

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2016.11.06

# ATRA、OMT 干预下大鼠肝癌变进程中 Axin、Gsk-3 $\beta$ 、Survivin 表达动态变化研究

崔琳<sup>1</sup>, 梁忆波<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>青岛市立医院 病理科, 山东 青岛 266071;

<sup>2</sup>青岛市立医院 结直肠外科, 山东 青岛 266071)

**摘要:**[目的]观察 ATRA 联合 OMT 干预方式在肝癌大鼠病变进程中对 Axin、Gsk-3 $\beta$ 、Survivin 因子的影响及该干预方式在肝癌疾病治疗中的临床价值。[方法]实验中采用 DENA 作为诱癌剂制备肝癌模型,选取的 120 只实验 SD 大鼠将其平均分为诱癌组、干预组及对照组,通过采取病理切片、免疫组化方式观察不同时期 3 组大鼠的 Axin、Gsk-3 $\beta$ 、Survivin 因子的表达情况。[结果]诱癌大鼠的 Axin 阳性细胞到后期 Axin 阳性细胞降低最低点,在诱癌进程中诱癌组大鼠的 Axin 阳性细胞面积、着色深度等均明显弱于干预组,Axin 阳性表达率差异性显著( $P < 0.05$ );诱癌大鼠的 Gsk-3 $\beta$  阳性细胞到 13~18 周降低最低点,诱癌组大鼠在癌变过程中 Gsk-3 $\beta$  阳性细胞均出现明显减少,部分细胞质逐步转移至细胞核,在中、后期诱癌组大鼠肝脏组织中的 Gsk-3 $\beta$  阳性细胞下降幅度明显大于干预组( $P < 0.05$ ),相同时期诱癌组的 Gsk-3 $\beta$  阳性细胞面积明显小于干预组;诱癌大鼠肝组织中的 Survivin 阳性细胞表达在后期达到最高值,在肝癌病变进程中干预组大鼠的 Survivin 阳性细胞却明显低于诱癌组( $P < 0.05$ )。[结论]通过给予肝癌大鼠实施 ATRA 联合 OMT 干预方式,干预组大鼠病变进程中对 Axin、Gsk-3 $\beta$ 、Survivin 因子表达呈一定规律性变化,肝癌病变进程明显滞后,为临床探讨肝癌发病进程及临床治疗提供参考。

**关键词:**肝癌; ATRA; OMT; Axin; Gsk-3 $\beta$ ; Survivin

**中图分类号:** R735.7

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1671-038X(2016)11-0842-06

## Intervention effect of ATRA and OMT on Axin, Gsk-3 $\beta$ and Survivin expression in rat liver cancer

CUI Lin<sup>1</sup>, LIANG Yi-bo<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pathology, Qingdao Municipal Hospital, Shandong 266071, China; <sup>2</sup>Department of Colorectal Surgery, Qingdao Municipal Hospital, Shandong 266071, China)

Corresponding author: LIANG Yi-bo, E-mail: liangyibo959@126.com

**Abstract:** [Objective] To observe the effect of ATRA combined with OMT intervention on Axin, Gsk-3 $\beta$ , Survivin and the clinical value of the intervention in the treatment of hepatocellular carcinoma. [Methods] The DENA was used as cancer inducing agent to prepare the model of hepatocellular carcinoma (HCC). One hundred and twenty Sprague Dawley rats were averagely assigned to induced cancer group, intervention group and control group. The expression of Axin, Gsk-3 $\beta$  and Survivin in the three groups was observed by pathology and immunohistochemistry in different periods. [Results] Axin positive cells in induced cancer rats decreased the most at late stage, and the expression of GSK-3 $\beta$  showed a similar trend. Survivin expression in induced cancer rats increased in later stage to reach the highest value. In the process of HCC lesions, survivin positive cells of intervention group was significantly lower than that in cancer induced group ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] Through implementation of ATRA combined with OMT intervention, there were certain changes in Axin, Gsk-3 $\beta$  and Survivin expression, and the disease process of hepatocellular carcinoma (HCC) obviously lags behind, which provides reference for clinical study of liver cancer and its clinical treatment.

