

N-去硫酸肝素对体外培养人胃癌SGC-7901细胞bFGF表达的影响

陈明祥, 陈金联, 陆金来, 洪静, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维, 耿建国

■背景资料

胃癌是我国常见的消化系统肿瘤, 胃癌的转移是造成该病的主要死亡原因, 而胃癌的转移是一个多因素、多步骤的过程, 目前对胃癌的转移缺少有效的治疗方法。

陈明祥, 陈金联, 陆金来, 洪静, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维, 上海市第六人民医院消化内科 上海市 200233

耿建国, 中国科学院上海细胞生物学研究所 上海市 200031
作者贡献分布: 陈明祥与陈金联对此文所作贡献均等; 此课题由陈明祥, 陈金联, 陈维雄, 朱金水及陈尼维设计; 研究过程由陈明祥, 陆金来及洪静操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由耿建国提供; 数据分析由陈明祥完成; 本论文写作由陈明祥与陈金联完成。

通讯作者: 陈金联, 200233, 上海市第六人民医院消化内科。

wqq_021002@163.com

电话: 021-64834597

收稿日期: 2008-01-24 修回日期: 2008-03-16

In vitro effect of N-desulfated heparin on the expression of basic fibroblast growth factor in gastric carcinoma cell line SGC-7901

Ming-Xiang Chen, Jin-Lian Chen, Jin-Lai Lu, Jing Hong, Wei-Xiong Chen, Jin-Shui Zhu, Ni-Wei Chen, Jian-Guo Geng

Ming-Xiang Chen, Jin-Lian Chen, Jin-Lai Lu, Jing Hong, Wei-Xiong Chen, Jin-Shui Zhu, Ni-Wei Chen, Department of Gastroenterology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

Jian-Guo Geng, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

Correspondence to: Dr. Jin-Lian Chen, Department of Gastroenterology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China. wqq_021002@163.com

Received: 2008-01-24 Revised: 2008-03-16

Abstract

AIM: To investigate the effect of N-desulfated heparin on the expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in human gastric carcinoma SGC-7901 cells *in vitro*.

METHODS: Human gastric carcinoma cell line SGC-7901 was cultured *in vitro*, and then treated with N-desulfated heparin at different concentrations (0.1, 1.0 g/L). Meanwhile, SGC-7901 cells cultured in single RPMI 1640 medium were used as controls. Each group contained 3 parallel samples. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and real time polymerase chain

reaction (PCR) were used to detect the expression of bFGF in SGC-7901 cells at 12 h and 24 h, respectively.

RESULTS: After treatment with 0.1 or 1.0 g/L N-desulfated heparin for 12 or 24 h, bFGF protein expression was decreased significantly ($t = 7.502, P = 0.002; t = 55.416, P = 0.000; t = 52.221, P = 0.000; t = 48.080, P = 0.000$). The expression of bFGF (CT value) in each N-desulfated heparin group was higher than that in the control group at the same time. The inhibition of N-desulfated heparin on bFGF protein and mRNA expression in SGC-7901 cells was dose- and time-dependent.

CONCLUSION: N-desulfated heparin can inhibit the expression of bFGF in gastric cancer cell line SGC-7901 in a dose- and time-dependent manner *in vitro*.

Key Words: N-desulfated heparin; SGC-7901 gastric carcinoma cell; Basic fibroblast growth factor; ELISA; Real time PCR

Chen MX, Chen JL, Lu JL, Hong J, Chen WX, Zhu JS, Chen NW, Geng JG. *In vitro* effect of N-desulfated heparin on the expression of basic fibroblast growth factor in gastric carcinoma cell line SGC-7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1920-1925

摘要

目的: 探讨N-去硫酸肝素对体外培养人胃癌SGC-7901细胞碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)表达的影响。

方法: 体外培养人胃癌SGC-7901细胞, 加入含不同浓度N-去硫酸肝素(0.1、1.0 g/L, N-去硫酸肝素组)的RPMI 1640培养液, 并设对照(为培养液), 每组平行3个样本。培养12、24 h, 应用双抗体夹心ABC-ELISA法及实时荧光定量PCR法检测胃癌细胞bFGF的表达。

结果: 与对照组相比, 0.1、1.0 g/L N-去硫酸肝素组培养12、24 h, bFGF的表达下降均有

■同行评议者

姜慧卿, 教授, 河北医科大学第二医院消化科

统计学意义($t = 7.502, P = 0.002; t = 55.416, P = 0.000; t = 52.221, P = 0.000; t = 48.080, P = 0.000$); 相同时间下各浓度的N-去硫酸肝素组中bFGF mRNA的表达(CT值)较对照组高. N-去硫酸肝素对胃癌细胞bFGF蛋白及mRNA表达的抑制作用具有剂量及时间依赖性.

