

参麦注射液联合奥沙利铂对结肠癌 LoVo 细胞裸鼠移植瘤 HIF-1 α 、CD31 表达的影响*

顾莅冰¹, 陈正鑫¹, 蒋泽砚¹, 马 好¹, 樊志敏^{2 Δ}

(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023; 2. 南京市中医院, 江苏 南京 210001)

摘要: **目的** 通过观察参麦注射液联合奥沙利铂对结肠癌 LoVo 细胞裸鼠移植瘤缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor-1, HIF-1 α) 表达的影响, 探究参麦注射液增强奥沙利铂联合抗结直肠癌肿瘤疗效的作用机制。 **方法** 采用文献方法制备裸鼠 LoVo 细胞移植瘤模型。设立空白对照组 ($n=8$)、奥沙利铂组 (8 mg/kg, $n=8$)、参麦注射液组 (10 mg/g, $n=8$)、联合治疗组 (奥沙利铂 8 mg/kg, 参麦注射液 10 mg/g, $n=8$)。采用腹腔注射方法给药, 每隔 1 日记录肿瘤体积并绘制肿瘤生长曲线。给药 14 d 后观察各用药组对裸小鼠移植瘤体积及重量的影响, 取肿瘤组织计算肿瘤抑制率, 免疫组织化学法检测缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 表达、CD31 阳性肿瘤组织的微血管密度 (microvessel density, MVD)。 **结果** 参麦注射液与奥沙利铂联合用药抑瘤率为 46.9%, 联合用药组可显著降低 HIF-1 α 的表达, 并降低肿瘤组织的微血管密度 (MVD)。 **结论** 参麦注射液能增强奥沙利铂抗结肠恶性肿瘤的作用, 其机制可能与抑制 HIF-1 α 介导的血管生成信号通路相关。

关键词: 参麦注射液; 奥沙利铂; 结肠癌; 缺氧; 血管生成

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2018)03-0017-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.03.004

Effect of Shenmai Injection Combined with Oxaliplatin on HIF-1 α and CD31 Expression in Nude Mice Transplanted with Colon Cancer LoVo Cells

GU Libing¹, CHEN Zhenxin¹, JIANG Zeyan¹, MA Hao¹, FAN Zhimin²

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2. Nanjing Chinese Medicine Hospital, Nanjing 210001, China)

ABSTRACT: Objective To study the mechanism of Shenmai injection enhancing the efficacy of oxaliplatin combined with anti-colorectal cancer by observing the effect of Shenmai injection combined with oxaliplatin on the expression of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1 α) in colon cancer colon cancer xenografts in nude mice. **Methods** The method of transplanting tumor of LoVo cells in nude mice was established by literature method. Set up blank control group ($n=8$), oxaliplatin group (8 mg/kg, $n=8$), Shenmai injection group (10 mg/g, $n=8$) and combination therapy group (Oxaliplatin 8 mg/Kg; Shenmai Injection 10 mg/g, $n=8$). intraperitoneal injection and recording the tumor volume every other day. Plotting the tumor growth curve. Observing the effect of each drug group on the volume and weight of transplanted tumor in nude mice after 14 days of administration. tumor tissue was taken for tumor inhibition rate, and immunohistochemical method was used to detect the expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and microvessel density (MVD) of CD31-positive tumor tissue. **Results** The inhibitory rate of combined chemotherapy of Shenmai injection and oxaliplatin was 46.9%. Combination therapy group can significantly reduce the expression of HIF-1 α and reduce the microvessel density of tumor tissue. **Conclusion** Shenmai injection can enhance the effect of oxaliplatin against colonic malignant tumors, and its mechanism may be related to the inhibition of HIF-1 α -mediated angiogenesis signal pathway.

