

· 药理 ·

## 西黄滴丸对 S180 荷瘤小鼠 CD34 及 VEGF 影响 及形态学观察的实验研究

车萍<sup>1</sup>, 王中霞<sup>2</sup>, 李峰<sup>1</sup>, 欧阳兵<sup>3</sup>, 季旭明<sup>1\*</sup>

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东宏济堂制药集团有限公司, 济南 250355;  
3. 山东省食品药品监督管理局, 济南 250011)

**[摘要]** **目的:**研究西黄滴丸对 S180 肉瘤小鼠的抑瘤作用,并探讨西黄滴丸对荷瘤小鼠肉瘤组织中血管生成标记物(CD34)和相关因子血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。**方法:**采用 S180 肉瘤小鼠模型,分为模型组,西黄丸组(2.2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),西黄滴丸低、中、高剂量组(1.5,3,6 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)以及环磷酰胺组(CTX,0.02 g·kg<sup>-1</sup>),西黄丸组,西黄滴丸低、中、高剂量组 *ig* 给药,环磷酰胺组 *ip* 给药,每 2 d 1 次,连续 10 d 给药;观察西黄滴丸对 S180 荷瘤小鼠的抑瘤作用,并采用 HE 染色观察肿瘤细胞的形态变化,免疫组织化学的方法观察西黄滴丸对荷瘤小鼠肿瘤 CD34 及 VEGF 蛋白表达的影响。**结果:**与模型组比较,滴丸高剂量组荷瘤小鼠体重有明显升高;西黄丸组,西黄滴丸低、中、高剂量组及 CTX 组抑瘤率分别是 26.28%,21.47%,26.92%,30.76%,35.85%;CD34 的蛋白表达 CTX 组较模型组有明显降低( $P < 0.01$ ),西黄滴丸高、中、低剂量组明显降低 CD34 蛋白表达( $P < 0.05$ ),滴丸高剂量组较西黄丸组有较明显差异( $P < 0.05$ );滴丸中、高剂量组及 CTX 组与模型组比较 VEGF 的蛋白表达有明显降低( $P < 0.05$ ),滴丸中剂量组及 CTX 组较西黄丸组蛋白表达有较明显差异。**结论:**西黄滴丸对 S180 荷瘤小鼠具有抑瘤的作用,其机制可能与下调肿瘤组织 CD34 及 VEGF 蛋白表达水平有关。

**[关键词]** 西黄滴丸;西黄丸;S180;抑瘤;血管内皮生长因子;CD34

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0095-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200095

**Influence of Xihuang Dropping Pills on CD34 and VEGF of S180 Tumor-bearing Mice and Experience on Morphology** CHE Ping<sup>1</sup>, WANG Zhong-xia<sup>2</sup>, LI Feng<sup>1</sup>, OUYANG Bing<sup>3</sup>, JI Xu-ming<sup>1\*</sup> (1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China; 2. Shandong Hongjitang Pharmaceutical Group Corporation, Ji'nan 250355, China; 3. Shandong Food and Drug Administration, Ji'nan 250011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the antitumor effects of Xihuang dropping pills in S180 tumor-bearing mice and their influence on angiogenesis markers (CD34) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in sarcoma tissues of tumor-bearing mice. **Method:** S180 tumor-bearing mice were divided into model group, Xihuang pills group (2.2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), Xihuang dropping pills low dose, middle dose and high dose groups (1.5, 3, 6 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) and cytoxan group (CTX, 0.02 g·kg<sup>-1</sup>). Xihuang pills group, Xihuang dropping pills low dose, middle dose and high dose groups were administered *ig*, and CTX group was administered *ip*, 1 time/2 days for continuous 10 days. The antitumor effects of Xihuang dropping pills in S180 tumor-bearing mice were observed, and the morphology changes of tumor cells were observed by HE staining. The influence of Xihuang dropping pills on CD34 and VEGF expression was observed by immunohistochemical method. **Result:** Compared with the model group, the body weight in tumor-bearing mice in Xihuang dropping pills high dose group was significantly increased. The anti-tumor rate in Xihuang pills group, Xihuang dropping pills low, middle, high groups and CTX group was 26.28%, 21.47%, 26.92%, 30.76% and 35.85% respectively. CD34 protein