结论: N-去硫酸肝素可以显著抑制体外培养人胃癌细胞bFGF的表达, 且具有时间、剂量依赖性.

关键词: N-去硫酸肝素; SGC-7901胃癌细胞; 碱性成纤维细胞生长因子; ELISA; 实时荧光定量PCR

陈明祥, 陈金联, 陆金来, 洪静, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维, 耿建国. N-去硫酸肝素对外培养人胃癌SGC-7901细胞表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(17): 1920-1925
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1920.asp

0 引言

胃癌是我国常见的消化道肿瘤, 胃癌的转移是造成该病的主要死亡原因, 而胃癌的转移是一个多因素、多步骤的过程, 目前对胃癌的转移缺少有效的治疗方法. 业已证实, 几乎所有实体肿瘤的生长和转移均依赖于新生血管提供大量的营养物质与生长因子^[1-2]. 实体肿瘤的生长通常分为无血管期和血管期. 即肿瘤长至直径1-2 mm时, 肿瘤分泌若干因子刺激血管形成, 获得血供的肿瘤继续增大乃至转移, 因此新生血管的形成是实体瘤生长的关键. 肿瘤血管形成受多种因子调节, 其中具有重要实际意义的是碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF), 他与肿瘤血管形成高度相关^[3]. 以往的研究表明, 肝素为高度硫酸化蛋白多糖, 作为抗凝剂, 已被广泛用于临床^[4]. 然而, 由于肝素强烈的抗凝活性, 限制了他的临床应用, 对肝素进行化学修饰, 可降低其抗凝活性, 但可增强其抗肿瘤作用^[5-7]. 携带聚苯乙烯的非抗凝性肝素比普通肝素有更强的抑制肿瘤血管生成作用^[8]. 本实验研究用N-去硫酸肝素对外培养胃癌SGC7901细胞进行处理, 并通过ELISA和荧光定量PCR方法检测胃癌细胞bFGF的表达, 旨在为胃癌的治疗找到一个新的治疗途径.

1 材料和方法

1.1 材料 bFGF包被抗体R&D MAB293, 检测抗体PeproTech 500-P10Bt. N-去硫酸肝素由中国科学院上海细胞生物学和生物化学研究所提供. 人胃癌SGC-7901细胞株购自中国医学科学院上海细

表 1 bFGF探针序列

bFGF探针序列	
荧光探针:	5'-TGTGGCACTGAAACGAACTGGG-3'
正义链探针:	5'-GTCACGGAATACTCCAGTTGGT-3'
反义链探针:	5'-CCGTTTTGGATCCGAGTTTATACT-3'

胞所. 逆转录酶、Taq DNA聚合酶、引物和荧光标记探针由中山大学达安基因股份有限公司(广州)提供.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 用含体积分数100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养, 在37°C、体积分数50 mL/L CO₂、饱和湿度的条件下培养24 h, 然后换用不含胎牛血清的DMEM培养液同步化24 h, 然后换培养液与N-去硫酸肝素, 分别培养12 h与24 h. 每个10 mL培养基加SGC-7901胃癌细胞 3×10^6 个细胞, 每组培养3瓶. 收集培养上清液-80°C保存. 胃癌培养细胞于冻存管保存(液氮).

1.2.2 标准曲线建立: 实验前20 min从冰箱中取出试剂盒, 以平衡至室温(20-25°C). 设标准孔8孔, 每孔中各加入样品稀释液100 μ L, 第一孔加标准品100 μ L, 混匀后用加样器吸出100 μ L, 移至第二孔. 如此反复作对倍稀释至第七孔, 最后, 从第七孔中吸出100 μ L弃去, 使之体积均为100 μ L. 第八孔为空白对照. 待测品孔中每孔各加入待测样品100 μ L. 将反应板置37°C 120 min. 用洗涤液将反应板充分洗涤4-6次, 向滤纸上印干. 每孔中加入第一抗体工作液50 μ L. 将反应板充分混匀后置37°C 60 min. 用洗涤液将反应板充分洗涤4-6次, 向滤纸上印干. 每孔加酶标抗体工作液100 μ L. 将反应板置37°C 60 min. 洗板同前. 每孔加入底物工作液100 μ L, 置37°C暗处反应5-10 min. 每孔加入50 μ L终止液混匀. 在492 nm处测吸光值.

