文章编号:1000-5404(2005)11-1071-03

论著

姜黄素Ⅲ和顺铂联用抑制A549裸小鼠移植瘤生长作用研究

唐春兰,杨和平,李剑明,宫 亮,胡建林 (第三军医大学西南医院呼吸内科,重庆 400038)

提 要: 目的 观察中药姜黄的主要活性单体成分双脱甲氧基姜黄素(姜黄素Ⅲ)和顺铂联用对抑制人肺腺癌细胞系A549裸小鼠移植瘤生长有无增效作用。**方法** 将20只荷人A549肺腺癌的裸小鼠随机分成4组:①阴性对照组;②姜黄素Ⅲ组(100 mg/kg, 隔日1次×8次);③顺铂组(5 mg/kg, 每周2次×4次);④联合用药组(姜黄素Ⅲ100 mg/kg, 隔日1次×8次+顺铂5 mg/kg, 每周2次×4次)分别测量瘤质量、瘤体积和微血管密度,并观察各组移植瘤组织的病理形态结构。**结果** 4个组瘤质量分别为(1.15±0.18)、(0.57±0.10)、(0.49±0.08)、(0.24±0.05)g;瘤体积分别为(1 413.4±266.33)、(699.40±118.03)、(590.88±114.05)、(354.72±123.72)mm^3。统计学分析表明:在瘤质量及瘤体积方面,姜黄素Ⅲ组、顺铂组和阴性对照组比较差异具有显著性($P<0.01$),联合用药组和其他3组比较均有显著性差异($P<0.01$)。**结论** 姜黄素Ⅲ、顺铂对A549裸小鼠移植瘤生长都有明显的抑制作用;姜黄素Ⅲ和顺铂联用能起增效作用。

关键词: 姜黄素Ⅲ;顺铂;肺腺癌细胞;移植瘤;血管生成
中图法分类号: R364.3; R734.2; R979.1 **文献标识码**: A

Combined application of curcumin Ⅲ and cisplatin inhibits A549 xenografted tumors in nude mice

TANG Chun-lan, YANG He-ping, LI Jian-ming, GONG Liang, HU Jian-lin (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study whether curcumin Ⅲ could potentiate the anti-tumor effect of cisplatin on xenografted tumor growth of human lung adenocarcinoma cell line A549 in nude mice. **Methods** Twenty nude mice bearing human lung adenocarcinoma A549 xenografted tumor were randomly divided into 4 groups ($n=5$ in each group): control group (0.2 ml mixture of 6% dehydrated alcohol and 6% macrogol 400, intraperitoneal injection once every other day, 8 times), curcumin Ⅲ group (100 mg/kg, intraperitoneal injection once every other day, 8 times), cisplatin group (5 mg/kg, intraperitoneal injection twice a week, 4 times), the combination group of curcumin Ⅲ and cisplatin (the dose of curcumin Ⅲ and cisplatin was the same with that of curcumin Ⅲ group and cisplatin group, respectively). **Results** The mean tumor weights of 4 groups were (1.15±0.18), (0.57±0.10), (0.49±0.08), (0.24±0.05) g, respectively and the mean tumor volumes (1 413.4±266.33), (699.40±118.03), (590.88±114.05), and (354.72±123.72) mm^3, respectively. The difference in the tumor weight and volume between the control and curcumin Ⅲ group as well as the control and cisplatin group were both significant ($P<0.01$). The tumor weight and volume of the combination group were significantly different from those of other 3 groups ($P<0.01$). **Conclusion** Curcumin Ⅲ and cisplatin can significantly inhibit tumor growth in nude mice bearing human lung adenocarcinoma cell line A549 and their combination can produce a synergistic action.

Key words: curcumin Ⅲ; cisplatin; lung adenocarcinoma cell; xenografted tumour; angiogenesis

姜黄色素是姜黄属药用植物中的多酚性色素成分,主要含有3种主要成分:姜黄素Ⅰ(77%);姜黄素Ⅱ,即脱甲氧基姜黄素(17%);姜黄素Ⅲ,即双脱甲氧基姜黄素(3%),具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化和降血脂等作用[1]。初步研究表明,姜黄色素具有抗血管生成作用[2,3],同时研究表明,3种姜黄色素单体的抗肿瘤活性包括对内皮细胞生长的抑制作用有明显差异,其中以姜黄素Ⅲ的生物活性最强[4,5]。我们在动物实验中已经发现:姜黄素Ⅲ在体内具有明确的抑制A549裸小

