

南蛇藤乙酸乙酯提取物对肝癌原位荧光动物模型肿瘤VEGF表达影响的研究

张馨¹, 熊熙¹, 汪茂荣¹, 刘延庆² (1.解放军第81医院 全军肝病中心, 南京 210002; 2.南京中医药大学第一临床学院 中西医结合科, 南京 210046)

摘要: 目的 建立裸鼠原位人荧光蛋白肝癌移植瘤模型, 研究不同处理组肿瘤组织VEGF的表达变化, 探讨南蛇藤乙酸乙酯提取物对人肝癌生长抑制作用的相关机制。方法 BALB/c裸鼠肝脏接种荧光蛋白标记的人肝癌细胞(RFP-HepG2), 建立肝癌动物模型并随机分为空白对照组(G1组)、奥沙利铂阳性对照组(G2组, 25 mg/kg)、南蛇藤小剂量治疗组(G3组, 20 mg/kg)、南蛇藤大剂量治疗组(G4组, 40 mg/kg)和南蛇藤预防治疗组(G5组, 20 mg/kg)。奥沙利铂为尾静脉注射给药, 南蛇藤为灌胃给药, G1组用等渗盐水替代, G3组、G4组自RFP-HepG2细胞接种第20天开始每日给药1次, 连续4周。G5组自RFP-HepG2细胞接种第2天开始给药至治疗结束。治疗结束后组织标本进行VEGF免疫组织化学染色, 采用Image-pro plus 6.0 (IPP)软件分析, 用平均光密度评估各图片免疫组织化学染色程度。采用RT-PCR方法检测标本VEGF表达。结果 南蛇藤可抑制体内、外肿瘤细胞的生长, G4组、G5组对肿瘤的抑制更明显, 与之结果相一致, G2组的VEGF阳性表达率最低, G4组、G5组的VEGF阳性表达率显著低于G3组与G1组($t = 4.657, 6.440, 7.712, 8.900, P = 0.0037, 0.0031, < 0.001, < 0.001$)。各实验组肿瘤组织VEGF mRNA水平与免疫组织化学显示VEGF表达呈平行关系。奥沙利铂治疗组的VEGF mRNA水平最低, G4组、G5组的VEGF mRNA水平显著低于G1组、G3组($t = 6.320, 7.563, 12.907, 12.545, P = 0.0002, 0.0003, < 0.001, < 0.001$)。结论 南蛇藤乙酸乙酯提取物可抑制裸鼠原位人荧光蛋白肝癌移植瘤模型肿瘤的生长及人肝癌细胞中VEGF表达, 提示南蛇藤可能通过抑制人肝癌细胞中VEGF的表达来抗肝癌血管形成, 从而抑制肝癌细胞的生长和转移。
关键词: 南蛇藤属; 乙酸乙酯提取物; 肝癌; VEGF

Expression of vascular endothelial growth factor by acetoacetate extract from celastrus orbiculatus thunb in orthotropic human liver carcinoma nude mice model

ZHANG Xin¹, XIONG Xi¹, WANG Mao-rong¹, LIU Yan-qing² (1.Liver Disease Center of PLA, The 81st Hospital of PLA, Nanjing 210002, China; 2.Department of TCM, The First Clinical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

Abstract: Objective To invest the inhibitory effect of tumor growth and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) by acetoacetate extractive of *Celastrus orbiculatus* Thunb in orthotropic human liver carcinoma nude mice model. **Methods** Human HCC HepG2 cells transduced with red fluorescent protein (RFP-HepG2) were inoculated into the liver of BALB/c nude mice. The tumor-bearing nude mice were randomly divided into five groups: control group (G1 group), Oxaliplatin positive control group (G2 group, 25 mg/kg), COT low dose group (G3 group, 20 mg/kg), COT high dose group (G4 group, 40 mg/kg) and COT early treatment group (G5 group, 20 mg/kg). G5 group of mice was treated with COT p.o. from day 2 post tumor implantation. All other mice were treated from day 20 post tumor implantation. The growth of xenografted tumors was traced weekly by in vivo fluorescence imaging technology. Real time whole body fluorescence imaging was performed to measure tumor growth during the study. At the end of treatment, all

