

Кактусовая груша: натуральный продукт для химиопрофилактики рака

Да-мин Цзоу ,Молли Брюэр ,Франсиско Гарсия ,Жан М. Фейганг ,Цзянь Ван ,Рунгю Занг ,Хуагуан Лю иЧанпин Цзоу

Адрес:

1 Отделение акушерства и гинекологии, Центр медицинских наук Аризоны, Университет Аризоны, Тусон, Аризона 85724, США,

2 Отделение гинекологической онкологии, Онкологический центр Аризоны, Тусон, Аризона 85724, США,

3 Отделение гинекологической онкологии, Университет Фудань, Шанхай, 200032, Китай

4 Медицинский университет Гуанси, Гуанси, 532021, Китай

Электронная почта: Да-мин Цзоу - dmzou@hotmail.com; Молли Брюэр - mbrewer@azcc.arizona.edu; Франсиско Гарсия - fcisco@u.arizona.edu;

Жан М. Фейганг - jmn1@email.arizona.edu; Цзянь Ван - jianw@email.arizona.edu; Рунгю Занг - ryzang@email.arizona.edu;

Хуагуан Лю - hgliu@gxmu.net.cn; Чанпин Цзоу * - zou@email.arizona.edu* Corresponding author

Published: 08 September 2005

Nutrition Journal 2005, 4:25 doi: 10.1186/1475-2891-4-25

Received: 06 March 2005

Accepted: 08 September 2005

This article is available from: <http://www.nutritionj.com/content/4/1/25>

© 2005 Zou et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License

(<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>),

which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Аннотация

Химиопрофилактика рака - это новый подход к профилактике рака, при котором химические агенты используются для предотвращения рака в нормальных группах населения и / или в группах высокого риска. Хотя химиопрофилактика показала себя многообещающей при некоторых видах эпителиального рака, доступные в настоящее время профилактические средства ограничены, а сами средства дороги, как правило, с побочными эффектами. Натуральные продукты, такие как виноградные косточки, зеленый чай и некоторые травы, обладают противораковым действием. Чтобы найти натуральный продукт, который можно использовать для химиопрофилактики рака, мы протестировали раствор плодов кактуса Аризоны, водные экстракты кактусовой груши, на его противораковые эффекты в культивируемых клетках и на животных моделях.

Метод

Водные экстракты кактусовой груши использовались для лечения иммортализованных эпителиальных клеток яичников и шейки матки, а также раковых клеток яичников, шейки матки и мочевого пузыря. Водные экстракты кактусовой груши использовали в шести концентрациях (0, 0,5, 1, 5, 10 или 25%) для обработки клеток в течение 1, 3 или 5 дней. В культивируемых клетках анализировали ингибирование роста, индукцию апоптоза и изменения клеточного цикла; подавление роста опухоли у мышей nude оценивали и сравнивали с эффектом синтетического ретиноида N-(4-гидроксифенил) ретинамида (4-HPR), который в настоящее время используется в качестве химиопрофилактического агента. Иммуногистохимическое окрашивание образцов ткани из опухолей животных проводили для исследования экспрессии гена.

Полученные результаты

Клетки, подвергшиеся воздействию экстрактов кактусовой груши, имели значительное усиление апоптоза и ингибирование роста как иммортализованных эпителиальных клеток, так и раковых клеток в зависимости от дозы и времени. Это также повлияло на клеточный цикл раковых клеток, увеличивая G1 и уменьшая фазы G2 и S и 4-NPR. Экстракты кактусовой груши значительно подавляли рост опухоли у мышей nude, повышали экспрессию аннексина IV и снижали экспрессию VEGF.

Вывод

Экстракты кактусовой груши Аризоны эффективно подавляли рост клеток в нескольких различных культурах иммортализованных и раковых клеток, подавляли рост опухоли у голых мышей и модулировали экспрессию генов, связанных с опухолями. Эти эффекты были сопоставимы с эффектами, вызванными синтетическим ретиноидом, который в настоящее время используется в исследованиях химиопрофилактики. Механизм противоракового действия экстрактов кактусовой груши требует дальнейшего изучения.

ВВЕДЕНИЕ

Цель профилактики рака - задержать или заблокировать процессы инициации и перехода от предраковых клеток к раку. Химиопрофилактика рака, нацеленная на нормальные группы населения и группы высокого риска, включает использование лекарств или других химических агентов для подавления, задержки или обращения вспять развития рака [1,2]. За последние 20 лет были достигнуты значительные успехи в изучении профилактики рака и химиопрофилактики [1,2], и, как следствие, заболеваемость некоторыми видами рака снизилась благодаря методам профилактики и усовершенствованной технологии скрининга [1,2]. Однако заболеваемость и смертность от рака яичников практически не изменились [3], частично потому, что методы раннего выявления (первичная профилактика) не были разработаны, а предотвращение рецидивов (вторичная профилактика) не было достигнуто. Более того, было протестировано лишь ограниченное количество потенциально полезных химиопрофилактических агентов [2,4-6]. Открытие и разработка диетических агентов для профилактики рака впервые началась в Национальном институте рака в 1987 году [7]. Несмотря на то, что за последнее десятилетие в США были разработаны сотни агентов, фактически одобрено лишь несколько новых препаратов [7,8]. Разработка химиопрофилактических средств идет медленно и неэффективно. Если мы хотим достичь цели профилактики рака, как первичного, так и вторичного, необходимы более эффективные и менее токсичные агенты, включая натуральные продукты.

Ранее был обнаружен синтетический ретиноид, N-(4-hydroxyphenyl) ретинамид (4-NPR), который уменьшает риск развития рака яичников в итальянской исследованиях химиопрофилактики рака молочной железы [9-11]. У женщин, получавших 4-NPR, наблюдалось снижение заболеваемости раком яичников [9,10]; однако

после прекращения лечения в группе лечения действительно развился рак яичников [10,11]. В других исследованиях также сообщалось, что ответ ретиноидов не был устойчивым при лечении предраковых состояний и рака при лейкоплакии полости рта или рака шейки матки [13-16]. Эти сообщения предполагают, что долгосрочное введение агентов с более низкой токсичностью будет наиболее важным аспектом химиопрофилактических агентов, особенно для нормальных групп населения и групп высокого риска.

Лечебные преимущества растительных форм были признаны веками. Травы использовались в китайской медицине на протяжении тысяч лет для лечения болезней и заживления ран. Недавно было обнаружено, что компоненты зеленого чая и виноградных косточек обладают противораковым действием [17,18]. Кроме того, как правило, травы и натуральные продукты не обладают значительной токсичностью, присущей синтетическим химическим веществам, что повышает их привлекательность для долгосрочных профилактических стратегий.

Кактус (опунция) много лет использовался как обычный овощ и как лекарство коренными американцами и мексиканцами [19 - 22]. Кактус содержит фрукт, известный как кактусовая груша (*Opuntia ficus-indica*), а растение называется нопале (подушечка). Кактусовая груша содержит пектин, каротины, беталаины, аскорбиновую кислоту, кверцетин и производные кверцетина, которые обладают антиоксидантной активностью [21-24]. В китайской медицине плод кактуса считается слабым ядом и используется как лекарство от воспалений и боли [23,24]. Он также использовался в качестве детоксикационного средства при укусе змей [23,24].

В этом исследовании мы протестировали водные экстракты кактусовой груши на предмет их противоракового действия на раковые клетки яичников, шейки матки и мочевого пузыря, а также на модели яичников на животных голых мышах. Эти результаты сравнивали с эффектом 4-NPR, продемонстрировав противораковое действие кактусовой груши.

Методы

Сотовые линии

Иммортализованные клетки эпителия яичников (IOSE), линии клеток рака яичников OVCA420, SKOV3; линия TCL-1 иммортализованных клеток эпителия шейки матки HPVE6; клеточные линии рака шейки матки, HeLa и Me180; и клетки рака мочевого пузыря UM-UC-6, T24, все были использованы в этом исследовании. Клетки выращивали в смеси 1:1 (об./Об.) Модифицированной Дульбекко среды Игла (DMEM) и F12 Хэма с 10% фетальной бычьей сывороткой при 37 ° C в увлажненной атмосфере, состоящей из 95% воздуха и 5% CO₂.

