

图 6 慢性乙型肝炎患者组和正常对照组中血清 miR - 122、miR - 22 的表达比较

病毒学应答,有助于提高患者干扰素治疗的依从性和疗效。Hao 等^[7]发现 IFN - α 治疗能导致 miR - 122 在肝细胞中表达减少。所以笔者选择了血清中 miR - 22 和 miR - 122 两个 miRNA 作为我们的研究对象。在笔者的研究中,建立了茎环引物的实时荧光定量 PCR 法检测血清中的 miRNA。并进行了该方法的线性范围和敏感度评估实验与重复性实验,结果表明该方法线性范围宽,敏感度高,重复性好,方法简便。用 RT - PCR 法检测血清 miR - 122 和 miR - 22 的表达水平,慢性乙型肝炎患者组比正常对照组显著升高。提示这两个 miRNA 在 HBV 感染后表达上调。因此,血清中 miR - 122 和 miR - 22 的表达水平有可能作为乙型肝病毒感染的有效指标。

参考文献

- 1 梁晓峰,陈园生,王晓军,等.中国3岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究[J].中华流行病学杂志,2005,26(9):655-658

- 2 Gilad S, Meiri E, Yogeve Y, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers [J]. PLoS One 2008, 3(9): e3148
- 3 Wang K, Zhang S, Marzolf B, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug - induced liver injury [J]. Proc Natl Acad Sci USA 2009, 106(11): 4402-4407
- 4 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J].中华临床感染病杂志,2011,4(1):1-13
- 5 Zhang Y, Jia Y, Zheng R, et al. Serum microRNA - 122 as a biomarker for viral -, alcohol -, and chemical - related hepatic diseases [J]. Clin Chem, 2010, 56(12): 1830-1838
- 6 Zhang X, Chen C, M Wu, et al. Serum microRNA profile as a predictor of early virological response to pegylated interferon treatment in chronic hepatitis B patients [J]. Antiviral Therapy, 2012, 17(7): 1243-1253
- 7 Hao JL, Jin WS, Li XH, et al. Inhibition of alpha pegylated interferon (IFN - α) - induced microRNA - 122 negatively affects the anti - hepatitis B virus efficiency of IFN - α [J]. Journal of Virology, 2013, 87(1): 137-146

(收稿日期:2015-01-29)

(修回日期:2015-02-10)

人参皂甙 Rg3 对胰腺癌裸鼠皮下移植瘤血管生成拟态的研究

江丹丹 郭敬强 陈亮

摘要 目的 本实验通过建立胰腺癌 SW - 1990 细胞株皮下移植瘤模型,探讨人参皂甙 Rg3 对胰腺癌皮下移植瘤血管生成拟态的影响。**方法** 首先建立人胰腺癌细胞裸鼠模型,后给予不同药物浓度的人参皂甙 Rg3 (0、5、10、20mg/kg) 处理裸鼠,观察人参皂甙 Rg3 对裸鼠移植瘤生长的影响,免疫组化 - PAS 双染观察人参皂甙 Rg3 对裸鼠胰腺癌皮下移植瘤血管生成拟态和血

管内皮因子 CD31 的影响，并用荧光定量 PCR 和 Western blot 法分别检测 MMP-2、MMP-9 在 mRNA 和蛋白水平的表达。结果人参皂甙 Rg3 能够抑制胰腺癌裸鼠皮下移植瘤的生长，其中 20mg/kg 人参皂甙 Rg3 组最明显；Western blot 法和荧光定量 PCR 用药组与空白组比较，MMP-2、MMP-9 在蛋白和 mRNA 水平的表达下降，且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；免疫组化-PAS 双染后发现血管拟生 (+) 和 CD31 (+) 数量均较空白组减少。**结论** 通过体内实验笔者证实人参皂甙 Rg3 能够通过降低 MMP-2、MMP-9 的表达来抑制胰腺癌血管生成拟态的形成。

关键词 胰腺癌 胰腺癌裸鼠皮下移植瘤 血管生成拟态 基质金属蛋白酶

中图分类号 R6

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.10.035

Effects of Ginsenosides Rg3 on Vasculogenic Mimicry of Pancreatic Cancer Xenograft. Jiang Dandan, Guo Jingqiang, Chen Liang. Department of Hepatobiliary Surgery, First Hospital of Jiaxing, Zhejiang 314000, China

