

• 药理 •

羟基红花黄色素 A 对人胃癌移植瘤裸鼠瘤组织 bFGF 蛋白及 MMP-9 表达的影响

奚胜艳¹, 张前^{3*}, 刘朝阳², 解华³, 岳利峰³, 赵育芳¹, 臧宝霞⁴, 高学敏³

(1. 厦门大学医学院中医系, 福建厦门 361005;

2. 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所, 北京 100021;

3. 北京中医药大学, 北京 100029; 4. 北京市心肺血管疾病研究所药理研究室, 北京 100029)

[摘要] 目的: 研究羟基红花黄色素 A (hydroxy safflower yellow A, HSYA) 对人胃癌裸鼠皮下移植瘤碱性成纤维生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 蛋白以及基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) mRNA 及蛋白表达的影响。方法: 采用 BALB/C nu/nu 裸小鼠接种人胃腺癌细胞株 BGC-823 右前肢腋部皮下建立裸鼠人癌移植瘤模型, 随机分为模型组、阳性对照环磷酰胺组 ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、HSYA 组 ($0.056 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.028 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 观察抑瘤作用, 并采用实时荧光定量 PCR (real time fluorescent quantitation PCR, RTFQ-PCR) 检测瘤组织中 MMP-9 mRNA 表达; 酶联免疫吸附测定法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测瘤组织中 bFGF、MMP-9 蛋白表达。结果: HSYA $0.028 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组抑瘤效果明显, 且其 MMP-9 mRNA 表达及 bFGF 与 MMP-9 蛋白表达与模型组比, 均明显降低 ($P < 0.05$)。结论: 一定浓度的 HSYA 抑制肿瘤生长的机制之一可能与抑制 bFGF、MMP-9 的表达, 减少瘤组织血管基底膜的降解, 阻抑血管移行以减少血管生成有关。

[关键词] 羟基红花黄色素 A; BGC-823; 碱性成纤维生长因子; 基质金属蛋白酶 9; 肿瘤血管生成

血管内皮向肿瘤细胞所在的区域迁移是实体肿瘤进展过程中的一种病理生理现象。内皮细胞向瘤组织内移行, 实现其血管生成, 可为迅速增长的肿瘤提供充足营养。因而抑制微血管基底膜的降解、削弱血管内皮细胞的迁移是研究药物抗肿瘤血管形成的一个重要方向。羟基红花黄色素 A (hydroxy safflower yellow A, HSYA) 是从活血化瘀药红花中提取的活性成分, 前期研究显示具有一定抑瘤作用, HSYA $0.056 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组、CTX 组的抑瘤率分别为 10.39%、29.96%、48.34%; $0.028 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量 HSYA 组肿瘤体积及瘤重与模型组比明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 并发现 HSYA 能阻抑瘤体血管生成, 可能与其抑制 VEGF 与 bFGF 的 mRNA 表达有关^[1]。本实验在此基础上, 拟从血管内皮迁移与血管基底膜降解角度, 运用酶联免疫吸

附测定法 (ELISA) 测裸鼠 BGC-823 移植瘤组织血管移行相关因子 bFGF、MMP-9 蛋白含量情况; 用 RTFQ-PCR 法检测瘤组织 MMP-9 mRNA 表达, 研究 HSYA 对肿瘤血管内皮迁移的影响, 进一步探讨 HSYA 影响肿瘤血管生成的分子机制。

1 材料

1.1 动物、饲料、肿瘤细胞株 SPF 级 BALB/C nu/nu 裸小鼠 24 只, 周龄 4~6 周, 体重 (16 ± 2) g 雌雄各半, 由中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所提供, 合格证号 SCXK (京) 2004-0001; Co^{60} 灭菌饲料由北京科澳协力饲料有限公司提供, 合格证号 SCXK (京) 2005-0007。BGC-823 瘤株为人胃低分化腺癌细胞株, 购自北京肿瘤防治研究所。

