

桑黄灵芝 UE-1 对肿瘤生长及血管新生的抑制作用

张海英¹,何旭¹,杨旭芳¹,李敬轩²,李航³

Inhibitory Effect of Mesima Reishi UE-1 on Tumor Growth and Angiogenesis

ZHANG Hai-ying¹, HE Xu¹, YANG Xu-fang¹, LI Jing-xuan², LI Hang³

1. The Key Laboratory of Pathobiology, Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Norman Bethune College of Medicine, Jilin University; 3. Nikkei Edible Fungus Research Institute

Corresponding Author: HE Xu, E-mail:hexu00@163.com

Abstract: Objective To study the inhibitory effect of Mesima Reishi UE-1 on growth and angiogenesis of Lewis pulmonary carcinoma. **Methods** The models of Lewis pulmonary carcinoma were used to test the effect of UE-1 on tumor growth, and microvessel density was investigated in entity tumor by immunohistochemical technique. The count of tumor-induced new vessel was used to manifest the effect of UE-1 on Lewis pulmonary carcinoma angiogenesis. The inhibition of UE-1 on chick chorioallantoic membrane (CAM) angiogenesis was studied by CAM assay. **Results** The average weight and volume of Lewis pulmonary carcinoma in UE-1 group were lower than those in control group($P<0.05$). The MVD of entity tumor in UE-1 group was also lower than that in control group($P<0.05$). The number of vessels oriented toward the tumor mass in UE-1 group was less than that in control($P<0.05$). The CAM assay showed that UE-1 polysaccharide had anti-angiogenic effect. **Conclusion** Mesima Reishi UE-1 can inhibit the growth of Lewis pulmonary carcinoma. The inhibitory mechanism may be related to anti-angiogenic activity of UE-1.

Key words: Mesima Reishi UE-1; Tumor growth; Angiogenesis

摘要:目的 观察桑黄灵芝 UE-1 对 Lewis 肺癌生长及血管新生的抑制作用。**方法** 建立 Lewis 肺癌实体瘤模型,观察其抗肿瘤作用;通过免疫组织化学染色,检测肿瘤微血管密度;采用新生血管计数实验检测 UE-1 对肿瘤组织血管生成的影响;通过鸡胚尿囊膜血管新生实验观察 UE-1 多糖的抗血管新生作用。**结果** 实体瘤模型中,UE-1 组移植瘤重量和体积明显低于对照组($P<0.05$),且微血管密度值也低于对照组($P<0.05$);肿瘤诱导新生血管中 UE-1 组肿瘤周围的血管数明显少于对照组($P<0.05$);鸡胚尿囊膜血管新生实验显示 UE-1 多糖具有抑制血管新生作用。**结论** 桑黄灵芝 UE-1 可抑制 Lewis 肺癌的生长,可能是通过抑制肿瘤血管新生来发挥其抑瘤作用。

关键词: 桑黄灵芝 UE-1;肿瘤生长;血管新生

中图分类号:R73-3 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2010)04-0369-04

0 引言

恶性肿瘤是严重威胁人类健康和生命的疾病,充分开发利用中草药进行抗肿瘤治疗已成为国内外抗肿瘤新药研究的热点。桑黄灵芝 UE-1 (Mesima

Reishi UE-1)是从真菌桑黄与灵芝中提取的多糖组成的复方制剂,命名为桑黄灵芝 UE-1。研究表明,桑黄可通过细胞调节和体液免疫来提高免疫力而抑制肿瘤细胞生长和转移^[1-2]。灵芝的抗肿瘤作用也已得到国际公认,其多糖还具有抗血管新生作用^[3]。本实验通过 Lewis 肺癌实体瘤模型,观察桑黄灵芝 UE-1 抗肿瘤生长作用,并以肿瘤血管为切入点,探讨其血管新生抑制作用。

1 材料与方法

1.1 细胞系和实验动物

Lewis 肺癌细胞由本教研室提供。纯系 C57

收稿日期:2008-12-11;修回日期:2009-04-16
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470662)
作者单位:1. 130021 长春,吉林大学病理生物学教育部重点实验室;2. 吉林大学白求恩医学院;3. 长春日惠食用菌研究所
通信作者:何旭, E-mail: hexu00@163.com
作者简介:张海英(1975-),女,博士在读,实验师,主要从事肿瘤病理学研究

