

福安泰 -03 对小鼠癌细胞转移相关基因和转移行为的影响

黄来珍 王长秀 马润娣 于立坚* 苏伟明 廖铭能 于廷曦*

(广东海洋大学海洋药物研究与开发重点实验室, 湛江 524025)

摘要 以小鼠 Lewis 肺癌(Lewis lung carcinoma, LLC) 自发转移和小鼠黑色素瘤(B16)细胞实验转移为模型, 检测福安泰 -03 (Fuantai-03, FAT-03)对小鼠 Lewis 肺癌生长和转移的影响, Western 印迹和免疫组化法分析 FAT-03 对小鼠 Lewis 肺癌转移相关基因 CD44 和 nm23-H1 表达水平的影响。结果显示, FAT-03 明显抑制 LLC 的生长和肝转移, 显著抑制 B16 细胞的肺转移, 并与环磷酰胺(CY)有协同作用。每天腹腔注射 FAT-03 10.0、20.0 mg/kg, 共用药 14 天, 对 LLC 生长的抑制率分别为 53.8%、61.3% (CY 的抑制率为 58.8%); 对 LLC 肝转移的抑制率分别为 37.4%、76.5% (CY 的抑制率为 64.5%)。对 B16 细胞肺转移的抑制率分别为 51.4% 和 63.7% (CY 的抑制率为 44.0%, 10.0 mg/kg FAT-03+CY 的抑制率为 88.1%)。显著下调促癌转移基因 CD44, 上调抑癌转移基因 nm23-H1 的表达。结果提示 FAT-03 值得作为一种具有抗癌转移作用的先导物质继续研究, 它的抗癌转移效果可能部分与其下调促癌转移基因 CD44 和上调抑癌转移基因 nm23-H1 的表达有关。

关键词 赤魃; 福安泰 -03; 癌转移; Lewis 肺癌; 癌转移相关基因

肿瘤侵袭和转移是恶性肿瘤的基本生物学特征。在复杂的肿瘤侵袭和转移过程中, 涉及多种癌转移相关基因, 包括癌基因、抑癌基因、肿瘤转移基因和肿瘤转移抑制基因等。而肿瘤转移基因和肿瘤转移抑制基因是近年来肿瘤转移机制研究的焦点。

此前我们已经报告赤魃(*Dasyatis akajei*)尾刺提取物的抗肿瘤作用^[1], 赤魃组织粗提物和从赤魃组织中分离得到的福安肽(Fuantai, FAT)的抗肿瘤活性^[2,3]和抗血管生成作用^[4]。然而, 福安肽的电泳图谱显示, 其成分复杂, 由分子量范围很宽的多种蛋白质肽类物质组成。课题组以抑制血管生成作为追踪指标, 从福安肽中分离纯化得到具有强抗肿瘤血管生成活性的单一成分福安泰 -03 (Fuantai-03, FAT-03)。FAT-03 是分子量大约为 43 kDa、N 末端氨基酸序列(PFGNTHNKWK-LNYSAEQEF)已经确定的蛋白质^[5]。

此前作者已经报告无细胞毒作用的 FAT-03 对肿瘤血管生成^[6], 对人高转移卵巢癌细胞HO-8910PM 的粘附和迁移, 对该细胞基质金属蛋白酶 -9 (MMP-9)分泌和活性的抑制作用^[7]。这些资料无疑对阐明 FAT-03 抗肿瘤转移的机制有重要意义, 但其深度和广度都还不够。更为重要的是, FAT-03 在体内对肿瘤转移行为的影响, 前面的研究未涉及。本文报告

FAT-03 对小鼠 Lewis 肺癌细胞转移相关基因和 Lewis 肺癌及 B16 黑色素瘤转移行为的新的研究结果。

1 材料与方法

1.1 试剂

RPMI-1640 为美国 Hyclone 公司产品, DMEM 为美国 Gibco 公司产品, 超级无支原体新生小牛血清为杭州四季青公司产品, 胰蛋白酶和 MTT 均为美国 Sigma 公司产品; 兔多克隆一抗 CD44 和 nm23-H1 抗体、免疫组化超敏 SP 试剂盒、山羊抗兔 IgG 和第三抗体均购自北京中杉金桥生物公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 FAT-03 的制备和鉴定

