

枸杞多糖对小鼠结直肠癌肿瘤生长的抑制作用及对血管形成机制的影响

蒋正财, 陈统

温州医科大学附属第二医院肿瘤外科, 浙江 温州 325000

[摘要] 目的: 探讨枸杞多糖(LBP)对小鼠结直肠癌肿瘤生长及血管形成机制的影响。方法: 建立小鼠CT26结直肠癌肿瘤模型, LBP给药观察对模型小鼠肿瘤生长的抑制作用, 绘制肿瘤生长曲线; 肿瘤组织切片, 免疫组织化学方法检测CD31表达, 观察肿瘤间质血管密度; 大鼠动脉环实验观察LBP对血管形成的影响。体外实验QPCR检测LBP对脑组织特异性血管生成抑制因子1(BAI1)表达的影响, 同时检测LBP对结直肠癌细胞株(CT26)及人真皮微血管内皮细胞株(HDMEC)增殖的影响。结果: LBP用药组CT26结直肠癌小鼠肿瘤重量为(0.31±0.04)g小于对照组(0.63±0.06)g($P < 0.05$); 绘制肿瘤生长体积曲线, 发现LBP可抑制小鼠肿瘤的生长($P < 0.05$)。CD31染色显示LBP用药组小鼠肿瘤间质血管密度小于模型组($P < 0.05$)。LBP对大鼠动脉环血管形成具有明显抑制作用, 且与浓度有关。体外实验发现, 与对照组比较, LBP 500 μg/mL及1 000 μg/mL处理HDMEC后, BAI1表达上调($P < 0.01$); LBP药物浓度设定在0~1 000 μg/mL之间, 随着浓度的增加, LBP对小鼠结直肠癌CT26细胞及HDMEC细胞增殖均无明显的影响。结论: LBP对小鼠结直肠癌生长的抑制作用可能与抑制血管形成、上调BAI1表达有关, 但具体的作用机制有待进一步阐明。

[关键词] 枸杞多糖(LBP); 结直肠肿瘤; 血管形成; 细胞增殖; 脑组织特异性血管生成抑制因子1(BAI1); 动物实验; 大鼠; 小鼠

[中图分类号] R735.3 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2018) 08-0009-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.08.003

Lycium Barbarum Polysaccharides Has Effect on the Inhibition of Growth of Colorectal Cancer and the Mechanism of Angiogenesis in Mice

JIANG Zhengcai, CHEN Tong

Abstract: **Objective:** To discuss the effect of lycium barbarum polysaccharides (LBP) on the inhibition of growth of colorectal cancer (CRC) and the mechanism of angiogenesis in mice with colorectal neoplasms. **Methods:** Established CT26 colorectal cancer tumor model of mice, observed the inhibition of growth of tumor in model mice with LBP administration, drew a tumor growth curve, made tumor tissue sections, detected CD31 expression by applying immunohistochemical method, and observed tumor interstitial vascular density. Arterial rings experiments of rats were used to observe the effect of LBP on angiogenesis. In vitro QPCR was used to detect the effect of LBP on expression of brain tissue-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) and the proliferation of CT26 (colorectal cancer cell line) and microvascular endothelial cells of human skin (HDMEC). **Results:** The weight of colorectal neoplasms in mice in the medication group of LBP was (0.31 ± 0.04)g, being lower than that of (0.63 ± 0.06)g in the control group ($P < 0.05$). LBP was found able to inhibit the growth of mouse tumor by means of drawing the tumor growth volume curve ($P < 0.05$). CD31 staining showed that the tumor interstitial vascular density was lower in the the medication group of LBP than that in the model group ($P < 0.05$). LBP has a significant inhibitory effect on angiogenesis of arterial ring in rats, and it is related to the concentration. In vitro experiments showed that, compared with the control group, BAI1 expression was up-regulated after HDMEC was treated with LBP 500 μg/mL and 1 000 μg/mL ($P < 0.01$). LBP drug concentration was set between 0 and 1 000 μg/mL, and as the concentration increased, LBP had no significant effect on the proliferation of CT26 cells and HDMEC cells in colorectal cancer in mice. **Conclusion:** The inhibitory

[收稿日期] 2018-03-09

[作者简介] 蒋正财 (1979-), 男, 主治医师, 研究方向: 肿瘤外科。

effect of LBP on the growth of colorectal cancer may be related to inhibiting angiogenesis and up-regulating BAI1 expression, but the specific mechanism remains to be further illustrated.

