

苦参碱对 C57BL/6J 小鼠 Lewis 肺癌 VEGF 表达的影响

郭斌¹, 申洪波², 彭宏伟³, 李智⁴ (1. 辽宁医学院附属第一医院, 辽宁 锦州 121000; 2. 辽宁医学院附属第二医院, 辽宁 锦州 121000; 3. 辽宁医学院, 辽宁 锦州 121000; 4. 中国医科大学天然药物研究室, 沈阳 110001)

摘要: 目的 研究苦参碱对小鼠 Lewis 肺癌的作用, 并探讨其作用机制。方法 建立小鼠 Lewis 肺癌模型, 将实验小鼠分为生理盐水组、不同剂量苦参碱组、环磷酰胺组, 计算原发瘤抑制率及微血管密度; 采用 RT-PCR 和 Western blot 法检测原发瘤组织 VEGF mRNA 和蛋白表达。结果 应用苦参碱各剂量组, 小鼠原发瘤抑制率、微血管密度与生理盐水组比较有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与生理盐水组比较, 苦参碱各剂量组 VEGF mRNA 和蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$)。结论 苦参碱对于小鼠 Lewis 肺癌原发瘤的生长具有一定的抑制作用, 并能显著抑制瘤组织微血管形成, 可能与其抑制肿瘤 VEGF mRNA 和蛋白表达有关。

关键词: 苦参碱; Lewis 肺癌; 血管内皮生长因子

中图分类号: R285.5; R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)01-0014-04

Effect of Matrine on VEGF mRNA and Protein Expression Levels of Lewis Lung Carcinoma in C57BL/6J Mouse

GUO Bin¹, SHEN Hongbo², PENG Hongwei³, LI Zhi⁴ (1. The First Hospital Affiliated to Liaoning Medical College, Jinzhou 121000, China; 2. The Second Hospital Affiliated to Liaoning Medical College, Jinzhou 121000, China; 3. Liaoning Medical College, Jinzhou 121000, China; 4. Department of Ethnopharmacology, China Medical University, Shenyang 110001,

基金项目: 辽宁省科技厅第二批药物源头创新研究课题(2006226031-217)

作者简介: 郭斌, 男, 博士, 副主任药师

Tel: (0416)4197079

E-mail: jyguobin@126.com

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of matrine on Lewis lung carcinoma in C57BL/6J mouse and to explore its molecular mechanism. **METHODS** The model of mouse with Lewis lung carcinoma was made, the experimental mice were randomly divided into normal saline group, matrine groups at varied concentrations and cytoxan group. Tumor inhibitory rate and microvessel density (MVD) were measured; the mRNA and protein expression of VEGF were determined with RT-PCR and Western blot. **RESULTS** There were significant differences from inhibitory rates of primary tumor and MVD between matrine groups and normal saline group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); VEGF mRNA and protein expression levels in matrine groups were significantly lower than in normal saline group. **CONCLUSION** Matrine could inhibit the growth of implanted Lewis lung carcinoma in C57BL/6J mouse at different levels and reduce MVD of Lewis lung carcinoma obviously, which was probably because that matrine reduced the expressions of VEGF mRNA and protein of Lewis lung carcinoma.

KEY WORDS: matrine; Lewis lung carcinoma; vascular endothelial growth factor

据《本草纲目》记载,苦参,苦、寒,无毒,具有清热解毒、祛风燥湿、补中明目、养肝胆气之功效。苦参碱(matrine)是从苦豆子中提取的生物碱,是苦参的活性成分,属于四环喹啉类。近年来苦参碱抗肿瘤作用的研究是药学领域的热门课题。一系列的研究证实,苦参碱可抑制部分肿瘤的增殖和转移,但其确切的抗肿瘤机制和临床疗效仍需进一步深入研究^[1]。

目前国内外肺癌研究多以临床为主,本试验结合动物模型,研究苦参碱对小鼠 Lewis 肺癌的作用,并进一步研究苦参碱对 Lewis 肺癌原发瘤组织血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)mRNA 和蛋白表达的影响,以探讨苦参碱治疗肿瘤的分子机制,为其进一步临床应用提供一定的实验依据。

1 材料

1.1 仪器

紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);TU-1800SPC 电泳仪(美国 EC 公司);EC570 PCR 仪(Beckman 公司)。

