

康莱特注射液对 Lewis 肺癌小鼠 VEGF-C 蛋白及 mRNA 表达的影响*

张爱琴¹ 孙在典² 马胜林¹ 包素珍³

(1 浙江省肿瘤医院 杭州 310022; 2 浙江省中医药大学附属东方医院 杭州 310012;

3 浙江省中医药大学 杭州 310000)

摘要:目的:基于对 Lewis 肺癌组织中 VEGF-C 蛋白及 mRNA 表达的影响,探讨康莱特注射液抗肿瘤转移的分子机制,为其临床应用提供理论疗效证据。方法:50 只 C57 小鼠接种 Lewis 肺癌瘤株后,随机分为 5 组:模型组、CTX 组、康莱特低剂量组、康莱特中剂量组、康莱特高剂量组。分别腹腔注射相应药物 15d 后处死,免疫组化法检测各组小鼠肺癌组织中 VEGF-C 蛋白的阳性表达,用 RT-PCR 检测 VEGF-C mRNA 的表达。结果:模型组、CTX 组、康莱特低剂量组、康莱特中剂量组、康莱特高剂量组各组中 VEGF-C 蛋白的阳性表达率分别为:(9.02 ± 0.63)、(3.85 ± 0.27)、(5.23 ± 0.19)、(3.22 ± 0.08)、(2.02 ± 0.06), 各组 VEGF-C mRNA/GAPDH 比值分别为 (2.42 ± 0.08)、(2.17 ± 0.06)、(1.75 ± 0.02)、(0.67 ± 0.05)、(0.46 ± 0.03)。结论:抑制 VEGF-C 蛋白及 mRNA 的表达可能是康莱特注射液抗肿瘤转移的分子机制之一。

关键词:康莱特注射液;VEGF-C;肿瘤转移;RT-PCR

Abstract:Objective:To study the mol-mechanisms of KLT injection anti-tumor metastasis, according to the effect that the KLT affect on the VEGF-C protein and mRNA of Lewis lung cancer tissue. Methods: The 50 C57 mice were randomly divided into 5 groups after copied Lewis lung cancer model to them: the model group, the chemotherapy group, the LD KLT group, the MD KLT group and the HD KLT group. Sacrifice the mice after inject the diff-medicine to abdominal cavity for 15 days, the immunohistochemistry technique used to detect the expression of VEGF-C protein of lung cancer tissue, RT-PCR technique to detect the expression of VEGF-C mRNA. Results: the masc-expression rate of VEGF-C in every group is (9.02 ± 0.63)、(3.85 ± 0.27)、(5.23 ± 0.19)、(3.22 ± 0.08)、(2.02 ± 0.06) corresponding, the proportionality of gray scale of NF-kB/GAPDH in all groups separately is (2.42 ± 0.08)、(2.17 ± 0.06)、(1.75 ± 0.02)、(0.67 ± 0.05)、(0.46 ± 0.03). Conclusion: It's maybe the one of the mol-mechanisms of KLT to restrain tumor's metastasis by inhibiting the masc-expression of VEGF-C and mRNA.

Key words:KLT;VEGF-C;Tumor metastasis;RT-PCR

中图分类号:R 734.2

文献标识码:B

文献编号:1671-4040(2008)01-0005-02

康莱特注射液是从传统中药薏苡仁中提取的抗癌活性成分,主要组分为中性油脂甘油三酯(含量>85%),其次为甘油单酯、甘油二酯和脂肪酸酯;其中中性油脂甘油三酯是抗肿瘤活性的主要组分。近年来其在国内临床已广泛应用,在美国业已完成了 II 期临床试验,在俄罗斯已得到批准上市,得到 FDA 认可,显示出了良好的治疗效果和美好前景。本实验通过对康莱特注射液影响 VEGF-C 的表达,阐明其抑制肿瘤转移的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及瘤株 C57BL/6 小鼠 50 只,体重(20 ± 2)g,雌雄各半,购于上海医学科学院实验动物中心。饲养于浙江中医药大学实验动物中心清洁级动物房。小鼠 Lewis 肺癌瘤株,购于上海医学科学院实验动物中心。

1.2 药物 (1) 康莱特注射液:10 g/100mL, 国药准字 Z10970091, 批号 0406281-2。小鼠低、中、高用量分别为:0.007g/10g (每 10g 体重用药 0.007 g, 下同)、0.013g/10g、0.025g/10g。(2) 环磷酰胺 (CTX):0.2g/瓶, 国药准字 H32024654, 批号 04041421;小鼠用量为 50mg/kg, 生理盐水配制成 5mg/mL 稀释液。

