

· 论 著 ·

复方苦参注射液联合低剂量 5-Fu 对人胃癌裸鼠移植瘤血管生成的影响

杨 勤¹, 张亚声^{2△}, 杨德全¹

(1. 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆万州 404120; 2. 上海交通大学附属第一人民医院中医科 200080)

摘要:目的 探讨复方苦参注射液联合低剂量 5-氟尿嘧啶(5-Fu)对人胃癌裸鼠移植瘤血管生成的作用。方法 建立人胃癌裸鼠移植瘤模型,分为对照组(A组)、低剂量 5-Fu 组(B组)、复方苦参注射液组(C组)、5-Fu 联合复方苦参注射液组(D组)。连续腹腔注射给药,绘制裸鼠体质量变化曲线,给药 21 d 后处死裸鼠,取出瘤块,计算裸鼠肿瘤体积抑制率和质量抑制率;采用免疫组织化学方法检测肿瘤组织微血管密度(MVD)。结果 B、C、D 组裸鼠体质量于平稳状态中缓慢上升;3 组均能抑制裸鼠移植瘤的生长,降低裸鼠移植瘤 MVD,与 A 组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$),D 组与 B、C 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 复方苦参注射液与低剂量 5-Fu 能通过抑制肿瘤血管生成发挥抗肿瘤作用,二者联合应用具有协同效应。

关键词: 氟尿嘧啶;胃肿瘤;复方苦参注射液;移植瘤;血管生成

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.32.006

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)32-3239-03

Influence of Fufang Kushen injection combined with low dose 5-Fu on the angiogenesis of human gastric carcinoma xenografts in nude mice

Yang Qin¹, Zhang Yasheng^{2△}, Yang Dequan¹

(1. Chongqing Three Gorges Medical College, Wanzhou, Chongqing 404120, China; 2 Department of Traditional Chinese Medicine, the First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

Abstract: Objective To investigate the antiangiogenic effects of Fufang Kushen injection combined with low dose 5-fluorouracil(5-Fu) of human gastric carcinoma xenografts in nude mice. **Methods** After establishing the model of human gastric carcinoma xenografts in nude mice, the model mice were randomly divided into 4 groups, control group(A group), low dose 5-Fu group(B group), Fufang Kushen injection group(C group), 5-Fu plus Fufang Kushen injection group(D group). The growth of xenografts in nude mice was observed. The weight curve of nude mice was drawn. The volume inhibition rates and the weight inhibition rates of xenografts were measured. After 21 days of treatment, the nude mice were executed. Immunohistochemistry was employed to measure the expressions of microvessel density(MVD) of xenografts. **Results** The weights of nude mice in B, C and D group. The volume inhibition rates and the weight inhibition rates of xenografts of the three groups were significantly lower than those of A group($P < 0.05$), the MVD of xenografts of the three groups were significantly lower than those of A group, while those of D group were much lower than B and C group($P < 0.05$). **Conclusion** Fufang Kushen injection or low dose 5-Fu can inhibit the growth and angiogenesis of human gastric carcinoma xenografts in nude mice. Both sides are synergistic effect.

Key words: fluorouracil; stomach neoplasms; Fufang Kushen injection; xenograft; angiogenesis

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,其死亡率位居全球第二位。侵袭和转移是胃癌预后不佳的主要原因之一,肿瘤血管新生又是肿瘤生长和转移的关键。抑制肿瘤血管的生长就可能控制肿瘤的生长。目前抗肿瘤血管生成的药物如血管生成抑制剂还处于试验探索阶段,临床疗效仍不确定,不良反应令人担忧,且价格昂贵^[1-2]。复方苦参注射液是以苦参为主要成分的中药制剂,被广泛应用于治疗多种恶性肿瘤,对于化疗药物具有明显的减毒增效作用^[3-4]。最近有研究表明,复方苦参注射液还具有抑制肿瘤血管生成的作用^[5-6]。本实验通过建立人胃癌裸鼠移植瘤模型,观察移植瘤生长情况,检测肿瘤组织中微血管密度(microvessel density, MVD),探讨复方苦参注射液与低剂量 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)联用对肿瘤血管生成的作用,为复方苦参注射液的临床应用提供新的理论依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验动物 BALB/C 裸鼠 28 只, SPF 级, 雌性, 4~6 周龄, 体质量(16±2)g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 许可证号: SCXK(沪)2007-0005。饲养于上海市第一人民医院实验动物中心, 用灭菌的小鼠饲料喂养, 饮用无菌水。

