

# 人参皂苷免疫纳米对裸鼠人胃癌 NUGC-4 组织中血管内皮生长因子 D 表达的影响

戴小军<sup>1</sup> 王维民<sup>2</sup> 罗玉妍<sup>3</sup> 郁梅<sup>4</sup> 吴永健<sup>1</sup>

(1.南京中医药大学扬州附属医院、扬州市中医院,江苏扬州 225002; 2.宜兴市人民医院,江苏宜兴 214200; 3.南京中医药大学,江苏南京 210023; 4.扬州大学医学院,江苏扬州 225001)

**摘要** 目的:观察人参皂苷免疫纳米(VRIN)对裸鼠人胃癌 NUGC-4 组织中血管内皮生长因子 D(VEGF-D)表达的影响,探讨 VRIN 防治胃癌淋巴转移的作用机制。方法:24 只裸鼠建立 NUGC-4 人胃癌原位移植模型,并随机分为生理盐水组、5-氟尿嘧啶(5-Fu)组及 VRIN 组,每组 8 只,分别给予生理盐水、5-Fu 和 VRIN 干预后,采用免疫组织化学和 Real time-PCR 方法检测瘤组织 VEGF-D 蛋白及 mRNA 的表达。结果:与生理盐水组比较,VRIN 对胃癌 NUGC-4 细胞裸鼠淋巴结转移有明显抑制作用,对肿瘤组织中 VEGF-D 蛋白和 mRNA 水平的表达有明显下调作用。结论:VRIN 可抑制人胃癌细胞裸鼠移植瘤淋巴结转移,调控淋巴管生长因子 VEGF-D 蛋白和 mRNA 的表达是 VRIN 防治胃癌淋巴转移的可能机制之一。

**关键词** 人参皂苷 Rg3 免疫纳米乳 胃肿瘤 血管内皮生长因子 D 实验研究

**中图分类号** R735.2 **文献标识码** A **文章编号** 1672-397X(2014)08-0076-03

胃癌是主要以淋巴转移为扩散途径的恶性肿瘤,但经历数十年的研究仍未能完全阐明其机理和意义。近年来,随着血管内皮生长因子 D(vascular endothelial growth factor-D, VEGF-D)等特异作用于淋巴管内皮的生长因子及受体的发现,抑制胃癌细胞分泌 VEGF-D 或阻断 VEGF-D 与受体 VEGFR-3 结合,成为胃癌转移方面的研究热点,阻断或抑制淋巴转移是提高胃癌疗效的关键<sup>[1-2]</sup>。本课题组以抗血管内皮生长因子受体 3 抗体(VEGFR-3 antibody)为介导,制备人参皂苷 Rg3 肿瘤靶向免疫纳米乳剂(VRIN)。本研究通过建立裸鼠人胃癌 NUGC-4 原位移植模型,观察 VRIN 对裸鼠人胃癌模型淋巴结转移率和淋巴管生长因子 VEGF-D 表达的影响,探讨 VRIN 在防治胃癌淋巴转移方面的作用机理。

## 1 实验材料

**1.1 动物与瘤株** SPF 级 BALB/c 无胸腺裸鼠 24 只,雄性,6 周龄,18~20g,由扬州大学比较医学中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(苏)20120004,实验动物使用许可证号:SYXK(苏)2010-0004。红色荧光蛋白标记人胃癌细胞株 NUGC-4-RFP,由美国 AntiCancer.Inc 公司提供,将含  $5 \times 10^6$  细胞接种于裸鼠皮下,成瘤后,传代成实体瘤。

**1.2 主要药物与试剂** 人参皂苷 Rg3 肿瘤靶向免疫纳米乳剂(VRIN):由扬州大学医学院天然药物研究室采用聚乙二醇法制备,VRIN 为淡黄色澄清透明液体,TEM 观察其乳滴为球形,20℃条件下测定其粘度为  $(1.09 \pm 0.03) \text{ mPa} \cdot \text{s}$ ,电导率为  $(368.45 \pm 0.84) \mu\text{S}/\text{cm}$ ,pH 值为  $(7.86 \pm 0.12)$ ,折光率为  $(1.3379 \pm$

