

Smad7 表达, 阻止 TGF- β 刺激所致的肝星状细胞 (HSC) 活化及胶原形成。

TGF- β 是组织修复和肝纤维化的重要细胞因子, 调控 HSC 的活化、增殖^[3]。TGF- β 表达增加, 介导 HSC 产生细胞外基质 (ECM), 抑制肝细胞 DNA 合成, 导致肝纤维化的产生。抑制型 Smad6, Smad7 是细胞中 T β R I 型受体丝氨酸/苏氨酸激酶的拮抗蛋白, 可阻止 Smad2, Smad3 磷酸化, 从而阻断 TGF- β 的信号转导过程, 在 TGF- β 信号转导中构成负反馈调节环路^[4]。在肝纤维化模型组大鼠肝内抑制性 Smad7 明显减少, 同时具有促纤维化作用的 Smad3 表达增加, 其增加与减少程度与肝内纤维化多少呈正相关。正常情况下, TGF- β 可快速诱导 Smad7 的表达^[5], 但在肝纤维化大鼠中, 由 HSC 转化的成纤维细胞失去 TGF- β 诱导下的 Smad7 表达上调敏感性, 而 Smad2, Smad3 表达增加, 促使肝纤维化进程。金三莪治疗后的肝纤维化大鼠 TGF- β 在肝内表达明显降低, 表达量接近正常组, 显示该药抗肝纤维化作用与抑制 TGF- β 过度表达及抑制 HSC 活化有关; 治疗后的大鼠肝内 Smad7 表达增加并接近正常组, 而 Smad3 表达减少, 进一步说明该方剂能抑制 Smad3 而明显促进 Smad7 的表达, 后者负反馈调节 TGF- β 的胞内信号传递, 阻止 HSC 的活化及信号放大, 发挥抗肝纤维化作用。C 组 A/G 比值升高并与 A 组比较差异无显著性, 证明该方剂具有促进白蛋白合成, 改善肝脏生理功能的作用。HA 由间质细胞合成, 绝大多数存在于组织间隙或结缔组织中, 与肝纤维化程度符合率最高^[6]。血中 HA 被肝窦内皮细胞 (SECs) 摄取^[7], 活化的 SECs 能分

泌 HA 的受体 CD44, 通过受体循环通路, 在溶酶体内降解成乙酸和乳酸。低水平的 CD44 mRNA 表达水平与血清持续性高水平的 HA 密切相关, 可提示 SECs 功能不足。HA 有协同胶原聚合、沉积, 激活 HSC 与肝细胞的作用。本实验中模型组大鼠血清 HA 增高, 而金三莪治疗后大鼠血清 HA 水平降低, 是否与该方剂促进 SECs 分泌 CD44, 增强对 HA 结合转化有关, 尚待进一步研究证实。

References

- [1] Wang YQ, Ikeda K, Ikebe T, *et al*. Inhibition of hepatic stellate cell proliferation and activation by the semisynthetic analogue of fumagillin TNP-470 in rats [J]. *Hepatology*, 2000, 32(5): 980-989.
- [2] Hepatic Fibrosis Study Group of Chinese Liver Diseases Association. Consensus on evaluation of the diagnosis and efficacy of hepatic fibrosis [J]. *Chin J Hepatology* (中华肝脏病杂志), 2002, 10(5): 327-328.
- [3] Nieto N, Friedman S L, Cederbaum A I. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species [J]. *Hepatology*, 2002, 35(1): 62-73.
- [4] Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, *et al*. Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury [J]. *Hepatology*, 2002, 35(1): 49-61.
- [5] Dooley S, Delvoux B, Streckert M, *et al*. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during *in vitro* progression to myofibroblasts. TGF beta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells [J]. *FEBS Lett*, 2001, 502(1-2): 4-10.
- [6] Patel K, Lajoie A, Heaton S, *et al*. Clinical use of hyaluronic acid as a predictor of fibrosis change in hepatitis C [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18(3): 253-257.
- [7] Saegusa S, Isaji S, Kawarada Y. Changes in serum hyaluronic acid levels and expression of CD44 and CD44 mRNA in hepatic sinusoidal endothelial cells after major hepatectomy in cirrhotic rats [J]. *World J Surg*, 2002, 26(6): 694-699.