作者简介:唐春兰(1973-),女,四川省华莹市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事肺癌诊断及治疗方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68765679
通讯作者:杨和平,电话:(023)68754121
收稿日期:2004-12-20;修回日期:2005-03-25

鼠移植瘤生长及其血管生成作用[6]。本研究利用裸小鼠荷人A549肺腺癌动物模型，研究姜黄素Ⅲ与顺铂联用对抑制人肺腺癌细胞系A549裸小鼠移植瘤生长有无增效作用。

1 材料与方法

1.1 药物提取及配制

本实验用姜黄素Ⅲ单体采用醇渗石油醚脱脂、硅胶G柱层析、丙酮纯化方法及途径从中药姜黄中提取而成[6]。获取的姜黄素Ⅲ单体采用^{60}Co照射消毒，按文献[7]方法，将其溶解于含6%(体积分数)无水乙醇和6%(体积分数)聚乙二醇400的水溶液中，现配现用。阴性对照药中只含等量的溶剂。顺铂购自华北制药股份有限公司，采用同样方法配置。

1.2 建立裸小鼠移植瘤模型

将已培养好基本长满瓶壁的A549肺腺癌细胞弃培养瓶内培养基，用PBS液冲洗培养瓶2次，加入0.25%胰蛋白酶数滴消化，将消化好的细胞吸入离心管内，600 r/min离心6 min，弃上清，加入不含小牛血清的RPMI1640培养基3 ml，吸管吹打混匀(取适量计数细胞)，再离心(600 r/min，6 min)，弃上清，按每只裸小鼠皮下接种细胞数5×10^6/0.2 ml，即2.5×10^7/ml再加入无血清RPMI1640培养基，供裸小鼠皮下接种用。准备好的A549细胞悬液经台盼蓝染色活细胞数>95%，按每只0.2 ml A549细胞悬液注射于消毒后的裸小鼠皮下，观察肿瘤移植成功率。

1.3 实验分组

实验动物为BALB/c裸小鼠共20只，6~8周，雄性，体质量19~23 g，购自中国科学院上海实验动物中心，SPF实验室饲养。20只荷瘤裸小鼠随机分成4组，每组5只。接种A549细胞后第15天开始用药，此时移植瘤大小约65 mm^3，各组之间无显著差异。每次用药前称裸小鼠体质量。各组用药情况如下：①阴性对照组：含6%(体积分数)无水乙醇和6%(体积分数)聚乙二醇400的水溶液，0.2 ml/次，隔日腹腔注射1次，共8次。②姜黄素Ⅲ组：姜黄素Ⅲ 100 mg/kg，0.2 ml/次，隔日腹腔注射1次，共8次。③顺铂组：顺铂5 mg/kg，0.2 ml/次，每周腹腔注射2次，共4次。④联合用药组：姜黄素Ⅲ 100 mg/kg，0.2 ml/次，隔日腹腔注射1次，共8次+顺铂5 mg/kg，0.2 ml/次，每周腹腔注射2次，共4次。

1.4 皮下肿瘤生长治疗实验

用药前测量移植瘤体积，实验结束时测量移植瘤重量及体积。同时于用药前及治疗结束时称裸鼠体质量(鼠质量=带瘤鼠质量-瘤质量)。

按下列公式[8]计算移植瘤体积T：$T=0.52\times长\times宽^2$

按下列公式[9]计算抑瘤率及q值：

抑瘤率=1-(ET/EC)×100%

(EC为对照组平均瘤质量，ET为治疗组平均瘤质量)

q值$=E_{(A+B)}/E_A+E_B(1-E_A)$

[E_A、E_B、$E_{(A+B)}$分别为Cur Ⅲ组、Cis组及Cur Ⅲ+Cis组抑瘤率]

根据q值判断联合用药的疗效，若<0.85为拮抗，若0.85~1.15为相加，若>1.15为协同。

1.5 染色

皮下移植瘤标本分别行HE染色和鼠抗人CD34单克隆抗体免疫组化染色分析。参照Weidner等[10]报道的方法计数微血管密度(MVD)。

1.6 统计学处理

以SPSS 11.0软件对计量资料进行t检验，对计数资料进行χ^2检验。

2 结果

2.1 裸小鼠体内成瘤情况

自接种后第3天，可见接种部位小结节，约5 mm×5 mm大小，但随后结节逐渐缩小，至第9天，仅约2 mm×2 mm大小。自第10天开始，结节稳定增长，2周时达5 mm×5 mm大小。20只裸小鼠全部成瘤，成瘤率达100%。