Abstract Objective To investigate the effects of ginsenosides Rg3 on vasculogenic mimicry of pancreatic cancer xenograft through the establishment of pancreatic cancer cell line SW-1990 subcutaneous xenograft model. **Methods** After pancreatic cancer xenograft in nude mice model beening established, All the mice were randomly divided into 4 groups and treated intraperitoneally (IP) with saline and various concentrations (5, 10, 20 mg/kg) of ginsenosides Rg3. To observe the effect of ginsenoside Rg3 on tumor growth. Immunohistochemical-PAS staining was used to detect the effects of ginsenosides Rg3 on vasculogenic mimicry of pancreatic cancer xenograft. and mRNA and protein expression of MMP2、MMP9 were respectively evaluated by FQ-PCR and Western blot. **Results** The ginsenosides Rg3 can inhibit the growth of the tumor xenografts in nude mice. The inhibitory effect is the most obvious the 20 mg/kg of ginsenosides Rg3 group. The expression of MMP-2, MMP-9 were down-regulated compare with the control group, and the difference was significant; the Immunohistochemical-PAS staining showed the number of vasculogenic mimicry (+) and CD31 (+) were less than that in the control group. **Conclusion** Our results demonstrate that pancreatic vascular mimicry formation can be suppressed by Ginsenoside Rg3 though reducing the expression of MMP-2, MMP-9 in our vivo experiments,

Key words Pancreatic cancer; Xenograft model of pancreatic cancer; Vasculogenic mimicry; Matrix metalloproteinase

胰腺癌是一种恶性程度非常高的消化道肿瘤，由于其起病隐匿，临床发现时大部分已处于晚期，治疗上手术切除是目前主要的治疗方式，但由于术后易复发，其 5 年的生存率仅为 20%^[1]。肿瘤的生长主要依靠新生血管的形成，传统观念认为新生血管的形成大都起源于血管内皮细胞。然而 Maniotis 等^[2]发现在人眼葡萄膜黑色素瘤中存在一种由细胞外基质和黑色瘤细胞包绕组成的，在电子微镜下观察到在管腔中存在红细胞而无内皮细胞的互相连接的环状网络结构，通常将这种不依赖于内皮细胞的肿瘤内血管生成状态称为血管生成拟态，随后人们陆续在其他肿瘤中同样证实这种血管生成拟态的存在。有临床报道，胰腺癌中存在血管生成拟态，但是其形成具体机制仍不清楚。

人参皂甙 Rg3 是从人参中提取的一种微量四环三萜皂甙，其能够通过多种机制发挥抗肿瘤作用^[3~7]。笔者前期实验研究发现胰腺癌 SW-1990 细胞株在体外三维培养环境中能形成血管生成拟态，人参皂甙 Rg3 能够使 MMP-2、MMP-9 的表达下降，抑制胰腺癌 SW-1990 细胞株在三维培养环境中血管生成拟态的生成，但体外三维培养环境与体内的差异较大，对实验结果会造成影响。本实验通过建立

胰腺癌 SW-1990 细胞株裸鼠皮下移植瘤模型，探讨人参皂甙 Rg3 对胰腺癌裸鼠皮下移植瘤血管生成拟态的影响。

材料与方法

1. 试剂：人参皂甙 Rg3 标准品(纯度≥98%)，购买于美国 Sigma 公司，DMEM 培养液、胰酶购于 Gibco 公司，MMP-9、MMP-2 抗体购买于 Abcam 公司。

2. 细胞培养和胰腺癌动物模型的建立：胰腺癌细胞株 SW-1990 购于美国 ATCC 公司，培养于 DMEM 培养液中，置于 37℃、饱和湿度含 5% CO₂ 及 95% 氧气的孵箱中培养。动物实验经过嘉兴学院医学院伦理委员会批准。BALB-C-nu 裸鼠 28 只，18~22g，4~6 周龄，购自中科院上海实验动物中心，饲养于嘉兴学院医学院实验动物中心(SPF 级)，有关动物的实验操作均按规定进行。动物模型的建立：待 SW-1990 细胞培养至铺满瓶底 70%~80% 时，用胰酶消化贴壁细胞，用含 DMEM 和血清 1:1 的液体稀释成 $2 \times 10^6/100\mu\text{l}$ 的单细胞溶液，在无菌条件下于裸鼠背侧近右后肢处皮下接种 100 μl/只。当癌细胞接种后 3 天，把裸鼠随机分成 4 组，每组 7 只，之后通过腹腔注射给予不同人参皂甙 Rg3 浓度处理(0、5、10、20mg/kg)，隔日 1 次，共给药 4 周，最后一次给药后 3 天处死裸鼠，取移植瘤组织用于后续实验研究。

