

# 四味消瘤饮抗脑胶质瘤血管生成的研究

詹文刚, 张志强, 谢才军, 谭齐家, 李聪, 陈雲, 陈慧靖

广州中医药大学, 广东 广州 510405

**[摘要]** 目的: 观察四味消瘤饮对脑胶质瘤血管生成的抑制作用, 探讨四味消瘤饮抑制脑胶质瘤血管生成的机制。方法: 建立人脑胶质瘤细胞株 U87 皮下移植瘤模型, 将裸鼠随机分为生理盐水组、常规剂量四味消瘤饮组、大剂量四味消瘤饮组、替莫唑胺 (Temozolomide, TMZ) 组、四味消瘤饮+TMZ 组, 测量裸鼠肿瘤体积, Weidner 法计数裸鼠肿瘤组织微血管密度, 酶联吸附法检测裸鼠血清血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF)、内皮抑素 (Endostatin, ES) 的含量。结果: 与生理盐水组比较, TMZ 组肿瘤体积减小 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 常规剂量四味消瘤饮组、大剂量四味消瘤饮组、四味消瘤饮+TMZ 组肿瘤体积、组织微血管密度 (Microvessel density, MVD)、血清 VEGF 含量减小, 血清 ES 含量升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论: 四味消瘤饮能抑制脑胶质瘤血管生成, 其机制可能是通过上调 ES 和下调 VEGF 实现的。

**[关键词]** 四味消瘤饮; 胶质瘤; 血管生成; 动物实验; 裸鼠

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 01-0009-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.01.003

## Study on the Inhibition of Siwei Xiaoliu Yin on Angiogenesis in Gliomas

ZHAN Wen'gang, ZHANG Zhiqiang, XIE Caijun, Tan Qijia, LI Cong, CHEN Yun, CHEN Huijing

**Abstract:** **Objective:** To observe the inhibitory effect of Siwei Xiaoliu Yin on angiogenesis in gliomas, and explore its mechanism. **Methods:** Established subcutaneous transplantation tumor model of U87 glioma, randomly divided nude mice into the normal saline group, the routine dose of Siwei Xiaoliu Yin group, the high dose of Siwei Xiaoliu Yin group, the temozolomide (TMZ) group, and the Siwei Xiaoliu Yin plus TMZ group, measured the tumor volume, counted the microvessel density (MVD) of tumor tissues by Weidner method, and detected the content of vascular endothelial growth factor (VEGF) and endostatin (ES) in serum of nude mice by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** Compared with that in the normal saline group, the tumor volume in the TMZ group was decreased ( $P < 0.05$ ). The tumor volume, MVD and the content of VEGF in serum in the routine dose and the high dose of Siwei Xiaoliu Yin groups and the Siwei Xiaoliu Yin plus TMZ group were decreased, while the content of ES in the serum was increased when compared with those in the normal saline group, differences being significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Siwei Xiaoliu Yin can inhibit the angiogenesis in gliomas, and the mechanism is probably to up-regulate endostatin and to down-regulate vascular endothelial growth factor.

**Keywords:** Siwei Xiaoliu Yin; Gliomas; Angiogenesis; Animal experiment; Nude mice

胶质瘤是最常见的脑肿瘤, 具有高度迁移性、侵袭性以及增殖能力, 复发率高、预后差、死亡率高等特点, 5 年生存率不足 5%。抑制脑胶质瘤血管生成治疗胶质瘤, 进一步探索胶质瘤的发生、发展及预后情况已成为近年来的研究热点<sup>[1]</sup>。肿瘤血管微环境是在一系列促血管生成因子与抑制血管生成因子作用下进行的<sup>[2]</sup>。血管内皮生长因子 (Vascular endothelial

growth factor, VEGF) 与内皮抑素 (Endostatin, ES) 分别作为促血管生成因子与抑制血管生成的代表性因子, 在肿瘤血管生成中发挥着重要的作用。中药在抗肿瘤血管新生方面起着重大的作用, 课题组通过研究发现莪术能下调荷瘤裸鼠 VEGF 的表达, 从而抗胶质瘤血管生成<sup>[3]</sup>。本研究通过建立人脑胶质瘤细胞株 U87 裸鼠移植瘤模型, 研究四味消瘤饮对裸鼠血清 VEGF 及

