DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.21.028
第26卷第21期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 21
1950 2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)21-1950-04

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

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 初步探讨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)对人肺腺癌细胞系A549裸小鼠移植瘤的生长及其血管生成的影响。方法 选用人肺腺癌细胞株A549建立裸小鼠皮下移植瘤模型,腹腔注射姜黄素III,测量移植瘤的重量、体积,同时应用CD34免疫组化染色,观测瘤组织内的微血管密度。结果 姜黄素III具有较好的抗人肺腺癌细胞系A549裸小鼠移植瘤生长作用,移植瘤重量及体积显著低于阴性对照组($P<0.01$);瘤组织内可见微血管形态不规则,并可见无明显管腔形成的新生血管,姜黄素III组微血管密度明显低于阴性对照组($P<0.01$)。结论 姜黄素III能明显抑制人肺腺癌细胞系A549裸小鼠移植瘤的生长,其机制之一可能与其抑制瘤组织内血管生成有关。

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;R73-354;R734.2 文献标识码:A

Curcumin III inhibits growth and angiogenesis of human lung adenocarcinoma A549 xenografted 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 effects of bisdemethoxycurcumin (curcumin III) on the growth and angiogenesis of human lung adenocarcinoma cell line A549 xenografted in nude mice. Methods Fifteen nude mice were inoculated subcutaneously with A549 human lung adenocarcinoma cells for two weeks. Then, the tumor bearing mice were randomly divided into 3 groups ($n=5$ in each group): control group, TNP-470 group, curcumin III group. At 16 d after treatment, the nude mice were sacrificed and the tumor volume and weight were measured. The histopathological changes of the tumors were observed by HE staining. The microvessel densities (MVDs) of the tumors were measured by immunohistochemical staining with anti-CD34 monoclonal antibody. Results The mean volume and weight of the xenografted tumor in curcumin III group was remarkably lower than those in the control group ($P<0.01$). Moreover, MVD in curcumin III group was also lower than that in the control group ($P<0.01$), but was not different from that of TNP-470 group. Conclusion Curcumin III can significantly inhibit tumor growth in nude mice bearing human lung adenocarcinoma cell line A549. The possible mechanisms may be related with the suppression of angiogenesis in tumor tissues.

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

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[3]。初步研究表明,姜黄色素具有抗血管生成作用[4,5],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II的生物活性最强[6,7],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,目前尚少见有关姜黄素III活体内抗肿瘤血管生成作用的研究报道。本实验观察了姜黄素II在体内对人肺腺癌细胞系A549裸小鼠移植瘤生长及其对移植瘤

作者简介:唐春兰(1972-),女,四川省华莹市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事肺癌的诊断和治疗方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68765679

收稿日期:2004-07-20;修回日期:2004-09-03

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

血管生成的影响。

1　材料与方法

1.1　材料

中药姜黄购自重庆桐君阁大药房; 总姜黄素标准品购自中国药品生物制品鉴定所; 胰蛋白酶购自 Sigma 公司; 小牛血清购自 HYCLON 公司; RPMI1640 培养基购自 GIBCO 公司; 鼠抗人 CD34 单克隆抗体购自福州迈新公司; 免疫组化染色试剂盒购自北京中山公司; DAB 显色试剂盒购自晶美公司。

1.2　细胞培养

人肺腺癌细胞系 A549(亲代)由本科雷撼博士惠赠。将 A549 细胞培养于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 完全培养基中, 培养基中加入青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 μg/ml。将细胞置于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中在饱和湿度下培养, 隔日换液 1 次, 每 3 天以 1∶3 的比例传代 1 次, 采用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞。

1.3　药物提取及配制

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姜黄素 III单体, 并采用薄层层析、高效液相色谱法鉴别并测定其纯度。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。

1.4　建立裸小鼠移植瘤模型

将已培养好基本长满瓶壁的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 RPMI 1640 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、测量移植瘤的重量、体积, 行移植瘤病理形态学检查, 同时应用 CD34 免疫组化染色, 观测瘤组织内的新生血管。