Животные

Самки мышей nu / nu BALB / c возрастом от 4 до 6 недель были приобретены в зоне животноводства Национального института рака, Центр исследования рака Фредерика (Frederick, MD). Мышей содержали в шкафах с ламинарным потоком в условиях, свободных от патогенов, и содержали в учреждении по уходу за животными при Медицинском колледже Университета Аризоны в соответствии с институциональными правилами, утвержденными Комитетом по защите животных, а также действующими правилами и стандартами Департамента здравоохранения. Сельское хозяйство и Министерство здравоохранения и социальных служб.

Кактус продукт

Экстракт кактусовой груши очищали из зрелых плодов кактуса путем смешивания. Раствор кактусовой груши содержал как плоды кактуса, так и семена, и его центрифугировали при 4000 об/мин в течение 30 минут и фильтровали с использованием 0,45 мкМ фильтра Nalgene (Рочестер, штат Нью-Йорк), затем делили аликвоты на 15 мл и хранили при -20 ° C. Мы использовали чистые экстракты, которые были разбавлены в среде для культивирования клеток для достижения концентраций 0, 0,5, 1, 5, 10 и 25% (об. / Об.) Перед использованием в культуре клеток. Осмоляльность раствора составляла 358 м осм / кг для 25% раствора, 342 м осм / кг для 10% и 326 м осм / кг для 5%. Значение pH составляло

7,26–7,28. Животным вводили чистые плоды кактуса груши внутрибрюшинно (ip) по 0,4 мл в день.

Влияние продуктов кактусов на пролиферацию клеток в однослойных культурах

Клетки высевали в 96-луночные планшеты при концентрации 10 4 клеток на лунку и выращивали в течение 24 часов. Затем клетки инкубировали в растворе кактусовой груши при различных концентрациях в течение 1, 3 или 5 дней. Ингибирование роста определяли с использованием метода кристаллического фиолетового, как описано [25]. Вкратце, после 5 дней обработки клетки фиксировали 5% глутартальдегидом в фосфатно-солевом буфере (PBS), промывали дистиллированной водой и полностью сушили. Клетки инкубировали в смеси 1: 1 (об. / Об.) 200 мМ 3- (циклогексиламино) -1-пропансульфоновой кислоты (CAPS; pH 9,5) и 0,2% кристаллического фиолетового при 25 ° C в течение 30 мин, а затем промывали и сушили. Фиксированные и окрашенные клетки солубилизировали 10% ледяной уксусной кислотой и определяли оптическую плотность при A590 нм с использованием планшет-ридера. Ингибирование роста рассчитывали согласно уравнению: ингибирование = $(1 - N_t / N_c) \times 100$, где N_t и N_c - количество клеток в обработанной и контрольной культурах соответственно.

Все эксперименты были выполнены в трех экземплярах, и были рассчитаны среднее значение ± стандартное отклонение. IC50 также определяли при 50% скорости роста клеток в каждом.

Анализ клеточного цикла путем окрашивания йодидом пропидия (PI)

Клетки обрабатывали 0,5 и 25% раствором кактусовой груши в течение 2 дней, собирали центрифугированием и фиксировали в 4% параформальдегиде pH 7,4 при комнатной температуре в течение 30 минут, промывали и инкубировали в 70% этаноле, содержащем 1% HCl -20 ° C в течение 10 минут. Затем клетки окрашивали 500 мкл раствора йодида пропидия / RNКазы А в темноте в течение 30 минут при комнатной температуре, анализировали проточной цитометрией с использованием проточного цитометра FACScan (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния) с аргоновым лазером мощностью 15 мВт, используемым для возбуждения при 488 нм. Флуоресценция измерялась при 585 нм. Компьютерный анализ был завершен с помощью BD Biosciences CellQuest Pro и ModFit LT с помощью данных Верити программного обеспечения для обработки, чтобы предоставить информацию о доле апоптотических

клеток, а также доли клеток в G1, S и O 2 фазы клеточного цикла.

Анализ апоптоза, индуцированного продуктом кактуса, с помощью метода мечения ник-конца (TUNEL), опосредованного терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой (TdT), флуоресцеин-дезоксисуридин-трифосфат (dUTP) [25].

После инкубации с 0,5 и 25% раствором кактусовой груши в течение 2 дней клетки фиксировали в 1% формальдегиде в PBS (pH 7,4) в течение 15 минут при 4 ° C. Затем клетки дважды промывали PBS, ресуспендировали в 70% ледяном этаноле и хранили в морозильной камере -20 ° C до использования. Для анализа клетки сначала суспендировали в 1 мл промывочного буфера, содержащего какадилловую кислоту, буферный раствор трис-HCl и азид натрия (набор для проточной цитометрии Phoenix, Phoenix Flow Systems, Сан-Диего, Калифорния). Примерно 10 бклетки ресуспендировали в 50 мкл буфера для окрашивания, содержащего буфер Tris-HCl, TdT и флуоресцеин-12-dUTP (набор для проточной цитометрии Phoenix). Клетки инкубировали при 37 ° C в течение 60 мин, а затем дважды промывали PBS. Клетки окрашивали 500 мкл раствора пропидия йодида / РНКазы А в темноте в течение 30 минут при комнатной температуре, а затем анализировали проточной цитометрией с использованием проточного цитометра FACScan (Epics Profile, Coulter Corp., Хайялиа, Флорида) с аргонном мощностью 15 мВт. лазер использовали для возбуждения на 488 нм. Флуоресценцию измеряли при возбуждении 520 нм и 570 нм. Набор для проточной цитометрии Phoenix включал суспензии клеток, которые служили в качестве отрицательного и положительного контроля апоптоза. Компьютерный анализ данных предоставил информацию о процентном содержании апоптотических клеток, а также о доле клеток в гиподиплоиде, G1, S и G 2. фазы клеточного цикла.

Ксенотрансплантаты опухолей человека

Клетки рака яичников SKOV3 выращивали до субконфлюэнтности и собирали с использованием 0,1% трипсина и 1 mM EDTA. Клетки промывали средой, содержащей сыворотку, для гашения трипсина, а затем средой, не содержащей сыворотки. Жизнеспособность клеток определяли путем исключения трипанового синего, и для экспериментов *in vivo* использовали только культуры с жизнеспособностью более 90% . Клетки ресуспендировали в среде в количестве 5 × 10⁶ клеток. Раствор кактусовой груши, а также химиопротективный агент 4-NPR (0,43 мг

внутрибрюшинно дважды в неделю, что эквивалентно дозе 200 мг / кг для человека) вводили за один день до инъекции опухолевых клеток (день 1) (рис. 1). Контрольные животные получали Н 2О. Опухолевые клетки вводили подкожно (2 день). Опухоли появились на 10–14-е сутки, их размер измеряли дважды в неделю штангенциркулем. Большой (А) и меньший (В) диаметры использовались для расчета объема опухоли (V) с использованием уравнения $V = 0,4 \times A \times B^2$ [27]. Схема лечения раствором кактусовой груши была следующей: 0,4 мл раствора вводили внутрибрюшинно дважды в неделю в течение первых двух недель, затем пять раз в неделю с третьей по шестую неделю (рис. 1).

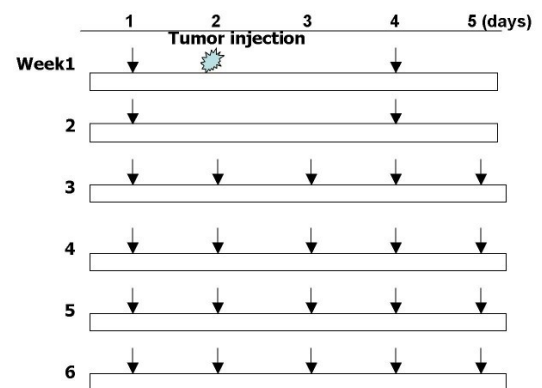


Рис. 1. Схема лечения экстрактами кактусовой груши у животных. Количество инъекций в неделю было представлено стрелками. В исследовании были исследованы четыре группы животных: только SKOV3, SKOV3 + Н 2 О, SKOV3 + экстракты кактусов и SKOV3 + 4-NPR. Концентрация 4-NPR составляла 0,43 мг / кг, что эквивалентно 200 мг / кг человека.

