

阿魏酸钠和白芍总苷对小鼠 H₂₂ 肿瘤生长与血管内皮细胞生长因子及增殖细胞核抗原表达的影响

徐晓玉¹, 陈伟海², 叶 兰³, 陈 刚⁴, 王淑美³, 胡益勇³

(1. 西南大学药学与中医药学院, 重庆 400715; 2. 重庆医药工业研究院有限公司 药理毒理评价中心, 重庆 400061; 3. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 400051; 4. 重庆工商大学 药物化学与化学生物学研究中心, 重庆 400067)

摘要:目的 探讨阿魏酸钠及白芍总苷对小鼠 H₂₂ 肿瘤生长及血管生成的影响。方法 昆明小鼠前腋下皮下接种小鼠 H₂₂ 肝癌细胞, 第2天 ip 阿魏酸钠 (200、100、50 mg/kg) 或 ig 白芍总苷 (200、100、50 mg/kg), 每3天测量1次肿瘤体积。用免疫组化法标记肿瘤血管及测定血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 及增殖细胞核抗原 (PCNA) 的表达。MTT 法检测阿魏酸钠对 H₂₂ 肿瘤细胞体外增殖的影响。结果 阿魏酸钠组小鼠 H₂₂ 肿瘤体积、质量增长明显较模型组缓慢 ($P < 0.05$), 同时阿魏酸钠组的肿瘤微血管密度及 VEGF、PCNA 阳性细胞较模型组显著减少 ($P < 0.05$), 阿魏酸钠对小鼠 H₂₂ 肿瘤细胞体外增殖无显著抑制作用。白芍总苷各剂量组的肿瘤生长、微血管密度、H₂₂ 肿瘤细胞增殖与模型组相比均无显著性差异。结论 阿魏酸钠可以显著抑制小鼠 H₂₂ 肿瘤的生长及血管生成, 且能抑制 VEGF 的表达。但在体外实验中不能抑制 H₂₂ 肿瘤细胞的增殖。白芍总苷尚不能被证明有抑制小鼠 H₂₂ 肿瘤生长的作用。阿魏酸钠对肿瘤组织 VEGF 表达的抑制作用可能是其抗 H₂₂ 肿瘤及抗血管生成的一个重要原因。

关键词: 阿魏酸钠; 白芍总苷; 肿瘤; 血管生成; VEGF

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)04-0570-04

Effect of sodium ferulate and total glucosides in paeony on tumor growth and expression of vascular endothelial growth factor and proliferating cell nuclear antigen in H₂₂ mice

XU Xiao-yu¹, CHEN Wei-hai², YE Lan³, CHEN Gang⁴, WANG Shu-mei³, HU Yi-yong³

(1. College of Pharmaceutics and Traditional Chinese Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Center of Pharmacology and Toxicology Evaluation, Chongqing Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Chongqing 400061, China; 3. College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400051, China; 4. Research Center of Pharmaceutical Chemistry and Chemobiology, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of sodium ferulate and total glucosides in paeony on tumor growth and angiogenesis in H₂₂ mice. **Methods** H₂₂ Cells were inoculated subcutaneously into anteroaxilla of KM mice. Animals were randomized for therapy on the second day and treated with ip sodium ferulate 200, 100, and 50 mg/(kg · d), or ig the total glucosides of paeony 200, 100, and 50 mg/(kg · d). The volume of tumor was measured at three days intervals. The expression of tumor microvessel, VEGF, and PCNA were examined by immunohistochemical staining. The proliferation of H₂₂ cells *in vitro* was examined by MTT assay. **Results** *In vivo*, the increase of tumor volume and weight in sodium ferulate group was obvious slower than that in model group ($P < 0.05$). The treatment with sodium ferulate inhibited the expression of VEGF ($P < 0.05$), leading to a decrease in microvessel density, which also decreased the positive cell of VEGF and PCNA ($P < 0.05$) within tumor. *In vitro*, sodium ferulate failed to inhibit the proliferation of H₂₂ cells. In addition, it can not be proved that those in the groups treated with total glucosides in paeony in every dosages are significantly different compared with the model group. **Conclusion** Sodium ferulate inhibits tumor growth, angiogenesis as well as VEGF expression significantly in H₂₂ mice. While total glucosides of paeony can not inhibit the tumor growth, angiogenesis as well as the VEGF expression in H₂₂ mice.