BL/6 小鼠,6~8 周龄,体重 18~20 g,雌性,购于本校实验动物部。SPF 鸡胚由长春市生物制品所惠赠。

1.2 药物和试剂

桑黄灵芝 UE-1 和灵芝多糖由长春日惠食用菌研究所提供,使用前用蒸馏水稀释成所需浓度,以蒸馏水为溶剂对照组。环磷酰胺(CTX)30 mg/kg,江苏恒瑞医药有限公司。新生小牛血清和高糖-DMEM 购于 Hyclone 公司。SP 免疫组织化学试剂盒和第Ⅷ因子抗体,购于福州迈新生物有限公司。

1.3 Lewis 肺癌实体瘤模型的建立

无菌条件下,取 Lewis 肺癌实体瘤,用玻璃匀浆器加 0.9%氯化钠溶液(1:3)制成密度为 5×10^6 /ml 细胞悬液,取 0.2 ml 接种于 C57BL/6 小鼠右侧背部皮下,将动物随机分成 3 组(对照组,1.0 g/kg UE-1 组,30 mg/kg CTX 组)。次日 UE-1 开始口服给药(1 次/天),环磷酰胺腹腔注射(1 次/2 天)。接种肿瘤细胞后第 10 日起,每日用游标卡尺测量肿瘤的长径和宽度,计算肿瘤容积($V = 0.52 \times \text{lenth} \times \text{width}^2$),描绘移植瘤生长曲线。第 22 天脱颈处死动物,称动物体重及瘤重,计算肿瘤生长抑制率(%),其值为(1-治疗组平均瘤重/对照组平均瘤重) $\times 100\%$ 。移植瘤经固定、脱水、石蜡包埋后,做 HE 染色及第Ⅷ因子免疫组织化学染色,观察瘤体内微血管密度(microvessel density, MVD)。

1.4 肿瘤诱导的新生血管计数实验

参考 Kreisle 等^[4]方法,部分进行改进:选取 C57 BL/6 小鼠背部正中一点,真皮浅层注入 Lewis 肺癌细胞 5×10^5 /点,随机分 3 组(对照组,1.0 g/kg 和 2.0 g/kg UE-1 组),于接种第 1、2、3、4、5 天分别口服给予 UE-1,第 7 天脱颈处死小鼠。分离小鼠背部皮肤,测量瘤体大小,解剖显微镜下(7 $\times$)计数朝向瘤体方向生长的血管数。

1.5 鸡胚尿囊膜血管新生实验

将 3 日龄鸡胚置检卵灯下寻找胚头,在鸡胚气室端钻孔并穿透气室壳膜和卵壳膜,暴露下方的尿囊膜(CAM),用封口膜封住卵窗,放入恒温箱(37℃、湿度 70%)内孵育 3 日。3 日后将直径 0.4 cm 无菌滤纸放置于 CAM 上无血管区,随机分 4 组(对照组,20 mg/L 和 40 mg/L UE-1 多糖组,40 mg/L 灵芝多糖组),在 CAM 上分别加入 10 μ l 上述物质,48 h 后,取出鸡胚,解剖镜下观察滤纸片周围毛细血管生成情况。

1.6 统计学方法

应用 Instat 软件,根据数据类型采用 *t* 检验,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 桑黄灵芝 UE-1 对 Lewis 肺癌生长的抑制作用

UE-1 组瘤重明显低于对照组,两者之间差异有统计学意义($P < 0.05$),可见 UE-1 明显抑制了体内 Lewis 肺癌的生长。但 UE-1 组瘤重明显高于阳性药物组($P < 0.05$),说明 UE-1 的抑瘤作用较传统的细胞毒性抗肿瘤药物的作用差,见表 1。

表 1 桑黄灵芝 UE-1 对 Lewis 肺癌生长的抑制作用
Table 1 Inhibitory effect of Mesima Reishi UE-1 on the growth of Lewis pulmonary carcinoma

Group	Dosage	Animal(<i>n</i>)	Animal weight (g)		Tumor weight (g, $\bar{x} \pm s$)	Inhibitory rate(%)
		beginning/end	beginning	end		
Control	0.2 ml	5/5	19.3	22.1	1.63 $\pm$ 0.53	-
CTX	30 mg/kg	5/5	18.9	19.9	0.67 $\pm$ 0.37	58.9
UE-1	1.0 g/kg	15/14	19.6	21.1	1.12 $\pm$ 0.43*	31.3