1.2 试剂

苦参碱,本室(辽宁医学院)于苦参干燥根中提纯,含量:98.3%,分子量:248.37;环磷酰胺(cytosan, CTX, 江苏恒瑞医药公司,批号:07041721);生理盐水(中国大冢制药有限公司,批号:071118);CD31, VEGF 单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);HRP-羊抗鼠 IgG(Santa Cruz 公司);Trizol 试剂、引物(上海生物工程技术服务有限公司);RT-PCR 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司];显色剂(Sigma 公司);其他试剂均为国产分析纯。

1.3 动物及瘤株

C57BL/6J 小鼠,清洁级,体重 18~22 g,由中

国医学科学院实验动物研究所提供,实验动物合格证号:SCXK(京)2004-0001;瘤株:小鼠 Lewis 肺癌细胞株(Lewis lung carcinoma, 3LL),由中国医学科学院药物研究所提供。

2 方法

2.1 小鼠 Lewis 肺癌模型复制及分组

将接种 Lewis 肺癌 10~14 d 的 C57BL/6J 荷瘤小鼠,脱颈椎处死,无菌冰浴条件下剥离瘤组织,选取生长良好的肿块,按肿瘤(g):生理盐水(mL)为 1:3 比例匀浆,筛网过滤,调细胞数为 1×10^7 ,作为诱导小鼠 Lewis 肺癌模型的匀浆液。另取 C57BL/6J 小鼠(18~22 g)50 只,♀♂ 各半,随机分为 5 组:生理盐水组、苦参碱高剂量组(matrine H, 150 mg·kg⁻¹)、苦参碱中剂量组(matrine M, 100 mg·kg⁻¹)、苦参碱低剂量组(matrine L, 50 mg·kg⁻¹)、CTX 组(20 mg·kg⁻¹)。各组小鼠于右腋下接种匀浆液,每只 0.2 mL。各组接种后第 2 天开始腹腔注射给药,各组隔日腹腔给药一次,连续 21 d。第 21 天,称重后脱颈椎处死各组小鼠,取右腋下肿块并称质量,根据以下公式计算肿瘤抑制率:

肿瘤抑制率(%)=(生理盐水组平均瘤质量-治疗组平均瘤质量)/生理盐水组平均瘤质量×100%。

2.2 苦参碱对 Lewis 肺癌组织微血管密度的影响

取部分肿瘤组织,10%中性甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋后连续切片,CD31 抗体为 I 抗,阴性对照用磷酸盐缓冲液(PBS)代替 I 抗,按照试剂盒说明书进行 SABC 法免疫组化染色。CD31 阳性内皮细胞被染成棕黄色,计数时以血管密集区为准,避免硬化区和坏死区,切片中任何与周围组织明确区分的棕染内皮细胞及细胞团均按独立的微血管分别计数,是否有管腔、红细胞不作为计数血管标志。显微镜下计数 6 个视野内肿瘤微血管数目,以平均每高倍镜(×200)下视野微血管个数表示微

血管密度(microvessel density, MVD)^[2]结果。

2.3 苦参碱对 Lewis 肺癌组织 VEGF mRNA 表达的影响

采用 Trizol 一步法提取瘤组织总 RNA, 提取的 RNA 经紫外分光光度计测量 260 nm 和 280 nm 吸光度(A)值, 由 260 nm 吸光度计算出 RNA 浓度。按照 RT-PCR 试剂盒(AMV)说明进行 PCR 扩增。RT-PCR VEGF 引物为: 5'-AGACAATGGGATGA AAGG-3'(sense), 5'-AGATGAGGAAGGGTAAG C-3'(antisense), 扩增片段大小为 554 bp; β -actin 引物为: 5'-CCCATCTACGAGGGCTAT-3'(sense), 5'-TGTCACGCACGATTTC-3'(antisense), 扩增片段大小为 145 bp。反转录反应参数设置如下: 42 °C, 30 min, 99 °C, 5 min; 然后进行 30 个周期的 PCR 扩增反应, PCR 扩增反应参数设置如下: 94 °C, 2 min 预变性 1 个循环, 每个周期为 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min。取 PCR 产物置于 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙锭染色, 电泳条带经电泳图象分析扫描仪扫描, 得到 VEGF 与 β -actin 条带的各自峰面积积分值, 以 VEGF 与 β -actin 比值作为 VEGF 表达参数, 对 VEGF PCR 产物相对定量。

