

# 薏苡仁注射液对小鼠移植性 S180 肉瘤血管形成抑制的作用

冯 刚<sup>1</sup>,孔庆志<sup>1</sup>,黄冬生<sup>2</sup>,黄 涛<sup>3</sup>,卢宏达<sup>1</sup>,费 雁<sup>1</sup>,冯觉平<sup>1</sup>

Experimental Study on Inhibition of Angiogenesis in Mice S180 Sarcoma by Coix Lacryma-jobi Injection

FENG Gan<sup>1</sup>, KONG Qizhi<sup>1</sup>, HUANG Dongsheng<sup>2</sup>, HUANG Tao<sup>3</sup>, LU Hongda<sup>1</sup>, FEI Yan<sup>1</sup>, FENG Jueping<sup>1</sup>

1. Wuhan Pu 'ai hospital, Wuhan 430033, China; 2. Traditional Chinese Medicine of Hubei College; 3.

Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology

**Abstract:** Objective To investigate the effect of inhibitin gan giogenesis by coix lacryma-jobi. Methods The tumorinhibitor yrate and the vascular density were tested in animal tumor model with experimental treatment. The expression of VEGF and bFGF were measured by immunohistochemistry. Results Coix lacryma-jobi has inhibitor yeffect on S180 sarcoma and the vascular density of S180 sarcoma was lower than the control group. The expression of VEGF and bFGF were down-regulated when the middle and high doses were used. Conclusion Coix lacryma-jobi injection has inhibitor yeffect on S180 sarcoma and strong inhibitor yeffect on angiogenesis. Its mechanism may be associated with the down-regulating of VEGF and bFGF expression.

**Keywords:** Coix lacryma-jobi; VEGF; bFGF

**摘要:** 目的 探讨薏苡仁注射液对肿瘤血管形成抑制作用。方法 通过建立动物肿瘤模型,运用薏苡仁实验治疗,检测其抑瘤率和肿瘤内血管密度,以及瘤体 VEGF 和 bFGF 表达的改变。结果 薏苡仁具有明显的抑制 S180 肉瘤生长作用。实验组的 S180 瘤体内微血管密度均明显低于对照组;免疫组化显示薏苡仁大、中剂量组均可下调 S180 瘤体内 VEGF、bFGF 的表达。结论 薏苡仁注射液对肿瘤血管形成均有明显抑制作用,降低 VEGF、bFGF 的表达可能是其抑制肿瘤血管形成的主要机制之一。

**关键词:** 薏苡仁; 血管内皮生长因子; 碱性成纤维细胞生长因子

中图分类号:R730.52 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2004)04-0229-02

## 0 引言

薏苡仁味甘、淡,性凉。归肺胃经,具有增强免疫、降血糖、镇痛等多种作用。研究表明:薏苡仁具有明显的抗肿瘤活性<sup>[1,2]</sup>,但是否具有抗肿瘤血管生成的作用,目前鲜见报道。我们就此进行了研究。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物及瘤株 昆明小鼠 72 只,雌雄各半,6~8 周龄,体重(20 ±2)g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。小鼠肉瘤 S180 由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。

1.2 药品 薏苡仁注射液(KLT10%)为浙江康莱特有限公司产品,规格 100 毫升/瓶,批号:0004061-2。

## 1.3 方法

1.3.1 荷瘤鼠模型的建立 小鼠肉瘤 S180 瘤株,腹腔传代接种。待腹水生长旺盛时,抽出腹水,细胞计数,调整细胞浓度为  $2 \times 10^7$  个细胞/毫升,在小鼠腋下皮下注射 S180 肉瘤细胞,每只接种 0.2 毫升。

1.3.2 治疗及分组 120 只小鼠于接种当天随机分为 4 组:空白对照组、小、中、大剂量薏苡仁组。小、中、大薏苡仁组分别予以薏苡仁注射液 6.25、12.5、25ml/kg。对照组予以生理盐水 0.2 毫升/只。治疗 10 天后处死小鼠,剥离瘤体称重,按公式计算抑瘤率:抑瘤率 = (对照组平均瘤重 - 实验组平均瘤重) / 对照组平均瘤重 ×100%。