收稿日期: 2016-03-31

作者简介: 崔琳, 女, 研究生, 研究方向: 肿瘤病理

通讯作者: 梁忆波, E-mail: liangyibo959@126.com

**Key words:** hepatocellular carcinoma; ATRA; OMT; Axin; Gsk-3 beta; Survivin

肝癌作为肿瘤疾病中常见的恶性肿瘤之一,其具有发病率高、预后效果差等特征,对人类的生命健康带来极大的风险。据相关调查数据<sup>[1]</sup>显示,在原发性肝癌疾病中 90% 以上均为肝细胞肝癌(其中肝内胆管细胞癌占 5.6%),而继发性肝癌主要是因全身多种器官恶性肿瘤转移、侵犯而致,常见于胆道、胃、胰腺、结直肠等消化器官的恶性癌症转移而致,因此临床发病率明显高于原发性肝癌。目前,医学界对于肝癌的发病机制尚未形成共识,临床治疗则主要通过药物实现抑制癌细胞增殖、促进癌细胞凋亡的治疗目的。全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)是一种由维生素 A 经人体吸收后转化为视黄醛,再经进一步转化后所形成的一种维甲酸。相关研究文献证实<sup>[2]</sup>, ATRA 可有效调节神经胶质瘤细胞中的 cyclin E 和 caspase-3 基因、蛋白水平,且可有效抑制肿瘤细胞生长,且随着药物干预时间的延长其抑制作用更强。氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)是苦参中的主要活性成分,通过对 OMT 进行临床研究发现,其具有抗炎、强心、抗肿瘤、抗病毒及镇痛等功效,且在抗肿瘤方面具有强大的药理活性,其可有效抑制肿瘤细胞增殖来实现控制肿瘤生长目的<sup>[3]</sup>。在本文研究中,笔者使用二乙基亚硝胺制作肝癌大鼠模型,尝试采用 ATRA 联合 OMT 干预方式治疗肝癌,通过观察不同时期的肝癌大鼠进行免疫组化检测 Wnt 信号通路相关因子 Axin、Gsk-3 $\beta$ 、Survivin 动态变化情况,旨在探讨肝癌的发病机制及 ATRA 联合 OMT 干预方式对肝癌治疗的临床价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物来源

本课题实验中使用的 120 只 SD 大鼠均来自于动物医学实验中心,所有实验大鼠均为雄性,体重在 175~230 g;所有实验 SD 大鼠均在实验前 7 d 进入实验室进行适应性生活,给予正常喂养,饲养环境室温保持在(23 $\pm$ 6) $^{\circ}$ C,湿度保持在(55 $\pm$ 8)% ,经常规喂养 7 d 无异常后参与本文实验。根据研究预案将 SD 大鼠分为诱癌组、干预组及对照组(各 30 例)。

### 1.2 实验药物来源及主要实验仪器

1.2.1 实验药物来源 全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)来自于 Sigma-Aldrich 公司,药物纯度达到 99%;苦参素(oxymatrine, OMT)国药准字 H20044669,规格:2 ml:0.2 g。

二乙基亚硝胺(n-nitroso-diethylamin, DENA)纯度为 99.9%,实验前采集 4 ml 二乙基亚硝胺混

合 100 ml 生理盐水,经均匀荡摇后配制成浓度为 4 mg/mL 的二乙基亚硝胺溶液备用。

1.2.2 主要实验仪器 本实验主要试剂和仪器见表 1。

表 1 本实验主要试剂和仪器

试剂名称	仪器名称
苏木色精	高速高速冷冻离心机
中分子量预染蛋白 Marker	双垂直电泳槽
小鼠 sABC 超敏二步法免疫组化检测试剂	可见分光光度计、电子天平、精密 PH 计
醇溶性伊红	石蜡切片机
survivin 多克隆抗体	荧光显微镜
GSK-3 $\beta$ 多克隆抗体	低速离心机
axin 多克隆抗体	电泳仪
$\beta$ -actin 单克隆抗体	-80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱
氮蓝四唑(NBT)	恒温振荡培养箱
5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸(BCIP)	
DAB 检测试剂盒	
四甲基乙二胺(TEMED)	
碱性磷酸酶标记山羊抗兔 IgG	
辣根酶标记山羊抗兔 IgG	
低分子量预染蛋白 Marker、山羊血清	

