

• 中西药苑 •

丹参、赤芍、莪术对小鼠 Lewis 肺癌血管生成的影响 *

黄兆明 何小琴

(浙江省温州市中医院 温州 325000)

摘要:目的:探讨中药丹参、赤芍、莪术对肿瘤血管生成的影响。方法:将上述 3 味中药分别水煎浓缩后,分别进行动物实验,实验的方法一致。将 Lewis 肺癌模型小鼠随机分为生理盐水对照组及中药低、中、高剂量组(丹参剂量分别为 12、16、20g/kg,赤芍及莪术剂量均分别为 6、8、10 g/kg),每组小鼠 10 只,每天灌胃 1 次,连续 20d。第 22 天处死小鼠,免疫组织化学计数肿瘤组织微血管密度(MVD)及检测血管内皮细胞生长因子(VEGF)的表达。结果:中高剂量丹参、莪术及高剂量赤芍能提高肿瘤组织 MVD 及 VEGF 表达, $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 。结论:单味中药煎剂丹参、赤芍、莪术会促进小鼠 Lewis 肺癌血管生成。

关键词:肿瘤血管;血管内皮细胞生长因子;活血化瘀;丹参;赤芍;莪术;Lewis 肺癌;实验研究

Abstract: Objective :To explore the affecting effects of danshen,chishao and ezhu on mice with Lewis Lung Cancer (LLC). Methods: LLC cells were inoculated subcutaneously into C₅₇BL mice .The three kinds of Chinese herb were experimented in the same way, respectively .Forty mice were randomly divided into normal saline group (control group ,n=10)and experimental groups (danshen of 12,16and 20g•kg⁻¹,10 in each group, chishao and ezhu of 6,8 and 10 g•kg⁻¹,respectively ,10 in each group). On 22th day ,the mice were killed. Tumor microvessel density (MVD) was quantitated by immunohistochemistry using monoclonal antibodies against factor F8, vascular endothelial growth factor (VEGF) immunoreactivity was examined by immunohistochemistry using polyclonal antibodies against VEGF. Results: The MVD and VEGF on middle ,high dosages of danshen and ezhu groups,and on high dosage of chishao group were significantly higher than control group, $P<0.05$ or $P<0.01$ 。 Conclusion: Danshen,chishao and eshu can enhance tumor angiogenesis of the implanted LLC in C₅₇BL mouse .

Key words : angiogenesis ;VEGF, huoxuehuayu;Chinesis herb ; danshen root ;paeoniae radix;zedoaxy rhizom ; Lewis lung cancer; empirical study

中图分类号 :R 285.5 文献标识码 :B 文献编号 : 1671-4040(2006)01-0074-02

活血化瘀作为肿瘤治疗的一大法则,已在临床广泛应用。但活血化瘀中药是能抑制肿瘤转移还是会促进肿瘤转移,目前仍没有统一的认识。本实验选取丹参、赤芍、莪术 3 味临床常用的活血化瘀中药进行研究,观察这些中药对小鼠 Lewis 肺癌血管密度(MVD)及血管内皮细胞生长因子(VEGF)的影响,从肿瘤血管生成的角度探讨活血化瘀中药与肿瘤转移的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 Lewis 肺癌瘤株购自中国科学院上海药物研究所。健康 C₅₇BL 小鼠雌雄各半,体重(20±2)g,购自复旦大学医学院实验动物中心。中药饮片丹参、赤芍、莪术购自温州市中医院,经鉴定属正品。丹参水煎成每毫升含生药 1.0g 的药液,赤芍、莪术分别水煎成每毫升含生药 0.5g 的药液,备用。第 VIII 因子(F8)单克隆抗体,血管内皮细胞生长因子(VEGF)抗体及 SP 免疫组化试剂盒均购于福州迈新生物技术开发公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物实验 对丹参、赤芍、莪术 3 种中药分别进行实验。对每一种中药的实验方法一致,取接种 Lewis 肺癌 10~14 d 的 C₅₇BL 荷瘤小鼠,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 制备瘤细胞悬液。另取 C₅₇BL 小鼠(18~22g,雌雄各半) 40 只,全部小鼠均于右前腋下接种 Lewis 肺癌瘤细胞悬液,每只 0.2mL,再随机分空白对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组小鼠 10 只,接种后第 2 天开始给药,空白组给生理盐水 0.4mL/只,另 3 组每日中药煎液灌胃 1 次,剂量见表 1~表 3。连续灌胃

20 d 后,于第 22 天脱颈椎处死,全部小鼠进行检测。

1.2.2 肿瘤组织微血管密度(MVD)检测 取部分肿瘤组织,4%多聚甲醛固定,F8 常规免疫组化染色,在显微镜下记数 20 个视野内肿瘤微血管数目,以平均每高倍镜(×200)视野微血管个数表示 MVD^[1]。

