

白花蛇舌草提取物抗小鼠结直肠癌血管生成的实验研究

肖云¹⁾, 伍治平²⁾, 金从国²⁾, 李佳²⁾, 陈晓群²⁾, 姚乾²⁾, 朱启顺³⁾

(1) 昆明医科大学第三附属医院重症医学科; 2) 肿瘤研究所, 云南昆明 650118; 3) 云南大学生命科学院, 云南昆明 650091)

[摘要] **目的** 探讨白花蛇舌草乙醇提取物对小鼠结直肠癌血管生成的抑制作用. **方法** 构建 32 只 BALB/c 小鼠皮下 CT26 结肠癌动物模型, 随机分为 4 组, 每组 8 只小鼠, 分别为 I 组: 对照组生理盐水 0.1 mL/(10 g·d), II 组: 白花蛇舌草乙醇提取物 90 mg/(kg·d), III 组: 白花蛇舌草乙醇提取物 180 mg/(kg·d), IV 组: 白花蛇舌草乙醇提取物 360 mg/(kg·d). 各组小鼠在接种 CT-26 结肠癌细胞后的第 10 天开始测量肿瘤的长径 (mm) 和短径 (mm); 接种后第 12 天开始采用灌胃给药法给药, 连续给药 10 d 后停止给药, 继续喂养观察至第 32 d 后处死小鼠, 取肿瘤组织用免疫组化法检测微血管密度. **结果** II 组、III 组和 IV 组小鼠的肿瘤体积明显小于 I 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); I 组、II 组、III 组和 IV 组的肿瘤组织微血管密度分别为 (7.83 ± 2.87) 、 (5.32 ± 1.27) 、 (1.77 ± 0.70) 、 (1.87 ± 0.68) ; II 组、III 组和 IV 组肿瘤组织血管数量明显少于 I 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$). **结论** 在一定剂量范围内, 白花蛇舌草乙醇提取物对小鼠 CT-26 结肠癌有明显的抑瘤作用, 其机理可能是通过抑制小鼠结肠癌血管生成而起到抗肿瘤的作用.

[关键词] 白花蛇舌草; BALB/c 小鼠 CT-26 结直肠癌细胞株; BALB/c 小鼠; 结直肠癌; 抑制血管生成

[中图分类号] R730.52 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 10 - 0053 - 05

Inhibitory Effect of Ethanol Extract of Oldenlandia Diffusa on Colorectal Cancer Angiogenesis in BALB/c Mice

XIAO Yun¹⁾, WU Zhi-ping²⁾, JIN Cong-guo²⁾, LI Jia²⁾, CHEN Xiao-qun²⁾, YAO Qian²⁾, ZHU Qi-shun³⁾

(1) Critical Care Medicine; 2) Cancer Institute, The 3rd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650118; 3) School of Life Science, Yunnan University, Kunming Yunnan 650091, China)

[Abstract] **Objective** To explore the inhibitory effect of Oldenlandia diffusa extract on colorectal cancer angiogenesis in BALB/c mice. **Methods** Thirty-two BALB/c mice with subcutaneous CT26 colon cancer animal model were randomly equally divided into four groups, including the control group (group I, saline 0.1 mL/(10 g·d), O. diffusa ethanol extract of 90 mg/(kg·d) (group II), O. diffusa ethanol extract of 180 mg/(kg·d) (group III) and O. diffusa ethanol extract of 360 mg/(kg·d) (group IV). Each group of mice were treated with intragastric administration of law administration 12 days after vaccination, then stopped and continue fed to 32 days, and the mice were killed. Micro-vascular dense (MVD) was observed and countered under the microscopy by immunohistochemistry. **Results** The murine colon tumor volumes of Group II, III and IV were significantly less than that of group I, with significant difference ($P < 0.05$). The tumor microvessel density values of four groups was (7.83 ± 2.87) , (5.32 ± 1.27) , (1.77 ± 0.70) and (1.87 ± 0.68) , respectively. The number of tumor blood vessels in Group II, III and IV were significantly less than that of I group, with significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** Within a certain dose range, the ethanol extract of O. diffusa can significantly inhibit the mouse colon cancer and the mechanism may be related to inhibiting tumor angiogenesis.