以 FAT^[5]为材料、抑制肿瘤血管生成活性作为同步追踪的指标, 采用凝胶过滤、离子交换、疏水层析、反向层析等方法分离纯化制备 FAT-03^[5]。制得的 FAT-03 以 0.22 μm 滤膜过滤除菌, -20℃ 保存备

收稿日期: 2009-10-13 接受日期: 2010-03-09

国家自然科学基金项目(No.30271493)、广东省自然科学基金重点项目(No.021386)、广东省海洋与渔业局科技兴海重大项目(No. A200099B01)资助

* 通讯作者。Tel: 0759-2362480, Fax: 0759-2382424, E-mail: ywyj9578@sohu.com, yutingxi@yahoo.com

用。使用前以细胞培养液稀释到一定浓度。

1.3 细胞株和细胞培养

LLC 和 B16 细胞购自中科院上海生物化学与细胞生物研究所。LLC 细胞以含 5% 小牛血清、10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养液, B16 细胞以含 10% 小牛血清, 100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 RPMI-1640 培养液, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度细胞培养箱中培养。对数生长期细胞用于实验。

1.4 动物

BALB/c 裸小鼠, 7~8 周龄, 体重 21 \pm 2 g, 雌雄各半, 购自广东医学院实验动物中心(湛江, 中国; 动物合格证号: SCXK Yue2004-2008 No.0001916)。本实验在广东医学院实验动物中心专用裸鼠室进行。饲料、饮水、笼具和操作器材及其他用品均灭菌处理后使用, 按无菌原则操作, 遵守动物福利法规。

1.5 Western 印迹分析

取对数生长期 LLC 细胞 4.8 ml (1 \times 10⁶ 个细胞), 加入 200 μ l 不同浓度 FAT-03, 对照组加等量培养基。培养 72 h 后, 将培养瓶置于冰上, 细胞刮刀小心刮脱细胞, 转移到 50 ml 离心管中。3 000 r/min 离心 15 min, 收集细胞。用预冷 PBS 洗涤 2 次, 加入 600 μ l 细胞裂解液, 混匀, 转移至 Eppendorf 管中。冰上裂解 30 min 后, 15 000 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min。收集上清液, Lowry's 法测定总蛋白含量。在 12% 分离胶、5% 浓缩胶上进行电泳(每个泳道 150 μ g 蛋白质量), 用 Western 印迹法检测 CD44、nm23 的表达水平。

1.6 LLC 自发转移肿瘤模型

每只裸小鼠背部皮下接种 0.2 ml (4 \times 10⁶ 个细胞) LLC 细胞悬液。瘤细胞接种后第 7 天, 挑选已成瘤小鼠, 随机分组, 每组 8 只, 雌雄各半。FAT-03 组每天腹腔注射 FAT-03 溶液(10.0、20.0 mg/kg), 共注射 14 天, 对照组同时腹腔注射等量生理盐水, 阳性对照组接种当天及第 7 天腹腔注射 0.2 ml 环磷酰胺[CY, 50 mg/(kg·d)]。末次用药后次日颈椎脱位法牺牲小鼠, 剥离原发肿瘤称重并用 10% 中性甲醛固定后用于免疫组化实验。剥离肝脏并分别计数肝脏表面肿瘤转移结节总数和大转移结节数(>3 mm)。按下列公式分别计算肿瘤生长抑制率和肿瘤转移抑制率。