2.4 苦参碱对 Lewis 肺癌组织 VEGF 蛋白表达的影响

将各组 Lewis 肺癌原发瘤组织粉碎研磨成匀浆, 按分子克隆实验指南^[3]方法提取总蛋白, 加碱性铜测吸光度定量蛋白, 并统一调整样品液蛋白浓度为 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 取 20 μL 样品液作 SDS-PAGE 电泳后转膜, 脱脂奶粉封闭过夜, 一抗(抗体稀释浓度为 1:200)孵育 3 h, 二抗(抗体稀释浓度为 1:2000)孵育 3 h, 显色剂显色, 以条带的大小和深浅判定 VEGF 蛋白的表达量并以凝胶成像图象分析软件处理, 测定每条条带的整合密度值(IDV), 并求得与 β -actin 组整合密度值的比值即相对灰度值。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件统计包, 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 样本均数比较采用方差分析(F 检验)。

3 结果

3.1 苦参碱对 Lewis 肺癌小鼠瘤重、抑瘤率及 MVD 的影响

用药 21 d 后, 与生理盐水组比较, 应用苦参碱各剂量组小鼠体重无明显变化。苦参碱各剂量组瘤重均显著低于生理盐水组($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 高、中、低剂量组小鼠原发瘤抑制率分别为 39.44%, 22.65%, 11.45%。镜下结果和统计分析表明, 与生理盐水组比较, 苦参碱各剂量组 Lewis 肺癌瘤组织 MVD 明显减小, 差异非常显著($P<0.01$)。结果见表 1。

表 1 苦参碱对荷 Lewis 肺癌小鼠体重、瘤重、抑瘤率及 MVD 的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of matrine on the weight, weight of tumor, inhibitory rate of tumor and MVD in mice with Lewis lung carcinoma($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	n	体重变化/g	瘤重/g	抑瘤率/%	MVD
生理盐水组	—	9	2.89 $\pm$ 1.47	3.93 $\pm$ 0.57	—	39.96 $\pm$ 2.27
matrine H 组	150	10	2.56 $\pm$ 1.85	2.38 $\pm$ 0.51 ²⁾	39.44	20.13 $\pm$ 1.84 ²⁾
matrine M 组	100	10	3.03 $\pm$ 2.12	3.04 $\pm$ 0.49 ²⁾	22.65	26.12 $\pm$ 2.45 ²⁾
matrine L 组	50	9	2.77 $\pm$ 1.63	3.48 $\pm$ 0.56 ¹⁾	11.45	29.37 $\pm$ 3.77 ²⁾
CTX 组	20	9	-1.55 $\pm$ 1.38 ²⁾	1.54 $\pm$ 0.42 ²⁾	60.81	29.98 $\pm$ 2.34 ²⁾

注: 与生理盐水组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with normal saline group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3.2 苦参碱对 Lewis 肺癌原发瘤组织 VEGF mRNA 和蛋白表达的影响

RT-PCR 实验结果表明, 与生理盐水组比较, 苦参碱各剂量组荧光强度逐渐降低。各用药组 VEGF 灰度与 β -actin 内参灰度比值较生理盐水组明显减少, 差异显著。Western blot 实验结果表明, 随着苦参碱各剂量组浓度增高, 蛋白条带

逐渐变浅, 结果见表 2、图 1 和图 2。上述结果说明苦参碱下调 Lewis 肺癌瘤组织 VEGF mRNA 和蛋白表达。

4 讨论

肺癌是一种恶性程度较高的肿瘤, 严重威胁着人类的健康。以往的研究表明^[2,4]: 苦参碱能抑制人肺癌 SPC-A-1 细胞的生长和人肺癌 A549 细

表 2 苦参碱对 Lewis 肺癌原发瘤组织 VEGF mRNA 和蛋白表达的影响($n=9$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of matrine on VEGF mRNA and protein expressions of Lewis lung carcinoma($n=9$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	VEGF mRNA	VEGF 蛋白
生理盐水组	—	1.13 ± 0.07	1.73 ± 0.03
matrine H 组	150	$0.65 \pm 0.04^{1)}$	$0.87 \pm 0.02^{1)}$
matrine M 组	100	$0.79 \pm 0.02^{1)}$	$1.19 \pm 0.02^{1)}$
matrine L 组	50	$0.88 \pm 0.02^{1)}$	$1.28 \pm 0.04^{1)}$
CTX 组	20	$0.59 \pm 0.03^{1)}$	$0.97 \pm 0.05^{1)}$

注: 与生理盐水组比较, $^{1)}P < 0.01$

Note: Compared with normal saline group, $^{1)}P < 0.01$.

