

附子多糖对裸鼠胃癌移植瘤 MMP-2, MMP-14 表达的影响

安祯祥, 何远利*, 王敏, 陈昱江

(贵州中医药大学第一附属医院, 贵阳 550001)

[摘要] **目的:** 观察附子多糖对裸鼠胃癌移植瘤的生长抑制作用及对肿瘤组织基质金属蛋白酶-2(MMP-2), 基质金属蛋白酶-14(MMP-14)表达的影响。**方法:** 建立胃癌裸鼠移植瘤模型, 随机分为模型组, 5-氟尿嘧啶组(5-FU, $0.01 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 附子多糖高、低剂量组($0.2, 0.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 灌胃 15 d。观察附子多糖对裸鼠胃癌瘤重的影响; 光镜下观察肿瘤细胞的形态变化; 酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清中转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)含量; 通过免疫组化、蛋白质免疫印迹法(Western blot)及实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测肿瘤组织中 MMP-2, MMP-14 蛋白及 mRNA 表达水平。**结果:** 附子多糖高、低剂量组抑瘤率分别为 52.83%, 40.57%, 与模型组比较, 附子多糖高、低剂量组的瘤重显著降低($P < 0.01$), 附子多糖对裸鼠胃癌移植瘤的生长具有抑制作用; ELISA 表明, 与模型组比较, 附子多糖高、低剂量组显著降低裸鼠胃癌血清 TGF- β_1 含量($P < 0.01$); 免疫组化表明, 与模型组比较, 附子多糖高、低剂量组 MMP-2 蛋白明显下调($P < 0.05, P < 0.01$), MMP-14 蛋白表达下降($P < 0.01$); Western blot 表明, 与模型组比较, 附子多糖高、低剂量组 MMP-2, MMP-14 蛋白表达下调($P < 0.01$); Real-time PCR 结果显示, 与模型组比较, 附子多糖高剂量组的 MMP-2, MMP-14 mRNA 表达下降($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:** 附子多糖可抑制裸鼠胃癌移植瘤的生长, 抑制 TGF- β_1 表达, 其抑瘤机制可能与下调 MMP-2, MMP-14 蛋白及 mRNA 的表达有关。

[关键词] 附子多糖; 裸鼠; 胃癌移植瘤; 基质金属蛋白酶

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)23-0079-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191621

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190505.0919.008.html>

[网络出版时间] 2019-05-07 17:08

Effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata Polysaccharide on Expressions of MMP-2, MMP-14 in Gastric Cancer Xenografts in Nude Mice

AN Zhen-xiang, HE Yuan-li*, WANG Min, CHEN Yu-jiang

(The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the growth inhibition effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata polysaccharide on the gastric cancer xenografts in nude mice and the expressions of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) in tumor tissues. **Method:** The nude mice xenograft model was established and randomly divided into model group, 5-fluorouracil group (5-FU, $0.01 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), high and low-dose Aconiti Lateralis Radix Praeparata polysaccharide groups ($0.2, 0.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Each group was given drug by gavage for 15 days. The effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata polysaccharide on the weight of gastric cancer in nude mice was observed. Morphological changes of tumor cells were observed under light microscope. The content of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) in serum was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The protein and mRNA expressions of MMP-2, MMP-14 in tumor tissues were detected by immunohistochemistry, Western blot and Real-time PCR. **Result:** The tumor inhibition rates of high and low-dose Aconiti Lateralis Radix Praeparata polysaccharides were 52.83%, 40.57%, respectively. Compared with model

[收稿日期] 20181225(001)

[基金项目] 贵州省科学技术基金项目[黔科合 J 字(2008)2175 号]; 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究专项

