

人参皂苷 Rg₃ 对胰腺癌裸鼠皮下移植瘤新生血管的影响

郭敬强¹, 林胜璋^{2*}

1. 温州医科大学附属五院, 丽水市中心医院, 浙江 丽水 323000

2. 浙江树人大学树兰国际医学院附属树兰杭州医院, 浙江 杭州 310004

摘要: 目的 探究人参皂苷 Rg₃ 对胰腺癌裸鼠皮下移植瘤新生血管形成的影响。方法 裸鼠背侧近右后肢处 sc 胰腺癌 SW-1900 细胞建立胰腺癌皮下移植瘤模型, 将荷瘤裸鼠随机分为对照组及人参皂苷 Rg₃ 低、高剂量 (10、20 mg/kg) 组。给药组 ip 人参皂苷 Rg₃, 对照组 ip 0.9% 氯化钠溶液, 每 2 天 1 次, 连续 4 周。给药结束 3 d 后裸鼠脱颈椎处死, 取瘤组织。采用免疫组化法检测各组裸鼠瘤组织中内皮细胞标记物 CD31 表达, 计算微血管密度; 采用 qRT-PCR 和 Western blotting 法检测各组裸鼠瘤组织中血管内皮钙黏素 (vascular endothelial cadherin, VE-cadherin)、络氨酸激酶受体 A2 (erythropoietin-producing hepatocellular receptor A2, EphA2) mRNA 和蛋白表达水平。结果 与对照组比较, 人参皂苷 Rg₃ 组胰腺癌裸鼠皮下移植瘤质量显著降低 ($P < 0.05$), 微血管密度显著降低 ($P < 0.05$), VE-cadherin、EphA2 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)。结论 人参皂苷 Rg₃ 可能通过调控 VE-cadherin、EphA2 mRNA 和蛋白表达, 从而抑制胰腺癌裸鼠皮下移植瘤新生血管形成。

关键词: 人参皂苷 Rg₃; 胰腺癌; 新生血管; 血管内皮钙黏素; 络氨酸激酶受体 A2

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)06-1668-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.06.015

Effect of ginsenoside Rg₃ on neovascularization of subcutaneous transplantation tumor of pancreatic cancer in nude mice

GUO Jing-qiang¹, LIN Sheng-zhang²

1. Fifth Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Lishui Central Hospital, Lishui 323000, China

2. Shulan Hangzhou Hospital Affiliated to Zhejiang Shuren University, Shulan International Medical College, Hangzhou 310004, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of ginsenoside Rg₃ on the angiogenesis of subcutaneously transplanted tumor of pancreatic cancer in nude mice. **Methods** Back of nude mice near the right hind limb were sc pancreatic cancer SW-1900 cells to establish a pancreatic cancer subcutaneous transplantation tumor model. Tumor-bearing nude mice were randomly divided into control group, low- and high-dose ginsenoside Rg₃ (10, 20 mg/kg) groups. Rats in administration group were ip ginsenoside Rg₃ and rats in control group were ip 0.9% sodium chloride solution, once every 2 d for four consecutive weeks. Three days after administration, nude mice were sacrificed by cervical vertebrae, and tumor tissues were collected. Immunohistochemical method was used to detect the expression of endothelial cell marker CD31 in the tumor tissues of nude mice, and the microvessel density was calculated. qRT-PCR and Western blotting were used to detect vascular endothelial cadherin (VE-cadherin), erythropoietin-producing hepatocellular receptor A2 (EphA2) mRNA and protein expression levels. **Results** Compared with the control group, the weight of subcutaneously transplanted pancreatic cancer nude mice in ginsenoside Rg₃ group were significantly reduced ($P < 0.05$); Microvessel density were significantly reduced ($P < 0.05$), mRNA and protein expression levels of VE-cadherin and EphA2 were significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** Ginsenoside Rg₃ can regulate the expression of VE-cadherin and EphA2 mRNA and protein expression, thereby inhibiting the angiogenesis of subcutaneously transplanted pancreatic cancer in nude mice.

