

固本消瘤胶囊抑制小鼠 Lewis 肺癌生长 及抗血管生成研究

杨国旺¹, 王笑民¹, 王 征², 彭瑞云³, 高亚兵⁴, 王晓民⁴

(1 北京中医医院, 北京 100010; 2 中国医学科学院肿瘤研究所, 北京 100021;
3 军事医学科学院二所, 北京 100850)

摘要: 目的: 探讨中药固本消瘤胶囊对小鼠 Lewis 肺癌抑瘤作用及机制。方法: 体内动物实验观察小鼠肿瘤生长; 免疫组化染色 S-P 法、病理彩色图像定量分析法检测小鼠肿瘤组织中微血管密度(MVD)、血管内皮生长因子(VEGF)表达。结果: 中药组、化疗组、中药加化疗组对小鼠 Lewis 肺癌抑制率分别为 40.5%、52.69%、61.09%, 与对照组比较有显著差异($P < 0.01$)。中药组、中药加化疗组 MVD、VEGF 表达水平以及化疗组 MVD 水平明显下降。结论: 固本消瘤胶囊对小鼠 Lewis 肺癌有明显抑制作用, 能够抗肿瘤新生血管生成。

关键词: 固本消瘤胶囊; 肺癌; 免疫组化

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)05-0050-03

Inhibitory Effect and Antiangiogenesis of Gubenxiaoliu Capsule on Lewis Lung Carcinoma of Mouse

YANG Guo-wang¹, WANG Xiao-min¹, WANG Zheng², PENG Rui-yun³, GAO Ya-bing³, WANG Xiao-min³

(1 Beijing Hospital of TCM, Beijing 100010, China;

2 Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China;

3 Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Objective: To explore the inhibitory effect of tumor growth and antiangiogenesis of Gubenxiaoliu capsule (GC) on Lewis lung carcinoma of mouse. Methods: In vivo animal experiment was used to investigate the growth of mouse tumor. Immunohistochemically (S-P) and quantitative pathologic image analysis were used to investigate the microvessel density (MVD) and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in tumor tissue. Results: The inhibitory rates on mouse tumor of GC group, Chemotherapy group and GC+ Chemotherapy group are 40.58%, 52.69%, 61.09% respectively. The inhibitory rates are significantly higher than the control. MVD and expression of VEGF of GC group and GC+ Chemotherapy group and MVD of Chemotherapy group decreased significantly. Conclusion: GC could inhibit the growth and angiogenesis of Lewis lung carcinoma of mouse.

Key words: Gubenxiaoliu capsule; lungcancer; immunohistochemistry

固本消瘤胶囊是纯中药复方制剂, 主要用于治疗中晚期非小细胞肺癌, 临床研究显示该药能改善症状, 提高免疫功能, 延长生存期。为进一步证实其客观疗效并研究其作用机制, 我们选用小鼠 Lewis 肺癌模型, 观察该药对肿瘤抑制作用; 进一步检测肿瘤组织中微血管密度 (MVD) 及血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达, 了解该药对肿瘤血管生成的影响。

1 材料与方法

1.1 试验药物 环磷酰胺, 200mg/支, 上海华联制药有限公司生产 (批号 011215)。固本消瘤胶囊由龙葵 20g, 冬虫夏草 10g, 灵芝 30g, 仙灵脾 15g, 浙贝母 15g, 西洋参 10g, 生薏米 15g, 水蛭 6g, 全蝎 6g 等九味中药组成。实验所用制剂由本院制剂室完成, 虫草、水蛭超微粉碎, 其余药物水提 2 次, 终浓度为 1g 生药/mL。每剂药水提液为 111mL, 粉剂为 16g。动物实验时将两部分混合, 制成混悬液, 加入蒸馏水至 127mL, 则调整后药物浓度为 1g 生药/mL。

1.2 实验动物及瘤株 C57BL 小鼠 (二级实验动物, 40 只, 18~22g, 雄性) 由中国医学科学院实验动物中心提供 (合格证号: scxk11-00-0006)。Lewis 肺癌瘤株由中国医学科学院肿瘤医院研究所传代提供。

1.3 试剂 抗第 VIII 因子抗原多克隆抗体、VEGF 单克隆抗体 S-P 免疫组化试剂盒均购自北京中山生物技术公司。

1.4 方法

1.4.1 抑瘤实验方法 取接种后第八天肿瘤生长良好的荷 Lewis 肺癌瘤株小鼠, 拉断颈椎处死小鼠, 在无菌条件下剥离肿瘤, 选择新鲜无坏死的瘤组织,

制备成细胞浓度为 1×10^7 mL 的细胞悬液。取 40 只实验小鼠, 将细胞悬液接种于小鼠右侧腋窝皮下, 0.2mL/只。次日随机分组, 每组 10 只, 开始给药。对照组以生理盐水 0.8mL 灌胃 (po); 中药组以固本消瘤胶囊 0.8mL 灌胃 (相当于 40g/kg); 化疗组以环磷酰胺盐水溶液腹腔注射 (ip), 剂量为 30mg/kg; 中药加化疗组同时进行中药灌胃和环磷酰胺腹腔注射, 剂量同上。均每天一次, 共 14 次 (化疗为 10 次), 第 15 天处死小鼠, 剥离肿瘤, 称瘤重, 随后以 10% 甲醛固定肿瘤, 石蜡包埋。抑瘤率计算公式如下:

$$\text{肿瘤生长抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

1.4.2 免疫组化染色 采用 S-P 法。石蜡标本 4μm 连续切片, 二甲苯及梯度酒精脱蜡至水, 3% 过氧化氢甲醇封闭内源性过氧化物酶, VEGF 用微波抗原修复, 第 VIII 因子采用胃酶抗原修复; 染色步骤按试剂盒内说明进行, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 中性树胶封片。以 TBS 代替一抗作为阴性对照, 已知阳性切片作为阳性对照。