1.2 药物 羟基红花黄色素 A 对照品 (首都医科大学附属北京安贞医院北京市心肺血管疾病研究所提供), 非极性大孔树脂柱色谱法分离, 原液质量浓度 $397.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 纯度为 98.9%。注射用环磷酰胺由江苏恒瑞医药股份有限公司生产, 每支 200 mg 批号 08012721。

1.3 试剂 培养基 DMEM、胎牛血清为美国 GIBCO 产品, 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (LightCycler Fast

[稿件编号] 20100118002

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30572436)

[通信作者] * 张前, Tel (010) 64287017, E-mail zq19881988@163.com

[作者简介] 奚胜艳, 医学博士, 讲师, Tel 13616043852 E-mail xishengyan13204@163.com

Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green I, 德国 Roche 公司, LOT: 13828600), MMP-9 (Human) 引物、内参 GAPDH (Human) 引物由北京奥科生物技术公司合成。MMP-9 (Human) ELISA 试剂盒与 bFGF (Human) ELISA 试剂盒 (美国 ADL 公司)。

1.4 仪器 Eppendorf centrifuge 5417R 小型冷冻离心机 (德国艾本德公司); FluorChem 凝胶成像系统 (美国 Alpha Innotech 公司); Tecan 全波长多功能酶标仪 (Tecan Austria GmbH)。LighCycler 2.0 实时荧光定量 PCR 仪及 LighCycler Carousel-Based System (德国 Roche Diagnostics GmbH); HERACell CO₂ 培养箱 (德国贺力氏公司); PTC-100TM Programmable Thermal Controller (美国 MJ Research 公司); TE2000 倒置显微镜 (日本尼康公司); SF2000 电子数显卡尺 (桂林广陆数字测控股份有限公司); 高速冷冻离心机 (德国 Sigma 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及动物饲养 将 BGC-823 细胞接种于 DMEM 培养基 (含 10% 灭活胎牛血清、100 U·mL⁻¹ 青霉素和 100 g·L⁻¹ 链霉素) 中, 置于 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。裸鼠置于中国医学科学院实验动物研究中心屏蔽系统辅洁净层流柜的动物室 (SPF 级) 饲养, 适应 1 周后供接种用。

2.2 药品及主要试剂配制 取 HSYA, 用生理盐水配制 0.056, 0.028 g·L⁻¹ 溶液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, -20 °C 保存待用。对照品环磷酰胺 (CTX) 用灭菌生理盐水配成 2 g·L⁻¹ 的溶液。ELISA 用 bFGF, MMP-9 标准液, 生物素标记人 bFGF, MMP-9 抗体工作液, 亲和素-过氧化物酶复合物 (ABC) 工作液严格按试剂盒说明书配制。

2.3 人癌裸鼠移植瘤模型的建立 参考文献 [2] 方法, 取处于对数生长期的 BGC-823 细胞株, 用 0.25% 胰蛋白酶-0.2% EDTA-D^H anks 消化液消化, 离心配成 2.15 × 10⁷ 个/mL 单细胞悬液, 接种于裸小鼠右前腹部皮下, 每只注射 0.2 mL (约含瘤细胞数 4.3 × 10⁶), 建立裸小鼠人胃癌移植瘤模型。

2.4 动物分组及给药 将接种瘤株 24 h 后的裸小鼠随机分为 4 组, 模型组, 阳性药对照组, HSYA (0.056, 0.028 g·L⁻¹) 剂量组。每组 6 只, 模型组给予腹腔注射 0.9% 灭菌生理盐水; HSYA 组以 HSYA 溶液腹腔注射, 此 3 组均每只裸鼠每日注射 2 次 (间隔 4~6 h), 每次 0.2 mL, 接种次日开始给药。