Key words: sodium ferulate, total glucosides in paeony; tumor; angiogenesis; VEGF

收稿日期: 2006-09-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (300070915)

作者简介: 徐晓玉 (1958—), 女, 四川人, 教授, 博士生导师, 主要从事活血化瘀及补益药的中药药理学研究, 主持国家自然科学基金等项目 8 项, 发表学术论文 60 余篇。Tel: (023)68251225 E-mail: xxy0618@sina.com

桃红四物汤是中医活血化瘀的经典方和代表方,既往研究发现桃红四物汤^[1]和主要成分之一川芎嗪^[2]有抗肿瘤及抑制肿瘤血管生成的作用。为了进一步探寻该方发挥作用的药效物质及其作用机制,本实验对桃红四物汤的另外两个主要成分阿魏酸钠及白芍总苷进行了抗肿瘤的活性研究。阿魏酸钠化学名称为3-甲氧基-4-羟基桂酸钠盐二水合物,为非肽类内皮素受体拮抗剂。阿魏酸钠主要用于动脉粥样硬化、冠心病、脑血管病、肾小球疾病、肺动脉高压、糖尿病性血管病变等心脑血管疾病。阿魏酸钠在体外对肿瘤细胞有抑制作用^[3],但尚未有抑制肿瘤生长的整体动物实验的报道。本实验研究阿魏酸钠、白芍总苷对H₂₂荷瘤小鼠肿瘤生长及肿瘤血管生成的抑制作用,并观察了两种药物对血管内皮细胞生长因子(VEGF)、增殖细胞核抗原(PCNA)表达的影响,旨在探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要药品、试剂及仪器:白芍总苷片,每片0.3 g,其中含芍药苷104 mg,购自三九集团(批号20011201);注射用阿魏酸钠,0.1 g/支,购自成都第一制药有限公司(批号031103);新生牛血清,购自杭州四季青公司。兔抗人CD34抗体、兔抗人PCNA抗体、兔抗人VEGF抗体,均购自Santa Cruz公司。DAB显色试剂盒、SP染色试剂盒,均购自美国ZYMED公司。

1.2 实验动物及细胞株:清洁级昆明小鼠,18~22 g,雄性,由重庆医科大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(渝)20020001,SPF条件饲养,实验动物使用许可证号:SYXK(渝)20020007。H₂₂小鼠肝癌细胞株,重庆医科大学检验系提供。

1.3 肿瘤模型制备及分组:昆明小鼠每只右前肢腋下皮下接种密度为 2×10^6 /mL的H₂₂细胞0.2 mL。随机分为7组,每组14只,从接种后第2天,每天定时给药。模型组每天ip生理盐水0.5 mL;阿魏酸钠(200、100、50 mg/kg)组,每天根据小鼠体重ip阿魏酸钠注射液;白芍总苷片(按白芍总苷计,200、100、50 mg/kg)组,每天根据小鼠体重ig白芍总苷溶液。连续给药14 d。从给药后第3天起开始测量肿瘤体积,每3天测量1次。肿瘤体积的计算方法参照文献方法^[4](肿瘤体积=0.523 6×长×宽)。

1.4 一般组织学处理:停药后第2天,处死小鼠,解剖并完整剥离出小鼠肿瘤,称质量,计算抑瘤率[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×100%]。

1.5 免疫组织化学法检测微血管密度(MVD)和VEGF、PCNA的表达:取新鲜肿瘤组织做石蜡切片,按免疫组化常规方法操作,SP染色。参照文献方法^[5]进行微血管计数。采用“热点”法计数,即在100倍低倍镜下,选取5个微血管密度最高的区域,400倍放大视野下,每一个着色的单个内皮细胞或细胞串计为一个微血管。血细胞和大的血管腔不计。VEGF计数方法:随机取10个400倍高倍镜视野,计数VEGF阳性细胞数总数。PCNA阳性细胞的计数方法:先用100倍镜观察全片,选取阳性率较高的5个视野,再换成400高倍镜计数,计算阳性细胞的平均数。