Иммуноокрашивание

Залитые парафином срезы депарафинизировали в ксилоле, регидратировали с помощью градуированных спиртов до воды, затем инкубировали в течение 10 минут в PBS. Срезы блокировали на 30 мин 3% нормальной лошадиной сывороткой (NHS), разведенной в PBS; затем срезы подвергали блоттингу и инкубировали с антителами к p53, аннексину IV и VEGF (Santa Cruz Biotech, Санта-Крус, Калифорния, и Zymed Lab Inc, Сан-Франциско, Калифорния) в течение 1 часа при комнатной температуре. Эндогенную пероксидазу инактивировали инкубацией в течение 30 мин в 0,015% перекиси в метаноле и регидратировали в течение 10 мин в PBS. Срезы инкубировали с биотинилированным конским антителом в течение 1 часа и промывали PBS, а затем комплексом авидин-биотин-пероксидаза (ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Предметные стекла промывали, и пероксидазную реакцию проявляли диаминобензидином и пероксидом, затем контрастировали гематоксилином, установлен в аква-крепление и

оценен с помощью световой микроскопии. Положительные и отрицательные антитела и клетки рака мочевого пузыря и яичников использовали в качестве контролей в каждом анализе.

Статистический анализ

Стюдент т испытание было проведено сравнение двух средств. Односторонний дисперсионный анализ с последующим тестом наименьших квадратов разницы Фишера (LSD) использовался для анализа размера опухоли в различных группах лечения или множественных средних. Двусторонние значения Р определяли во всех анализах. $P < 0,05$ считается статистически значимым.

Полученные результаты

Эффект ингибирования роста раствором кактусовой груши на клеточные линии яичников человека.

Экстракты кактусовой груши использовали в различных концентрациях (см. Методы) для сравнения ингибирующего действия на рост 3 различных типов раковых клеток человека в однослойных культурах. Чувствительность раковых клеток к лечению кактусами различалась в зависимости от типа клеток. Клетки рака шейки матки оказались наиболее чувствительными по сравнению с клетками рака яичников и мочевого

пузыря (рис. 2а, б, в). Однопроцентный (1%) раствор кактусовой груши подавлял 40–60% иммортализованных клеток эпителия шейки матки и клеток рака шейки матки (рис. 2а). Для клеток рака яичников 5% раствор кактусовой груши был эффективен в отношении ингибирования роста клеток IOSE и OVCA420, однако 10% раствор требовался для ингибирования роста клеток SKOV3 (рис. 2б.). Концентрация экстрактов кактусовой груши, влияющая на 50% роста клеток рака мочевого пузыря, превышала 1% (рис. 2с.) Эффект раствора кактуса была доза в зависимости от времени (фиг. 2). IC50 (концентрация, вызывающая гибель 50% клеток) в раковых клетках шейки матки и мочевого пузыря после 5-дневной обработки раствором кактусовой груши составляла менее 2 процентов. Для клеток шейки матки IC50 для TCL-1 составлял 1,5%; HeLa составлял 1,8%; и ME180 составлял 0,8%. Для клеток рака мочевого пузыря IC50 составлял 0,9% и 1,3% для клеток UM-UC-6 и T24 соответственно. Однако IC50 для клеток яичников варьировала, IC50 для клеток IOSE, OVCA420 и SKOV3 составляла 2%, 0,8% и 8% соответственно. Морфологические изменения были вызваны экстрактами кактусовой груши через 3 дня после обработки и соответствовали действию агента на рост клеток шейки матки (рис. 3), клеток яичников (рис. 4) и клеток рака мочевого пузыря (рис. 5).

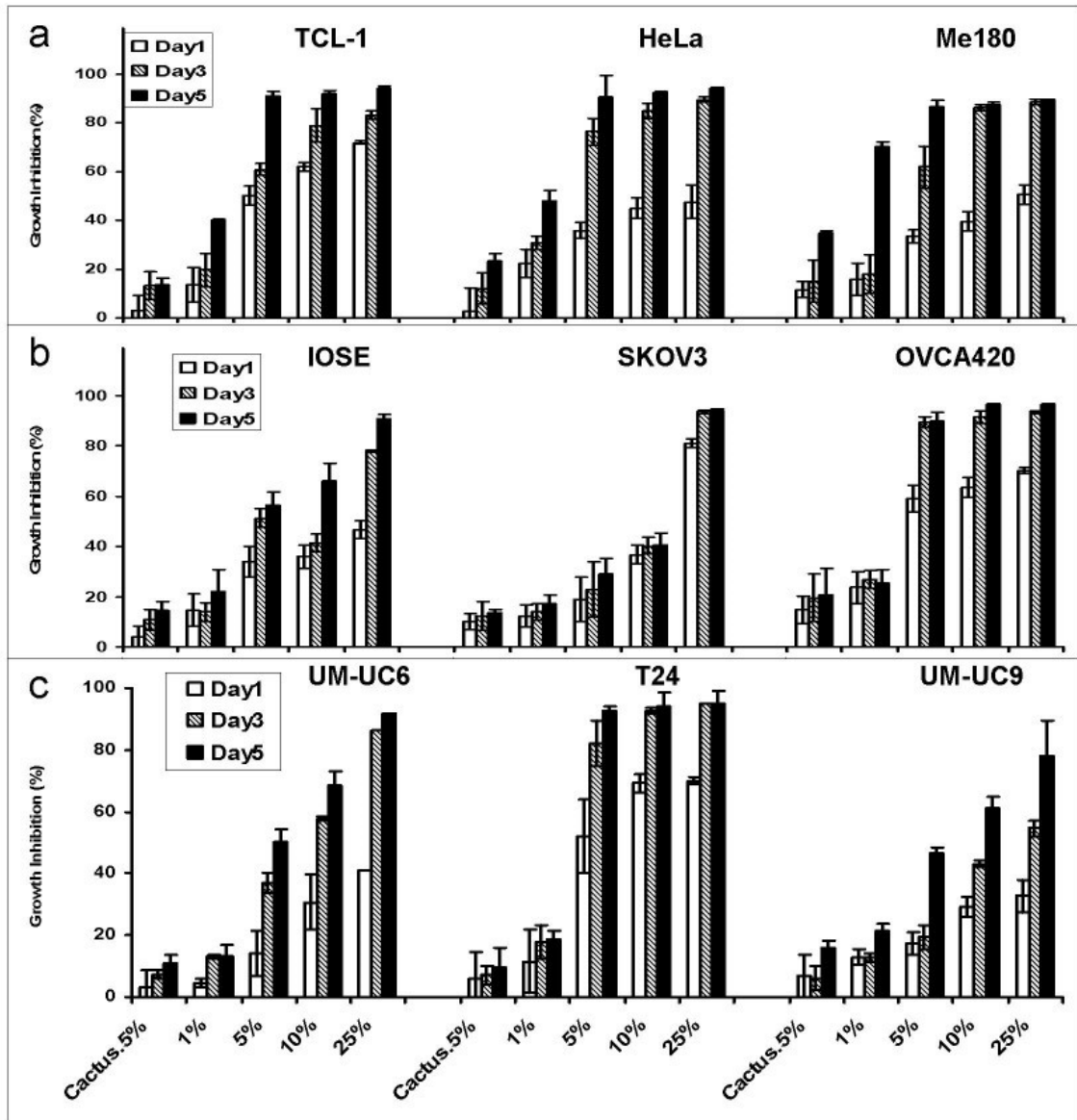


Рис. 2. Влияние экстрактов кактусовой груши на рост раковых клеток шейки матки, яичников и мочевого пузыря человека в однослойных культурах. Клетки выращивали в течение 1, 3 или 5 дней в отсутствие (контроль) или в присутствии 0,5, 1, 5, 10 или 25% экстрактов кактусовой груши в (а) иммортализованных клетках шейки матки и клетках рака шейки матки; (б) иммортализованные клетки яичников и клетки рака яичников; и (с) раковые клетки мочевого пузыря. Значения представляют собой средние значения ± стандартное отклонение для трех культур. Процент ингибирования роста (GI) рассчитывали с использованием уравнения: $\% GI = (1 - Nt / Nc) \times 100$; где Nt и Nc представляют собой количество клеток в обработанной и контрольной культурах соответственно.