川芎嗪和丹参对小鼠 Lewis 肺癌生长的抑制作用与抑制血管生成的关系

陈 刚¹, 徐晓玉¹, 严鹏科², 廖端芳^{2*}

(1. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 400050; 2. 南华大学 药理教研室, 湖南 衡阳 410016)

摘要: 目的 观察川芎嗪注射液 (TMP)、丹参注射液对小鼠 Lewis 肺癌生长和转移及肿瘤血管生成的影响。方法 用 C57BL 小鼠 Lewis 肺癌模型, 分别给 TMP 50, 100, 200 mg/(kg·d), 丹参注射液 5, 10, 20 g/(kg·d), 共 21 d, 检测小鼠 Lewis 肺癌移植瘤体积、质量、肺转移灶数、肿瘤微血管密度 (MVD) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达。结果 与模型组相比, TMP 组小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的体积、质量、肺转移灶数、肿瘤 MVD 和 VEGF 的表达均显著降低; 丹参组与模型组比较差异无显著性。结论 TMP 可抑制小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的生长和转移, 其作用机制与抑制 VEGF 的表达、抑制血管生成有关。丹参对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的生长和转移无明显影响。

* 收稿日期: 2003-07-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (300070915)

作者简介: 陈 刚 (1974—), 男, 湖南省长沙市人, 重庆医科大学在读博士, 主要从事中药药理研究。Tel: (023) 68733591

关键词: 川芎嗪; 丹参; Lewis 肺癌; 微血管密度; 血管内皮生长因子

中图分类号: R 286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)03-0296-04

Relationship between effect of tetramethylpyrazine and Danshen on inhibiting Lewis lung carcinoma growth and tumor angiogenesis

CHEN Gang¹, XU Xiao-yu¹, YAN Peng-ke², LIAO Duan-fang²

(1. School of Chinese Traditional Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400050, China; 2. Department of Pharmacology, Nanhua University, Hengyang 410016, China)

Abstract: **Object** To investigate the effects of tetramethylpyrazine (TMP) and Danshen (DS) on the growth and metastasis of Lewis lung carcinoma and tumor angiogenesis. **Methods** C₅₇BL mice with Lewis lung carcinoma were used in this study, which were injected respectively with TMP injection 50, 100, and 200 mg/(kg·d) and DS injection 5, 10, and 20 g/(kg·d), ip, for 21 days. Then the volume, weight, and numbers of the metastatic foci on lungs, tumor microvessel density (MVD) were determined, the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) of Lewis lung carcinoma was observed. **Results** TMP could remarkably reduce the volume, weight, and numbers of the metastatic foci, MVD, and the expression of VEGF of Lewis lung carcinoma. But DS did not show remarkably effect on Lewis lung carcinoma. **Conclusion** TMP can remarkably inhibit the growth and metastasis of Lewis lung carcinoma on mice, and its mechanism might be relative to inhibiting the expression of VEGF and angiogenesis. DS injection has no remarkably effect on Lewis lung carcinoma.

Key words: tetramethylpyrazine (TMP); Danshen (DS); Lewis lung carcinoma; microvessel density (MVD); vascular endothelial growth factor (VEGF)

研究表明,恶性肿瘤的无限制侵袭性生长及其转移均依赖于血管生成,抑制血管生成能够显著抑制肿瘤的生长和转移^[1]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种高效、特异地作用于血管内皮细胞的促血管生长因子,VEGF与肿瘤的生长和转移密切相关^[2]。既往研究表明,川芎嗪可以抑制肿瘤的生长,其机制与川芎嗪提高免疫功能密切相关^[3]。丹参素在无血清培养液中能明显抑制胃腺癌细胞的生长并在实验范围内有较好的剂量依赖关系^[4]。本实验探讨了川芎嗪注射液和丹参注射液对小鼠Lewis肺癌生长和转移的影响及其与肿瘤血管生成和VEGF表达的关系。

1 材料与方法

1.1 药品与主要试剂:盐酸川芎嗪注射液(TMP,无锡市第七制药厂,40 mg/2 mL,批号9803161);丹参注射液(DS,正大青春宝药业有限公司,每支10 mL,相当于原生药15 g,批号0101156);硫酸鱼精蛋白注射液(上海生物化学制药厂,50 mg/5 mL,批号000609);Ⅷ因子、VEGF抗体(Santa Cruze公司);SABC免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。其余试剂均为市售分析纯。