**[收稿日期]** 2018-05-30

**[基金项目]** 广东省科技厅-社会发展领域项目 (412030198018)

**[作者简介]** 詹文刚 (1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合治疗脑肿瘤。

**[通信作者]** 张志强, E-mail: doctorzzq@163.com。

ES 含量的影响,探讨四味消瘤饮抑制脑胶质瘤血管生成的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验瘤细胞** U87 细胞由中山大学肿瘤防治中心 629 实验室提供,将处于对数生长期的 U87 细胞置于 EME 培养液中,在 37℃,5%CO<sub>2</sub> 的水饱和条件温孵箱内培养。显微镜下观察至胞质回缩后。记录细胞种类及日期,放入液氮罐中冻存。

**1.2 实验动物** 6~8 周龄健康裸鼠 40 只,体质量 25~30 g,均购自广东省医学实验动物中心,动物许可证号:SCXK(沪)2007-0005,由中山大学 SPF 级动物实验中心饲养。

**1.3 实验药物** 四味消瘤饮由莪术、龙葵各 15 g,天龙 10 g,土茯苓 60 g 组成,从广东省中医院购入,加水 500 mL,煎至 100~150 mL,浸泡 30 min,水开后文火煎煮 30 min,取汁,2 煎加水 300 mL,取汁 100 mL,混合 2 次药液。替莫唑胺(Temozolomide, TMZ)购自江苏天士力帝益药业有限公司,溶解于二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)中,每只裸鼠灌胃 50 mg/(kg·d)。

**1.4 动物分组与肿瘤种植** 将 40 只裸鼠随机分为生理盐水组、常规剂量四味消瘤饮组、大剂量四味消瘤饮组、TMZ 组、四味消瘤饮 +TMZ 组,组间体质量无统计学差异。将培养好的 U87 细胞制成细胞悬液,皮下注射至裸鼠右侧腋部。每天 10 点,生理盐水组灌胃 200 μL 生理盐水,常规剂量四味消瘤饮组灌胃等量常规剂量四味消瘤饮,大剂量四味消瘤饮组灌胃等量大剂量四味消瘤饮,TMZ 组灌胃等量 TMZ,四味消瘤饮 +TMZ 组灌胃等量常规剂量四味消瘤饮 +TMZ,连续灌胃 28 天。

**1.5 肿瘤生长的指标测量** 肿瘤组织块接种可看到裸鼠皮下成瘤,成瘤第 3 天后测量肿瘤的长径(a)及宽径(b),每隔 6 天用游标卡尺测量 1 次,肿瘤体积计算公式如下:肿瘤体积 =  $1/6 \times \pi \times b \times a$ 。

**1.6 血清 VEGF、ES 测定** 灌胃 28 天后摘眼球取血,离心后取上层血清置于 -80℃ 冰箱中保存。严格按照 ELISA 试剂盒步骤检测裸鼠血清 VEGF、ES。

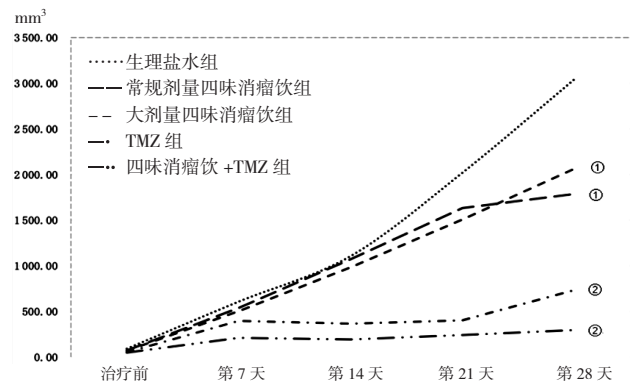
**1.7 肿瘤组织微血管密度 (Microvessel density, MVD) 测定** 拉颈处死荷瘤小鼠,完整剥取肿瘤组织,肿瘤标本制成 5 μm 厚度切片,脱蜡,以柠檬酸抗原修复缓冲液修复后,加 5% 山羊血清封闭于 37℃

孵育箱 10 min。滴加 CD34 一抗,37℃ 孵育 60 min,然后置于 4℃ 冰箱过夜。PBS 洗 3 次,每次 5 min 后,滴加试剂生物素化二抗工作液,放入湿盒中,37℃ 孵育 30 min。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。DAB 显色,显色满意后以自来水洗终止反应,再以苏木素复染细胞核,自来水冲洗,烘干后以中性树胶封片,Meidner 法计数 MVD。