KEY WORDS: Shenmai injection; oxaliplatin; colon cancer; hypoxia; angiogenesis

收稿日期: 2018-06-08

* 基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK2012521)

第一作者简介: 顾莅冰 (1993-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医外科学肛肠方向。

Δ 通信作者: 樊志敏, E-mail: shizhongfanzhimin@163.com

源于明朝秦景明的《证因脉治》参麦注射液是由中药红参、麦冬加入多种辅料制成的具有益气养阴功效的中药复方制剂。众多临床实验皆指向参麦注射液(SM)与奥沙利铂(OX)的联合应用可以有效降低第三代铂类药物奥沙利铂治疗结直肠癌恶性肿瘤附带毒副作用,并通过抗血管生成、抗氧化等作用提高结直肠癌恶性肿瘤对化疗药物的敏感性进而直接影响化疗药物的长期应用^[1-4]。本实验依据文献方法建立人结肠癌 LoVo 细胞株裸鼠移植瘤模型以探究参麦注射液联合奥沙利铂对结肠癌 LoVo 细胞裸鼠移植瘤 HIF-1 α 、CD31 表达的影响,为参麦注射液提高化疗药物抗肿瘤疗效提供理论支持。

1 实验材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与细胞株 4~6 周龄健康雄性 BALB/c-un 小鼠 32 只,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号码(SCXK(沪)2017-0005)。结肠癌 LoVo 细胞(传代),购自上海中国科学院细胞库,由南京市中医院中心试验室培养。

1.1.2 主要试剂 参麦注射液,正大青春宝药业,批号:1701188;奥沙利铂注射液,江苏恒瑞医药股份有限公司生产,批号:170728AG;免疫组化试剂:HIF-1 α 一抗 ab51608,abcam 公司;EXPOSE 兔 specific HRP/DAB detection IHC 试剂盒 ab80437,abcam 公司;CD31 一抗 MAB-0031,福州迈新公司;kit-9922 二抗试剂盒,福州迈新公司。

1.1.3 主要仪器 FAH04N 分析天平,上海精密科学仪器有限公司。XZJ-L2030 显微镜,江西凤凰光学集团。KH-Q380 切片机,湖北孝感阔海医疗科技有限公司。KH-BL 生物组织自动包埋机,湖北孝感阔海医疗科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 造模与分组 根据文献 [5]方法,将 32 只裸小鼠在无菌操作环境下将传代后的人结肠癌 LoVo 细胞种植于右腋皮下建立移植瘤模型,随机分为生理盐水组(NC 组)、奥沙利铂组(OX 组)、参麦注射液组(SM 组)、参麦注射液+奥沙利铂组(SM+OX

组)4 组,每组 8 只。

1.2.2 给药 待皮下注射肿瘤细胞悬液 2 周后小鼠皮下移植瘤体积增长至 100~300 mm³ 时各组分别予以腹腔注射给药:单纯化学药物治疗组予以奥沙利铂腹腔注射 8 mg/kg,0.1 mL/次(d1、d5、d9、d13),参麦注射液组予以每日腹腔注射参麦注射液 0.1 mL/10 g、中药+奥沙利铂组予以每日腹腔注射参麦注射液 0.1 mL/10 g,并予奥沙利铂腹腔注射 8 mg/kg,0.1 mL/次(d1、d5、d9、d13),NC 组腹腔注射等体积的生理盐水。

