

蝎毒提取物抑制 Lewis 肺癌化疗期间再增殖实验研究

王兆朋, 张维东*, 武利存, 贾青, 王朝霞, 张月英, 张俊平

山东省医学科学院基础医学研究所, 山东省现代医用药物与技术重点实验室, 山东 济南 250062

摘要: **目的** 观察转移性 Lewis 肺癌在 5-Fu 化疗期间再增殖加速现象及蝎毒提取物 (PESV) 对再增殖的抑制作用。**方法** C57BL/6 小鼠尾 iv Lewis 肺癌细胞, 从第 7 天开始, 每隔 7 天 ip 5-Fu 1 次, 建立 Lewis 肺癌化疗期间再增殖模型, 以 PESV 干预, 每隔 7 天处死 6 只动物, 统计肺转移灶数目和肺质量, 并以免疫组织化学方法检测 Lewis 肺癌增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达水平和微血管密度 (microvessel density, MVD)。**结果** 模型组从第 21 天到第 28 天, 大肿瘤转移灶数目平均增加 2.5 个, 而从第 14~21 天仅平均增加 0.8 个; 模型组肺质量增加在第 21~28 天显著大于第 14~21 天; 模型组 PCNA 表达在第 21 天表达最低, 在第 28 天最高, 但第 28 天与第 14 天差异无显著性, PESV 高、低剂量组在第 28 天表达水平皆低于模型组, 以 PESV 高剂量组作用显著。模型组 VEGF 表达在第 28 天显著上调 (与模型组第 21 天相比, $P<0.01$)。与模型组相比, PESV 高剂量组在第 21、28 天肿瘤组织 VEGF 表达下调, 尤其是在第 28 天表达显著下调 ($P<0.01$), 而 PESV 低剂量组仅在第 28 天与模型组差异存在显著性 ($P<0.05$)。MVD 计数显示, 模型组在第 21 天最低, 在第 28 天最高, 但在第 28 天和第 14 天差异无显著性。而在 PESV 高剂量组, 第 14 天高于第 21 天, 第 21 天高于第 28 天, 差异均有显著性。在 PESV 低剂量组, 第 14 天高于第 21 天, 但第 21 天与第 28 天差异无显著性。**结论** 在 5-Fu 对 Lewis 肺癌化疗期间存在再增殖加速现象, PESV 可有效抑制此 Lewis 肺癌再增殖, 作用机制之一是通过抑制肿瘤新生血管生成来抑制肿瘤细胞再增殖。

关键词: 蝎毒提取物; 再增殖; 增殖核抗原; 微血管密度; Lewis 肺癌; 血管内皮生长因子

中图分类号: R286.91 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)01-0103-05

Inhibition of polypeptide extract from scorpion venom on repopulation in Lewis lung adenocarcinoma during chemotherapy

WANG Zhao-peng, ZHANG Wei-dong, WU Li-cun, JIA Qing, WANG Zhao-xia, ZHANG Yue-ying, ZHANG Jun-ping

Key Laboratory for Modern Medicine and Technology of Shandong Province, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China

Abstract: Objective To identify the repopulation in metastatic Lewis lung adenocarcinoma during 5-Fu chemotherapy and observe the inhibition of polypeptide extract from scorpion venom (PESV) on the repopulation. **Methods** To make repopulation model, Lewis cells were iv injected into caudal vein of C57BL/6 mice, the mice were ip injected by 5-Fu once every 7 d since day 7 and intervened by ig administration of PESV. Groups were treated differently. Six mice were sacrificed every 7 d, with counting metastatic foci in lung and detecting the level of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), vascular endothelial growth factor (VEGF), and microvessel density (MVD) expression in Lewis lung metastatic loci by using immunohistochemistry. **Results** In model groups, from day 21 to day 28 the numbers of metastatic big loci increased 2.5 averagely, while from day 14 to day 21 increased 0.8 only; The weight of lung from day 21 to day 28 increased more than that from day 14 to day 21; The expression of PCNA was the lowest in day 21, the highest in day 28, and there was no significant difference between day 28 and day 14; The expression in both high- and low-dose PESV groups in day 28 was lower than that in model group. There was a significant effect in high-dose PESV group. In model group the expression of VEGF in day 28 was upregulated significantly ($P<0.01$ vs that in model group in day 21). Compared with model group, VEGF expression in high-dose PESV group in day 21 and day 28 was downregulated, especially in day 28 ($P<0.01$). In low-dose PESV group only in day 28 the difference was found ($P<0.05$ vs that in model group); The change of MVD was the same as PCNA. The expression was the lowest in day 21, the highest in day 28, and there was no significant difference between day 28 and day 14. While in high-dose