阳性对照组从接种第 3 天开始给药, 每 2 d 每只腹腔注射 2 g·L⁻¹ 环磷酰胺 1 次, 每次 0.2 mL。

2.5 抑瘤观察 裸鼠腋下肿瘤块生成肉眼可见时, 即用电子数显卡尺每 3 d 测量 1 次移植瘤的最长径 (a) 和最短径 (b), 按公式 $V = 1/2ab^2$ (mm³) 计算肿瘤体积。末次给药后 24 h 称重 (第 20 天), 颈椎脱臼处死裸小鼠, 完整剥离裸鼠右前腋皮下肿瘤, 用电子天平称取瘤重, 计算抑瘤率 (IR)。IR = (模型组平均瘤重 - 给药组平均瘤重) / 模型组平均瘤重 × 100%。

2.6 取材及样品准备 每只裸鼠剥离后的瘤组织用手术刀切取火柴头大小多块, 装入冻存管并迅速投入液氮冷冻, 再于 -70 °C 低温冰箱中储存待用; ELISA 实验按每 50 mg 组织加入 500 μL 的匀浆液进行匀浆, 离心去沉淀。

2.7 实时荧光定量 PCR 检测 总 RNA 提取: 将最佳抑制浓度的 HSYA 组以及模型组瘤组织, 按照 TRIzol 试剂说明, 采用异硫氰酸胍一步法抽提所取瘤组织总 RNA, 所提总 RNA 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳确定其完整性, 并经紫外分光光度计测样品 RNA 含量和纯度。

PCR 扩增: 分别取 3 μg 总 RNA 为模板, 在加入 Oligo (dT) 和 M-MLV 逆转录酶后以 50 μL 体系在 42 °C 下反应 1 h 合成 cDNA 第 1 链, 之后 94 °C 加热 2 min 以灭活逆转录酶。按照 PCR 使用说明, 采用 20 μL 反应体系, 取上述反应物 2 μL, 加入 ddH₂O 12 μL, PCR Mix 4 μL, 并加入 MMP-9 (246 bp) 引物 2 μL; 上游引物 5'-GGGGAAGATGCTGCTGTTC-3', 下游引物 5'-TGCAGGATGTCA TAGGTCA CG-3'。内标基因选择 GAPDH, 上游引物 5'-CCACAGTCCATGCCATCACT-3', 下游引物 5'-GCCTGCTTACCACCTTCTTG-3' (268 bp)。

PCR 循环参数: 退火时间设为 6 s, 退火温度分别设为 MMP-9 59.6 °C, GAPDH 59.0 °C, 延伸温度 72 °C 的延伸时间 (s) 依据引物 bp 数 /25 而定, 45 个循环, 其余严格按试剂盒说明书设定。样品加完后, 放入 PCR 仪卡盘, 运行 LighCycler 2.0 系统, 检测并记录 Ct 值, 所有目标基因表达水平的差异均用治疗组基因相对于内标基因的比值 CR 来表示, 同时做溶解曲线确认是否是单一峰。检测结果重复 3 次。

琼脂糖凝胶电泳确认 RTFQ-PCR 扩增产物: 随机选取模型组和 HSYA 0.028 g·L⁻¹ 组样品的

MMP-9 PCR 扩增产物各 5 μ L, 上样后在 100 V 恒压下进行电泳, Fluor Chem 凝胶成像系统进行 DNA 电泳条带拍照, 对 MMP-9 的扩增结果进行抽样验证。

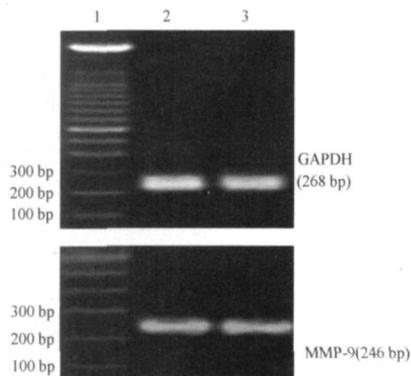
ELISA 法测瘤组织 bFGF, MMP-9 蛋白表达: 经加样, 孵育 120 min, 加待检因子抗体, 温育 60 min, 加入 ABC 工作液, 温育 30 min, 加显色液显影, 读板。