**[收稿日期]** 20141008(008)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2010ZX09401)

**[第一作者]** 车萍,讲师,在读博士,从事方剂的药效学研究,Tel:0531-89628576,E-mail:cheping200380@163.com

**[通讯作者]** \*季旭明,博士,教授,从事中西医结合基础研究,Tel:0531-89628576,E-mail:jixuming724@163.com

expression in CTX group and Xihuang dropping pills high dose group was significantly lower than that in model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). VEGF protein expression in Xihuang dropping pills middle, high dose group and CTX group was significantly lower than that in model group ( $P < 0.05$ ). There was significant difference in proteins expression between Xihuang dropping pills middle dose group and Xihuang pills group. **Conclusion:** Xihuang dropping pills have the anti-tumor effect in S180 tumor-bearing mice, and the mechanism may be associated with down-regulating expression of CD34 and VEGF protein in tumor tissues.

[**Key words**] Xihuang dropping pills; Xihuang pills; S180; anti-tumor; vascular endothelial growth factor; CD34

肿瘤的发病率逐年升高,目前是危害人类健康的头号杀手。关于治疗肿瘤的药物越来越多,中医药在此方面逐渐显示出它的优势。西黄丸由牛黄、麝香、乳香、没药 4 味中药组成,具有活血化瘀,软坚散结的功效,用于癌症的治疗。山东中医药大学李峰教授在传统西黄丸的基础上,采用单因素试验和正交试验的方法对其制备过程进行优选,制成西黄滴丸,在前期研究中显示出较好的疗效<sup>[1]</sup>。CD34 蛋白能通过抗体与其相应的血管内皮细胞结合,增加内皮细胞的化学趋向性,促进血管内皮的分裂和毛细血管出芽生长,诱导蛋白溶解酶生成,有利于内皮细胞穿过基质,促进新生血管形成。血管内皮生长因子(VEGF)在新生血管生长过程中发挥着中心作用,是刺激肿瘤血管生成最强的细胞因子<sup>[2]</sup>。本文就西黄滴丸对 S180 荷瘤小鼠肉瘤组织中 CD34 和相关因子 VEGF 表达的影响进行研究。

## 1 材料

**1.1 动物及细胞株** 昆明种小鼠,雌雄各半,60 只,体重(20±2)g,由山东中医药大学动物实验中心提供,合格证号 SCXK(鲁)2013-0001,SPF 级实验室饲养。S180 腹水瘤株由山东省医学科学院药物研究所提供。

**1.2 药物及试剂** 西黄滴丸由山东中医药大学李峰教授提供;西黄丸(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂,批号 Z11020073),环磷酰胺(CTX,江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 00231-201303),兔抗小鼠 CD34 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号 BA0981),小鼠抗小鼠 VEGF 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 E1537)。

**1.3 仪器** DSHZ-400 型恒温水浴箱(江苏太仓医用仪器厂),HM440E 型滑动式石蜡切片机(德国 MICROM 公司),BX41 型显微摄影仪(日本 Olympus 公司),Image-Pro Plus 6.0 多功能图像分析系统(美国 Medcybernetic 公司)。

## 2 方法

**2.1 西黄滴丸的制备** 以工艺条件 PEG8000-PEG10000 1:1 作为基质,药物-基质 1:1.5,用二甲硅油作冷却剂,温度采用梯度冷却(上部温度为 30℃,下部温度为 0~5℃,药液温度为 75℃,滴速为 20~25 滴/min,滴距 4 cm。称一定量基质,75℃ 熔融后加入提取的乳香、没药有效成分挥发油以及用超微粉碎技术所制的牛黄、麝香粉末,混匀后滴制而成。

