

鲳鱼软骨多糖对小鼠黑色素移植瘤 VEGF 表达的影响^Δ

郭 斌^{1*}, 孙 岩²(1. 辽宁医学院附属第一医院, 辽宁 锦州 121000; 2. 辽宁医学院, 辽宁 锦州 121001)

中图分类号 R969.1; R971.1

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2013)11-0970-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.11.04

摘要 目的: 研究鲳鱼软骨多糖(RCG)对小鼠恶性黑色素移植瘤血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。方法: 每只小鼠右腋下接种细胞以复制黑色素瘤模型, 将实验分为模型(灌胃, 等容生理盐水)、环磷酰胺(CTX, 腹腔注射, 60 mg/kg)与 RCG 高、中、低剂量(灌胃, 500、250、125 mg/kg)组, CTX 组每周给药 1 次, 其余组每天给药 1 次, 连续 21 d。观察肿瘤生长情况, 计算瘤质量、抑瘤率; 采用 RT-PCR 法和 Western blot 法检测黑色素瘤组织 VEGF mRNA 和蛋白表达。结果: 与模型组比较, RCG 高、中、低剂量组瘤质量显著减少, 抑瘤率显著升高($P < 0.01$); RCG 高、中、低剂量组 VEGF mRNA 和蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$)。结论: RCG 可明显抑制小鼠黑色素瘤原发瘤的生长, 可能与其抑制肿瘤的 VEGF mRNA 表达和蛋白表达有关。

关键词 鲳鱼软骨多糖; 恶性黑色素移植瘤; 血管内皮生长因子

Effect of RCG on the Expression of VEGF in Mice with Malignant Melanoma

GUO Bin¹, SUN Yan²(1. The First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Liaoning Jinzhou 121000, China; 2. Liaoning Medical University, Liaoning Jinzhou 121001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effect of ray cartilage glycosaminoglycans (RCG) on the expression VEGF in mice with malignant melanoma. METHODS: Malignant melanoma model mice were induced by inoculating cell via subcutaneous tissue of their right armpit. The experimental mice were divided into model group(constant volume of normal saline), CTX group(intraperitoneal administration, 60 mg/kg) and RCG high-dose, medium-dose and low-dose groups (gastric lavage administration, 500, 250, 125 mg/kg). CTX group was given medicine once a week, and other group once a day, for 21 consecutive days. The growth of tumor was observed and the inhibitory rate of tumor was measured; the mRNA and the protein expression of VEGF were detected respectively with RT-PCR and Western blot. RESULTS: Compared with model group, inhibitory rates of primary tumor in RCG groups increased significantly, tumor weight decreased significantly($P < 0.01$); the gene expression and the protein expression of VEGF in RCG groups lowered significantly($P < 0.01$). CONCLUSION: RCG could effectively inhibit the growth of malignant melanoma in mice, which was probably related to that RCG inhibit the gene expression of VEGF and the protein expression of VEGF.

KEY WORDS Ray cartilage glycosaminoglycans; Malignant melanoma tumor; VEGF

鲳鱼(Ray)属于脊椎动物门(Vertebrata), 软骨鱼纲(Chondrichthyes), 板鳃亚纲(Elasmobranchii), 鳐目(或魟目)(Rajiformes), 魟科(Dasyatidae)的鱼, 属暖温带底层鱼。我国海域分布有相当丰富的赤魟资源, 赤魟具有多种重要的生物活性物质^[1]。本研究用鲳鱼经锦州海洋药业研究开发中心鉴定为赤魟。多数报道认为, 多糖的抗肿瘤作用主要通过提高机体的免疫力实现, 有研究表明软骨多糖对 S180 细胞有杀伤作用并能提高小鼠的免疫功能^[2]。鲳鱼软骨多糖(RCG)是来源于鲳鱼的一种黏多糖, 以往的研究发现, RCG 具有明显的抗肿瘤作用和免疫增强作用^[3]。

本研究通过复制小鼠黑色素瘤模型, 观察 RCG 对小鼠黑色素瘤的抑制作用, 并进一步研究 RCG 对小鼠黑色素瘤组织中血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。

1 材料

1.1 仪器

AEL-200 型电子天平(日本岛津公司); 55P-7 型超速离心机(日本 Hitachi 公司); 1-15K 型高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司); 601 型超级恒温水浴箱(金坛市国瑞实验仪器厂); 超净