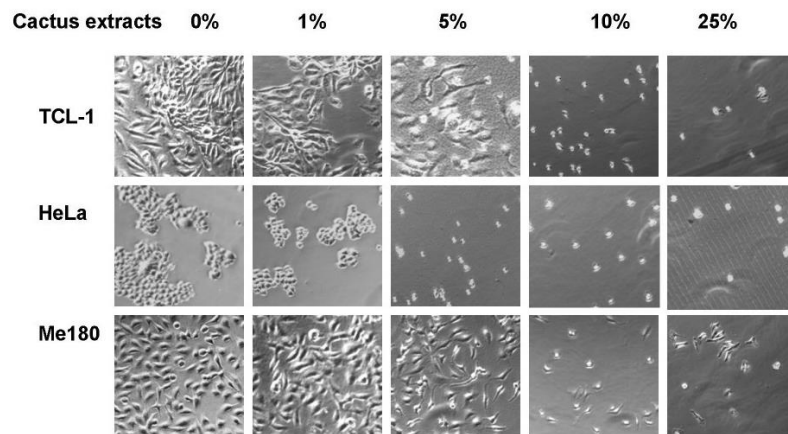


Рис. 3. Влияние экстрактов кактусовой груши на морфологию клеток шейки матки. Нормальные клетки шейки матки и клетки рака шейки матки выращивали в отсутствие (контроль) или в присутствии различных концентраций экстрактов кактусов. Фотографии были сделаны на 3-й день после удаления среды, содержащей плавающие клетки.

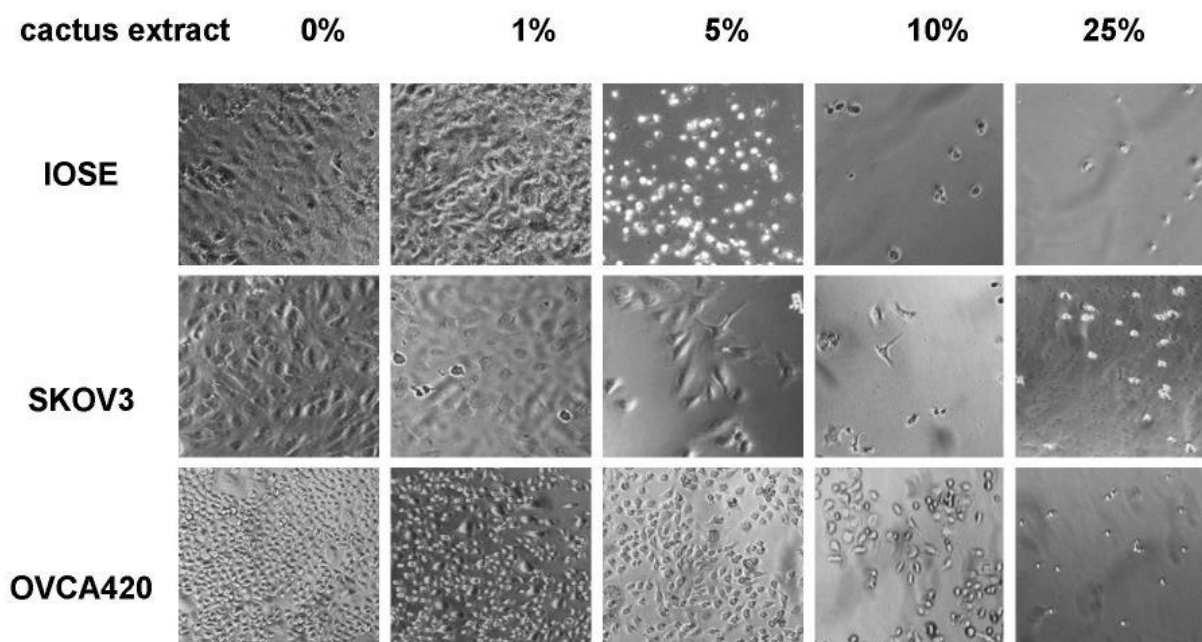


Рис. 4. Влияние экстрактов кактусовой груши на морфологию клеток яичников. Иммутиализованные клетки яичников и клетки рака яичников выращивали в отсутствие (контроль) или в присутствии различных концентраций экстрактов кактусов. Фотографии были сделаны на 3-й день после удаления среды, содержащей плавающие клетки.

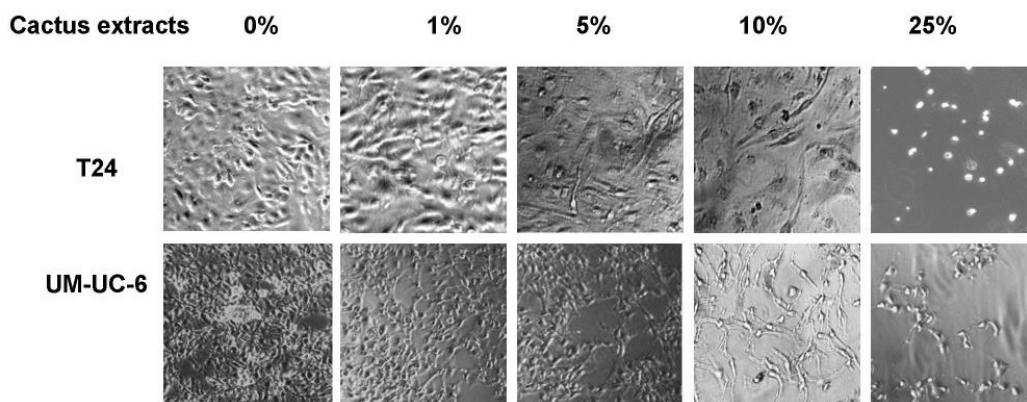


Рис.5. Влияние экстрактов кактусовой груши на морфологию раковых клеток мочевого пузыря. Клетки рака мочевого пузыря выращивали в отсутствие (контроль) или в присутствии различных концентраций экстрактов кактусов. Фотографии были сделаны на 3-й день после удаления среды, содержащей плавающие клетки.

Индукция апоптоза экстрактом кактуса в различных раковых клетках

Раствор кактусовой груши индуцировал апоптоз во всех трех линиях раковых клеток, протестированных с помощью анализа TUNEL (рис. 6 и 7). В линиях раковых клеток самый сильный эффект индукции апоптоза был обнаружен в клетках шейки матки. Популяция клеток апоптоза увеличивалась более чем на 50% при концентрации 25% экстракта кактуса по сравнению с необработанными клетками (фиг. 6). Это соответствовало эффектам ингибирования роста клеток (рис. 2 и 6). Иммутиализованные

клетки эпителия шейки матки были наиболее чувствительными, в которых апоптотических клеток увеличилась более чем 70% после обработки (фиг. 6). Индукция апоптоза в клетках рака яичников и мочевого пузыря различалась: в клетках рака яичников экстракты кактуса увеличивали индукцию апоптоза с 40% до 50% в клетках OVCA420 и SKOV3 (рис. 7, слева и в середине панели). В клетках рака мочевого пузыря T24 апоптоз составлял 30% (рис. 7, правая панель). Индукция апоптоза не была значительной при 5% концентрации.

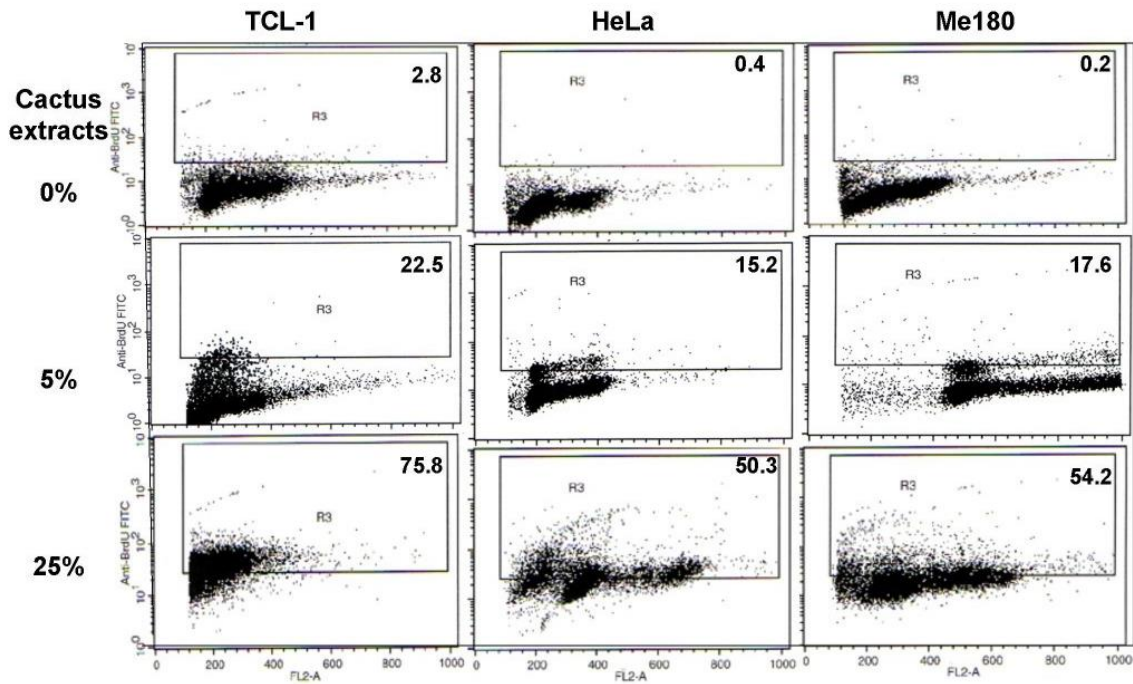


Рис. 6. Индукцию апоптоза анализировали с помощью теста TUNEL в клетках шейки матки. Клетки обрабатывали 5% и 25% раствором кактусовой груши в течение 2 дней. Клетки собирали и инкубировали с TdT в присутствии меченного биотином BrdU и анализировали проточной цитометрией. Процент клеток с апоптозом представлен темными точками (флуоресценция отдельных клеток) над линией в области R3 (R3 - компьютерная программа анализа апоптоза).

