

加味保安方对带瘤 C57 小鼠肿瘤及肺组织 VEGF 表达水平的影响^{*}

★ 李晓丽^{**} 宋振华 (山东中医药大学 济南 250355)

摘要:目的:探讨加味保安方对 Lweis 肺癌 C57 小鼠肿瘤和肺组织的 VEGF 表达水平的影响。方法:将 Lweis 肺癌 C57 小鼠分为加味保安方大、小剂量组,西黄丸对照组,模型组,观察各组对 Lweis 肺癌 C57 小鼠对肿瘤和肺组织的 VEGF 水平的表达。结果:加味保安方大、小剂量及西黄丸均抑制 Lweis 肺癌 C57 小鼠肿瘤及肺组织的 VEGF 水平的表达($P < 0.05$),尤其是加味保安方大剂量作用明显,与西黄丸相当。结论:加味保安方能明显降低 Lweis 肺癌 C57 小鼠肿瘤及肺组织的 VEGF 水平的表达。

关键词:加味保安方;LweisC57 小鼠;肺癌;VEGF

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

保安丸出自刘完素《黄帝素问宣明论方·卷七》,以大黄 90 g、干姜 30 g、附子 15 g、鳖甲 45 g 组成,功效为化瘀消积、温中散寒,主治癥积,症见心腹内结如拳,渐上不止,抢心疼痛,及绕脐腹痛不可忍者。笔者根据温通降浊、解毒散结为治疗原则,将原方用量调整为大黄 30 g、干姜 30 g、附子 15 g、鳖甲 15 g、加冬凌草 15 g 组成本方。根据以往研究,本方可抑制肿瘤血管生成、抑制肺癌转移瘤的体积及镇痛等作用^[1~3],为进一步探讨本方抗肿瘤转移的机制,对带瘤 C57 小鼠瘤组织及肺组织 VEGF 表达水平的进行了实验研究,报道如下。

1 实验材料

1.1 实验药物 加味保安方:生大黄、干姜、炮附子、醋制鳖甲、冬凌草。

西黄丸:牛黄、乳香(醋制),没药(醋制),麝香。吉林金泉药业股份有限公司生产。产品批号 20030401。

1.2 实验仪器、试剂 RNA 提取试剂盒:MBI 公司。RT 试剂盒:Introgen 公司。PCR 试剂盒:上海生物工程有限责任公司。引物合成:上海生物工程有限责任公司。其他试剂:DEPC、EB、琼脂糖、异丙醇、三氯甲烷、醋酸钠、硼酸、异硫氰酸胍、SPS 等均购自上海生物工程有限责任公司。

1.3 实验动物 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠 40 只,体重 18~20 g,购于中国科学院上海实验动物中心。合格证号:SCXK(沪)2002-0010。Lewis 肺癌带瘤小鼠:购于北京医科大学药所。

2 实验方法

2.1 瘤细胞悬液制备 将 Lewis 肺癌带瘤小鼠放入超净台内,固定于蜡版上,剖开皮肤,无菌取瘤组织,去掉包膜和坏

死组织,选取周围生长旺盛的瘤组织,制成细胞悬液,调整成细胞浓度为 2×10^8 的肿瘤混悬液,待用。

2.2 分组及肿瘤移植 将未带瘤 C57 小鼠称重,随机分为 4 组,每组 10 只,加味保安方大剂量组、加味保安方小剂量组、西黄丸组及模型组,均在右腋下接种肿瘤细胞悬液 0.2 ml/只。

2.3 给药 加味保安方按成人表面积折算小鼠加味保安方大、小剂量为 14.04、7.02 g/kg;西黄丸组剂量为 0.78 g/kg。根据临床应用方法西黄丸组口服灌胃,模型对照组灌服等剂量的生理盐水。自肿瘤第 2 天起灌胃给药,连续给药 16d,期间小剂量组因灌胃不当死亡 1 只。

2.4 取肿瘤组织及肺组织 给药第 16 天,处死小鼠,放入超净台内,固定于蜡版上。剖开皮肤取瘤,取带瘤各组肿瘤组织及各组肺组织,置于冷冻管中, -70°C 保存,备用。