1.6 H₂₂细胞体外增殖实验:H₂₂细胞用含10% NBS PRMI-1640配为 1×10^4 /mL,96孔板每孔接种200 μ L,5% CO₂、37℃条件下培养24 h后,1 000 r/min离心2 min,弃原培养基,各组加入以下质量浓度的含阿魏酸钠培养液:10、20、40、80、160 μ g/mL,对照组不含阿魏酸钠,每组6孔。培养48 h后,1 000 r/min离心2 min,弃原培养液,每孔加入200 μ L无血清培养液及20 μ L MTT,继续培养4 h后。1 000 r/min离心2 min,弃原培养液,每孔加入二甲亚砜(DMSO)200 μ L,震荡5 min,在全自动酶标仪中选择590 nm波长测各孔吸光度(A)值。

1.7 统计学处理:各实验组与对照组各项指标中的计量资料采用 t 检验分析组间差异,全部统计分析采用SPSS 10.0统计软件进行。

2 结果

2.1 阿魏酸钠、白芍总苷对肿瘤生长的影响:所有小鼠接种后第15天处死,成瘤率100%。阿魏酸钠各剂量组肿瘤生长较模型组慢,白芍总苷各组肿瘤体积与模型组相比差异不明显。生长曲线见图1和2。

2.2 阿魏酸钠、白芍总苷对肿瘤质量的影响:阿魏酸钠各剂量组肿瘤质量低于模型组,差异显著($P < 0.05$),阿魏酸钠200 mg/kg组的抑瘤率最高(55.61%),平均瘤质量最低,并与阿魏酸钠其他剂量组有显著差异($P < 0.05$)。白芍总苷各剂量组与模型组之间肿瘤质量没有显著性差异。见表1。

2.3 阿魏酸钠、白芍总苷对肿瘤血管生成的作用:免疫组织化学法结果,肿瘤血管被标记特异性棕黄色。计数被标记的血管,阿魏酸钠各剂量组的微血管密度和模型组相比较均显著性降低($P < 0.05$)。白芍总苷各剂量组之间及与模型组之间无显著性差异,见表1。

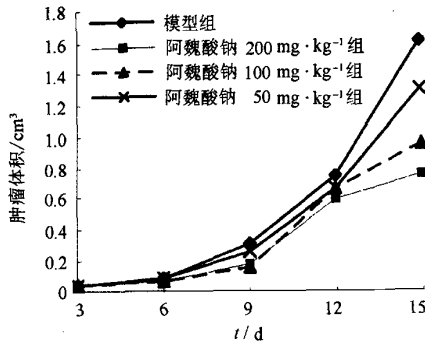


图 1 阿魏酸钠对 H₂₂荷瘤小鼠肿瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=14$)

Fig. 1 Effect of sodium ferulate on tumor growth in H₂₂ mice ($\bar{x} \pm s, n=14$)

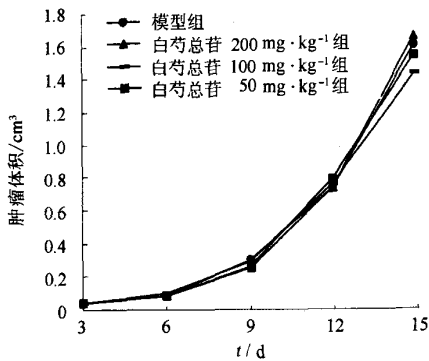


图 2 白芍总苷对 H₂₂荷瘤小鼠肿瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=14$)

Fig. 2 Effect of total glucoside in paeony on tumor growth in H₂₂ mice ($\bar{x} \pm s, n=14$)

表 1 阿魏酸钠和白芍总苷对 H₂₂小鼠肿瘤质量及微血管密度的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=14$)

Table 1 Inhibition of sodium ferulate and total glucosides in paeony on tumor growth and MVD in H₂₂ mice ($\bar{x} \pm s, n=14$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	瘤质量/ g	抑瘤率/ %	微血管密度
模型	—	3.92±0.23	—	59.14±7.20
阿魏酸钠	200	1.74±0.72 [△]	55.61	24.07±7.71 [△]
	100	2.41±0.89 ^{△*}	38.52	33.86±11.01 ^{△*}
	50	2.55±0.54 [*]	35.11	34.38±12.61 ^{△*}
白芍总苷	200	3.95±0.44	—	55.00±15.52
	100	3.79±0.41	—	59.54±16.73
	50	3.76±0.41	—	55.23±10.30