**1.8 统计学方法** 采用 SPSS17.0 统计分析软件。计量资料采用  $(\bar{x} \pm s)$  表示,计量资料采用 *t* 检验,等级资料采用秩和检验,检验水平为  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 各组裸鼠肿瘤体积变化结果比较** 见图 1。随着时间推移,各组裸鼠肿瘤体积逐渐增加。第 28 天测量各组裸鼠肿瘤体积,与生理盐水组比较,常规剂量四味消瘤饮组、大剂量四味消瘤饮组、TMZ 组、四味消瘤饮 +TMZ 组裸鼠肿瘤体积均减小,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。



与生理盐水组比较,① $P < 0.05$ ,② $P < 0.01$

图 1 各组裸鼠肿瘤体积变化结果比较

**2.2 各组裸鼠肿瘤组织 MVD 计数结果比较** 见表 1。与生理盐水组比较,常规剂量四味消瘤饮组、大剂量四味消瘤饮组、四味消瘤饮 +TMZ 组裸鼠肿瘤组织 MVD 均减小,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

表 1 各组裸鼠肿瘤组织 MVD 计数结果比较( $\bar{x} \pm s$ ) 个/HP

组别	n	MVD
生理盐水组	10	25.1 ± 2.7
常规剂量四味消瘤饮组	10	20.7 ± 3.6 <sup>①</sup>
大剂量四味消瘤饮组	10	17.2 ± 3.9 <sup>②</sup>
TMZ 组	10	24.7 ± 3.4
四味消瘤饮 +TMZ 组	10	15.4 ± 3.5 <sup>②</sup>

与生理盐水组比较,① $P < 0.05$ ,② $P < 0.01$

2.3 各组裸鼠血清 VEGF、ES 表达结果比较 见表 2。与生理盐水组比较, 常规剂量四味消瘤饮组、大剂量四味消瘤饮组、四味消瘤饮 +TMZ 组的 VEGF 表达均减少, ES 表达均升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

表 2 各组裸鼠血清 VEGF、ES 表达结果比较( $\bar{x} \pm s$ ) pg/mL		
分 组	VEGF	ES
生理盐水组	253.5 ± 63.2	114.3 ± 19.3
常规剂量四味消瘤饮组	176.2 ± 33.3 <sup>①</sup>	152.1 ± 39.4 <sup>①</sup>
大剂量四味消瘤饮组	134.1 ± 35.0 <sup>②</sup>	192.4 ± 31.4 <sup>②</sup>
TMZ 组	258.1 ± 29.7	119.8 ± 28.5
四味消瘤饮 +TMZ 组	103.4 ± 22.7 <sup>②</sup>	218.4 ± 56.1 <sup>②</sup>

与生理盐水组比较, ① $P < 0.05$ , ② $P < 0.01$

### 3 讨论

肿瘤的生长和转移依赖于血管, 肿瘤血管为肿瘤的生长提供氧气、营养物质等, 抑制肿瘤血管生成, 切断肿瘤的供养, 最终达到遏制肿瘤生长和转移的目的<sup>[4]</sup>。因此, 探明肿瘤血管生成的机制及在肿瘤生成过程中的影响因素, 以抗肿瘤血管生成作为出发点治疗肿瘤将成为控制肿瘤生长、转移的一个重要治疗途径, 对于肿瘤的治疗有战略性意义<sup>[5-6]</sup>。

MVD 能直接反应肿瘤血管生成情况, 随着目前肿瘤血管生成的研究进展, MVD 已逐渐成为实体肿瘤的一个独立预后指标, 也是检测和评价抗肿瘤血管生成药物作用的一个重要指标。CD34 可标记血管内皮细胞, 广泛应用于 MVD 的检测。本研究利用 CD34 抗体, 采用免疫组化法检测各组裸鼠肿瘤组织内 MVD 计数, 经统计分析结果提示常规剂量四味消瘤饮组、大剂量四味消瘤饮组、TMZ 组、四味消瘤饮 +TMZ 组裸鼠肿瘤组织 MVD 均少于生理盐水组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 表明四味消瘤饮能有效降低肿瘤组织内 MVD 计数, 且呈一定的量效关系, 四味消瘤饮与 TMZ 联合用药能在抗肿瘤血管生成方面具有协同作用。