肿瘤生长抑制率 = (对照组平均瘤重 - 给药组平均瘤重) / 对照组平均瘤重 \times 100%

肿瘤转移抑制率 = (对照组平均转移结节数 - 给药组平均转移结节数) / 对照组平均转移结节数

\times 100%

1.7 B16 细胞实验转移模型

每只裸小鼠尾静脉接种 0.2 ml (3 \times 10⁶ 个细胞) B16 细胞悬液, 肿瘤接种当天, FAT-03 组每天腹腔注射 FAT-03 溶液(10.0、20.0 mg/kg) 14 天; 对照组腹腔注射等量生理盐水; 阳性对照组接种当天、第 7 天腹腔注射 0.2 ml CY; FAT-03+CY 组接种当天开始注射 FAT-03 [10.0 mg/(kg·d)], 共注射 14 天, 并于接种当日及第 7 天腹腔注射 0.2 ml CY [50 mg/(kg·d)]。末次用药翌日颈椎脱位法牺牲小鼠, 剥离肺肝并计数肺表面(肝表面无)转移结节总数和大转移结节数(>3 mm), 计算肿瘤转移抑制率。

1.8 免疫组化法

免疫组化法(SP法)检测肿瘤转移相关基因 CD44 和 nm23-H1 的表达^[8,9]。促转移基因 CD44 表达于细胞膜与细胞浆, 以胞膜着色为主, 出现少量胞浆着色; 抑转移基因 nm23 主要表达于细胞浆。细胞浆及胞膜中出现淡黄至褐黄色细颗粒状着色为阳性细胞。两位观察者盲法阅片, 每张切片至少观察 5 个具有代表性的高倍视野, 计数不少于 100 个细胞。

1.9 统计分析

观察指标: 肿瘤生长抑制率和肿瘤转移抑制率。完全随机化设计实验所得结果数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 来表示。资料均数采用 *t* 检验分析。所有数据均用 SPSS11.0 统计软件进行处理。P<0.05 被视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FAT-03 的分离与纯化

纯化后的 FAT-03 的色谱图和电泳图参见文献^[9]。

2.2 Western 印迹分析 LLC 细胞 CD44 和 nm23-H1 的表达水平

Western 印迹分析结果显示, 对照组 CD44 的表达水平比 FAT-03 组高, 而 FAT-03 组 CD44 表达水平则与所用 FAT-03 剂量相关, 即 FAT-03 的用量愈大, CD44 的表达水平愈低; 与此相反, 对照组 nm23-H1 的表达水平比 FAT-03 组低, 且 FAT-03 的用量愈大, nm23-H1 的表达水平愈高。可见, FAT-03 下调 LLC 细胞促转移基因 CD44 的表达, 上调抑转移基因 nm23-H1 的表达, 并与剂量相关(图 1)。

2.3 FAT-03 抑制小鼠 LLC 的生长和转移

FAT-03 组的原发肿瘤明显较对照组体积小, 基底窄, 易剥离。每天腹腔注射 FAT-03 (10.0、20.0

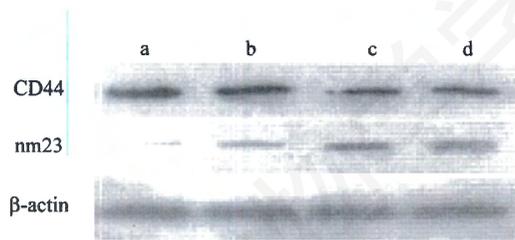


Fig.1 Effects of FAT-03 on the expressions of CD44 and nm23-H1 in LLC cells by Western blot analysis

a: control; b: 0.05 mg/ml FAT-03; c: 0.10 mg/ml FAT-03; d: 0.20 mg/ml FAT-03.

mg/kg), 共 14 天, 对 LLC 的生长抑制率分别为 53.8% 和 61.3%, CY 的抑制率为 58.8% (表 1)。解剖动物取出肝脏, 无需染色, 肉眼即可见对照组小鼠肝脏表面密布灰白色斑点状的或大(直径>3 mm)或小的转移

结节, 而 FAT-03 组的转移结节则很稀少(图 2)。计数结果表明, 10.0、20.0 mg/kg FAT-03 对 LLC 肝转移的抑制率分别为 37.4% 和 76.5%, CY 的抑制率为 64.5% (表 2)。表 2 中有 2 组实验数据(22.3±21.6; 8.2±8.0)的离散度大, 导致标准差接近均数。