与模型组比较: $\Delta P < 0.05$

与阿魏酸钠 200 mg/kg 组比较: $* P < 0.05$

$\Delta P < 0.05$ vs model group

$* P < 0.01$ vs sodium ferulate 200 mg/kg group

2.4 免疫组织化学分析肿瘤细胞 VEGF、PCNA 的表达: 免疫组织化学法结果, 在光镜下 VEGF 阳

性细胞可在细胞胞浆内见到棕黄色特异性染色。阿魏酸钠各组 VEGF 阳性细胞数明显少于模型组 ($P < 0.05$), 但白芍总苷各剂量组与模型组之间无显著差异。肿瘤细胞 PCNA 阳性细胞胞核染色呈棕黄色, 在光镜下可见阿魏酸钠各剂量组 PCNA 阳性细胞率明显降低 ($P < 0.05$), 白芍总苷各剂量组与模型组相比无显著性差异, 见表 2。

表 2 阿魏酸钠及白芍总苷对 H₂₂小鼠肿瘤细胞 VEGF 和 PCNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=14$)

Table 2 Effect of sodium ferulate and total glucosides in paeony on expression of VEGF and PCNA in tumor cells of H₂₂ mice ($\bar{x} \pm s, n=14$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	VEGF 阳性细胞/个	PCNA 阳性细胞/个
模型	—	558.77±89.91	537.62±188.52
阿魏酸钠	200	94.62±13.04 [△]	119.08±24.72 [△]
	100	127.92±25.44 ^{△*}	202.54±67.73 ^{△*}
	50	137.77±28.21 ^{△*}	209.69±60.31 ^{△*}
白芍总苷	200	467.54±78.50	465.53±93.52
	100	523.38±57.92	520.00±100.00
	50	578.38±89.92	506.92±105.11

与模型组比较: $\Delta P < 0.05$

与阿魏酸钠 200 mg/kg 组比较: $* P < 0.05$

$\Delta P < 0.05$ vs model group

$* P < 0.01$ vs sodium ferulate 200 mg/kg group

2.5 阿魏酸钠对 H₂₂肝癌细胞体外增殖的影响: MTT 法结果, 阿魏酸钠对 H₂₂肿瘤细胞增殖无直接的抑制作用 ($P > 0.05$)。模型组 A 组 A 值为 0.377 ± 0.05 ; 阿魏酸钠 (10、20、40、80、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组 A 值分别为 0.478 ± 0.07 、 0.392 ± 0.05 、 0.374 ± 0.09 、 0.342 ± 0.05 、 0.370 ± 0.03 , 与模型组均无差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

实体瘤的生长依赖新生的血管提供营养和排泄代谢产物, 因此通过抑制肿瘤细胞诱导的血管生成来抑制肿瘤的生长、浸润和转移的治疗策略, 近年来得到迅速发展^[6]。目前, 进入临床试验的肿瘤血管生成抑制剂有 40 余种。2004 年 2 月, 美国 FDA 正式批准第 1 个肿瘤血管抑制剂 Avastin (bevacizumab) 作为一线抗肿瘤药上市, 从而标志抗血管生成剂的研究进入了一个新的时代。抗肿瘤血管生长的中药研究与开发具有广泛的前景。既往的研究发现川芎嗪对小鼠 Lewis 肺癌及肿瘤微血管^[2], 人肝癌细胞^[7]及人脐静脉内皮细胞^[8]增殖有良好的抑制作用。到目前为止尚未见关于阿魏酸钠、白芍总苷影响肿瘤血管生成的报道。

本实验结果发现, 阿魏酸钠各剂量组肿瘤生长被显著抑制, 肿瘤质量与模型组相比显著降低, 肿瘤

组织中的 PCNA 呈阳性的肿瘤细胞显著低于模型组,表明肿瘤增殖受到了抑制。同时,阿魏酸钠组比模型组微血管计数显著减少,说明阿魏酸钠抑制了小鼠体内 H_{22} 肿瘤的生长和血管生成。但是,本实验并不能证实白芍总苷具有抑制肿瘤生长及肿瘤血管生成的作用,但也没有证据表明白芍总苷有促进肿瘤生长的作用。

为了进一步分析阿魏酸钠抑制血管生成的作用是否通过对 H_{22} 肿瘤细胞的直接细胞毒作用而实现的,采用 MTT 法来验证阿魏酸钠是否对体外培养的 H_{22} 肿瘤细胞具有直接的细胞毒作用。结果阿魏酸钠组的质量浓度即使达到了 $160\text{ }\mu\text{g/mL}$,其肿瘤细胞的 A 值尚与模型组无显著性差异。说明阿魏酸钠对肿瘤细胞不具有直接的细胞毒作用,阿魏酸钠对整体动物肿瘤模型的肿瘤生长抑制作用是通过抑制肿瘤血管生成实现的。

