

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.17.004

# 硫酸右旋糖酐抑制人胃癌腹腔种植转移及其对缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 表达的影响\*

王红红,王娟,金秀,徐远义 $\Delta$ 

(宁夏医科大学基础医学院病理学系,银川 750001)

**[摘要]** **目的** 探讨硫酸右旋糖酐(DS)是否可抑制胃癌腹腔种植转移及其对缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (Hif-1 $\alpha$ )表达的影响。**方法** 裸鼠 72 只分为两大组,对照组 32 只,实验组 40 只,培养 BGC-823 胃癌细胞,腹腔注射建立裸鼠腹腔种植转移动物模型。注射胃癌细胞 1 d 后,对照组注射生理盐水 1 mL,实验组注射 0.3% DS 1 mL。于 1、3、7、14 d 时剖腹观察胃癌细胞腹腔种植转移情况,采用逆转录 PCR(RT-PCR)及免疫组织化学检测缺氧诱导因子(Hif-1 $\alpha$ )mRNA 及蛋白的表达。**结果** 第 7、14 天实验组结节数明显少于对照组。经 RT-PCR 及免疫组织化学检测,第 3、7、14 天实验组 Hif-1 $\alpha$  mRNA 及蛋白的表达明显低于对照组( $P < 0.05$ )。**结论** DS 可以抑制胃癌的腹腔种植转移,DS 可能是通过下调 Hif-1 $\alpha$  的表达来抑制胃癌的腹腔种植转移。

**[关键词]** 右旋糖酐类;缺氧诱导因子 1 $\alpha$  亚基;胃肿瘤;腹腔种植转移

**[中图分类号]** R735.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)17-2315-03

## Dextran sulfate inhibits gastric cancer celiac planting transfer and its influence on the expression of Hif-1 $\alpha$ \*

Wang Honghong, Wang Juan, Jin Xiu, Xu Yuanyi $\Delta$ 

(Department of Pathology, Basic Medicine School of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750001, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the influence of Dextran sulfate (dextran sulfate, DS) on celiac planting metastasis of gastric cancer and its influence on the expression of Hif-1 $\alpha$ . **Methods** 72 nude mice was divided into two groups, control group (32 mice), the experimental group (40 mice). Intraperitoneal injection of BGC-823 gastric cancer cells to establish animal model. A day after the injection of gastric cancer cells, control group was injected with 1 mL of saline solution, and experimental group was injected with 1 mL of 0.3% DS. At 1st, 3rd, 7th, 14th day caesarean section was conducted to observe the situation of transfer. The expression of hypoxia inducing factor (Hif-1 $\alpha$ ) mRNA and protein are detected by RT-PCR and immunohistochemical. **Results** The number of tumor nodules in experimental group was less than control group obviously at 7th, 14th day. The expression of Hif-1 $\alpha$  mRNA and protein in experimental group were significantly less than those of control group at 3rd, 7th, 14th day. **Conclusion** DS can inhibit the celiac planting metastasis of gastric cancer by inhibit the expression of Hif-1 $\alpha$ .

**[Key words]** dextrans; hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit; stomach neoplasms; celiac planting transfer

胃癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,而腹腔种植转移是影响患者预后及死亡最重要的原因,因此寻找一种可以抑制其种植转移的药物将会极大的提高患者的生存率。硫酸右旋糖酐(dextran sulfate, DS)是一种大分子右旋糖酐,具有腹腔吸收缓慢,毒性小,来源丰富等优点。动物实验表明,DS 可以阻止 B-16 黑色素瘤细胞在大网膜乳斑和腹膜上的种植,并可延长患有癌性腹膜炎小鼠的生存时间<sup>[1]</sup>。缺氧是实体性肿瘤物理微环境的基本特征之一,在缺氧微环境下,肿瘤细胞高表达缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (Hif-1 $\alpha$ )<sup>[2]</sup>。目前相关研究<sup>[3]</sup>表明 Hif-1 $\alpha$  与肿瘤的发生发展具有密切的关系,在肿瘤发生发展过程中起到重要的调控作用。本研究通过免疫组织化学、逆转录(RT-PCR),在前期研究的基础上,检测通过胃癌细胞 BGC-823 所构建的裸鼠腹腔种植转移模型中 Hif-1 $\alpha$  的表达,观察 DS 对胃癌细胞腹腔种植转移的作用,并探讨 Hif-1 $\alpha$  在其中的作用。