1.1.2 细胞 人胃癌细胞系 SGC-7901, 由上海第一人民医院消化实验室提供。

1.1.3 药物与试剂 5-Fu 注射液(10 mL/支, 相对分子质量为 130.08, 由上海旭东海普药业有限公司提供, 产品批号: 081218), 复方苦参注射液(5 mL/支, 由山西振东制药有限公司提供, 产品批号: 20081007)。DMEM 细胞培养液购于美国 Gibco 公司, 胎牛血清(FBS)购自美国 HYCLONE 公司, 兔抗鼠第八因子相关抗体 factor VIII(FVIII)单克隆抗体购自美国 BD 公司, 羊抗兔 IgG、DAB 显色试剂盒均购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 裸鼠移植瘤模型建立及药物干预 取对数生长期 SGC-

△ 通讯作者, Tel:13611817555; E-mail: zyszw818@hotmail.com.

表 1 各组裸鼠移植瘤生长情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	移植瘤体积(cm ³)	体积抑制率(%)	移植瘤质量(g)	质量抑制率(%)
A组	6	3.147±0.459	—	2.022±0.143	—
B组	7	2.138±0.384**	32.06	1.285±0.422**	36.45
C组	7	2.395±0.607*	23.90	1.376±0.428*	31.95
D组	7	1.489±0.753**△▲▲	52.69△▲▲	0.755±0.397**△▲	62.66△▲▲

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与 A 组比较; △: $P < 0.05$, 与 B 组比较; ▲: $P < 0.05$, ▲▲: $P < 0.01$, 与 C 组比较; —: 表示无此项。

7901 细胞,用 DMEM 培养液调整细胞浓度至 5×10^7 个/mL,取该细胞悬液 0.2 mL(1×10^7 个/只)接种于每只裸鼠右后肢背部皮下。接种 SGC-7901 细胞后,隔天观察 1 次,移植瘤长径大于 0.5 cm 视为成瘤。在接种第 7 天后,裸鼠成瘤率为 100%。按随机分组的原则将裸鼠分为 4 组(每组 7 只)。对照组(A组):给予无菌生理盐水;低剂量 5-Fu 组(B组):给予 5-Fu 2 mg/(kg·d);复方苦参注射液组(C组):给予复方苦参注射液 3 mL/(kg·d);联合组(D组):给予 5-Fu 2 mg/(kg·d)联合复方苦参注射液 3 mL/(kg·d)。每组给药方式均为腹腔注射,每只裸鼠注射 0.2 mL,每日给药 1 次,连续给药 21 d,末次给药后脱颈椎法处死全部裸鼠。实验过程中 A 组有 1 只裸鼠死亡。

1.2.2 观察指标

1.2.2.1 动物一般情况 记录每组裸鼠体质量、精神状态、活动情况等。

1.2.2.2 裸鼠体质量变化情况 从第 7 天开始,隔天用电子秤称量裸鼠体质量,绘制各组裸鼠体质量变化曲线。

1.2.2.3 移植瘤体积及质量测量 测量瘤体长径(a)、短径(b),计算裸鼠移植瘤体积($V = (a \times b^2)/2$),体积抑制率(%) = $[(V_{\text{对照组}} - V_{\text{实验组}})/V_{\text{对照组}}] \times 100\%$;完整剥取瘤组织,称瘤组织质量(W),计算质量抑制率 = $[(W_{\text{对照组}} - W_{\text{实验组}})/W_{\text{对照组}}] \times 100\%$ 。

1.2.2.4 免疫组织化学方法检测移植瘤组织 MVD 完整剥离肿瘤组织,置于适量 4%多聚甲醛中固定 24 h,石蜡包埋,以 5 μm 厚度连续切片;二甲苯脱蜡、水化,加入 3% H₂O₂ 处理 10 min 以阻断内源性过氧化物酶;磷酸二氢盐缓冲液(PBS)洗涤,10%羊血清封闭 30 min,加入一抗 FⅧ(1:200)4℃过夜,将 PBS 代替一抗设置为阴性对照;加入相应二抗(1:200)孵育 30 min,DAB 显色,PBS 反复漂洗,苏木精复染细胞核,中性树脂封片。MVD 评定标准:参照 Weinder 等^[7]报道的方法,先在低倍镜下(×40)观察切片以确定肿瘤内 MVD 最高区,再在高倍镜下(×200)观察每视野范围内凡是染成棕黄色,可与周围血管肿瘤细胞和其他结缔组织区分开来的单个内皮细胞或内皮细胞簇均作为一个单一的、可计数的微血管,并不要求一定有明显的管腔或红细胞(管腔面积直径大于 8 个红细胞直径的血管、带有较厚的肌层的微血管均不计数)。每组每个样本首先在低倍镜下选择 3 个血管着色最密集区域,然后在高倍镜下随机计数 3 个视野内微血管数,取 3 个视野的平均值作为 MVD 值。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 和 SNK 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组裸鼠一般情况 对照组有一只裸鼠在 24 d 时因肿瘤消耗而死亡,剩余的 6 只裸鼠精神较萎靡、食欲下降、皮毛失去光泽、行动迟缓、形体消瘦。其余各组裸鼠无死亡,精神食欲好,毛色有光泽,行动灵活。

