文章编号:1000-5404(2005)09-0831-03

论著

姜黄素Ⅲ对 A549 裸鼠移植瘤 VEGF 蛋白表达的影响

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 研究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)抗肿瘤血管生成作用的可能机制。**方法** 将 15 只荷人 A549 肺腺癌的裸小鼠随机分成 3 个组:①阴性对照组;②TNP-470 组(30 mg/kg,隔日注射 1 次,共 8 次);③姜黄素Ⅲ组(100 mg/kg,隔日注射 1 次,共 8 次)。治疗结束后取移植瘤组织及荷瘤鼠血清,免疫组化染色检测移植瘤组织中 VEGF 的表达,ELISA 检测血清中 VEGF 的含量。**结果** 姜黄素Ⅲ组 VEGF 表达的阳性组织 RGV 值为 1.63 ± 0.13,血清中 VEGF 含量为(65.18 ± 11.62)pg/ml,显著低于阴性对照组[2.49 ± 0.15,(100.52 ± 13.17) pg/ml, $P < 0.01$]。**结论** 姜黄素Ⅲ抗人肺腺癌细胞系 A549 裸鼠移植瘤血管生成作用的机制可能与其抑制移植瘤中肿瘤细胞 VEGF 的表达有关。

关键词: 姜黄素Ⅲ;肺腺癌细胞;移植瘤;血管生成
中图法分类号: R282.71; R73-36; R734.2 **文献标识码**: A

Inhibition effects of curcumin Ⅲ on VEGF expression of human lung adenocarcinoma A549 xenografted tumor 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 the possible anti-angiogenic mechanisms of curcumin Ⅲ *in vivo*. **Methods** Fifteen nude mice bearing human lung adenocarcinoma A549 xenografted tumor were randomly divided into 3 groups ($n = 5$ in each group): control group; TNP-470 group (30 mg/kg, intra-abdominal injection every other day, 8 times); curcumin Ⅲ group (100 mg/kg, intra-abdominal injection every other day, 8 times). The expression of VEGF in tumor tissues and in serum of each group was detected by immunohistochemistry and ELISA, respectively. **Results** The expression of VEGF in tumor tissues and in serum of curcumin Ⅲ group was lower than that of control group. The difference between curcumin Ⅲ and control groups was significant ($P < 0.01$), but did not differ from that of TNP-470 group. **Conclusion** The possible mechanisms involved in the suppression of angiogenesis of curcumin Ⅲ may be related to down-regulation of VEGF in tumor cells.

Key words: curcumin Ⅲ; lung adenocarcinoma cell; angiogenesis; xenografted tumor

肺癌系世界上发病率最高的恶性肿瘤之一,侵袭和转移是其最本质的生物学特征,也是导致肺癌患者死亡的根本原因。而相应血管的新生是恶性肿瘤生长和转移的先决条件。因此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[1,2]。

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。初步研究表明,姜黄色素具有抗血管生成作用[3,4],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[5,6],但由于姜黄素Ⅲ含量较少,不易分离及提纯,目前对姜黄色素的研究绝大多数是以姜黄色素的混合物或其中的姜黄素Ⅰ为对象。我们采用自行分离提纯的姜黄素Ⅲ,在动物实验中发现姜黄素Ⅲ在体内具有明确的抑制 A549 裸小鼠移植瘤生长及血管生成作用[7]。为进一步探讨其抗血管生成作用的可能机制,本实验利用裸小鼠荷人 A549 肺腺癌动物模型,研究姜黄素Ⅲ对 VEGF 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物为 BALB/c 裸小鼠,6 ~ 8 周龄,雄性,体质量 19 ~

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 9 篇。电话:(023)68765679
通讯作者:杨和平,电话:(023)68754121
收稿日期:2005-03-01;修回日期:2005-04-08