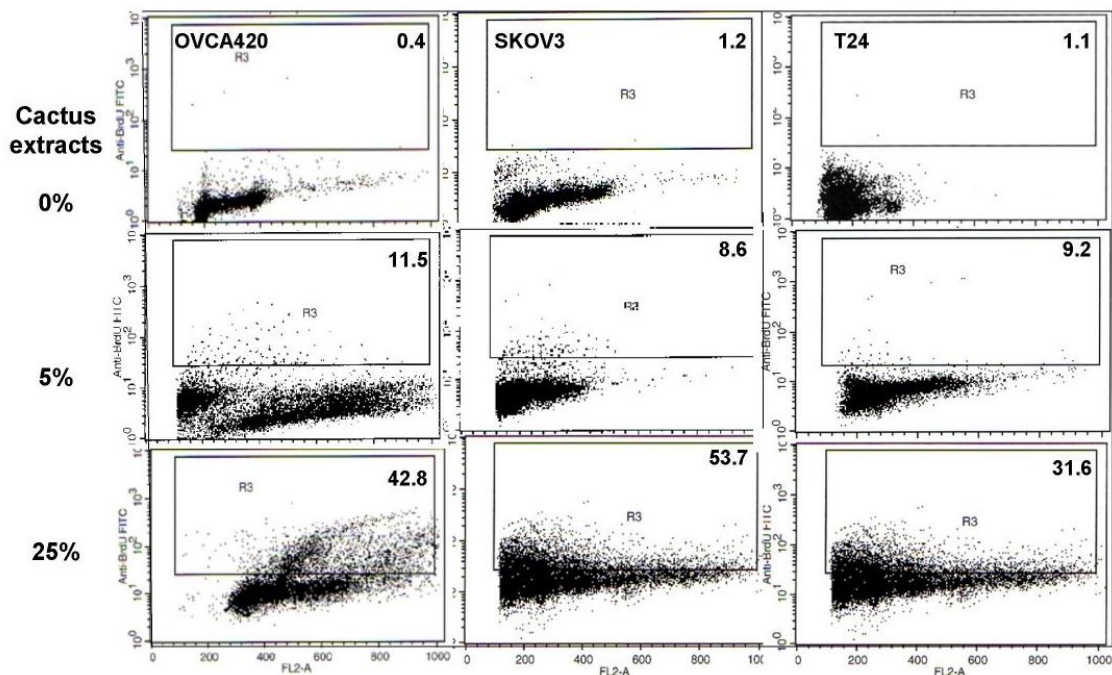


Рис. 7. Индукция апоптоза анализируется с помощью анализа TUNEL в раковых клетках яичников и мочевого пузыря. Результаты анализа TUNEL показали индукцию апоптоза экстрактом кактуса в клетках рака яичников (левая и средняя панель) и раковых клетках мочевого пузыря (правая панель).

Клеточный цикл и анализ апоптоза раковых клеток

Анализ содержания ДНК и клеточного цикла проводили после обработки раствором кактусовой груши 0, 5 и 25%. Результаты показали, что экстракты кактусовой груши влияют на клеточный цикл раковых клеток, начиная с 5% концентрации

(рис. 8a и 8b). В клетках рака шейки матки экстракты кактусов увеличивают количество клеток в G1 и уменьшают их в S-фазе (рис. 8a). Обработка более высокими концентрациями экстрактов кактусовой груши увеличивала количество клеток в G1 и уменьшала количество клеток в G2 и в S-фазе в клетках рака яичников и

мочевого пузыря (рис. 8b). Влияние кактуса на клеточный цикл было дозозависимым.

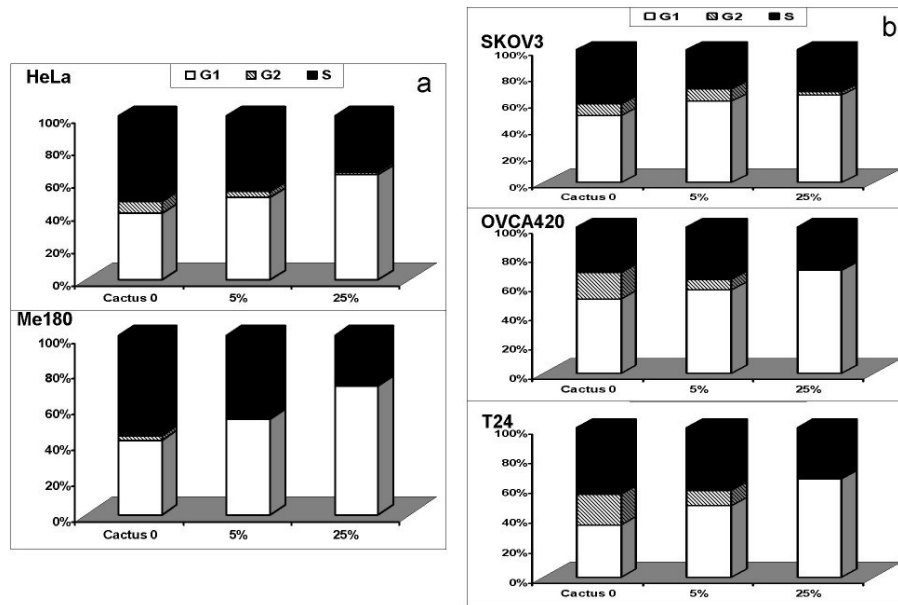


Рис. 8. Анализ клеточного цикла. Клетки обрабатывали 5 и 25% экстрактом кактусовой груши в течение 2 дней. Клетки окрашивали раствором пропидия йодида / РНКазы А в течение 30 мин, затем анализировали проточной цитометрией с использованием проточного цитометра FACScan. (а) клетки рака шейки матки HeLa и Me180; (б) клетки рака яичников SKOV3 и OVCA420 (вверху) и клетки рака мочевого пузыря T24 (внизу).

Продукты кактуса ингибировали рост опухоли на модели голых мышей

Группы лечения и график лечения показаны на рис. 1. Вес тела животного измеряли два раза в неделю для определения потери веса, что

указывало на токсичность. Экстракты кактусовой груши не оказали значительного влияния на потерю веса (рис. 9а) или поведение животных.