[第一作者] 安祯祥, 博士, 主任医师, 从事中西医结合防治消化系统疾病的基础及临床研究, E-mail: 407206115@qq.com

[通信作者] * 何远利, 主治医师, 从事老年疾病研究, E-mail: 66587934@qq.com

group, the tumor weight of high and low-dose Aconiti Lateralis Radix Praeparata polysaccharide was significantly lower ($P < 0.01$), indicating the inhibitory effect on the growth of transplanted tumors. ELISA showed that compared with model group, Aconiti Lateralis Radix Praeparata polysaccharide could significantly reduce serum TGF- β_1 content in nude mice ($P < 0.01$). Immunohistochemistry showed that compared with model group, MMP-2 protein was down-regulated in high and low-dose Aconiti Lateralis Radix Praeparata polysaccharide groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and MMP-14 protein expression was decreased ($P < 0.01$). Western blot analysis showed that expressions of MMP-2 and MMP-14 were down-regulated in high and low-dose Aconiti Lateralis Radix Praeparata polysaccharide groups compared with model group ($P < 0.01$). Real-time PCR results showed that compared with model group, expressions of MMP-2 and MMP-14 mRNA in high-dose Aconiti Lateralis Radix Praeparata polysaccharide group decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Aconiti Lateralis Radix Praeparata polysaccharide can inhibit the growth of gastric cancer xenografts in nude mice and the expression of TGF- β_1 . The anti-tumor mechanism may be related to the down-regulation of MMP-2, MMP-14 protein and mRNA expressions.

[Key words] Aconiti Lateralis Radix Praeparata polysaccharide; nude mouse; gastric cancer xenograft; matrix metalloproteinase

胃癌是我国最常见消化道恶性肿瘤之一,发病率和死亡率在恶性肿瘤均高居第 2 位,90% 新发胃癌多属于进展期,即使进行了外科手术治疗,5 年生存率仍低于 30%,预后差,严重威胁着人民身体健康^[1]。提高胃癌的早期诊断和远期生存时间是临床研究的热点^[2]。胃癌细胞可通过局部浸润和直接蔓延,破坏邻近组织,亦可通过脉管系统远处转移。胃癌的特点是局部浸润和远处转移,因而抑制胃癌细胞增殖,阻断其浸润与转移,是治疗的关键环节。胃癌细胞浸润与转移的前提条件是细胞外基质(ECM)的降解和重构。胃癌细胞微环境中基质金属蛋白酶(MMPs)分泌异常,可降解、破坏 ECM 和基底膜组成的组织结构屏障,导致肿瘤细胞脱黏附,帮助胃癌细胞进入宿主微循环而发生转移,与癌细胞的浸润与转移关系密切,因此,大量研究以 MMPs 作为诊断、治疗及预后的标记靶点^[3-4]。MMPs 抑制剂在 1990 年被作为抗肿瘤药物应用于临床^[5]。

胃癌早期以手术治疗为主,中晚期以化疗为主,然而化疗的毒副作用限制了其临床应用。中医药在胃癌治疗中具有重要作用,与放疗联合,可减毒增效,缓解临床症状,改善生存质量^[6-7]。从植物类中药中提取的多糖具有双向免疫调节作用,对抗肿瘤、延缓衰老、降低血脂等方面具有重要作用^[8]。附子多糖是从附子中提取的有效活性成分之一,是附子重要的药效物质基础,对早幼粒细胞 HL-60 有诱导分化作用^[9],可延长 S180, H22 荷瘤小鼠的存活时间,具有抑制肿瘤生长作用,能提高机体的细胞免疫功能,诱导肿瘤细胞凋亡,上调抑癌基因 p53,死亡因子(Fas)的表达,协同增效抗肿瘤、降低化疗药物

毒副作用^[10-15]。既往对附子多糖抗肿瘤的研究多集中在调节免疫功能方面,认为免疫调节作用是附子多糖抗肿瘤作用环节之一^[16],而从 MMPs 角度研究附子多糖对胃癌的作用机制,目前报道较少,本研究拟通过建立裸鼠胃癌移植瘤动物模型,观察附子多糖对肿瘤细胞生长的抑制作用,检测瘤组织中基质金属蛋白酶 MMP-2, MMP-14 的相对表达,探究附子多糖抗胃癌的作用靶点及机制,为附子多糖抗胃癌作用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物及细胞株 BALB/c-nu 裸鼠 32 只,雄性,4 周龄,体质量(18 ± 2)g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号 SCXK(京)2014-0004,饲养于贵州医科大学 SPF 级实验动物中心,分笼饲养,自由取食及饮水,均严格消毒。MFC 小鼠胃癌细胞株,购于中国科学院昆明细胞库,编号 KCB92020YJ。本研究所涉及的动物实验均符合动物伦理委员会的准则。