以标准品500、250、125、62.5、31.25、15.62、7.81、0 ng/L之A值在半对数纸上作图, 画出标准曲线. 将浓度作为X轴(对数轴), A值作为Y轴(线性轴). 所有A值都应减除空白值后再行计算. 曲线应为一光滑曲线. 根据样品A值在该曲线图上查出相应人bFGF含量. 所有的数据由分析软件Ascent software for Multiskan进行处理. bFGF探针序列见表1.

1.2.3 荧光定量PCR测定肿瘤细胞bFGF mRNA表达: TRIzol法抽提小鼠胃癌细胞总RNA, 加DEPC水溶解RNA, -80°C保存备用. 取出RNA

■ 研发前沿

肝素为高度硫酸化蛋白多糖, 作为抗凝剂, 已被广泛用于临床. 然而, 由于肝素强烈的抗凝活性, 限制了他的临床应用, 对肝素进行化学修饰, 可降低其抗凝活性, 但可增强其抗肿瘤作用.

■相关报道

有报道肝素经化学修饰后,可减少戊糖环中碳氧含量或增加含硫基团,可降低抗凝活性而增强抗炎作用,而其抗凝作用却明显降低,如经修饰后N-去硫酸肝素仅为肝素的1/76,氧去硫酸肝素抗凝活性可降低至肝素5%-30%,N-乙酰化可降低至10%以下,可明显降低出血副反应。

表 2 N-去硫酸肝素对外培养SGC-7901细胞的bFGF和bFGF mRNA表达作用 (mean ± SD, n = 3)

分组	bFGF(ng/L)		bFGF mRNA(CT值)	
	12 h	24 h	12 h	24 h
对照组	17.724 ± 0.173	19.690 ± 0.111 ^a	25.956 ± 0.505	24.490 ± 0.145 ^a
0.1 g/L N-去硫酸肝素组	15.313 ± 0.394 ^c	13.301 ± 0.166 ^{bc}	30.923 ± 0.612 ^c	32.493 ± 0.358 ^c
1.0 g/L N-去硫酸肝素组	12.173 ± 0.063 ^{ce}	11.174 ± 0.286 ^{ce}	33.826 ± 0.349 ^{ce}	35.446 ± 0.299 ^{ce}

^a $P < 0.05$ vs 12 h组; ^c $P < 0.05$ vs 对照组; ^e $P < 0.05$ vs 0.1 g/L N-去硫酸肝素组。

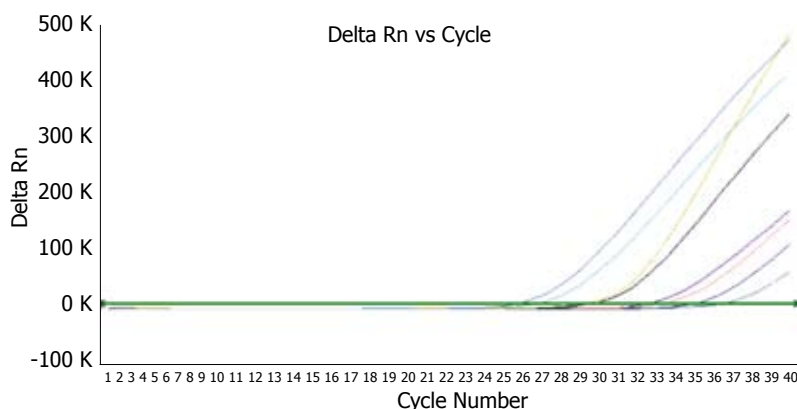


图 1 对照组及不同浓度N-去硫酸肝素(12, 24 h)胃癌细胞bFGF mRNA扩增动力学曲线图。

模板分别加至2 μ L已标记的消毒离心管中, RT-PCR试剂盒解冻, 依次加入稀释的逆转录酶0.5 μ L、dNTP 0.2 μ L, 上下游引物各0.2 μ L, DEPC水4.9 μ L, RT缓冲液2 μ L总体积10 μ L, 然后依次插入预先设置(37 $^{\circ}$ C 1 h, 95 $^{\circ}$ C 3 min加热模块, 逆转录cDNA完成, -80 $^{\circ}$ C保存备用。