Key words: ginsenoside Rg₃; pancreatic cancer; angiogenesis; vascular endothelial cadherin; erythropoietin-producing hepatocellular receptor A2

收稿日期: 2020-10-25

作者简介: 郭敬强, 男, 硕士研究生, 主治医师, 从事肝胆胰临床研究。

*通信作者: 林胜璋, 男, 医学博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 从事肝胆胰肿瘤治疗基础与临床研究。E-mail: wzfz1sz@163.com

胰腺癌是临床常见的消化系统恶性肿瘤,发病率高位居恶性肿瘤第 7 位,病死率位居第 6 位^[1]。胰腺癌恶性程度高,由于其生物学特性,患者早期无特异性临床症状,病情进展迅速,部分患者就诊时已发展为晚期阶段,临床治疗效果不佳^[1-2]。目前临床以手术、靶向、免疫等治疗及化疗为主^[3]。研究发现,肿瘤新生血管的形成与机体血液循环有关,可促进肿瘤的生长、转移与侵袭^[4-5]。因此,基于肿瘤新生血管的研究是开发抗肿瘤药物的新方向。人参与具有显著的抗肿瘤作用,人参皂苷是其主要活性成分。人参皂苷 Rg₃ 具有抑制新生血管形成的作用^[6-8],临床常将以人参皂苷 Rg₃ 为主要活性成分的参一胶囊用于多种肿瘤的辅助治疗。本研究通过建立胰腺癌裸鼠皮下移植瘤模型,考察人参皂苷 Rg₃ 对裸鼠肿瘤新生血管的影响,并探讨人参皂苷 Rg₃ 抑制胰腺癌新生血管形成的作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 BALB/C 裸鼠,4~6 周龄,体质量 18~22 g,购自中国科学院上海实验动物中心,合格证号 SYXK(浙)2015-0009。动物饲养于温州医科大学 SPF 级屏障系统的洁净层流架内,温度(25±1)℃、相对湿度 40%~60%,自由进食饮水。动物实验经温州医科大学实验动物中心伦理委员会批准(批准号 wydw2019-0012)。

1.2 细胞

胰腺癌 SW-1990 细胞株购自美国 ATCC。

1.3 药品与试剂

人参皂苷 Rg₃ (质量分数≥98%) 购自上海博蕴生物科技有限公司;血管内皮钙黏素(vascular endothelial cadherin, VE-cadherin) 抗体购自美国 abgent 公司;络氨酸激酶受体 A2(erythropoietin-producing hepatocellular receptor A2, EphA2) 抗体购自美国 R&D 公司;CD31 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;山羊抗鼠生物素标记的抗体购自美国 Earthox 公司;DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;荧光定量 PCR 试剂盒购自瑞士 Roche 公司;ECL 化学发光法检测试剂盒购自美国 Thermo 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 Pierce 公司;免疫组化二步法试剂盒、DAB 显色剂购自北京中杉金桥生物有限公司。

1.4 仪器

Elx800 型全自动酶标仪(奥地利 KIALAB 公司);电泳仪、电泳槽(美国 Bio-Rad 公司);3111

型 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司);TS100 倒置显微镜、E4500 型照相机(日本 Nikon 公司);Image-proplus 6.0 免疫组化彩色图像(美国 Media Cybernetics 公司);GS-15R 低温高速离心机(美国 Beckman 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

SW-1990 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 的培养箱中培养,细胞生长至 70%~80% 时进行传代。

2.2 动物模型建立、分组与给药

取处于对数生长期的 SW-1990 细胞,用 DMEM 培养基调整细胞密度为 3×10⁶/L,于裸鼠背侧近右后肢处 sc 100 μL 细胞悬浮液,1 周后,按照文献方法^[9],将荷瘤裸鼠随机分为对照组及人参皂苷 Rg₃ 低、高剂量(10、20 mg/kg)组,每组 8 只。人参皂苷 Rg₃ 溶于生理盐水配制成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液,给药组 ip 人参皂苷 Rg₃,对照组 ip 0.9%氯化钠溶液,每 2 天 1 次,连续 4 周。给药结束 3 d 后,裸鼠脱颈椎处死,取瘤组织,称定瘤质量并计算人参皂苷 Rg₃ 的抑瘤率。