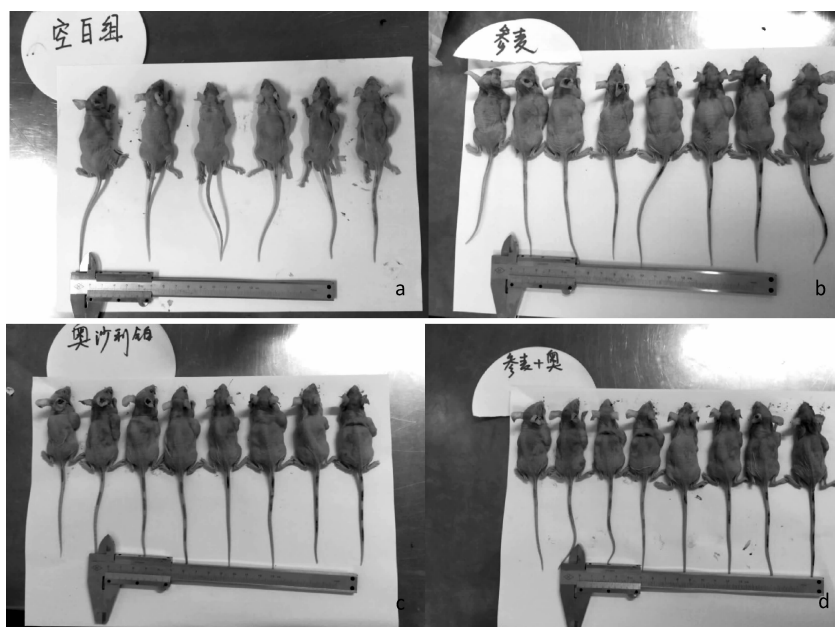
1.2.3 绘制肿瘤生长曲线 从各治疗组开始给药之日起记录中药及化疗药物对小鼠皮下移植瘤体积的影响,每隔 1 日用游标卡尺测量肿瘤组织的长径(a)和短径(b)。计算肿瘤组织体积并绘制生长曲线。肿瘤体积计算公式: $V=(ab^2)/2$ 。

1.2.4 取出瘤组织,称量肿瘤重量,计算抑瘤率 进行样本制备:用于免疫组化样本置于 10%中性缓冲甲醛溶液中;部分瘤组织进行冰冻切片并 HE 染色,显微镜下观察各组病理切片细胞形态学的变化。处死小鼠后计算肿瘤抑制率并按金正均法判断参麦注射液与奥沙利铂合用的效果 Elivison 二步法^[6]免疫组化测定肿瘤组织 HIF-1 α 、CD31 的表达。

1.2.5 统计学分析 应用 SPSS24.0 进行数据分析,方差齐性数据应用单因素方差分析分析组间差异。

2 结果

2.1 各组肿瘤的生长情况



a. NC 组; b. SM 组; c. OX 组; d. SM+OX 组

图 1 给药 14 d 后各组小鼠肿瘤生长情况

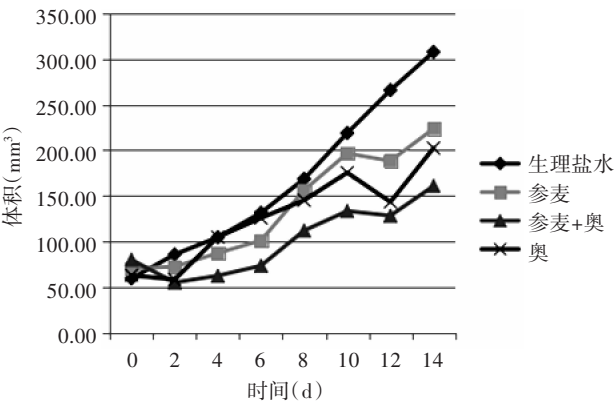


图 2 各组小鼠肿瘤生长曲线

自接药物注射之日起,每日观察移植瘤的形态变化。初始肿瘤体积较小,移动性良好,后逐渐增大,各治疗组增长速度较生理盐水组缓慢(图 2)。生理盐水组小鼠于给药第 13 天死亡 2 只,其余各治疗组小鼠生长良好。至用药结束时,奥沙利铂组和参麦注射液联合奥沙利铂组的肿瘤抑制率与对照组、参麦注射液组相比有组间差异($P<0.05$)。参麦注射液联合奥沙利铂组与其他用药组相比,具有更高的肿瘤抑制率($P<0.05$)。按金正均法计算^[7] q 值为 1.18,说明两药联合为协同作用,用药后各组抑瘤率见表 1、图 3、图 4。