### 1.3 建立动物模型

根据预案将 120 只 SD 大鼠分为诱癌组、干预组及对照组(各 30 例),3 组大鼠在每次灌胃前进行精确称重,根据体重确定灌胃药物剂量。

诱癌组:本组大鼠给予灌胃 70 mg/kg. bw 的 DENA,一周/次,每只大鼠连续灌胃 18 周后进行正常饲养。对照组则给予灌胃等同剂量的生理盐水。

干预组(ATRA 联合 OMT):灌胃前提取 2 mg/kg. bw ATRA+200 mg/kg. bw OMT 经均匀混合后,灌胃 2 d/次,每只大鼠连续灌胃 18 周;DENNA 灌胃剂量与诱癌组一致;将 ATRA 粉剂溶于植物油中(浓度保持在 2 mg/ml,以 2 mg/kg 维甲酸剂量给药,连续灌胃 18 周后进行正常饲养。对照组与诱癌组大鼠给予灌入相等剂量的植物油、生理盐水。

### 1.4 实验取材

3 组大鼠自灌胃之日起,在 2、6、10、14、18 周分别随机处死大鼠取材。3 组大鼠分别采取脱颈处死

方式迅速取肝脏,分别取肝脏大、中、小叶分开保存,并将其分为两份,其中一份放在 Bouin's 液固定,将其作为 HE 染色剂、鼠疫组化材料备用,另外一份作为鼠疫印迹材料放在液氮中保存备用。

### 1.5 组织病理分级

将病理组织载玻片放在重铬酸钾酸液中浸泡约 24 h,之后使用流水冲洗后再用蒸馏水进行清洗、烘干,再涂抹诺钒明胶后烘干备用。

**1.5.1 石蜡切片制作** 首先将 Bouin's 液固定的实验大鼠肝组织切小块(0.3 cm×0.5 cm×0.5 cm),将其放在不同浓度的乙醇中逐级(70%→80%→90%→95%→100%)脱水处理。采取无水乙醇、二甲苯(不同纯度)进行透明处理,采用石蜡二甲苯、石蜡(两次处理)进行浸蜡,然后在将肝组织方在入蜡的小纸包中冷却后切片,将蜡块修剪至合适大小(切片厚度 4~6 μm),将其黏在切片机上;将准备好的肝组织切片蜡带方在恒温水浴锅中,将蜡带放好后使用诺钒明胶处理载玻片,再将载玻片放在烘箱中,用于免疫组化切片放在 50℃ 温度中烘烤 6 h 上。

**1.5.2 苏木素-伊红染色处理** 采用二甲苯 I、二甲苯 II 进行 15 min 脱蜡处理,之后使用 100%乙醇 I→100%乙醇 II→95%乙醇→90%乙醇→80%乙醇→70%乙醇→蒸馏水;采取苏木素进行染色处理(2~5 min),之后使用 1%盐酸酒精进行分色 2~6 s,直至肝组织颜色呈棕红色,再使用自来水进行冲洗蓝化,待肝组织完全变为淡蓝色为止;然后依次采用蒸馏水(5 min)→70%乙醇(3 min)→80%乙醇(3 min)→90%乙醇(3 min)→95%乙醇 I(3 min)→乙醇伊红染液(1-3 min)→95%乙醇 II(3 min)→100%乙醇 I(3 min)→100%乙醇 II(3 min)进行脱水、复染;再使用乙醇二甲苯进行透明化处理。最后使用中性树脂封片并做好相关标记、烘干,将制作好的 HE 染色切片交由专业人员进行病理学分期处理。

**1.5.3 免疫组化处理** 将提前制作好的蜡块进行脱蜡处理,采取二甲苯 I→二甲苯 II 分别处理 15 min,再依次采用 100%乙醇 I(3 min)→100%乙醇 II(3 min)→95%乙醇 II(3 min)→90%乙醇(3 min)→80%乙醇(3 min)→70%乙醇(3 min)→蒸馏水(5 min)进行复水处理。将载玻片放提前配制好的抗原修复液中,目的在于充分暴露组织切片中的抗原决定簇表位,之后将其水浴锅(温度保持在 90℃ 以上)中修复 20 min,修复后行自然冷却;将肝组织进行封闭内源性过氧化物酶、山羊血清封闭处理;之后采取进行一抗孵育、二抗孵育处理,分别采