工作台(苏州新区枫桥净化设备厂); EC250 型电泳槽及电泳仪(美国 EC 公司); OMN-E 型 PCR 仪(英国 Hybaid 公司); EDAS290 型凝胶成像系统(日本 Kodark 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, 分子量: 9.7×10^4 , 纯度: 99%); 环磷酰胺(CTX, 江苏恒瑞医药公司, 批号: 20110507); 0.25% 胰蛋白酶溶液、1640 培养基(美国 Gibco 公司); 新生牛血清(杭州四季青生物技术有限公司); VEGF 单克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司); RT-PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司); 引物、Trizol 试剂(上海生工生物工程技术服务有限公司); 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, 由中国医学科学院实验动物研究所提供[动物使用许可证号: SCXK(京)2009-0004]。B16 细胞由中国医学科学院提供。

2 方法

2.1 模型的复制与分组

B16 细胞常规培养于 1640 培养基, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 2~3 天进行 1 次传代。取对数生长期细胞, 用 0.25% 胰酶消化, 800 r/min 离心 5 min 后收集细胞, 用无菌生理盐水调细胞浓度为 1×10^7 ml⁻¹, 备用。取 C57BL/6 小鼠 40

Δ 基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目(No.201102132)

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

只,每只小鼠右腋下接种细胞悬液0.2 ml。将上述小鼠均分为5组,即模型(ig, 等容生理盐水)、CTX(ip, 60 mg/kg)与RCG高、中、低剂量(ig, 500、250、125 mg/kg)组。接种后第2天给药,CTX组每周1次,其余组每天1次,连续21 d。末次给药后脱颈椎处死小鼠,取皮下肿块称质量,计算肿瘤抑制率。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 RT-PCR 法检测黑色素瘤组织 VEGF mRNA 表达

用 Trizol 溶解黑色素瘤组织,置涡型混合仪震荡 20 s,室温放置 10 min,然后 4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min;加入 200 μl 氯仿,放置 10 min,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min;将上清吸出转入另一个离心管中,加入与上清等体积的异丙醇,放置 10 min,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min;弃去上清液,加入 75% 乙醇洗涤沉淀,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min;弃上清,在空气中干燥 5~10 min,加 20 μl DEPC 水溶解。提取的 RNA 在 260 nm 波长下检测吸光度并计算 RNA 浓度。按照 RT-PCR 试剂盒说明进行扩增。VEGF 上游引物:5'-AGACAATGGGATGAAAGG-3',下游引物:5'-AGATGAGGAAGGGTAAGC-3';β-action 上游引物:5'-CCCATCTACGAGGGCTAT-3',下游引物:5'-TGTCACGCACGATTTC-3';VEGF 扩增片段大小为 554 bp,β-action 扩增片段大小为 145 bp。反转录反应参数设置:42 ℃ 30 min,99 ℃ 5 min;PCR 扩增反应参数设置如下:94 ℃ 预变性 2 min,然后 94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,上述步骤进行 30 个循环。取 PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳,溴化乙锭染色,用凝胶成像分析系统照相,计算机分析各条带的光密度值,并与内参相比,以此代表目的片段的相对表达值。

2.3 Western blot 法检测 VEGF 蛋白表达

取-80 ℃ 冻存的黑色素瘤组织 100 mg,加入裂解液,将组织剪碎,4 ℃ 12 000 r/min 离心 30 min,取上清液用 BCA 法进行蛋白定量。各取 50 μg 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,半干转印法将蛋白质转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,用脱脂奶粉封闭 1 h,加入 1:500 稀释的一抗温育 2 h,PBS 洗膜 3 次,每次 3 min,加入 1:500 稀释的二抗温育 2 h,PBS 洗膜 3 次,每次 10 min。NBT 显色液中避光显色,将蛋白印迹显影图扫描,利用凝胶自动分析成像软件对蛋白带进行分析,并求得与β-actin 组整合密度值的比值为相对灰度值。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 7.0 进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 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、低剂量组瘤质量显著减少,抑瘤率显著升高($P < 0.01$),表明 RCG 对小鼠黑色素瘤的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。