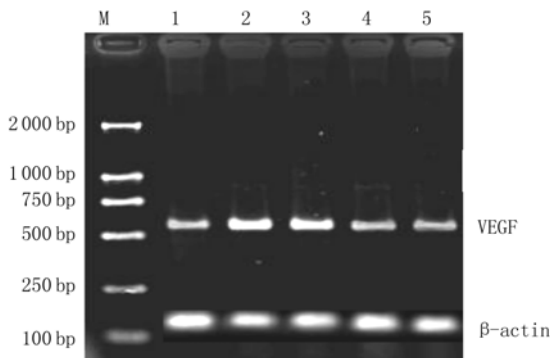


图 1 苦参碱对 Lewis 肺癌原发瘤组织 VEGF mRNA 表达的影响

M-标记; 1-CTX 组; 2-生理盐水组; 3-matrine L 组; 4-matrine M 组; 5-matrine H 组

Fig 1 Effect of matrine on VEGF mRNA expression in mice with Lewis lung carcinoma

M-marker; 1-CTX group; 2-normal saline group; 3-matrine L group; 4-matrine M group; 5-matrine H group

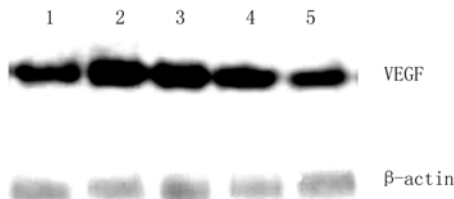


图 2 苦参碱对 Lewis 肺癌原发瘤组织 VEGF 蛋白表达的影响

1-CTX 组; 2-生理盐水组; 3-matrine L 组; 4-matrine M 组; 5-matrine H 组

Fig 2 Effect of matrine on VEGF protein expression in mice with Lewis lung carcinoma

1-CTX group; 2-normal saline group; 3-matrine L group; 4-matrine M group; 5-matrine H group

胞的增殖, 呈浓度依赖性, 但仅局限于体外研究。本试验结合动物模型, 进一步研究苦参碱抗肿瘤机制, 为苦参碱的临床应用提供一定的理论依据。研究结果表明, 应用苦参碱可使 Lewis 肺癌的 C57 小鼠原发瘤抑瘤率增加, 且具有剂量依赖性, 在体内的抑瘤效果虽没有阳性对照化疗药 CTX 好, 但与生理盐水组比较差异仍具有统计学意义。

目前, 抗血管生成和肿瘤治疗的研究已成为肿瘤治疗中的重要治疗手段之一, 给肺癌有效治疗带来曙光。抗血管生成治疗重要的作用靶点就是针对与肿瘤血管生成过程中相关环节, 将血管生成过程中的相关因子进行抑制, 从而达到抑制肿瘤增殖的目的。在诸多的抗血管生成治疗靶标中, 以针对 VEGF 及 VEGFR 的治疗最为引人关注。这是因为 VEGF 及 VEGFR 在血管生成中的作用最为重要, 同时两者在许多肿瘤细胞及肿瘤血管内皮细胞中均有高表达。因此, 是抗血管生成的相对最为理想的靶点^[4]。

检测肿瘤 MVD, 定量肿瘤血管, 能反映肿瘤血管生成情况, 且可预测肿瘤转移、复发和预后^[5]。本试验结果表明, 苦参碱的各剂量组 MVD 均明显低于对照组, 表明苦参碱在一定程度上能抑制 Lewis 肺癌的微血管形成。进一步的研究表明, 苦参碱下调了 Lewis 肺癌原发瘤组织 VEGF mRNA 和蛋白表达, 可能是其抑制肿瘤的生长的机制之一。

REFERENCES

- [1] WANG L, LI Q L. Summary of research on anticancer mechanism of constituent matrine [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2009, 13(4): 360-363.
- [2] WEIDNER N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors [J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36(2): 169-180.
- [3] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T, Translated by JIN D Y, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子克隆实验指南) [M]. Beijing: Science Press, 1996: 881-887.
- [4] LI H J, XIA H B. Regulation of tumor angiogenesis and tumor therapy [J]. J Mod Oncol(现代肿瘤学), 2008, 16(7): 1245-1248.
- [5] TANAKA F, OYANAGI H, TAKENAKA K, et al. Glomeruloid microvascular proliferation is superior to intratumoral microvessel density as a prognostic marker in non-small cell lung cancer [J]. Cancer Res, 2003, 63(20): 6791-6794.

收稿日期: 2010-05-20