3. 免疫组化-PAS 双染：上述留取的裸鼠移植瘤组织，经 4% 的多聚甲醛固定，石蜡包埋后切片，经 3% 的双氧水灭活过氧化物酶 20min，1×PBS 洗涤 3 次，每次 5min，后经 5% 的山

羊血清室温下封闭 20min,一抗 CD31(1:100)4℃过夜孵育, PBS 洗涤后经辣根标记的山羊抗鼠二抗(1:100)37℃孵育1h。DAB 复染 8min,高碘酸作用 10min,然后置于 Schiff 液中,目测组织出现紫红质后流水冲洗终止。苏木素复染 2min,流水冲洗 12min,分化、反蓝、常规脱水、透明、树胶封片。CD31/PAS 阳性结果判定及量化方法如下^[8]:400×高倍显微镜下随机选取 10 个视野,肿瘤细胞彼此融合,连接成网络结构且 PAS 阳性的为形成拟生态血管;肿瘤组织中出现 CD31 阳性、PAS 染色阴性的为血管内皮依赖的管道,CD31 阴性、PAS 染色阳性且管腔内发现红细胞者为拟生态血管,以平均数来计算两者的量。

4. 荧光定量 PCR 检测 MMP-2、MMP-9 mRNA 的表达:根据说明用 TRIzol 一步法提取裸鼠移植瘤组织中总的 RNA,按 RNA 反转录试剂盒说明反转录合成 cDNA,cDNA 用 DEPC 水稀释 3 倍。MMP-2、MMP-9 和内参 GAPDH 的引物用 1×TBE Buffer 稀释成 10pmol/ml 待用,其引物序列见表 1。将扩

增好的 cDNA,待用的稀释引物,荧光 PCR 水,SYRB Green 按照 SYRB Green 5μl、上游下游引物各 1μl、cDNA 1μl、余下用荧光 PCR 水补足配成 10μl 的反应体系,上机(Roche)扩增 45 个循环。结果用 Light Cycler 480 软件分析。

5. Western blot 法检测 MMP-2、MMP-9 蛋白水平的表达:裸鼠移植瘤组织获取后立即放入加有液氮的研钵中碾磨,提取移植瘤组织的蛋白,之后用 BAC 试剂盒测定蛋白的浓度,配体系。制好 10% 的胶板后,蛋白 60μg 浓度上样电泳,恒流 300mA 转膜,1×TBS 平衡 5min,后 5% 的脱脂牛奶封闭 2h,一抗(MMP-9 1:1000, MMP-2 1:100)4℃过夜,二抗(1:5000)室温下 2h,1×TBST 洗涤后,加 ECL 化学发光曝光,结果用 AlphaEaseFC 4.0 软件分析。

6. 统计学方法:所得数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,不同组别采用卡检验或方差分析,采用 SPSS 17.0 软件进行 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 人参皂甙 Rg3 对胰腺癌裸鼠皮下移植瘤生长的影响:与不用药组比较,人参皂甙 Rg3 可以抑制裸鼠胰腺癌皮下移植瘤的生长,并且随着用药浓度的增加,移植瘤的形成有逐渐变小的趋势,其中 10mg/kg 和 20mg/kg 浓度人参皂甙 Rg3 作用最明显。裸鼠麻醉后取瘤称重,测量瘤体长和宽,按照 $(4/3)\pi[(\text{长度} + \text{宽度})/4]^2$ ^[9] 计算瘤体的体积,各组瘤体重量和体积的量化差别见表 2 所示。

