

# 艾迪注射液抑制肿瘤新生血管形成的实验研究

朱世杰<sup>\*</sup>, 贾立群, 李佩文  
(中日友好医院肿瘤科, 北京 100029)

[摘要] 目的: 研究艾迪注射液抑制肿瘤生长的作用机理。方法: 采用裸鼠人肺鳞癌移植瘤模型, 造模 10 d 后, 随机分为 3 组: 对照组每日 ip 生理盐水 0.2 mL, 共 20 d。艾迪组按  $12\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  每日 ip 艾迪注射液 0.2 mL(含生药  $1.2\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 共 20 d。化疗组按照  $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  给小鼠 ip 0.2 mL 顺铂(DDP), 共 7 d。给药结束后处死动物, 称瘤重; 用免疫组化染色检测肿瘤血管密度和 VEGF 蛋白表达。结果: 艾迪注射液和 DDP 的抑瘤率分别为 45.6% 和 78.3%, 艾迪注射液组血管密度降低, 肿瘤组织 VEGF 蛋白表达减少, DDP 组血管密度也降低, 但肿瘤组织 VEGF 蛋白表达增加。结论: 艾迪注射液可抑制肿瘤组织 VEGF 蛋白表达, 降低肿瘤血管密度。

[关键词] 肺癌; 艾迪注射液; 抗血管生成

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)11-0055-03

## An Experimental Study of the Anti-angiogenesis Effect of Aidi Injection

ZHU Shi-jie<sup>\*</sup>, JIA Li-qun, LI Pei-wen  
(Oncology Department, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

[收稿日期] 2008-06-09

[通讯作者] \* 朱世杰, Tel: (010) 84205733; Email: zhushijie@yahoo. cn

[ **Abstract** ] **Objective:** To explore the mechanism of the anti-tumor effect of Aidi Injection. **Methods:** Human lung squamous cell carcinoma xenografts were transplanted into 30 nude mice. Mice were randomly divided into 3 groups: The Aidi Injection group received Aidi Injection (  $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 0.2 mL, peritoneal injection) every day for 20 days, the chemotherapy group received DDP (  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 0.2 mL peritoneal injection) every day for 7 days, and the control group received normal sodium (0.2 mL peritoneal injection) every day for 20 days. They were sacrificed afterwards and their tumors were processed for histological examination. The weights of the tumors were measured, the vessel density of the tumor and the expression of VEGF in tumors were detected using immunohistochemical method. **Results:** The cancer inhibition rates of Aidi Injection and DDP are 45.6% and 78.3% accordingly. In the Aidi Injection group, the vessel density of the tumor and the expression of VEGF in tumors decreased. In the DDP group, the vessel density of the tumor decreased, while the expression of VEGF in tumors increased. **Conclusion:** Aidi Injection can inhibit the expression of VEGF in tumor and decrease the vessel density of the tumor.

[ **Key words** ] lung cancer; Aidi injection; anti-angiogenesis effect

艾迪注射液是 3 类抗肿瘤中成药,由黄芪、刺五加、人参与斑蝥提取物制成,具有清热解毒、消瘀散结功能。适用于原发性肝癌、肺癌、肠癌、鼻咽癌、泌尿系肿瘤、恶性淋巴瘤、妇科恶性肿瘤等。可用于肿瘤术后巩固治疗,与化疗联合应用可提高疗效、减少毒副作用。我们在临床上用于治疗晚期肿瘤,发现该药具有稳定病灶的作用。为了进一步揭示该药的作用机理,本实验观察了艾迪注射液对肿瘤新生血管的抑制作用,探讨其抑制肿瘤生长的可能机制。

## 1 材料与方法

**1.1 动物与药物** 裸鼠购自中国医学科学院动物研究所,雄性,鼠龄(6~8)周,体重(  $20 \pm 1$  )g,共 33 只。艾迪注射液由贵州益佰制药有限公司提供,生药浓度  $1.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。阳性对照药顺铂(DDP):山东齐鲁制药厂产品,批号:9904008,用 5%GS 配成浓度为  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液,遮光保存。