2.8 统计方法 实验所得成组资料数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 软件统计, 两组间比较运用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 时为有统计学意义。

3 结果

3.1 总 RNA 提取结果 总 RNA 样品经琼脂糖凝胶电泳之后, 紫外灯下观察可见 18S 28S 2 条清晰的条带^[1], RNA 样品保持完好, 未被降解。紫外分光比色测定显示, 所有 RNA 样品 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 表明纯度符合要求。

3.2 HSYA 对 BGC-823 移植瘤 MMP-9 mRNA 表达的影响 肿瘤组织总 RNA RT 产物经 RTFQ-PCR 检测显示 MMP-9 内参 GAPDH mRNA 均有表达; 凝胶电泳确认其扩增片段大小分别与理论扩增大小 246 268 bp 一致(图 1); 模型组和 HSYA 0.028 $g \cdot L^{-1}$ 组样本 MMP-9 各自扩增过程中荧光达到阈值时所需的循环数 Ct 值分别为 25.12 \pm 0.62 和 26.06 \pm 0.78。溶解曲线分析表明所测基因各自的溶解温度一致, 为单一峰。数据结果显示, HSYA 0.028 $g \cdot L^{-1}$ 组与模型组 MMP-9 mRNA 的表达水平相比明显降低 ($P < 0.05$) (表 1)。



1. Marker 2. 模型组; 3. HSYA 0.028 $g \cdot L^{-1}$ 组。

图 1 mRNA 实时荧光定量 PCR 产物凝胶电泳

表 1 裸鼠 BGC-823 移植瘤 MMP-9 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量 / $g \cdot L^{-1}$	Ct	CR (mRNA level)
模型	-	25.12 \pm 0.62	4.23 \pm 0.79
HSYA	0.028	26.06 \pm 0.78	3.18 \pm 0.66 ¹⁾

注: 与模型组比较 ¹⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.3 HSYA 对 BGC-823 移植瘤组织 bFGF, MMP-9 蛋白表达的影响 血管迁移相关因子的蛋白表达是反映 HSYA 对肿瘤血管作用的另一分子层面的指标。ELISA 法测定结果显示: HSYA 0.028 $g \cdot L^{-1}$ 治疗组瘤组织中的基质金属蛋白酶 MMP-9 及碱性成纤维生长因子 bFGF 蛋白表达减少, 与模型组相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 HSYA 对裸鼠 BGC-823 移植瘤 bFGF, MMP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量 / $g \cdot L^{-1}$	bFGF / $ng \cdot g^{-1}$	MMP-9 / $\mu g \cdot g^{-1}$
模型	-	710.78 \pm 90.32	4.12 \pm 0.90
HSYA	0.028	629.18 \pm 60.90 ¹⁾	3.07 \pm 0.56 ¹⁾

4 讨论

肿瘤血管生成受血管内皮细胞外基质影响。基底膜 (basement membrane, BM) 是一种特殊的胞外基质。血管内皮基底膜是血管内皮细胞基底面的一附着膜层。基底膜的降解和间质组织的调整主要由内皮细胞特异的基质金属蛋白酶诱导。肿瘤产生的促血管生成因子作用于血管内皮细胞表面的受体诱导内皮细胞变形, 从基底膜降解部位穿出向血管生成促进方向增殖、迁移。

羟基红花黄色素 A (HSYA) 为红花中提取的活血功效成分, 本研究首次将 HSYA 用于人胃腺癌裸鼠皮下移植瘤, 观察其对肿瘤血管生成的作用, 结果见文献 [1], 由于实验中 HSYA 高剂量组 (0.056 $g \cdot L^{-1}$) 抑瘤率太低, 后续研究意义不大, 因此后续基因与蛋白研究主要是对抑瘤率较好的低剂量组进行探讨, 通过实时荧光定量 PCR, ELISA 法对瘤组织中血管生成相关因子 MMP-9 基因及蛋白、bFGF 蛋白进行检测, 初步探讨了 HSYA 对肿瘤新血管迁移形成的作用机制。

