肌消耗、蛋白储备减少等,其中骨骼肌消耗是引起和加剧这一过程的中心环节^[14]。目前临床上缺乏十分有效的预防和治疗肿瘤恶病质的药物。

肿瘤恶病质状态下的骨骼肌消耗机制,目前

尚未完全清楚,但骨骼肌消耗的主要原因在于蛋白质合成减少和降解增加,其中炎症因子具有重要的作用。TNF- α 、IL-6的参与导致骨骼肌的分解加剧、分化受阻,同时这些炎症因子还能加剧全身炎症反应,进一步促进恶病质的发生^[15]。近年来,泮托拉唑有研究报道,泮托拉唑具有化疗增敏、抗氧化、抗炎等作用。Zeng等^[7]发现泮托拉唑能抑制肿瘤细胞生长,沈永华等^[16]在恶病质小鼠实验中发现泮托拉唑具有降低TNF- α 和IL-6的表达水平的作用。这些结果提示泮托拉唑可能成为治疗肿瘤恶病质骨骼肌消耗的药物。本研究结果也显示,肿瘤恶病质组TNF- α 和IL-6的表达水平明显升高,而泮托拉唑干预组则明显降低TNF- α 和IL-6水平,这表明泮托拉唑可能通过抑制炎症因子的表达来发挥保护作用。

泛素蛋白酶体途径(ubiquitin-proteasome system, UPS)是骨骼肌蛋白水解过程中重要的一环, MuRF1和MAFbx这两个E3泛素连接酶在这一途径中起到至关重要的作用^[17],参与恶病质进程中的肌肉萎缩^[18]。抑制这两个基因的表达,能明显改善肿瘤恶病质肌肉萎缩和蛋白降解^[19-20]。在我们的研究当中,泮托拉唑能明显抑制恶病质小鼠MAFbx和MuRF1这两个基因的表达。生肌调节因子(MRF)家族有四个成员,包括Myod1、myogenin、myf5、MRF4等,在肌肉发育中起到重要的调节作用。Myod1-/myf5-小鼠,无法生成骨骼肌,也没有前体成肌细胞群产生^[21]。近年来有研究报道, Myod1、myf5基因在骨骼肌萎缩中表达明显减少,



Western blot results show that pantoprazole can reduce the protein expression of MAFBx and MuRF1, increase the protein expression of Myod1 and myf5. $n = 8/\text{group}$, 1) $P < 0.01$ vs NN; 2) $P < 0.05$ vs NN; 3) $P < 0.01$ vs CC; 4) $P < 0.05$ vs CC

图3 各组小鼠腓肠肌蛋白表达水平

Fig.3 The level of relative protein expression

在肌肉启动损伤修复过程中,起到关键作用^[19-21]。在本实验中,恶病质小鼠的Myod1和myf5表达水平也低于正常组,而泮托拉唑能上调这两种生肌调节因子的表达,并最终参与了肌肉损伤修复过程。以上结果表明泮托拉唑能抑制骨骼肌的分解,增强骨骼肌的合成。

综上所述,质子泵抑制剂泮托拉唑可抑制炎症因子TNF- α 和IL-6的表达,抑制泛素蛋白酶体途径MuRF1和MAFBx的表达,上调生肌调节因子Myod1及myf5的表达,起到改善肿瘤恶病质骨骼肌消耗的作用。本实验结果还发现,干预组肿瘤大小和肿瘤质量较恶病质组都有减少,提示泮托拉唑对肿瘤本身可能也有一定的抑制作用,但具

体机制还需要进一步的探索。泮托拉唑在肿瘤恶病质中的积极作用,将可能为临床预防和治疗恶病质提供新的思路。

参考文献:

- [1] Fearon KC. Cancer cachexia and fat-muscle physiology [J]. NEJM, 2011, 365(6): 565-598.
- [2] Benny Klimek ME, Aydogdu T, Link MJ, et al. Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia [J]. Bioch Biophys Res Commun, 2010, 391(3): 1548-1554.
- [3] Strassmann G, Fong M, Kenney JS, et al. Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer

- cachexia[J]. *J Clin Invest*, 1992, 89(5):1681-1684.
- [4] Talarwojnarowska R, Gasiorowska A, Smolarz B, et al. Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma genes polymorphisms and serum levels in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Neoplasma*, 2009, 56(56):56-62.
- [5] Bonetto A, Aydogdu T, Jin X, et al. JAK/STAT3 pathway inhibition blocks skeletal muscle wasting downstream of IL-6 and in experimental cancer cachexia[J]. *AJP Endocrin Metabol*, 2012, 303(3):E410-430.
- [6] Kedika RR, Souza RF, Spechler SJ. Potential anti-inflammatory effects of proton pump inhibitors: a review and discussion of the clinical implications [J]. *Digest Dis Sci*, 2009, 54(11):2312-2317.
- [7] Zeng X, Liu L, Zheng M, et al. Pantoprazole, an FDA-approved proton-pump inhibitor, suppresses colorectal cancer growth by targeting T-cell-originated protein kinase[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(16):22460-22473.
- [8] 方裕强,许国铭.质子泵抑制剂的研究进展[J].*中华消化杂志*, 1999, 10(s1):53-55.
- [9] Carson JA, Baltgalvis KA. Interleukin 6 as a key regulator of muscle mass during cachexia [J]. *Exer Sport Sci Rev*, 2010, 38(4):168-176.
- [10] Figueras M, Busquets S, Carbó N, et al. Cancer cachexia results in an increase in TNF- α receptor gene expression in both skeletal muscle and adipose tissue[J]. *Int J Oncol*, 2005, 27(3):855-860.
- [11] 王强,郑曰勇,彭旭东,等. Carfilzomib 缓解肿瘤恶病质骨骼肌消耗及其分子机制[J]. *第三军医大学学报*, 2014, 36(20): 2113-2117.
- [12] 王强,李春红,王朝义,等. Carfilzomib 联合 Z-VAD-FMK 对肿瘤恶病质的防治作用[J]. *第三军医大学学报*, 2014, 36(22):2292-2295.
- [13] Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2002, 2(11):862-895.
- [14] 王会玲,凌昌全.肿瘤恶病质的肌肉消耗[J].*中华临床医师杂志(电子版)*, 2011, 5(13):3873-3875.
- [15] 吴国豪.癌性恶病质发生机制及防治对策[J].*中国实用外科杂志*, 2015, 35(1):36-39.
- [16] 沈永华,陈敏,沈卫东,等. 质子泵抑制剂对 SGC-7901 胃腺癌裸小鼠癌性恶病质的作用[J].*胃肠病学*, 2011, 16(1):11-14.
- [17] Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy[J]. *Science*, 2001, 294(5547):1704-1708.
- [18] Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, et al. Atrogin-1, A muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy[J]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, 2002, 98(25):14440-14445.
- [19] Yuan L, Han J, Meng Q, et al. Muscle-specific E3 ubiquitin ligases are involved in muscle atrophy of cancer cachexia: an in vitro and in vivo study [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(5):2261-2265.
- [20] Melstrom LG, Jr MK, Ding XZ, et al. Mechanisms of skeletal muscle degradation and its therapy in cancer cachexia[J]. *Histol Histopathol*, 2007, 22(7):805-852.
- [21] 王东林,毛宝龄.生肌调节因子及其作用机理[J].*国外医学(分子生物学分册)*, 1995, 18(4):157-160.
- [22] Yin H, Li D, Wang Y, et al. Myogenic regulatory factor (MRF) expression is affected by exercise in postnatal chicken skeletal muscles [J].*Gene*, 2015, 561(2): 292-299.
- [23] Qadir AS, Woo KM, Ryou H, et al. MiR-124 Inhibits Myogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Via Targeting Dlx5 [J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(9):1572-1581.
- [24] Günther S, Kim J, Kostin S, et al. Myf5-Positive Satellite Cells Contribute to Pax7-Dependent Long-Term Maintenance of Adult Muscle Stem Cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6):590-601.

(编辑 徐杰)