of mice were killed and tumor tissue were collected. VEGF expression in the tumors collected at autopsy was analyzed by immunohistochemical staining. VEGF mRNA expression in the tumors collected at autopsy was analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The COT significantly inhibited the growth of xenografted tumors. The inhibitory effect of COT in G5 group was superior to those in G3 group and G4 group, which was almost close to G2 group. VEGF protein was found to be expressed in the cytoplasm of all liver cells and the cell membrane of some liver cells. Average optical density (D) of the tumor VEGF expression was significantly reduced by high-dose COT and early COT treatment, compared to G1 group and G3 group ($t = 4.657, 6.440, 7.712, 8.900; P = 0.0037, 0.0031, < 0.001, < 0.001$). The tumors from early treatment with COT and oxaliplatin-treated mice had significantly lower VEGF expression levels compared to all other COT-treated mice. Consistent with VEGF protein expression by immunohistochemistry, the tumor VEGF mRNA expression was significantly reduced by G4 group and G5 group, compared to G1 group and G3 group ($t = 6.320, 7.563, 12.907, 12.545; P = 0.0002, 0.0003, < 0.001, < 0.001$). **Conclusions** The acetoacetate extractive of *C. articulatus* Thunb possess the effect of anti-tumor in vivo. The COT inhibits the growth of tumor. Inhibit VEGF expression by COT may inhibit angiogenesis and then may contribute in part to the inhibition of tumor growth.

Key words: Celastrus; Acetic ether extract of Celastrus; Liver carcinoma; Vascular endothelial growth factor

南蛇藤(*celastrus orbiculatus thumb*)具有抗肿瘤、抗感染镇痛、抗菌、抗病毒、抗生育等广泛的药理活性^[1-5]。目前,关于南蛇藤抗癌活性及其机制的研究已有报道。血管内皮生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)是肿瘤诱导产生新生血管的最主要的细胞因子^[6]。VEGF是迄今研究证明作用最强的促血管生成因子。VEGF作为肿瘤组织中最主要的血管生成因子,不仅与肿瘤血管发生、增殖有关,并可使微血管的通透性增加,促进血浆纤维蛋白外渗,为血管内皮细胞的增殖、迁移及新血管形成提供基质支架。本研究在前期肝癌原位荧光动物模型的基础上,通过对肿瘤组织VEGF表达的研究,进一步揭示南蛇藤乙酸乙酯提取物对肿瘤生长的抑制作用可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选择50只BALB/c裸鼠,4~6周龄,雌雄各半(无特定病原体级,购自南京军区医学动物实验中心)。所有裸鼠在无特定病原体级屏障系统中饲养和实验(实验室使用许可证编号:SYXK(苏)2007-0011)。饲料为⁶⁰钴辐射灭菌的专用颗粒饲料(购自江苏协同医药生物公司)。

1.2 肿瘤细胞系 红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)标记的人肝癌HepG2细胞株(RFP-HepG2)购自美国组织细胞库,37℃、体积分数

5% CO₂及饱和湿度条件下培养于RPMI 1640培养液中。

1.3 RFP-HepG2细胞皮下种植 取 5×10^6 个RFP-HepG2细胞接种于3只裸鼠皮下,生长的瘤体供肝癌模型造模用。

1.4 肝癌模型的建立 取皮下种植生长的RFP-HepG2肿瘤,在培养液中分割成1 mm³的碎块。常规麻醉、消毒,在裸鼠左上腹做一切口,暴露肝脏,肝脏表面划5 mm深切口,在8×外科手术显微镜下,将1个瘤组织碎块植入肝脏,黏胶海绵轻压止血,5-0外科缝线缝合、关闭腹腔,整个过程在超净工作台中完成。