2.4 FAT-03 抑制小鼠 B16 的转移

解剖动物取出肺脏, 肉眼即可见对照组小鼠肺表面(肝表面无)有较多黑色点状的转移结节, 而 FAT-03 组的转移结节则很稀少(图 3)。计数结果表明, 10.0、20.0 mg/kg FAT-03 对 B16 肺转移的抑制率分别为 51.4% 和 63.7%, CY 为 44.0%, FAT-03 (10.0 mg/kg)+CY 为 88.1% (表 3)。腹腔注射 FAT-03 显著抑制 B16 细胞肺转移, 其抑制肿瘤转移作用优于 CY 并与之有协同作用。

Table 1 Effects of intraperitoneal injection of FAT-03 on primary tumor weight and body weight gain in Lewis lung carcinoma-inoculated BALB/c nude mice

Treatment	Dose [mg/(kg·d)]	Number of animals and body weight gain (g, $\bar{x} \pm s$)		Primary tumor weight (g, $\bar{x} \pm s$)	Inhibition (%)
		start	end		
Control	0	20.3±2.4	21.3±2.9	1.19±0.54	—
FAT-03	10.0×14	20.8±2.0	21.0±1.3	0.55±0.30*	53.8
FAT-03	20.0×14	21.6±1.9	22.7±2.0	0.46±0.11**	61.3
Cyclophosphamide	50.0×2	20.7±1.7	21.0±2.0	0.49±0.22**	58.8

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Student's *t*-test versus control. Cyclophosphamide (50 mg/kg) was injected intraperitoneally 1 and 7 days after the inoculation of tumor cells.

Table 2 Inhibitory effects of intraperitoneal injection of FAT-03 on the spontaneous liver metastases of Lewis lung carcinoma in BALB/c nude mice

Treatment	Dose [mg/(kg·d)]	Metastasis rate	No. of total metastatic foci ($\bar{x} \pm s$)	MIR (%)	No. of metastatic Foci (>3 mm) ($\bar{x} \pm s$)	MIR (%)
Control	—	8/8	95.0±38.3	—	71.6±32.8	—
FAT-03	10.0×14	6/8	59.5±34.4*	37.4	38.3±8.2*	46.5
FAT-03	20.0×14	5/8	22.3±21.6**	76.5	8.2±8.0**	88.5
Cyclophosphamide	50.0×2	6/8	33.7±26.0**	64.5	28.1±10.8**	60.8

MIR: metastasis inhibition rate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Student's *t*-test versus control. Cyclophosphamide (50mg/kg) was injected intraperitoneally 1 and 7 days after the inoculation of tumor cells.

Table 3 Inhibitory effects of intraperitoneal injection of FAT-03 on the experimental lung metastases of B16 melanoma in BALB/c nude mice

Treatment	Dose [mg/(kg·d)]	Metastasis rate	No. of total metastatic foci ($\bar{x} \pm s$)	MIR (%)	No. of metastatic Foci (>3 mm) ($\bar{x} \pm s$)	MIR (%)
Control	—	8/8	43.0±9.9	—	36.0±7.2	—
FAT-03	10.0×14	7/8	20.9±9.7*	51.4	15.1±9.1*	58.1
FAT-03	20.0×14	6/8	15.6±6.3**	63.7	10.6±8.3**	70.6
Cyclophosphamide	50.0×2	7/8	24.1±9.6*	44.0	16.0±9.8*	55.6
FAT-03+	10.0×14	4/8	5.1±1.3**	88.1	4.1±1.6**	88.6
Cyclophosphamide	50.0×2					

MIR: metastasis inhibition rate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Student's *t*-test versus control. Cyclophosphamide (50 mg/kg) was injected intraperitoneally 1 and 7 days after the inoculation of tumor cells.