碱性成纤维细胞生长因子 bFGF 是继 VEGF 外另一强力促血管形成多肽, 是多种肿瘤发生发展以及瘤体新血管化过程中不容忽视的因素; bFGF 可促

进细胞的有丝分裂,与受体 FGF-R 结合刺激多种来源的细胞增殖与分化;并可刺激内皮细胞产生胶原酶和血浆素原激活物,使血管 BM 降解、消失;诱导血管内皮向三维胶原基质中迁移,形成与毛细血管类似的管腔结构^[3]。深入研究 bFGF 对肿瘤抗血管治疗具有重要意义。

本实验 ELISA 法检测结果显示, $0.028 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ HSYA 治疗的移植瘤中 bFGF 蛋白表达明显较生理盐水治疗的降低,表明其对瘤组织中 bFGF 蛋白的表达有所阻抑,从而减弱 bFGF 对血管内皮迁移、成管的刺激作用。

肿瘤细胞可释放多种基质降解酶,其中基质金属蛋白酶最为重要。MMP-9 是基质金属蛋白酶家族中相对分子质量最大的酶,以酶原形式分泌,被激活后形成 N 型胶原酶发挥降解基质效能^[3]。研究证实: MMP-9 与血管内皮生长因子 VEGF 有很好的正相关性^[4-5]。从而使得 MMP-9 在肿瘤生长过程中可有诱导肿瘤血管生成的作用。有研究显示 MMP-9 在正常胃黏膜组织无表达,胃癌组织中却呈不同程度表达,表达较强的部位在癌巢浸润前缘;胃癌组织内微血管密度较正常组织明显增高;且肿瘤生长活跃的浸润缘密度大于中心密度,微血管高密部位亦是 MMP-9 高表达部位^[6]。

因此,本实验也着眼于基膜降解环节,通过 RT-FQ-PCR 实验观察到 HSYA 可明显抑制裸鼠人胃腺癌 BGC-823 移植瘤组织 MMP-9 基因表达,表明 MMP-9 蛋白的形成在转录水平即受到干扰;通过 ELISA 检测发现给药组瘤组织中 MMP-9 蛋白含量有所减少,提示经 HSYA 治疗后肿瘤细胞直接分泌或诱导宿主细胞合成 MMP-9 的能力有降低,表明 HSYA 通过抑制 MMP-9 的 mRNA 表达,而抑制了 MMP-9 的蛋白表达,因为遗传信息是从 DNA 到 mRNA 再到蛋白质的。因而使得 MMP-9 对肿瘤血管基底膜的降解受阻,妨碍了内皮细胞的迁移,使新血管芽生减少;佐证了前期实验^[1]的病理观察结果,与陈学东等^[7]观察到的活血化瘀药地龙蛋白组

分 III 可通过抑制 MMP-9 蛋白的表达活性、抑制瘤旁微血管的生长而抑制鼻咽癌细胞裸鼠移植瘤有类似结论。目前发现降解胞外基质和血管基底膜、直接参与肿瘤血管生成的 MMPs 家族成员还有很多, HSYA 抑制血管生成是否部分也通过对其他基质蛋白酶产生抑制作用来实现尚有待研究。

综上所述, HSYA 不仅能通过前期实验所发现的抑制人胃腺癌 BGC-823 裸鼠移植瘤 VEGF 及 bFGF mRNA 表达抑制血管形成^[1],而且还可通过减少 bFGF 蛋白表达,阻抑血管移行;通过降低 MMP-9 对血管基质的降解,削弱移植瘤血管的生成,证实 HSYA 在干预血管生成方面具有多靶点效应。 HSYA 药理研究以往多集中于在抗心肌缺血,脑缺血等心血管药理活性上,在抑制肿瘤血管方面研究少有。因而本研究对于 HSYA 新药理作用的阐明,研究新型抗肿瘤辅助治疗药物具重要指导价值。