## 1.2 方法

**1.2.1 动物模型制备** L78 人肺鳞癌细胞株,由北京结核病防治研究所建立,保存于中日友好临床医学研究所生化室。复苏液氮冻存的 L78 瘤株,用 RPMI1640 培养液洗 1 次,收集细胞悬浮于含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液中,置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  及饱和湿度的孵育箱中培养,3 d 后取对数生长期细胞,调整浓度为  $2 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ ,在 3 只小鼠右腋下皮下接种  $5 \times 10^6$  个人肺鳞癌细胞,15 d 后取生长状态良好的 2 只肺鳞癌瘤源小鼠,拉颈处死,在严格无菌条件下取出瘤组织,除去血块及坏死组织,剪碎做成单细胞悬液,在每只裸鼠右腋下皮下接种  $2 \times 10^6$  个瘤细胞,共接种 30 只。

**1.2.2 分组用药及取材** 造模 10 d 后,随机分成 3 组,每组 10 只。对照组,ip 生理盐水 0.2 mL,每日 1 次,共 20 d;艾迪组:按  $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  ip 艾迪注射液 0.2 mL(含生药 0.24 g),每日 1 次,共 20 d;化疗组:按  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  给小鼠 ip 0.2 mL DDP(含 DDP 0.02 mg),每日 1 次,共 7 d。结束后处死动物,称瘤重,计算抑瘤率,肿瘤标本以 4% 甲醛固定做免疫组化染色。

**1.2.3 肿瘤血管密度测量** 常规石蜡切片,厚度  $0.8 \mu\text{m}$ ,石蜡切片脱蜡水化;3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  封闭内源性过氧化物酶 10 min;水洗;0.01 M TBS 液浸泡 5 min;电炉煮沸法修复抗原 60 min;正常山羊血清孵育 30 min;滴加小鼠抗人 CD34 单克隆抗体(1:100)(购自中山生物试剂公司), $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱过夜,阴性对照以正常山羊血清代替小鼠抗人 CD34 单克隆抗体;TBS 洗;滴加生物素化的羊抗鼠抗体, $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 30 min;TBS 洗;滴加辣根酶标记的链霉卵白素复合物, $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 30 min;TBS 充分洗涤;DAB 显色液常温下显色(5~10)min;充分水洗;梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片;光学显微镜下观察。肿瘤微血管密度的计数先用低倍镜观察整张切片,找出热点高血管密度区,它通常位于肿瘤包膜的边缘区。用 200 倍光镜计算 3 个视野中血管数目的平均数,作为每例肿瘤的血管密度,并采用人工计数与图像分析相结合的方法,以最大限度的减少误差。

**1.2.4 VEGF(血管内皮生长因子)表达的检测** 制片方法同肿瘤血管密度,用图像分析仪统计每个高倍镜视野下阳性细胞的总面积和平均视觉密度值。

**1.3 统计学处理** SPSS8.0 软件对数据进行多组之间比较的方差分析,计算各组差异性。

## 2 结果

**2.1 抑瘤率** L78 人肺鳞癌在裸鼠体内仍保持恶性增殖的特性, 至给药第 19 天时, 对照组有 1 只裸鼠因肿瘤负荷过大而死亡。故于第 20 天取材称瘤重。模型组瘤重明显大于艾迪组和化疗组( $P < 0.01$ ), 而减轻瘤重的作用化疗组优于艾迪组。结果见表 1。

表 1 各组平均瘤重和抑瘤率( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 ( $g \cdot kg^{-1}$ )	天数 (d)	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
模型组	—	—	1.06 ± 0.25	—
艾迪组	12.0	20	0.61 ± 0.15 <sup>1)</sup>	42.5
化疗组	1 × 10 <sup>-3</sup>	7	0.20 ± 0.09 <sup>1,2)</sup>	81.1

注: 与模型组比较 <sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与艾迪组比较 <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (下同)

**2.2 肿瘤血管密度** 模型组肿瘤血管密度明显高于艾迪组, 化疗组肿瘤血管和模型组比有所减少, 但不如艾迪组明显, ( $P < 0.01$ ), 见表 2。

表 2 各组肿瘤组织的平均血管密度( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 ( $g \cdot kg^{-1}$ )	天数 (d)	平均血管密度( $\bar{x} \pm s$ )
模型组	—	—	137.9 ± 13.7
艾迪组	12.0	20	42.9 ± 10.0 <sup>1)</sup>
化疗组	1 × 10 <sup>-3</sup>	7	67.3 ± 7.7 <sup>1,2)</sup>