3.2 RCG 对模型小鼠黑色素瘤组织 VEGF mRNA 表达的影响

与模型组比较,RCG 高、中、低剂量组小鼠黑色素瘤组织 VEGF mRNA 表达显著减弱($P < 0.01$),表明 RCG 对小鼠黑色素瘤组织 VEGF mRNA 表达具有显著抑制作用。小鼠黑色素

瘤组织 VEGF mRNA 的表达见图 1、表 2。

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 Effects of RCG on the weight of tumor 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		4.28±0.09	
RCG 低剂量组	125	3.64±0.10*	15.14*
RCG 中剂量组	250	3.04±0.15*	28.95*
RCG 高剂量组	500	2.27±0.02*	46.98*
CTX 组	60	1.56±0.03*	63.60*

与模型组比较: * $P < 0.01$
vs.model group: * $P < 0.01$

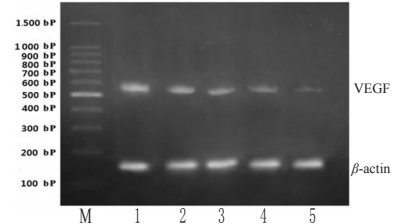


图 1 小鼠黑色素瘤组织 VEGF mRNA 的表达
1.模型组;2.RCG 低剂量组;3.RCG 中剂量组;4.CTX 组;5. RCG 高剂量组;M.mark

Fig 1 The mRNA expression of VEGF in mice with malignant melanoma
1.model group; 2. RCG low-dose group;3. RCGM medium-dose group; 4.CTX group; 5. RCG high-dose group M.mark

表 2 小鼠黑色素瘤组织 VEGF mRNA 与蛋白的表达($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 The mRNA expression and protein expression of VEGF in mice with malignant melanoma($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量,mg/kg	VEGF mRNA	VEGF 蛋白
模型组		0.79±0.02	0.62±0.02
RCG 低剂量组	125	0.61±0.03*	0.40±0.02*
RCG 中剂量组	250	0.39±0.01*	0.29±0.02*
RCG 高剂量组	500	0.14±0.01*	0.11±0.02*
CTX 组	60	0.28±0.02*	0.24±0.02*

与模型组比较: * $P < 0.01$
vs.model group: * $P < 0.01$

3.3 RCG 对小鼠黑色素瘤组织 VEGF 蛋白表达的影响

与模型组比较,RCG 高、中、低剂量组黑色素瘤组织 VEGF 蛋白表达显著减弱($P < 0.01$),表明 RCG 对小鼠黑色素瘤组织 VEGF 蛋白表达具有显著抑制作用。小鼠黑色素瘤组织 VEGF 蛋白的表达见表 2、图 2。

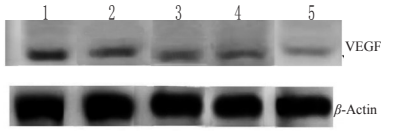


图 2 小鼠黑色素瘤组织 VEGF 蛋白的表达
1.模型组;2.RCG 低剂量组;3.RCG 中剂量组;4.CTX 组;5. RCG 高剂量组

Fig 2 The protein expression of VEGF in mice with malignant melanoma
1.model group; 2. RCG low-dose group;3. RCGM medium-dose group; 4.CTX group; 5. RCG high-dose group

4 讨论

催眠方煎剂对小鼠海马GABA_A受体mRNA表达的影响

黄晓舞^{1*}, 冯 慧²(1.解放军总医院, 北京 100853; 2.总参旗坛寺门诊部, 北京 100034)

中图分类号 R392; R285

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2013)11-0972-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.11.05

摘要 目的:研究催眠方煎剂对小鼠海马GABA_A受体mRNA表达的影响。方法:实验分为空白对照(等体积蒸馏水)、地西洋(2 mg/kg)与催眠方煎剂(2 g/kg)组。应用实时荧光定量PCR法检测小鼠海马GABA_A受体mRNA的表达。结果:与空白对照组比较,催眠方煎剂组小鼠海马GABA_A-α₁mRNA表达显著增强,GABA_A-α₂mRNA表达无显著变化。结论:催眠方煎剂通过特异性作用于GABA_A-α₁受体而发挥镇静催眠作用。