1.2 药物与试剂 白附片(贵阳济仁堂中药饮片厂,批号 20160101)购于贵州中医药大学第一附属医院中药房,经贵州中医药大学药学院生药实验室王祥培教授鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* 的子根加工品;附子多糖参考文献[17]于贵州中医药大学药学院生药实验室提取,采用水提醇沉法提取附子粗多糖,采用 Sevage 法将附子粗多糖进行纯化,附子 100 g 制备得精制附子多糖 3.125 g,提取率 3.125%,苯酚-浓硫酸分光光度方法对提取得到的附子多糖进行质量分数测定为 73.5%。苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索宝

来科技有限公司,批号 171431);5-氟尿嘧啶(5-FU,天津金耀药业有限公司,国药准字 H12020959);转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(深圳欣博盛生物科技有限公司,批号 EMC107b);MMP-2, MMP-14 一抗(美国 Assay Biotech 公司,批号分别为 C0270, C0266);PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa(美国 Thermo 公司,批号 26619); β -肌动蛋白(β -actin)一抗,RIPA Lysis Buffer (Strong),蛋白酶抑制剂,BCA 蛋白定量试剂盒,SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒,ECL 高灵敏度化学发光检测试剂盒,一步法快速蛋白免疫印迹法(HRP)试剂盒,蛋白印迹膜再生液(北京康为世纪生物科技有限公司,批号分别为 CW0096A, CW2333S, CW2200S, CW0014, CW0022, CW0049, CW02029, CW0056);trizol 总 RNA 提取试剂[天根生化科技(北京)有限公司,批号 DP405-02];PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser, SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus), DL2 000 DNA Marker(大连 TaKaRa 公司,批号分别为 RR047B, RR82LR, 3427Q);引物序列由北京 Invitrogen 公司合成。MMP-2(126 bp):上游 5'-AATGCCATCCCTGATAACCT-3',下游 5'-GCTTCCAAACTTCACGCTCT-3';MMP-14(292 bp):上游 5'-ATAAGCACTGGGTGTTTGACG-3',下游 5'-TTGTTTCCCTGTAGAAAGTATGTG-3'; β -actin(159 bp):上游 5'-CGTTGACATCCGTAAAGACCTC-3',下游 5'-ACAGACTACTTGGCCTCAGGAG-3'。

1.3 仪器 T6 型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);EPS-300 型电泳仪,Tanon 1600 型凝胶成像系统,EPS-300 型电泳仪(上海天能科技有限公司);QL-902 型涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);ZS-2 型板式酶标仪(北京新凤机电技术公司);NANODROP 2000 型分光光度计(美国 Thermo scientific 公司);ABI7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 常规复苏胃癌 MFC 细胞,在含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基中培养,置于 37 °C 5% CO₂ 恒温培养箱中,隔天换液,用胰酶消化传代,并计数细胞。

2.2 造模、分组及给药 参照文献方法造模^[18]。常规消毒裸鼠皮肤。取 1 mL 注射器抽吸出细胞悬液 0.2 mL(1×10^7 个/mL),将胃癌细胞接种在裸鼠的右前肢近腋窝处皮下。接种后,每天观察肿瘤接

种后在裸鼠体内的生长情况,饲养裸鼠至肉眼可见瘤体,用游标卡尺测肿瘤体的大小(长径和短径),肿瘤直径 > 4 mm 为成瘤成功,将造模成功的胃癌荷瘤裸鼠随机分为模型组,5-FU 组,附子多糖高、低剂量组,每组 8 只。第 3 周开始灌胃给药,灌胃体积 20 mL·kg⁻¹。模型组给予等体积生理盐水灌胃,1 次/d,连续灌胃 15 d。附子多糖高、低剂量组剂量参考文献 [11],分别给予附子多糖 200, 100 mg·kg⁻¹,1 次/d,连续灌胃 15 d。5-FU 组给予 5-FU 10 mg·kg⁻¹,隔天 1 次,共 15 d。

2.3 样本采集 给药结束后,禁食 12 h,称质量,正常饮水。腹主动脉采血,分离血清,处死裸鼠,取瘤组织行病理组织学检查。一部分肿瘤组织于液氮中保存,再转移 -80 °C 冰箱保存,备用。