收稿日期: 2010-04-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873408); 山东省自然科学基金资助项目 (Y2007C094); 山东省科技攻关基金资助项目 (2008GG30002067)

作者简介: 王兆朋 (1976—), 男, 山东济南人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为中西医结合抗肿瘤转移基础研究。E-mail: charle92003@163.com

*通讯作者 张维东 Tel: (0531)82919939 E-mail: zhangweidongkui@163.com

PESV group, the number of MVD in day 14 was more than that in day 21, and in day 21 more than in day 28, there were significant differences. In low-dose PESV group, in day 14 more than in day 21, but no significant difference was found between day 21 and day 28. **Conclusion** The phenomenon of repopulation acceleration is found in Lewis lung adenocarcinoma during 5-Fu treatment and PESV could inhibit the repopulation through anti-angiogenesis which may be one of the mechanisms of inhibiting tumor cell repopulation.

Key words: polypeptide extract from scorpion venom (PESV); repopulation; proliferating cell nuclear antigen (PCNA); microvessel density (MVD); Lewis lung adenocarcinoma; vascular endothelial growth factor (VEGF)

化疗后肿瘤细胞再增殖过程与肿瘤细胞产生耐药性密切相关。化疗后残存肿瘤细胞再增殖过程加速,是肿瘤细胞产生耐药性的原因之一。因此抑制肿瘤细胞的再增殖对肿瘤治疗有重要意义,前期实验已经证明,以5-氟尿嘧啶(5-Fu)对H₂₂皮下荷瘤小鼠进行周期性化疗,肿瘤组织存在再增殖加速现象。蝎毒提取物(polypeptide extract from scorpion venom, PESV)从东亚钳蝎*Buthus martensii* Karsch中提取的,为含50~60个氨基酸、相对分子质量在6 000~7 000的多肽混合物,有研究表明PESV具有显著的抗肿瘤再增殖作用^[1]。本实验采用Lewis肺癌荷瘤小鼠,以5-Fu对小鼠进行化疗,建立转移性Lewis肺癌化疗期间再增殖模型,观察PESV对肺内Lewis肺癌再增殖的抑制作用,并检测肿瘤组织增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和微血管密度(microvessel density, MVD),初步探讨作用机制。

1 材料

1.1 细胞和动物

C57BL/6小鼠,雄性,3~4周龄,购自北京维通利华实验动物有限公司,合格证号:SCXK(京)2007-0001。Lewis肺癌瘤株,由山东省医学科学院基础医学研究所免疫室张玲研究员赠予。

1.2 药品、试剂与仪器

PESV提取见参考文献方法^[2],5-Fu,购自天津金耀氨基酸有限公司,批号:0612022。PCNA、Ⅷ因子一抗,购自北京中杉金桥生物技术有限公司。德国Leica DM4000B光学显微镜。德国Leica公司Qwin V3图像分析软件。

2 方法

2.1 模型建立、分组和干预方法

先将Lewis肺癌瘤株种植于C57BL/6小鼠皮下进行扩增。实验时无菌取出生长7 d的肿瘤组织,研磨,筛网滤过,调细胞浓度为 $5 \times 10^6/\text{mL}$,每只小鼠尾iv 0.1 mL,注射当天为第0天,第7天将小鼠

随机分为对照组、模型组和PESV高、低剂量(40、10 mg/kg)组。模型组:分别于第7、14、21天ip给予5-Fu 20 mg/kg; PESV高、低剂量组:分别于第11、12、13、18、19、20、25、26、27天ig给予PESV,并于第7、14、21天ip给予5-Fu,对照组,荷瘤小鼠ip生理盐水,实验共进行28 d。实验重复进行3次。

2.2 肺肿瘤转移灶计数

分别于第14、21、28天每组各随机取6只小鼠,处死,取肺脏,以中性福尔马林固定后,解剖显微镜下统计肺表面肺肿瘤转移灶数目,大于3 mm为大转移灶,小于3 mm为小转移灶,计算各组大、小转移灶数目之和,各组不同时间点取均值。取每只小鼠肺脏中最大转移灶制作切片。