2.2 瘤组织病理学变化

经 HE 染色后,光学显微镜下观察肿瘤细胞可见生理盐水对照组细胞呈类圆形或不规则形,细胞核染色较深且核浆比较大,细胞核内可见较多分裂相而核固缩较少见。参麦注射液组和参麦注射液联合奥沙利

表 1 用药后各组肿瘤抑制率			
组别	<i>n</i>	瘤重/g	抑瘤率/%
奥沙利铂+参麦注射液(OX+SM)	8	0.51±0.24 ^{ab}	46.9
奥沙利铂(OX)	8	0.60±0.25 ^a	38.5
参麦注射液(SM)	8	0.96±0.43	2.2
生理盐水(NC)	6	0.98±0.39	—

注:与 NC 组比较,^a $P<0.05$;与 SM 组、OX 组比较,^b $P<0.05$

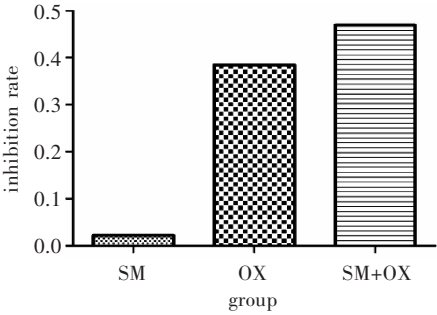


图 3 各组抑瘤率

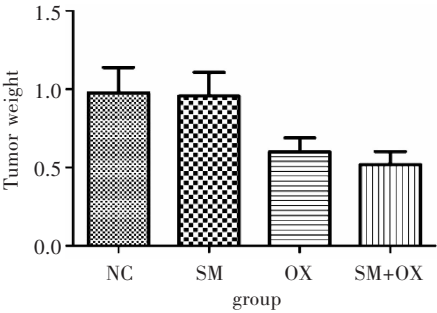
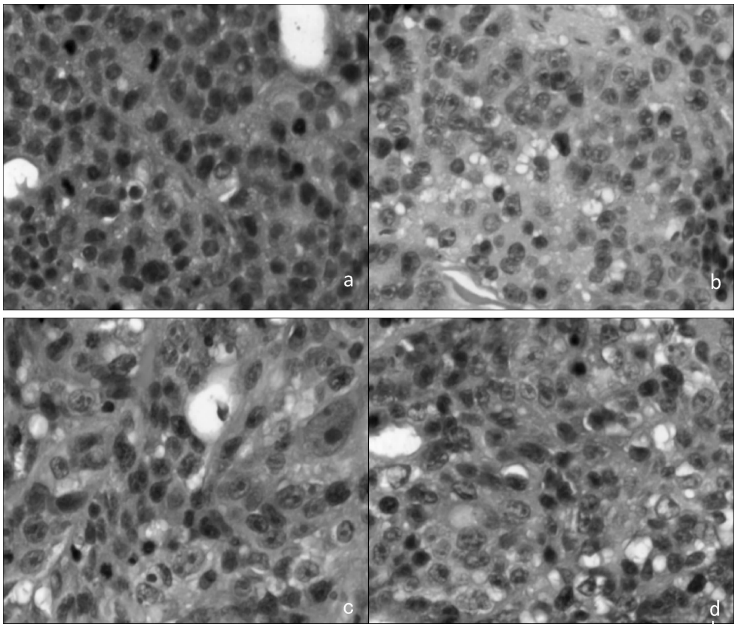