2.4 计算瘤重与抑瘤率 完整剥离肿瘤,称量肿瘤质量,计算肿瘤抑制率,抑瘤率 = (模型组平均瘤重 - 实验组平均瘤重)/模型组平均瘤重 × 100%。

2.5 病理组织学观察 取肿瘤组织于 10% 甲醛中固定,用于 HE 染色,观察癌细胞形态。

2.6 ELISA 检测血清 TGF- β_1 测定 采用 ELISA 检测 TGF- β_1 水平,具体按照试剂盒要求进行指标检测。

2.7 免疫组化法检测肿瘤组织 MMP-2, MMP-14 蛋白表达 肿瘤组织石蜡切片,脱蜡水化,抗原修复,3% H₂O₂ 室温孵育,羊血清封闭,加一抗(1:500),4 °C 过夜,洗去一抗(1:500),加二抗工作液,室温孵育 30 min,洗去二抗,DAB 显色,苏木精染色,脱水,中性树胶封片。以 PBS 液代替一抗为阴性对照。MMP-2, MMP-14 为胞质染色。以棕黄色为阳性表达,未着色为阴性。使用 Image-Pro Plus 6.0 软件对结果进行分析,以积分吸光度 IA 和阳性染色面积百分比表示蛋白的相对表达量。

2.8 蛋白免疫印迹法检测肿瘤组织 MMP-2, MMP-14 蛋白表达 取瘤组织块,尽可能剪碎,加入蛋白酶抑制剂,制成工作液,加入组织蛋白抽提试剂,冰浴匀浆及超声破碎;冰上孵育 20 min, 10 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,收集上清;使用 BCA 定量,用酶标仪测定 562 nm 处各样本吸光度 A,计算各样本蛋白含量;按 1:5 加入上样缓冲液,混匀,沸水浴 5 min,4 °C 保存备用。蛋白灌胶及电泳,转膜,封闭,加入一抗(1:500),二抗(1:200),4 °C 孵育过夜,漂洗,ECL 化学发光和曝光显影, β -actin 为内参,采用 Image J 图像分析软件测定各带的灰度值做定量分析。

2.9 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测肿瘤组织 MMP-2, MMP-14 mRNA 表达 采用 trizol 总 RNA 提取试剂进行样本 RNA 提取, 实验操作按产品说明书进行。紫外分光光度计检测 RNA 浓度和纯度。逆转录合成 cDNA。将所有 cDNA 样品分别配置 PCR 反应体系, Master Mix 10 μL , 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PCR 特异引物 0.5 μL , cDNA 2 μL , 加水至总体积为 20 μL 。扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 40 个循环。各样品的目的基因和内参分别进行 Real-time PCR 反应, 每个样本检测 3 个复孔。数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行分析。

2.10 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对裸鼠胃癌移植瘤重及抑瘤率的影响

5-FU 组、附子多糖高、低剂量组抑瘤率分别为 59.43%, 52.83%, 40.57%, 均对裸鼠胃癌移植瘤的生长具有抑制作用。与模型组比较, 5-FU 组、附子

多糖高、低剂量组瘤重显著降低 ($P < 0.01$); 与 5-FU 组比较, 附子多糖低剂量组瘤重显著升高 ($P < 0.01$); 与附子多糖低剂量组比较, 附子多糖高剂量组瘤重显著降低 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 附子多糖对裸鼠胃癌移植瘤重与抑瘤率的影响

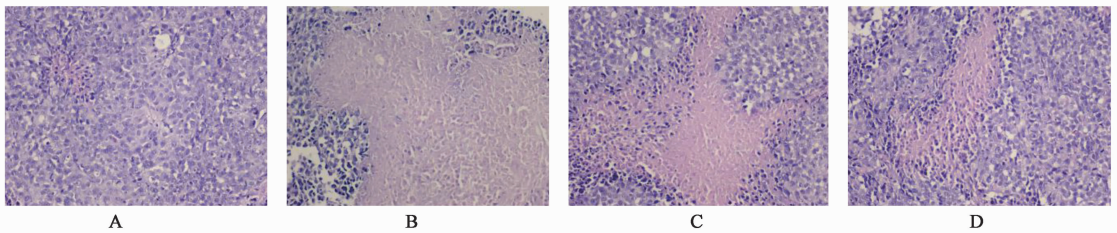
Table 1 Effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata polysaccharide on weight and tumor inhibition rate of gastric cancer xenografts in nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	瘤重 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)/g	抑瘤率/%
模型	-	1.06 \pm 0.10	-
5-FU	0.01	0.43 \pm 0.06 ¹⁾	59.43
附子多糖	0.2	0.50 \pm 0.07 ^{1,3)}	52.83
	0.1	0.63 \pm 0.06 ^{1,2)}	40.57