2.5 免疫组化检测 LLC 组织 CD44 和 nm23-H1 的表达水平

免疫组化结果显示, CD44 对照组 LLC 细胞膜及细胞浆中出现大量褐黄色颗粒, 而在 FAT-03 组细胞

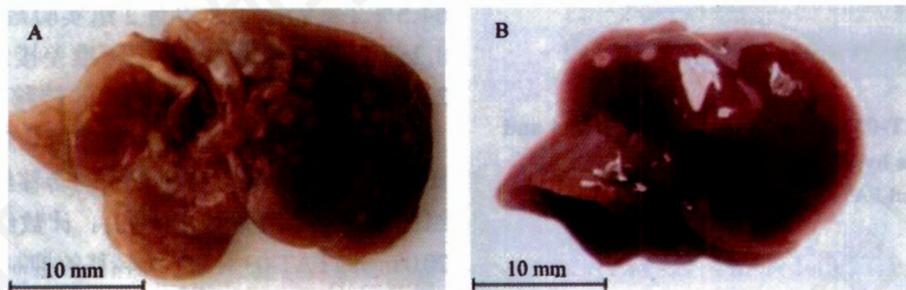


Fig.2 Effects of intraperitoneal injection of FAT-03 on the sponaneous liver metastases of LLC
A: control, dense grey metastatic foci of LLC; B: 20.0 mg/kg FAT-03, a few grey metastatic foci of LLC.

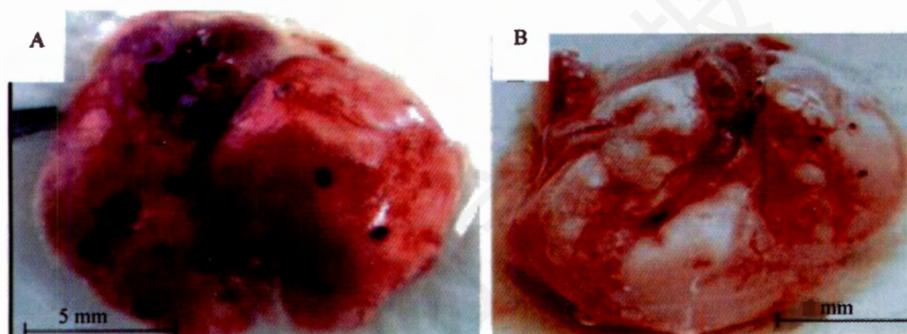


Fig.3 Effects of intraperitoneal injection of FAT-03 on the sponaneous liver metastases of B16
A: control, dense black metastatic foci of B16; B: 20.0 mg/kg FAT-03, a few black metastatic foci of B16.

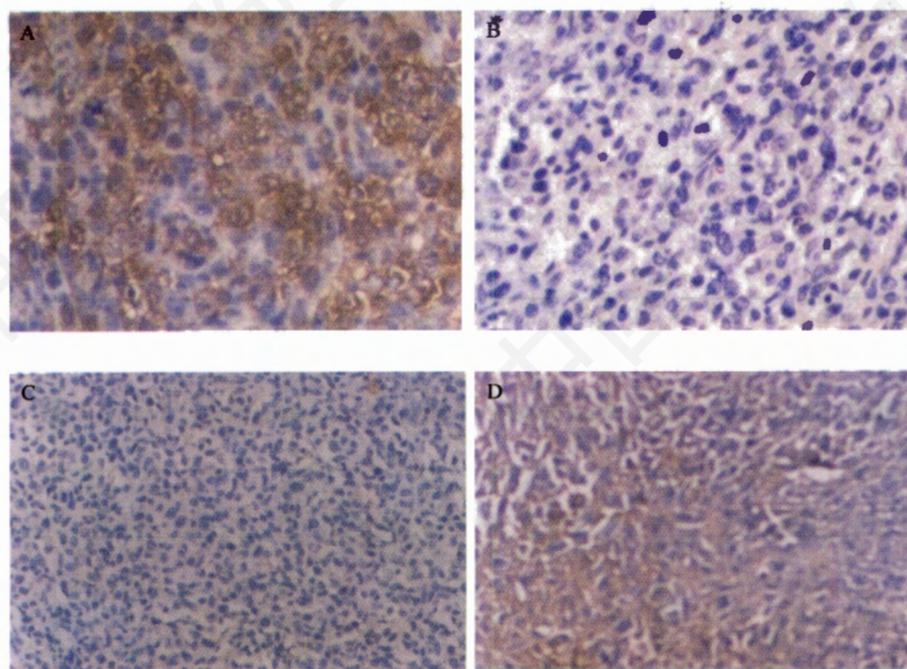


Fig.4 Effects of intraperitoneal injection of FAT-03 on the expressions of CD44 and nm23-H1 (SP, 200 \times) by immunohistochemistry protocol