取免疫组化采取兔抗大鼠 Axin、Gsk-3β、Survivin 一抗,加入 PBS 进行 100 倍稀释后放入湿盒中孵育过夜,再使用 PBS 冲洗三次(3 min),二抗孵育采用辣根酶标记山羊抗兔 Ig G,使用 PBS 稀 250 倍后放入放入湿盒中孵育过夜,再使用 PBS 冲洗三次(3 min)。上述操作结束后进行 DAB 显色,将 DAB 显色试剂盒中的 A、B、C 液分别吸取一滴加入到 1 ml 的蒸馏水中,均匀摇动后 30 min 内在避光环境中使用,当显色适宜后去掉显色液,使用蒸馏水进行冲洗;使用苏木素染液进行复染 3 min 左右,之后使用自来水冲洗多余染液,采取 1%盐酸酒精进行分色处理 5 s,再使用自来水冲洗蓝化处理,直至棕红色肝组织变为淡蓝色为止;最后再进行脱水、透明、封片处理(处理方法与 1.5.2 相同)。

在每个病理时期选取三只大鼠肝组织进行试验,选取 5 张不同肝脏组织切片,每张切片选取 5 个不同视角进行阳性细胞计数,并采取统计学方法进行处理。

### 1.6 统计学处理

本文每组 SD 实验鼠的临床研究数据均采用 SPSS 17.0 软件进行处理分析,检测指标数据采用  $\bar{x} \pm s$  的形式表示并采用  $\chi^2$  检验,采用  $P < 0.05$  表示组间指标比较具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 实验大鼠肝脏表观结果分析

诱癌组、干预组患者在前期(1-4 周)肝脏组织外观无明显变化;中期(5-12 周)2 组大鼠肝脏组织表面出现黄色斑点,肝脏边缘钝化,颜色暗红;后期(13-18 周)2 组大鼠的肝脏组织颜色逐渐变黄,呈暗黄色,肝脏质地变硬,边缘呈钝化且表面粗糙,其中诱癌组大鼠检出小血管瘤,但是干预组未检出小血管瘤或偶见血管瘤。

### 2.2 组间 Axin 免疫组化结果分析

随着诱癌进程逐步推进,诱癌大鼠的 Axin 阳性细胞出现明显减少,到后期 Axin 阳性细胞降低最低点。从第 2 周开始,诱癌组大鼠的 Axin 阳性细胞与对照组之间呈现出明显差异性( $P < 0.01$ );而从中期至后期,诱癌组大鼠的 Axin 阳性细胞与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );在诱癌进程中,干预组、诱癌组大鼠的 Axin 阳性细胞数量均呈明显下降趋势,其中诱癌组大鼠的 Axin 阳性细胞面积、着色深度等均明显弱于干预组,在中、后期进程中 2 组大鼠的 Axin 阳性表达率差异性显著,前期无明显差异性。详见表 2。

表 2 3 组大鼠实验进程中 Axin 阳性率表达比较

时期	诱癌组	干预组	对照组
前期(1-4 周)	74.2 $\pm$ 5.7	72.5 $\pm$ 6.4	75.4 $\pm$ 7.5
中期(5-12 周)	53.6 $\pm$ 9.2 <sup>2)</sup>	61.5 $\pm$ 3.3 <sup>1)</sup>	71.3 $\pm$ 1.5
后期(13-18 周)	28.7 $\pm$ 9.6 <sup>2)</sup>	32.5 $\pm$ 5.7 <sup>1)</sup>	71.7 $\pm$ 5.8

与诱癌组比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与对照组比较,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

### 2.3 组间 Gsk-3 $\beta$ 免疫组化结果分析

从实验结果中可以看出,诱癌大鼠的 Gsk-3 $\beta$  阳性细胞明显减少,直到 13-18 周降低最低点。从中期到后期,诱癌组大鼠的 Gsk-3 $\beta$  阳性细胞与对照组大鼠之间均存在明显差异性;而对照组的 Gsk-3 $\beta$  阳性细胞分布呈灶性分布,主要位于胆管周围,细胞核、细胞质均有明显表达;诱癌组大鼠在癌变过程中 Gsk-3 $\beta$  阳性细胞均出现明显减少,而阳性表达则有

细胞质逐步转移至细胞核。诱癌组、干预组大鼠肝脏组织中的 Gsk-3 $\beta$  阳性细胞均呈下降趋势,其中诱癌组下降水平明显低于干预组 ( $P < 0.05$ ),在中期至后期中 2 组大鼠的 Gsk-3 $\beta$  阳性细胞存在明显差异性,在相同时期诱癌组的 Gsk-3 $\beta$  阳性细胞面积明显小于干预组 ( $P < 0.05$ ),着色也相对较弱。详见表 3。