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 5-FU 组比较²⁾ $P < 0.01$; 与附子多糖低剂量组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对裸鼠胃癌移植瘤组织病理变化的影响

模型组肿瘤细胞呈片巢状生长, 细胞数量多, 细胞异型性明显, 核分裂易见, 可见灶性坏死; 各药物干预组细胞数量减少, 细胞坏死增加, 可见凝固性坏死, 坏死面积多少不等, 均较模型组严重。见图 1。



A. 模型组; B. 5-FU 组; C. 附子多糖高剂量组; D. 附子多糖低剂量组 (图 2, 3 同)

图 1 附子多糖对荷瘤裸鼠胃癌移植瘤组织形态学的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata polysaccharide on histomorphology of gastric cancer xenografts in nude mice (HE, $\times 200$)

3.3 对裸鼠胃癌移植瘤血清中 TGF- β_1 的影响

与模型组比较, 5-FU 组、附子多糖高、低剂量组 TGF- β_1 显著下降 ($P < 0.01$); 与 5-FU 组比较, 附子多糖高、低剂量组 TGF- β_1 水平升高, 但无统计学差异; 与附子多糖低剂量组比较, 附子多糖高剂量组 TGF- β_1 下降, 但无统计学差异。见表 2。

表 2 附子多糖对裸鼠胃癌移植瘤血清中 TGF- β_1 表达的影响

($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata polysaccharide on expression of TGF- β_1 in serum of gastric cancer xenografts in nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	TGF- β_1 / $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
模型	-	204.08 \pm 49.39
5-FU	0.01	65.45 \pm 10.57 ¹⁾
附子多糖	0.2	78.02 \pm 24.89 ¹⁾
	0.1	98.42 \pm 34.60 ¹⁾

3.4 对裸鼠胃癌组织 MMP-2, MMP-14 蛋白表达的影响

与模型组比较, 5-FU 组、附子多糖高、低剂量组肿瘤组织 MMP-2 蛋白明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$), MMP-14 蛋白显著减少 ($P < 0.01$); 与 5-FU 组比较, 附子多糖低剂量组 MMP-2, MMP-14 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与附子多糖低剂量组比较, 附子多糖高剂量组 MMP-2 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$)。见图 2, 表 3。

3.5 对裸鼠胃癌移植瘤 MMP-2, MMP-14 蛋白表达的影响

与模型组比较, 5-FU 组、附子多糖高、低剂量组移植瘤 MMP-2, MMP-14 蛋白表达均显著下降

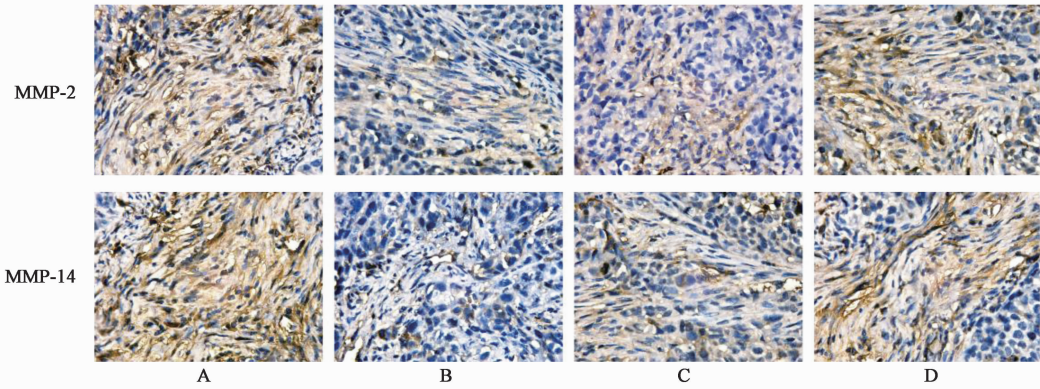


图 2 附子多糖对裸鼠胃癌移植瘤组织 MMP-2, MMP-14 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 2 Effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata polysaccharide on mean optical density of MMP-2 and MMP-14 proteins in gastric cancer xenografts of nude mice(IHC, ×400)