**2.2 动物模型制备** 无菌条件下取瘤株注射于小鼠腹腔,培养 7 d。取腹水与 PBS 液 1:3 比例稀释,离心取上清,用血细胞计数板计数瘤细胞数量,调整瘤细胞密度为(2~3×10<sup>7</sup>/mL)接种于小鼠右腋下。然后用台盼蓝染色并进行活细胞计数,活细胞率 > 95% 后进行右腋下接种,每只 0.2 mL,制备实体瘤模型。

**2.3 动物分组及给药** 取已接种的上述实体瘤模型小鼠,于接种 24 h 后,将小鼠随机分为 6 组,每组 10 只,分别是模型组,西黄丸组,西黄滴丸低、中、高剂量组以及 CTX 组。分别给予生理盐水,西黄丸 2.2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,西黄滴丸 1.5, 3.0, 6.0 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,ig 给药,以及 20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,每 2 d 1 次,ip,连续给药 10 d。

**2.4 西黄滴丸对 S180 荷瘤小鼠的体重及瘤重的影响** 分别于造模前及给药 10 d 后,称取小鼠体重并记录。末次给药 24 h 后,将小鼠脱臼处死,剥取小鼠瘤体,称其质量,计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = (\text{对照组平均瘤重} - \text{实验组平均瘤重}) / \text{对照组平均瘤重} \times 100\%$$

**2.5 各组肿瘤组织的形态变化** 取各组小鼠肿瘤组织,4% 多聚甲醛固定 24 h,常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,进行 HE 染色,显微镜下进行观察。

**2.6 肿瘤组织中 CD34 及 VEGF 的表达检测** 将切片用二甲苯浸泡 10 min,更换二甲苯浸泡 10 min,常规脱蜡,100%,95%,85%,70% 乙醇梯度

脱水。余步骤按照免疫组化试剂盒进行操作。70% ,85% ,95% ,100% 乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。以抗体稀释液代替一抗作为阴性对照。切片置于显微镜下观察拍片,美国 Medcybernetic 公司 Image Pro Plus 6.0 医学图像分析系统进行图像分析,400 倍镜下随机取 5 个视野,分别检测阳性细胞总面积 (Area) 和积分吸光度 IA,求出平均吸光度 A。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间均数比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表 1 西黄滴丸对 S180 荷瘤小鼠体重及瘤重的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of Xihuang dropping pills body and tumor weight of S180 tumor-bearing mice ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物/只		剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	体重/g		瘤重/g	抑瘤率/%
	始	末		始	末		
模型	10	9	-	19.34 ± 1.56	24.35 ± 2.87	3.12 ± 0.74	-
西黄丸	10	10	2.2	19.68 ± 1.54	25.69 ± 3.74	2.40 ± 0.52 <sup>1)</sup>	26.28
西黄滴丸	10	9	1.5	19.15 ± 1.12	25.74 ± 5.67	2.45 ± 0.67 <sup>1)</sup>	21.47
	10	9	3.0	19.25 ± 1.43	26.52 ± 3.95	2.28 ± 0.43 <sup>1)</sup>	26.92
	10	10	6.0	19.57 ± 1.28	28.37 ± 4.56 <sup>1)</sup>	2.16 ± 0.56 <sup>2,3)</sup>	30.76
CTX	10	8	0.02	19.45 ± 1.31	23.54 ± 5.26	2.04 ± 0.35 <sup>2)</sup>	35.85

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与西黄丸组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.2 对 S180 荷瘤小鼠肿瘤组织形态学的影响 显微镜下观察显示,模型组可见肿瘤细胞弥漫散在分布,成束状交织排列,比较密集,细胞大小不同,形态各异;细胞核大小不一,核质比例增大,可见不对称性、多极性核分裂等病理性核分裂象。西黄丸组可见肿瘤细胞密度减低,并有间质出现,组织中可见少量坏死细胞。滴丸低、中剂量组可见组织结构稍微疏松,见较多无定型坏死物,滴丸高剂量组及 CTX 组 HE 切片可见大量的肿瘤细胞无定型坏死物,坏死区细胞结构多消失。见图 1。