[基金项目] 云南省卫生厅科技计划项目 (2011WS0065)

[作者简介] 肖云 (1979~), 男, 云南昆明市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事重症肿瘤患者治疗工作.

[通讯作者] 朱启顺. E-mail:dmn0406@163.com; 伍治平. E-mail:xiaoyun0406@163.com

[Key words] Oldenlandia diffusa; BALB/c mice CT-26 colon cancer cell strain; BALB/c mice; Colorectal cancer; Inhibition of angiogenesis

中医药治疗恶性肿瘤具有独特的优势, 从中药中提取抗肿瘤成分是研发抗癌药物的重要途径。据统计, 目前全球抗肿瘤药物的 32.25% 是以植物为原料提取制备的抗癌药物^[1]。白花蛇舌草是近年来国内外抗肿瘤中药的研究热点之一。

近年研究发现白花蛇舌草中的槲皮素、熊果酸、豆甾醇等成分具有抗肿瘤活性, 可通过诱导肿瘤细胞凋亡、免疫调节刺激机体免疫抗肿瘤、干扰肿瘤细胞能量代谢、下调肿瘤细胞基因表达等机制发挥抗肿瘤作用。但其是否具有抑制肿瘤血管生成的作用, 尤其在体内抑制结直肠癌血管生成的动物实验研究方面, 尚未见报道。为此, 笔者进行了白花蛇舌草提取物抑制 BALB/c 小鼠 CT-26 结直肠癌抗肿瘤血管生成的实验研究, 对其进行了药效学及抗肿瘤血管生成的机理探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 BALB/c 小鼠, 6~8 周龄, 体重 18~20 g (昆明医科大学动物实验中心, 批准文号: SCXK 滇 P0005-0008)。

1.1.2 药物 白花蛇舌草乙醇提取物由云南大学化学科学与工程学院提供。

1.1.3 细胞株 BALB/c 小鼠 CT-26 结直肠癌细胞株, 购自美国 ATCC 公司, 保存于液氮。

1.1.4 试剂 胎牛血清购自中国医学科学生物工程研究所; RPMI 1640、PBS 以及青霉素和链霉素混合液购自 GIBCO 公司; 0.25% 胰蛋白酶购自 Hyclone 公司; DMSO 购自 SIGMA 公司; MTT 购自 SIGMA 公司, H.E 染色试剂和免疫组化试剂购自迈新公司。

1.1.5 主要仪器 一次性细胞培养瓶和细胞培养板 (GIBCO 公司), 二氧化碳培养箱、生物安全柜 (Forma 公司), 倒置显微镜 (Leica 公司), 显微镜 (Leica 公司), BALB/c 小鼠饲养 IVC 系统 (苏州苏杭实验动物设备厂), 高速低温离心机 (Heraeus 公司), Bio-Rad550 型酶标仪 (Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠模型的建立 常规复苏 CT-26 细胞, 将细胞培养于含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液中; 置于 37℃, 含 5% CO₂ 的培养箱内培养并传代。取指数生长期的细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,

机械吹打成细胞悬液, 800 g, 离心 5 min, 弃上清, 加适量生理盐水, 取少许在计数板上盖玻片的一侧加微量细胞悬液, 按白细胞计数法, 于低倍镜下计数 4 角的各个大方格内活细胞总数, 按下面公式计算:

$$\text{细胞浓度} = \frac{4 \text{ 大方格内活细胞数}}{4} \times \text{稀释倍数} \times 10^4$$

细胞浓度调整至 5×10^6 个 /mL。每只小鼠右腋下接种 CT-26 细胞悬液 0.2 mL/只。

1.2.2 动物分组及给药 将 32 只结直肠癌皮下接种小鼠随机分成 4 组, 每组 8 只。I 组: 对照组, 生理盐水 0.1 mL/(10g·d); II 组: 白花蛇舌草乙醇提取物 90 mg/(kg·d); III 组: 白花蛇舌草乙醇提取物 180 mg/(kg·d); IV 组: 白花蛇舌草乙醇提取物 360 mg/(kg·d)。当肿瘤生长至直径 10 mm 时 (第 12 天), 开始采用灌胃给药法给药, 每日 1 次。连续给药 10 d 后停药, 继续饲养至第 32 天, 处死动物。观察记录肿瘤的生长情况, 每隔 2 d 用电子秤测量小鼠体重, 用游标卡尺测量每只小鼠腋下肿瘤的短径 a (mm) 和长径 b (mm), 根据 Steel 公式:

$$V = \frac{a^2 b}{2} \text{ 计算肿瘤体积。}$$

1.2.3 HE 染色和免疫组化 瘤组织标本经常规处理后制成 4 μm 厚石蜡切片, HE 染色, 常规光镜检查; LSAB 免疫组化, 采用鼠抗鼠 CD31 因子单克隆抗体为一抗, DBA 显色, 苏木素复染, 以 PBS 代替 CD31 一抗作阴性对照, 光镜检测肿瘤标本中血管生成的情况。免疫组化染色呈黄色或棕黄色。按照 Weidner 等^[2]提出的肿瘤微血管鉴别方法, 在低倍镜 (×100) 下确定 5 个血管最密集部分, 再在高倍镜 (×200) 下计数每个密集区中 1 个视野的微血管数, 以 5 个区域微血管数的平均数作为微血管密度 (MVD), 在高倍镜 (×400) 下拍照。

1.3 统计学处理

Microsoft Excel 2003 计算各组肿瘤的平均体积, 体重, MVD。实验数据采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用统计学分析软件 SPSS13.0 对各组体重、肿瘤体积、MVD 进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白花蛇舌草乙醇提取物对小鼠 CT26 结直肠癌的抑瘤作用

用药期间, 3 组荷瘤小鼠活动正常, 未见特殊不良反应, 无 1 例死亡. 成瘤时 (接种 10 d 后), 治疗组与生理盐水对照组瘤体大小差异无统计学意义 ($P > 0.05$). 用药 10 d, 喂养至 32 d, I 组肿瘤体积明显大于 II 组、III 组和 IV 组 ($P < 0.05$); 而 II 组与 III 组、IV 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); III 组与 IV 组之间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1.

2.2 血管计数

处死小鼠后取肿瘤组织, 用免疫组化法检测肿瘤组织微血管密度, 见图 1. 微血管密度均数分别为 (7.83 ± 2.87) 、 (5.32 ± 1.27) 、 (1.77 ± 0.70) 、 (1.87 ± 0.68) . I 组肿瘤组织的微血管密度明显多于 II 组、III 组和 IV 组 ($P < 0.05$); II 组与 III 组、IV

组比较, 肿瘤组织的微血管密度差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 III 组与 IV 组比较, 肿瘤组织的微血管密度差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2.

3 讨论

白花蛇舌草为茜草科耳草属一年生草本植物, 全草均可入药, 具有清热解毒、活血化瘀、利尿消肿和抗癌肿等功效, 是我国中医自古以来治疗癌肿常用的单味中药. 临床主要用于治疗肿瘤和炎性疾病^[1]. 近年研究, 白花蛇舌草中分离出的槲皮素、熊果酸、豆甾醇等成分具有抗肿瘤活性, 而白花蛇舌草不同工艺提取物抑制肿瘤作用有明显差异, 其乙醇提取物抗肿瘤效果远远好于水提取物^[4]. 故本实验采用白花蛇舌草乙醇提取物作为实验用药.

新生血管的生成是肿瘤侵袭性生长的前提和肿

表 1 各组小鼠结直肠癌肿瘤体积比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The colorectal tumor volume of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组 别	数量	给药途径	时间 (d)	肿瘤体积(mm ³)
I 组	8	口服	10	13 739.25 ± 3 569.89
II 组	8	口服	10	10 036.25 ± 3 664.29 [▲]
III 组	8	口服	10	5 856.62 ± 1 425.80 ^{▲▲}
IV 组	8	口服	10	5 833.37 ± 1 380.41 ^{▲▲}

与 I 组比较, [▲] $P < 0.05$; 与 II 组比较, ^{▲▲} $P < 0.05$.