表 3 3 组大鼠实验进程中 Gsk-3 $\beta$  阳性率表达比较

时期	诱癌组	干预组	对照组
前期(1-4 周)	62.8 $\pm$ 7.9	62.1 $\pm$ 5.9	66.8 $\pm$ 5.9
中期(5-12 周)	50.1 $\pm$ 11.4 <sup>2)</sup>	56.3 $\pm$ 2.2 <sup>1)</sup>	64.4 $\pm$ 9.4
后期(13-18 周)	28.3 $\pm$ 5.0 <sup>2)</sup>	34.9 $\pm$ 2.5 <sup>1)</sup>	63.1 $\pm$ 4.6

与诱癌组比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与对照组比较,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

### 2.4 组间 Survivin 免疫组化结果分析

在诱癌进程中,诱癌大鼠肝组织中的 Survivin 阳性细胞表达成明显增多趋势,在后期达到最高值。对照组大鼠基本上没有 Survivin 阳性细胞表达,而从中期开始至后期,诱癌组大鼠的 Survivin 阳性细胞比例与对照组呈明显差异性,Survivin 阳性细胞

表达成分散分布,在细胞质、细胞核中均有明显表达;而干预组、诱癌组大鼠的 Survivin 阳性细胞表达成明显上升趋势,但干预组大鼠的 Survivin 阳性细胞却明显低于诱癌组,组间比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),其中在后期差异显著,前、中期干预组则低于诱癌组 ( $P < 0.05$ )。详见表 4。

表 4 3 组大鼠实验进程中 Survivin 阳性率表达比较

时期	Survivin 阳性率/%		
	诱癌组	干预组	对照组
前期(1-4 周)	5.4 $\pm$ 4.1	4.7 $\pm$ 2.6	4.3 $\pm$ 3.9
中期(5-12 周)	16.6 $\pm$ 3.9 <sup>2)</sup>	15.4 $\pm$ 3.2 <sup>1)</sup>	4.7 $\pm$ 2.4
后期(13-18 周)	53.9 $\pm$ 9.8 <sup>2)</sup>	46.3 $\pm$ 4.1 <sup>1)</sup>	7.5 $\pm$ 2.5

与诱癌组比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与对照组比较,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

## 3 讨论

根据世界卫生组织发布的全球肿瘤疾病统计分析报告显示:目前,在全球肿瘤疾病发病中肝癌发病率居于第五位,统计数据显示每年全球肝癌新增人数大概在 61.9 万人,占有新增肿瘤疾病发病总数的 5.8%,每年因肝癌死亡病例数为 60.6 万人,仅

次于肺癌、胃癌。据《2014 中国卫生统计年鉴》报道,我国临床肝癌发病人数已经超过了胃癌,在消化道恶性肿瘤疾病中居于首位,年发病总数占到全球肝癌发病总数的 23%,而肝癌死亡人数则达到全球的 22%。目前,国内外学者对于肝癌的病因及准确分子机制尚未形成统一观点,但是大部分学者认为

可能与遗传、肝炎病毒、饮酒、激素、水源污染、等相关<sup>[4-5]</sup>。

近年来,大量临床研究文献证实<sup>[6-7]</sup>: ATRA、OMT 均具有良好的阻碍细胞增殖、诱导细胞凋亡等功效,尤其是在肝癌疾病治疗中可起到良好的抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡功效。

ATRA 药理学原理证实其具有抑制细胞增殖、促进细胞凋亡等作用。相关研究文献<sup>[8]</sup>显示: ATRA 对肝癌细胞 SMMC-7721 增殖、端粒酶活性产生明显的抑制作用,并有效激活 Caspase-3 表达。Ahmed 等<sup>[9]</sup>在研究中发现对急性白血病患者细胞中加入 ATRA,结果显示细胞中的凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达出现显著下降且细胞凋亡数量明显增加;另外发现 Bax/Bcl-2 比值高低与肿瘤细胞凋亡存在密切关联性,当比值偏高时则可诱导细胞凋亡,当比值偏低则可抑制细胞凋亡<sup>[10]</sup>。