1.4.3 结果判定 MVD 计数采用 Weidner 方法^[1], 低倍镜下寻找新生血管最密集区, 然后在 400 倍视野下, 对每张标本在肿瘤区域内选择 3 个高密度血管区。VEGF 以肿瘤细胞胞浆内出现棕黄或深黄色颗粒作为阳性判定标准, 每张切片随机选取 5 个视野。应用彩色病理图像分析系统 (CMAS) 对 MVD、VEGF 进行积分光密度指标 (IOD) 定量分析检测, 并计算其均值, 以此代表单位面积内 MVD、VEGF 相对含量。

1.4.4 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 固本消瘤胶囊对 Lewis 肺癌抑瘤及化疗增效的影响 固本消瘤组肿瘤抑制率为 40.58%,与对照组比较有显著差异($P < 0.01$),显示出明显的抑瘤活性;中药加化疗,抑瘤率较单纯化疗有所提高,但统计学无差异($P > 0.05$)结果见表 1。

表 1 口服固本消瘤及合并 CTX 对小鼠 Lewis 肺癌的抑瘤活性($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	给药方式	平均瘤重(g)	抑制率(%)
对照组	40	po	2.691 $\pm$ 0.70	
化疗组	30mg	ip	1.273 $\pm$ 0.36	52.69 ²⁾
中药组	40	po	1.599 $\pm$ 0.31	40.58 ¹⁾
中药+ 化疗组	40+ 30mg	po+ ip	1.047 $\pm$ 0.19	61.09 ²⁾

注:与对照组比较: ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$ 。

2.2 固本消瘤胶囊对小鼠 Lewis 肺癌 MVD、VEGF 表达的影响 免疫组化结果显示,中药组、中药加化疗组肿瘤组织中 MVD、VEGF 表达较对照组显著下调,化疗组 MVD 含量有明显下降,但 VEGF 表达与对照组比较无统计学差异,结果见表 2。

表 2 小鼠 Lewis 肺癌肿瘤组织中 MVD、VEGF 表达的定量分析($\bar{x} \pm s$)

组别	标本数(张)	VEGF	MVD
对照组	8	16.11 $\pm$ 4.71	31.81 $\pm$ 16.21
化疗组	8	13.59 $\pm$ 4.11	18.95 $\pm$ 11.87 ¹⁾
中药组	9	11.36 $\pm$ 2.95 ²⁾	12.95 $\pm$ 6.81 ¹⁾
中药+ 化疗组	8	12.01 $\pm$ 4.57 ²⁾	15.63 $\pm$ 12.75 ¹⁾

注:与对照组比较: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

中医学认为肺癌主要由于脏腑虚损、血瘀痰凝毒结而成。根据我们长期临床观察,大部分中晚期肺癌病人均不同程度存在气虚血瘀证^[2],因此,益气活血成为肺癌主要治疗法则。固本消瘤胶囊由西洋参、冬虫夏草、全蝎、水蛭、浙贝母等组成,温而不燥,滋而不膩,共同起到益气培本、活血散结之功效,调节阴阳平衡,维持内环境稳定。本动物实验证明该药有明确的抑瘤作用。

大量研究表明,恶性肿瘤组织的微血管密度较良性肿瘤组织及正常粘膜组织为高。肿瘤血管生成是肿瘤细胞生长和转移的基础,没有营养血管的支持,肿瘤直径一般不会超过 2cm^[3]。许多学者认为 MVD 在反映肿瘤预后方面是一个独立而且重要的因素,高 MVD 往往提示易发生转移和预后不良。在众多与肿瘤血管生成相关的细胞因子中,VEGF 被认为是主要因子之一,其生物学特性主要表现在两方面:增加微血管的通透性和特异性的与血管内皮细胞受体结合;促进血管内皮细胞的分裂和增殖,进而导致新生血管的生成^[4]。有研究发现,应用 VEGF 抗体能够抑制实体瘤生长和转移^[5]。多数研究表明,肿瘤组织中 MVD 与 VEGF 表达呈明显正相关,本项实验结果也证明这一点。研究表明,中药组及中药加化疗组 VEGF、MVD 表达水平均较对照组低,提示固本消瘤胶囊可能通过下调 VEGF 表达,进而抑制肿瘤血管生成而发挥抑瘤作用。由于中药复方成分复杂,其具体有效部位以及其它作用机制目前正在研究中。

参考文献:

[1] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel, density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. Breast Cancei Res Treat, 1995, 36(1) : 169-173.

[2] 王笑民,郁仁存,王禹堂,等. 晚期非小细胞肺癌患者气虚血瘀证的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1994, 14 (12) : 724-725.

[3] Tsao MS, Liu N, Nicklee T. et al. Angiogenesis correlates with vascular endothelial growth factor expression but not with K-ras oncogene activation in non-small cell lung carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 1997, 3(10) : 1807-1814.

[4] 初同伟,王正国,朱佩芳. 血管内皮生长因子的基础及临床应用研究[J]. 中国临床康复, 2002, 6(4) : 570-571.

[5] 张曼,周爱儒. 血管内皮生长因子的功能[J]. 应用生理科学进展, 1996, 27(3) : 255-257.