### 1 材料与方

#### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株及实验动物** 人胃癌细胞株 BGC-823 购于北京金紫晶生物公司肿瘤细胞库。BALB/c 裸鼠购自北京华康生物科技股份有限公司,雄性,体质量 18~21 g,4~6 周龄,饲养于宁夏医科大学实验动物中心,SPF 级,自由摄取无菌食物及饮水。

**1.1.2 实验药品及试剂** DS 购自 Sigma 公司,生理盐水稀释,用 22  $\mu$ m 过滤器过滤,使其最终浓度为 0.3%;RPMI1640 培养基购自 Hyclone 公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;Hif-1 $\alpha$  多克隆抗体购自 Proteintech 生物有限公司(1:200 稀释),山羊抗兔二抗、DAB 购自北京中山金桥生物科技有限公司;总 mRNA 提取试剂盒购自 Omega 公司;逆转录试剂盒购自美国 Frementas 公司;PCR 试剂盒购自北京康为试剂科技股份有限公司。

#### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 人胃癌细胞株 BGC-823 从液氮中取出,于 37  $^{\circ}$ C 水浴锅中快速复苏后,培养于 RPMI1640 完全培养基(含 10% 灭活胎牛血清)中。在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度温箱中培养,0.25% 胰蛋白酶消化,隔天传代。在细胞对数生长期时收集细胞,并调整细胞悬液浓度至 1  $\times$  10<sup>7</sup>/mL 备用。

**1.2.2 分组、动物模型的建立** BALB/C 裸鼠 72 只,用 0.5% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉,腹部皮肤消毒后,于腹部剑突下切口约 0.5 cm 长切口,暴露胃壁,于胃壁后悬浮滴入 0.2 mL 1  $\times$  10<sup>7</sup>/mL 的细胞悬液,关闭切口。裸鼠分为两组,一组 32 只,于第 2 天在切口附近注入 1 mL 生理盐水,另一组 40 只,于第 2 天切口附近注入 0.3% DS 1 mL。每组再分为 4 小组,于注入药物后的第 1、3、7、14 天用颈椎脱位法处死裸鼠。观察大网膜

上的转移肿瘤数量、大小、颜色,取大网膜分为两份,一份用于制作蜡块,另一份冻存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱中用于 RT-PCR。

**1.2.3 免疫组织化学** 组织经 10% 甲醛固定,乙醇脱水后石蜡包埋,切取 0.4 mm 厚组织。免疫组织化学染色采用二步法,PBS 代替一抗作为阴性对照。Hif-1 $\alpha$  于细胞核及细胞质表达,观察阳性细胞分布特点。应用 IPP 图像自动分析系统,在 400 倍镜下,选定空白区定标及具有代表性的 5 个视野,测定光密度(OD)值进行计算,获得所选视野的平均光密度值。

**1.2.4 RT-PCR** 总 mRNA 提取试剂盒提取总 RNA,按试剂盒步骤逆转录及扩增。Hif-1 $\alpha$  引物:正向 5'-GAA AGC GCA AGT CTT CAA AG-3',反向 5'-TGG GTA GGA GAT GGA GAT GC-3',目的片段长度为 167 bp,反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$  3 min;94 $^{\circ}\text{C}$  30 s,58 $^{\circ}\text{C}$  30 s,72 $^{\circ}\text{C}$  30 s 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$  4 min。内参 GAPDH:正向 5'-CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG-3',反向 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G-3',目的片段长度为 496 bp,反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$  3 min;94 $^{\circ}\text{C}$  30 s,58 $^{\circ}\text{C}$  30 s,72 $^{\circ}\text{C}$  30 s 30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$  7 min。PCR 产物用溴化乙锭染色的 2% 琼脂糖凝胶电泳,用 Bio-Rad 凝胶成像系统拍照记录。将图像摄入 Quantity One 分析系统对扩增产物进行图像分析,以相对光密度(ROD)代表基因表达丰度,以 Hif-1 $\alpha$ /GAPDH 计算 Hif-1 $\alpha$  的相对表达量。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件整理分析数据,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,两样本均数的比较采用两样本均数的  $t$  检验,多个样本均数的比较采用方差分析。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 实验组及对照组腹腔内肿瘤结节的数量** 结节计数时以结节间界限较清楚记为各自独立结节。随着时间的推移,在大网膜、腹膜、肝脾均可见到瓷白色结节,质略硬,腹腔瘤结节的数量逐渐增加,3 d 时实验组与对照组差异无统计学意义( $P>0.05$ ),7、14 d 时实验组较对照组数量明显减少,直径减小( $P=0.000$ ),见图 1。