2.2 移植瘤组织的病理形态学观察

实验结束后，进行移植瘤组织病理学检查，镜下均可见癌组织，癌细胞圆形或椭圆形，核大，核仁明显，胞浆微呈透明稍嗜碱，细胞大小不等，癌细胞被纤维组织分隔成大小不等的癌巢，其中可见腺管、腺腔样结构。

2.3 各组平均瘤质量及瘤块体积

从平均瘤质量及瘤块体积来看，用药组瘤质量及瘤块体积明显低于阴性对照组($P<0.01$)，联合用药组和其他3组比较均有显著性差异($P<0.01$)，姜黄素Ⅲ的抑瘤率为50.43%(表1)。

表1 各组平均瘤质量及瘤块体积($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The mean volume and weight of xenografted tumor in each group ($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Weight(m/g)	Volume(V/mm^3)	Tumor control rate(%)	q
Control	$1.15\pm0.18^{▲}$	$1413.40\pm266.33^{▲}$	-	-
Cur Ⅲ	$0.57\pm0.10^{△▲}$	$699.40\pm118.03^{△▲}$	50.43	-
Cis	$0.49\pm0.08^{△▲}$	$590.88\pm114.05^{△▲}$	57.39	-
Cur Ⅲ+Cis	$0.24\pm0.05^{△}$	$354.72\pm123.72^{△}$	79.13	1.00

△: $P<0.01$, *vs* control; ▲: $P<0.01$, *vs* Cur Ⅲ+Cis

2.4 各组移植瘤MVD测定结果

CD34免疫组化染色结果表明，移植瘤肿瘤组织内可见形态不规则、且无明显管腔形成的新生血管，血管分布以肿瘤组织边缘处多见。阴性对照组、顺铂组移植瘤中MVD分别为(76.67 ± 10.48)、(72.40 ± 11.43)，显著高于姜黄素Ⅲ组[MVD为(40.13 ± 7.05)]及姜黄素Ⅲ+顺铂组[MVD为(39.60 ± 9.71)]，差异非常显著($P<0.01$)；顺铂组与阴性对照组移植瘤中MVD相比、姜黄素Ⅲ组与姜黄素Ⅲ+顺铂组移植瘤中MVD相比无显著差异($P>0.05$)。

2.5 各组副作用比较

整个治疗过程中，未发现裸鼠有明显的惊恐、不安或拒食现象，各组裸鼠活动良好，除顺铂组(Cis组)及顺铂+姜黄素Ⅲ组(Cur Ⅲ+Cis组)裸鼠体质量有轻度下降(考虑为顺铂的毒副作用)外，其余各组裸鼠体质量无下降。表2显示了各组治疗前后裸鼠体质量的变化，经统计学分析，各组之间差异均无显著性($P>0.05$)。

表 2　各组治疗前后裸鼠体质量的变化（m/g，$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2　Change of nude mice weight in each group before and after treatment（m/g，$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

Group	Before treatment	After treamtent
Control	21.87 ± 1.13	22.48 ± 1.48
CurⅢ	22.41 ± 1.04	20.98 ± 1.37
Cis	22.19 ± 1.41	21.44 ± 1.18
CurⅢ + Cis	23.72 ± 1.58	20.06 ± 1.56

3　讨论

肿瘤生长及转移与肿瘤血管生成密切相关，抑制肿瘤血管的新生，切断肿瘤生长和转移所依赖的血管生成已成为当前抗肿瘤尤其是耐药肿瘤治疗的重要策略。作为一种具有良好发展前景的抗癌活性物质，姜黄色素在肿瘤预防和治疗方面的作用已引起了国内外学者的广泛关注，成为研究的热点。研究表明，姜黄色素可影响肿瘤发生、发展的各个阶段（始发、促进和演进），抗肿瘤血管生成可能为其机制之一[2,3,6]。