Keywords: Lycium barbarum polysaccharides (LBP); Colorectal neoplasms; Angiogenesis; Cell proliferation; Brain tissue-specific angiogenesis inhibitor 1(BAI1); Animal experiment; Rats; Mice

结直肠癌(Colorectal cancer, CRC)是我国常见恶性肿瘤之一, 2015年我国CRC患病人数男性新增21.57万, 女性新增16.06万, 死亡人数男性为11.11万, 女性为8万^[1]。近年来, 抗血管治疗无论在基础研究还是临床应用中都取得了一定的成果, 如贝伐单抗是美国食品药品监督管理局批准的一线治疗CRC的重组人源化单克隆抗体, 但靶向肿瘤血管药物却存在价格昂贵、容易出现不良反应及耐药等缺点, 而我国传统医药治疗肿瘤具有多靶点的特点, 以及价格低廉、毒副作用小的优势, 可弥补此方面的缺陷。本课题组前期实验结果表明枸杞多糖(LBP)可抑制肝癌模型小鼠血管内皮生长因子(VEGF)的表达^[2], LBP是否具有抑制CRC肿瘤血管形成的作用, 其具体作用机制需要进一步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物与细胞 6~8周SPF级SD大鼠2只, 雌性, 体质量(200±20)g, 由南方医科大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(粤)2016-0041。6~8周SPF级Balb/c小鼠16只, 雄性, 体质量(20±2)g, 由南方医科大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(粤)2016-0041, 实验动物饲养于室温20~26℃、相对湿度40%~70%的环境中, 昼夜明暗光照时间(12 h明/12 h暗)。小鼠CRC结直肠癌细胞株(CT26)细胞和人真皮微血管内皮细胞(HDMEC)由温州医科大学附属第二医院实验室保种。

1.2 药物、试剂与仪器 LBP(质量分数为60%, 生产批号: K140828)购于中国西安开来生物工程有限公司, CD31抗体购于Abcam公司, 免疫组化抗兔二抗购于中国北京中杉金桥生物技术公司; PCR引物由中国英捷捷基公司合成, DAB购于美国CST公司; matrigel购于美国BD公司, SYBR Green Mix和逆转录试剂盒购于Takara公司。二氧化碳培养箱(美国Thermo公司); 超净工作台(苏州净化); 白光拍摄显微镜(日本奥林巴斯)。

1.3 建立小鼠结直肠癌模型 把小鼠随机分为对照组和实验组, 每组8只, 将对数期生长的CT26细胞按照每只小鼠 2×10^5 个/0.2 mL接种于小鼠左侧腋前皮下。4天后可看到肿瘤长出, 开始给药, 依据课题组前期研究基础^[3-4], LBP给药浓度为50 mg/kg, 腹腔注射, 每2天给药1次; 游标卡尺测量肿瘤的长短径, 每2天检测1次, 绘制肿瘤生长曲线, 共给药12天。在给药结束后, 脱臼处死小鼠, 肿瘤剥离后称重, 放入体积分数为10%甲醛溶液固定24 h, 常规脱水石蜡包埋、病理制片。

1.4 免疫组化染色 常规脱蜡-切片肿瘤组织, PBS洗3次, 每次5 min, 柠檬酸钠修复液(pH 6.0)高温高压热修复8 min, 自然冷却后放入3% H₂O₂甲醇溶液37℃浸泡30 min, PBS再洗3次, 每次5 min, 组织上加10% BSA封闭, 加一抗CD31置于4℃过夜。将组织切片从封闭盒中拿出, PBS洗3次, 每次5 min, 于组织上加上二抗辣根过氧化物酶山羊抗兔二抗37℃孵育1 h, 然后PBS洗3次, 每次5 min, DAB显色10 s, 流水冲掉, 苏木素复染30 s流水冲洗, 接着常规脱水, 最后于组织上滴加适量中性树胶, 盖上盖玻片, 自然晾干。