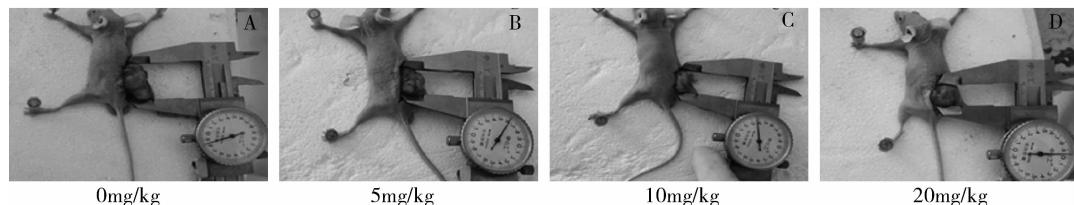


图 1 不同浓度的人参皂甙 Rg3(0、5、10、20mg/kg)分别作用于裸鼠皮下移植瘤 4 周后,对胰腺癌皮下移植瘤的影响

A. 0mg/kg; B. 5mg/kg; C. 10mg/kg; D. 20mg/kg;由图 A、B、C、D 可以看出,随着药物浓度的升高,移植瘤的形成有逐渐变小的趋势

表 2 不同浓度的人参皂甙 Rg3 对裸鼠皮下移植瘤重量和体积影响的量化

分组	移植瘤重量(g)	移植瘤体积(mm ³)
0mg/kg	1.48 ± 0.13	662.78 ± 12.91
5mg/kg	1.11 ± 0.46	414.64 ± 13.46
10mg/kg	0.95 ± 0.32	351.43 ± 20.65
20mg/kg	0.58 ± 0.24	300.33 ± 14.71

2. 人参皂甙 Rg3 对胰腺癌裸鼠皮下移植瘤血管生成拟态的影响:单纯 CD31 染色,可见一抗 CD31 将具有血管内皮结构的血管部分染成棕黄色(图 2A);单纯 PAS 染色,将血管拟态区管道壁及细胞外基质染成紫红色(图 2B);图 2C 所示在 PAS(+)的通道中

能够见到肿瘤细胞,说明肿瘤细胞可以经过血管生成拟态发生转移;图 2D 所示 CD31 染色(+)的管道和 PAS(+)的通道相连,说明血管生成拟态和内皮依赖性血管相通,血管生成拟态同样可以给肿瘤组织的生长、侵袭、复发和转移提供基础;空白组和用药组的双染结果分别如图 2E、F、G、H 所示,随着人参皂甙 Rg3 的用药,血管拟生态的形成能力逐渐下降,CD31/PAS 阳性量逐渐下降,其具体数值如表 3 所示。

3. Western blot 法和 FQ-PCR 检测各组裸鼠移植瘤组织 MMP-2、MMP-9 蛋白和 mRNA 的表达:如图 3A 所示,随着人参皂甙 Rg3 用药浓度的增加,与不用药组比较,移植瘤组织的 MMP-2、MMP-9

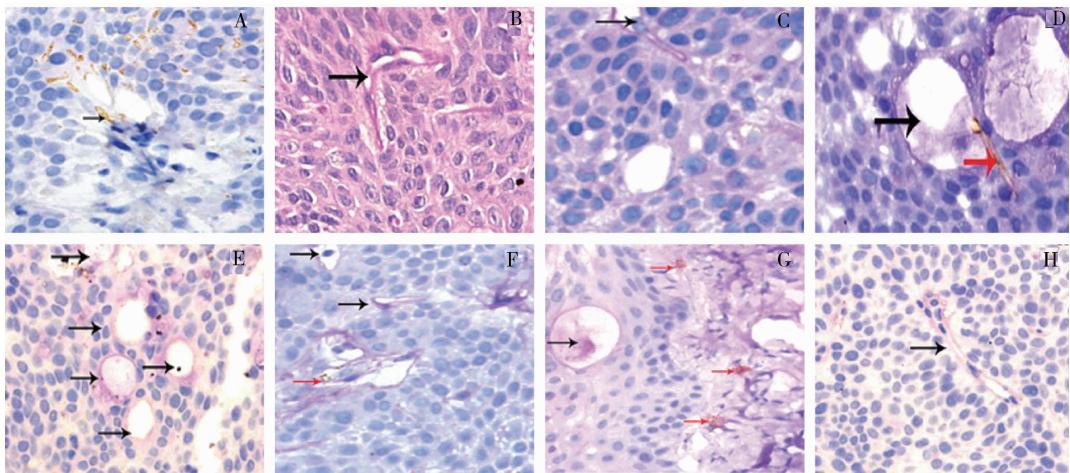


图 2 采用免疫组化 - PAS 双染法观察人参皂甙 Rg3 对胰腺癌裸鼠皮下移植瘤血管生成拟态的影响

表 3 裸鼠 CD31/PAS 阳性量化计数具体数值

分组	CD31(+)	P	PAS(+)	P
0mg/kg	2.9 ± 1.369		2.3 ± 1.159	
5mg/kg	1.9 ± 0.994	0.364	1.6 ± 0.843	0.563
10mg/kg	0.7 ± 0.948	0.004	0.5 ± 0.572	0.004
20mg/kg	0.3 ± 0.674	0.001	0.3 ± 0.483	0.002