1.2.3 血管内皮细胞生长因子(VEGF)免疫组化染色及阳性表达结果的判定 VEGF 免疫组化染色采用 SP 法。以 PBS 代替一抗作为阴性对照,以已知 VEGF 阳性的乳腺癌作为阳性对照。阳性表达结果判定采用半定量记分法,即每张组织切片染色强度:阴性 0 分,浅棕黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,深棕黄色为 3 分。阳性细胞比例:0%为 0 分,≤25%为 1 分,26%~50%为 2 分,>50%为 3 分。2 项打分相加≥2 分为 VEGF 染色阳性(+) ^[2]。

1.2.4 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件进行统计处理,MVD 的组间比较采用 t 检验,VEGF 阳性率的组间比较采用卡方检验。

2 结果

2.1 丹参对肿瘤组织 MVD 和 VEGF 染色的影响 低剂量组 MVD 及 VEGF 均低于生理盐水对照组,但无统计学差异。中剂量及高剂量组的 MVD 及 VEGF 显著高于生理盐水组, $P<0.05$ 。详见表 1。说明中、高剂量的丹参煎剂能提高肿瘤 MVD 及 VEGF 的表达,具有促进肿瘤血管生成的作用。

表 1 丹参煎剂对肿瘤 MVD 及 VEGF 的影响 ($\bar{X} \pm S$)				
组别	n	给药剂量 /g•kg ⁻¹	MVD	VEGF 阳性率/%
空白对照组	10		35.41 ± 6.43	64.3
低剂量组	10	12	33.16 ± 6.14	62.7
中剂量组	10	16	42.86 ± 7.32*	70.4 *
高剂量组	10	20	43.29 ± 7.48*	72.1*

* 浙江省温州市卫生局科研课题(编号:2005076)

注:与空白组比较,**P*<0.05。

2.2 赤芍对肿瘤组织 MVD 和 VEGF 染色的影响 低剂量及中剂量组的 MVD 及 VEGF 均高于生理盐水组,但无统计学差异。而高剂量组的 MVD 则明显高于生理盐水组,*P*<0.01,VEGF 也显著高于生理盐水组,*P*<0.05。详见表 2。说明中、低剂量的赤芍煎剂对肿瘤 MVD 及 VEGF 影响不大,而高剂量赤芍煎剂则能提高肿瘤 MVD 及 VEGF 表达。

表 2 赤芍煎剂对肿瘤 MVD 及 VEGF 的影响 ($\bar{X}\pm S$)

组别	n	给药剂量 /g·kg ⁻¹	MVD	VEGF 阳性率 /%
空白对照组	10		33.12 ± 7.33	63.5
低剂量组	10	6	34.26 ± 6.67	64.6
中剂量组	10	8	36.85 ± 6.16	65.7
高剂量组	10	10	45.12 ± 9.10 **	77.4*

注:与空白组比较,**P*<0.05,***P*<0.01。

2.3 莪术对肿瘤组织 MVD 和 VEGF 染色的影响 低剂量组的 MVD 及 VEGF 略低于生理盐水组,但无显著性差异。中剂量和高剂量组的 MVD 及 VEGF 则明显高于生理盐水组,*P*<0.05,但中剂量组与高剂量组无显著性差异,说明并非莪术剂量越高对 MVD 及 VEGF 的影响越大。详见表 3。

表 3 莪术煎剂对肿瘤 MVD 及 VEGF 的影响 ($\bar{X}\pm S$)

组别	n	给药剂量 /g·kg ⁻¹	MVD	VEGF 阳性率 /%
空白对照组	10		37.16 ± 7.32	60.1
低剂量组	10	6	36.42 ± 7.39	62.4
中剂量组	10	8	44.44 ± 8.98 *	70.8*
高剂量组	10	10	46.23 ± 9.27*	72.5*

注:与空白组比较,**P*<0.05。

3 讨论

恶性肿瘤的一大特性就是无限制地侵袭性生长和远处转移,这一特性依赖于肿瘤血管生成,抑制血管生成则能够显著抑制肿瘤的生长和转移^[1]。血管内皮生长因子(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,与肿瘤的生长和转移密切相关^[2],降低 VEGF 的表达则能起到抑制肿瘤血管生成的作用。