1.5 大鼠动脉环实验 6~8周龄SD雌性大鼠, 用乙醚麻醉后脱臼处死; 将大鼠浸泡于75%酒精中2 min, 放入原代细胞房操作台中, 打开胸腔, 沿脊柱剪下大鼠胸主动脉; 将血管置于大的细胞培养皿中, 放入无菌PBS洗3遍, 除去血液; 用精密剪、精密镊剥离干净血管周围结缔组织, 用精密剪将血管剪成1 mm高圆环; 在细胞传代房间超净台中, 提前于4℃预冷枪头、48孔板, 在冰上把matrigel 100 μL加入48孔板中, 避免气泡, 轻轻拍打48孔板使其分布均匀, 把48孔板放入37℃细胞培养箱中15 min使matrigel凝固; 用精密镊将剪好的血管环放入凝固的matrigel中, 使其位于中央, 再加入matrigel 100 μL, 避免气泡, 将48孔板放入37℃细胞培养箱中15 min使matrigel凝固。根据预实验, LBP药物浓度为500 μg/mL及1 000 μg/mL两个浓度, 用EBM培养基配制, 500 μL/孔, 每天观察血管生长情况, 8天后, 向48孔板中加入4%多聚甲醛固定液, 室温固定30 min后拍照。

1.6 CCK8细胞增殖实验 将CT26和HDMEC对数生长期细胞消化计数, 以2 000个/孔接种于96孔板中, 第2天弃掉培养基, LBP药物浓度设计为0、50、100、200、500、1 000 μg/mL, 用培养基稀释后, 每孔100 μL加入, 48 h后, 每孔加入10 μL CCK8, 细胞培养箱孵育2 h后, 酶标仪450 nm测量每孔吸光度。

1.7 QPCR检测HDMEC细胞脑组织特异性血管生成抑制因子1(BAI1)基因的表达 培养HDMEC细胞, 对数期生长的细胞汇合度达到90%, 消化, 计数, 按 1.0×10^5 个/孔铺6孔板。第2天, 弃掉培养基, 用EBM培养基配置500 μg/mL和1 000 μg/mL的枸杞多糖用组, 对照组加入相同体积的EBM培养基, 培养48 h。48 h后, 弃掉培养基, PBS洗3次, 弃掉PBS; RNA提取、逆转录严格按照试剂盒说明书进行, cDNA用DEPC稀释8倍后, 按照试剂盒说明进行操作分析。BAI1引物序列为, 上游引物: 5'-CAGAGGAGCAGCTGGACAGAGA

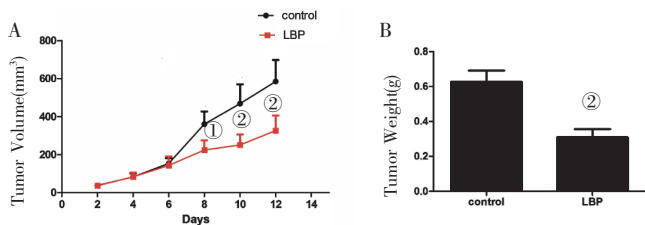
AAG-3', 下游引物: 5'-TCAGGA GACAGTGGGAAGCAGCG-3'。

1.8 统计学方法 肿瘤组织血管密度采用 Image pro plus 软件对结果进行处理得出数据, 血管环周长用ipp 软件计算。所有数据采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行作图。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验。

2 结果

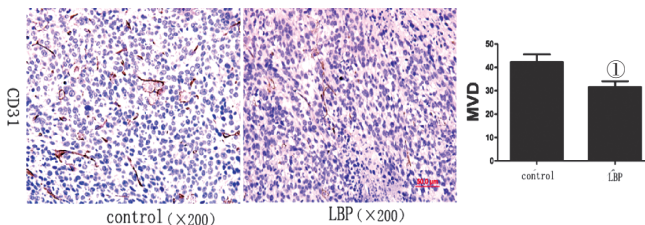
2.1 LBP 对 CT26 小鼠结直肠肿瘤生长的影响 见图 1。LBP 用药组 CT26 CRC 小鼠肿瘤重量为(0.31 ± 0.04)g 小于对照组(0.63 ± 0.06)g($P < 0.05$) (图 1B); 绘制肿瘤生长体积曲线, 发现 LBP 可抑制小鼠肿瘤的生长($P < 0.05$) (图 1A)。