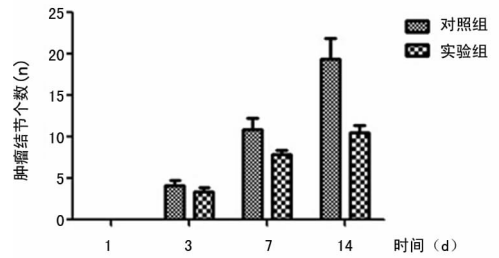
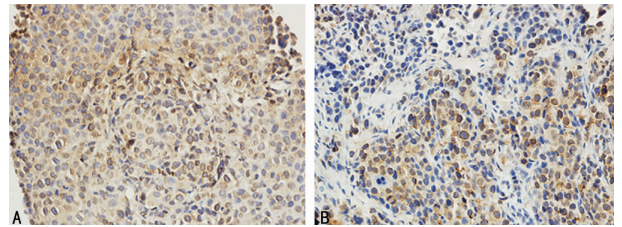


图 1 实验组及对照组不同时间点腹腔肿瘤结节数量

**2.2 免疫组织化学法检测不同时间点实验组和对照组 Hif-1 $\alpha$  的表达** Hif-1 $\alpha$  于细胞质及细胞核表达,1 d 时,实验组与对照组差异无统计学意义( $P>0.05$ ),3、7、14 d 时实验组较对照组表达明显降低( $P<0.01$ ),见图 2、表 1。



A: 对照组; B: 实验组。

图 2 对照组与实验组 Hif-1 $\alpha$  免疫组织化学表达结果( $\times 400$ )

**2.3 RT-PCR 法检测不同时间点实验组和对照组 Hif-1 $\alpha$  mRNA 的表达** 与对照组比较,实验组不同时间点 Hif-1 $\alpha$  mRNA 的表达明显下调,差异有统计学意义( $P=0.000$ ),见表 2。

表 1 免疫组织化学检测对照组及实验组不同时间点 Hif-1 $\alpha$  的表达( $\bar{x}\pm s$ )

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	F	P
对照组	56.97 $\pm$ 4.36	74.37 $\pm$ 3.36	94.51 $\pm$ 4.81	137.11 $\pm$ 4.30	327.980	0.000
实验组	53.49 $\pm$ 2.18	67.14 $\pm$ 3.25	82.64 $\pm$ 3.77	87.31 $\pm$ 4.51	95.295	0.000
t	1.577	3.456	4.338	17.881		
P	0.154	0.009	0.002	0.000		

表 2 RT-PCR 法检测对照组与实验组不同时间点 Hif-1 $\alpha$  mRNA 表达( $\bar{x}\pm s$ )

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	F	P
对照组	1.18 $\pm$ 0.47	1.63 $\pm$ 0.34	2.63 $\pm$ 0.44	3.61 $\pm$ 0.41	100.964	0.000
实验组	0.83 $\pm$ 0.18	1.36 $\pm$ 0.22	1.86 $\pm$ 0.47	1.86 $\pm$ 0.46	27.883	0.000
t	2.672	2.584	4.625	10.988		
P	0.016	0.015	0.000	0.000		