2.3 肿瘤组织PCNA、VEGF和MVD检测

采用免疫组化SP法检测肺转移灶PCNA、VEGF和Ⅷ因子表达。肺转移灶切片先以3% H₂O₂消除内源性过氧化物酶活性,热修复后,分别加入一抗,工作浓度为1:100,4℃过夜,DAB显色,显微镜下观察结果。PCNA表达于肿瘤细胞的细胞核,VEGF主要表达于细胞浆。每张切片选取5个视野($\times 200$)进行光学灰度值分析,数值在0~255,染色越强,灰度值越低,取其平均值计为该片的灰度值。Ⅷ因子表达于肿瘤组织血管内皮细胞的胞浆中。MVD计数:200倍光镜下检测Ⅷ因子表达的微血管,选取5个表达高的区域,取平均值,即为该检测样本MVD计数。

2.4 统计方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.5软件统计处理,多组资料的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行检验,两组资料的比较,采用两两比较 t 检验。

3 结果

3.1 对化疗期间小鼠Lewis肺癌转移灶数目和肺质量的影响

结果见表1。对照组肺表面转移灶数目在第14、

21、28 天逐渐增多、增大；与对照组相比，模型组肿瘤在第 21~28 天增殖迅速。而 PESV 高剂量组转移灶增加缓慢，第 28 天和第 21 天差异不显著。PESV 低剂量组有转移灶增加缓慢的趋势，但在第 28 天，低剂量组和模型组之间差异不显著。模型组肺质量增加迅速，第 28 天 PESV 高剂量组与模型组间存在显著差异 ($P<0.05$)。

3.2 对化疗期间转移性 Lewis 肺癌组织 PCNA 表达水平的影响

模型组 PCNA 表达在第 21 天最低，在第 28 天

最高，但第 28 天与第 14 天 PCNA 表达差异无显著性，对照组在 3 个时间点中以第 14 天最高，第 21、28 天表达无显著差异。与对照组相比，模型组在第 14、21 天表达水平显著下调，且存在显著差异，但在第 28 天差异无显著性。PESV 高剂量组在第 28 天 PCNA 表达最低，在第 14 天最高；PESV 低剂量组在第 14 天 PCNA 表达最高，在第 21 天最低，但第 28 天与第 21 天差异无显著性；PESV 高、低剂量组在第 28 天 PCNA 表达均低于模型组。结果见图 1。

表 1 PESV 对 Lewis 肺癌小鼠肺转移灶数目和肺质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of PESV on number of Lewis lung metastatic loci and lung weight of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	大转移灶/个			总转移灶/个			肺质量/g		
		第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照	—	2.5±1.4	4.8±2.7	7.0±2.4	8.8±2.3	9.1±2.8	10.0±5.3	0.21±0.08	0.32±0.11	0.46±0.17
模型	—	2.7±1.5	3.5±2.1	6.0±2.4	7.2±2.4	7.5±2.2	8.1±1.6	0.16±0.07	0.21±0.08	0.37±0.10
PESV	40	1.0±0.6*	1.5±1.0	1.7±0.8**	4.0±2.3*	3.5±1.0**	4.7±2.4*	0.16±0.09	0.19±0.05	0.26±0.08*
	10	1.5±1.0	1.0±0.9*	3.0±1.8*	5.6±1.2	6.0±2.4	6.5±2.3	0.17±0.08	0.21±0.04	0.32±0.13

与模型组比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$ ，表 2 同
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group, Table 2 is same