2.5 检测方法步骤

2.5.1 引物设计 参照有关文献合成引物^[4],由上海生物工程公司合成。 β -actin:上游引物:5' GGACTTGATTCCTTCATTCAGTC3',下游引物:5' CTCCTCCTACTATAAGCTAAGA3',扩增后 DNA 片段长度为 569bp;VEGF-C:上游引物:5' CGCTTAGGBACGATTAGAGTAACC3',下游引物:5' TACGTCAGTATCGCCGCAAATTTTC3',扩增后 DNA 片段长度为 497 bp。

2.5.2 mRNA 提取 所有操作器械均经 DEPC 处理或高温去 Rnase 处理。取保存的肿瘤组织及肺组织,用 GIT 变性液冰浴研磨,充分破碎,加 2M 醋酸钠(1/10 体积),充分混匀,加等体积水饱和酚,充分混匀,加 1/10 体积三氯甲烷,充分

^{*} 基金项目:山东省中医管理局资助项目(2003-08)

^{**} 作者简介:李晓丽(1964-),女,山东莱州人,医学博士,副教授,主要从事编辑工作及中药配伍的理论与实验研究。

混匀,冰浴 15min,13 000 r/min 低温离心 10min,移取上清,加入等体积异丙醇-20℃沉淀 1h,15 000 r/min 低温离心,小心弃上清,沉淀加入 100 μl GIT 变性液,充分混匀,加入等体积异丙醇-20℃沉淀 1h,15 000 r/min 低温离心,弃上清,用 75% 乙醇洗涤 2 遍,紫外分光光度仪检测纯度,A260/A280≈1.8,用于 RT 反应。

2.5.3 逆转录 引物(oligo dT) 2 μl,RT buffer(DTT)4 μl,提纯的 RNA5 μg,RNasin 1 μl,M⁺-MLV:1 μl,dNTP 2 μl,总体积 20 μl,42℃1h,70℃10min。

2.5.4 聚合酶链反应 用 RT 反应物 20 μl,PCR buffer 10 μl,MgCL 28 μl,上游引物、下游引物、dNTP1 μl 加去 Rnase 水调整总体积为 98 μl,95℃5min 冰浴,高速低温离心,加入 Tag 酶 2 μl,进入 PCR 循环。扩增条件为:β-actin:94℃1min→56℃1min→72℃1min;VEGF-C:94℃1min→58℃1min→72℃1min。30 个循环后,70℃7min。

2.5.5 PCR 产物电泳 琼脂糖凝胶 1.2%。

2.5.6 检测方法 应用 Alpha 凝胶成像系统分析 β-actin 以及 VEGF 的表达,以 VEGF 与 β-actin 光密度的比值,作为该样本 VEGF 的表达量。

2.6 统计处理

所测结果采用 SPSS 统计软件,进行方差分析和 *q* 检验。

3 结果

见表 1。

表 1 加味保安方对 LweisC57 小鼠移植瘤组织、肺组织 VEGF 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

	<i>n</i>	VEGF 表达	
		瘤组织	肺组织
模型组	10	1.045±0.023	0.535±0.018
大剂量组	10	0.514±0.025 [△]	0.252±0.011 [△]
小剂量组	9	0.626±0.019 [△]	0.352±0.019 [△]
西黄丸组	10	0.562±0.027 [△]	0.234±0.021 [△]

注:与模型组比较,△*P*<0.05。

结果表明,对肿瘤组织 VEGF 表达,大、小剂量加味保安方 V/β 比值均低于模型组(*P*<0.05),与西黄丸组相当,其中大剂量组略强于西黄丸,但无统计学意义;对肺组织的 VEGF 表达,大、小剂量加味保安方 V/β 比值也均低于模型组(*P*<0.05),与西黄丸组相当。