图 4 各组肿瘤重量

铂组细胞形态各异且有不同程度的组织坏死,细胞核内可见较多核固缩而核分裂相少。

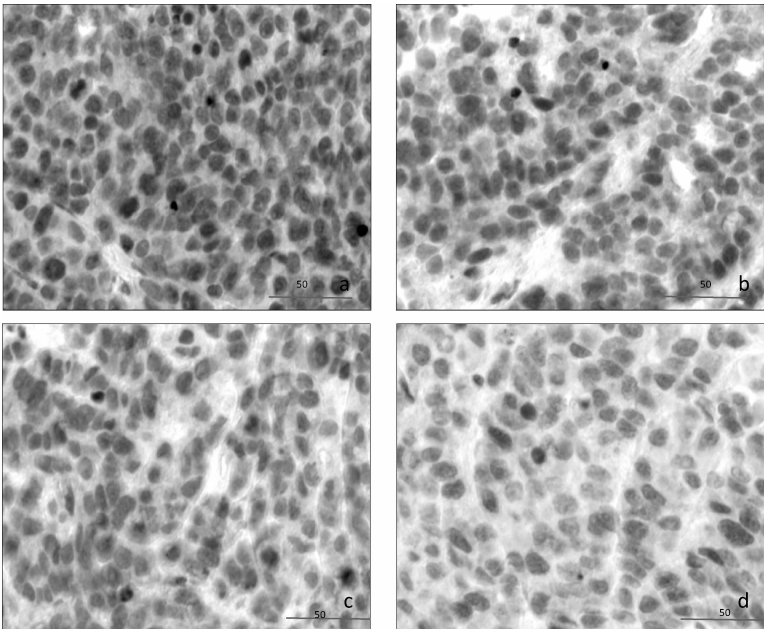


a. NC 组; b. OX 组; c. SM 组; d. 联合用药组

图 5 HE 染色肿瘤组织切片

2.3 各用药组对 HIF- α 蛋白表达的影响 免疫组织化学二步法检测参麦注射液联合奥沙利铂对缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)蛋白表达的影响,表达强度通过 Image Pro Plus 6.0 软件计算平均光密度(MOD)值来

表达^[8]。每张切片先在 100 倍镜下筛选出阳性表达较强的区域,然后在 400 倍镜下随机选择 5 个不连续视野进行拍照,曝光时间及光源亮度均一致。MOD 值越高,表达越强。见表 2、图 6、图 7。



a. NC 组; b. OX 组; c. SM 组; d. SM+OX 组
图 6 高倍(400 倍)镜下各组 HIF-1 α 表达水平

表 2 各组 HIF-1 α 蛋白 MOD 值			
组别	n	($\bar{x} \pm s$)	
奥沙利铂(OX)	8	0.008 $\pm$ 0.009 ^a	
奥沙利铂+参麦注射液(OX+SM)	8	0.005 $\pm$ 0.007 ^{bc}	
参麦注射液(SM)	8	0.006 $\pm$ 0.008 ^b	
生理盐水(NC)	6	0.014 $\pm$ 0.016	

注:与 NC 组比较,^a $P>0.05$;与 NC 组比较,^b $P<0.01$;与 SM 组比较,^c $P>0.05$

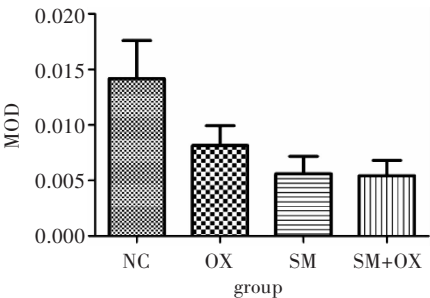


图 7 各组 HIF-1 α 蛋白 MOD 值

奥沙利铂组 MOD 较空白对照组无组间差异($P>0.05$),参麦注射液联合奥沙利铂组及参麦注射液 MOD 较空白对照组显著下降($P<0.01$),参麦注射液联合奥沙利铂组与参麦注射液 MOD 差异无统计学