**2.3 VEGF 的蛋白表达** VEGF 的阳性颗粒为棕褐色, 位于细胞浆中, 阳性细胞多分布在肿瘤血管周围。艾迪注射液组的阳性细胞面积和平均视觉密度都明显少于模型组, 说明艾迪注射液对 VEGF 的蛋白表达有抑制作用, 化疗组 VEGF 阳性细胞染色深度有所增加, 提示化疗可能会破坏肿瘤和宿主间的动态平衡, 使残存肿瘤细胞 VEGF 分泌量增加。见表 3。

表 3 各组 VEGF 阳性细胞面积和平均视觉密度( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 ( $g \cdot kg^{-1}$ )	天数 (d)	平均阳性细胞面积	平均视觉密度
模型组	—	—	215 288.8 ± 31 903.6	0.37 ± 0.052
艾迪组	12.0	20	177 723.9 ± 29 310.8 <sup>1)</sup>	0.31 ± 0.034 <sup>1)</sup>
化疗组	1 × 10 <sup>-3</sup>	7	110 116.5 ± 15 556.5 <sup>1,2)</sup>	0.47 ± 0.066 <sup>1,2)</sup>

## 3 讨论

艾迪注射液药理研究提示该药具有干扰癌细胞

合成、诱导癌细胞凋亡、影响癌基因表达、抗侵袭及转移的作用, 并能诱导体内产生白介素、干扰素、肿瘤坏死因子及提高细胞免疫功能、增加白细胞的功能<sup>[1]</sup>。肿瘤分子生物学研究的进展为进一步揭示其抗癌机理提供了有力的手段<sup>[2]</sup>。肿瘤血管不仅向肿瘤提供充足的营养, 同时还源源不断地向宿主输出肿瘤细胞, 导致肿瘤的恶性生长和转移。如果能抑制肿瘤血管, 肿瘤细胞的营养来源将随之减少, 肿瘤进入休眠状态, 对早期获得切除的肿瘤来说, 复发的可能性将减少, 对晚期肿瘤来说, 可稳定病灶, 使带瘤长期生存成为可能。Gitay 等<sup>[3]</sup>发现一些肿瘤细胞膜上有 VEGF 的受体, 提示 VEGF 是肿瘤细胞自分泌的一种促进增殖的细胞因子。抑制肿瘤新生血管可能是中药抗癌的作用靶点之一, 多个实验研究发现中药的抗癌作用与抑制肿瘤血管新生有关, 陈达理等<sup>[4]</sup>发现传统中药鳖甲煎丸可以显著抑制肿瘤细胞分泌 VEGF, 从而降低荷瘤小鼠病灶内微血管数, 以此达到抑制肿瘤生长的目的。王庆高<sup>[5]</sup>也发现癌痛消胶囊具有抑制肿瘤血管新生的作用。

我们在实验研究中发现, 艾迪注射液的抑瘤率为 45%, 其肿瘤的平均血管密度明显低于对照组和化疗组, VEGF 的蛋白表达水平也有所降低, 说明抑制肿瘤新生血管可能是艾迪注射液治疗有效的机理之一。

## [参考文献]

- [1] 李佩文. 肺癌综合治疗学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001: 630.
- [2] Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. [J]. J Natl Cancer Inst 1992, 84: 1875-1880.
- [3] Gitay-Goren H, Halaban R, Neufeld G, et al. Human melanoma cells but not normal melanocytes express vascular endothelial growth factor receptors[J]. J Biochem Biophys Res Commun, 1993, 190: 702-708.
- [4] 陈达理, 张绪慧. 鳖甲煎丸抗肿瘤血管生成的实验研究[J]. 浙江中医杂志, 2004, 12: 535-537.
- [5] 王庆高, 韦艾凌, 徐志新, 等. 癌痛消胶囊调节小鼠荷 H22 移植性肝癌细胞 VEGF、P53 和 P21 表达的实验研究[J]. 广西中医药, 2005, (28) 2: 45-48.