1.5 实验分组及方法 小鼠分5组,每组8只,分别为空白对照组(G1组,等渗盐水),奥沙利铂阳性治疗组(G2组,奥沙利铂25 mg/kg),南蛇藤小剂量治疗组(G3组,南蛇藤20 mg/kg),南蛇藤大剂量治疗组(G4组,南蛇藤40 mg/kg),南蛇藤预防治疗组(G5组,南蛇藤20 mg/kg)。南蛇藤配制方法:南蛇藤提取物有效药物含量为50%,二甲基亚砜助溶。G2组在瘤块移植后第2天开始灌胃给药,每天1次。20天后,治疗组开始用药,奥沙利铂采用尾静脉注射给药,南蛇藤为灌胃给药,每天1次,共4周。实验终点小鼠麻醉后剖腹取移植瘤称重记录,标本置于-196℃液氮中,2~3小时后转入-80℃低温冰

箱中保存,部分标本用4%甲醛固定保存。

1.6 荧光成像测定肿瘤体积变化 动物活体荧光影像系统由体视显微镜(ZOOM645S型,购自江南禹成光学仪器有限公司)、CCD图像传感器(Retiga Exi Cooled Digital Color型,购自美国QImaging公司)、荧光激发仪(LG-150-A型,购自南京超腾科技发展有限公司)组成。影像分析采用美国Media Cybernetics公司开发的Image-Pro软件。每周测量1次小鼠原位肿瘤长径和短径,Image-Pro软件计算肿瘤体积,并拍摄典型照片。肿瘤体积=肿瘤长径×肿瘤短径²/2

1.7 免疫组织化学检测VEGF表达 将标本进行常规包埋切片,进行VEGF免疫组织化学染色,显微镜下观察并拍照。实验结果判定:以已知阳性切片为标准,光镜下VEGF阳性表达以肝癌细胞细胞膜和(或)细胞浆内出现棕黄色颗粒为准。所有照片在同一条件下拍摄(禁用自动白平衡功能),采用Image-pro plus 6.0 (IPP)软件分析,选用累积光密度(integrated optical density, IOD)与面积两个测量项目,IOD SUM表达图片上阳性物总量,整个视野的平均光密度(D)=IOD SUM/面积SUM,利用整个视野的平均光密度来表示各图片免疫组织化学染色程度。

1.8 RT-PCR检测VEGF表达 将每个标本的另一半用匀浆机捣成匀浆,按照美国Promega公司细胞总RNA提取试剂盒说明书进行总RNA的提取纯化。由上海生工生物工程技术服务有限公司合成VEGF的引物序列,VEGF正义引物序列为:5'-GGGGGATCCGCCTCCGAAACCATGAACCTT-3',反义引物序列为:5'-CCCGAATTCTCCTGGTGAGAGATCTGGTT-3',扩增长度为550 bp。转录合成cDNA按照Access RT-PCR试剂盒说明书进行操作,最后用凝胶图像分析系统扫描分析,计算VEGF/GAPDH的比值。

1.9 统计学分析 所有实验数据应用SPSS 12.0统计学软件进行处理。率采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 南蛇藤乙酸乙酯提取物对小鼠肝脏移植瘤体积

的影响 RFP-HepG2细胞接种第20天治疗组开始用药,第31天的影像扫描结果提示各组移植瘤体积出现差异,第45天达高峰。G5组在移植第31、38、45天的移植瘤体积与G1组相比,均明显减小($t = 5.043、3.574、3.723, P = 0.001、0.009、0.007$)。G4组在移植第31、38天的移植瘤体积明显小于G1组($t = 4.599、2.419, P = 0.002、0.046$),第45天时的移植瘤体积虽小于G1组,但差异无统计学意义($t = 2.156, P = 0.068$)。G3组在治疗过程中的移植瘤体积与G1组相比无明显减小($P = 0.701、0.674、0.853$)。G2组移植瘤生长速度慢,体积最小,与G1组、G3组相比,差异均有统计学意义(治疗45天, $P = 0.003、0.002$);与G4组相比,移植第31天时的移植瘤体积差异无统计学意义($t = 2.146, P = 0.069$),但第38、45天时G4组移植瘤体积明显较G2组大($t = 2.569、4.526, P = 0.037、0.003$)。G2组与G5组移植瘤体积差异在各时间点均无统计学意义($t = 1.973、0.715、0.937, P = 0.089、0.498、0.163$)。各组移植瘤生长曲线见图1。