OMT 是提炼于一种传统中药材——苦参(*sophoraflavescens* ait)。苦参在传统中药中应用比较广泛,具有良好的抗敏消炎、清热祛湿等功效,目前此类中药材被用于心律失常、病毒性肝炎疾病治疗<sup>[11]</sup>。长期临床研究<sup>[12]</sup>发现,OMT 对细胞增殖可产生明显抑制作用,同时还可诱导细胞凋亡、调控细胞周期等作用。相关学者<sup>[13]</sup>在研究中使用不同浓度 OMT 用于培养人肝癌细胞株—Bel-7404,观察中发现 OMT 可有效抑制肝癌细胞增殖,在肝癌细胞中呈现出明显的时间、药物浓度依赖性,这也证实了 OMT 可降低癌细胞凋亡抑制蛋白(如:Survivin、Livin)水平并促进癌细胞凋亡<sup>[14]</sup>。

从本文临床研究结果中可见,在整个诱癌进程中 ATRA 联合 OMT 干预组大鼠的肝组织病理切片、免疫组化结果都明显优于诱癌组,观察发现干预组大鼠的肝癌病变进程明显滞后于诱癌组,其中 Gsk-3 $\beta$ 、Axin 值比诱癌组大鼠高,而 Survivin 阳性率则低于诱癌组大鼠,这可能与 ATRA、OMT 抑制 Wnt 信号通路分子以下游靶基因无法表达相关;另外,ATRA、OMT 具有抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡及调控细胞周期等作用,其可以全面调节细胞中多种分子参与反应,从而实现抑制肿瘤持续生长目的,本文研究中也发现干预组大鼠的癌变病情进程明显滞后于诱癌组。除此之外,ATRA、OMT 的抑制肝纤维化、抗氧化作用还可在一定程度上缓解肝细胞损伤进程,进一步延缓肝癌病变进程<sup>[15]</sup>。

综上所述,大鼠的肝癌病变进程中 Axin、Gsk-3 $\beta$  水平逐渐下降而 Survivin 表达上升,研究中采用 ATRA 联合 OMT 干预方式,在一定程度上促进 Axin、

Gsk-3 $\beta$ 、Survivin 的表达均与诱癌组出现明显差异性,肝癌病变进程明显滞后,且在干预作用下大鼠的 Axin、Gsk-3 $\beta$ 、Survivin 的表达变化均呈规律性变化,本研究结论可为进一步深入探讨肝癌发病机制及研发新型肝癌治疗靶点提供相关参考。

#### 参考文献

- [1] 闵亮,祁宏.不同活血方剂对高转移人肝癌裸鼠原位移植瘤生长和转移及肿瘤血管生成的影响[J].中国中西医结合消化杂志,2014,22(3):113-117.
- [2] 高新生,肖绍树,贺降福,等.全反式维甲酸联合三氧化二砷行肝动脉插管化疗栓塞治疗原发性肝癌的临床研究[J].中国中西医结合消化杂志,2009,17(6):361-363.
- [3] 韩海啸,李军祥,江义墩,等.氧化苦参碱对肝星状细胞增殖抑制和促凋亡作用的影响[J].中国中西医结合消化杂志,2009,17(1):41-43.
- [4] ITO H, TANAKA K, HAGIWARA K, et al. Transcriptional regulation of neutral sphingomyelinase 2 in all-trans retinoic acid-treated human breast cancer cell line, MCF-7[J]. J Biochem, 2012, 151:599-610.
- [5] ALI FATTAHI, MOHAMMAD-ALI GOLOZAR, JALEH VARSHOSAZ, et al. Preparation and characterization of micelles of oligomeric chitosan linked to all-trans retinoic acid [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87:1176-1184.
- [6] TIWARI M D, MEHRA S, JADHAV S, et al. All-trans retinoic acid loaded block copolymer nanoparticles efficiently induce cellular differentiation in HL-60 cells[J]. Eur J Pharm Sci, 2011, 44:643-652.
- [7] FU Q, FANG Q, FENG B, et al. Matrine-imprinted monolithic stationary phase for extraction and purification of matrine from *Sophorae flavescens* Ait[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879:894-900.
- [8] 骆霞岗,苗毅.全反式维甲酸对人胰腺癌细胞生长及 Survivin 基因表达的影响[J].南京医科大学学报:自然科学版,2006,26(6):389-392.
- [9] AHMED N, LAVERICK L, SAMMONS J, et al. Effect of all-trans retinoic acid on chemotherapy induced apoptosis and down-regulation of Bcl-2 in human myeloid leukaemia CD34 positive cells[J]. Leukemia Res, 1999, 23:741-749.
- [10] 马明霞.全反式维甲酸联合苦参素干预大鼠肝癌变进程中 Annexin A2 和 Nm23-H1 的动态变化[D].河南师范大学,2014.
- [11] 兰晓青.氧化苦参碱联合胸腺肽治疗慢性乙型肝炎 50 例[J].中国中西医结合消化杂志,2002,10(1):23-23