免疫组织化学发现,阿魏酸钠各剂量组均能有效地抑制肿瘤组织的 VEGF 表达。VEGF 是最重要的促血管生成因子,能通过其受体 KDR/Flk-1 有效激活胞外信号调节激酶 (ERK),从而刺激内皮细胞 DNA 合成^[9],也能够通过 PI-3K 通路激活抗凋亡激酶 Akt/PKB 而发挥抗凋亡作用^[10]。结合阿魏酸钠组肿瘤组织微血管密度降低的结果,说明阿魏酸钠可能是通过抑制肿瘤细胞 VEGF 的分泌来抑制体内 H_{22} 肿瘤的生长及血管生成。

References:

[1] Xu X Y, Wang S M, Chen W H, *et al.* Effect of Taohong

Siwu Decoction I on inhibiting the angiogenesis and KDR/FLK-1 expression [J]. *New Clin Pharmacol Tradit Chin Med* (中药新药与临床药理), 2005, 9(16): 329-332.

[2] Chen G, Xu X Y, Yun P K, *et al.* Relationship between effect of tetramethylpyrazine and Danshen on inhibiting Lewis lung carcinoma growth and tumor angiogenesis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(3): 296-299.

[3] Zhu X Q, Zhang X J. Inhibitory effects of sodium ferulate on human EBL-7040 hepatocellular carcinoma cells [J]. *Chin J Hepatol* (中华肝病杂志), 2001, 6(1): 19-20.

[4] Ruggeri B, Singh J, Gingrich D. CEP-7055: A novel orally active pan inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases with potent antiangiogenic activity and antitumor efficacy in preclinical models [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(17): 5559-5563.

[5] Kitadai Y, Haruma K, Tokutomi T, *et al.* Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(9): 2095-2200.

[6] Oehler M K, Bicknell R. The promise of anti-angiogenic cancer therapy [J]. *B J Cancer*, 2000, 82(4): 2749-2750.

[7] Feng J D, Xu X Y. Inhibition of tetramethylpyrazine-containing serum on proliferation of human liver cancer Hep G₂ [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(4): 231-233.

[8] Xu X Y, Yang L R, Chen G. The effect of tetramethylpyrazine on proliferation of ECV304 [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(10): 1150-1152.

[9] Avraham H K, Lee T H, Koh Y, *et al.* Vascular endothelial growth factor regulates focal adhesion assembly in human brain microvascular endothelial cells through activation of the focal adhesion kinase and related adhesion focal tyrosine kinase [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(38): 36661-36668.

[10] Thakker G D, Hajjar D P, Muller W A, *et al.* The role of phosphatidylinositol 3'-kinase in vascular endothelial growth factor signaling [J]. *J Biol Chem*, 1992, 274(15): 10002-10007.

槟榔碱对骨髓细胞内 DNA 的影响

季宇彬,李连闯,于 蕾

(哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心,黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 通过体内骨髓细胞实验,探讨槟榔碱对 DNA 的损伤作用机制。方法 采用 AO 探针标记,激光共聚焦技术检测槟榔碱对骨髓细胞内 DNA 和 RNA 的影响;采用流式细胞仪测定槟榔碱对骨髓细胞周期的影响。结果 给予槟榔碱 20、10、5 mg/kg 剂量的染毒组,骨髓细胞内 RNA/DNA 的荧光像素比值明显高于空白对照组,差异非常显著 ($P<0.01$);骨髓细胞周期与空白对照组相比, G_0/G_1 期细胞比率有非常显著增加 ($P<0.01$),S 期细胞比率有非常显著降低 ($P<0.01$), G_2/M 期细胞比率有非常显著降低 ($P<0.01$)。结论 槟榔碱对小鼠骨髓细胞的 DNA 有一定的损伤作用,具有一定的遗传毒性。

关键词:槟榔碱;激光共聚焦;流式细胞仪;DNA;RNA;细胞周期

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)04-0573-03

收稿日期:2006-10-30

作者简介:季宇彬(1956—),男,辽宁省人,教授,博士,多年来一直致力于中药药理、肿瘤药理、分子药理学研究。