2.2 各组裸鼠体质量情况 从图 1 中各组裸鼠的体质量变化曲线可以看出,治疗开始当天(第 7 天),各组裸鼠体质量两两相比差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗后,各组裸鼠体质量逐渐上升,其中 A 组呈持续快速生长,上升幅度较快。但在后期,A 组裸鼠因肿瘤负荷较大,严重消瘦,出现恶病质,体质量有所下降;B、C、D 组裸鼠体质量上升较平稳,其中 D 组上升最慢。

2.3 各组裸鼠移植瘤生长情况 各组裸鼠成瘤率均为 100%,瘤体呈椭圆或圆形。分组前各组肿瘤平均体积比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验结果表明,B、C、D 组均能抑制 SGC-7901 细胞在裸鼠体内的生长,平均肿瘤体积、质量与 A 组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);B、C 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);D 组与 B、C 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。实验结束时,D 组肿瘤体积和质量抑制率明显高于 B、C 组,见表 1。

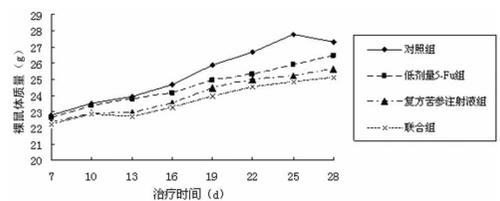


图 1 各组裸鼠体质量变化曲线

2.4 各组裸鼠移植瘤 MVD 血管在癌组织内分布不均匀,癌组织微血管形态不规则,部分血管无明显管腔,表现为内皮细胞簇,新生血管分布在肿瘤任何位置。B、C 组 MVD 与 A 组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$),D 组 MVD 与 B、C 组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 2。

表 2 各组裸鼠移植瘤 MVD 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	MVD
A组	34.330±2.082
B组	22.000±2.000**
C组	24.670±1.528**
D组	14.330±2.082**△△▲▲

** : $P < 0.01$, 与 A 组比较; △△: $P < 0.01$, 与 B 组比较; ▲▲: $P < 0.01$, 与 C 组比较。

3 讨论

复方苦参注射液是以苦参、白土苓为原料的纯中药抗癌药

物。苦参清热、解毒、燥湿,白土苓解毒、除湿、止痛,二药合用清热凉血、解毒散结。现代药理学研究显示,复方苦参注射液主要成分为苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱等多种生物碱。根据大量的临床报道,复方苦参注射液能明显改善化疗引起的疼痛、发热、消化道反应,提高免疫力,减少耐药性,抑制肿瘤生长,延长肿瘤患者生存期,提高生活质量^[3-4]。近年研究还显示,复方苦参注射液具有抑制肿瘤血管生成的作用。李敏等^[6]发现复方苦参注射液能明显抑制人脐静脉内皮细胞的增殖和迁移,并对鸡胚绒毛尿囊膜新生血管具有明显的抑制作用;贾英杰等^[5]对移植性 S180 肉瘤小鼠分别腹腔注射复方苦参注射液 0.3、0.6 g/kg,连续 8 d 后瘤体质量较对照组分别减少 25%、36%,MVD 分别减小 32%、40%。

节律化疗 (metronomic chemotherapy) 是新兴的一种抗肿瘤血管生成的方法,即低剂量化疗药物 (通常为常规剂量的 1/10~1/3) 高频率给药^[8],具有不良反应少,患者依从性高等优点。5-Fu 是目前胃癌的一线化疗药物。临床资料表明,低剂量 5-Fu 联合其他化疗药物治疗胃癌等消化道肿瘤具有较好的疗效^[9-10]。基础实验证实低剂量 5-Fu 可抑制人血管内皮细胞生长,亦可抑制鸡胚绒毛尿囊膜血管生成^[11-12]。