4 讨论

4.1 加味保安方配伍特点

加味保安方配伍特点主要有以下四个方面:一是攻下逐邪,解毒散结,肿瘤为有形之邪,因寒、毒、瘀胶结而成,癌肿一旦形成,更阻滞气血,致毒结愈甚,进而形成转移,故缓和毒结、寒瘀凝滞胶结难解之势,以利攻下为当务之急,治疗应攻下逐邪为主,兼以解毒散结,方能奏效;二是寒热并用,相反相成,肿瘤局部虽以热为表象,但形成之因多有寒凝,且全身多为寒象,呈寒热错杂之势,唯有寒热并施,方无顾此失彼之虞。方中大黄、附子二药寒热并行不悖,共奏温通解毒、扶阳降浊之功,故有“大黄与附子为伍者,皆非寻常之症。凡顽固偏僻难拔者,皆涉于阴阳两端,为非常之配伍”。张景岳也

精辟指出:“附子、大黄者乱世之良将也……”故大黄、附子寒热并用可拨乱反正,定祸乱而致太平。方中大黄与干姜相伍,脾胃同治,寒热平调,一守一走,相反相成,共奏温脾通下,顾护脾胃之效;三是攻补兼施,相得益彰,在攻下之中参以扶正,使泻不致太过,祛邪而不伤正。本方为治肿瘤转移的方剂,方中虽无纯补之品,但附子、干姜可温中散寒,温暖脾胃之阳,以奏培正之效,可防止病情的进一步恶化而发生转移。且取干姜的温中之性以缓大黄的攻下之力,正可谓“发中带补,真元不致于耗散”、“辅正祛邪,尤易于见功”;四是祛瘀消痰,痰瘀并治,肿瘤多系痰瘀毒夹杂相互搏结而成,古代医家倡导痰瘀毒致瘤论,如《疡科心得集》载:“瘤瘤者,非阴阳正气所结肿,乃五脏瘀血浊气痰滞而成。”方中药物温经活血以化痰,软坚散结以消痰,既绝生痰之源,又挫痰结之势,符合痰瘀同源、同治论之意。由于肿瘤形成是寒凝、毒结、血瘀相互缠绵胶结,造成久宕不愈而致转移。本方各药相伍,配合神妙,可使诸邪得以化解而有出路,消除致病、致变、致传之因,以达防治转移之功。

4.2 对肿瘤和肺组织的 VEGF 表达水平的影响

研究表明,肿瘤治疗之所以达不到满意的疗效,其原因在于肿瘤具有强大的生长、转移潜能,而肿瘤血管新生是恶性肿瘤生长和转移的前提之一。肿瘤的血管生成与多种生长因子的刺激有关,其中 VEGF 是重要的血管生长因子,其可诱导血管生成,维持肿瘤的继续生长,与诸多生理及病理过程有关。而实验证明多数实体肿瘤内有 VEGF 的异常高表达,是作用最强、特异性最高的促血管生长因子之一^[4]。因此,VEGF 作为抗肿瘤血管治疗的一个理想靶点,正日益受到人们的重视。

在以往研究中实显示^[1,2],加味保安方能够抑制小鼠肿瘤生长及肺转移,具有抑制鸡胚尿囊膜(CAM)血管生长的作用,为进一步探讨其机制,检测了移植瘤组织和载有转移灶的肺组织的 VEGF 表达,结果显示,加味保安方大、小剂量组对移植瘤的瘤组织以及带瘤肺组织的 VEGF 表达均有抑制作用,尤其是大剂量加味保安方对移植瘤组织的 VEGF 表达抑制作用更为明显。

通过实验研究初步显示,加味保安方抑制肿瘤转移作用与控制血行转移和抑制血管生成有关,但肿瘤转移是一个多步骤、复杂的过程,因此,其控制肿瘤转移的机制有待于进一步深入、细致的研究。

参考文献

- [1]李晓丽,姚成芳,王丽,等.加味保安方对 C57 小鼠移植肿瘤生长及肺转移的影响[J].山东中医药大学学报,2005,29(1):52~53
- [2]李晓丽,王世军.加味保安方对鸡胚尿囊膜血管新生的影响[J].中国微循环,2005,9(4):248~250
- [3]李晓丽,孙蓉,王平,等.加味保安方镇痛实验研究[J].山东中医药大学学报,2004,28(3):224~226
- [4]Dereanne CF,HajitonA,Calberg CM,et al.Angiogenesis by hbroblast growth factor 4 is mediated through an autocrin up-regulation of vascular endothelial growth factor expression[J].Cancer Res,1997,57(24):5 590~5 597

(收稿日期:2007-05-08)