1.5　实验分组

实验动物为 BALB/c 裸小鼠, 6~8 周, 雄性, 购自中国科学院上海实验动物中心, SPF 实验室饲养。15 只荷瘤裸小鼠(接种后 2 周)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重。

A 组(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。

B 组(TNP-470 组): TNP-470 30 mg/kg, 0.2 ml/次, 隔日腹腔注射 1 次, 共 8 次。

C 组(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。

1.6　MVD(微血管密度)结果判定

CD34 阳性产物呈棕黄色细颗粒状, 定位于血管内皮细胞胞膜及胞质。光镜下先以 100 倍视野选择 3 个微血管染色最丰富区(新生血管热点区), 然后在 200 倍视野下计数每一区中的微血管, 取其平均值。任何被 CD34 染成棕色的内皮细跑或内皮细胞簇, 必须与邻近微血管、肿瘤细胞和周围结缔组织分界清楚, 才可作为一个微血管计数, 管腔大于 8 个红细胞及有较厚肌层的血管不计数, 背景中阳性染色的浆细胞, 白细胞依据形态排除[9]。

1.7　统计学处理

以 SPSS11.0 软件对计量资料进行 t 检验。

2　结果

2.1　姜黄素 III的分离、鉴定及纯度测定结果

经分离、纯化获取的姜黄素 III为黄色粉末状物质, 有少许颗粒。薄层层析显示: 总姜黄素标准品展开后主要包含 3 种物质, 而经醇渗石油醚脱脂、硅胶柱层析法提取的姜黄素 I、姜黄素 II 和姜黄素 III样品展开后显示为不同单一物质, 与总姜黄素标准品 3 种物质展开位置一致, 证实为 3 种单体成分; 高效液相色谱法检测显示: 总姜黄素标准品显示 3 个主要药物峰, 分别代表姜黄素 I、姜黄素 II 和姜黄素 III。纯化后的姜黄素 III样品显示单一药物峰, 保留时间与标准品姜黄素 III时间一致, 进一步证实姜黄素 III样品为姜黄素 III单体, 同时行含量测定, 其纯度为 95.2%。

2.2　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%。

2.3　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。

2.4　各组平均瘤重及瘤块体积

从平均瘤重及瘤块体积来看, 用药组瘤重及瘤块体积明显低于阴性对照组($P<0.01$), 姜黄素III的抑瘤率为 50.43%(表 1)。

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

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

Group	Weight(g)	Volume(mm^3)	Tumor control rate(%)
Control	1.15±0.18	1413.4±266.33	
TNP-470	0.50±0.10△	631.18±120.82△	56.52
CurIII	0.57±0.10△	699.40±118.03△	50.43

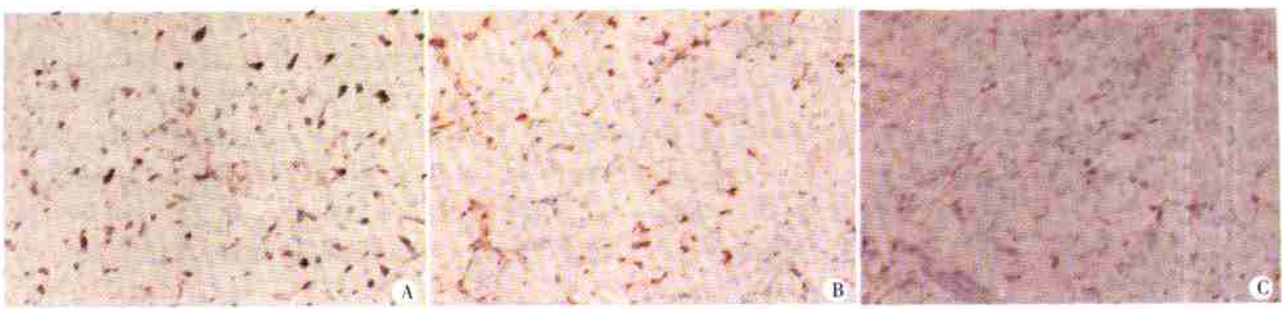
△: $P<0.01$, *vs* control

2.5　各组移植瘤微血管密度测定结果

CD34 免疫组化染色结果表明, 移植瘤肿瘤组织内可见形

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

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。阴性对照组移植瘤中MVD为(76.67±10.48)，显著高于TNP-470组(MVD为37.53±6.80)及姜黄素III组(MVD为40.13±7.05)，差异非常显著($P<0.01$)；姜黄素III组和与TNP-470组移植瘤中MVD相比无显著差异($P>0.05$)。各组移植瘤组织中CD34的表达情况见图1。