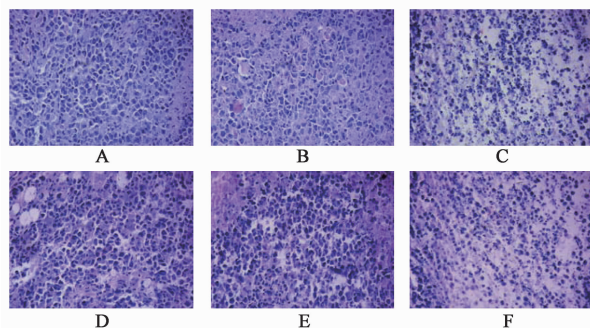
3.3 对 S180 荷瘤小鼠肿瘤中 CD34 及 VEGF 蛋白表达的影响 CD34 的 A CTX 组较模型组有显著性降低( $P < 0.01$ ),西黄滴丸高剂量组具有将明显降低( $P < 0.05$ ),滴丸高剂量组较西黄丸组有较显著差异( $P < 0.05$ )。滴丸中、高剂量组及 CTX 组就与模型组对比 VEGF 的 A 有明显降低( $P < 0.05$ ),滴丸中剂量组及 CTX 组较西黄丸组 A 有较明显差异( $P < 0.05$ )。见表 2,图 2,3。

#### 4 讨论

在实体瘤的生长、浸润和转移中,持续的血管生成是一个关键因素。新生的微血管是肿瘤浸润和转

### 3 结果

3.1 对 S180 荷瘤小鼠体重及瘤重的影响 实验前各组动物体重比较无统计学意义;给药后,滴丸高剂量组体重较模型组有所升高,有统计学意义( $P < 0.05$ )。瘤体质量滴丸高剂量及 CTX 组较模型组有显著降低( $P < 0.01$ ),西黄丸及滴丸低、中剂量组较模型组有较显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );滴丸高剂量组较西黄丸组有较显著降低( $P < 0.05$ );西黄丸,西黄滴丸高、中、低剂量组及 CTX 组的抑瘤率分别是 26.28% ,21.47% ,26.92% ,30.76% ,35.85% 。



A. 模型组;B. 西黄丸组;C. CTX 组;D. 西黄滴丸 1.5 g·kg<sup>-1</sup>组;E. 西黄滴丸 3.0 g·kg<sup>-1</sup>组;F. 西黄滴丸 6.0 g·kg<sup>-1</sup>组(图 2~3 同)

图 1 西黄滴丸对 S180 荷瘤小鼠肿瘤组织形态学的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effects of Xihuang dropping pills on tumor tissue morphology of S180 tumor-bearing mice (HE, ×400)

移的第一站,肿瘤微血管数量越多,肿瘤细胞进入血液循环的机会就越大,转移概率越大,对人体造成的危害就越大。因此,血管生成是近年来医学研究新兴的一个领域。

CD34 主要表达于血管内皮细胞胞浆,其免疫组织化学染色的阳性酶点 (PED) 可反映肿瘤组织内微血管的密度。因此,是血管内皮细胞的标记物,可

表 2 西黄滴丸对 S180 肉瘤中 CD34 及 VEGF 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effects of Xihuang dropping pills on CD34 and VEGF expression of S180 tumor-bearing mice ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	CD34 /A	VEGF /A
模型	9	-	0.79 ± 0.12	0.21 ± 0.04
西黄丸	10	2.2	0.60 ± 0.08 <sup>1)</sup>	0.20 ± 0.05
西黄滴丸	9	1.5	0.62 ± 0.09 <sup>1)</sup>	0.20 ± 0.03
	9	3.0	0.61 ± 0.07 <sup>1)</sup>	0.16 ± 0.05 <sup>1,3)</sup>
	10	6.0	0.54 ± 0.07 <sup>1,3)</sup>	0.16 ± 0.03 <sup>1)</sup>
CTX	8	0.02	0.43 ± 0.12 <sup>2)</sup>	0.15 ± 0.02 <sup>1,3)</sup>