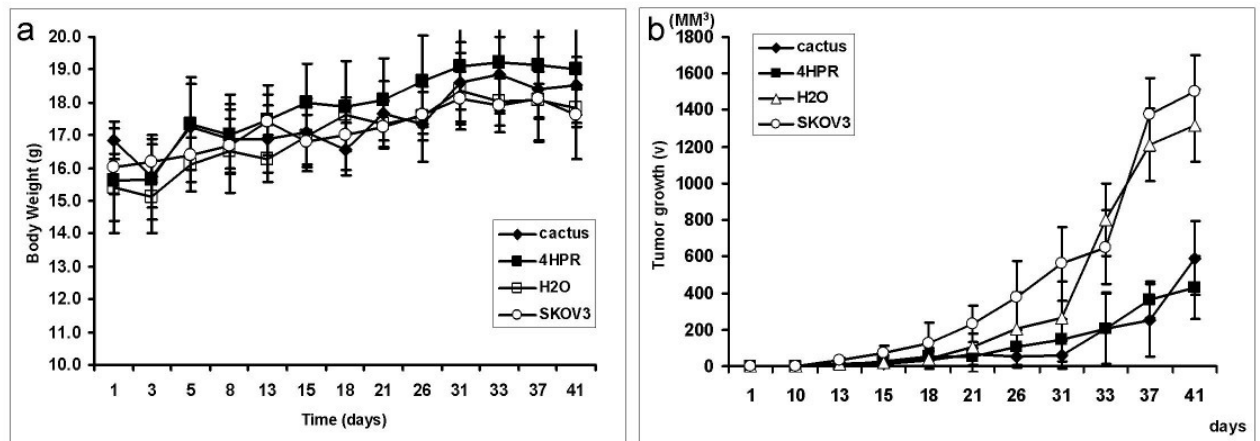


Рис. 9. Кривая массы тела животного. Во время эксперимента массу тела измеряли дважды в неделю. На рисунке представлено контрольное животное, обозначенное как H₂O, и обработанное животное только как SKOV3 (SKOV3), SKOV3 + кактусовая груша (золь груши) и SKOV3 + 4HPR (4-HPR). б. Кривая роста опухоли. Размер опухоли в группах обработки кактусовой груши и 4-HPR по сравнению с контрольной группой только SKOV3 и SKOV3 плюс H₂O был значительно уменьшен ($p < 0,05$). Эффект раствора кактусовой груши по сравнению с 4-HPR на ингибирование роста опухоли, оба агента были способны ингибировать рост опухоли, инокулированной SKOV3, разница не является статистически значимой ($p > 0,05$).

Раствор кактусовой груши был способен подавлять рост опухоли у мышей nude по сравнению с таковым у необработанных животных или животных, получавших H₂O (фиг. 9б). Эффект раствора кактусовой груши на ингибирование роста опухоли, на что указывает

размер опухоли, сравнивали с 4-HPR, который в настоящее время используется в качестве химиопрофилактического средства в клинических испытаниях рака яичников, шейки матки и мочевого пузыря [11 - 17] (рис. 9б). Мы сравнили контрольное животное, которому транспланти-

рвали только клетки SKOV3 и SKOV3 + H₂O для группы лечения либо экстрактами кактусовой груши, либо 4-HPR. Экстракты кактусовой груши и 4-HPR значительно уменьшали размер опухоли ($p < 0,05$). Ингибирующий эффект 4-HPR существенно не отличался от эффекта раствора экстракта кактусовой груши ($p > 0,05$).

Иммуногистохимическое окрашивание на экспрессию p53, аннексина IV и VEGF

Экспрессию p53, аннексина IV и VEGF исследовали в опухолевых тканях животных. Обработка 4-HPR и экстрактами кактуса увеличивала экспрессию аннексина IV и снижала экспрессию VEGF; также экстракты кактусов оказали более сильное влияние на подавление экспрессии VEGF (рис. 10). И 4-HPR, и экстракты кактуса немного изменили экспрессию p53, где наблюдались более отрицательные ядра (рис. 10).

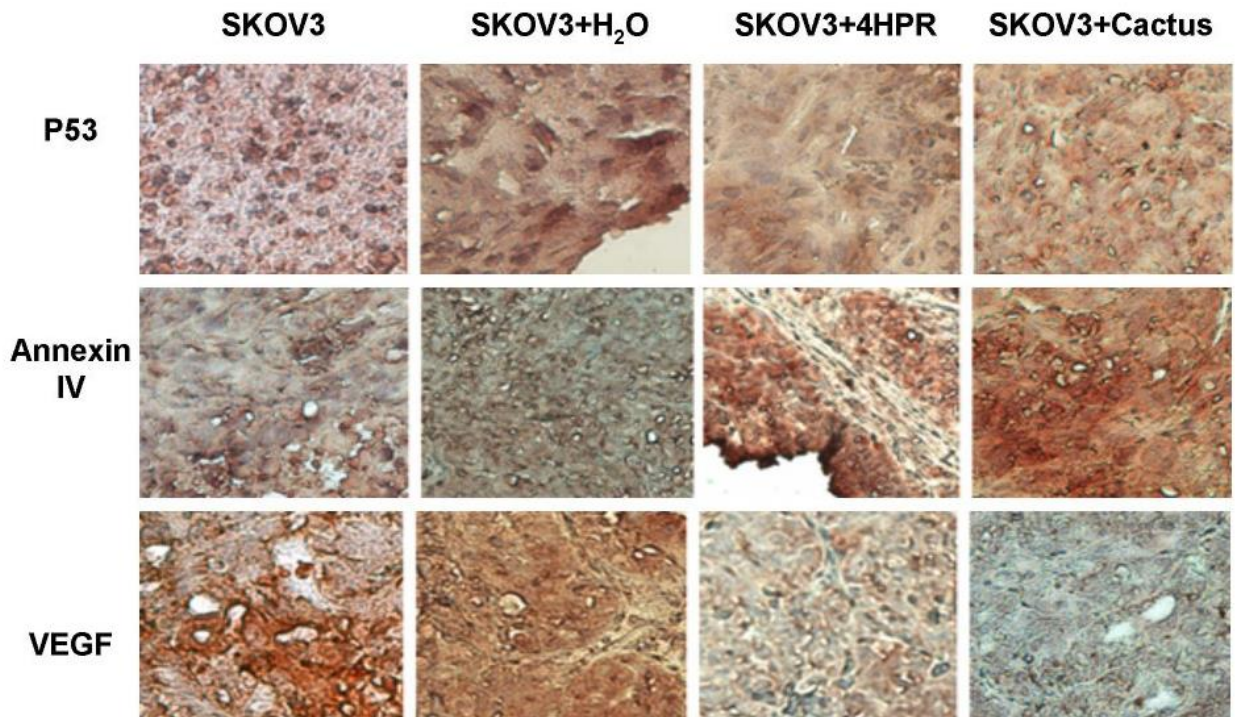


Рис. 10. Репрезентативные образцы иммуногистохимии p53, аннексина IV и VEGF в срезах опухолей животных. Экспрессия p53 была окрашена как положительная (+) в группах только SKOV3 и SKOV3 плюс H₂O, обработка 4-HPR немного изменила ее экспрессию, и большинство ядер были окрашены отрицательно (верхняя панель). Обработка экстрактом кактуса была обнаружена в некоторых ядрах, окрашенных отрицательно (слабая). Экспрессия аннексина IV была обнаружена отрицательно (-) в группах только SKOV3 и SKOV3 плюс H₂O, обработка как 4-HPR, так и экстрактов кактуса увеличивала его экспрессию (средняя панель). Экспрессия VEGF была обнаружена положительно (+) в группах только SKOV3 и SKOV3 плюс H₂O, обработка как 4-HPR, так и экстрактов кактуса снижала его экспрессию (нижняя панель).

Обсуждение

За последние два десятилетия был достигнут значительный прогресс в понимании молекулярных и клеточных механизмов предраковых состояний и прогрессирования рака [2]. Тем не менее, разработка эффективных и безопасных средств профилактики и лечения рака остается медленной, неэффективной и дорогостоящей [7], и мало что можно предложить населению высокого риска для первичной профилактики и выжившим после рака для предотвращения рецидива рака. Ключом к эффективной химиопрофилактике является

идентификация химиопрофилактических агентов, которые могут эффективно ингибировать развитие рака без токсических побочных эффектов. В итальянском исследовании 4-HPR ретиноиды показали профилактическое действие при раке яичников только в период приема препарата. После прекращения лечения заболеваемость раком яичников увеличилась до уровня, который наблюдался в нелеченой контрольной группе [10,11]. Следовательно, для обеспечения эффективности химиопрофилактических агентов может потребоваться длительный период времени. В результате становится важной идентификация агентов с небольшой токсичностью или без нее.

Мы показали, что экстракты кактусовой груши, натуральный продукт, обладают противораковой активностью, хотя активный компонент (ы) не был четко идентифицирован. Поскольку экстракты кактусовой груши не обладают токсическим действием, их можно легко использовать, например, в качестве пищевых добавок [19-21] в группах нормального и высокого риска.

Было отмечено, что у коренных американцев более низкий уровень заболеваемости раком по сравнению с белыми и афроамериканцами [3]. И кактусовая груша, и нопале, содержащие множество антиоксидантов, на протяжении веков использовались коренными американцами в качестве пищевой добавки. Наши результаты показывают, что кактусовая груша подавляет рост различных раковых клеток *in vitro* и *in vivo*. Продукты кактуса подавляли рост раковых клеток с концентрацией всего 5%; Эта концентрация также влияет на клеточный цикл с увеличением фазы G1 (рис. 2 и 8). Однако апоптоз наблюдался при более высокой концентрации 10% (данные не показаны) и 25% (фиг. 6 и 7).