表 3 附子多糖对裸鼠胃癌移植瘤组织 MMP-2, MMP-14 蛋白积分吸光度的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata polysaccharide on IA of MMP-2 and MMP-14 proteins in gastric cancer xenografts of nude mice($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MMP-2	MMP-14
模型	-	0.228 ± 0.028	0.249 ± 0.029
5-FU	0.01	0.097 ± 0.023 ²⁾	0.149 ± 0.014 ²⁾
附子多糖	0.2	0.126 ± 0.010 ^{2,5)}	0.158 ± 0.005 ²⁾
	0.1	0.178 ± 0.011 ^{1,4)}	0.183 ± 0.010 ^{2,3)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与 5-FU 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与附子多糖低剂量组比较⁵⁾ $P < 0.01$ 。

($P < 0.01$);与 5-FU 组比较,附子多糖高、低剂量组 MMP-2 蛋白表达升高($P < 0.05, P < 0.01$),附子多糖低剂量组 MMP-14 蛋白表达升高($P < 0.01$);与附子多糖低剂量组比较,附子多糖高剂量组 MMP-2, MMP-14 表达显著下降($P < 0.01$)。见图 3,表 4。

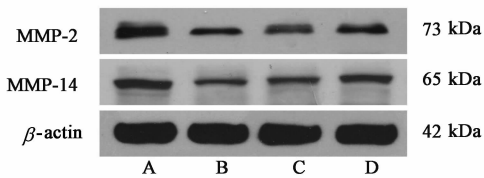


图 3 附子多糖作用于裸鼠胃癌移植瘤组织 MMP-2, MMP-14 蛋白表达电泳

Fig. 3 Effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata polysaccharide on relative expressions of MMP-2 and MMP-14 proteins in gastric cancer xenografts of nude mice

3.6 对裸鼠胃癌移植瘤 MMP-2, MMP-14 mRNA 表达的影响 与模型组比较,5-FU 组 MMP-2, MMP-14 mRNA 表达显著下降($P < 0.01$),附子多糖高剂量组 MMP-2, MMP-14 mRNA 表达下降($P < 0.05, P <$

表 4 附子多糖对裸鼠胃癌移植瘤组织 MMP-2, MMP-14 蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata polysaccharide on relative expressions of MMP-2 and MMP-14 proteins in gastric cancer xenografts of nude mice($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MMP-2/ β -actin	MMP-14/ β -actin
模型	-	1.073 ± 0.067	1.030 ± 0.079
5-FU	0.01	0.494 ± 0.020 ¹⁾	0.555 ± 0.0203 ¹⁾
附子多糖	0.2	0.592 ± 0.030 ^{1,2,4)}	0.586 ± 0.032 ^{1,4)}
	0.1	0.748 ± 0.033 ^{1,3)}	0.750 ± 0.028 ^{1,3)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 5-FU 组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$;与附子多糖低剂量组比较⁴⁾ $P < 0.01$ 。

0.01);与 5-FU 组比较,附子多糖低剂量组 MMP-2, MMP-14 mRNA 表达升高($P < 0.01$);与附子多糖低剂量组比较,附子多糖高剂量组 MMP-2 mRNA 表达下降($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 附子多糖对裸鼠胃癌移植瘤组织中 MMP-2, MMP-14 mRNA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata polysaccharide on relative expressions of MMP-2 and MMP-14 mRNA in gastric cancer xenografts of nude mice($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MMP-2	MMP-14
模型	-	1.073 ± 0.065	1.030 ± 0.083
5-FU	0.01	0.581 ± 0.097 ²⁾	0.444 ± 0.190 ²⁾
附子多糖	0.2	0.670 ± 0.142 ^{2,4)}	0.679 ± 0.088 ¹⁾
	0.1	0.922 ± 0.103 ³⁾	0.881 ± 0.203 ³⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与 5-FU 组比较³⁾ $P < 0.01$;与附子多糖低剂量组比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

