

丹参多酚酸盐对肺癌模型小鼠肺组织中VEGF和MMP-9表达的影响

周生余^{1*}, 张发艳²(1.山东大学护理学院临床教研室, 济南 250012; 2.山东中医药大学中医学院生理教研室, 济南 250355)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)25-3515-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.25.18

摘要 目的:研究丹参多酚酸盐对肺癌模型小鼠肺组织中血管内皮生长因子(VEGF)和基质金属蛋白酶9(MMP-9)表达的影响。方法:取C57BL/6小鼠随机分为模型组(生理盐水)、阳性对照组(环磷酰胺50 mg/kg)和丹参多酚酸盐低、中、高剂量组(20、40、80 g/kg),每组10只。小鼠ip乌拉坦1 000 mg/kg,每周2次,连续4周建立肺癌模型;建模后各组小鼠ip相应药物,每日1次,连续给药14 d。比较各组小鼠行为、体征、体质量、抑瘤率、脾脏系数、胸腺系数及肺组织中血管内皮生长因子(VEGF)和基质金属蛋白酶9(MMP-9)表达。结果:模型组小鼠活动度消失,毛色暗淡无光泽,喜扎堆;阳性对照组和丹参多酚酸盐各剂量组小鼠上述现象均好转。阳性对照组和丹参多酚酸盐低、中、高剂量组小鼠的体质量分别为(21.01±2.95) g、(20.89±3.14) g、(21.03±3.02) g、(21.24±3.17) g,抑瘤率分别为(41.12±15.42)%、(36.92±10.42)%、(39.41±12.39)%、(37.19±10.39)%;与模型组比较,其余4组小鼠的脾脏系数、胸腺系数、VEGF(阳性对照组除外)和MMP-9表达均明显降低($P<0.05$)。结论:丹参多酚酸盐对肺癌模型小鼠有明显的抑瘤作用,其作用机制可能与抑制VEGF和MMP-9表达相关。

关键词 丹参多酚酸盐;肺癌;小鼠;抑瘤率;血管内皮生长因子;基质金属蛋白酶9

Effects of Salvianolate on the Expression of VEGF and MMP-9 in Lung Tissue of Mice with Lung Cancer

ZHOU Shengyu¹, ZHANG Fayuan²(1.Dept. of Clinical Laboratory, College of Nursing, Shandong University, Jinan 250012, China; 2.Dept. of Physiology Laboratory, College of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of salvianolate on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in lung tissue of mice with lung cancer. METHODS: C57BL/6 mice were randomly divided into model group (normal saline), positive control group (cyclophosphamide 50 mg/kg) and salvianolate low-dose, medium-dose and high-dose groups (20, 40, 80 g/kg) with 10 mice in each group. They were ig 1 000 mg/kg urethane, twice a day, for consecutive 4 weeks to establish lung cancer model. After modeling, they were given relevant medicine intragastrically once a day for consecutive 14 d. Mice behaviors, symptoms, body weight, tumor inhibition rate, spleen index, thymus index, and the expressions of VEGF and MMP-9 in lung tissue among groups were compared. RESULTS: The activity of mice in model group disappeared, dull coat color, preferred crowding together; the above-mentioned phenomenon improved in positive control group and salvianolate different dose groups. The body weight of mice in positive control group, salvianolate low-dose group, medium-dose group and high-dose group were (21.01±2.95) g, (20.89±3.14) g, (21.03±3.02) g, (21.24±3.17) g; and the tumor inhibition rates were (41.12±15.42)%, (36.92±10.42)%, (39.41±12.39)% and (37.19±10.39)%; compared with model group, spleen index, thymus index, and the expressions of VEGF (except for positive control group) and MMP-9 in other 4 groups decreased ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Salvianolate shows obvious inhibitory effects on mice with lung cancer, which may be related to inhibiting expressions of VEGF and MMP-9 in lung tissue.

KEYWORDS Salvianolate; Lung cancer; Mice; Tumor inhibition rate; Vascular endothelial growth factor; Matrix metalloproteinases-9

肺癌是常见的一种恶性肿瘤。近年来流行病学调查研究发现肺癌发病率呈上升趋势,死亡原因主要在于远处转移和局部浸润,致使患者丧失治愈的机会^[1-2]。丹参已广泛应用于临床治疗肿瘤,其主要成分丹参酮具有明显的抗肿瘤及促进肿瘤浸润淋巴细胞的体外扩增作用^[3]。丹参多酚酸盐是由丹参中提取的多酚酸盐类化合物制备成的一类化合物,以丹参乙酸镁为主要成分。近年来研究表明,血管内皮生长因子(VEGF)和基质金属蛋白酶9(MMP-9)与肺癌预后有一定的相关性,且具有促进肿瘤浸润转移的作用^[4]。为了解丹参多酚酸