[参考文献]

- [1] 奚胜艳,张前,解华,等. 羟基红花黄色素 A 对裸鼠人胃腺癌 BGC-823 移植瘤血管及其 VEGF, bFGF mRNA 表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(5): 605.
- [2] 贺岩,李莹杰,王齐敏,等. 建立胃癌实验动物模型方法的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(4): 251.
- [3] 廖子君,雷光焰. 肿瘤转移学 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 2007: 97.
- [4] Zaman K, Driscoll R, Hahn D, et al. Monitoring multiple angiogenesis related molecules in the blood of cancer patients shows a correlation between VEGF-A and MMP-9 levels before treatment and divergent changes after surgical vs conservative therapy [J]. Int J Cancer, 2006, 118(3): 755.
- [5] Gao Z L, Zhang C, Du G Y, et al. Clinical significance of changes in tumor markers, extracellular matrix, MMP-9 and VEGF in patients with gastric carcinoma [J]. Hepatogastroenterology, 2007, 54(77): 1591.
- [6] 王爱东,吕光成. 胃癌组织中 MMP-9 表达、微血管生成与胃癌侵袭与转移 [J]. 肿瘤杂志, 2002, 22(1): 57.
- [7] 陈学东,田道法,孙虹. 地龙蛋白组分 III 对鼻咽癌细胞裸鼠移植瘤血管密度和 MMP-9 表达的影响 [J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志, 2007, 15(5): 326.

Effects of HSYA on expression of bFGF protein and MMP-9 in BGC-823 transplantation tumor of nude mice

XI Shengyan¹, ZHANG Qian^{3*}, LIU Chaoyang², XIE Hua³, YUE Lifeng³, ZHAO Yufang¹, ZANG Baoxia⁴, GAO Xuemin³

(1. Department of Traditional Chinese Medicine of Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005 China;

2. Tumor Research Center of Cancer Hospital of Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021 China;

3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029 China

4. Beijing Institute of Cardiology Vascular Disease, Beijing 100029 China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of hydroxy safflower yellow A (HSYA) on the expression of bFGF protein and MMP-9 mRNA or protein of transplantation tumor of gastric adenocarcinoma cell line BGC-823 in nude mice. **Method** The BGC-823 cells were subcutaneously injected into the right anterior armpit of BALB/C nu/nu nude mice and the animal model of transplantation tumor was established. The experimental groups were treated with HSYA at concentration of 0.056 and 0.028 g·L⁻¹ and cyclophosphamide at 2 g·L⁻¹, or with physiologic saline. The tumor inhibitory effect was observed and the mRNA expression of MMP-9 of transplantation tumor was detected by real time fluorescent quantitation PCR and the protein expression of MMP-9 and bFGF were detected by enzyme linked immunosorbent assay. **Result** The R in the group with HSYA at the concentration of 0.028 g·L⁻¹ is higher than in the group with normal sodium. After treatment with HSYA, the mRNA expression of MMP-9 has significant difference at the concentration of 0.028 g·L⁻¹ as compared with physiologic saline treated group ($P < 0.05$), but the protein expression of MMP-9 and bFGF is obviously less than that in the physiologic saline treated group ($P < 0.05$). **Conclusion** The possible mechanism of HSYA in given concentration to antagonize tumor angiogenesis may be related with inhibiting the protein expression of MMP-9 and bFGF or the mRNA expression of MMP-9 in tumor tissue to reduce the degradation of blood vessel basement membrane and to restrain the migration of blood vessel and decrease the tumor vascularization.

[Key words] hydroxy safflower yellow A; BGC-823; bFGF; MMP-9; tumor angiogenesis

doi 10.4268/cjmm.20102119

[责任编辑 张宁宁]