胃癌的中医病机与机体阳气虚弱,无以温化

癌毒有关,阳气衰少、寒毒内侵与胃癌的发生密切相关。《黄帝内经·灵枢·百病始生》有云:“积之始生,得寒乃生,厥乃成积。”阳化气,阴成形是人体正常的生理状态。病理状态下,阳气不足而阴聚成形,阳化气不及与阴成形太过,久则阴寒内聚成积,日久成瘤,是肿瘤的重要病理机制。因此针对其病理机制温阳散积尤为重要,所谓离照当空,阴霾自散,阳气恢复,则阴阳平衡,气血畅行,积块缩小,病情恢复。研究表明,温阳法是治疗肿瘤的有效方法,多种温阳散寒药物如附子、肉桂、吴茱萸等治疗晚期恶性肿瘤具有较好的临床疗效^[19]。附子为大热有毒之品,具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛等功效,为回阳第一要药。其主要化学成分有生物碱、多糖、苷类、甾醇、无机盐等。附子多糖是附子的有效组分之一,安全性较高,具有增强肿瘤免疫功能,上调抑癌基因的表达,诱导肿瘤细胞分化和凋亡的功效^[20]。研究表明,附子多糖干预胃癌荷瘤裸鼠后,可见肿瘤细胞坏死,较模型组严重,附子多糖能降低胃癌移植瘤重量,具有一定的抑瘤作用。

胃癌最重要的特点是局部浸润和远处转移,亦是其治疗难点。癌细胞通过破坏细胞外基质(ECM)和基底膜组成的结构屏障,进入宿主微循环而发生浸润与转移。MMPs 可诱导病理血管生成,促进癌细胞增殖、浸润和远处转移。MMPs 在 ECM 和基底膜的降解与重塑过程中起着主要作用,能降解除多糖外全部的 ECM,能相互激活,形成瀑布效应,MMP-2, MMP-14 是其重要成员^[21]。MMP-2 降解基底膜中的 IV 型胶原,使其丧失完整性,诱导肿瘤病理血管生成,从而促进肿瘤生长、侵袭和转移,是肿瘤恶性进展的标志^[22]。MMP-14 介导 MMP-2 的激活,直接降解 ECM,促进肿瘤细胞的血管增生,加强肿瘤的侵袭和转移^[3]。肿瘤细胞分泌 TGF- β_1 , TGF- β_1 则可加强癌细胞的黏附与浸润,诱导肿瘤病理血管生成。TGF- β_1 与 MMP-2 表达呈正相关,胃癌组织中 TGF- β_1 表达明显升高,与肿瘤浸润、转移, TNM 分期密切相关^[23-25]。MMP-2, MMP-14 可激活 TGF- β_1 , 降解 ECM 释放成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子,促进肿瘤病理血管生成^[26]。MMP-2, MMP-14, TGF- β_1 是肿瘤浸润转移的重要标志。5-FU 在体内转化后可干扰 DNA 的合成,影响蛋白质的合成,对胃癌疗效明确,是治疗胃癌最常见的化疗药物^[27],故本研究选取其为阳性对照药物。研究表明,高、低剂量组附子多糖均对裸鼠胃癌移植瘤具有抑瘤作用,其平均瘤重均低于模型组,附子多糖

高剂量组与 5-FU 组之间无显著性差异;病理切片发现附子多糖高低剂量组可见肿瘤细胞破碎,细胞凝固性坏死,均较模型组严重;与模型组比较,附子多糖高、低剂量组血清 TGF- β_1 表达明显下降,免疫组化及蛋白免疫印迹法检测均提示附子多糖高、低剂量组 MMP-2, MMP-14 蛋白表达下降,其 mRNA 表达亦明显下降。

综上,附子多糖具有较好的抑制裸鼠胃癌移植瘤的生长作用,可降低肿瘤重量,促进肿瘤细胞坏死液化,其抗肿瘤作用可能与下调肿瘤组织 MMP-2, MMP-14 蛋白与 mRNA 表达有关。

[参考文献]