1.2 模型制备^[5]与分组给药:取接种Lewis肺癌10~14 d的C₅₇BL荷瘤小鼠(购自中国科学院上海药物研究所),脱颈椎处死,无菌条件下取瘤组织,按

肿瘤质量(g)与生理盐水(mL)1:3制备匀浆液备用。另取C₅₇BL小鼠(18~20 g,购自中国医学科学院动物繁殖所)80只,雌雄各半,随机分为8组:TMP 50, 100, 200 mg/(kg·d) 3个剂量组;丹参注射液 5, 10, 20 g/(kg·d) 3个剂量组;鱼精蛋白 60 mg/(kg·d)组;生理盐水组。各组小鼠于右腋皮下接种匀浆液,每只0.2 mL。各组接种后第2天开始给药,TMP及丹参各剂量组分别ip相应药物,生理盐水组ip生理盐水,每只0.2 mL,每日1次,连续21 d;鱼精蛋白组于接种后第2天按60 mg/kg sc 1次,第3天起每12 h sc 1次,连续20 d。第22天脱颈椎处死各组小鼠进行指标检测。

1.3 一般检测:接种前和接种后每3 d称1次体重,按体重变化调整给药。接种后每3 d测量1次荷瘤小鼠肿瘤最长径(a)和最短径(b),计算肿瘤体积($V = 0.5ab^2$),绘制肿瘤生长曲线。第22天脱颈椎处死小鼠,取皮下肿块称质量,计算肿瘤抑制率。取双侧肺称质量,并计数各肺叶表面的癌转移灶数。

肿瘤生长抑制率 = (生理盐水组平均瘤质量 - 治疗组平均瘤质量) / 生理盐水组平均瘤质量 × 100%

1.4 免疫组织化学染色:取肿瘤组织,10%中性甲醛固定,常规脱水包埋,4 μm连续切片,抗Ⅷ因子抗体或抗VEGF抗体为I抗,阴性对照用磷酸盐缓冲液(PBS)代替I抗,按照试剂盒说明书进行SABC

法免疫组化染色。

1.5 MVD 和 VEGF 表达的检测: 对 I 抗为抗 VIII 因子抗体的切片依据 Weidner^[6] 标准对着染的血管进行密度分级。先在低倍镜 ($\times 40$) 下全面观察切片, 在肿瘤浸润区域选取血管内皮细胞染色清晰、背景对比良好、微血管数量最密集的视野, 在高倍镜 ($\times 200$) 下记录 6 个视野内的微血管数, 取其平均值作为 MVD 值。对 I 抗为抗 VEGF 抗体的切片选取阳性细胞密集区域, 在高倍显微镜 ($\times 400$) 下选取 20 个阳性细胞, 应用图像分析系统, 测定平均吸光度 (A) 值, 以此代表阳性细胞胞质单位面积内 VEGF 相对含量。

1.6 结果统计: 计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行单因素方差分析, 组间均值两两比较用 SHK 法, 均由统计软件包 (SPSS10.0) 完成。

2 结果

2.1 TMP、丹参对肿瘤生长的影响: 各组小鼠移植瘤生长曲线见图 1。用药 21 d 后, TMP 各剂量组、鱼精蛋白组肿瘤体积均显著小于生理盐水组 ($P < 0.05$); 丹参各剂量组肿瘤体积与生理盐水组相比, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。此结果表明: TMP 对 Lewis 肺癌小鼠移植瘤生长有明显抑制作用, 而丹参没有抑制作用。

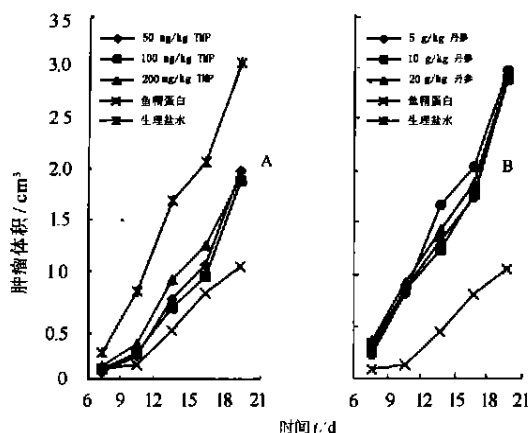


图 1 TMP (A) 和丹参 (B) 对小鼠 Lewis 肺癌生长的影响

Fig 1 Effect of TMP (A) and DS (B) on growth of Lewis lung carcinoma

2.2 TMP、丹参对肿瘤质量的影响: 见表 1。用药 21 d 后, TMP 各剂量组、鱼精蛋白组的肿瘤质量均显著低于生理盐水组 ($P < 0.05$)。丹参各剂量组的肿瘤质量与生理盐水组相比虽有减轻, 但差异不显著。结果表明: TMP 对 Lewis 肺癌小鼠移植瘤生长有明显抑制作用, 而丹参对此无明显作用。