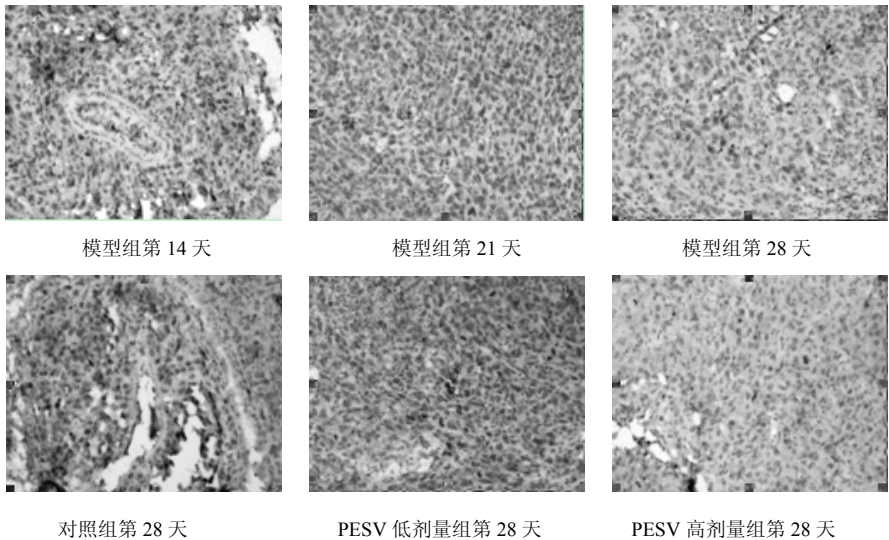


图 1 PESV 对 Lewis 肺癌小鼠肺组织 PCNA 表达的影响

Fig. 1 Effect of PESV on expression of PCNA in Lewis lung metastatic loci

3.3 对化疗期间转移性 Lewis 肺癌组织 MVD 计数的影响

MVD 计数显示，模型组在第 21 天最低，在第 28 天最高，但在第 28 天和第 14 天，差异无显著性。对照组 MVD 在第 14 天最高，但是 3 个时间点差异无显著性；而 PESV 高剂量组，以第 14 天最高，以第 28 天最低，第 14 天与第 21 天，及第 21 天与第

28 天之间差异皆有显著性；PESV 低剂量组，以第 14 天最高，以第 21 天最低，但第 21 天与第 28 天差异无显著性。见图 2 和表 2。

3.4 对化疗期间转移性 Lewis 肺癌组织 VEGF 表达的影响

模型组肿瘤组织在第 14、21、28 天，VEGF 表达水平逐渐上调，尤其是从第 21~28 天，表达水平

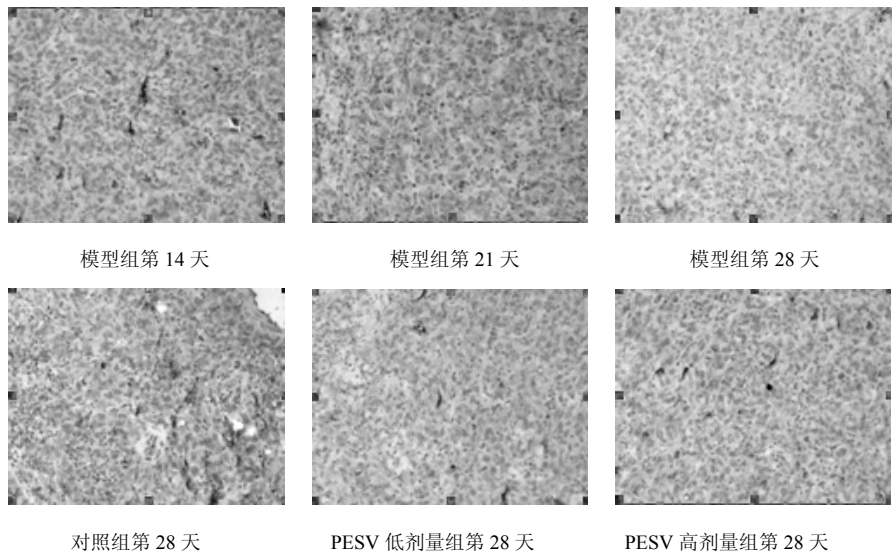


图 2 PESV 对 Lewis 肺癌小鼠肺转移灶 MVD 的影响
Fig. 2 Effect of PESV on MVD in Lewis lung metastatic loci

表 2 PESV 对 Lewis 肺癌小鼠肺转移灶中 MVD 的影响
($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 2 Effect of PESV on MVD in Lewis lung metastatic
loci ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组 别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	MVD		
		第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照	—	26.3 ± 6.6	30.2 ± 9.4	28.4 ± 10.5
模型	—	19.3 ± 3.2	15.4 ± 4.5	20.5 ± 9.5
PESV	40	17.8 ± 5.1	12.8 ± 4.7	$12.2 \pm 1.6^{**}$
	10	18.5 ± 4.2	13.5 ± 5.4	$17.6 \pm 1.7^*$