$0.0009)$ ,25℃条件下测定其 Zeta 电位平均值为  $-11.8 \text{ mV}$ ,平均粒径为  $137.9 \text{ nm}$ ,偶联率为  $895 \text{ ng}$ 。VEGFR-3 抗体/1mg 人参皂苷 Rg3、5-氟尿嘧啶(5-Fu)注射液,天津金耀氨基酸有限公司,批号:201203211;VEGF-D 一抗,购于英国 Abcam 公司;即用型免疫组化 Maxvision2 鼠兔通用型免疫组化检测试剂盒,购于福州迈新生物技术开发有限公司;cDNA 第一链合成试剂盒,购自 Fermentas Trizol 公司。

## 2 实验方法

**2.1 造模、分组与给药** 取皮下种植生长的 NUGC-4-RFP 胃癌肿瘤,在培养液中分割成  $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$  的组织碎块。采用肌肉注射麻醉的方法麻醉小鼠,待裸鼠痛觉消失后,在 8 倍外科手术用显微镜下,采用显微外科手术的方法,用手术剪在裸鼠左腹部做一  $1 \text{ cm}$  的纵切口,剪开皮肤和腹膜,暴露胃。用 8-0 外科手术用线将 1 块 NUGC-4-RFP 组织碎块植入裸鼠胃大弯部,之后用 5-0 外科缝线关闭腹腔,整个操作过程在超净工作台中完成。24 只裸鼠同时造模后,按随机数字表法分为生理盐水组、5-Fu 组和 VRIN 组,每组 8 只。造模后第 9 天开始给药。生理盐水组给予生理盐水尾静脉注射,每只  $0.2 \text{ mL}/\text{次}$ , $\text{Q}2\text{d} \times 15$ ;5-Fu 组给予 5-Fu 注射液腹腔注射,按照  $20 \text{ mg}/\text{kg}$  标准,每周 1 次,连续 3 周;VRIN 组给予 VRIN 尾静脉注射,按照  $1 \text{ mg}/\text{kg}$  标准, $\text{Q}2\text{d} \times 15$ 。各组药物干预结束后,经麻醉脱颈处死荷瘤鼠,将裸鼠解剖并进行开放式荧光成像,根据红色荧光的表达来判断淋巴结转移情况。快速切取原发肿瘤和转移灶,分别置于 4%甲醛与液氮中备用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81001589);江苏省中医药局科研项目(HZ07101)

2.2 胃癌组织中 VEGF-D 蛋白表达检测 按照试剂盒说明书方法检测移植瘤组织中 VEGF-D 蛋白表达情况。二甲基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,盐酸酒精分化,脱水,透明,封片,镜检。在 10×20 倍视野下选取 3 个视野,用计算机图像分析系统对所选视野进行图像采集,并用 Moti Image Advaneed 3.0 图像分析软件检测其阳性信号,以平均光密度值反映 VEGF-D 表达的强弱,光密度值越高,VEGF-D 的表达就越强。

2.3 胃癌组织中 VEGF-D mRNA 表达检测 采用 Real time-PCR 方法。取胃癌组织,使用 TRIZOL 试剂提取肿瘤组织总 RNA,检测吸光度(A)值,所提取的 RNA 纯度  $A_{260}/A_{280}$  均在 1.8~2.1。按照逆转录试剂盒说明书,将总 RNA 逆转录成 cDNA,以 GAPDH 为内参照进行 Real-time PCR。引物的设计与合成:参照 GenBank 中的基因序列,使用 Primer Premier 5.0 进行设计。