取消毒的96孔联体反应板, 分别加入cDNA模板, 取适时荧光定量PCR试剂盒解冻, 依次加入Taq酶1 μ L、dNTP 0.5 μ L、上游引物0.5 μ L、下游引物0.5 μ L, 荧光标记探针0.5 μ L, 5 \times 缓冲液10 μ L、ddH₂O 32 μ L、cDNA 5 μ L, 放入全自动实时荧光定量PCR(美国ABI7300)模板中。扩增条件: 93 $^{\circ}$ C 2 min, 93 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 共40个循环。应用荧光定量PCR技术检测bFGF mRNA表达。CT值: 目标基因扩增的阈值循环数。

统计学处理 使用SAS6.12统计软件, 实验数据采用mean \pm SD表示, 两组间采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 N-去硫酸肝素对胃癌细胞bFGF蛋白表达的影响 ELISA结果可见, 对照组SGC-7901胃癌细胞随着培养时间的延长, bFGF的表达量明显增加($t = 16.567$, $P = 0.000 < 0.05$)。不同浓度的N-去硫酸肝素对外培养SGC-7901胃癌细胞分别作用12、24 h后与对照组相比, bFGF的表达均有

明显下降($t = 7.502$, $P = 0.002 < 0.05$; $t = 55.416$, $P = 0.000 < 0.05$; $t = 52.221$, $P = 0.000 < 0.05$; $t = 48.080$, $P = 0.000 < 0.05$), 且随着N-去硫酸肝素剂量的加大、作用时间的延长, N-去硫酸肝素对bFGF的表达的抑制作用增强了($P < 0.05$), 因而具有剂量及时间依赖性(表2)。

2.2 N-去硫酸肝素对bFGF mRNA表达的影响 使用荧光定量PCR方法, 12 h对照组bFGF mRNA的表达(CT值)较24 h对照组高; 相同时间下各浓度的N-去硫酸肝素组(CT值)较对照组高; 与0.1 g/L N-去硫酸肝素组相比, 1.0 g/L N-去硫酸肝素组中bFGF mRNA的表达(CT值)均明显升高($t = 4.120$, $P = 0.015 < 0.05$; $t = 6.323$, $P = 0.003 < 0.05$); 0.1 g/L、1.0 g/L的N-去硫酸肝素24 h组与12 h组相比, bFGF蛋白表达CT值均升高, 且1.0 g/L N-去硫酸肝素24 h组与12 h组相比, $t = 3.522$, $P = 0.024 < 0.05$ 。由于bFGF mRNA的实际含量与CT值成反比, 因而荧光定量PCR结果表明, N-去硫酸肝素对SGC-7901胃癌细胞bFGF的表达的抑制作用呈剂量、时间依赖性(表2, 图1)。

3 讨论

肿瘤的恶性增殖和转移是一个极其复杂的过程, 当肿瘤生长至直径 ≥ 1 mm时, 进一步生长就需要新生血管生长。肿瘤血管生长对实体瘤的发生、发展起着重要的作用, 是影响肿瘤生物学

行为和转移潜能的重要因素. 一些研究表明, 低分子肝素类似物比普通肝素对血管形成具有更强的抑制作用^[9]. N-去硫酸肝素能抑制各种生长因子、细胞分裂素、细胞外基质蛋白的作用, 因此能影响肿瘤细胞增殖、迁移和肿瘤的血管生成从而抗肿瘤转移作用^[10]. 有报道肝素经化学修饰后, 可减少戊糖环中碳氧含量或增加含硫基团, 可降低抗凝活性而增强抗炎作用, 而其抗凝作用却明显降低, 如经修饰后N-去硫酸肝素仅为肝素的1/76^[11-12], 氧去硫酸肝素抗凝活性可降至肝素5%-30%^[13], N-乙酰化可降至10%以下^[14], 可明显降低出血副反应.