肿瘤血管新生的过程十分复杂, 其基本步骤为: 调节肿瘤血管生成的促血管生成因子与抑制血管生成因子之间的平衡被打破, 血管生成表型形成; 血管内皮基底膜降解; 血管内皮细胞的迁移以及增殖; 内皮细胞管道化; 分支形成血管环; 形成新的基底膜。因此, 调节肿瘤血管生成过程中的各个环节, 抑制肿瘤血管的生成以达到控制肿瘤发展、转移已成为治疗肿

瘤的一个重要途径。

肿瘤血管的生成受到一系列的因子调节, 包括促血管生成因子和抑制血管生成因子, 其在肿瘤的发生和发展过程中起着重要的作用。促血管生成因子和抑制血管生成因子具有相互拮抗的作用, 在正常情况下, 这 2 类因子保持相对平衡的状态, 当发生肿瘤时, 这种平衡状态被打破, 使得肿瘤细胞生成促血管生成的物质增多, 从而启动、促进了肿瘤血管的生成。VEGF 是目前已知作用最强的促血管生成因子, VEGF 能特异性的促进血管内皮细胞的有丝分裂和增加血管通透性因子, 并使大量纤维蛋白从血管向外渗出, 进而促进血管内皮细胞的迁移和增殖, 最后致使肿瘤血管生成, 在原发性肿瘤的发生、发展和转移过程中发挥着重要的作用<sup>[7-10]</sup>。ES 能抑制血管内皮细胞增殖, 从而减缓肿瘤的生长和转移。本研究证实四味消瘤饮能降低荷瘤裸鼠体内 VEGF 以及提高 ES 的表达, 表明其具有很好的抑制胶质瘤血管新生的作用。

促进胶质瘤进展和复发的因素有很多, 这使得胶质瘤的治疗方法受到了极大的限制。以抗胶质瘤血管生成作为出发点治疗胶质瘤, 将中医融入胶质瘤的治疗中, 探索中药抗胶质瘤血管生成的作用及其机制具有重大的意义。

### [参考文献]

- [1] Wen PY, Reardon DA. Progress in glioma diagnosis, classification and treatment[J]. Nat Rev Neurol, 2016, 12(2): 69-70.
- [2] Hanahan D. Rethinking the war on cancer[J]. Lancet, 2014, 383(9916): 558-563.
- [3] 张志强, 韩富, 谢海涛, 等. 乌骨藤对裸鼠胶质瘤作用的实验研究[J]. 新中医, 2013, 45(1): 160-161.
- [4] Jhaveri N, Chen TC, Hofman FM. Tumor vasculature and glioma stem cells: Contributions to glioma progression[J]. Cancer Lett, 2014, 16(14): 783-786.
- [5] Borhani K, Bamdad T, Hashempour T. Low dose of lenalidomide enhances NK cell activity: possible implication as an adjuvant[J]. Iranian Journal of Immunology, 2017, 14(2): 151-158.
- [6] Sun H, Guo D, Su Y, et al. Hyperplasia of pericytes is one of the main characteristics of microvascular architecture in malignant glioma[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e114246.
- [7] 鲁美钰, 仲维兰, 司春枫, 等. 肿瘤血管生成机制及抗肿瘤血管新生的靶向药物研究进展[J]. 安徽医药, 2018,



- 22(5): 798-802.
- [8] Bhattacharya R, Xia L, Fan F, et al. Inhibition of intracrine VEGF signaling prevents colorectal cancer cell migration and invasion[J]. Cancer Res, 2016, 76(14): 3255-3255.
- [9] Krcek R, Matschke V, Theis V, et al. Vascular endothelial growth factor, irradiation, and axitinib have diverse effects on motility and proliferation of glioblastoma multiforme cells[J]. Front Oncol, 2017, 7(8): 182.
- [10] 项高波, 邓勇, 鲍凤, 等. IL-24 与 VEGF 在脑胶质瘤中的表达以及与肿瘤微血管密度的关系[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(7): 810-813.
- (责任编辑: 冯天保, 钟志敏)