## 3 讨论

胃癌是常见的严重危害人类健康、高发病率、高病死率的恶性肿瘤,据统计占我国消化道恶性肿瘤的第一位,目前住院病例中 90% 以上为进展期胃癌,即使施行根治手术,腹腔转移仍是胃癌无法手术根治的主要原因之一,也是术后复发、治疗失败的主要原因。胃癌术后腹腔化疗已作为阻止腹腔种植转移的一种常规治疗手段,普通化疗药物在腹腔容易被吸收,导致该药在腹腔停留时间短不能达到很好的抗癌作用。

本实验研究的 DS 相对分子质量大,约  $50\times 10^4$ ,致使其在腹腔吸收缓慢,可在腹腔形成比较持久的高浓度,从而对腹腔肿瘤细胞发挥作用。国外于 1997 年开始研究 DS 的抗癌作

用。曾有研究显示,DS 可以阻止 B-16 黑色素瘤细胞在大网膜乳斑及腹膜上的种植,可安全的使用于胃肠道吻合手术,所以 DS 被认为是具有潜力的抗癌药物<sup>[4]</sup>。本课题组前期研究显示,DS 在体外可抑制人胃癌细胞 MKN1 的黏附及整合素  $\beta 1$  的表达<sup>[5]</sup>,体内实验亦研究显示,DS 可以抑制整合素  $\beta 1$  的表达<sup>[6-7]</sup>及 VEGF 的表达<sup>[8]</sup>。

Hif-1 $\alpha$  是 1992 年由 Ratcliffe 等<sup>[9]</sup>发现的一种氧依赖转录激活因子,Hif-1 主要由 Hif-1 $\alpha$  和 Hif-1 $\beta$  两个亚单位组成,其中 Hif-1 $\alpha$  是惟一的氧调节亚单位,主要表达在缺氧的组织细胞内<sup>[10]</sup>。缺氧是实体性肿瘤物理微环境的基本特征之一,肿瘤生长到一定阶段,当氧的需求超过供给,或肿瘤内的不成熟

血管因间质内压力上升而塌陷时,局部微环境处于缺氧状态。肿瘤细胞在长期缺氧微环境刺激下,通过 Hif-1 $\alpha$  表达增高调控血管新生,促进细胞发生上皮间质转化等途径适应缺氧微环境而促进肿瘤生长和转移<sup>[11]</sup>。

本实验通过体外实验研究发现,DS 可以减少实验组裸鼠腹腔内的胃癌结节数量并减小其体积,且可有效地降低 Hif-1 $\alpha$  mRNA 及蛋白的表达,表明 DS 可以抑制胃癌细胞在腹腔内的转移生长,其可能是 DS 通过抑制 Hif-1 $\alpha$  的表达而发挥作用,使肿瘤局部缺氧状态不能得到改善,从而抑制肿瘤的生长,最终抑制胃癌细胞在腹腔的转移生长。Ardyanto 等<sup>[12]</sup>用 CoCl<sub>2</sub> 处理不同分化程度的人胃癌细胞株,结果显示 Hif-1 $\alpha$  的表达与胃癌细胞的增殖和凋亡相关。易楠等<sup>[13]</sup>的研究发现 miR-18 $\alpha$  能作用于 Hif-1 $\alpha$  的 3'UTR,抑制其蛋白表达,从而最终抑制胃癌细胞的增殖。

总之,本实验研究发现,DS 可以减少实验组裸鼠腹腔内的胃癌结节数量并减小体积,且可有效地降低 Hif-1 $\alpha$  mRNA 及蛋白的表达。DS 抑制胃癌细胞腹腔种植转移的机制可能是其通过下调 Hif-1 $\alpha$  的表达而发挥作用,Hif-1 $\alpha$  在 DS 抑制胃癌腹腔种植转移中发挥重要作用,降低 Hif-1 $\alpha$  的表达对抑制胃癌腹腔种植转移具有重大意义。本研究发现,DS 可以抑制胃癌的腹腔种植转移,可为胃癌腹腔种植转移临床治疗提供新的药物。