显著上调 ($P < 0.01$)。对照组在第 14 天最高,在第 28 天最低,但 3 个时间点表达无差异性; PESV 高剂量表达持续缓慢上调,与模型组相比, PESV 高

剂量组在第 21、28 天肿瘤组织 VEGF 表达下调,尤其是在第 28 天,表达显著下调 ($P < 0.01$); PESV 低剂量组仅在第 28 天与模型差异存在显著性 ($P < 0.05$)。对照组则在第 21 天表达水平最高,但低于模型组第 28 天的表达水平 ($P < 0.05$)。见图 3。

4 讨论

加拿大多伦多大学Tannock等^[3-4]首先提出化疗期间肿瘤再增殖加速模型,认为此模型在连续数个疗程化疗期间肿瘤细胞的再增殖速度随着时间而加快,且化疗使肿瘤体积暂时缩小后再生长并不是因为瘤细胞对化疗药物的敏感性改变所致,而是由于肿瘤细胞的加速增殖引起的。由于化疗作为治疗

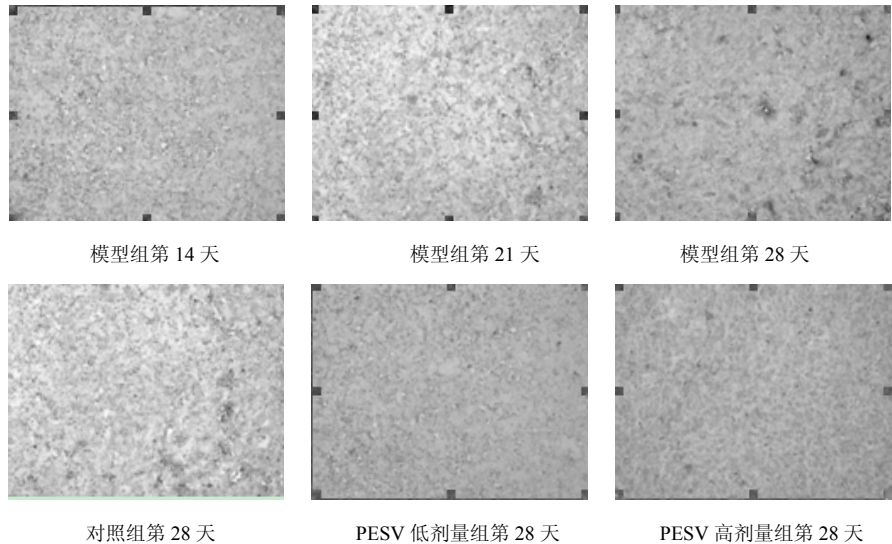


图 3 PESV 对 Lewis 肺癌小鼠肺转移灶 VEGF 表达的影响
Fig. 3 Effect of PESV on expression of VEGF in Lewis lung metastatic loci

恶性肿瘤的三大常规方法之一,因此如何提高化疗治疗肿瘤的疗效有重大意义。

Lewis 为自发性肺内未分化上皮样癌,移植于动物皮下、肌肉爪垫后肿瘤细胞即可通过血行播散到肺,形成肺转移灶。本实验鼠尾 iv Lewis 细胞,使肿瘤细胞直接进入血液,进而产生肺转移瘤形成,因其具有高的肺内成瘤性,类似体内种植过程,故是研究肿瘤治疗理想的模型。PCNA 表达于细胞核,为在细胞周期 S 期广泛表达的一种蛋白,其表达反映肿瘤细胞的增殖活性。本实验采用 5-Fu 对 Lewis 荷瘤小鼠进行连续周期性化疗以建立肿瘤组织化疗期间再增殖模型,结果发现,无论从肺转移灶、肺质量及转移瘤 PCNA 表达水平变化,都说明在第 14~21 天肿瘤生长出现缓慢现象,而在第 21~28 天肿瘤生长速度加速,提示化疗 2 周后,肿瘤化疗残存细胞增殖加快,即化疗期间肿瘤细胞再增殖加速,从而使化疗疗效降低。实验发现,经 PESV 干预后,高剂量组在肺转移灶数目、肺质量及 PCNA 表达都有明显改变,提示 PESV 具有显著的抗化疗期间肿瘤组织再增殖作用。