GAPDH 引物序列——GAPDH 上游引物 F:5' - GCACCGTCAAGGCTGAGAAC -3', 下游引物 R:5' - TGGTGAAGACGCCAGTGGG -3', 扩增片段为 137bp; VEGF 引物序列——VEGF -D 上游引物 F:5' - GGACTCTCGCTCAGCATCCCATC -3', VEGF-D 下游引物 R: 5' - CCACCTCCACGACGTTTCTCTA -3', 扩增片段为 131bp。上述引物均由上海捷瑞生物科技有限公司合成。PCR 反应:反应体系为 25μL, SYBR Green PCR Master Mix (2×) 10μL, 10μmol/L 上下游引物各 1μL, 双蒸水 7μL, cDNA 1μL。反应条件:95℃变性 5min, 95℃15s, 60℃30min, 共 40 个循环, 扩增完毕后,进行溶解曲线分析,每个标本均作 3 个复孔;PCR 产物定量的校正和判定分析:采用 GAPDH 作为内参照。VEGF-D mRNA 和 GAPDH mRNA 根据标准曲线得出 mRNA 的分子拷贝数,用 GAPDH 的拷贝数作为校正基数,即目的基因 mRNA 精确含量=目的基因 Ct 值/内参照 GAPDH Ct 值,以此比值作统计处理。

2.4 统计学方法 所有数据采用 SPSS19.0 软件处理,计量资料用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,首先用 Levene 检验 (Homogeneity of variance test) 进行方差齐性检验,如方差齐,采用完全随机的方差分析 (ANOVA),多个均数的比较用 LSD-t 检验;如各个组总体方差不齐,则采用 Kruskal-Wallis 检验,检验水准 ( $\alpha$ ) 定为 0.05。

### 3 实验结果

3.1 各组淋巴结转移情况比较 当生理盐水组肿瘤平均体积达到 1278.6mm<sup>3</sup> 时结束实验。裸鼠被解剖后,荧光系统观察可见部分动物肠系膜、腹主动脉旁及腹股沟等淋巴结肿大。生理盐水组、5-Fu 组和 VRIN 组的淋巴转移率分别为 87.5% (7/8)、50.0% (4/8) 和 12.5% (1/8)。与生理盐水组比较,VRIN 组淋巴转移率明显降低 ( $P < 0.01$ ),而 5-Fu 组降低无显著性意义 ( $P > 0.05$ );VRIN 组与 5-Fu 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。对切除标本进行 HE 染色显示移植肿瘤及转移淋巴结均为低分化腺癌。

3.2 各组原位移植瘤组织中 VEGF-D 蛋白表达比较 见表 1。各实验组肿瘤组织中均可见到 VEGF-D 阳性染色,阳性表达细胞以肿瘤细胞为主,主要定位于细胞浆内。两用药组肿瘤组织中 VEGF-D 蛋白表达均明显低于生理盐水组 ( $P < 0.05$ ),

两用药组组间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1 各组原位移植瘤组织中 VEGF-D 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 动物数 | 平均光密度值 (OD)  |
|------|-----|--------------|
|      |     | VEGF-D       |
| 生理盐水 | 8   | 0.261±0.024  |
| 5-Fu | 8   | 0.196±0.017* |
| VRIN | 8   | 0.178±0.021* |

注:与生理盐水组比较,\* $P < 0.05$ 。

3.3 各组原位移植瘤组织中 VEGF-D mRNA 表达比较 见表 2。与生理盐水组比较,VRIN 组、5-Fu 组均可下调 VEGF-D mRNA 表达水平,VRIN 组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),而 5-Fu 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );两用药组组间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 2 各组原位移植瘤组织中 VEGF-D mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 动物数 | VEGF-D     |
|------|-----|------------|
| 生理盐水 | 8   | 1.30±0.38  |
| 5-Fu | 8   | 1.15±0.23  |
| VRIN | 8   | 0.69±0.43* |