2.3 TMP、丹参对肿瘤肺转移的影响: Lewis 肺癌

肺转移灶一般呈圆形小突起如疱状, 直径多数在 0.4~0.8 cm, 部分转移灶可融合在一起。用药 21 d 后, TMP 各剂量组和鱼精蛋白组的肺质量、肺转移灶数均显著低于生理盐水组 ($P < 0.05$), 见表 1。肺转移灶主要为单个分散于肺叶表面, 较少见到融合的转移灶。丹参各剂量组的肺质量和肺转移灶数均低于生理盐水组, 但差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。此结果表明: TMP 对 Lewis 肺癌小鼠移植瘤肺转移有明显的抑制作用, 而丹参有抗 Lewis 肺癌小鼠移植瘤肺转移的倾向。

表 1 TMP 和丹参对 Lewis 肺癌小鼠移植瘤质量、肺质量和肺转移灶数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effect of TMP and DS on weight of tumor and lung tissue, numbers of metastatic foci in mice with Lewis lung carcinoma ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 /(g · kg ⁻¹)	肿瘤质量 /g	抑制率 /%	肺质量 /g	转移灶 数/个
生理盐水	-	1.90 ± 0.16	-	0.23 ± 0.10	14.60 ± 6.86
TMP	0.050	1.03 ± 0.19*	45.8	0.17 ± 0.02*	7.11 ± 1.30*
	0.100	1.08 ± 0.15*	43.2	0.16 ± 0.02*	7.33 ± 1.63*
	0.200	1.08 ± 0.19*	43.2	0.18 ± 0.05*	9.70 ± 3.32*
丹参	5	1.73 ± 0.40	8.9	0.21 ± 0.02	13.52 ± 2.65
	10	1.73 ± 0.64	8.7	0.20 ± 0.03	13.67 ± 4.15
	20	1.80 ± 0.63	4.9	0.22 ± 0.12	13.50 ± 3.25
鱼精蛋白	0.060	0.80 ± 0.21**	57.9	0.16 ± 0.03**	6.80 ± 2.16**

与生理盐水组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs NS group

2.4 TMP、丹参对 MVD 和 VEGF 表达的影响: 显微图像分析表明肿瘤微血管内皮细胞被染成棕黄色, 微血管密集区多位于肿瘤细胞浸润的前缘部位, 肿瘤内部微血管密集区少于浸润的前缘部位。TMP 各剂量组、鱼精蛋白组 MVD 与生理盐水组比较显著降低 ($P < 0.05$), 丹参各组 MVD 与生理盐水组比较差异无显著性 ($P > 0.05$), 见表 2。VEGF 主要表达于肿瘤细胞内, 肿瘤细胞膜亦有少量阳性染色, 阳性染色的肿瘤细胞多位于浸润边缘, 某些血管内皮细胞呈弱阳性染色。结果表明: TMP 对 Lewis 肺癌移植瘤 MVD 和 VEGF 的表达均有显著抑制作用, 丹参无明显作用。

3 讨论

VEGF 是一种特异的血管内皮细胞刺激因子, 可与血管内皮细胞相应受体结合, 刺激血管内皮细胞增殖, 促进血管生成; 同时还可增强血管通透性, 为血管内皮细胞迁移及肿瘤细胞转移提供基础。研究表明, 多数肿瘤细胞都表达高水平的 VEGF, 抑制 VEGF 可有效抑制肿瘤的生长及转移^[2]。本实验结果显示, Lewis 肺癌在生长过程中高表达 VEGF,

表 2 TMP 和丹参对 Lewis 肺癌小鼠移植瘤组织 MVD 及 VEGF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of TMP and DS on MVD and expression of VEGF of tumor tissue in mice with Lewis lung carcinoma ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组 别	剂量/(g · kg ⁻¹)	MVD/(个 · 视野 ⁻¹)	VEGF (A 值)
生理盐水	-	27.17 ± 7.97	0.63 ± 0.08
TMP	0.050	14.32 ± 9.11*	0.45 ± 0.07*
	0.100	12.27 ± 11.19*	0.44 ± 0.06*
	0.200	13.01 ± 8.34*	0.51 ± 0.08*
丹参	5	25.44 ± 11.23	0.63 ± 0.05
	10	24.97 ± 8.85	0.61 ± 0.06
	20	26.99 ± 13.01	0.62 ± 0.05
鱼精蛋白	0.060	11.31 ± 12.24**	0.59 ± 0.06