A: control: CD44, +++; B: 20.0 mg/kg FAT-03, CD44, -; C: control: nm23-H1, -; D: 20.0 mg/kg FAT-03, nm23-H1, +++.

中类似颗粒则少见; nm23-H1 FAT-03 组 LLC 细胞浆着黄色(对照组细胞浆少见着色)。FAT-03 组 LLC 细胞中促转移基因 CD44 的阳性细胞百分率仅为 3.9% (对照组为 50.6%, $P < 0.01$); 抑转移基因 nm23-H1 的阳性细胞百分率为 53.5% (对照组仅为 3.0%, $P < 0.01$)。这些结果提示腹腔注射 FAT-03 下调 CD44 的表达, 上调 nm23-H1 的表达(图 4)。

3 讨论

海洋生物物种及其所含物质的多样性和特异性使海洋成为天然药物的巨大资源宝库, 具有极大的开发潜力。已报道的海洋来源的肿瘤血管生成抑制剂有二十多种。FAT-03 是我们课题组首次从湛江近海捕获的赤魃组织中分离得到的具有强抗血管生成活性和强抗肿瘤生长和转移作用的单一成分。目前课题组正对 FAT-03 的作用机制和靶点进行深入研究, 并试图确定其抗血管生成活性的功能域。

BALB/c 小鼠皮下接种 LLC 细胞, 成瘤率高, 并可发生自发性肺和 / 或肝转移。BALB/c 小鼠尾静脉接种 B16 细胞, 可发生实验性肺和 / 或肝转移。本研究结果显示, BALB/c 裸小鼠皮下接种 LLC 细胞发生自发性肝转移, 这与 Nakamura 等^[10]的实验结果一致。荷瘤裸小鼠连续腹腔注射 FAT-03 [10.0, 20.0 mg/(kg·d)] 14 天, 对 LLC 生长的抑制率分别为 53.8% 和 61.3%, 对 LLC 细胞自发性肝转移的抑制率分别为 37.4% 和 76.5%。BALB/c 小鼠尾静脉接种 B16 细胞, 可发生实验性肺转移。裸小鼠连续腹腔注射 FAT-03 [(10.0, 20.0 mg/(kg·d))] 14 天, 对 B16 细胞实验性肺转移的抑制率分别为 51.4% 和 63.7%, 并与 CY 有协同作用。

肿瘤转移是一个多因素、多步骤的生物学过程, 大体上可分为三个基本步骤: 原发灶肿瘤细胞通过与基底膜表面整合素、非整合素受体等结合而粘附其上; 接着释放多种基质蛋白酶, 降解由细胞间质与基底膜组成的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的成分, 打破 ECM 的动态平衡; 最后穿越 ECM 破损处, 侵入局部血管、淋巴管, 在远端位突破毛细血管形成“种子”, 长出新生血管, 供给瘤体营养, 最终形成新转移灶。此三个基本步骤可循环反复、不断演进。根据我们已经得到的实验结果似乎可以认为, FAT-03 作用于肿瘤转移的多个环节, 它不仅抑制肿瘤细胞的粘附、运动能力, 抑制 MMP-9 的分泌及其活性^[7], 抑制肿瘤血管生成^[6], 而且还有下调促癌转移基因 CD44 和上调抑癌转移基因 nm23-H1 的