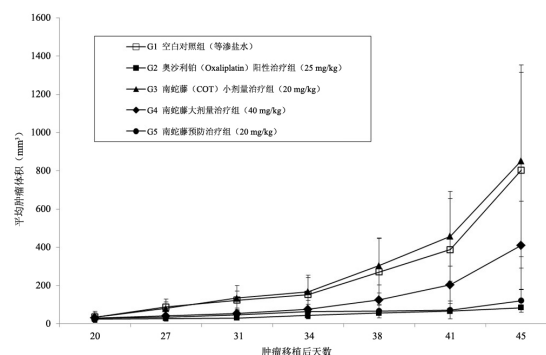


图1 治疗期间各组肿瘤的平均体积变化

2.2 各实验组肿瘤组织的VEGF表达 VEGF主要表达于肝癌细胞的细胞浆内,部分肝癌细胞的细胞膜亦有表达,偶有间质中表达,G2组的阳性表达率最低,G4组、G5组的阳性表达率显著低于G1组、G3组($t = 4.657、6.440、7.712、8.900, P = 0.0037、0.0031、< 0.001、< 0.001$),见图2、图3、表1。

2.3 各实验组肿瘤组织的VEGF mRNA水平 各组肿瘤组织GAPDH的表达无差异,通过半定量的RT-PCR方法,对比内参照物GAPDH,VEGF mRNA在不同实验组的水平自G1组至G5组依次为(1.281 ±

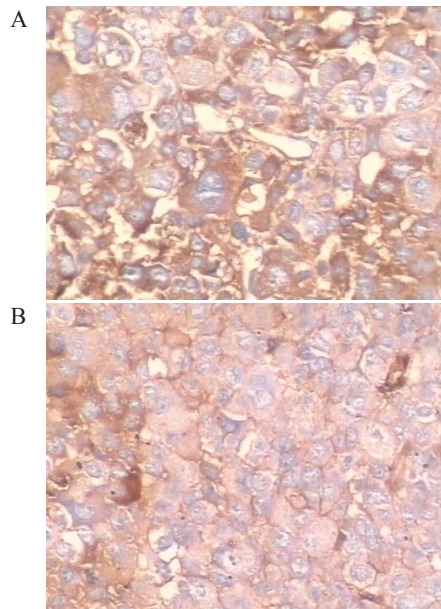


图2 肝癌组织中VEGF表达（免疫组织化学染色）
注：A为空白对照组（200×）；B为南蛇藤预防治疗组（200×）

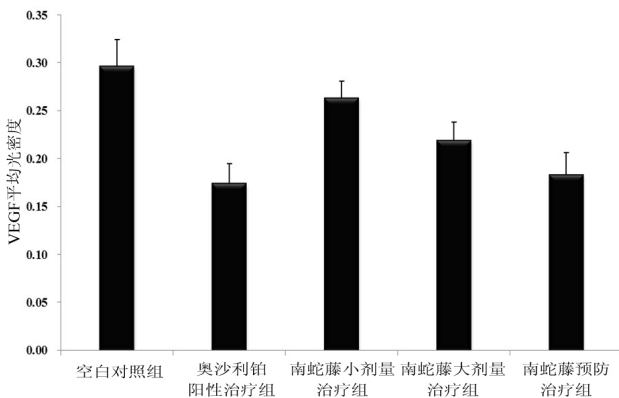


图3 VEGF在各实验组肿瘤组织中的表达

表1 VEGF在各实验组肿瘤组织中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

	IOD SUM	D
G1组	32347.75 ± 2981.11	0.296 ± 0.028
G2组	19991.88 ± 2496.68	0.174 ± 0.021
G3组	29241.25 ± 2534.69	0.263 ± 0.018
G4组	25858.50 ± 2128.05	0.219 ± 0.019
G5组	21013.38 ± 2280.19	0.183 ± 0.023

注：G1 vs G2: $t = 9.942$, $P < 0.001$; G1 vs G3: $t = 2.817$, $P = 0.017$; G1 vs G4: $t = 6.440$, $P = 0.003$; G1 vs G5: $t = 8.900$, $P < 0.001$; G2 vs G5: $t = 0.790$, $P = 0.428$; G2 vs G4: $t = 4.474$, $P = 0.003$; G3 vs G4: $t = 4.457$, $P = 0.004$; G3 vs G5: $t = 7.712$, $P < 0.001$; G4 vs G5: $t = 3.427$, $P = 0.011$