对照组之间有差异。因此,我们最终决定以基因组中整合了 CMET5-1 的细胞进行后续基因功能的研究。

本研究把转染后转染前食管癌细胞株 CE81T-4 植入裸鼠体内,每只裸鼠接种  $1 \times 10^6$  个肿瘤细胞, Yanagihara 等作者报道  $1 \times 10^6 \sim 10^7$  个细胞诱导成瘤率高的结果相符<sup>[9]</sup>。5 周后移植肿瘤直径达 0.9 cm 左右。皮下种植的主要问题多数皮下种植的肿瘤会被假包膜所包绕,成为机体的外来移植物,导致局部侵袭和远端转移发病率均很低<sup>[10]</sup>,因而肿瘤移植效果在一定程度上受到影响。

在裸鼠移植瘤的成长过程中,测量肿瘤体积,制作裸鼠皮下移植瘤生长曲线,CE81T-4 组的平均肿瘤体积明显高于 CMET5-1 组,然后取裸鼠体内肿瘤结节,提取蛋白,用 Western blotting 检验证实体内种植肿瘤 c-Met 转染前后蛋白表达量。为更深入研究 c-Met 基因在食管鳞癌中的作用奠定了基础。

综上所述,通过慢病毒介导 RNAi 干扰可有效降低高侵袭性食管鳞癌 CE81T-4 细胞 c-Met 的表达,这种 c-Met 下调能够抑制细胞侵袭和成瘤能力,就此推测,c-Met 可能成为未来抑制食管鳞癌侵袭和转移的潜在靶点,这也为临床上对食管癌进行基因治疗提供了理论依据。

#### 参考文献

- [1] 陈碧华,谢倩,刘康达,等. C-Met 信号阻断对肝癌细胞生长和运动能力的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11(8):487-489.
- [2] GOYAL L, MUZUMDAR M D, ZHU A X, et al. Targeting the HGF/c-MET pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19:2310-2318.
- [3] YOUNGJOO KWON, BRYAN D SMITH, ZHOU Y, et al. Effective inhibition of c-MET-mediated Signaling, Growth, and Migration of ovarian cancer cells is influenced by the ovarian tissue microenvironment oncogene[J]. 2015, 34:144-153.
- [4] STROHMEYER D, STRAUSS F, ROSSING C, et al. Expression of bFGF, VEGF and c-met and their correlation with microvesse density and progression in prostate carcinoma[J]. Anticancer Res, 2004, 24:1797-1804.
- [5] UEHARA Y, MINOWA O, MORI C, et al. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor[J]. Nature, 1995, 373:702-705.
- [6] HUH C G, FACTOR V M, SANCHEZ A, et al. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101:4477-4482.
- [7] NAKAMURA T, MIZUNO S, MATSUMOTO K, et al. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF[J]. J Clin Invest, 2000, 106:1511-1519.
- [8] EDER J P, VANDEWOUDE G F, BOERNER S A, et al. Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15:2207-2214.
- [9] YANAGIHARA K, TAKIGAHIRA M, TANAKA H, et al. Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human esophageal stomach cancer[J]. Cancer Sci, 2005, 96:323-332.
- [10] 胡翠梨,张志强,温浩,等. 不同转移潜能食管癌细胞株裸鼠模型的建立[J]. 胃肠病学, 2013, 18(9):548-551.
- [12] 高金县. 苦参碱对大鼠肝癌前病变的阻断作用及对 Wnt 信号转导通路的调控作用[D]. 石家庄:河北医科大学, 2008.
- [13] 袁二燕,张洁,吕宗舜. Survivin 在消化系统肿瘤的研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2009, 18(5):469-472.
- [14] 苏建家,冯震博,曹骥,等. Survivin 与 p21 waf-1 在大鼠肝细胞癌变过程中的动态表达及其相关性的研究[J]. 广西医科大学学报, 2009, 26(3):335-338.
- [15] VALVEZAN A J, ZHANG F, DIEHL J A, et al. Adenomatous polyposis coil regulates multiple signaling pathways by enhancing glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) activity[J]. J Biol Chem, 2012, 287:3823-3832.

(上接第 846 页)