盐对恶性肿瘤的转移是否具有影响,本研究探讨了不同浓度丹参多酚酸盐对肺癌模型小鼠肺组织中VEGF和MMP-9表达的影响,以为临床提供一定的参考。

1 材料

1.1 仪器

Olympus生物显微镜(日本Olympus公司);TGL-160台式高速离心机(上海医用分析仪器厂);Leica切片机(德国Leica公司)。

1.2 药品与试剂

注射用丹参多酚酸盐(上海绿谷制药有限公司,批号:20140824,规格:每支50 mg,含丹参乙酸镁40 mg);注射用环

*副主任医师,博士。研究方向:肺部肿瘤与凝血异常。E-mail: zloe908@163.com

磷酸胺(山西普德药业股份有限公司,批号:20140919,规格:每支50 mg);乌拉坦片(武汉胜天宇生物科技有限公司,批号:20141227,规格:每片0.5 g);VEGF、MMP-9免疫组化检测试剂盒(武汉博士德生物工程技术有限公司,批号:201206、201211)。

1.3 动物

C57BL/6小鼠50只,♂,6~8周龄,体质量(18±2)g;饲养2周,室温23~25℃,湿度为70%,自由饮水和摄食。小鼠购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号为SYXK(沪)2010-0095。

2 方法

2.1 肺癌模型的建立

将小鼠实验室适应性饲养2周后,ip乌拉坦(采用生理盐水配制)1 000 mg/kg,每周2次,连续4周。

2.2 分组与给药

将50只小鼠随机分为模型组、阳性对照组和丹参多酚酸盐低、中、高剂量组,每组10只。于造模成功后,丹参多酚酸盐低、中、高剂量组小鼠分别按20、40、80 g/kg ip相应的丹参多酚酸盐,阳性对照组小鼠ip 50 mg/kg的环磷酰胺,模型组小鼠ip相同剂量的生理盐水,每日给药1次,连续给药14 d。丹参多酚酸盐低、中、高剂量组的给药剂量分别由成人临床日用量的4.5、9、18倍换算而得,阳性对照组给药剂量参照文献[5]。

2.3 观察指标

2.3.1 行为和体征 于给药期间每日8:30-9:30观察各组小鼠的行为、体征,观察14 d。

2.3.2 体质量与抑瘤率 分别于造模4周后称量各组小鼠体质量;分别于给药14 d后以颈椎脱臼法处死小鼠,取瘤组织,称瘤质量,计算抑瘤率,抑瘤率=(1-给药组平均瘤质量/模型组平均瘤质量)×100%。

2.3.3 脏器系数 取各组小鼠的脾脏、胸腺并称质量,计算脏器系数,脏器系数=脏器质量/去瘤体质量(其中,去瘤体质量指去除瘤体后小鼠体质量)。

2.3.4 肺组织中VEGF和MMP-9表达 将肺转移瘤灶用4%甲醛固定12 h后,采用石蜡包埋,根据免疫组化检测试剂盒说明书标准操作,测定各组小鼠肺组织中VEGF和MMP-9表达。采用Image-pro Plus 6.0图像分析软件分析高清晰度彩色病理图文报告进行定量,在400倍显微镜下,每张切片随机选取5个视野,计算阳性面积的比例,取平均值。

2.4 统计学方法

采用SPSS 19.0统计学软件进行分析。处理数据多个样本均数比较采用单因素方差分析(ANOVA),多组间计量资料采用F检验,计数资料采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义,检验标准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 行为和体征观察结果

小鼠造模4周后成瘤率100%。模型组小鼠给药7 d后活动度减少,14 d后毛色暗淡无光泽,且喜扎堆。阳性对照组小鼠给药7 d后活动度较模型组明显增加,14 d后毛色无暗淡现象。与模型组比较,丹参多酚酸盐各剂量组小鼠给药7 d后活动能力下降不明显,且至14 d仍未出现毛发卷曲和毛色暗淡现象。

3.2 体质量和抑瘤率测定结果

丹参多酚酸盐各剂量组和阳性对照组小鼠的体质量和抑瘤率差异无统计学意义($P>0.05$)。各组小鼠体质量、抑瘤率的检测结果见表1。

表1 各组小鼠体质量、抑瘤率的测定结果($\bar{x}\pm s, n=10$)

Tab 1 Detection results of body weight and tumor inhibition rate of mice in each group($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	体质量,g	抑瘤率,%
模型组	20.71±2.89	
丹参多酚酸盐低剂量组	20.89±3.14	36.92±10.42
丹参多酚酸盐中剂量组	21.03±3.02	39.41±12.39
丹参多酚酸盐高剂量组	21.24±3.17	37.19±10.39
阳性对照组	21.01±2.95	41.12±15.42