0.114)、(0.688 ± 0.048)、(1.160 ± 0.079)、(0.918 ± 0.075)、(0.720 ± 0.056)，见图4、5。各实验组肿瘤组织VEGF mRNA水平与免疫组织化学显示VEGF表达呈平行关系。G2组的VEGF mRNA水平最低，G4组、G5组的VEGF mRNA

水平显著低于G1组、G3组 ($t = 6.320$ 、 7.563 、 12.907 、 12.545 , $P = 0.0002$ 、 0.0003 、 < 0.001 、 < 0.001)。

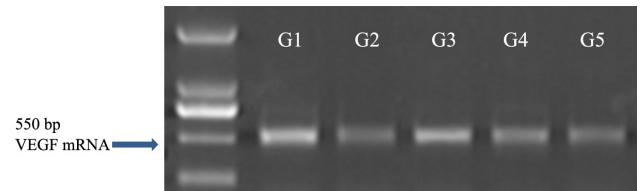


图4 VEGF mRNA水平半定量的RT-PCR

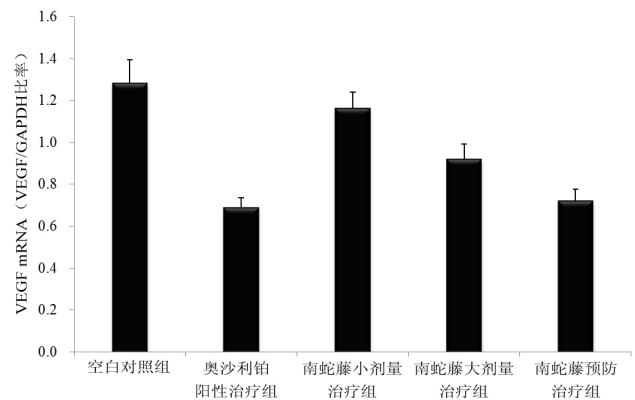


图5 各实验组肿瘤组织的VEGF mRNA水平

3 讨论

在肿瘤的生长、发展、转移等各阶段中，血管生成发挥着重要的作用。肿瘤细胞可分泌促血管生成的各种因子，进而促进新生血管的生成，新生的血管为肿瘤生长提供所需要的营养，促进肿瘤进一步发展和转移^[6-10]。VEGF是肿瘤诱导新生血管生成的最主要的细胞因子之一，而且是目前研究证实作用最强的促血管生成因子。在正常组织中，VEGF表达水平极低，而在大多数恶性肿瘤中则呈高水平表达。肿瘤细胞中VEGF的表达显著增加，肿瘤新生血管增多，其结构和功能均与正常血管不同，癌细胞更易侵入血管出现远处转移，因此，VEGF是肿瘤细胞在生长和转移过程中最重要的因子之一^[11-13]。

近年多项系列研究结果表明，南蛇藤多种有效成分具有抗肿瘤作用，对多种肿瘤细胞株的生长、增殖有较好的抑制作用，在抑制肿瘤侵袭、转移中表现出一定优势^[1-3]。本实验应用荧光蛋白基因工程表达的人肝癌细胞RFP-HepG2 接种到BALB/c裸鼠肝脏，成功建立了人肝癌动物模型，比较不同剂

量的南蛇藤乙酸乙酯提取物对人肝癌动物模型的抗肿瘤疗效。采用活体荧光影像技术追踪肿瘤生长情况,动态观察肿瘤的体积变化,并进一步通过对肿瘤组织VEGF表达的研究,揭示南蛇藤乙酸乙酯提取物对肿瘤生长的抑制作用可能的机制^[14,15]。本课题组前期系列研究显示^[16],南蛇藤乙酸乙酯提取物可抑制体内、外肿瘤细胞的生长,对裸鼠人肝癌移植瘤的生长具有一定的治疗和预防作用G4组、G5组对肿瘤的抑制更明显。研究表明,南蛇藤可抑制体内、外肿瘤细胞的生长,同时具有抗血管形成作用,与前期研究^[16]结果相一致的,G4组、G5组的免疫组织化学VEGF阳性表达率显著低于G1组、G3组;各实验组肿瘤组织VEGF mRNA水平与免疫组织化学VEGF表达呈平行关系。G2组的VEGF mRNA水平最低,G4组、G5组的VEGF mRNA水平显著低于G1组、G3组。