抑瘤率=(对照组平均瘤质量-给药组平均瘤质量)/对照组平均瘤质量

2.3 人参皂苷 Rg₃ 对荷瘤裸鼠皮下移植瘤微血管密度的影响

各组瘤组织于 4%多聚甲醛中固定 48 h,纵行切取瘤组织,于自动组织处理机处理并切片,采用免疫组化法检测血管标志物 CD31 表达情况。根据 Weidner 计数方法,镜下观察微血管呈棕色的单个或成簇细胞,在 100×光镜下寻找病灶微血管密度高的区域,在 400×光镜下随机计算 5 个视野下的微血管数,计算其平均值,作为肿瘤微血管密度。

2.4 人参皂苷 Rg₃ 对荷瘤裸鼠皮下移植瘤 VE-cadherin 和 EphA2 mRNA 表达的影响

按照 Trizol 试剂盒说明书提取瘤组织总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物序列:VE-cadherin 上游引物 5'-AAGCGTGAGTCGCAA-3'、下游引物 5'-TCTC-CAGGTTTTTCGC-3';EphA2 上游引物 5'-GAGGGC-GTCATCTCCAAATA-3'、下游引物 5'-TCAGACAC-CTTGACAGACCAG-3';GAPDH 上游引物 5'-GAGT-CAACGGATTGTCGT-3'、下游引物 5'-TTGATT-TTGAGGGATCTCG-3'。

2.5 人参皂苷 Rg₃ 对荷瘤裸鼠皮下移植瘤 VE-cadherin 和 EphA2 蛋白表达的影响

取 100 mg 瘤组织, 加入 0.8 mL 裂解液研磨, 于冰上孵育 30 min, 40 °C、12 000 r/min 离心 5 min; 超声裂解 3 次, 40 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 取上清, 采用 BCA 定量试剂盒测定蛋白质量浓度。蛋白样本经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 分别加入 VE-cadherin、EphA2 抗体, 于 4 °C 孵育过夜; TBS 洗涤 3 次, 加入山羊抗鼠生物素标记的抗体, 室温孵育 2 h; TBS 洗涤 3 次, 加入 ECL 化学发光液曝光显像, 采用 Alpha Ease FC 4.0 软件分析结果。

2.6 统计学分析

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 软件统计分析, 多组比较采用方差分析, 两两比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 人参皂苷 Rg₃ 对荷瘤裸鼠皮下移植瘤的影响

如表 1 所示, 与对照组比较, 人参皂苷 Rg₃ 组荷瘤裸鼠皮下移植瘤质量显著降低 ($P < 0.05$), 呈剂量相关性。

3.2 人参皂苷 Rg₃ 对荷瘤裸鼠皮下移植瘤微血管密度的影响

如图 1 和表 2 所示, 与对照组比较, 人参皂苷 Rg₃ 组皮下移植瘤微血管密度显著降低 ($P < 0.05$), 呈剂量相关性。

表 1 人参皂苷 Rg₃ 对荷瘤裸鼠皮下移植瘤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of ginsenoside Rg₃ on subcutaneous transplantation tumor in nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	瘤质量/g	抑瘤率/%
对照	—	1.51 ± 0.34	—
人参皂苷 Rg ₃	10	0.74 ± 0.15*	41.8
	20	0.58 ± 0.11*	53.3

与对照组比较: * $P < 0.05$, 下表同

* $P < 0.05$ vs control group, same as below tables

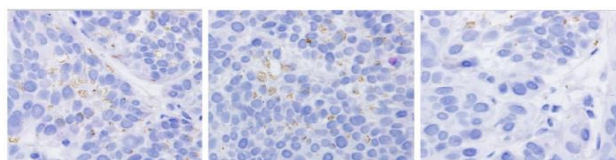


图 1 人参皂苷 Rg₃ 对胰腺癌裸鼠皮下移植瘤微血管密度的影响 (×400)

Fig. 1 Effect of ginsenoside Rg₃ on microvessel density of subcutaneous transplantation tumor in nude mice with pancreatic cancer (× 400)