1.3.3 微血管染色 免疫组化 SABC 法染色血管,即用型微血管染色试剂盒(一抗为人相关第八因子)为武汉博士德生物公司产品。小、中、大剂量薏苡仁各组和对照组瘤体剥离后,切取标本,固定,包埋,切片。经染色后的切片,内皮细胞褐染,血管呈黄褐色,易于辨认。MVD 的测定按 Bosari 等<sup>[3]</sup> 报道的方法进行,先在低倍视野下选取肿瘤微血管最丰富

收稿日期:2003-04-08;修回日期:2003-07-23

基金项目:武汉市卫生局资助项目(编号:200219-27)

作者单位:1.430033 武汉市普爱医院肿瘤科;2. 湖北中医学院 2000 级研究生;3. 华中科技大学同济医学院 2002 级博士生

的区域,即“热点”,再在 400 倍视野范围计数被染成棕色的微血管数目,取 3 个数值的平均值作为 MVD 值。任何棕染的内皮细胞或内皮细胞簇,只要与临近的微血管、肿瘤细胞或其他结缔组织分开,就视为一个血管,尽管血管腔常可看到,但并不作为判断血管的标准。为了避免较大血管对计数的干扰,对管壁有较厚平滑肌包绕或管腔 >8 个红细胞面积的血管不予计数。

1.3.4 VEGF、bFGF 免疫组化 VEGF、bFGF 免疫组化检测试剂盒(即用型)购自武汉博士德生物公司。阳性细胞呈棕黄色,免疫组化染色评分按 Rahman 等<sup>[4]</sup> 的方法进行,即 VEGF、bFGF 的评分标准是:根据着色细胞的比例(染色范围)及染色强度,染色范围(阳性细胞比率)分为 0~4 级,阴性为 0 分;阳性细胞 1%~25% 为 1 分;阳性细胞 26%~50% 为 2 分;阳性细胞 51%~75% 为 3 分;阳性染色 76%~100% 为 4 分。染色强度划分为 0~3 级;阴性为 0 分;弱阳性为 1 分;中等强度为 2 分;强阳性为 3 分,两者得分相加为最后评分。

1.3.5 统计方法 运用 SPSS 统计软件,采用 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 荷瘤鼠对治疗措施的反应以及抑瘤率 接种后第 6 天,各组荷瘤鼠腋下移植瘤已有黄豆大小,小鼠活泼,饮食正常。对照组小鼠第 8 天后瘤体生长加快,部分小鼠不活泼,进食差;治疗各组小鼠活泼,饮食正常,毛发光泽正常,瘤体生长缓慢。各薏苡仁组对小鼠 S180 肉瘤均有抑制作用,其中大剂量组作用强于中、小剂量组。薏苡仁大剂量组瘤重明显小于对照组,  $P < 0.05$ , 见表 1。

表 1 薏苡仁对小鼠 S180 肉瘤的抑制作用( $\bar{x} \pm s$ ) n=12

组别	剂量(ml/kg)	瘤重(g)	抑瘤率(%)	P
对照组	0	1.513 $\pm 0.54$		
薏苡仁组				
小剂量	6.25	1.082 $\pm 0.35$	28.51	<0.05
中剂量	12.5	0.912 $\pm 0.21$	39.72	<0.05
大剂量	25	0.814 $\pm 0.23$	46.21	<0.01

## 2.2 薏苡仁对 S180 瘤体微血管密度的影响

经免疫组化 SABC 法染色后的切片,血管内皮细胞被褐染,对照组可见微血管广泛分布于肿瘤组织间质内,实验组微血管相对少见。  $P < 0.05$ , 见表 2。

## 2.3 薏苡仁对 S180 瘤体 VEGF、bFGF 表达的影响

免疫组化结果显示,VEGF、bFGF 蛋白在 S180

肉瘤组织中呈高表达,主要表达于细胞的细胞浆。薏苡仁对 VEGF、bFGF 的表达有明显的抑制作用,结果见表 3。

表 2 薏苡仁对小鼠 S180 移植瘤内微血管

密度的影响( $\bar{x} \pm s$ ) n=12

组别	微血管密度(条/平方毫米)
对照组	16.747 $\pm 5.23$
薏苡仁小剂量组	14.51 $\pm 2.98$ *
薏苡仁中剂量组	13.19 $\pm 3.87$ *
薏苡仁大剂量组	9.64 $\pm 3.07$ **