#### 参考文献

- [1] Hagiwara A, Sakakura C, Yamasaki J, et al. Dextran sulfate inhibits injured abdominal wall-specific tumor implantation in mice[J]. *Anticancer Drugs*, 2000, 11(10): 873-877.
- [2] Arjumand W, Sultana S. Role of VHL gene mutation in human renal cell carcinoma[J]. *Tumor Biology*, 2012, 33(1): 9-16.
- [3] Jung JH, Im S, Jung ES, et al. Clinicopathological implications of the expression of hypoxia-related proteins in gastric cancer[J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10(9): 1217-1223.
- [4] Hagiwara A, Sakakura C, Shirasu M, et al. Intraperitoneal

injection of dextran sulfate as an anti-adherent drug for the prevention of peritoneal metastasis of cancer shows low toxicity in animals[J]. *Anticancer Drugs*, 2000, 11(5): 393-399.

- [5] 徐远义,黄允宁,王伟,等. 硫酸右旋糖苷抑制人胃癌细胞黏附以及整合素  $\beta$ -1 基因表达的机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2007, 23(12): 1552-1555.
- [6] 赵雪艳,王娟,荣小伟,等. DS 对胃癌细胞整合素  $\beta$ 1 表达及腹腔种植转移的影响[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2013, 29(4): 365-368.
- [7] 王娟,赵雪艳,荣小伟,等. 硫酸右旋糖苷对人胃癌细胞腹腔种植转移和整合素  $\beta$ 1 表达的影响[J]. *诊断病理学杂志*, 2014, 21(4): 224-227.
- [8] 王娟,赵雪艳,王红红,等. 硫酸右旋糖苷对人胃癌细胞腹腔种植转移和 VEGF 表达的影响[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2014, 30(6): 625-628.
- [9] Ratcliffe PJ. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(4): 862-865.
- [10] 李伟,熊正文,李宏伟,等. COX-2、VEGF 和 E-cad 在乳腺癌组织中的表达及临床病理意义[J]. *中国现代普通外科进展*, 2010, 13(10): 766-771.
- [11] Noman MZ, Messai Y, Carre T, et al. Microenvironmental hypoxia orchestrating the cell stroma cross talk, tumor progression and antitumor response[J]. *Crit Rev Immunol*, 2011, 31(5): 357-377.
- [12] Ardyanto TD, Osaki M, Nagahama Y, et al. Down-regulation of cobalt-induced HIF-1 alpha expression correlates with cell proliferation and apoptosis in human gastric carcinoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2008, 19(2): 339-343.
- [13] 易楠,李杏玉,李铁军,等. miR-18a 抑制 HIF-1 $\alpha$  的表达及对胃癌细胞增殖的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 22(14): 1977-1983.

(收稿日期:2014-11-15 修回日期:2015-02-16)

(上接第 2307 页)

- Curr Pharm Des, 2012, 8(3): 303-309.
- [3] Qiu Y, Seager M, Osman A, et al. Ovarian VEGF(165) b expression regulates follicular development, corpus luteum function and fertility[J]. *Reproduction*, 2012, 143(4): 501-511.
- [4] van den Driesche S, Myers M, Gay E, et al. HCG up-regulates hypoxia inducible factor1 alpha in luteinized granulosa cells: implications for the hormonal regulation of vascular endothelial growth factor A in the human corpus luteum[J]. *Mol Hum Reprod*, 2008, 14(8): 455-464.
- [5] Assal Y, Mie M, Kobatake E. The promotion of angiogenesis by growth factors integrated with ECM proteins through coiledcoil structures[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(13): 3315-3323.

- [6] Gao JM, Yan J, Li R, et al. Improvement in the quality of heterotopic allotransplanted mouse ovarian tissues with basic fibroblast growth factor and fibrin hydrogel[J]. *Hum Reprod*, 2013, 28(10): 2784-2793.
- [7] Guan XM, Cheng M, Li H, et al. Biological properties of bone marrow-derived early and late endothelial progenitor cells in different culture media[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(6): 1722-1728.
- [8] Duncan WC, Driesche S, Fraser HM. Inhibition of vascular endothelial growth factor in the primate ovary up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha in the follicle and corpus luteum[J]. *Endocrinology*, 2011, 149(7): 3313-3318.

(收稿日期:2014-11-08 修回日期:2015-03-16)