Мы также сравнили кактус с химиопрофилактическим агентом 4-NPR на мышцах *nude*. И кактус, и 4-NPR ингибировали рост рака яичников. Было высказано предположение, что антиканцерогенные свойства природных и синтетических ретиноидов частично объясняются антиоксидантным действием [28-30], повышенное потребление фруктов и овощей связано с профилактикой различных заболеваний человека, а окислительное повреждение - важный этиологический фактор риска многих заболеваний, включая рак и болезни сердца. Экстракты кактусовой груши также содержат множество антиоксидантов, которые могут уменьшить окислительное повреждение. Клинические испытания витамина С и кактусовой груши продемонстрировали, что добавки витамина С в сопоставимой дозировке усиливают общую антиоксидантную защиту, но не оказывают значительного воздействия на окислительный стресс организма [21,22]. Компоненты экстракта кактусовой груши, помимо витаминно-антиоксидантов, могут играть роль в антиоксидантных эффектах [21,22,31-33].

Канцерогенез можно рассматривать как процесс прогрессирующей дезорганизации. Этот процесс характеризуется накоплением генотипических изменений и соответствующих тканевых и клеточных аномалий, включая потерю контроля над пролиферацией и апоптозом. Диетический агент, который может усиливать пути антипролиферации и изменять клеточный цикл раковых клеток без токсичности, мог бы быть

потенциальным агентом для химиопрофилактики. Хотя механизм применения экстракта кактусовой груши в профилактике рака неясен, наше текущее исследование показывает, что кактусовая груша действительно изменяет экспрессию определенных генов, связанных с ростом клеток и апоптозом. Экстракты кактусовой груши повышали уровень аннексина IV и снижали экспрессию VEGF в опухолях животных. Аннексин IV, Ca²⁺-зависимый мембранно-связывающий белок, экспрессируется во многих эпителиальных раках [34]. Аннексин IV играл ключевую роль в ранних фазах апоптоза [35], он был идентифицирован в инициации апоптоза в пренеопластических колоноцитах человека [35], а его экспрессия регулировалась кверцетином [35]. Кверцетин - один из компонентов экстрактов кактусовой груши. Наши результаты (неопубликованные данные) и другие отчеты [35, 36] предполагают, что кверцетин может быть одним из активных соединений, ответственных за антиканцерогенные и индуцирующие апоптоз эффекты экстрактов кактусовой груши. В нашем исследовании экстракты кактусовой груши снижали экспрессию VEGF, предполагая, что экстракты кактусовой груши могут оказывать ингибирующее действие на ангиогенез, важный фактор, способствующий росту опухоли и метастазированию. Мы не наблюдали значительного влияния на экспрессию p53, вызванного экстрактами 4-NPR или кактусовой груши. Ожидается мутация p53 с клеточной линией SKOV3, опухолевыми клетками, использованными в этой животной модели [37,38], но в этом исследовании мы наблюдали минимальный эффект на экспрессию p53 после обработки экстрактом кактуса и 4-NPR. Однако, поскольку как дикий тип, так и мутантный p53 могут вносить вклад в индукцию апоптоза, эти результаты не могут исключить участие пути p53 посредством 4-NPR или экстракта кактусовой груши.

Для разработки агентов пищевого происхождения NCI выступает за совместную разработку одного или очищенного экстракта нескольких предполагаемых активных соединений, которые содержатся в пищевых продуктах [7]. Экстракты кактусовой груши, протестированные в этом исследовании, могут быть таким кандидатом в профилактике рака как у нормальных, так и у людей с высоким риском, а также в предотвращении рецидивов у пациентов с предыдущими формами рака. Этот продукт перспективен для длительного использования из-за безопасности пищевых продуктов и того факта, что они не воспринимаются как «химические вещества».

Вывод

Кактус опунции Аризоны эффективно подавляет рост клеток в нескольких различных иммортализованных и раковых культурах клеток *in vitro* и подавляет рост опухоли у голых мышей на модели рака яичников. Механизм противоракового действия экстрактов кактусовой груши еще полностью не изучен. В настоящее время мы изучаем экспрессию генов, связанных с ростом клеток и апоптозом, которая может быть изменена обработкой продуктами кактуса, чтобы выяснить возможные пути, посредством которых этот натуральный продукт оказывает свое противораковое действие.

Ссылки

1. Kelloff GJ, Sigman CC, Greenwald P: Химиопрофилактика рака: прогресс и перспективы. *Eur J Cancer*. 1999, 35: 2031-2038. 10.1016 / S0959-8049 (99) 00299-3.
2. Kelloff GJ, Crowell JA, Steel V, Lubet RA, Boone CW, Malone WA, Hawk ET, Lieberma R, Lawrence JA, Sigman CC: Progress in Cancer Chemoprevention. *Ann NY Acad Sci*. 1999, 889: 1-13.
3. Статистика рака 2004 г. 2004 г., Американское онкологическое общество
4. Kelloff GJ, Sigman CC, Hawk ET, Johnson KM, Crowell JA, Guyton KZ: биомаркеры суррогатных конечных точек при разработке химиопрофилактических препаратов. *IARC Sci Publ*. 2001, 154: 13-26.
5. Woude GF, Kelloff GJ, Ruddon RW, Koo HM, Sigman CC, Barrett JC, Day RW, Dicker AP, Kerbel RS, Parkinson DR, Slichenmyer WJ: Reanalysis of Cancer Drugs: Old Drugs, New Tricks. *Clin Cancer Res*. 2004, 10: 3897-3907.
6. Kelloff GJ, Bast RC, Coffey DS, D'Amico AV, Kerbel RS, Park JW, Ruddon RW, Rustin GJ, Schilsky RL, Sigman CC, Woude GF: биомаркеры, суррогатные конечные точки и ускорение разработки лекарств для профилактики рака и лечение: пролог обновления. *Clin Cancer Res*. 2004, 10: 3881-3884.
7. Kelloff GJ, Crowell JA, Steele VE, Lubet RA, Malone WA, Boone CW, Kopelovich L, Hawk ET, Lieberman R, Lawrence JA, Ali I, Viner JL, Sigman CC: Progress in Cancer Chemoprevention: Development of Diet-Derived Chemopreventive Agents. *J Nutr*. 2000, 130: 467C-471C.

8. Стил В.Е., Шарма С., Мехта Р., Элмор Э., Редпат Л., Радд С., Багери Д., Сигман С.С., Келлофф Г.Дж.: Использование анализов *in vitro* для прогнозирования эффективности химиопрофилактических агентов у целых животных. *J Cell Biochem*. 1996, 26: 29-53. 10.1002 / jcb.240630704.

9. Supino R, Crosti M, Clerici M, Warlters A, Cleris L, Zunino F: индукция апоптоза фенретинидом (4-HPR) в клетках карциномы яичников человека и его связь с экспрессией рецептора ретиноевой кислоты. *Международный Рак*. 1996, 65: 491-497. 10.1002 / (SICI) 1097-0215 (19960208) 65: 4 <491 :: AID-IJC17> 3.0.CO; 2-D.

10. Veronesi U, De Palo G, Marubini E, Costa A, Formelli F, Mariani L, Decensi A, Camerini T, Del Turco MR, Di Mauro MG, Muraca MG, Del Vecchio M, Pinto C, D'Aiuto G, Boni C, Campa T, Magni A, Miceli R, Perloff M, Malone WF, Sporn MB: рандомизированное испытание фенретинида для предотвращения второго злокачественного новообразования груди у женщин с ранним раком груди. *J Natl Cancer Inst*. 1999, 91: 1847-1856. 10.1093 / jnci / 91.21.1847.

11. Де Пало Г., Мариани Л., Камерини Т., Марубини Э., Формелли Ф., Пасин Б., Деценси А., Веронези Ю.: Влияние фенретинида на возникновение рака яичников. *Gynecol Oncol*. 2002, 86: 24-27. 10.1006 / gyno.2002.6663.

12. Чжан Д., Холмс В., Ву С., Сопрано Д., Сопрано К.: Ретиноиды и рак яичников. *J. Cell Physiol*. 2000, 185: 1-20. 10.1002 / 1097-4652 (200010) 185: 1 <1 :: AID-JCP1> 3.0.CO; 2-O.