与生理盐水组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs NS group

并形成了丰富的新生血管,从而促进了肿瘤的生长和肺转移。

肿瘤属于中医“瘰疬”范畴,运用活血化瘀法及其方药治疗肿瘤已被公认。但有关中药抗肿瘤机制中,抗血管生成的研究报道不多。本实验显示,在给予 TMP 治疗后, Lewis 肺癌的体积、质量、MVD 和肺转移灶数均显著降低,证明 TMP 有抗肿瘤生长和转移的作用。同时本研究首次表明, TMP 可抑制肿瘤血管生成,降低 MVD,抑制 VEGF 的表达,说明 TMP 抗肿瘤生长和转移的作用与其抑制肿瘤血管生成,降低肿瘤 MVD 密切相关,其确切机制很可能是通过抑制 VEGF 的表达来实现的。

实验结果还表明,给予鱼精蛋白后,虽然肿瘤的生长和转移均受到了显著抑制,但是肿瘤细胞分泌的 VEGF 与模型组相比并没有显著差异,这与既往的研究是一致的。鱼精蛋白作为一种抗血管生成剂,其机制并非是抑制 VEGF 的产生,而是阻碍 VEGF

与其受体结合而抑制 VEGF 的生物功能的实现^[7]。

睦建^[4]、张培彤^[8]等通过体外细胞实验证实,丹参素和丹参酮 II_A 均有一定的抗肿瘤活性。本实验所用的丹参注射液是以丹参素为主的水溶性成分,结果显示其对 Lewis 肺癌小鼠移植瘤生长和肺转移无明显抑制作用,对肿瘤 MVD 和 VEGF 的分泌亦无明显影响。这一现象再次表明,体外细胞实验与体内实体瘤模型实验存在着较大的区别。其原因可能是,体外实验的药物浓度通常较高,体内很难达到如此高浓度;体外实验影响因素单一,而体内用药干预因素较多等。动物实体瘤模型实验更接近于人体的实际情况,或许更有参考价值。

References

- [1] Folkman J. Angiogenesis in cancer vascular rheumatoid and other disease [J]. *Nat Med*, 1995, 1: 27-31.
- [2] Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis [J]. *Kidney Inter*, 1999, 56: 794-814.
- [3] Liu J R, Ye S B. Antimetastasis effect of tetramethylpyrazine to tumor and its mechanism [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1993, 7(2): 149-152.
- [4] Sui J, Lin F. Effect of Danshensu to adenocarcinoma NGCC cell [J]. *J Zhenjiang Med Coll* (镇江医学院学报), 1997, 7(4): 384-387.
- [5] O'Reilly M S, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma [J]. *Cell*, 1994, 79: 315-321.
- [6] Weidner N, Semple J P, Welch W R, et al. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma [J]. *New Engl J Med*, 1991, 324: 1-8.
- [7] Vaisman N, Gospodarowicz D, Neufeld G. Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265: 19461-19466.
- [8] Zhang P T, Pei Y X, Qi X, et al. Effects of certain drugs on the expression of antigens on human pulmonary giant cell carcinoma [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(5): 352-355.

益气平悬饮对艾氏腹水癌小鼠肿瘤浸润淋巴细胞杀伤活性的影响

黄立中, 伍参荣, 肖 雅, 何 欣, 唐小梅, 王大安*

(湖南中医学院, 湖南 长沙 410007)

摘 要: 目的 探讨益气平悬饮对肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor-infiltrating lymphocytes, TIL) 杀伤自体肿瘤细胞 (auto-tumor cells, ATC) 活性的影响。方法 取昆明种小鼠 40 只, 腹腔接种艾氏腹水癌瘤株 (EAC) 瘤液建立移植瘤模型, 接种次日随机分为 4 组: 益气平悬饮大、小剂量 (37.0, 18.5 g/kg) 组、环磷酰胺对照组、模型对照组。益气平悬饮大、小剂量组当日 ig 给药, 共给药 9 d, 环磷酰胺组 ip 环磷酰胺 75 mg/kg, 自接种第 3 日起, 隔日给药, 共

* 收稿日期: 2003-07-17

基金项目: 国家中医药管理局基金资助 (02-031P30); 湖南省自然科学基金资助 (01JJ2037)

作者简介: 黄立中 (1956—), 男, 河北抚宁人, 医学博士, 副教授, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事肿瘤的中医药防治研究。
E-mail: HLZ992002@163.com