23 g,购自中国科学院上海实验动物中心,SPF 实验室饲养。本实验中姜黄素Ⅲ单体由作者采用醇渗石油醚脱脂、硅胶 G 柱层析、丙酮纯化方法从中药姜黄中提取而成[7]。获取的姜黄素Ⅲ单体采用 ^{60}Co 照射消毒,按文献[8]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。阳性对照药 TNP-470(由日本 TAKEDA 公司药物研究部 HIROSHI FUKUI 先生惠赠)采用同样方法配制。阴性对照药中只含等量的溶剂。兔抗人 VEGF 多克隆抗体购自 Santa Cruz,VEGF ELISA 检测试剂盒购自晶美生物工程有限公司。

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 细胞悬液经苔盼蓝染色活细胞数 > 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

15 只荷瘤裸小鼠随机分成 3 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;②TNP-470 组:TNP-470 30 mg/kg,0.2 ml/次,隔日腹腔注射 1 次,共 8 次;③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。

1.4 VEGF 表达检测

皮下移植瘤标本分别行 HE 染色和 VEGF 免疫组化染色分析;利用 VEGF ELISA 检测试剂盒检测各实验组血清中 VEGF 的含量。

1.5 VEGF 表达的半定量分析(免疫组化)

将染色结果用 MIG 2000 图像分析软件进行分析。各组 5 个标本各 1 张切片,在 10×20 倍视野下随机选择背景和阳性组织区域各 5 处,测其灰度值并取均值,计算阳性组织相对灰度值(阳性组织灰度值/背景灰度值,relative grey value, RGV),并统计分析。

1.6 统计学方法

以 SPSS 11.0 软件对计量资料进行 t 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。15 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

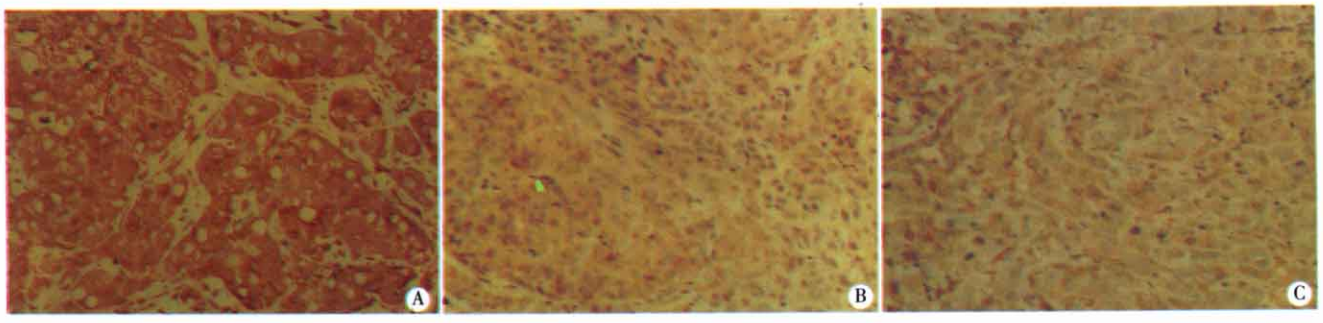
实验结束后,进行移植瘤组织病理学检查,镜下均可见癌组织。癌细胞圆形或椭圆形,核大,核仁明显,胞浆微呈透明、稍嗜碱,细胞大小不等,癌细胞被纤维组织分隔成大小不等的癌巢,其中可见腺管、腺腔样结构。

2.3 各组移植瘤组织中 VEGF 的表达

VEGF 呈棕黄色细颗粒状,定位于肿瘤细胞及部分成纤维细胞胞质内。阴性对照组 VEGF 阳性组织相对灰度值(RGV)为 2.49±0.15,显著高于 TNP-470 组、姜黄素Ⅲ组,差异非常显著(分别为 1.57±0.09、1.63±0.13,$P<0.01$);姜黄素Ⅲ组与 TNP-470 组相比 VEGF 的 RGV 无显著差异($P>0.05$)(图 1)。

2.4 各实验组裸小鼠血清中 VEGF 的含量

阴性对照组 VEGF 含量为(100.52±13.17) pg/ml,显著高于 TNP-470 组、姜黄素Ⅲ组,差异非常显著[分别为(58.30±9.30) pg/ml、(65.18±11.62) pg/ml,$P<0.01$];姜黄素Ⅲ组与 TNP-470 组 VEGF 含量相比无显著差异($P>0.05$)。