\* 与对照组相比  $P < 0.05$ , \*\* 与对照组相比  $P < 0.01$

表 3 薏苡仁对小鼠 S180 肉瘤组织 VEGF、

bFGF 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ ) n=12

组别	VEGF 表达评分	bFGF 表达评分
对照组	5.00 $\pm 0.81$	4.40 $\pm 0.88$
薏苡仁小剂量组	4.75 $\pm 0.68$	4.28 $\pm 0.26$
薏苡仁中剂量组	4.54 $\pm 0.62$ *	3.81 $\pm 0.48$ *
薏苡仁大剂量组	3.42 $\pm 0.51$ *	1.97 $\pm 0.43$ **

\* 与对照组相比  $P < 0.05$ , \*\* 与对照组相比  $P < 0.01$

## 3 讨论

实验及临床研究均证明康莱特注射液具有较强的抗肿瘤作用,但其抗肿瘤的作用机制尚未完全清楚。本世纪 70 年代,Folkman<sup>[5]</sup> 首先研究发现了新生血管的生成在肿瘤生长中的重要作用,开创了该领域研究的先河。他在研究中发现:肿瘤的生长和转移很大程度上依赖肿瘤血管形成<sup>[5]</sup>。实体肿瘤长到 2~3mm 时,如果没有新生血管形成,肿瘤细胞即进入休眠状态,一旦血管形成,长入肿瘤组织后,肿瘤组织的血供由弥散变为灌注。

薏苡仁是临幊上常用的抗肿瘤药物,具有确切的抗肿瘤作用。曾有文献报道薏苡仁注射液在体外具有抑制血管生成的作用<sup>[5]</sup>。本实验研究表明,薏苡仁对小鼠 S180 肉瘤的抑瘤率为 46.21%,和有关文献报道相似<sup>[1]</sup>,可见它具有较强抗肿瘤的作用,在此基础上我们进一步研究其对血管生成的影响。

评价肿瘤血管生成程度的最客观标准是肿瘤组织内的微血管数目<sup>[6]</sup>,本实验通过小鼠移植性肿瘤模型体内实验,瘤体微血管标记染色,微血管密度计数显示,薏苡仁均可抑制肿瘤血管的生成,和对照组比较,具有显著性差异。血管形成,即从已有的血管上抽芽生成新的毛细血管,这一多步骤过程依赖于血管形成促进因子和抑制因子的协调产生。研究表明,VEGF、bFGF 在多种肿瘤中均有表达,VEGF、bFGF 在多种肿瘤的血管新生中起着重要的作用,

(下转第 248 页)

ARHI 是第一个被报道的与成人肿瘤有关的母源性印迹的肿瘤抑制基因。国内施宗高等<sup>[15]</sup>已用 PCR 克隆技术构建了 ARHI 的真核表达载体,李勤等<sup>[16,17]</sup>利用 GE7 导入系统介导 ARHI 体内导入治疗人上皮性卵巢癌裸鼠腹水瘤、网膜移植瘤,均显示一定的疗效。但目前尚不完全明确 ARHI 发生异常的失活机制,如何鉴别调节因子,从而有效地恢复正常基因印迹,仍需深入研究。

临床研究发现,表达 ER 的乳腺癌患者有较长的缓解期,较之缺乏 ER 表达的乳腺癌患者生存期要长,这种明显的生理、表型的差异可能归因于肿瘤中基因表达的不同<sup>[18]</sup>。因此,有必要鉴别乳腺癌的雌激素敏感性基因,认识它们在肿瘤发生、发展中的作用。RERG 依赖于雌激素调节,且在许多预后较差的乳腺肿瘤中其表达却存在较高比例的丢失或下调,说明 RERG 对于乳腺癌的诊疗有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] 卢建,余应年,徐仁宝.受体信号转导系统与疾病[M].济南:山东科学技术出版社,1999.164.
- [2] BourneHR,SandersDA,McCormickF.The GTPases: a family of conserved structure and molecular mechanism[J].Nature,1991,349 (6305):117-127.
- [3] YuY,XuF,PengH,etal.NOEY2 (ARHI), a novel putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas[J].Proc Natl Acad Sci,1999,96 (1):214-219.
- [4] LuoRZ,PengH,XuF,etal.Genomic structure and promoter characterization of a novel putative tumor suppressor gene ARHI[J].Biochim Biophys Acta,2001,1519 (3):216-222.
- [5] 施宗高,许良中,周晓燕,等.NOEY2 基因对人乳腺癌细胞体外生长的影响[J].中国癌症杂志,2001,11 (1):29-32.
- [6] YuY,FujiS,YuanJ,etal.Expression and genetic regulation of ARHI in

