

鲑鱼软骨多糖对小鼠黑色素瘤上皮细胞激酶表达的影响[△]

王冠^{1*}, 郭斌^{2#}, 孟康¹(1. 辽宁医学院药学院, 辽宁锦州 121001, 2. 辽宁医学院附属第一医院, 辽宁锦州 121000)

中图分类号 R285;R282.74 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)07-0589-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.07.05

摘要 目的:研究鲑鱼软骨多糖(RCG)对小鼠黑色素瘤中上皮细胞激酶(EphA2)表达的影响。方法:将培养的黑色素瘤细胞接种于C57BL/6小鼠右侧腋下部位,复制小鼠黑色素瘤模型。实验分为模型(等容生理盐水)、环磷酰胺(CTX, 60 mg/kg)与RCG高、中、低剂量(700、300、100 mg/kg)组,观察肿瘤生长情况,计算抑瘤率;采用Western blot法检测EphA2蛋白的表达,采用RT-PCR法检测EphA2基因的表达。结果:与模型组比较,RCG高、中、低剂量组小鼠瘤质量显著减轻,抑瘤率显著升高($P<0.01$);EphA2蛋白表达显著减弱($P<0.01$),EphA2基因表达显著减弱($P<0.01$)。结论:RCG抑制小鼠黑色素瘤的生长可能与其减少肿瘤中EphA2表达有关。

关键词 鲑鱼软骨多糖;恶性黑色素移植瘤;上皮细胞激酶

Effect of RCG on the Expression of EphA2 in Melanoma of Mice

WANG Guan¹, GUO Bin², MENG Kang¹(1. School of Pharmacy, Liaoning Medical College, Liaoning Jinzhou 121001, China; 2. The First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Liaoning Jinzhou 121000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effect of RCG on the protein expression of epithelial cell kinase (EphA2) in melanoma of mice. METHODS: Melanoma tumor cells were cultivated *in vitro*, then inoculated in right oter of C57BL/6 mice. The malignant melanoma model was established. The experimental mice were randomly divided into model group (isovolumic saline), CTX group (60 mg/kg) and RCG high-dose, medium-dose and low-dose groups (700, 300, 100 mg/kg). The growth of tumor was observed and the inhibitory rate of tumor was measured; the protein expression of EphA2 was determined by Western blot, and the mRNA expression of EphA2 was detected with RT-PCR. RESULTS: Compared with model group, tumor weight were lost, inhibitory rates of primary tumor in RCG groups were increased significantly ($P<0.01$); the protein expression of EphA2 and the gene expression of EphA2 in RCG groups were lowered significantly ($P<0.01$). CONCLUSION: RCG could inhibit the growth of melanoma of mice, which is probably associated with that RCG reduce the protein expression of EphA2 in the tumor cells.

KEY WORDS Ray cartilage glycosaminoglycans; Malignant melanoma tumor; EphA2

黑色素瘤中上皮细胞激酶(EphA2)家族是目前已知最大的酪氨酸蛋白激酶受体(Eph)家族成员之一,EphA2是该亚族成员被发现具有酪氨酸激酶活性的第一个基因^[1],在人类上皮来源的多种组织或细胞中广泛表达。EphA2异常时同样可以通过信号转导导致肿瘤的发生,肿瘤血管的生成,肿瘤的侵袭、浸润和转移^[2]。鲑鱼软骨多糖(RCG)是从鲑鱼软骨中提取、分离出的具有抗肿瘤作用的活性成分^[3]。鲑鱼属于脊椎动物门(Vertebrata),软骨鱼纲(Chondrichthyes),板鳃亚纲(Elasmobranchii),鳐目(或魼目,Rajiformes),魼科(Dasytidae)鱼,属暖温带底层鱼,在我国黄海、渤海、东海、南海均有分布。目前,我国在鲑鱼生理活性物质的研究方面取得了一定进展,药效学实验表明,RCG具有明显的抗肿瘤作用,同时具有增强荷瘤小鼠免疫力的作用,可抑制鸡胚绒毛尿囊膜血管的生成^[4]。

笔者通过复制小鼠黑色素瘤模型,探讨RCG对黑色素瘤中EphA2信号转导通路中的EphA2表达的影响。

1 材料

1.1 仪器

CO₂恒温培养箱(美国Fomra Scientific公司);CH型倒置显微镜(日本Olympus公司);超净工作台(苏州新区枫桥净化设备厂);PROTEAN II型电泳槽(美国Bio Rad公司);Dmm2型RT-PCR仪(英国Hybaid公司);EDAS290型凝胶成像系统(日本Kodak公司)。