表达的作用。

细胞表面分子 CD44 是分布极为广泛的细胞表面跨膜糖蛋白, 定位于染色体 11p13, 最初由 Dalchau 等^[11]用单克隆抗体技术检测并确定。Stamenkovic 等^[12]根据外显子表达方式不同分为标准型(CD44S)和变异型(CD44V)两种。CD44 分子正常情况下主要参与淋巴细胞的激活及细胞与细胞之间, 细胞与基质之间的特异性粘连过程。CD44 的变异性表达与肿瘤转移的关系是最近几年来肿瘤研究的热点^[13,14]。

Steeg 等^[15]根据 nm23 基因在 7 个转移潜力不同的 K-1735 小鼠黑色素细胞瘤细胞株中表达不同, 用减交叉法将此种基因分离出来。高转移细胞株的 nm23 mRNA 产生比低转移细胞株少 10 倍, 这表明 nm23 基因在高转移细胞中表达低, 提示它可能具有转移抑制功能。已发现两种人类 nm23 基因, 即 nm23-H1 和 nm23-H2^[16], nm23-H1 的 mRNA 水平与肿瘤转移的相关性更强^[17]。CD44v6 和 nm23-H1 共同调节肺癌的转移过程, CD44v6 表达水平与肺癌淋巴结转移呈正相关^[18], nm23-H1 表达水平与肺癌淋巴结转移呈负相关^[19]。本研究结果显示, 无论体外还是体内 FAT-03 都下调 LLC 细胞(组织)促癌转移基因 CD44 的表达, 上调抑癌转移基因 nm23-H1 的表达。

总之, FAT-03 对肿瘤的生长和转移具有抑制作用, 这种抑制作用与其对肿瘤血管生成、肿瘤细胞的粘附和迁移、胶原酶分泌和活性的抑制作用, 以及下调促转移基因 CD44、上调抑转移基因 nm23-H1 的表达有关, 提示 FAT-03 可能是一个以肿瘤血管、肿瘤转移相关基因为作用靶点、有抑制肿瘤生长和阻止癌转移活性的蛋白质。

参考文献(References)

- 1 苏伟明, 马润娣, 于立坚. 赤魃尾刺提取物的抗肿瘤作用. 广东海洋大学学报 2007; 27(6): 84-5.
- 2 廖铭能, 于立坚, 马润娣, 苏伟明, 黄来珍. 赤魃组织粗提物的抗肿瘤作用. 广东海洋大学学报 2008; 28(1): 53-6.
- 3 苏伟明, 于立坚, 马润娣, 廖铭能, 黄来珍. 从赤魃组织中分离到的福安肽的抗肿瘤活性的初步研究. 中国生化药物杂志 2008; 29(1): 9-11.
- 4 廖铭能, 于立坚, 马润娣, 苏伟明, 黄来珍. 从赤魃组织中分离到的福安肽的抗血管生成作用. 中国生化药物杂志 2008; 29(4): 217-20.
- 5 苏伟明, 马润娣, 于立坚, 张永平, 廖铭能, 黄来珍. 一种新的源自赤魃的强血管生成抑制剂福安泰-03 的分离和鉴定. 中国生物化学与分子生物学报 2009; 25(9): 849-54.
- 6 于立坚, 马润娣, 廖铭能, 苏伟明, 黄来珍, 于廷曦. 福安泰-03 对肿瘤血管生成的抑制作用. 中国药理学通报 2008; 24(11): 1445-9.