综合治疗是目前肿瘤治疗的基本原则。化疗与抗血管生成治疗联合治疗肿瘤已成为目前研究的热点，二者联合应用不仅可提高疗效，而且可防治肿瘤多药耐药现象的发生。Yamaoka 等[11]研究发现，TNP-470 和顺铂联用能增强对前列腺癌的抑制作用。国内夏景林等[9]发现 TNP-470 和丝裂霉素联用能增强对肝癌生长的抑制作用。Anuchapreeda 等[12]报道姜黄色素能降低多药耐药人子宫颈癌细胞（KB-V1 细胞）表面与多药耐药相关的 P-糖蛋白及 MDR1 mRNA 的表达。由于顺铂是常用的化疗药，并且目前肺癌化疗基本上都是以铂类尤其是顺铂为基础的联合化疗方案，因此，本实验观察了姜黄素Ⅲ与顺铂联合用药的抗肿瘤效果。结果表明，姜黄素Ⅲ及顺铂均具有较好的抗人肺腺癌细胞系 A549 裸鼠移植瘤生长作用，移植瘤质量及体积显著低于阴性对照组（$P<0.01$）。但是顺铂对移植瘤的肿瘤血管生成无明显抑制作用，微血管密度与阴性对照组相比无显著性差异。这说明顺铂的抗肿瘤作用与抑制肿瘤的血管生成作用无关。本实验还显示，姜黄素Ⅲ和顺铂联合应用能显著抑制人肺腺癌细胞系 A549 裸鼠移植瘤的生长，裸鼠移植瘤体积及瘤质量均显著低于姜黄素Ⅲ及顺铂单药治疗组（$P<0.01$），q 值为 1.00，这表明姜黄素Ⅲ和顺铂联用抗肿瘤具有相加作用，其机制可能为：①姜黄素Ⅲ引起的血管生成抑制造成远离已生成血管的肿瘤细胞的死亡，从而缩小了肿瘤体积，这就使顺铂更易于到达整个肿瘤组织；②顺铂直接杀伤或抑制肿瘤细胞。另外，最近有资料显示，姜黄色素可通过增加化疗药物对癌细胞的敏感性而增强抗癌作用[12~14]。在本实验的整个过程中，联合用药组裸鼠活动情况良好，与姜黄素Ⅲ及顺铂单药治疗组相比裸鼠体重均无明显改变。这表明联合用药不仅增加了疗效，而且未增加药物的毒副作用。

参考文献：

[1] 顾　军，韩　香，顾　欣. 姜黄素的基础药理作用[J]. 天津药学，2000，12(2)：5－6.

[2] Park M J，Kim E H，Park I C，*et al*. Curcumin inhibits cell cycle progression of immortalized human umbilical vein endothelial（ECV304）cells by up-regulating cyclin-dependent kinase inhibitor，p21WAF1/CIP1，p27KIP1 and p53[J]. Int J Oncol，2002，21(2)：379－383.

[3] Gururaj A E，Belakavadi M，Venkatesh D A，*et al*. Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin[J]. Biochem Biophys Res Commun，2002，297(4)：934－942.

[4] 李剑明，杨和平，刘松青. 3 种姜黄色素单体抑制人内皮细胞作用的实验研究[J]. 重庆医学，2002，31(9)：804－805.

[5] Ramsewak R S，DeWitt D L，Nair M G. Cytotoxicity，antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins Ⅰ-Ⅲ from Curcuma longa[J]. Phytomedicine，2000，7(4)：303－308.

[6] 唐春兰，杨和平，李剑明，等. 姜黄素Ⅲ抑制 A549 裸小鼠移植瘤生长及其血管生成的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(21)：1950－1953.

[7] 石　晶，顾军，邓心新，等. 姜黄素对大鼠心肌缺血性损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报，1998，14(2)：145－147.

[8] Hahnfeldt P，Panigrahy D，Folkman J，*et al*. Tumor development under angiogenic signaling：a dynamical theory of tumor growth，treatment response，and postvascular dormancy[J]. Cancer Res，1999，59(19)：4770－4775.

[9] 夏景林，杨秉辉，叶胜龙，等. TNP-470 和丝裂霉素联用对肝癌生长和转移抑制作用的实验研究[J]. 癌症，2000，19(4)：341－343.

[10] Weidner N，Semple J P，Welch W R，*et al*. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma[J]. N Engl J Med，1991，324(1)：1－8.

[11] Yamaoka M，Yamamoto T，Ikeyama S，*et al*. Angiogenesis inhibitor TNP-470（AGM-1470）potently inhibits the tumor growth of hormone-independent human breast and prostate carcinoma cell lines[J]. Cancer Res，1993，53(21)：5233－5236.

[12] Anuchapreeda S，Leechanachai P，Smith M M，*et al*. Modulation of P-glycoprotein expression and function by curcumin in multidrug-resistant human KB cells[J]. Biochem Pharmacol，2002，64(4)：573－582.

[13] Chan M M，Fong D，Soprano K J，*et al*. Inhibition of growth and sensitization to cisplatin-mediated killing of ovarian cancer cells by polyphenolic chemopreventive agents[J]. J Cell Physiol，2003，194(1)：63－70.

[14] Hour T C，Chen J，Huang C Y，*et al*. Curcumin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic agents in prostate cancer cells by inducing p21（WAF1/CIP1）and C/EBPbeta expressions and suppressing NF-KappaB activation [J]. Prostate，2002，51(3)：211－218.

（编辑　汪勤俭）