1.2 药品与试剂

RCG(辽宁医学院附属第一医院制剂室制备,得率:8.4%,纯度:99%,相对分子质量:9.7×10⁴);兔抗鼠EphA2单克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司);环磷酰胺(CTX,江苏恒瑞医药公司,批号:20110803);RT-PCR试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司);Trizol试剂、引物(上海生工生物工程技术有限公司);其余试剂均为国产分析纯。

1.3 动物与细胞

清洁级C57BL/6小鼠40只,♂,体质量18~22 g,购自大

△基金项目:辽宁省自然科学基金资助项目(No.201102132)

* 硕士研究生。研究方向:药物分析,海洋药用资源开发。E-mail: wang.591716708@163.com

通信作者:教授,硕士研究生导师,博士。研究方向:药物分析,海洋药用资源开发。电话:0416-4140066。E-mail: jyguobin@126.com

连医科大学实验动物中心[动物使用合格证号: SCXK(辽)2008-0002]。黑色素瘤(B16细胞株)由中国科学院上海生命科学研究院提供。

2 方法

2.1 模型的复制与分组、给药

40只小鼠均分为模型(等容生理盐水)、CTX(60 mg/kg)与RCG高、中、低剂量(700、300、100 mg/kg)组。黑色素瘤细胞于1640培养基、37℃、5%CO₂环境中培养,每2~3天进行传代。将已长满培养瓶底80%的黑色素瘤细胞消化,800 r/min离心5 min后,调细胞数为1×10⁷个(当细胞数>2×10⁵个时即复制模型成功),每只小鼠于右腋下接种细胞悬液0.2 ml。各组接种后第2天开始ip给药,CTX组每周1次,其它各组每天1次,连续21 d。末次给药后脱颈椎处死小鼠,取右腋下肿块并称质量,计算抑瘤率。抑瘤率(%)=(模型组平均瘤质量-用药组平均瘤质量)/模型组平均瘤质量×100%。

2.2 Western blot法检测EphA2蛋白表达

取-80℃冻存的黑色素瘤组织100 mg,加入裂解液中剪碎,移入1.5 ml EP管中,4℃、12 000 r/min离心20 min,取上清液用BCA法进行蛋白定量。各取等量的标本进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,浓缩胶电压80 V,分离胶电压120 V,半干法将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,TBS冲洗,封闭1 h,将膜放入1:500稀释的一抗,杂交2 h,封闭液漂洗后将膜放入1:500稀释的二抗,室温下摇床杂交1 h,漂洗后加四唑氨蓝显色剂,避光显色。应用生物凝胶图像分析系统进行扫描定量,测定每条条带的整合密度值,并求得与β-actin组整合密度值的比值,即相对灰度值。

2.3 RT-PCR法检测黑色素瘤中EphA2基因表达

总RNA提取使用Trizol法,提取的RNA经紫外分光光度计测量260、280 nm波长处吸光度值,由260 nm波长处吸光度值计算出RNA浓度。按照RT-PCR试剂盒说明进行PCR扩增。引物设计:EphA2上游引物:CCGTGTGGAAGTACGAAGTCA,下游引物:GGTACGTGGTATCCGGAGCAAG,扩增片段大小为119 bp;β-actin上游引物:5'-GAGACCTTCAACACCCAGC-3',下游引物:5'-CCACAGGATTC-CATACCCAA-3',扩增片段大小为446 bp。反转录反应参数设置:42℃、60 min,99℃、5 min;然后进行35个周期的PCR扩增反应,PCR扩增反应参数设置如下:94℃、5 min预变性1个循环,每个周期为94℃变性30 s,62℃退火30 s,72℃延伸1 min。取PCR产物置于2%琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭染色,电泳条带经电泳图像分析仪扫描,得到EphA2与β-actin条带的各自峰面积积分值,以EphA2与β-actin比值作为EphA2表达参数,对EphA2 mRNA产物进行相对定量。

2.4 统计学方法

采用SPSS 17.0软件统计数据,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数比较用*t*检验,多组均数比较用方差分析。*P*<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 RCG对模型小鼠瘤质量、抑瘤率的影响