1.3 主要试剂及仪器 Rabbit anti-VEGF-C (RAB-0243) 稀释度为 1:50, 迈新生物技术有限公司;Trizol、Ribonuclease、Ribonuclease Inhibitor、Oligo (dT) 18 primer、dNTP mix、10× PCR Buffer、Taq DNA polymerase 等试剂购于上海生物工程技术有限公司。实验仪器由所在实验室提供。

2 实验方法

2.1 造模、分组及给药 取传代后 14d 的 Lewis 肺癌瘤株小鼠,无菌条件下剥取其肿瘤组织,匀浆,制成 1×10^7 /mL 瘤细胞悬液,台盼蓝染色,光镜下瘤细胞计数,活细胞 >90%。0.2mL/只种植于 C57BL/6 小鼠右腋下,复制小鼠 Lewis 肺癌转移模型,从取出肿瘤到移植完最后一只小鼠时间控制在 2h 之内。24h 后,将小鼠随机分为 5 组(每组 10 只):模型组;CTX 组;康莱特高、中、低剂量治疗组。康莱特组(高、中、低三剂量组):每只剂量分别为 0.5、0.25、0.125mL,CTX 组和模型组:每只分别注射 0.2mL 的 CTX 和生理盐水,每日 1 次,各组均腹腔给药,连用 14d。

2.2 检测指标 采用免疫组化 SABC 染色法检测 VEGF-C 在 Lewis 肺癌小鼠瘤组织中的表达。VEGF-C 蛋白表达阳性判断标准:A:按细胞染色强度记分,不显色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。B:按显色细胞比例记分,13 以下为 1 分,13~23 为 2 分,23 以上为 3 分。积分数 = A × B, A × B = 0 为阴性(-);A × B = 1~4 为弱阳性,低表达(+);A × B > 4 为强阳性,高表达(++)[1]。

RT-PCR 法:VEGF-C 上游引物序列为 5'-tag ggt ttt ttt cag tat tct-3', 下游引物序列为 5'-ttt tct tgt ttt gtt ttt act t-3', 扩增片段长度为 412bp。其 PCR 预变性(5min,95℃);变性(30s,95℃),退火(30s,55℃),聚合(30s,72℃);延伸(10 min,72℃)。其中变性、退火、聚合共进行 36 个循环。然后将扩增产物分别注入 4%的琼脂糖凝胶上电泳,GIS-2008 凝胶成像系统分析电泳产物。

* 浙江省中医药管理局基金资助课题(No.2004c065)

2.3 统计学处理 采用统计软件包 SPSS11.0 统计, 数值用均数± 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示, 两组间比较用 *t* 检验, 多组间比较用方差分析, 然后用 *q* 检验, 均以 $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性。

3 结果

3.1 康莱特对 VEGF-C 蛋白表达的影响 与模型组比较, CTX 组及康莱特低、中、高剂量组中 VEGF-C 蛋白阳性表达率显著降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

组别	样本	VEGF-C 阳性率
模型组	10	9.02± 0.63
CTX 组	10	3.85± 0.27*
康莱特低剂量组	10	5.23± 0.19*
康莱特中剂量组	10	3.22± 0.08*
康莱特高剂量组	10	2.02± 0.06*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$ 。

3.2 康莱特对 VEGF-C mRNA 的影响 见表 2。康莱特中、高剂量组中 VEGF-C mRNA/GAPDH 与模型组比较, 差异有非常显著性 ($P < 0.01$), 而 CTX 组、康莱特低剂量组中 VEGF-C mRNA/GAPDH 的比值与模型组比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。

组别	样本	VEGF-C mRNA/GAPDH
模型组	10	2.42± 0.08
CTX 组	10	2.17± 0.06*
康莱特低剂量组	10	1.75± 0.02*
康莱特中剂量组	10	0.67± 0.05**
康莱特高剂量组	10	0.46± 0.03**

注:与生理盐水组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

4 讨论

具有局部浸润和远处转移能力是恶性肿瘤细胞特有的性质, 并且是恶性肿瘤威胁病人健康与生命的主要原因。临床与动物实验都证明, 如果没有新生的血管供应营养, 肿瘤在达到 1~2mm 的直径或厚度后, 即 10^7 个细胞左右将不再增大。因此诱导血管的生成能力是恶性肿瘤能生长、浸润与转移的前提之一。血管内生长因子 (VEGF) 是目前发现的可溶性最强、特异性最高的微血管生成正向调节因子, 可增加微血管通透性, 使血浆蛋白从高渗透性的血管中外凝固, 改变细胞外基质, 该基质最终将降解并转化成胶原结缔组织, 为