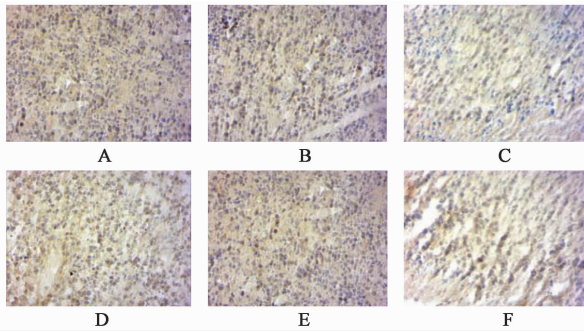


图 2 西黄滴丸对 S180 肿瘤组织 CD34 表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 2 Effects of Xihuang dropping pills on expression of CD34 protein of S180 tumor-bearing mice (IHC, ×400)

用于标记肿瘤组织中的微血管<sup>[3]</sup>。本研究表明,滴丸高剂量组 CD34 的 A 明显低于对照组,揭示一定量浓度的滴丸可以抑制肿瘤血管的生长。抑制血管生长,应该是西黄滴丸抑瘤的机制之一。

VEGF 阳性染色主要见于 S180 肿瘤细胞胞浆中,也可见细胞外着色<sup>[4]</sup>,其表达强度根据阳性物质着色深浅及面积大小来判断。VEGF 能强烈促使血管内皮细胞分裂增殖及增加血管通透性<sup>[5]</sup>,从而有利于肿瘤细胞侵入血管,与肿瘤生长及转移密切相关。本实验表明,一定剂量的西黄滴丸干预后,能促进间质的增生,促进肿瘤组织的坏死,下调肿瘤组织 VEGF 的蛋白表达。而西黄滴丸的抗肿瘤作用机

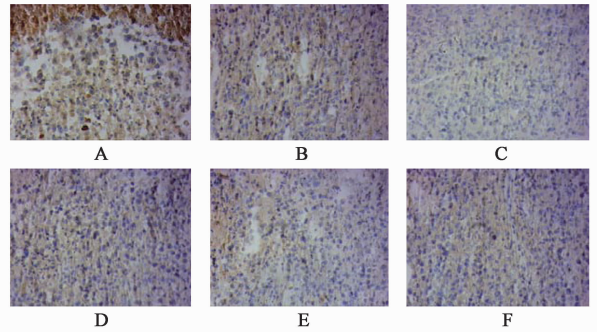


图 3 西黄滴丸对 S180 肿瘤组织 VEGF 表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effects of Xihuang dropping pills on expression of VEGF protein of S180 tumor-bearing mice (IHC, ×400)

制可能与下调肿瘤组织中 VEGF 的蛋白表达有关。

实验数据表明,西黄滴丸高剂量组瘤重较西黄丸组有较显著降低,滴丸高剂量组 CD34 A 较西黄丸组有较显著差异,并且滴丸中剂量组 VEGF A 较西黄丸组有较明显降低,差异有统计学意义。说明一定剂量的西黄滴丸较西黄丸具有较好的抑瘤作用,其抑瘤的机制可能与降低肿瘤组织中 CD34 和 VEGF 的量有关。

[参考文献]

[1] 王志宏,王中霞,刘超,等.西黄滴丸抗肿瘤作用及对免疫功能的影响[J].山东大学学报,2013,51(4):18-20.  
[2] Twardowski P, Gradishar W J. Clinical trial of antiangiogenic agents[J]. Curr Opin Oncol,1997,9(6):584-589.  
[3] 王家林,韩明勇,胡旭东,等.大肠组织 Endostatin、VEGF 的表达与血管生成关系的探讨[J].中国现代普通外科进展,2004,7(5):310-312.  
[4] 韩志鹏,王润田,李铁民,等.中药复方抑瘤饮对小鼠 S180 移植瘤血管生成的动态研究[J].中国中药杂志,2009,4(2):212-216.  
[5] 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(27):2894-2896.

[责任编辑 周冰冰]