肿瘤组织内有大量的促血管生成因子,促进肿瘤血管生成。肿瘤细胞生长依赖这些血管提供所需的氧气和营养物质;肿瘤细胞也可以进入微血管而发生转移;肿瘤细胞再增殖过程的加速更需要充足的血供,因此可以根据微血管水平判断肿瘤的发生、发展程度^[5-6]。前期工作证实,PESV 可明显抑制人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的增殖活性,可明显抑制鸡胚尿囊膜(CAM)新生血管的形成^[2,7-8]。本实验结果表明,模型组肿瘤组织在第 21 天 MVD 最少,说明 5-Fu 有一定的抗血管生成作用,与文献报道一致^[9]。在第 28 天 MVD 显著升高,说明在第 21~28 天肿瘤生长迅速,也就是再增殖加速。再增殖加速需要大量的新生血管,以保障血液供应。而 PESV 高剂量组 MVD 逐渐减少,显示随着化疗进展,高剂量 PESV 可显著抑制化疗期间肿瘤组织微血管的生成。低剂量 PESV 作用结果在高剂量和模型组之间。结合 PCNA 表达和肿瘤转移灶及肺质量,说明 PESV 通过抑制肿瘤组织微血管生成以对抗化疗期间肿瘤组织再增殖加速。

VEGF 具有直接刺激内皮细胞分裂增殖,调节内皮细胞的多重功能,直接参与诱导肿瘤血管生成等作用^[10-12]。VEGF 是一种最有效的血管形成分子^[13],已经有研究表明抗癌药物以其为作用靶点^[14],被认

为是肿瘤转移和预后的重要细胞因子。本实验发现,模型组在第 21 天前,VEGF 表达增加缓慢,在第 28 天,表达显著上调。而 PESV 高剂量组 VEGF 表达则持续缓慢上调,但 3 个时间点表达差异不显著。结合模型组说明 PESV 显著抑制了化疗期间再增殖加速肿瘤组织分泌 VEGF。结合 MVD 和 VEGF 相关性分析结果,说明 PESV 通过抑制化疗期间肿瘤组织分泌 VEGF,来抑制肿瘤组织中新血管生成,从而起到抑制化疗期间肿瘤组织再增殖作用。

参考文献

- [1] 王兆朋,张维东,武利存,等. 蝎毒多肽提取物抑制肝癌 H22 细胞化疗期间再增殖实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(1): 108-113.
- [2] 张维东,崔亚洲,姚成芳,等. 蝎毒多肽提取物抗肿瘤血管生成作用的实验研究 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21(6): 708-711.
- [3] Wu L C, Tannock I F. Repopulation in murine breast tumors during and after sequential treatments with cyclophosphamide and 5-fluorouracil [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(9): 2134-2138.
- [4] Kim J J, Tannock I F. Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(7): 516-525.
- [5] Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82(1): 4-10.
- [6] Lee T Y, Purdie T G, Stewart E. CT imaging of angiogenesis [J]. *Q J Nucl Med*, 2003, 47(3): 171-187.
- [7] 张维东,张月英,王朝霞,等. 蝎毒多肽提取物对肿瘤生长和细胞免疫功能的影响 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2007, 45: 286-289.
- [8] 王兆朋,张维东,张捷,等. 蝎毒多肽提取物对非激素依赖性前列腺癌细胞增殖抑制作用的实验研究 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(8): 938-942.
- [9] Kerbel R S, Kamen B A. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(6): 423-436.
- [10] 牛建昭,河福金,李彧,等. 金雀黄素对人乳腺癌细胞血管内皮生长因子表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(7): 873-875.
- [11] 徐晓玉,严鹏科,陈刚,等. 川芎嗪对小鼠肺癌血管生长和 VEGF 表达的抑制 [J]. 中国药理学通报, 2004, 20(2): 151-154.
- [12] 胡人杰. 抗癌方剂实验研究与肿瘤相关基因表达 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(2): 139-143.
- [13] Bergers G, Benjamin L E. Tumorigenesis and the angiogenic switch [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(6): 401-410.
- [14] 纪潇朗,刘巍. 血管内皮生长因子抑制剂治疗肾癌的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(4): 247-251.