2.2 LBP 对肿瘤组织血管生成的影响 见图 2。LBP 用药组血管数(31.6 ± 2.45)条/视野明显少于对照组(42.3 ± 3.28)条/视野($P < 0.05$), 表明 LBP 可抑制肿瘤血管的形成。



与对照组比较, ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$

图 1 LBP 对 CT26 小鼠结直肠癌肿瘤生长的影响



与对照组比较, ① $P < 0.05$

图 2 LBP 对肿瘤组织血管生成的影响

2.3 LBP 对大鼠动脉环血管形成的影响 见图 3。观察动脉环周围新生成的血管数量, LBP 用药剂量分别在 500 $\mu\text{g/mL}$ 和 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 时血管数明显少于对照组, 表明 LBP 对大鼠动脉环血管形成具有抑制作用, 且与浓度相关。

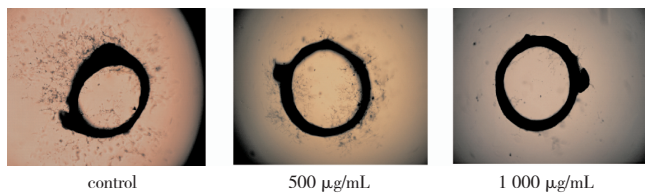


图 3 LBP 对大鼠动脉环血管形成的影响($\times 60$)

2.4 LBP 对 CT26 及 HDMEC 细胞增殖的影响 见图 4。LBP 药物浓度设定在 0 ~ 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 之间, 随着浓度的增加, LBP 对小鼠 CRC CT26 细胞(图 4A)及 HDMEC 细胞(图 4B)增殖均无

明显的影响。

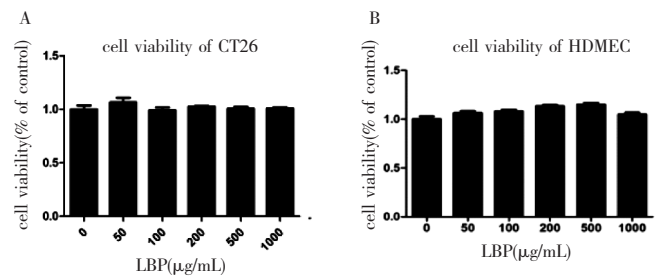
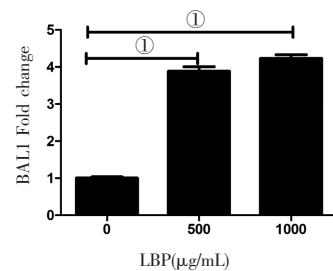


图 4 LBP 对 CT26 及 HDMEC 细胞增殖的影响

2.5 LBP 对 HDMEC 内皮细胞 BAI1 表达的影响 见图 5。与对照组比较, LBP 500 $\mu\text{g/mL}$ 及 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 处理 HDMEC 后, BAI1 表达上调($P < 0.01$)。



与对照组比较, ① $P < 0.01$

图 5 LBP 对 HDMEC 内皮细胞 BAI1 表达的影响

3 讨论

恶性肿瘤侵袭与转移是治疗失败的主要原因, 血管形成成为肿瘤细胞提供了丰富的氧及营养物质, 为促进其恶性生物学行为创造了条件^[5]。抗血管生成药物通过切断恶性肿瘤细胞的养分补给, 并阻断侵袭转移的血行通道, 使肿瘤细胞静止于休眠状态, 因此, 以抑制肿瘤血管形成为目的生物治疗受到广大研究者关注。

研究证实许多中药具有抗血管作用, 例如蜂毒素、去甲斑蝥素、蟾毒灵三种抗肿瘤中药对人体肝癌细胞 HepG2 细胞及人脐静脉内皮细胞 ECV304 细胞的生长均有不同程度抑制作用, 在一定范围内呈浓度和时间的依赖性, 鸡胚绒毛尿囊膜实验证实三种药物不同浓度均能抑制肿瘤血管形成^[6]。潘子民等^[7]研究发现人参皂苷 Rg3 可通过下调肿瘤 VEGF2 mRNA 及蛋白的表达量, 阻滞肿瘤血管生成。中医药治疗肿瘤具有多靶点的特点, 以及价格低廉、毒副作用小的优势, 可弥补靶向抗肿瘤血管治疗方面的缺陷, 从而为肿瘤的治疗开辟更好的途径。