13. Lippman SM, Kavanagh JJ, Paredes-Espinoza M, Delgadillo-Madrueno F, Paredes-Castillas P, Hong WK, Holdener E, Krakoff IH: 13-цис-ретиноевая кислота плюс интертрон-с2а: высокоактивная системная терапия плоскоклеточных клеток карцинома шейки матки. *J Natl Cancer Inst*. 1992, 84: 241-245.

14. Lippman SM, Kavanagh JJ, Paredes-Espinoza M, Delgadillo-Madrueno F, Paredes-Castillas P, Hong WK, Massimini G, Holdener EE, Krakoff IH: 13-цис-ретиноевая кислота плюс интерферон-а2а при местнораспространенной плоскоклеточной карциноме шейки матки. *J Natl Cancer Inst*. 1993, 85: 499-500.

15. Studer UE, Biedermann C: Профилактика рецидивов поверхностных опухолей мочевого пузыря пероральным этретинатом: предварительные результаты рандомизированного двойного слепого многоцентрового исследования в Свитерленде. *J Urol*. 1984, 131: 47-51.

16. Хонг В.К., Эндикотт Дж., Итри Л.М.: 13-цис-ретиноевая кислота в лечении лейкоплакии полости рта. *N Engl J Med.* 1986, 315: 1501-1505.
17. Ким Х, Холл П., Смит М., Кирк М., Прасейн Дж., Барнс С., Граббс С. Химиопрофилактика с помощью экстракта виноградных косточек и генистеина при канцероген-индуцированном раке молочной железы у крыс зависит от диеты. Приложение: Международная научная конференция по пищевым продуктам, питанию и раку. *J Nutr.* 2004, 134: 3445S-3452S.
18. Xu Y, Ho CT, Amin SG, Han C, Chung FL: Ингибирование табак-специфического нитрозамино-индуцированного туморогенеза легких у мышей А / J зеленым чаем и его основным полифенолом в качестве антиоксидантов. *Cancer Res.* 1992, 52: 3875-3879.
19. Корнетт Дж.: Как индейцы использовали пустынные растения. 2000, Издательство "Природные травы"
20. Кей М.А.: Исцеление с помощью растений на западе Америки и Мексики. 1996, Университет Аризоны Press
21. Книшинский Р: Лекарство от кактуса опунции. 1971, Healing Arts Press, Рочестер, Вермонт
22. Tesoriere L, Butera D, Pintaudi M, Allegra M, Livrea MA: добавление фруктов кактусовой груши (*Opuntia ficus-indica*) снижает окислительный стресс у здоровых людей: сравнительное исследование с витамином С. *Am J Clin Nutr.* 2004, 80: 391-395.
23. Ван П.З: Хирургия китайской медицины. 1988, Ancient Chinese Medicine Press, 164-183.
24. Нанкинский фармакологический колледж: Чжун Цао Яо Сюэ. 1976, Jiangsu People Press, 681-682.
25. Zou CP, Kurie JM, Lotan D, Zou CC, Hong WK, Lotan R: N- (4-гидроксифенил) ретинамид (4HPR) индуцирует апоптоз в клеточных линиях немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) человека. *Clin Cancer Res.* 1988, 4: 1345-1355.
26. Киркпатрик Н.Д., Зоу С.П., Брюер М.А., Брэндс В.Р., Дрезек Р.А., Утцингер У: Эндогенная флуоресцентная спектроскопия клеточных суспензий для химиопрофилактического мониторинга лекарств. *Фотохимия и фотобиология.* 2005, 81: 125-134. 10.1562 / 2004-08-09-RA-267.1.
27. Занг Р.Ю., Ши Д.Р., Лу Х.Дж.: генная терапия E1a, опосредованная аденовирусом 5, для лечения рака яичников *in vitro* и *in vivo*. *Int J Gynecol Cancer.* 2001, 11 (1): 18-23. 10.1046 / j.1525-1438.2001.011001018.x.
28. De Palo G, Veronesi U, Camerini T, Formelli F, Mascotti G, Boni C, Fosser V, Del Vecchio M, Campa T, Costa A: Может ли фенретинамид защитить женщин от рака яичников? *J Natl Cancer Inst.* 1995, 87: 146-147.
29. Goto H, Takahashi H, Fujii H, Ikuta K, Yokota S: N- (4-гидроксифенил) ретинамид (4-HPR) вызывает гибель лейкозных клеток за счет генерации активных форм кислорода. *Int J Hematol.* 2003, 78: 219-225.
30. Приветствую Н., Лотан Р.: Дыхание митохондрий однозначно связано с прооксидантными и апоптотическими эффектами N- (4-гидроксифенил) ретинамида. *J Biol Chem.* 2001, 276: 45614-45621. 10.1074 / jbc.M106559200.
31. Nail N, Lotan R: Переход митохондриальной проницаемости является центральным координирующим событием в апоптозе, индуцированном N- (4-гидроксифенил) ретинамидом. Биомаркеры эпидемиологии рака Пред. 2000, 9: 1293-1301.
32. Tesoriere L, Allegra M, Butera D, Livrea MA: Поглощение, выведение и распределение диетических беталаинов-антиоксидантов в ЛПНП: потенциальные эффекты беталаинов на здоровье человека. *Am J Clin Nutr.* 2004, 80: 941-945.
33. Collazo-Siques P, Valverde ME, Paredes-Lopez O, Guevara-Lara F: Экспрессия генов, связанных со созреванием, в плодах опунции (*Opuntia sp.*). *Растительная еда Hum Nutr.* 2003, 58: 317-326. 10.1023 / B: QUAL.0000040286.28359.76.
34. Ли Б., Дедман-младший, Кетцель М.А.: Нарушение интрона гена аннексина IV обнаруживает новые транскрипты. *J Biol Chem.* 2003, 278 (44): 43276-4383. 10.1074 / jbc.M306361200.
35. Herzog A, Kuntz S, Daniel H, Wenzel U: Идентификация биомаркеров для инициации апоптоза в пренеопластических колоноцитах человека с помощью протеомного анализа. *Int J Cancer.* 2004, 109 (2): 220-229. 10.1002 / ijc.11692.
36. Hansen RK, Oesterreich S, Lemieux P, Sarge DK, Fuqua SAW: Кверцетин ингибирует индукцию белка теплового шока, но не связывает ДНК фактора теплового шока в клетках карциномы груди человека. *Biochem Biophys Res Comm.* 1997, 239: 851-856. 10.1006 / bbrc.1997.7572.
37. Шин К.С., Салленджер Б.А., Ли С.В.: Рибозим-опосредованная индукция апоптоза в раковых

клетках человека путем направленной репарации мутантной РНК р53. Mol Ther. 2004, 10 (2): 365-372. 10.1016 / j.ymthe.2004.05.007.

38. Hwang ES, Kim J, Kim JS, Kao C, Ko SC, Chung L, Lee JH: Эффекты доставки р53 дикого типа, опосредованной аденовирусом, в линии клеток эпителиального рака яичников человека in vitro и in vivo. Int J Gynecol Cancer. 1998, 8: 27-36. 10.1046 / j.1525-1438.1998.09772.x.

Благодарности

Этот проект частично поддержан грантом Национального института здоровья NCI-CA75966 и Фондом исследования рака яичников. Мы хотим поблагодарить Уильяма Брэндса, Натаниэля Киркпатрика и Дж. Доминика Дженнингса за их помощь и помощь в работе с животными, а также доктора Суй Чжан и Кэрол Мейер за их тщательное редактирование рукописи.

Информация об авторе

Принадлежности

- Отделение акушерства и гинекологии, Центр медицинских наук Аризоны, Университет Аризоны, Тусон, Аризона, 85724, США
- Да-мин Цзоу, Молли Брюэр, Франсиско Гарсия, Жан М. Феуганг, Цзянь Ван и Чанпин Цзоу
- Отделение гинекологической онкологии, Онкологический центр Аризоны, Тусон, Аризона, 85724, США
- Молли Брюэр, Жан М. Феуганг, Цзянь Ван и Чанпин Цзоу
- Отделение гинекологической онкологии, Университет Фудань, Шанхай, 200032, Китай Рунгю Занг
- Медицинский университет Гуанси, Гуанси, 532021, Китай
- Хуагуан Лю и Чанпин Цзоу

Корреспондент

Переписка с Чанпин Цзоу.