但肿瘤血管生成机制极其复杂,单纯依靠抗血管生成药物或化疗药物的节律给药方式来达到抑制肿瘤血管生成的目的是远远不够的。近年研究显示,将节律化疗同其他抗血管生成药物联合应用,能产生协同效应。因此本实验将复方苦参注射液与低剂量 5-Fu 联合应用,结果提示 B、C、D 组裸鼠皮下移植瘤的体积抑制率和瘤质量抑制率与 A 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D 组抑瘤效果明显优于 B、C 组 ($P < 0.05$)。而且与 A 组裸鼠恶病质状态相比, D 组裸鼠体质量缓慢稳步上升,毛色光泽,行动灵活,说明复方苦参注射液联合低剂量 5-Fu 无明显的不良作用,安全可靠,可抑制裸鼠皮下移植瘤的生长,使肿瘤长期处于稳定状态,推测其远期抑瘤效果较好。

MVD 检测是运用一些针对血管内皮细胞特异性抗体,免疫标记血管内皮细胞,然后计数高倍镜视野下的微血管数量。目前,采用 MVD 定量分析是评价肿瘤血管生成的金标准^[13]。本实验免疫组织化学检测结果提示, B、C、D 组的 MVD 均有所下降 ($P < 0.05$), D 组下降更明显 ($P < 0.05$)。由此可以看出 5-Fu 节律化疗和复方苦参注射液均有抗血管生成的作用,二者联合更具优势,从而达到抑制肿瘤生长的效果。

因此,作为一种有效、安全、价廉的中药制剂,复方苦参注射液不仅具有抗肿瘤血管生成的作用,还能与化疗药物、血管生成抑制剂等多种药物联合应用,减毒增效,改善它们的不良反应,提高抗肿瘤疗效,值得进一步深入研究,并在临床推广。

参考文献:

[1] Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for

metastatic colorectal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350 (23): 2335-2342.

- [2] Los M, Roodhart JM, Voest EE. Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab and vatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer[J]. *Oncologist*, 2007, 12(4): 443-450.
- [3] 王朝阳, 李桂生, 黄海欣, 等. 岩舒注射液治疗中晚期肿瘤患者 75 例的临床观察[J]. *中国中西医结合杂志*, 2006, 26(8): 681-684.
- [4] 谢忠, 谢杰荣, 温继育, 等. 复方苦参注射液联合 NP 方案治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究[J]. *肿瘤研究与临床*, 2007, 19(6): 385-387.
- [5] 贾英杰, 张莹, 史福敏. 复方苦参注射液对小鼠移植性 S180 肉瘤血管形成抑制作用[J]. *天津中医学报*, 2006, 25(1): 25-26.
- [6] 李敏, 钱晓萍, 刘宝瑞. 奥沙利铂联合复方苦参注射液抗血管生成作用的实验研究[J]. *中国癌症杂志*, 2008, 18(3): 167-171.
- [7] Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1992, 84(24): 1875-1887.
- [8] Kerbel RS, Klement G, Pritchard KL, et al. Continuous low-dose anti-angiogenic/metronomic chemotherapy: from the research laboratory into the oncology clinic[J]. *Ann Oncol*, 2002, 13(1): 12-15.
- [9] 夏国豪, 刘德林, 许红霞, 等. 紫杉醇联合小剂量顺铂和持续静滴低剂量氟尿嘧啶治疗晚期胃癌 35 例[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2006, 3(11): 195-197.
- [10] 侯安继, 胡艳, 周维, 等. 周剂量多西他赛、顺铂联合低剂量氟尿嘧啶治疗晚期胃癌的随机对照研究[J]. *肿瘤*, 2009, 29(2): 160-163.
- [11] Dreves J, Fakler J, Eisele S, et al. Antiangiogenic potency of various chemotherapeutic drugs for metronomic chemotherapy[J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(3a): 1759-1763.
- [12] 尹鸣, 陈龙邦, 耿怀成, 等. 氟尿嘧啶抗血管生成作用的实验研究[J]. *医学研究生学报*, 2004, 17(5): 395-397.
- [13] Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Stathopoulos GP, et al. Angiogenic interactions of vascular endothelial growth factor, of thymidine phosphorylase, and of p53 protein expression in locally advanced gastric cancer[J]. *Oncol Res*, 2000, 12(1): 33-41.

(收稿日期: 2011-05-09 修回日期: 2011-09-18)