- [7] XuF,XiaW,LuoRZ,etal.The human ARHI tumor suppressor gene inhibits lactation and growth in transgenic mice[J].Cancer Res,2000,60 (17):4913-4920.
- [8] BaoJ,LeX,Wan,etal.Reexpression of the tumor suppressor gene ARHI induces apoptosis in ovarian and breast cancer cells through caspase-independent cell death pathway[J].Cancer Res,2002,62 (24):7264-7272.
- [9] HisatomiH,NagaoK,WakitaK,etal.ARHI/NOEY2 inactivation may be important in breast tumor pathogenesis[J].Oncology,2002,62 (2):136-140.
- [10] 卢朝晖,陈杰,谷丽君,等.ARHI 在胰腺癌组织中 mRNA 水平及蛋白表达[J].中国医学科学院学报,2001,23 (4):324-327.
- [11] PengH,XuF,PershadR,etal.ARHI is the center of allelic deletion on chromosome 1 p31 in ovarian and breast cancers[J].Int J Cancer,2000,86 (5):690-694.
- [12] FinlinBS,GauCL,MurphyGA,etal.RERG is a novel estrogen-regulated gene that is regulated and growth-inhibitory gene in breast cancer[J].J Biol Chem,2001,276 (45):42259-42267.
- [13] EllisCA,VosMD,HowellH,etal.RERG is a novel estrogen-related protein and potential neural tumor suppressor[J].Proc Natl Acad Sci USA,2002,99 (15):9876-9881.
- [14] KloogY,CoxAD,RAS inhibitors: potential for cancer therapy [J].Mol Med Today,2000,6 (10):398-402.
- [15] 施宗高,许良中,药锦娟,等.PCR 克隆技术构建抑癌基因 NOEY2 真核表达载体[J].癌症,2001,20 (1):99-100.
- [16] 李勤,丰有吉,郁茵华,等.GE7 导入系统介导抑癌基因 NOEY2 体内导入治疗人上皮性卵巢癌裸鼠网膜移植瘤的研究[J].现代妇产科进展,2000,9 (5):328-331.
- [17] 李勤,丰有吉,郁茵华,等.GE7 导入系统介导抑癌基因 NOEY2 体内导入治疗人上皮性卵巢癌裸鼠腹水瘤[J].复旦学报,2002,29 (5):183-185.
- [18] KnightWA,LivinstonRB,GregoryEJ,etal.Estradiol gene receptor is an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer[J].Cancer Res,1997,57 (12):4669-4671.

[编辑:安凤;校对:贺文]

#### (上接第 230 页)

与人类多种肿瘤的浸润和转移有密切的关系。在研究薏苡仁抑制肿瘤形成的机制时发现,它可下调 VEGF、bFGF 蛋白的表达。

由此可见,薏苡仁均具有抑制肿瘤血管形成的作用,其作用机制可能是下调 VEGF、bFGF 的表达。中药含有的成分复杂,药物中究竟是何种成分起主要作用,尚有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 李凤云,陈浩然,冯晓东,等.中药薏苡仁抗肿瘤作用的研究[J].实用肿瘤学杂志,1994;15 (3):59.
- [2] 姜小玲,张良,徐卓玉,等.薏苡仁注射液对血管生成的影响[J].肿瘤,2000,20 (4):313-314.

- [3] BosarisS,LeeAKC,DelellisRA,etal.Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma[J].Human Pathology,1992,23 (5):755-761.
- [4] RahmanA,DharDK,YamaguchiE,etal.Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in the peritoneal carcinomatosis surrounding liver, possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus positive case[J].Clin Cancer Res,2001,7 (5):1325.
- [5] FolkmanJ.What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?[J].Journal of the National Cancer Institute,1990,82 (8):4-6.
- [6] FanelliM,LopezN,GattusoD,etal.Assessment of tumor vascularization: immunohistochemical and non-invasive methods[J].Int J Biol Markers,1999,14 (4):218-231.

[编辑:李奇明;校对:刘红武]