Note: Compared with control, * $P = 0.0463$

移植瘤生长曲线显示 UE-1 组移植瘤体积明显小于对照组,两者之间差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

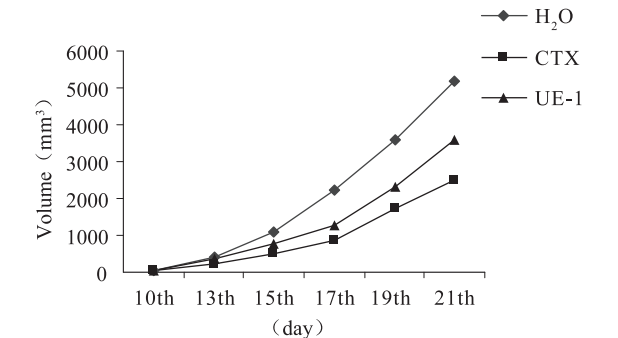


图 1 C57BL/6 小鼠肿瘤体积变化
Figure 1 The tumor volume of C57BL/6 mice

第Ⅷ因子免疫组织化学染色显示肿瘤内血管多数分布于肿瘤组织边缘,其中对照组肿瘤组织内血管丰富,微血管密度(MVD)高于 CTX 组和 UE-1 组,UE-1 组与对照组之间差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2、图 2。

2.2 桑黄灵芝 UE-1 对 Lewis 肺癌诱导新生血管的抑制作用

表 2 肿瘤内微血管密度($\bar{x} \pm s$)
Table 2 The MVD in tumor($\bar{x} \pm s$)

Groups	Case	MVD
Control	5	7.8 $\pm$ 1.21
CTX	5	6.2 $\pm$ 1.87
UE-1	14	6.6 $\pm$ 1.04*

Note: Compared with control, * $P = 0.0483$

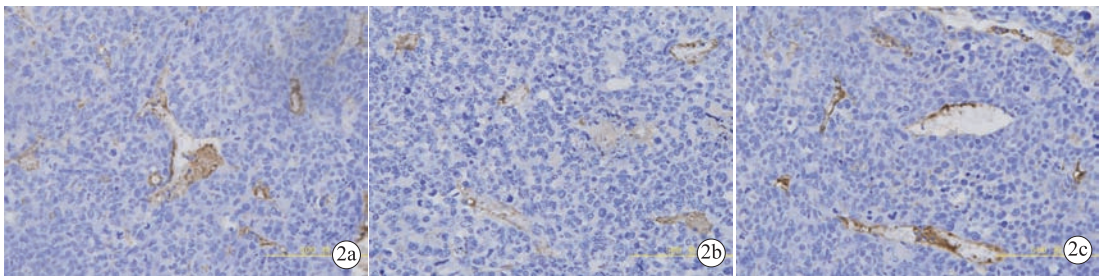


图 2 Lewis 肺癌实体瘤内微血管密度(第Ⅷ因子免疫组织化学染色,×400)

Figure 2 The MVD in Lewis pulmonary carcinoma (Immunohistochemical staining with antibody against Factor Ⅷ, ×400)

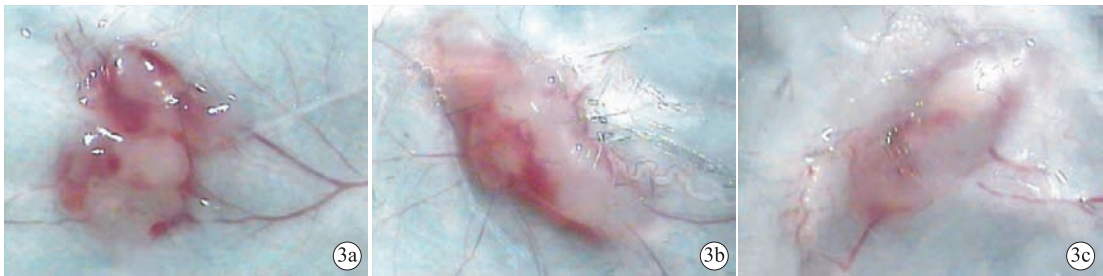


图 3 桑黄灵芝 UE-1 对 Lewis 肺癌诱导肿瘤新生血管形成的抑制作用

Figure 3 Inhibitory effect of Mesima Reishi UE-1 on angiogenesis induced by Lewis pulmonary carcinoma