综上所述,南蛇藤乙酸乙酯提取物可抑制裸鼠原位人荧光蛋白肝癌移植瘤模型肿瘤的生长及其VEGF表达,提示南蛇藤乙酸乙酯提取物抑制肝癌的生长和转移的作用可能通过抑制其VEGF的表达,继而抑制肝癌血管形成。

参考文献

- [1] 汪茂荣. 中药南蛇藤抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中医学报,2010,25:1055-1057.
- [2] 张舰,许运明,刘延庆. 南蛇藤提取物体外抑瘤作用研究[J]. 中药药理与临床,2006,22:99-101.
- [3] 张华,付强,钱亚云,等. 南蛇藤提取物对人肝癌细胞增殖、迁移及血管内皮生长因子-C表达的影响[J]. 中医杂志,2013,10:865-869.
- [4] 员林,张华,钱亚云,等. 南蛇藤提取物含药血清对小鼠肝癌Hep1-6细胞的增殖能力和VEGF-c表达水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17:157-160.
- [5] 杨庆伟,刘延庆. 中药有效成分抗消化道肿瘤血管生成的研究进展[J]. 国际中医中药杂志,2007,29:281-283,286.
- [6] 段泽星,谢立群. VEGF在肿瘤生长和血管生成中的作用[J]. 世界华人消化杂志,2010,18:2894-2900.
- [7] Tjwa M, Luttun A, Autiero M, et al. VEGF and PIGF: two pleiotropic growth factors with distinct roles in development and homeostasis[J]. Cell Tissue Res,2003,314:5-14.
- [8] Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy[J]. J Clin Oncol,2002,20:4368-4380.
- [9] Fang J, Zhou Q, Liu LZ, et al. Apigenin inhibits tumor angiogenesis through decreasing HIF-1 alpha and VEGF expression[J]. Carcinogenesis, 2007,28:858-864.
- [10] Chang SH, Kanasaki K, Gocheva V, et al. VEGF-A induces angiogenesis by perturbing the cathepsin-cysteine protease inhibitor balance in venules, causing basement membrane degradation and mother vessel formation[J]. Cancer Res,2009,69:4537-4544.
- [11] Benest AV, Harper SJ, Herttua SY, et al. VEGF-C induced angiogenesis preferentially occurs at a distance from lymphangiogenesis [J]. Cardiovasc Res,2008,78:315-323.
- [12] Hirakawa S, Brown LF, Kodama S, et al. VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites[J]. Blood,2007,109:1010-1017.
- [13] Pradeep CR, Sunila ES, Kuttan G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies[J]. Integr Cancer Ther,2005,4:315-321.
- [14] Qian YY, Zhang H, Hou Y, et al. Celastrus Orbiculatus extract inhibits tumor angiogenesis by targeting vascular endothelial growth factor signaling pathways and shows potent antitumor activity in hepatocarcinomas in Vitro and in Vivo[J]. Chin J Integr Med,2012,18:752-760.
- [15] Cao R, Ji H, Feng N, et al. Collaborative interplay between FGF-2 and VEGF-C promotes lymphangiogenesis and metastasis[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2012,109:15894-15899.
- [16] 汪茂荣,张馨,刘延庆. 南蛇藤乙酸乙酯提取物对荧光蛋白标记的肝癌HepG2细胞裸鼠移植瘤生长的抑制作用[J]. 中华肝脏病杂志,2012,20:101-103.

收稿日期: 2013-04-16

· 消息 ·

与本刊编辑部互动方式

尊敬的作者、尊敬的读者,有关投稿、稿件查询、杂志订阅、地坛国际感染病学术会议消息、肝脏病和感染病诊疗指南等有关咨询或学术疑难问题,您可以登陆本刊网站<http://www.j-ditan.com>、发送邮件至Email: editordt@163.com;或拨打电话010-84322058/84322059与编辑部联系。

本刊编辑部