中医学认为,恶性肿瘤的病理基础离不开“血瘀”,有人甚至认为“血瘀”证贯穿于恶性肿瘤的整个发展过程。因此,活血化瘀法已在肿瘤临床得到广泛应用,并且得到公认。但

(上接第 2 页)神可,全身皮肤、巩膜黄染,浅表淋巴结未触及肿大,眼睑无水肿,口唇无青紫。颈软,气管居中,甲状腺无肿大。双肺呼吸音粗,未闻及干湿性罗音,心率 80 次/min,节律整齐,各瓣膜听诊区未闻及杂音。腹软,肝、脾肋缘下未触及,未触及包块,无触痛。双下肢无水肿,双病理征阴性。患者入院后,予以甘利欣保肝,帮达、利胆片抗炎、利胆及对症处理。并查巨细胞病毒抗体、EB 病毒酶标,结果示均阴性;血清抗核抗体(ANA),抗平滑肌抗体(SMA)均为阴性。可以排除自身免疫性肝炎。经过以上治疗 15d,患者无腹胀,饮食可,皮肤、巩膜黄染消退。复查肝功能示:ALT:57.2U/L, G:30g/L, A/G:1:3, TBIL:43μmol/L, DBIL:33.6μmol/L, IBIL:9.4μmol/L,继续予以保肝治疗 10d,肝功能各项指标均恢复正常,胆囊 B 超示:胆囊大小正常。患者痊愈出院。

讨论:酮替芬作为肥大细胞膜稳定剂,临床上常用于过敏性鼻炎、过敏性支气管哮喘及过敏性皮肤病的治疗。它的一般副作用和毒性是:(1)常见有嗜睡、乏力、食欲不振、恶

近些年来研究却提出了新的问题,活血化瘀中药是否会促进肿瘤的转移?很多学者从肿瘤血管生成的角度对这一问题进行了探讨。有研究认为活血化瘀中药会促进肿瘤的转移,如已有研究发现丹参、赤芍能促进大鼠移植瘤高表达 VEGF 及肿瘤血管的形成,促进大鼠移植瘤模型肝转移的发生^[3]。也有研究发现,有些活血化瘀中药如川芎嗪注射液对肿瘤转移有抑制作用,而有些中药如丹参注射液则对肿瘤转移无影响^[4]。还有研究表明,仅将三棱、莪术两药合用,则能促进肝癌模型大鼠血清 VEGF 的表达,可能具有促进肿瘤生长或转移的作用,但配伍白芍、黄芪后,又能降低模型大鼠血清 VEGF 的表达,推测分析认为可能是配伍之间的作用^[5]。因此,活血化瘀中药对肿瘤血管生成的影响研究还有待进一步深入。

本研究对丹参、赤芍、莪术 3 味中药进行了单药实验,发现这 3 味中药能不同程度地提高小鼠 Lewis 肺癌 VEGF 的表达,促进肿瘤血管生成。其对肿瘤 MVD 和 VEGF 的影响强度与给药剂量有一定关系,但并非给药剂量越大,影响程度越强。与其他中药配伍使用,是否会象有些研究^[7]一样出现相反的结果,有待进一步探讨。

参考文献

[1]Weidner N.Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors [J].Breast Cancer Res Treat,1995,36(2): 169~180
[2]Mattern J,Koomage R,Volm M. Biological characterization of subgroups of squamous cell lung carcinomas [J].Clin Cancer Res, 1999,5(6): 1 459~1 463
[3]Folkman J.Angiogenesis in cancer vascular rheumatism and other disease [J].Nat Med,1995,1: 27~31
[4]曾民德,王泰龄,王宝恩.肝纤维化诊断及疗效评估共识[J].中华肝病杂志,2002,10(5): 327~328
[5]丁罡,宋明志,于尔辛.丹参、赤芍对大鼠 Walker256 癌肝转移影响机制的研究[J].中国癌症杂志,2001, 11 (4): 364~366
[6]陈刚,徐晓玉,严鹏科,等.川芎嗪和丹参对小鼠 Lewis 肺癌生长的抑制作用与血管生成的关系[J].中草药,2004,35(3): 296~299
[7]丁荣杰,唐德才.三棱、莪术对移植性肝癌大鼠 VEGF 的影响[J].中华实用中西医杂志,2005,18(18): 1 047~1 048

(收稿日期:2005-10-08)

心,偶见头痛、头晕。(2)个别病例肝功能异常,但较轻微。患者在未服其他药物的情况下,只口服了 4 片酮替芬,就引起了急性肝损害及胆囊萎缩,在临床上实属少见。

有资料表明,在诊断“肝炎”的患者中 10%~20%为药物性肝损害,因黄疸住院的患者中 2%~5%为药物性肝损害,15%~30%爆发性肝衰竭和 20%~50%非病毒性慢性肝炎与药物有关。估计有 500~1000 种药物可引起肝损害。所以,我们临床医师应认真学习药物知识,开展药代和药动学研究,注意个体差异,密切观察机体临床反应,随时调整剂量或停药及更换药物,建立药物不良反应监测系统,以不断提高用药水平,防止脏器损害^[1]。

参考文献

[1]盛瑞媛.全国内科合理用药与防止药物性脏器损害学术会议纪要 [J].中华内科杂志,2003,42(4): 265

(收稿日期:2005-06-27)