UE-1 组肿瘤新生血管数少于对照组 ($P<0.05$),但不同剂量 UE-1 对肿瘤新生血管的抑制作用无明显差异,说明桑黄灵芝 UE-1 可抑制 Lewis 肺癌诱导的肿瘤新生血管的形成。瘤体的大小组间差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3、图 3。

2.3 鸡胚尿囊膜血管新生实验

桑黄灵芝 UE-1 多糖对鸡胚尿囊膜血管新生有抑制作用,见图 4,其抑制效果呈明显的量效关系,40 mg/L 组明显抑制血管新生,20 mg/L 组抑制血管新生不明显。

3 讨论

恶性肿瘤是目前危害人类健康的最主要的一类疾病。目前临床上采用的抗肿瘤药物主要是细胞毒性药物,但这类药物在杀伤肿瘤细胞的同时具有选

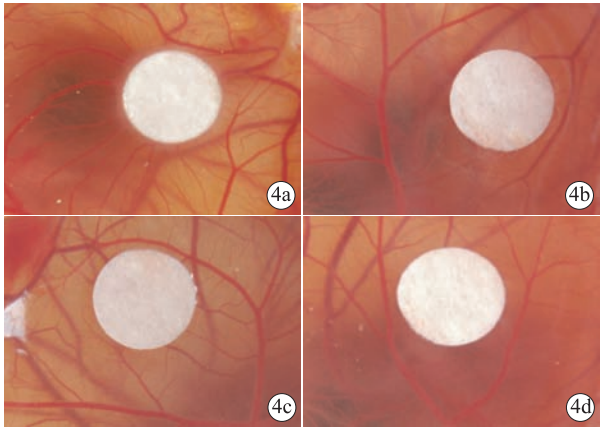


图 4 桑黄灵芝 UE-1 对鸡胚尿囊膜 (CAM)血管新生的抑制作用

Figure 4 Inhibitory effect of Mesima Reishi UE-1 on the chicken chorioallantoic membrane (CAM) angiogenesis

表 3 桑黄灵芝 UE-1 对 Lewis 肺癌诱导肿瘤新生血管形成的抑制作用				
Table 3 Inhibitory effect of Mesima Reishi UE-1 on angiogenesis induced by Lewis pulmonary carcinoma				
Group	Dosage (g/kg)	Case Number (n)	Number of vessels (n)	Tumor size (mm)
Control	—	3	11.5 ± 1.20	3.5 ± 0.4
UE-1	1.0	6	9.4 ± 1.27*	3.4 ± 0.3
UE-1	2.0	6	8.7 ± 1.62**	3.2 ± 0.5

Note: Compared with control, * $P = 0.0492$ ** $P = 0.0345$

择性差、不良反应大及易产生耐药等弊端。中药不良反应小,作用广泛,因此利用中草药进行抗肿瘤治疗已经成为研究的热点。

桑黄和灵芝来源于传统植物药,具有抗衰老、抗疲劳、提高免疫力及抗肿瘤等多种功效。本实验将桑黄和灵芝粗多糖均匀(1:1)混合制成桑黄灵芝 UE-1。目前对桑黄灵芝的抗肿瘤作用尚无明确报道。本实验中我们以 C57 BL/6 小鼠为研究对象,探讨了桑黄灵芝 UE-1 对 Lewis 肺癌生长和血管新

生的影响。已经证实灵芝具有抑制肿瘤生长的作用^[5-6],其多糖提取物不但可以抑制内皮细胞的增殖,还具有抑制血管新生的作用^[3]。灵芝硒多糖还能通过诱导 K562 细胞凋亡而抑制肿瘤细胞的生长^[7]。Sliva 等^[8]研究表明桑黄能抑制乳腺癌细胞的生长、浸润和血管生成。桑黄具有抗肿瘤作用^[9-10],其多糖对肿瘤细胞增殖及迁移具有抑制作用^[11]。本实验结果显示桑黄灵芝 UE-1 明显抑制了体内 Lewis 肺癌的生长,其抑瘤率为 31.3%,说明 UE-1 有良好的抗肿瘤作用。实体瘤是血管依赖性病变,肿瘤的生长、浸润和转移都必须依赖于新生血管的形成^[12]。因此我们通过免疫组织化学染色检测了肿瘤内微血管密度。结果显示 UE-1 组 MVD 值低于对照组,提示 UE-1 可能具有抗肿瘤血管新生作用。CAM 法是一种研究血管形成的经典方法^[13],实验显示 UE-1 多糖对鸡胚尿囊膜血管新生有抑制作用,其抑制效果呈明显的量效关系,这与文献报道相符^[14-15]。通过肿瘤诱导的新生血管计数实验,我们进一步明确了 UE-1 可抑制 Lewis 肺癌诱导的肿瘤新生血管的形成。由此我们认为桑黄灵芝 UE-1 的抗肿瘤作用可能与其抗血管新生作用密切相关。目前已有文献报道灵芝多糖通过抑制肿瘤细胞黏附和迁移穿过内皮细胞发挥其抗肿瘤转移作用^[16]。然而体外桑黄灵芝 UE-1 对内皮细胞增殖、迁移和成管作用的影响以及是否具有抗肿瘤转移作用,需进一步深入研究。