- 7 廖铭能, 徐海瑛, 马润娣, 于立坚, 苏伟明, 黄来珍. 福安泰-03 对高转移人卵巢癌细胞 HO-8910PM 侵袭能力的影响. 细胞生物学杂志 2009; 31(3): 384-8.
- 8 Chen JQ, Zhan WH, He YL, Peng JS, Wang JP, Cai SR, *et al.* Expression of heparanase gene, CD44v6, MMP-7 and nm23 protein and their relationship with the invasion and metastasis of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2004; 10(6): 776-82.
- 9 Shi ZR, Itzkowitz SH, Kim YS. A comparison of three immunoperoxidase techniques for antigen detection in colorectal carcinoma tissues. *J Histochem Cytochem* 1988; 36(3): 317-22.
- 10 Nakamura K, Yamaguchi Y, Kagota S, Kwon YM, Shinozuka K, Kunitomo M. Inhibitory effect of Cordyceps sinensis on spontaneous liver metastasis of Lewis lung carcinoma and B16 melanoma cells in syngeneic mice. *Jpn J Pharmacol* 1999; 79(3): 335-41.
- 11 Dalchau R, Kirkley J, Fabre JW. Monoclonal antibody to a human brain-granulocyte-T-lymphocyte antigen probably homologous to the W3/13 antigen of the rat. *Eur J Immunol* 1980; 10(10): 745-9.
- 12 Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, Seed B. The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *Eur J Cell Biol* 1991; 10(2): 343-8.
- 13 赵 研. Myc 基因表达和 CD44 分子在喉癌淋巴结转移的意义. 黑龙江医学 2002; 26(10): 757-760.
- 14 Arch R, Wirth K, Hofmann M, Ponta H, Matzku S, Herrlich P, *et al.* Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* 1992; 257(5070): 682-5.
- 15 Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, *et al.* Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80(3): 200-4.
- 16 Stahl JA, Leone A, Rosengard AM, Porter L, King CR, Steeg PS. Identification of a second human nm-23 gene, nm23-H2. *Cancer Res* 1991; 51(1): 445-9.
- 17 Yi S, Guangqi H, Guoli H. The association of the expression of MTA1, nm23H1 with the invasion, metastasis of ovarian carcinoma. *Chin Med Sci J* 2003; 18(2): 87-92.
- 18 Wang FL, Wei LX. Expression of CD44 variant exon 6 in lung cancers. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2001; 23(4): 401-2.
- 19 Tomita M, Ayabe T, Matsuzaki Y, Onitsuka T. Expression of nm23-H1 gene product in mediastinal lymph nodes from lung cancer patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001; 19(6): 904-7.

Effects of Intraperitoneal Injection of Fuantai-03 on Metastasis-related Genes and Metastasis in Mouse Lewis Lung Carcinoma and B16 Melanoma

Lai-Zhen Huang, Chang-Xiu Wang, Run-Di Ma, Li-Jian Yu*, Wei-Ming Su, Ming-Neng Liao, Ting-Xi Yu*

(Key Laboratory of Marine Materia Medica, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract Western blot analysis and immunohistochemistry protocol were performed to assay the expressions of CD44 and nm23-H1; mouse Lewis lung carcinoma (LLC), a spontaneous tumor metastasis model, and mouse B16 melanoma (B16), a experimental tumor metastasis model, were utilized to study the effects of intraperitoneal (ip) injection of Fuantai-03 (FAT-03) on cancer metastasis. The results showed that FAT-03 resulted in down-regulation of expression of CD44, and up-regulation of expression of nm23-H1 *in vitro* and *in vivo*, and that the growth inhibition rates of primary tumors of LLC in the FAT-03 [10.0, 20.0 mg/(kg-d), ip, for 14 days]-administered mice were 53.8% and 61.3% [vs 58.8% of cyclophosphamide (CY)], and the liver metastasis inhibition rates (MIR) of LLC were 37.4% and 76.5% (vs. 64.5% of CY), and the lung MIR of B16 were 51.4% and 63.7% (vs 44.0% of CY, and 88.1% of 10.0 mg/kg FAT-03+CY), respectively. These observations qualify FAT-03 as an interesting lead component to prevent cancer metastasis; FAT-03-induced change of expressions of metastasis-related genes may be partially responsible for its inhibitory effect on metastasis.

Key words *Dasyatis akaje*; Fuantai-03; cancer metastasis; Lewis lung carcinoma; metastasis-related genes

Received: October 13, 2009 Accepted: March 9, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30271493), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No.021386), and the Major Project of Guangdong Provincial Oceanic and Fishery Administration (No.A200099B01)

*Corresponding author. Tel: 86-759-2362480, Fax: 86-759-2382424, E-mail: ywyj9578@sohu.com, yutingxi@yahoo.com