肿瘤侵袭和转移提供适合的基础^[1], 其对血管内皮细胞的增殖、分化、迁移和管腔状结构的形成、血管内皮基底膜的降解等均有明显的促进作用。

人类 VEGF 基因位于染色体的 6P21, 其 mRNA 的不同剪接产生 5 种异构体, 其中 VEGF 121、145、165 以可溶形式分泌到细胞外, VEGF 的受体是具有亲和力的酪氨酸蛋白激酶受体 (PTKs), 与其它的 PTKs 受体一样, 可通过受体的二聚化及自身磷酸化而激活^[2]。VEGF 及其受体在黑色素瘤、胃癌、肺癌等多种实体瘤中均高表达, 与血管生成及肿瘤恶性程度相关。缺氧可促进微小血管的形成, 使肿瘤细胞得以不断地增殖和转移^[3]。VEGF 的阳性表达与血管密度的增加呈一致性, 表达阳性的病人其中位生存期明显缩短。另外发现亚型的表达与肿瘤的组织类型有关, VEGF189 与非小细胞肺癌关系密切, 临床利用抗 VEGF 及受体的特异性单克隆抗体, 可封闭已经分泌的 VEGF 及其受体 VEGFR, 阻断 VEGF 诱发的血管内皮细胞的信号传导, 抑制肿瘤血管的形成, 从而阻止肿瘤的转移。

本实验结果显示, 康莱特低、中、高剂量组 VEGF-C 的阳性细胞数降低, 以高剂量组降低最为明显, 均低于模型组, 与模型组比较有显著差异 ($P < 0.05$)。VEGF-C 蛋白的阳性表达和血管形成正相关, 血管形成和肿瘤复发转移具有一致性, 本结果提示康莱特可降低 VEGF-C 蛋白的阳性表达, 减少肿瘤血管形成及肿瘤营养供应, 对防止肿瘤复发转移有积极意义, 是防止肿瘤复发转移的可能机制靶点。

参考文献

- [1]王彬彬,冯正权,吴良村. 安体优抑制小鼠 Lewis 肺癌血管生长作用的实验研究[J]. 浙江中医学院学报, 2004, 28(5): 55-56
- [2]Sicinski P, Donaherj L, Parker SB, et al. Cyclin D1 Provides a link between development and on cogenesis in the retina and breast [J]. Cell, 1995, 82(4): 621-630
- [3]Lan Zachary. Molecules in focus vasculature and the hypoxia-inducible growth factor [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1998, 30: 1169-1174
- [4]Christiane BH, Edurne B, Jacques P. Hypoxia: the tumor is gate way to Progression along the angiogenic Pathway [J]. Trends in Cell Biology, 2001, 11: 32-36

(收稿日期: 2007-07-25)

深静脉置管术引流膈下脓肿 18 例报告

汪瑞峰

(浙江省开化县中医院 开化 324300)

关键词: 深静脉置管术; 外科引流; 膈下脓肿

中图分类号: R 632.5

文献标识码: B

文献编号: 1671-4040(2008)01-0006-01

深静脉置管术常用于急救时的加压输液、输血或采血标本等。我院自 2003 年以来应用深静脉置管术引流膈下脓肿 18 例, 疗效满意, 避免进一步手术切开引流。现报告如下:

1 临床资料

1.1 一般资料 本组 18 例中, 男 7 例, 女 11 例; 年龄 38~75 岁, 平均 58.5 岁; 其中胆道手术 10 例, 不规则肝段、叶切除 5 例, 胃大部切除术 2 例, 脾切除合并贲门周围血管离断术 1 例。术后因各种原因引起右膈下脓肿 15 例, 左膈下脓肿 3

例, 同时发现有两个脓腔 2 例, 先后产生两个脓腔 1 例。

1.2 治疗方法 全组病例均应用北京天地协和科技公司产的 16Ga-20cm length-0.32inch 中心静脉导管。在 B 超监测下穿刺, 抽得脓液后拔出针筒, 将导引钢丝注入针芯, 到达脓腔后, 退出针芯, 然后把静脉导管顺导丝插入脓腔, 拔出导丝。最后将导管依托蝶形固定夹固定在腹壁皮肤上, 接消毒引流袋。术后每日 2 次用生理盐水冲洗脓腔, 并根据抽得脓液细菌培养及药敏选择性使用抗生素保留冲洗。(下转第 14 页)