bFGF是FGF家族中第一个发现的成员, 他是一种碱性多肽, 由146个氨基酸组成, 基本分子量为18 kDa, pH值为9.6, 主要分布于细胞质中, 含有4个半胱氨酸残基, 通过形成分子内二硫键, 在维持bFGF的三级结构中起重要作用. bFGF的N端和C端区域分别是肝素受体的结合部位. bFGF基因位于人类5号染色体上, 为单拷贝基因, 为三个外显子两个内含子组成. bFGF在体内分布极为广泛, 脑、心、肾、肾上腺、骨和胎盘都有bFGF的存在. bFGF作为一种重要的促血管生成因子, 与肿瘤尤其是实体瘤的关系尤为密切, 具有促进源自中胚层和神经内胚层有丝分裂的活性, 有强烈的促血管内皮细胞分裂增殖和增加血管通透性的作用, 通过促进新生血管形成, 为肿瘤细胞生长提供营养. 另一方面通过自分泌或旁分泌方式促进细胞过度增殖和肿瘤生长^[15]. 最近免疫组化研究发现, 食道癌、前列腺癌、肺癌肿瘤中均发现有不同程度的bFGF量的表达^[16-18]. bFGF参与胃癌的发生、发展、浸润、转移^[19-20]. Zhao *et al*^[21]应用原位杂交技术来检测105例胃癌组织中bFGF mRNA、MMP-9 mRNA和CD34蛋白的表达, 结果发现与阴性对照组相比, 平均微血管密度、bFGF mRNA、MMP-9 mRNA表达均明显高于对照组, 且bFGF mRNA、MMP-9 mRNA与肿瘤的浸润深度、淋巴结转移、血管浸润、肿瘤的生长方式有关, 而与肿瘤的分型与分化无关, 因而认为bFGF可作为一个肿瘤血管形成、浸润转移、胃癌预后的一个有效指标. Noda *et al*^[22]使用原位杂交技术检测bFGF mRNA在16例早期和14例晚期胃癌中的表达以此来阐明bFGF在癌症进展中的作用, bFGF在弥散型胃癌中的表达要高于肠型胃癌的表达, bFGF mRNA阴性表达的胃癌患者生存率要明显高于bFGF mRNA阳性表达的患

者. 研究表明, bFGF在弥散型胃癌特别是晚期胃癌中的表达有着重要的意义.

本研究使用ELISA方法, 12 h的阴性对照组、12 h的0.1 g/L N-去硫酸肝素组、12 h 1.0 g/L N-去硫酸肝素组中培养的胃癌细胞上清液中bFGF的含量分别为 17.724 ± 0.173 、 15.313 ± 0.394 、 12.173 ± 0.063 ; 24 h的阴性对照组、24 h 0.1 g/L N-去硫酸肝素组、24 h 1.0 g/L N-去硫酸肝素组中培养的胃癌细胞上清液中bFGF的含量分别为 19.690 ± 0.111 、 13.301 ± 0.166 、 11.174 ± 0.286 . 根据实验结果, 12、24 h阴性对照组中bFGF的蛋白含量分别为 17.724 ± 0.173 、 19.690 ± 0.111 , 随着培养时间的延长, 培养的胃癌细胞上清液中bFGF的含量是增加的, 两组间bFGF含量有明显差异, 符合胃癌细胞体外培养的增殖规律. 相同时间下, 各浓度的N-去硫酸肝素组与对照组相比, bFGF的含量均有下降, 且 $P < 0.05$, 表明N-去硫酸肝素对培养的胃癌细胞上清液bFGF的表达有抑制作用. 12 h 0.1 g/L N-去硫酸肝素与24 h 0.1 g/L N-去硫酸肝素相比, bFGF的含量分别为 15.313 ± 0.394 、 13.301 ± 0.166 , 有下降趋势, 两组数据之间有差异, $t = 8.151$, $P = 0.001 < 0.05$; 12 h 1.0 g/L N-去硫酸肝素与24 h 1.0 g/L N-去硫酸肝素组中bFGF的含量分别为 12.173 ± 0.063 、 11.174 ± 0.286 , 有下降趋势, 两组数据之间有差异, $t = 5.908$, $P = 0.004 < 0.05$; 因此认为, 随着作用时间的延长, 同一浓度的N-去硫酸肝素对培养胃癌细胞上清液中bFGF的表达抑制作用是增强的, 因而具有时间依赖性. 12 h的0.1 g/L N-去硫酸肝素组、1.0 g/L N-去硫酸肝素组中培养胃癌细胞上清液中bFGF的蛋白含量分别为 15.313 ± 0.394 、 12.173 ± 0.063 ; 24 h的0.1 g/L N-去硫酸肝素组、24 h 1.0 g/L N-去硫酸肝素组中bFGF的蛋白含量分别为 13.301 ± 0.166 、 11.174 ± 0.286 ; 在相同的时间, 1.0 g/L的N-去硫酸肝素组与0.1 g/L的N-去硫酸肝素组相比, 培养的胃癌细胞上清液中bFGF的含量是降低的, 两组之间均有明显差异($t = 13.630$, $P = 0.000 < 0.05$; $t = 11.141$, $P = 0.000 < 0.05$), 因此认为N-去硫酸肝素对bFGF的表达的抑制作用具有剂量依赖性.