综上所述,桑黄灵芝 UE-1 具有明显的抗肿瘤作用,其抗肿瘤作用可能是通过抑制肿瘤血管新生来完成的。桑黄灵芝 UE-1 的研制与开发利用,为人类攻克肿瘤顽疾又开辟了一条新途径,带来新的希望。

参考文献:

[1] 沈业寿,郑立军,王正亮,等. 桑黄胞内多糖抗肿瘤效应的实验研究[J]. 癌变·畸变·突变,2007, 19(4):305-308.

[2] Moradali MF, Mostafavi H, Ghods S, et al. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycete fungi (macrofungi)[J]. Int Immunopharmacol,2007, 7(6):701-724.

[3] Cao QZ, Lin ZB. Antitumor and anti-angiogenic activity of Ganoderma lucidum polysaccharides peptide[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(6):833-838.

[4] Kreisle RA, Ershler WB. Investigation of tumor angiogenesis in an id mouse model: role of host-tumor inteavitions [J]. J Natl Cancer Inst, 1988, 80(11): 849-854.

[5] 林志彬. 灵芝抗肿瘤作用的研究[J]. 医学研究通讯,2005, 34(11):2-3.

[6] Xie JT, Wang CZ, Wicks S, et al. Ganoderma lucidum extract inhibits proliferation of SW 480 human colorectal cancer cells [J]. Exp Oncol, 2006, 28(1):25-29.

[7] 崔乔,尚德静. 灵芝硒多糖 SeGLP-2B 和 SeGLP-3B 诱导 K562 细胞凋亡[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2004, 11(3):203.

[8] Sliva D, Jedinak A, Kawasaki J, et al. Phellinus linteus suppresses growth, angiogenesis and invasive behaviour of breast cancer cells through the inhibition of AKT signalling[J]. Br J Cancer, 2008, 98(8): 1348-1356.

[9] 张敏,纪晓光,贝祝春,等. 桑黄多糖抗肿瘤作用[J]. 中药药理与临床,2006, 22(3):56-58.

[10] 车会莲,孟繁岳,杜杰,等. 桑黄提取物对肿瘤生长和细胞免疫功能的影响[J]. 中国公共卫生,2005, 2(1):79-81.

[11] 赵澜,张红锋. 桑黄粗多糖对肿瘤细胞增殖及转移相关能力的抑制作用[J]. 华东师范大学学报(自然科学版),2008, 2(2): 78-84.

[12] Folkmen J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissues? [J]. Cancer Res, 1986, 46(2): 467-473.

[13] Schlatter P, Konig MF, Karlsson LM, et al. Quantitative study of intussusceptive capillary growth in the chorioallantoic membrane (CAM) of the chicken embryo[J]. Microvasc Res, 1997, 54(1):65-73.

[14] Song YS, Kim SH, Sa JH, et al. Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom Phellinus linteus[J]. J Ethnopharmacol,2003, 88(1):113-116.

[15] Song YS, Kim SH, Sa JH, et al. Anti-angiogenic and inhibitory activity on inducible nitric oxide production of the mushroom Ganoderma lucidum [J]. J Ethnopharmacol, 2004, 90(1):17-20.

[16] 李颖博,李宇华,王瑞,等. 灵芝多糖对肿瘤细胞与内皮细胞相互作用的影响 [J]. 中国药理学通报,2008, 24(2):250-253.

[编辑:周永红;校对:杨 卉]