## 香菇多糖联合云芝糖肽对 Lewis 肺癌小鼠免疫调节与抗肿瘤作用的研究

艾亮, 王晓东

锦州医科大学附属第一医院胸外科, 辽宁 锦州 121000

**[摘要]** 目的: 探讨香菇多糖 (Lentinan, LNT) 和云芝糖肽 (Polysaccharopeptide, PSP) 联合使用对免疫抑制小鼠和肺癌小鼠的免疫调节作用和抗肿瘤活性。方法: 以 Lewis 肺癌细胞建立肺癌小鼠模型, 随机分为空白组 (B1 组)、生理盐水组 (N1 组)、PSP+LNT 组 (C1 组) 和阿霉素 (Adriamycin, ADM) 组 (A1 组); 以多柔比星 KM 小鼠建立免疫抑制模型, 随机分为空白组 (B2 组)、生理盐水组 (N2 组) 和 PSP+LNT 组 (C2 组); 2 模型中 B1 组和 B2 组小鼠不行肺癌细胞和 ADM 注射, 2 模型中 N1 组与 N2 组、C1 与 C2 组在建模后连续 20 天分别通过灌胃法注入生理盐水 0.2 mL 和 PSP+LNT 的混合溶液 0.2 mL, A1 组小鼠连续 3 天腹腔内注射 4 mg/(kg·d) ADM。采用自动血细胞分析仪对外周血白细胞 (WBC) 进行计数; 比较各组小鼠胸腺指数、脾脏指数和抑瘤作用; 采用流式细胞术测定外周血中 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞, 并计算其比值; 用微量样本多指标流式蛋白定量方法 (CBA) 和小鼠 Th1/Th2/Th17 细胞因子 CBA 分析试剂盒测定小鼠血清中白细胞介素-2 (Interleukin-2, IL-2)、肿瘤坏死因子 (Tumor necrosis factor, TNF)、干扰素- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-4 (Interleukin-4, IL-4)、白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-10 (Interleukin-10, IL-10) 和白细胞介素-17A (Interleukin-17A, IL-17A) 的含量。结果: 肺癌模型中, 与 B1 组比较, N1 组外周 WBC 数量、胸腺指数、脾脏指数、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 比值、TNF、IFN- $\gamma$ 、IL-2 和 IL-17A 均显著降低 ( $P < 0.05$ ), 血清中 IL-10 的含量增高 ( $P < 0.05$ ); 与 N1 组比较, C1 组外周 WBC 数量、胸腺指数、脾脏指数、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 比值、TNF、IFN- $\gamma$ 、IL-2 和 IL-17A 均显著提高 ( $P < 0.05$ ), 血清中 IL-10 的含量降低 ( $P < 0.05$ ), 平均肿瘤重量较低 ( $P < 0.05$ ); 而 A1 组外周 WBC 数量、胸腺指数、脾脏指数、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 比值、TNF、IFN- $\gamma$ 、IL-2 和 IL-17A 明显降低 ( $P < 0.05$ ), 2 组平均肿瘤重量没有差别。免疫抑制模型中, 与 B2 组比较, N2 组外周 WBC 数量、胸腺指数、脾脏指数、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 比值、TNF、IFN- $\gamma$ 、IL-2 和 IL-17A 均显著降低 ( $P < 0.05$ ), 血清中 IL-10 的含量增高 ( $P < 0.05$ ); 与 N2 组比较, C2 组外周 WBC 数量、胸腺指数、脾脏指数、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 比值、TNF、IFN- $\gamma$ 、IL-2 和 IL-17A 均显著提高 ( $P < 0.05$ ), 血清中 IL-10 的含量降低 ( $P < 0.05$ )。结论: LNT 和 PSP 联合使用对 Lewis 肺癌小鼠有免疫促进作用和抗肿瘤作用。

**[关键词]** 云芝多糖 (LNT); 香菇多糖 (PSP); 肺癌; 免疫调节; 抗肿瘤; 动物实验; 小鼠

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 01-0012-06

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.01.004

## Study on Immunomodulatory and Antitumor Effects of Lentinan Combined with Polysaccharopeptide on Lewis Lung Cancer in Mice

AI Liang, WANG Xiaodong

**Abstract:** Objective: To explore the immunomodulatory effect and antitumor activities of the combined application of

**[收稿日期]** 2018-06-07

**[作者简介]** 艾亮 (1982-), 男, 主治医师, 研究方向: 肺癌基础与临床研究。

**[通信作者]** 王晓东, E-mail: antiy@sina.com。