陈金联 *et al*^[23]在研究中发现, N-去硫酸肝素对人胃癌组织原位移植非肥胖性糖尿病(non-obesity diabetes, NOD)重度联合免疫缺陷(SCID)小鼠转移模型的肿瘤转移、血管生成和血管内皮生长因子(VEGF)表达具有抑制作用. 而其在

■应用要点

N-去硫酸肝素可以显著抑制体外培养人胃癌细胞bFGF的表达, 且具有时间、剂量依赖性.

■同行评价

本文从时效与量效两个方面,应用ELISA法及实时荧光定量PCR法检测胃癌细胞bFGF的表达,能够说明N-去硫酸肝素对外培养人胃癌SGC-7901细胞表达的影响,文章短小,但能够说明问题。

此前的研究中发现, N-去硫酸肝素通过抑制肿瘤组织VEGF表达和血管生成,从而抑制肿瘤的转移,并且无明显出血等不良反应,这一结果是一致的^[24]。Shi *et al*^[25]在研究中发现, bFGF主要通过PI3K途径增加缺氧状态下VEGF的释放,因而在肿瘤的血管形成中发挥着关键的作用。Yang *et al*^[26]在研究中发现, bFGF能够介导TGF-B在前列腺癌间质中的活化,从而参与肿瘤血管的形成和扩增。Li *et al*^[27]体内外的研究表明, 米非司酮通过抑制胃腺癌MKN-45细胞VEGF的表达,从而抑制细胞转移、血管形成及基底膜异质性黏附作用,最终达到有效抑制胃腺癌MKN-45细胞系的浸润及转移作用。

本研究使用荧光定量PCR方法, 12 h的阴性对照组、0.1 g/L N-去硫酸肝素组、1.0 g/L N-去硫酸肝素组中bFGF的蛋白表达CT值分别为 25.956 ± 0.505 、 30.923 ± 0.612 、 33.826 ± 0.349 。24 h的阴性对照组、0.1 g/L N-去硫酸肝素、1.0 g/L N-去硫酸肝素组中bFGF的蛋白表达CT值分别为 24.490 ± 0.145 、 32.493 ± 0.358 、 35.446 ± 0.299 。根据本实验结果,我们不难发现, 0.1、1.0 g/L组的N-去硫酸肝素对SGC-7901胃癌细胞分别作用12、24 h后与对照组相比, CT值均升高($t = 6.261$, $P = 0.003 < 0.05$; $t = 20.694$, $P = 0.000 < 0.05$; $t = 12.827$, $P = 0.002 < 0.05$; $t = 32.919$, $P = 0.000 < 0.05$), 由于bFGF mRNA的实际含量与CT值负相关, 因此认为N-去硫酸肝素对SGC-7901胃癌细胞bFGF mRNA的表达具有抑制作用。相同的作用时间, 1.0 g/L的N-去硫酸肝素组与0.1 g/L的N-去硫酸肝素相比, bFGF的蛋白表达CT值也是增高的($t = 13.631$, $P = 0.000 < 0.05$; $t = 11.141$, $P = 0.000 < 0.05$), 由于CT值越高, bFGF mRNA的实际含量越低, 因而1.0 g/L的N-去硫酸肝素比0.1 g/L的N-去硫酸肝素对培养胃癌细胞bFGF mRNA表达的抑制作用更强, 具有剂量依赖性。随着作用时间的延长, 1.0 g/L N-去硫酸肝素对SGC-7901胃癌细胞作用24 h组与作用12 h组相比, CT值升高($t = 5.908$, $P < 0.05$), 因而胃癌bFGF mRNA表达的量减少; 0.1 g/L组的N-去硫酸肝素对SGC-7901胃癌细胞作用24 h组与作用12 h组相比, 胃癌bFGF mRNA表达的量有下降趋势, CT值升高但 $P > 0.05$, 可能与作用浓度偏小有关; 因而认为N-去硫酸肝素对SGC-7901胃癌细胞bFGF基因的表达的抑制作用具有时间依赖性。对照组SGC-7901胃癌细胞分别培养12、24 h后, 随着作用时间的延长,