课题组前期实验结果表明 LBP 可抑制肝癌模型小鼠 VEGF 的表达^[2], 同时发现 LBP 可抑制自发乳腺癌小鼠肿瘤生长及减少肿瘤间质血管形成^[4]。本研究在体内实验中, 采用 CT26 结直肠癌小鼠肿瘤模型, LBP 整体给药情况下, 与对照组比较, LBP 对结肠癌小鼠肿瘤的生长亦具有一定的抑制作用, 采用免

疫组织化学检测发现肿瘤间质血管在用药后明显减少。进一步通过大鼠动脉环实验发现 LBP 可抑制血管形成；但体外细胞培养，CCK8 细胞增殖实验却没有发现 LBP 对小鼠结肠癌细胞 CT26 及 HDMEC 增殖的抑制作用，说明 LBP 对肿瘤生长的抑制作用与直接杀伤肿瘤细胞或者抑制血管内皮细胞的增殖无明显的关系，有可能是通过一些复杂的体内微环境因素抑制了内皮细胞的功能和血管的形成。BA11 特异性表达在脑组织内，属于 G 蛋白偶联受体的 B 家族，具有抑制血管生成作用¹⁸。QPCR 检测 LBP 可促进 BA11 表达上调，其抑制血管形成机制是否是通过上调 BA11 表达实现的，还需要进一步探明。由于中药抗肿瘤作用具有多靶点的特征，其体内抑制肿瘤生长及抑制血管形成的具体机制需要深入研究。

[参考文献]

[1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2): 115-132.

[2] 何彦丽, 应逸, 苏宁, 等. 枸杞多糖抗实验性肝癌作用及对 VEGF 表达与分泌的影响[J]. 广东医学, 2006, 27(7): 950-952.

[3] 胡妮, 杜标炎, 谭宇蕙, 等. 从诱导树突状细胞成熟角度探讨枸杞多糖联合 CXC 趋化因子配体 10 抗癌作用机制[J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(4): 641-647.

[4] 李媛媛, 亓翠玲, 周芷晴, 等. 枸杞多糖对自发乳腺癌 MMTV-PyMT 小鼠肿瘤生长和转移的作用[J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(6): 618-621.

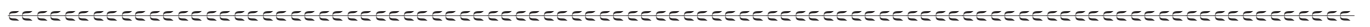
[5] Abdelrahim M, Konduri S, Basha R, et al. Angiogenesis: an update and potential drug approaches[J]. Int J Oncol, 2010, 36(1): 5-18.

[6] 翟笑枫. 三种抗肿瘤中药有效成分抑制血管生成的实验研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2006.

[7] 潘子民, 叶大风, 谢幸, 等. 人参皂甙 Rg3 对荷卵巢癌的严重联合免疫缺陷鼠的抗肿瘤血管生成作用的研究[J]. 中华妇产科杂志, 2002, 37(4): 227-230.

[8] Duda DG, Sunamura M, Lozomehi L, et al. Overexpression of the p53-inducible brain-specific angiogenesis inhibitor 1 suppresses efficiently tumor angiogenesis [J]. Br J Cancer, 2002, 86(3): 490-496.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)



《新中医》杂志稿约 (2018 年)

《新中医》是由国家中医药管理局主管、广州中医药大学与中华中医药学会共同主办的国家级学术期刊，1969 年创刊。标准刊号：ISSN 0256-7415，CN 44-1231/R，月刊，期刊代号：国内：46-38，国外：M186。根据国家的有关标准和科技期刊的编排规范，对来稿做出如下要求：一、**征稿内容**：本刊设有方药研究、临床研究、针灸研究、名家经验、思路研究、文献研究、护理研究、医案研究等专栏。二、**来稿要求**：主题鲜明，论点明确，论据充分，文字精炼，内容真实，资料可靠，数据准确，数据比较应做统计学处理。三、**来稿格式**：参照本刊格式。四、**投稿方式**：在线投稿。网址：<http://xzy.ijournal.cn>。五、**文责自负**：作者如有侵权行为，本刊不负连带责任。署名人的顺序由作者决定。依照《著作权法》，本刊对文稿有修改权、删节权，修改稿未按时寄回视作自动撤稿。六、**稿件采用**：需与编辑部签订论文著作权转让书，并及时寄回《新中医》编辑部档案室。编辑部地址：广州市番禺区广州大学城外环东路 232 号广州中医药大学办公楼《新中医》编辑部。邮编：510006。电话：020-39359588。