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

图1 各组移植瘤组织中**CD34**的表达情况 (S-P×200)

Fig 1 Expression of CD34 in tumor xenografts (S-P×200)

3 讨论

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。用有机溶剂(如乙醇)从姜黄中提取姜黄素是目前国内外普遍采用的工艺。高效液相色谱法是目前较为常用的测定姜黄素含量的方法。本实验中姜黄素III由作者经醇渗石油醚脱脂、硅胶柱层析法分离、薄层层析定性鉴别后经丙酮纯化制备而成，并采用高效液相色谱法测定其纯度为95.2%，能够满足动物实验的要求。

大量研究表明，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)，它可能通过癌化学预防作用[10]、抗肿瘤细胞增殖作用[11]及诱导肿瘤细胞凋亡作用[12]等方式发挥其抗肿瘤活性。本实验观察了姜黄色素单体成分之一姜黄素II在体内对人肺腺癌细胞系A549裸小鼠移植瘤的生长的影响。结果显示，姜黄素II组移植瘤重量及体积分别为(1.15±0.18) g、(1413.4±266.33) mm^3，明显低于阴性对照组[分别为(0.57±0.10) g、(699.40±118.0) mm^3] ($P<0.01$)，抑瘤率达50.43%。

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。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。Park等[4]研究证实姜黄色素可抑制永生性人脐静脉内皮细胞ECV304的增殖；Gururaj等[5]报道姜黄色素在体外可诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的凋亡，进一步研究表明，当将姜黄色素注射到EAT (Ehrlich ascites tumor)荷瘤小鼠腹腔后，能够显著减少腹水的形成(下降66%)及腹膜血管生成。为了观察姜黄素II是否可影响移植瘤内新生血管的形成，本实验利用抗CD34检测了移植瘤组织中的微血管密度(MVD)，由此来衡量肿瘤血管生成的活跃程度。本实验MVD的检测结果显示，姜黄素II组瘤组织内新生血管的数量(40.13±7.05)明显减少，与阴性对照组(76.67±10.48)相比相差非常显著($P<0.01$)，而与血管生成抑制剂TNP-470组(37.53±6.80)相比无显著差异($P>0.05$)，提示姜黄素III在体内能够通过减少移植瘤组织内新生血管的形成，在一定程度上控制肿瘤的生长，这可能为姜黄素II抑制A549裸小鼠移植瘤生长机制之一。

本实验表明，姜黄素III在体内具有明确的抑制A549裸小鼠抑制瘤生长及其血管生成作用，而且传统中药姜黄来源丰富，毒副作用小，可望成为一种低毒副作用的新型抗肿瘤药物。

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] 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.

[4] 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.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[5] 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.
[6] 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.
[7] Ramsewak R S, DeWitt D L, Nair M G, *et al*. Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins Ⅰ-Ⅲ from Curcuma longa [J]. Phytomedicine, 2000, 7(4): 303—308.
[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] 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.
[10] Lin C C, Lu Y P, Lou Y R, *et al*. Inhibition by dietary dibenzoylmethane of mammary gland proliferation, formation of DMBA-DNA adducts in mammary glands, and mammary tumorigenesis in Sencar mice[J]. Cancer Lett, 2001, 168(2): 125—132.
[11] Mori H, Niwa K, Zheng Q, *et al*. Cell proliferation in cancer prevention, effects of preventive agents on estrogen-related endometrial carcinogenesis model and on an *in vitro* model in human colorectal cells[J]. Mutat Res. 2001, 480—481: 201—207.
[12] Anto R J, Mukhopadhyay A, Denning K, *et al*. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl[J]. Carcinogenesis, 2002, 23(1): 143—150.