CT值降低, 且 $t = 16.567$, $P = 0.000 < 0.05$, 因此bFGF mRNA的实际表达量是增加的, 与培养胃癌细胞的增殖有关。

细胞肺癌耐药是由于bFGF增加了抗凋亡蛋白XIAP和Bcl-xL的表达, 激发了小细胞肺癌的耐药。而这种耐药作用的产生是通过包括B-Raf, PKCepsilon, S6K-2多蛋白复合体介导产生的。研究表明, PKCepsilon的过度表达增加了XIAP和Bcl-xL水平和小细胞肺癌细胞的耐药。在一个四环素诱导的系统中, 增加的S6k-2激酶活性诱导了XIAP, Bcl-xL抗肿瘤作用的上调^[28]。目前的研究表明外源性的bFGF能够促进前列腺癌的扩增和转移。肝素类似物调控蛋白(HARP)在bFGF的激发效应中起着非常重要的媒介作用。

总之, bFGF在胃癌的血管形成和肿瘤转移中起着重要的作用, N-去硫酸肝素通过抑制肿瘤组织bFGF的表达和肿瘤的血管形成, 对胃癌具有抗转移作用且无明显出血不良副反应。进一步应用ELISA及荧光定量PCR方法研究N-去硫酸肝素抗胃癌转移作用及机制, 将对胃癌实体瘤抗转移治疗提供新的途径。

4 参考文献

- Shiraishi N, Sato K, Yasuda K, Inomata M, Kitano S. Multivariate prognostic study on large gastric cancer. *J Surg Oncol* 2007; 96: 14-18
- Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, Nakao A. Clinical significance of isolated tumor cells and micrometastases in patients with gastric carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho* 2007; 34: 817-823
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186
- Castelli R, Porro F, Tarsia P. The heparins and cancer: review of clinical trials and biological properties. *Vasc Med* 2004; 9: 205-213
- Hostettler N, Naggi A, Torri G, Ishai-Michaeli R, Casu B, Vlodavsky I, Borsig L. P-selectin- and heparanase-dependent antimetastatic activity of non-anticoagulant heparins. *FASEB J* 2007; 21: 3562-3572
- Yu MK, Lee DY, Kim YS, Park K, Park SA, Son DH, Lee GY, Nam JH, Kim SY, Kim IS, Park RW, Byun Y. Antiangiogenic and apoptotic properties of a novel amphiphilic folate-heparin-lithocholate derivative having cellular internality for cancer therapy. *Pharm Res* 2007; 24: 705-714
- Wang S, Ai X, Freeman SD, Pownall ME, Lu Q, Kessler DS, Emerson CP Jr. QSulf1, a heparan sulfate 6-O-endosulfatase, inhibits fibroblast growth factor signaling in mesoderm induction and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 4833-4838
- Ono K, Ishihara M, Ishikawa K, Ozeki Y, Deguchi H, Sato M, Hashimoto H, Saito Y, Yura H, Kurita A, Maehara T. Periodate-treated, non-anticoagulant heparin-carrying polystyrene (NAC-HCPS) affects angiogenesis and inhibits subcutaneous induced tumour growth and metastasis to the lung. *Br J*