注:与生理盐水组比较,\* $P < 0.05$ 。

### 4 讨论

防治肿瘤的复发和转移仍是目前胃癌防治工作中的重点和难点。淋巴转移是胃癌转移的主要途径,近年来,随着 VEGF-C 和 VEGF-D 等淋巴管生长因子的发现,使胃癌淋巴转移机制研究得以深入。VEGF-D 是血管内皮生长因子家族的新成员,位于 Xp22.34<sup>[3]</sup>。VEGF-D 是目前已知的促淋巴管生长因子,可诱导淋巴管生成,促进肿瘤细胞的淋巴转移,在淋巴管生成机制中起重要作用。VEGF-D 与其受体 VEGFR-3 的胞外区域高度特异性结合,使受体自身磷酸化而激活细胞内信号传导通路,刺激淋巴管内皮细胞的增殖和迁移,诱导淋巴管生成,参与体内多种病理生理过程。VEGF-D 在胃癌等多种肿瘤细胞中都有表达,与胃癌的预后密切相关<sup>[4-5]</sup>。

人参作为传统中药家喻户晓,其提纯的重要活性成分之一的人参皂苷 Rg3 分子式是 C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>13</sub>,属四环三萜类人参二醇型皂苷单体,其抗肿瘤作用已从多面被证实,包括:诱导肿瘤细胞凋亡、细胞周期阻滞、抑制肿瘤细胞侵袭和转移、抑制肿瘤血管新生、逆转化疗耐药、调节肿瘤细胞基因及蛋白表达<sup>[6-7]</sup>。我国自行开发的第一个在临床应用的抗肿瘤中药一类新药参一胶囊的主要活性成分就是 Rg3。然而 Rg3 口服后血浆浓度很低,3.2mg/kg 口服后的 C<sub>max</sub> 值仅为 (15.67±6.14)ng/mL<sup>[8]</sup>。为了提高 Rg3 在体内的生物利用度,需要设计一种更加安全高效的 Rg3 制剂。

本课题研究的人参皂苷 Rg3 免疫纳米乳剂 (VRIN) 是采用聚乙二醇法制备,将 VEGFR-3 抗体与人参皂苷 Rg3 纳米乳结合的新制剂。研究证实人参皂苷免疫纳米 VRIN 组对胃癌 NUGC-4 细胞裸鼠移植瘤淋巴结转移有明显抑制作用,与生理盐水组比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );下调肿瘤组织中 VEGF-D 蛋白和 mRNA 水平的表达,与生理盐水组比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。因此人参皂苷免疫纳米 VRIN 可有效抑制胃癌淋巴结转移,调控淋巴管生长因子 VEGF-D

## 当代名家湿疹内治要点概述

李红兵<sup>1</sup> 徐 萍<sup>1,2</sup> 王晓红<sup>1</sup>

(1.南京中医药大学附属医院,江苏南京 210029; 2.南京中医药大学,江苏南京 210029)

**摘 要** 湿疹是临床皮肤科最常见的变态反应性疾病,发病率高。当代中医皮肤病名家诸如赵炳南、朱仁康、张志礼、禩国维等,通过典籍研读、临证实践,对湿疹的病因病机、辨证施治、选方用药等各方面不断地探索研究,逐渐形成了完备的证治体系,并对属外疡之患的湿疹内治上多有建树。