（编辑 汪勤俭）

文章编号: 1000-5404(2004)21-1953-01

个案与短篇

428 例蛛网膜下腔出血脑血管造影的临床应用及价值

Clinical application and value of cerebral angiography in 428 cases of subarachnoid hemorrhage

李 强, 牟 玮 （第三军医大学西南医院放射科, 重庆 400038）

我科自 1996 年以来, 先后对 428 例蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)患者进行了 DSA 三血管或四血管全脑血管造影检查, 其中 15 例患者在 1 年中进行了 2 次 DSA 全脑血管造影, 5 例患者先后进行了 3 次检查。总结如下。

1 资料与方法

428 例 SAH 患者为我院 1996 年 2 月至 2003 年 3 月住院收治。年龄 18～75(51.4±23.8)岁, 其中男 344 例, 女 84 例。既往有长期头痛 151 例, 发作性眩晕 49 例, 高血压病史 223 例, 糖尿病史 117 例, 单侧动眼神经麻痹 12 例, 单侧外展神经麻痹 6 例, 癫痫发作史 26 例, SAH 病史 23 例。入院时情况: 入院时伴头痛 407 例, 恶心呕吐 301 例, 眼球运动障碍 47 例, 单侧神经系统定位体征 142 例。其中 364 例经腰穿证实为 SAH, 154 例经 CT 血管造影证实; 88 例经 MRI 血管成像证实。

428 例患者均行 DSA 三血管或四血管全脑血管造影检查, 造影时间为发病后 2 h 到 1 年内, 其中 1 周内 196 例, 2 周至 30 d 内 202 例, 余 30 例在发病 1 个月后造影。

统计学方法: 计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

DSA 全脑血管造影对 SAH 的诊断价值: 在 428 例患者 DSA 全脑血管造影检查中共发现 321 例异常, 其中 6 例患者在第 1 次检查未发现异常, 但在第 2 次检查中发现异常, 另有 1 例患者在第 3 次检查才发现异常。在 321 例异常患者中颅内动脉瘤 185 例, 分布在大脑前动脉 32 例, 前交通动脉 74 例, 后交通动脉 56 例, 大脑中动脉 5 例, 大脑后动脉 12 例, 其余 6 例分布在眼动脉、颈内动脉及基底动脉; 发现动静脉畸形 58 例, 其中海绵窦血管畸形 5 例, Moyamoya 病 5 例, 前交通动脉 13 例, 后交通动脉血管畸形 8 例, 其余为大脑凸面血管畸形。在 428 例 SAH 患者 DSA 全脑血管造影中共有 107 例无异常发现。

造影时间与 DSA 阳性率之间的关系: 在 1 周内进行的 196 例患者 DSA 检查, 共发现 133 例异常, 占 67.9%, 2 周至 30 d 内进行的 202 例检查共发现 159 例异常, 占 73.8%, 发病 1 个月后进行的 30 例检查共发现 29 例异常, 占 96.7%。χ^2 检验三者之间有显著差异, 其中 2 周内检查的阳性率明显低于 2 周后检查 ($P<0.05$)。

3 讨论

SAH 是常见的神经系统出血性疾病, 由于发病急骤, 患者常在急性期内出现严重意识障碍和高颅压表现, 危重患者多因急性脑疝而死亡[1]。经典的颈动脉穿刺造影和椎动脉穿刺造影由于创伤大, 一次穿能够显示的血管有限, 近 10 余年来逐渐被无创的 CT 血管成像、MR 血管成像或微创的 DSA 全脑血管造影所代替。尽管新的无创检查如三维 CT 血管成像技术在阳性率方面可与 DSA 蔚美, 但由于 DSA 全脑血管造影能够实时显示血象分布, 动态观察异常血管的形状, 因此目前仍为临床上主要的血管造影手段[2]。

（下转 1960 页）

作者简介: 李 强(1964—), 男, 天津市人, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤介入治疗方面的研究。电话: (023)65311849

收稿日期: 2004-03-02; 修回日期: 2004-07-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net