蛋白的表达逐渐下降;其中 20mg/kg 组下降最明显,差异有统计学意义($P < 0.05$) ;与 Western blot 法的结果相对应的荧光定量 PCR 结果如图 3B 所示,随着人参皂甙 Rg3 用药浓度的增加,与不用药组比较,移植瘤组织的 MMP - 2、MMP - 9 在 mRNA 水平表达均下降,其中 20mg/kg 组下降最明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

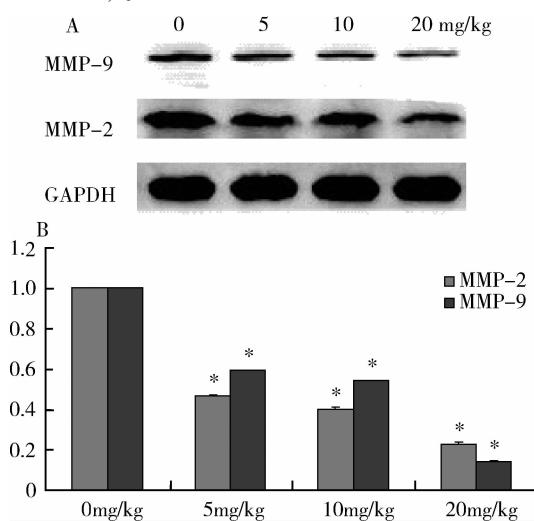


图 3 采用 Western blot 法和 FQ - PCR 分别检测不同用药浓度的人参皂甙 Rg3 对 MMP - 2、MMP - 9 蛋白和 mRNA 的表达的影响
与对照组比较, $P < 0.05$

讨 论

传统观念认为肿瘤血管的形成主要依靠内皮细胞,据研究发现在黑色素瘤中存在一种由肿瘤细胞自身和细胞外基质形成的能够运输红细胞的管型通道,即血管生成拟态^[2]。血管生成拟态一般出现在高度恶性的肿瘤组织中,是肿瘤细胞形成的新型血管网络结构^[5]。正如本实验证实,在胰腺癌裸鼠移植瘤组织中存在血管生成拟态,血管可以形成花环状结构,其为肿瘤的生成和侵袭提供营养基础,随着人参皂甙 Rg3 的用药,裸鼠移植瘤组织形成血管拟生态的能力逐渐下降,主要表现在免疫组化 - PAS 双染中 CD31(+) 和 PAS(+) 阳性数量逐渐下降。

基质金属蛋白酶 (MMP) 是一组锌依赖性内肽酶,与肿瘤浸润和转移等密切相关。据 Seftor 等^[10]报道在高侵袭性黑色素瘤组织中 MMP2、MMP9 的表达较其他肿瘤组织中明显增加,使肿瘤细胞结合更多的层黏连蛋白,最终促进血管生成拟态的形成。研究发现人参皂甙 Rg3 抑制 MMP - 2、MMP - 9 的表达而发挥抗肿瘤作用^[11]。正如本研究所证实,在裸鼠移植瘤组织中,MMP2、MMP9 呈高表达状态,随着人参皂甙 Rg3 的用药,与不用药组比较 MMP - 2、MMP - 9 在蛋白和 mRNA 水平的表达均下降。故通过本实验笔者推测人参皂甙 Rg3 抑制胰腺癌皮下移植瘤的生长和其可抑制 MMP2、MMP9 的表达有关,并进一步抑制血管生成拟态的形成。

总之,血管生成拟态的提出是对经典的内皮依赖性肿瘤血管的补充,为部分临床肿瘤抗血管治疗效果不佳提供一合理的解释。通过体内实验笔者证实人参皂甙 Rg3 能够通过降低 MMP - 2、MMP - 9 的表达