**关键词** 湿疹 内治 中医学术发掘 综述

**中图分类号** R275.982.3

**文献标识码** A

**文章编号** 1672-397X(2014)08-0078-04

湿疹即中医所谓“湿疮”或“湿疡”,是皮肤科最常见的由多种内外因素引起的具明显渗出倾向的皮肤炎症反应,皮疹呈多样性,易复发且发病率高。故赵炳南曰:“善治湿疹者,当可谓善治皮肤病之半。”明清以前,医家将湿疹归于“外疡”范畴,治疗多以外治为主,忽略内治。自明清以来,后世医家在总结前人经验的基础上,始而重视内因为湿疹发病基础,尤重内治方略,从整体观念出发进行辨证施治,通常经内服中药治疗外在疮疡之证,即内治法。当代名家,如两位现代中医皮肤病学创始人赵炳南、朱仁康临证总结了许多宝贵的有关湿疹的内治经验。笔者在文献复习基础上,归纳撷取赵氏及传人张志礼、陈凯,朱氏及传人李林、李辅仁、禩国维、艾儒棣、唐定书等中医皮肤病学名家关于湿疹内治精髓要领,包括整体观念的运用、中医证候规范化、辨证与辨病要点、内治要点、经典方剂应用及化裁,并结

合本人临床实践对名家们内治湿疹的研习思路作相应梳理分析如下。

### 1 当代名家对湿疹辨证要点

**1.1 整体观念的运用及强调内治** 赵炳南对湿疹的研习思路受《医宗金鉴·外科心法要诀》重视内治的影响,其中医整体观念的运用贯穿于湿疹证治的整个过程,他指出:“皮肤疮疡虽形于外,而实发于内。没有内乱,不得外患。皮肤病损的变化与阴阳之平衡、卫气营血之调和、脏腑经络之通畅息息相关。”<sup>[1]</sup>即皮损虽见于外,却是内部病变的反映。朱仁康则受《疡科心得集》中“外疡与内证异流同源”的影响,临床尤重内因,重视内治;李林更强调,在湿疹辨证过程中,也要有整体观,除了对皮损、瘙痒详细分辨外,不能忽略湿疹患者的其他全身症状和舌苔脉象,对诸多症状综合分析,辨证准确,论治就会效如桴鼓<sup>[2]</sup>。

蛋白和 mRNA 水平的表达,可能是 VRIN 防治胃癌淋巴转移的作用机制之一。

本研究中利用可稳定表达红色荧光的裸鼠原位移植胃癌模型对人参皂苷 Rg3 免疫纳米乳剂(VRIN)抗胃癌转移作用进行了探索研究,目前国内外尚未见相似报道。研究结果提示 VRIN 是一种非常有潜力的抗胃癌转移治疗药物,值得进一步深入研究。

### 5 参考文献

- [1] 邓靖宇.淋巴结转移在胃癌临床研究中的现状.中国肿瘤临床,2013,40(22):1370
- [2] Schimanski CC,Schlaegel F,Jordan M,et al. VEGF-D correlates with metastatic disease in gastric cancer patients undergoing surgery. World J Surg,2011,35(5):1010
- [3] Mohammed RA,Gree A,El-shikh S,et al. Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors - A,-C and -D in breast cancer and their relationship with angio - and lymphangiogenesis.Br J Cancer,2007,96(7):1092
- [4] Kim JY,Jeon TJ, Bae BN,et al. The prognostic significance of growth factors and growth factor receptors in gastric

adenocarcinoma. APMIS,2013,121(2):95

- [5] Shida A,Fujioka S,Ishibashi Y,et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in gastric carcinoma. World J Surg,2005,29(12):1600
- [6] 张翔,叶宝东,陈丹,等.人参皂苷 Rg3 抗肿瘤机制研究进展.中华中医药学刊,2013,31(2):328
- [7] Choi YJ,Lee HJ,Kang DW,et al.Ginsenoside Rg3 induces apoptosis in the U87MG human glioblastoma cell line through the MEK signaling pathway and reactive oxygen species.Oncol Rep,2013,30(3):1362
- [8] Wang H,Zou H,Kong L,et al. Determination of ginsenoside Rg3 in plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for pharmacokinetic study.J Chromatogr B Biomed Sci Appl,1999,731(2):403

**第一作者:**戴小军(1979-),男,医学硕士,主治医师,主要从事肿瘤中西医结合临床与基础研究工作。dxj2319@sinan.com

收稿日期:2014-03-02

编辑:吴 宁