与模型组比较,RCG高、中、低剂量组小鼠瘤质量显著减轻,抑瘤率显著升高(*P*<0.01),表明RCG对小鼠黑色素瘤生长具有明显的抑制作用。RCG对模型小鼠瘤质量、抑瘤率的影响见表1。

表1 RCG对模型小鼠瘤质量、抑瘤率的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 1 Effect of RCG on the tumor weight and inhibition rate in model mice($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量,mg/kg	瘤质量,g	抑瘤率,%
模型组		4.14±0.23	
RCG低剂量组	100	3.58±0.21*	13.53*
RCG中剂量组	300	2.91±0.17*	29.71*
RCG高剂量组	700	2.32±0.22*	43.96*
CTX组	60	1.54±0.16*	62.80*

与模型组比较:**P*<0.01

vs.model group:**P*<0.01

3.2 RCG对小鼠黑色素瘤中EphA2蛋白表达的影响

与模型组比较,RCG高、中、低剂量组小鼠黑色素瘤中EphA2蛋白表达显著减弱,表明RCG对小鼠黑色素瘤中EphA2蛋白表达具有抑制作用。小鼠黑色素瘤中EphA2蛋白的表达分别见图1、表2。

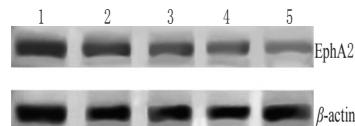


图1 小鼠黑色素瘤中EphA2蛋白的表达

1.模型组;2.RCG低剂量组;3.RCG中剂量组;4.RCG高剂量组;5.CTX组

Fig 1 The protein expression of EphA2 in malignant melanoma of mice

1. model group; 2. RCG low-dose group; 3. RCG medium-dose group; 4. RCG high-dose group; 5. CTX group

表2 小鼠黑色素瘤中EphA2蛋白、EphA2基因的表达($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Effect of RCG on the protein expression and gene expression of EphA2 in malignant melanoma of mice($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量,mg/kg	EphA2蛋白表达	EphA2基因表达
模型组		0.67±0.03	0.59±0.02
RCG低剂量组	100	0.57±0.05*	0.48±0.03*
RCG中剂量组	300	0.47±0.02*	0.41±0.05*
RCG高剂量组	700	0.39±0.03*	0.28±0.05*
CTX组	60	0.26±0.05*	0.22±0.04*

与模型组比较:**P*<0.01

vs.model group:**P*<0.01

3.3 RCG对小鼠黑色素瘤中EphA2基因表达的影响

RNA经紫外分光光度计测量,其在260、280 nm波长处吸光度的比值均为1.8~2.0。与模型组比较,RCG高、中、低剂量组小鼠黑色素瘤中EphA2基因表达显著减弱(*P*<0.01),表明RCG对小鼠黑色素瘤中EphA2基因表达具有抑制作用。小鼠黑色素瘤中EphA2基因的表达分别见图2、表2。

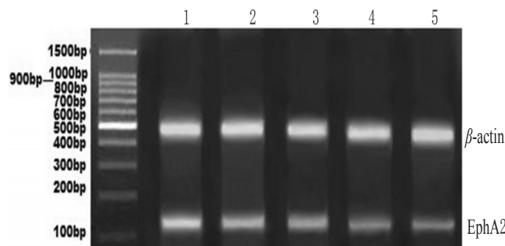


图2 小鼠黑色素瘤组织EphA2基因的表达

1.模型组;2.RCG低剂量组;3.RCG中剂量组;4.RCG高剂量组;5.CTX组

Fig 2 Effect of RCG on the gene expression of EphA2 in malignant melanoma of mice

1. model group; 2. RCG low-dose group; 3. RCG medium-dose group; 4. RCG high-dose group; 5. CTX group

4 讨论

黑色素瘤是一种古老的疾病,恶性程度相当高,又称恶性黑瘤^[6],多数发生在色素病变的基础上,少数发生于正常皮肤或黏膜的色素细胞,预后较差,生存期短。此病的发病率日益增高,国外学者正积极探索新的治疗方法以求攻克黑色素瘤。中国有着广阔的海洋资源,对其进行开发将是未来的发展趋势,鱼软骨中多糖等活性物质可以作为新生血管生成抑制因子、肿瘤细胞抑制因子、免疫调节因子和抗入侵因子等用于肿瘤的治疗和预防^[6]。