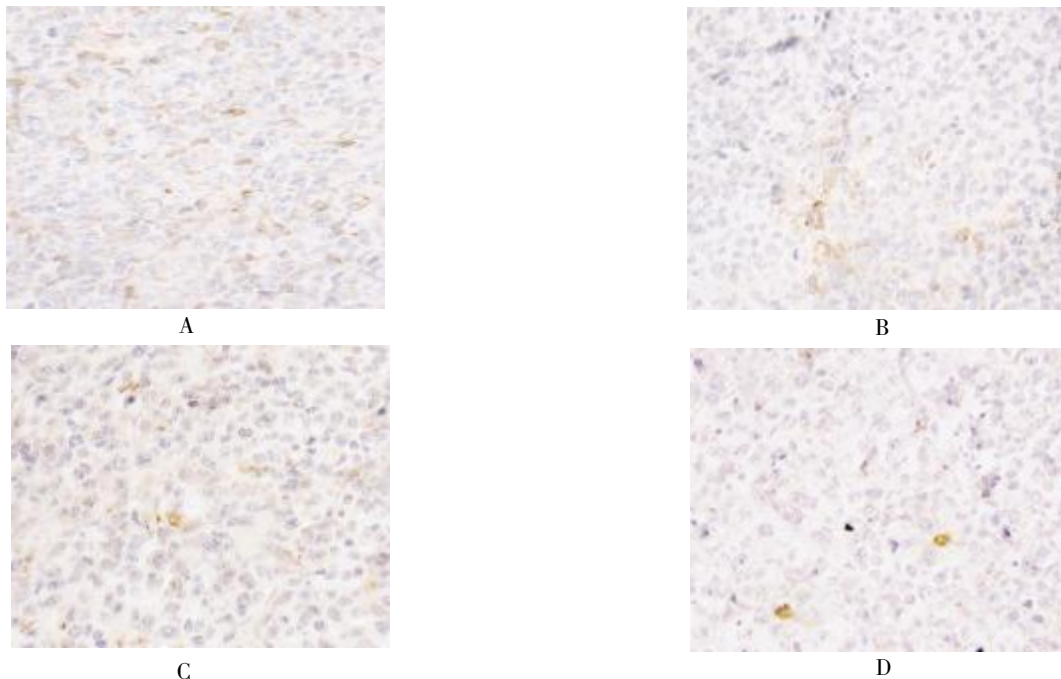


图 1 各组小鼠肿瘤组织微血管密度

Fig. 1 The tumor microvessel density of mice in four groups

A: I 组 (小鼠结直肠癌, 免疫组化, CD31, $\times 400$) ; B: II 组 (小鼠结直肠癌, 免疫组化, CD31, $\times 400$) ; C: III 组 (小鼠结直肠癌, 免疫组化, CD31, $\times 400$) ; D: IV 组 (小鼠结直肠癌, 免疫组化, CD31, $\times 400$) .

表 2 各组小鼠微血管密度比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The microvessel density of mice in each group

组别	微血管密度
I 组	7.83 ± 2.87
II 组	5.32 ± 1.27 [▲]
III 组	1.77 ± 0.70 ^{▲▲}
IV 组	1.77 ± 0.70 ^{▲▲}

与 I 组比较, [▲] $P < 0.05$; 与 II 组比较, ^{▲▲} $P < 0.05$.

瘤转移的基础^{5,6}, 在实体肿瘤中, 如果没有新生血管的生成, 肿瘤的生长往往很缓慢, 常常仅限于非常小的范围内局部浸润、生长, 其肿瘤体积仅为 1~2 mm³, 肿瘤细胞数量在 10⁶ 以内, 多无远处转移⁷. 血管的生成为肿瘤细胞生长提供了丰富的营养物质, 促使肿瘤细胞疯狂生长, 肿瘤迅速长大, 同时新生血管也为肿瘤细胞侵入血管进入血液循环向远处转移提供了条件. 因此如果能阻断肿瘤新生血管的生成, 则可阻止肿瘤的生长及转移. 新生血管的生成包括: 多种血管生长因子的释放; 血管内皮细胞在血管生成因子作用下形态、数量发生改变; 毛细血管基底膜、细胞外基质的降解; 内皮细胞的去黏附、增殖、迁移, 形成血管新芽、微血管、血管样结构⁸. 血管生成因子主要有: 血管内皮生长因子 (VEGF)、基质金属蛋白酶 (MMPs)、血小板源性生长因子 (PDGF) 等. 目前认为抑制肿瘤新生血管生成的途径主要有: (1) 抑制肿瘤组织 VEGF 等促血管生成因子的表达、释放; (2) 抑制肿瘤组织 VEGF、PDGF 等促血管生成因子的上调因子的表达; (3) 抑制 MMPs 活性, 减少毛细血管基底膜和细胞基质的降解. 白花蛇舌草提取物中的槲皮素可明显下调肿瘤组织中 VEGF 的表达⁹; 熊果酸能抑制 MMPs-2 的表达¹⁰. 这可能是其抑制血管生成的机制之一.