3.3 脾脏系数和胸腺系数测定结果

与模型组比较,各给药组小鼠的脾脏系数和胸腺系数均明显降低($P<0.05$);与阳性对照组比较,丹参多酚酸盐各剂量组小鼠的脾脏系数和胸腺系数均明显升高($P<0.05$);与丹参多酚酸盐低、高剂量组比较,丹参多酚酸盐中剂量组小鼠的脾脏系数和胸腺系数明显降低($P<0.05$),结果见表2。

表2 各组小鼠脾脏系数和胸腺系数的测定结果($\bar{x}\pm s, n=10$)

Tab 2 Detection results of spleen index and thymus index of mice in each group($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	脾脏指数,mg/g	胸腺指数,mg/g
模型组	10.39±1.39	0.71±0.06
丹参多酚酸盐低剂量组	8.47±0.89**	0.63±0.05**
丹参多酚酸盐中剂量组	7.31±0.76** ^Δ	0.41±0.04** ^Δ
丹参多酚酸盐高剂量组	7.92±0.82**	0.52±0.06**
阳性对照组	6.03±1.34*	0.34±0.04*

注:与模型组比较,* $P<0.05$;与阳性对照组比较,[#] $P<0.05$;与丹参多酚酸盐低、高剂量组比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. model group, * $P<0.05$; vs. positive control group, [#] $P<0.05$; vs. salviaolate low-dose group and high-dose group, ^Δ $P<0.05$

3.4 肺组织中VEGF和MMP-9表达测定结果

与模型组比较,各给药组小鼠肺组织中VEGF(阳性对照组除外)、MMP-9表达均明显降低($P<0.05$);与阳性对照组比较,丹参多酚酸盐各剂量组小鼠肺组织中VEGF和MMP-9表达更低($P<0.05$);与丹参多酚酸盐低、高剂量组比较,丹参多酚酸盐中剂量组小鼠肺组织中VEGF和MMP-9表达最低($P<0.05$),结果见表3。

表3 各组小鼠肺组织中VEGF、MMP-9表达的测定结果($\bar{x}\pm s, n=10$)

Tab 3 Detection results of VEGF and MMP-9 expressions of mice lung tissue in each group($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	VEGF,%	MMP-9,%
模型组	7.59±0.76	7.13±0.93
丹参多酚酸盐低剂量组	6.81±0.68**	6.25±0.78**
丹参多酚酸盐中剂量组	6.13±0.53** ^Δ	5.34±0.72** ^Δ
丹参多酚酸盐高剂量组	6.59±0.60**	5.82±0.83**
阳性对照组	7.69±0.87	8.49±1.23*

注:与模型组比较,* $P<0.05$;与阳性对照组比较,[#] $P<0.05$;与丹参多酚酸盐低、高剂量组比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. model group, * $P<0.05$; vs. positive control group, [#] $P<0.05$; vs. salviaolate low-dose group and high-dose group, ^Δ $P<0.05$

4 讨论

肺癌模型大致可分为转基因模型、移植性肿瘤模型、诱发性肿瘤模型以及自发性肿瘤模型,这些肿瘤模型各有利弊^[5]。其中转基因模型主要是通过基因工程将外源特定基因导入动物细胞的染色体内,其特点主要是外源肿瘤基因可遗传给后代,从基因水平研究肿瘤的演进、发展及形成,但单基因肿瘤发病机制与临床不相符,且来源有限、建立技术要求较高^[6]。移植性肿瘤模型是目前应用相对较多的一种肿瘤模型,将癌细胞或肿瘤组织移植至动物体内形成肿瘤,具有个体差异小、生长速率一致、周期短等特点,且接种率达100%;该方法常用于筛选抗肿瘤新药,但采用该法具有肿瘤生长速度快、体积倍增时间短、增殖比率高^[7]。诱发性肿瘤模型是用病毒、射线、化学致癌物等在动物中诱发肿瘤,其诱发的肿瘤与人体肿瘤较为相似,但该法致癌物和动物的选择对肿瘤模型尤为重要,还存在潜伏期个体变异大、周期长、成功率达不到100%等缺点^[8-9]。自发性肿瘤模型是在自然情况下发生,与人类肿瘤最为类似,但该法具有周期长、耗资大、动物样本量大、肿瘤发生率低等缺点^[10]。目前,已有很多研究将诱发性肺癌小鼠模型应用于临床,包括肺内注射致癌物诱发肺癌、口服致癌剂诱发肺癌以及吸入致癌物质诱发肺癌等。常用肺癌模型致癌物包括乌拉坦、巯基甲基嘧啶、苯并芘、乙酰胺基氟、二乙基亚硝酸胺等,这些药物均可成功诱发肺癌,其中乌拉坦可100%诱导肺癌模型^[11]。故笔者在本研究中选用乌拉坦诱导小鼠肺癌模型,结果显示,成瘤率达100%。