EphA2是Eph的一种,通过与细胞黏附分子作用而影响细胞与细胞之间的黏附从而能够调节细胞的增生、凋亡、迁移及血管生成^[7],在多种恶性肿瘤中呈高表达。体内、外研究表明,Eph-ephrin信号转导机制在血管生成中,尤其是在肿瘤血管生成中有重要的作用^[8]。此外,有研究发现肿瘤除了通过传统的内皮依赖性血管得到血液供应外,还存在一种叫血管生成拟态^[9](VM)的新型血供模式,VM已被证明存在于某些恶性肿瘤中,针对VM的研究已成为目前抗肿瘤治疗的焦点^[10]。研究表明,EphA2与VM有关,能够形成VM的黑色素瘤细胞中EphA2高表达,敲除了EphA2基因的黑色素瘤细胞则不能形成VM^[11]。如,人们已发现姜黄素可通过抑制EphA2的表达,阻止VM管道的形成^[12],说明EphA2在VM形成过程中具有重要作用。

本研究通过复制小鼠黑色素瘤模型,观察RCG对小鼠肿瘤的抑制作用。结果表明,RCG各剂量组的平均瘤质量均显著低于模型组,抑瘤率均显著高于模型组($P < 0.01$);RCG高、中、低剂量组EphA2蛋白与基因表达水平与模型组比较均显

著降低($P < 0.01$)。以上研究结果提示,RCG对于肿瘤的治疗可能具有一定的应用价值,值得深入的探索,其有望更好的用于恶性肿瘤的治疗。

参考文献

- [1] 彭震,李震,焦征.EphA2和黏着斑激酶在肿瘤中的研究进展[J].临床合理用药杂志,2012,5(5):150.
- [2] 钟启宝,冯晓辉.EphA2、E-钙黏素在肿瘤中的研究[J].现代生物学进展,2008,8(1):184.
- [3] 孙岩,郭斌.鲑鱼软骨多糖对小鼠恶性黑色素移植瘤MMP-9表达的影响[J].中国药房,2012,23(11):967.
- [4] 郭斌,刘玉玲,贾玉海.鲑鱼骨素对鸡胚绒毛尿囊膜血管形成的影响[J].辽宁中医杂志,2002,29(11):688.
- [5] Urteaga O, Pack GT. On the antiquity of melanoma[J]. *Cancer*, 1966, 19(5):607.
- [6] 冯刚,王斌,罗红宇,等.海洋软骨鱼软骨抗肿瘤物质的研究进展[J].浙江海洋学院学报:自然科学版,2011,30(2):168.
- [7] 郗硕,孙保存.EphA2在血管生成拟态中的作用机制[J].国际肿瘤学杂志,2006,33(7):484.
- [8] Brantley-Sieders DM, Fang WB, Hicks DJ, et al. Impaired tumor microenvironment in EphA2-deficient mice inhibits tumor angiogenesis and metastatic progression[J]. *FASEB J*, 2005, 19(13):1884.
- [9] Maniotis AJ, Folberg R, Hess AR, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry[J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(3):739.
- [10] 岳伟英,陈忠平.血管生成拟态:肿瘤治疗的新靶点[J].癌症,2006,25(7):914.
- [11] Hess AR, Seftor EA, Gardner LM, et al. Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation: role of epithelial cell kinase (Eck/EphA2) [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(8):3250.
- [12] Yadav VR, Aggarwal BB. Curcumin: a component of the golden spice, targets multiple angiogenic pathways[J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11(2):1.

(收稿日期:2012-07-14 修回日期:2012-08-29)

卫生部要求各地卫生行政部门加强对医院的监管

本刊讯 2013年1月12日,卫生部新闻发言人表示,广大医疗卫生工作者奋斗在救死扶伤第一线,得到社会的信任和尊重。收受药品回扣的行为,触犯国家法律,侵害群众利益,也损害卫生行业形象,影响医患和谐。对此,卫生部严令禁止,严肃查处,态度鲜明。治理医药购销领域商业贿赂和纠正行业不正之风,正是深化“医改”要着力解决的问题。目前正在大力推进以取消“以药补医”为关键环节的公立医院综合改

革,推进和完善药品集中招标采购制度,从根本上破除滋生收受药品回扣行为的土壤。卫生部欢迎社会和媒体进行监督。

卫生部要求各地卫生行政部门进一步强化对医院的监管,加强正面典型教育和反面警示教育。各级医疗机构要认真自查,严格制度,严肃纪律,举一反三。弘扬医疗卫生职业精神,全心全意为人民健康服务。