VEGF 是目前已知血管生成促进因子中活性最强, 特异性最高的血管生成因子. VEGF 能特异性地作用于血管内皮细胞, 刺激内皮细胞有丝分裂、增殖, 提高毛细血管小静脉通透性, 对微血管生成有极强的诱导作用¹¹, 因此减少肿瘤组织中 VEGF 的表达对抑制肿瘤血管生成, 遏止肿瘤生长、浸润、转移有重要意义. MMP-2 为 MMPs 家族成员之一, 在肿瘤血管形成过程中发挥着重要作用, 也是目前研究最多的. Iurlaro M¹² 研究发现 MMP-2 的表达与肿瘤的侵袭性和血管的生成呈正相关. MMP-2 不仅可以降解毛细血管基底膜和细胞外基质, 还可以通过降低肿瘤细胞与内皮细胞、肿瘤细胞与细胞外基质的黏附性而增强肿瘤细胞

的侵袭、转移能力. 因此下调 MMP-2 的表达, 降低其活性有利于抑制肿瘤血管形成, 提高抗肿瘤效果.

本实验结果显示, 在一定剂量范围内, 口服白花蛇舌草提取物对小鼠 CT 26 结直肠癌有明显的抑制作用; 能使小鼠结直肠癌移植瘤的生长减缓, 移植瘤体积减小, 微血管生成数量减少. 提示肿瘤的发生、生长是血管依赖性的, 白花蛇舌草提取物能够明显抑制结肠癌血管生成, 其可能通过抑制肿瘤血管生成而发挥抗肿瘤作用. 且在一定范围内随剂量的增加, 肿瘤血管生成进一步减少, 肿瘤生长也进一步受到抑制. 而白花蛇舌草正常剂量与高剂量抗肿瘤疗效相似, 白花蛇舌草在达到治疗剂量后, 增加剂量抗肿瘤效果并无增强, 还增加费用. 故不建议超剂量应用白花蛇舌草抗结肠癌治疗. MVD 是目前评价肿瘤血管生成状况的金标准¹³, 可反映肿瘤组织内血管生成的活跃程度, 多数恶性实体肿瘤的生长、浸润、转移、复发及预后与肿瘤 MVD 密切相关. 大量实验证实, 肿瘤组织中 VEGF 和 MMP-2 的表达与 MVD 呈正相关^{14,15}. 白花蛇舌草提取物中的槲皮素可明显下调肿瘤组织中 VEGF 的表达; 熊果酸能抑制 MMPs-2 的表达. 故白花蛇舌草抗结肠癌机制之一可能是通过下调肿瘤组织 VEGF 等促血管生成因子的表达; 抑制 MMP-2 表达, 降低其活性, 阻止血管基底膜和细胞基质的降解等途径抑制肿瘤血管的生成而实现的.

[参考文献]

- [1] 邹夏慧, 张棍和. 中药抗肿瘤作用分子机制研究进展 [J]. 国外医学肿瘤学分册, 2005, 32(1): 172 - 181.
- [2] WEIDNER N, SAMPLE J P, FOLKMAN J, et al. Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma [J]. N Engl J Med, 1991, 324 (1): 1 - 8.
- [3] 陈秀珍, 朱大诚, 王艳辉. 白花蛇舌草药理作用及临床应用研究新进展 [J]. 中药材, 2009, 32(1): 157 - 161.
- [4] 赵浩如, 李瑞, 林以宁, 等. 白花蛇舌草不同提取工艺对抗肿瘤活性的影响 [J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(6): 510.
- [5] SHIBUYA M. Angiogenesis, anti-angiogenesis, and tumor suppression [J]. Nippon Yakurigaku Zasshi, 2002, 120(5): 285 - 294.
- [6] BIKFALVI A, BICKNELL R. Recent advance in angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting [J]. Trends Pharmacol Sci, 2002, 23(12): 576 - 582.
- [7] ESK ENS F. Angiogenesis inhibitors in clinical development; Where are we now and where are we going [J].