表 2 人参皂苷 Rg₃ 对胰腺癌裸鼠皮下移植瘤微血管密度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of ginsenoside Rg₃ on microvessel density of subcutaneous transplantation tumor in nude mice with pancreatic cancer ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	微血管密度/个
对照	—	26.00 ± 1.52
人参皂苷 Rg ₃	10	17.82 ± 1.08*
	20	12.77 ± 1.65*

3.3 人参皂苷 Rg₃ 对荷瘤裸鼠皮下移植瘤 VE-cadherin 和 EphA2 mRNA 表达的影响

如表 3 所示, 与对照组比较, 人参皂苷 Rg₃ 组荷瘤裸鼠皮下移植瘤中 VE-cadherin 和 EphA2 mRNA 水平显著降低 ($P < 0.05$), 呈剂量相关性。

3.4 人参皂苷 Rg₃ 对荷瘤裸鼠皮下移植瘤 VE-cadherin 和 EphA2 蛋白表达的影响

如图 2 和表 4 所示, 与对照组比较, 人参皂苷 Rg₃ 组荷瘤裸鼠皮下移植瘤中 VE-cadherin 和 EphA2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 呈剂量相关性。

表 3 人参皂苷 Rg₃ 对荷瘤裸鼠皮下移植瘤 VE-cadherin 和 EphA2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of ginsenoside Rg₃ on expression of VE-cadherin and EphA2 mRNA in subcutaneous transplantation tumors in nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	VE-cadherin mRNA 相对表达量	EphA2 mRNA 相对表达量
对照	—	1.00	1.00
人参皂苷 Rg ₃	10	0.56 ± 0.00*	0.62 ± 0.01*
	20	0.34 ± 0.00*	0.36 ± 0.00*

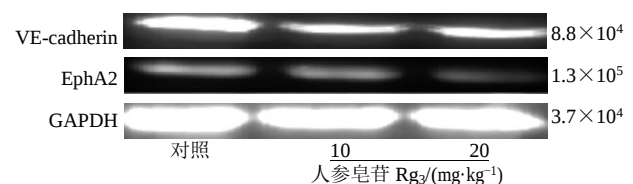


图 2 人参皂苷 Rg₃ 对荷瘤裸鼠皮下移植瘤 VE-cadherin 和 EphA2 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of ginsenoside Rg₃ on expression of VE-cadherin and EphA2 in subcutaneous transplantation tumors in nude mice

4 讨论

肿瘤转移与肿瘤的微血管生成密切相关, 微血管生成可作为肿瘤转移、复发和预后的重要指标^[10]。本研究结果显示, 与对照组比较, 人参皂苷 Rg₃ 组荷瘤裸鼠皮下移植瘤质量降低, 微血管生成减少, 表明人参皂苷 Rg₃ 通过抑制荷瘤裸鼠皮下移植瘤微血管生成, 从而抑制皮下移植瘤生长。局部的毛细

表 4 人参皂苷 Rg₃ 对荷瘤裸鼠皮下移植瘤 VE-cadherin 和 EphA2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Effect of ginsenoside Rg₃ on expression of VE-cadherin and EphA2 in subcutaneous transplantation tumors in nude mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	VE-cadherin 蛋白 相对表达量	EphA2 蛋白 相对表达量
对照	—	6.12±0.24	4.53±0.31
人参皂苷 Rg ₃	10	4.95±0.53*	2.63±0.26*
	20	3.13±0.38*	1.84±0.25*