关键词 实时荧光定量PCR;催眠方;GABA_A受体

Effects of Cuimian Prescription Decoction on mRNA Expression of GABA_A Receptor in Hippocampus of Mice

HUANG Xiao-wu¹, FENG Hui² (1.General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; 2.Clinical Department of Zhantan Temple, Headquarters of General Staff, Beijing 100034, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the Cuimian prescription on mRNA expression of GABA_A receptor in hippocampus of mice. **METHODS:** Mice were divided into 3 groups, i.e. blank control group (equal volume of distilled water) group, diazepam (2 mg/kg) group and Cuimian prescription decoction (2 g/kg) group. mRNA expression of GABA_A in hippocampus of mice was detected by RT-PCR techniques. **RESULTS:** Compared with blank control group, mRNA expression of GABA_A in hippocampus of mice increased in Cuimian prescription decoction group. **CONCLUSION:** Cuimian prescription decoction has edative and hypnotic effects by increasing the gene expression level of GABA_A-α₁ receptor.

KEYWORDS Real-time PCR; Cuimian prescription; GABA_A receptor

恶性黑色素瘤(Malignant melanoma, MM)简称恶黑,是一类起源于神经嵴黑色素细胞的恶性肿瘤。Maniotis AJ等^[4]研究发现,恶性黑色素瘤存在一种特殊的血液供应方式即血管生成拟态,肿瘤细胞本身可以形成类似于血管的管道,肿瘤通过这些管道与宿主血管相连,进而为肿瘤的生长、侵袭和转移提供血供。

目前研究发现,与肿瘤血管生成有关的因子有30多种,其中VEGF起着重要的作用,它能特异地促进细胞分裂、增殖及迁移。Bayer-Garner B等^[5]发现,VEGF在恶性黑色素瘤中表达率为42%,而细胞痣以及非典型复合痣无表达。Salven P等^[6]发现,32%的原发性恶性黑色素瘤表达VEGF,而转移性恶性黑色素瘤高表达至90%。VEGF的主要机制为:(1)VEGF诱导内皮细胞表达整合素-1及其配体,介导内皮细胞浸润和转移^[7]。(2)VEGF诱导内皮细胞分泌多种组织蛋白酶及其组织因子,降解细胞外基质,介导内皮细胞迁移,诱导新生血管生成^[8]。

本研究通过复制小鼠黑色素瘤模型,发现RCG可以抑制小鼠黑色素瘤的生长并且具有剂量依赖性。结果表明,RCG高、中、低剂量组VEGF蛋白表达相对灰度值显著低于模型组($P < 0.01$),VEGF mRNA表达与模型组比较也显著下降($P < 0.01$),以上结果说明RCG对肿瘤具有一定的抑制作用。该结论可为探索出一条更为有效的黑色素瘤药物治疗方法提供实验基础。

参考文献

- [1] 罗红宇,余新威. 赤鲋生物活性物质的研究现状[J]. 中国海洋药物杂志, 2007, 26(1): 54.
- [2] 刘安军,尤玲玲,贾永利,等. 软骨多糖对小鼠肉瘤细胞S180抑瘤作用[J]. 中国肿瘤, 2006, 15(11): 772.
- [3] 郭斌,樊海燕,贾玉海,等. 鲑鱼骨素对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2002, 29(2): 104.
- [4] Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry[J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(3): 739.
- [5] Bayer-Garner B, Hough AJ, Smoller BR. Vascular endothelial growth factor expression in malignant melanoma: prognostic versus diagnostic usefulness[J]. *Mod Pathol*, 1999, 12(8): 770.
- [6] Salven P, Heikkilä P, Joensuu H. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in metastatic melanoma[J]. *Br J Cancer*, 1997, 76(7): 930.
- [7] Thurston G. Complementary actions of VEGF and angiopoietins on blood vessel permeability and growth in mice[J]. *J Anat*, 2002, 200(5): 529.
- [8] Naskar R, Thanos S. Retinal gene profiling in a hereditary rodent model of elevated intraocular pressure[J]. *Mol Vis*, 2006(12): 199.

(收稿日期:2012-03-15 修回日期:2012-08-05)

* 副主任药师。研究方向:药品质量控制和物流管理。电话:010-66939338。E-mail:huangxw9266@vip.sina.com