来抑制胰腺癌血管生成拟态的形成,该发现可能为临床治疗工作提供帮助。

参考文献

- 1 Saif M, Lee Y, Kim R. Harnessing gemcitabine metabolism: a step towards personalized medicine for pancreatic cancer [J]. Ther Adv Med Oncol, 2012, 4(6): 341–346
- 2 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): 739–752
- 3 Pan XY, Guo H, Han J, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates cell migration via inhibition of aquaporin expression in PC-3M prostate cancer cells [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 683(1–3): 27–34
- 4 Kim JW, Jung SY, Kwon YH, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates tumor angiogenesis via inhibiting bioactivities of endothelial progenitor cells [J]. Cancer Biol Ther, 2012, 13(7): 504–515
- 5 Zhang C, Liu L, Yu Y, et al. Antitumor effects of ginsenoside Rg3 on human hepatocellular carcinoma cells [J]. Mol Med Rep, 2012, 5(5): 1295–1298
- 6 Lee CK, Park KK, Chung AS, et al. Ginsenoside Rg3 enhances the chemosensitivity of tumors to cisplatin by reducing the basal level of nuclear factor erythroid 2-related factor 2-mediated heme oxygenase-1/NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 and prevents normal tissue damage by scavenging cisplatin-induced intracellular reactive ox-
- 7 ygen species [J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(7): 2565–2574
- 8 Liu JP, Lu D, Nicholson RC, et al. Toxicity of a novel anti-tumor agent 20(S)-ginsenoside Rg3: a 26-week intramuscular repeated administration study in Beagle dogs [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(8): 1718–1727
- 9 Sun B, Zhang S, Zhang D, et al. Wang Y: Doxycycline influences microcirculation patterns in B16 melanoma [J]. Exp Biol Med: Maywood, 2007, 23(2): 1300–1307
- 10 Wei WT, Chen H, Ni ZL, et al. Antitumor and apoptosis-promoting properties of emodin, an anthraquinone derivative from *Rheum officinale Baill.*, against pancreatic cancer in mice via inhibition of Akt activation [J]. Int J Oncol, 2011, 39(2): 1381–1390
- 11 Seftor RE, Seftor EA, Koshikawa N, et al. Cooperative interactions of laminin 5gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma [J]. Cancer Res, 2001, 61(17): 6322–6327
- 12 Shin YM, Jung HJ, Choi WY, et al. Antioxidative, anti-inflammatory, and matrix metalloproteinase inhibitory activities of 20(S)-ginsenoside Rg3 in cultured mammalian cell lines [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(1): 269–279

(收稿日期:2014-12-13)

(修回日期:2015-01-06)

颈前路治疗多节段颈椎病的疗效分析

王 杨 赵承斌 刘立冰 勾旭升 吴 垠

摘要 目的 分析颈前路治疗多节段颈椎病的临床效果。**方法** 收集哈尔滨医科大学附属第四医院 2012 年 7 月~2013 年 7 月病变累及 3 个以上椎间隙的颈椎病患者 34 例,并由同一术者行手术治疗,术式采用颈前路椎管减压、髓核摘除、椎体次全切、钛网内植骨、锁定钛板固定。手术前后均对患者采用日本骨科协会颈椎病疗效评定标准 (JOA) 进行评分。观察患者手术前后 JOA 评分变化。**结果** 34 例患者手术均获得成功,术后未出现明显并发症。JOA 评分由术前 9.9 ± 1.2 分上升为术后 13.6 ± 1.3 分,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 颈椎前路治疗多节段颈椎病安全可行。

关键词 多节段颈椎病 颈前路 钛网 髓核摘除 椎体次全

中图分类号 R687.3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.10.036

Curative Effect Analysis of Anterior Multilevel Cervical Spondylopathy Treatment. Wang Yang, Zhao Chengbin, Liu Libing, et al. Department of Orthopedic Surgery, The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Heilongjiang 150001, China

Abstract Objective To evaluate the clinical effects of anterior cervical multilevel cervical disease. **Methods** Collected 34 patients of multilevel cervical myelopathy with 3 consecutive segments who were treated with the same surgeon for operation treatment in the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University from 2012 July to 2013 July. Operation by anterior cervical decompression, removal of nucleus pulposus, subtotal resection of vertebral body, bone grafting with titanium mesh, locking titanium plate fixation. Both before

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第四医院骨科

通讯作者:赵承斌,教授,主任医师,硕士生导师,电子信箱:zhaochengbin123@sina.com.cn