丹参多酚酸盐是由中药丹参中提取精制的一种水溶性多酚酸盐类化合物制备而成的一类化合物。丹参水溶性提取物具有清除自由基、抗脂质过氧化、促进组织恢复、抗血栓以及改善微循环等广泛的药理作用^[12]。丹参对肿瘤细胞具有细胞毒作用、增殖抑制作用以及诱导肿瘤细胞凋亡和诱导分化作用^[13]。VEGF是由学者Ferrara N 1989年发现的一种血管生成调节因子,该因子主要由肿瘤细胞分泌,其生物活性功能主要通过VEGF受体结合产生。早期学者研究发现,VEGF主要通过与其内皮细胞上的VEGF受体结合,通过旁分泌机制增加新生血管通透性以及促进肿瘤新生血管的生成^[14]。近年来报道表明,很多肿瘤细胞上也存在VEGF受体表达,并且VEGF还能够经自分泌机制促进肿瘤的浸润转移,但目前对其具体机制尚不十分清楚,认为可能与VEGF调节肿瘤细胞组织因子、MMPs及整合素等相关^[15]。MMPs是Zn²⁺依赖的一类细胞外蛋白质水解酶,其能够降解细胞外基质的所有成分,而其中细胞外基质降解是肿瘤细胞浸润、迁移的前提,MMP-9是其中一种重要的MMP蛋白^[16]。本文研究结果显示,与模型组和阳性对照组比较,丹参多酚酸盐各剂量组小鼠肺组织中VEGF和MMP-9表达明显降低,其中中剂量组效果最明显($P<0.05$),但其具体原因尚不十分清楚,有待进一步研究。

综上所述,丹参多酚酸盐对肺癌模型小鼠有明显的抑瘤作用,其作用机制可能与抑制VEGF和MMP-9表达相关。

参考文献

- [1] 张志,梁旭满. 330例肺癌流行病学调查分析[J]. 蛇志, 2013,25(2):142.
- [2] 姚晓军,刘伦旭. 肺癌的流行病学及治疗现状[J]. 现代肿瘤医学, 2014,22(8):1982.
- [3] 廖嘉煦,杨汉丰,肖应全,等. 肺小细胞肺癌:流行病学、临床、病理、基因、影像学表现及治疗进展[J]. 中华临床医师杂志:电子版, 2013,7(19):114.
- [4] 贺兼斌,张贻秋,向志,等. 苏拉明对小鼠肺腺癌的抑制作用及对血清VEGF和MMP-9表达的影响[J]. 吉林医学, 2014,35(2):227.
- [5] 余琛琳,崔淑芳. 肺癌动物模型的制备与应用[J]. 中国实验动物学报, 2008,16(6):470.
- [6] 李辉,段凤英. 转基因小鼠肺癌模型的研究和应用[J]. 广东医学, 2011,32(24):3284.
- [7] 徐小华,李清林. 基于C57/BL6J小鼠的动物移植性肺癌模型的建立及评价研究[J]. 中华中医药学刊, 2015,33(2):281.
- [8] 侯敏,黄健清,戴丽军. 化学致癌剂诱发的小鼠肺癌模型及应用研究[J]. 医学综述, 2015,21(4):615.
- [9] 杨新宇,徐蓓蕾,沈芸. 诱发性大鼠肝癌模型的建立[J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版, 2015,31(4):401.
- [10] 姜林,孔庆志,李小菊. 桃红四物汤对小鼠Lewis肺癌移植瘤自发性肺转移抑制作用的实验研究[J]. 湖北中医杂志, 2012,34(3):24.
- [11] 孙婷. 乌拉坦诱导小鼠肺癌模型的研究[D]. 开封:河南大学, 2013.
- [12] 周茹,何耀,和丽芬,等. 丹参水提物对大鼠心肌缺血-再灌注损伤氧化应激的影响[J]. 中药药理与临床, 2014,30(2):76.
- [13] 马丙祥,董宠凯. 丹参的药理作用研究新进展[J]. 中国药房, 2014,25(7):663.
- [14] 李斐斐,吴皓,陈璐,等. 益肺清化颗粒对Lewis肺癌小鼠VEGF、bFGF、Angiostatin、Endostatin影响的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2013,33(8):1086.
- [15] 李艳,高习文,颜志军,等. MMP-9、TIMP-1及E-cad在肺腺癌组织中的表达及其与临床病理的关系[J]. 安徽医药, 2013,17(9):1510.
- [16] 刘倩,王莹. MMP-2、MMP-9与肺癌发生、转移的现状与进展[J]. 国际呼吸杂志, 2013,33(4):279.

(收稿日期:2016-01-28 修回日期:2016-05-15)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊,欢迎投稿、订阅