- [1] 杜奕奇,蔡全才,廖专,等.中国早期胃癌筛查流程专家共识意见(草案)(2017年,上海)[J].胃肠病学,2018,23(2):92-97.
- [2] WANG J W, XU R H, LI J, et al. Randomized multicenter phase III study of a modified docetaxel and cisplatin plus fluorouracil regimen compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced or locally recurrent gastric cancer[J]. Gastric Cancer,2016, 19(1): 234-244.
- [3] 安志强,董志广.基质金属蛋白酶类在胃癌、癌旁组织及胃溃疡中的表达情况及相互关系[J].现代医药卫生,2017,33(17):2619-2621.
- [4] Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases [J]. Amino Acids, 2011, 41(2):271-290.
- [5] Vandooren J, Opendakker G, Loadman P M, et al. Proteases in cancer drug delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev,2016,97(2):144-155.
- [6] Lapolla A, Frison V, Bettio M, et al. Correlation between baseline characteristics and clinical outcomes in a large population of diabetes patients treated with liraglutide in a real-world setting in Italy [J]. Clin Ther, 2015, 37(3):574-584.
- [7] 曹超,黄秋林.扶正抑瘤方联合新辅助化疗、腹腔镜辅助胃癌根治术治疗进展期胃癌痰瘀毒结证患者的疗效观察[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(8):176-182.
- [8] 高静东,李湧健,陈嘉璐,等.复方附子多糖对肿瘤细胞糖基化作用的影响[J].中国中西医结合杂志,2016,36(9):1103-1106.
- [9] 彭文珍,吴雄志,曾升平,等.附子多糖诱导人早幼粒白血病细胞分化研究[J].职业卫生与病伤,2003,18(2):123-124.
- [10] 董兰凤,刘京生,宋淑霞,等.附子多糖与阿霉素蛋白

- 磁微球靶向治疗的抗肿瘤协同作用[J]. 中国药科大学学报, 2003, 34(6): 549-553.
- [11] 董兰凤, 张英俊, 刘京生, 等. 附子多糖与阿霉素长循环热敏脂质体的抗肿瘤作用及其机制探讨[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, 22(4): 458-462.
- [12] 董兰凤, 刘京生, 苗智慧, 等. 附子多糖对 H22 和 S180 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(9): 14-17.
- [13] 周芹, 段晓云, 武林鑫, 等. 附子多糖对大鼠食诱性高胆固醇血症的预防作用及机制研究[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(4): 492-496.
- [14] LIN S Q, LIU K X, WU W K, et al. Study on pretreatment of FPS-1 in rats with hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Chin Med*, 2009, 37(2): 323-337.
- [15] 刘颖, 纪超. 附子多糖对 SD 乳鼠缺氧/复氧心肌细胞的保护作用及其机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(5): 504-507.
- [16] 熊海霞, 杨颖, 孙文燕. 附子多糖的药理作用研究进展[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(9): 1948-1951.
- [17] 叶强, 张丹, 郭力. 附子多糖提取纯化工艺研究[J]. 中药与临床, 2013, 4(2): 29-31.
- [18] 贾永森, 王亚, 秦丽娟, 等. 通连汤对裸小鼠胃癌移植瘤组织形态学及外周血免疫因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(23): 145-148.
- [19] 宋立家, 季旭明, 王海瑞, 等. 温阳法治疗肿瘤研究进展[J]. 中医药信息, 2015, 32(1): 118-121.
- [20] 高林林, 曾升平, 潘力戩. 附子多糖诱导肝癌患者外周血树突状细胞分化成熟的实验研究[J]. 中国肿瘤临床, 2012, 39(13): 882-885, 894.
- [21] Pavidia P, Jitlada M, Ornicha P, et al. Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): 868.
- [22] 王磊, 李亦工, 史琳, 等. 基质金属蛋白酶 2 促进胃癌侵袭和浸润[J]. 宁夏医科大学学报, 2017, 39(12): 1369-1372.
- [23] 韩勛. MMP-2, MMP-9, VEGF, TGF- β_1 在胃癌侵袭、转移中分子机制及其意义[D]. 延吉: 延边大学, 2014.
- [24] 刘长兵, 吴继锋. 胃癌中 TGF- β_1 、HIF-1 α 、VEGF 的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(7): 733-736.
- [25] Tas F, Yasasever C T, Karabulut S, et al. Serum transforming growth factor-beta1 levels may have predictive and prognostic roles in patients with gastric cancer[J]. *Tumor Biology*, 2015, 36(3): 2097-2103.
- [26] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment[J]. *Cell*, 2010, 141(1): 52-67.
- [27] 程海燕, 沈哲, 陈卫昌, 等. 曲古菌素 A 联合 5-FU 对人胃癌 SGC-7901 细胞生长及其 PLK1 基因表达的影响[J]. 温州医学院学报, 2013, 43(9): 591-594.

[责任编辑 张丰丰]