A: Control group; B: TNP-470 group; C: Curcumin Ⅲ group

图 1 VEGF 定位于肿瘤细胞胞质,阴性对照组呈强阳性表达,TNP-470 组、姜黄素Ⅲ组呈弱阳性表达 (S-P×200)

Fig 1 Positive staining of VEGF in the cytoplasm of cancer cells. The expression of VEGF in control group was higher than that in TNP-470 and curcumin Ⅲ groups (S-P×200)

3　讨论

肿瘤生长及转移与肿瘤血管生成密切相关，新生血管为肿瘤组织提供充足的养分，同时发育不完善的微血管也为肿瘤细胞进入循环转移扩散提供便利。当前，抗肿瘤血管生成已经成为众多治疗恶性肿瘤策略中新的靶点。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。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[3,4,7]。

众所周知，实体瘤生长需严格依赖血管新生。血管新生在体内受到一系列因子调节，其中以血管内皮生长因子（VEGF）最为重要，它是肿瘤扩增和维持血管功能的关键因子。一方面它能诱导内皮细胞增殖、迁徙甚至改变其基因表达；另一方面它能增加微血管的通透性，使许多血浆蛋白渗出血管外，这对改变局部的细胞外基质以适应血管生成具有重要作用。VEGF通过受体来发挥其生物学作用。早期研究表明，VEGF通过特异地作用于内皮细胞上的受体而发挥作用，即通过旁分泌途径诱导血管生成，促进肿瘤生长。而最近研究表明，VEGF可通过自分泌途径促进肿瘤（细胞）的生长[9]，进而增加VEGF的分泌，加强其诱导肿瘤血管新生的旁分泌作用。进一步研究显示，VEGF受体并非特异表达于血管内皮细胞，肿瘤细胞包括肺癌细胞亦可表达[10,11]，这是VEGF自分泌作用机制存在的基础。VEGF在临床实践中具有重要价值，肿瘤组织中VEGF的表达水平及血清中VEGF的含量与肿瘤微血管密度、恶性程度和转移情况呈高度正相关，而与患者的预后则呈显著负相关[12,13]。本实验免疫组化结果显示，VEGF主要在肿瘤细胞中表达，部分成纤维细胞中亦有表达。阴性对照组VEGF呈强阳性表达，而姜黄素Ⅲ组与血管生成抑制剂TNP-470组VEGF阳性组织相对灰度值显著降低，与阴性对照组相比相差非常显著（$P<0.01$）；血清VEGF经ELISA检测结果显示，阴性对照组VEGF水平明显高于姜黄素Ⅲ组与TNP-470组（$P<0.01$）。

以上结果提示，姜黄素Ⅲ可通过抑制VEGF的分泌及表达，从自分泌及旁分泌两种途径抑制人肺腺癌细胞A549裸鼠移植瘤血管生成，这可能为其抗肿瘤血管生成的机制之一。

参考文献：

[1] Vergani V, Garofalo A, Bani M R, *et al*. Inhibition of matrix metalloproteinases by over-expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits the growth of experimental hemangiomas[J]. Int J Cancer, 2001, 91(2): 241－247.

[2] Joki T, Machluf M, Atala A, *et al*. Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy[J]. Nat Biotechnol, 2001, 19(1): 35－39.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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.

[9] Bachelder R E, Crago A, Chung J, *et al*. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(15): 5736－5740.

[10] Bairey O, Boycov O, Kaganovsky E, *et al*. All three receptors for vascular endothelial growth factor (VEGF) are expressed on B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells[J]. Leuk Res, 2004, 28(3): 243－248.

[11] 张广宇，赵　敏，徐明堂，等. 血管内皮生长因子及其受体与肺癌血管新生的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志，2002，25(2)：89－93.

[12] Iwaski A, Kuwahara M, Yoshinaga Y, *et al*. Basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels, as prognostic indicators in NSCLC[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2004, 25(3): 443－448.

[13] 赵建军，胡敬群，蔡建强，等. 血管内皮生长因子在肝细胞癌血清中的表达意义[J]. 中华肿瘤杂志，2001，23(5)：389－392.

（编辑　栾　嘉）