- British J Cancer, 2004, 90 (1): 1 - 7.
- [8] STEPHEN B F, KEVIN C G, A DRIAN L H, et al. Tumor angiogenesis [J]. J Pathol, 1996, 179(2): 232 - 237.
- [9] 孔令泉, 吴凯南, 林辉. 槲皮素对实验性乳腺癌中血管生成抑制作用的研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2001, 28 (4): 295 - 298.
- [10] CARDENAS C, QUESADA A R, MEDINA M A. Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 320: 402 - 408.
- [11] LONGO R, GASPARIN G. Challenges for patient selection with VEGF inhibitors [J]. Cancer Chem Pharm, 2007, 60 (2): 151 - 170.
- [12] IURLARO M, LOVERRO G, VACCA A, et al. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and-9 correlate with upgrading and myometrial invasion in endometrial carcinoma [J]. Eur J Clin Invest, 1999, 29 (9): 793 - 801.
- [13] KATO T, STEERS G, CAMPO L, et al. Prognostic significance of microvessel density and other variables in Japanese and British patients with primary invasive breast cancer [J]. Br J Cancer, 2007, 97(9): 1 277 - 1 286.
- [14] 张明林, 许建明, 梅俏. 结肠癌中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达与微血管计数的关系 [J]. 安徽医药, 2007, 11 (2): 146 - 148.
- [15] SEO Y, BABA H, FUKUDA T, et al. High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis with ductal pancreatic adenocarcinoma [J]. Cancer, 2000, 88(10): 2 239 - 2 245.
- (2013 - 06 - 09 收稿)

(上接第 38 页)

项目实施不到位的情况, 具体表现为娜允镇和景信乡多个项目的服务率高于远郊的富岩乡; 城乡居民健康档案建档率低 (约 65%)、覆盖面窄, 高血压患者血压控制率、2 型糖尿病患者血糖控制率、重性精神疾病患者稳定率等偏低等; 各样本乡镇尤其是远郊的富岩乡卫生技术人员对其辖区内上述几项服务的评分也较低。究其原因, 最突出的是人力资源不足, 孟连县不论是地处县城的, 还是近郊和远郊的乡镇卫生院, 其每千人口卫生技术人员数都明显低于全国农村平均水平, 在人力不足的情况下开展各项基本公共卫生服务项目, 难免出现顾此失彼的情况; 其次是设备不足, 或者是有设备但无人会使用而导致的闲置; 另外, 服务机构职责定位不清、农村居民不配合、少数民族生活习惯都在一定程度上影响着基本公共卫生服务项目的普遍开展。

孟连县地处中缅边境民族地区, 主体民族有傣族、拉祜族和佤族等, 高水平广覆盖地开展国家基本公共卫生服务项目不仅关系到人民健康水平的提高, 还关系到边疆稳定、民族发展和社会和谐。针对影响当地开展基本公共卫生服务的主要因素, 建议当地卫生部门着力培训或引进高素

质的卫生技术人才, 充实基层医疗卫生机构的人力资源, 激活闲置的卫生设备; 加大宣传力度, 赢得农村居民的理解和支持; 加强健康促进和健康教育工作, 消除不良生活习惯可能引起的负面效应; 从全局角度出发, 统筹安排, 打破县城、近郊、远郊基本公共卫生服务不均衡的现状, 各乡镇齐头并进, 又好又快地推进基本公共卫生服务均等化的进程。

[参考文献]

- [1] 卫生部. 国家基本公共卫生服务规范 (2009年版) [EB/OL]. (2009-10-16) [2009-12-12]. <http://www.moh.gov.cn/mohfybjysqwss/s3577/200910/43183.shtml>.
- [2] 卫生部. 国家基本公共卫生服务规范 (2011年版) [EB/OL]. (2011-05-24) [2011-10-20]. <http://www.moh.gov.cn/mohfybjysqwss/s3577/201105/51780.shtml>.
- [3] 卫生部统计信息中心. 2008中国卫生服务调查研究: 第四次家庭健康询问调查分析报告 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2009: 5 - 27.
- [4] 卫生部. 中国卫生统计年鉴 2012 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2012: 97 - 100.

(2013 - 07 - 09 收稿)