血管基底膜降解, 血管内皮细胞增殖并迁移, 内皮细胞形成新的毛细血管。VE-cadherin 仅在内皮细胞表达, 是内皮细胞特异性标志物, 在维持血管内皮细胞极性和完整性中发挥重要作用。VE-cadherin 的表达与肿瘤的发生密切相关, VE-cadherin 可促进内皮细胞向肿瘤病灶的黏附、迁移, 促进病灶内新生血管的形成^[11], 且与肿瘤体积呈正相关^[12-13]。EphA2 是 Eph 受体酪氨酸激酶家族成员之一, 在多种恶性肿瘤或细胞株中高表达^[14]。EphA2 与其配体 Ephrin A1 结合后, 激活下游胞质底物蛋白, 在肿瘤新生血管形成中发挥重要作用^[15]。阻断 EphA2 信号转导或阻断 EphA 受体酪氨酸激酶可抑制肿瘤血管生成^[14]。研究发现, VE-cadherin 可重新分布 EphA2 的配体, 使 EphA2 与 EphrinA1 结合^[16]。本研究结果显示, 与对照组比较, 人参皂苷 Rg₃ 组荷瘤裸鼠皮下移植瘤 VE-cadherin、EphA2 蛋白和 mRNA 表达水平均显著降低, 提示人参皂苷 Rg₃ 可抑制血管内皮细胞增殖、迁移, 下调 VE-cadherin、EphA2 蛋白和 mRNA 表达, 阻止 EphA2 与其配体结合, 阻断 EphA2 信号转导。

本研究表明, 人参皂苷 Rg₃ 可抑制 VE-cadherin、EphA2 蛋白和 mRNA 表达, 抑制瘤组织血管生成, 从而提高荷瘤裸鼠生存质量。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
[2] Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(44): 9694-9705.
[3] 徐锦波, 陈敏远, 徐宏涛. 大黄素通过调节 TGF-β1、Smad4 抑制人胰腺癌的血管生成 [J]. *医学研究杂志*, 2017, 46(10): 162-165.

[4] 焦作义, 俞泽元. 原发性肝癌外科治疗进展 [J]. *中华肝脏外科手术学电子杂志*, 2016, 5(5): 281-284.
[5] Carra S, Sangiorgio L, Pelucchi P, *et al.* Zebrafish Tmem230a cooperates with the Delta/Notch signaling pathway to modulate endothelial cell number in angiogenic vessels [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(2): 1455-1467.
[6] 刘兴山, 董雪. 人参皂甙 Rg₃ 抑制血管形成的研究 [J]. *长春中医药大学学报*, 2014, 30(5): 820-822.
[7] 罗林明, 石雅宁, 姜懿纳, 等. 人参抗肿瘤作用的有效成分及其机制研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(3): 582-596.
[8] 王蔚, 王旭, 余苏云, 等. 人参皂苷 Rg₃ 调节免疫检查点 PD-L1 抑制肺癌 Lewis 细胞增殖的作用及机制研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(1): 166-171.
[9] Guo J Q, Zheng Q H, Chen H, *et al.* Ginsenoside Rg₃ inhibition of vasculogenic mimicry in pancreatic cancer through downregulation of VE-cadherin/EphA2/MMP9/MMP2 expression [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(3): 1065-1072.
[10] Zolota V, Gerokosta A, Melachrinou M, *et al.* Microvessel density, proliferating activity, p53 and bcl-2 expression in in situ ductal carcinoma of the breast [J]. *Anticancer Res*, 1999, 19(4): 3269-3274.
[11] Nikitopoulou I, Orfanos S E, Kotanidou A, *et al.* Vascular endothelial-cadherin downregulation as a feature of endothelial transdifferentiation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 311(2): 352-363.
[12] 汤伟胜, 林冬华, 郑辉, 等. 小细胞肺癌患者血清 PCT 含量与癌细胞浸润性生长及血管新生的关系 [J]. *海南医学院学报*, 2018, 24(4): 500-503.
[13] Rabascio C, Muratori E, Mancuso P, *et al.* Assessing tumor angiogenesis: Increased circulating VE-cadherin RNA in patients with cancer indicates viability of circulating endothelial cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(12): 4373-4377.
[14] 张本斯, 李庄, 卞思源, 等. EphA2 受体与恶性肿瘤关系的研究进展 [J]. *解剖学杂志*, 2017, 40(4): 469-472.
[15] Suetterlin P, Marler K M, Drescher U. Axonal ephrinA/EphA interactions, and the emergence of order in topographic projections [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2012, 23(1): 1-6.
[16] Wallesch M, Pachow D, Blücher C, *et al.* Altered expression of E-cadherin-related transcription factors indicates partial epithelial-mesenchymal transition in aggressive meningiomas [J]. *J Neurol Sci*, 2017, 380: 112-121.

[责任编辑 李亚楠]