- Cancer* 2002; 86: 1803-1812
- 9 Norrby K. 2.5 kDa and 5.0 kDa heparin fragments specifically inhibit microvessel sprouting and network formation in VEGF165-mediated mammalian angiogenesis. *Int J Exp Pathol* 2000; 81: 191-198
- 10 陈金联, 陈维雄, 朱金水, 陈明祥, 陆金来, 陈尼维, 陆允敏, 陈国强, 耿建国. N-去硫酸肝素对胃癌转移的抑制作用. *中国临床药理学杂志* 2006; 15: 67-70
- 11 Bjornsson TD, Schneider DE, Hecht AR. Effects of N-deacetylation and N-desulfation of heparin on its anticoagulant activity and in vivo disposition. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 245: 804-808
- 12 Sache E, Maillard M, Malazzi P, Bertrand H. Partially N-desulfated heparin as a non-anticoagulant heparin: some physico-chemical and biological properties. *Thromb Res* 1989; 55: 247-258
- 13 Thourani VH, Brar SS, Kennedy TP, Thornton LR, Watts JA, Ronson RS, Zhao ZQ, Sturrock AL, Hoidal JR, Vinten-Johansen J. Nonanticoagulant heparin inhibits NF-kappaB activation and attenuates myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H2084-H2093
- 14 Kouretas PC, Kim YD, Cahill PA, Myers AK, To LN, Wang YN, Sitzmann JV, Hannan RL. Nonanticoagulant heparin prevents coronary endothelial dysfunction after brief ischemia-reperfusion injury in the dog. *Circulation* 1999; 99: 1062-1068
- 15 Dow JK, deVere White RW. Fibroblast growth factor 2: its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions. *Urology* 2000; 55: 800-806
- 16 Barclay C, Li AW, Geldenhuys L, Baguma-Nibasheka M, Porter GA, Veugelers PJ, Murphy PR, Casson AG. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) overexpression is a risk factor for esophageal cancer recurrence and reduced survival, which is ameliorated by coexpression of the FGF-2 antisense gene. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7683-7691
- 17 Soultz N, Karyotis I, Delakas D, Spandidos DA. Expression analysis of peptide growth factors VEGF, FGF2, TGF β 1, EGF and IGF1 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Int J Oncol* 2006; 29: 305-314
- 18 Zhao J, Liu XY, Zhang QY, Jiang W. Plasma level and prognostic significance of VEGF, bFGF and MMP-9 in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2005; 27: 676-679
- 19 Miyamoto N, Yamamoto H, Taniguchi H, Miyamoto C, Oki M, Adachi Y, Imai K, Shinomura Y. Differential expression of angiogenesis-related genes in human gastric cancers with and those without high-frequency microsatellite instability. *Cancer Lett* 2007; 254: 42-53
- 20 Zhao ZS, Yao GY, Ru GQ, Ma J, Ruan J. Relationship between bFGF mRNA and MMP-9 mRNA expression in gastric carcinoma and their clinicopathological features as well as patients survival. *Zhonghua Waike Zazhi* 2005; 43: 169-172
- 21 Zhao ZS, Zhou JL, Yao GY, Ru GQ, Ma J, Ruan J. Correlative studies on bFGF mRNA and MMP-9 mRNA expressions with microvascular density, progression, and prognosis of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3227-3233
- 22 Noda M, Hattori T, Kimura T, Naitoh H, Kodama T, Kashima K, Pignatelli M. Expression of fibroblast growth factor 2 mRNA in early and advanced gastric cancer. *Acta Oncol* 1997; 36: 695-700
- 23 陈金联, 陈维雄, 朱金水, 洪静, 陆金来, 陈明祥, 陈尼维, 陈国强, 耿建国. 非抗凝N-去硫酸肝素对胃癌转移抑制作用的实验研究. *中华消化杂志* 2006; 26: 818-821
- 24 Chen JL, Hong J, Lu JL, Chen MX, Chen WX, Zhu JS, Chen NW, Chen GQ, Geng JG. Effect of non-anticoagulant N-desulfated heparin on expression of vascular endothelial growth factor, angiogenesis and metastasis of orthotopic implantation of human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 457-461
- 25 Shi YH, Bingle L, Gong LH, Wang YX, Corke KP, Fang WG. Basic FGF augments hypoxia induced HIF-1-alpha expression and VEGF release in T47D breast cancer cells. *Pathology* 2007; 39: 396-400
- 26 Yang F, Strand DW, Rowley DR. Fibroblast growth factor-2 mediates transforming growth factor-beta action in prostate cancer reactive stroma. *Oncogene* 2008; 27: 450-459
- 27 Li DQ, Wang ZB, Bai J, Zhao J, Wang Y, Hu K, Du YH. Effects of mifepristone on invasive and metastatic potential of human gastric adenocarcinoma cell line MKN-45 in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1726-1729
- 28 Pardo OE, Wellbrock C, Khanzada UK, Aubert M, Arozarena I, Davidson S, Bowen F, Parker PJ, Filonenko VV, Gout IT, Sebire N, Marais R, Downward J, Seckl MJ. FGF-2 protects small cell lung cancer cells from apoptosis through a complex involving PKCepsilon, B-Raf and S6K2. *EMBO J* 2006; 25: 3078-3088
- 29 Hatziapostolou M, Polytarchou C, Katsoris P, Courty J, Papadimitriou E. Heparin affinity regulatory peptide/pleiotrophin mediates fibroblast growth factor 2 stimulatory effects on human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 32217-32226

编辑 程剑侠 电编 何基才