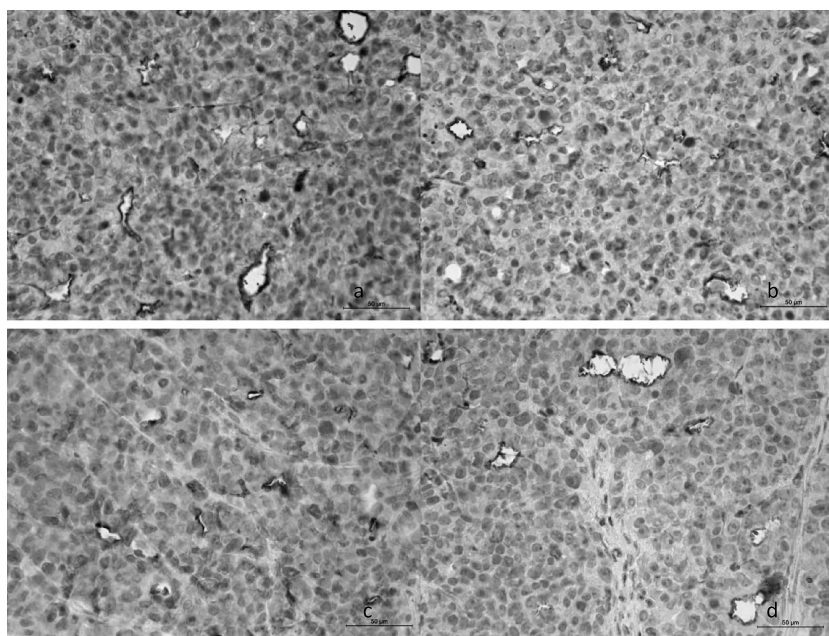
意义($P>0.05$)。上述结果显示参麦注射液能显著降低肿瘤组织局部 HIF-1 α 的表达。

2.4 CD31 标记 MVD 的结果判定 对 CD31 阳性的血管内皮细胞采取 WEIDNER^[9]MVD 计数方法进行微血管计数。CD31 与血管的形成密切相关,其阳性表达的 MVD 可直观的表现肿瘤组织局部微血管密度。

表 3 各组微血管计数			
组别	n	微血管计数	
奥沙利铂(OX)	8	20.1 $\pm$ 6.3 ^a	
奥沙利铂+参麦注射液(OX+SM)	8	10.6 $\pm$ 4.6 ^{bc}	
参麦注射液(SM)	8	12.4 $\pm$ 3.4 ^b	
生理盐水(NC)	6	27.7 $\pm$ 4.6	

注:与 NC 组比较,^a $P<0.05$;与 OX 组比较,^b $P<0.01$;与 SM 组比较,^c $P>0.05$

奥沙利铂组 MVD 较空白对照组有所下降,差异有统计学意义($P<0.05$),参麦注射液联合奥沙利铂组及参麦注射液 MVD 较空白对照组显著下降($P<0.01$),参麦注射液联合奥沙利铂组与参麦注射液 MVD 无组间差异($P>0.05$)。上述结果显示参麦注射液能显著降低肿瘤组织局部微血管密度。



a. NC 组; b. OX 组; c. SM 组; d. SM+OX 组

图8 高倍(400倍)镜下CD31表达阳性微血管

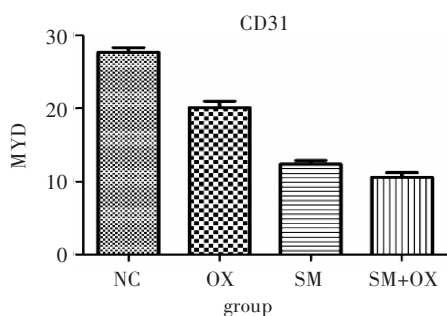


图9 各组微血管计数

3 讨论

以DNA为靶点杀伤肿瘤细胞^[9]的第三代铂类药物奥沙利铂与顺铂等1、2代铂类药物相比具有有效率高、副反应小的特点,但临床应用奥沙利铂治疗结直肠肿瘤时仍然存在对肠道肿瘤细胞敏感度低及骨髓抑制、神经毒性^[10]和过敏反应等不良反应,直接影响了化疗药物的长期应用。结直肠恶性肿瘤属中医“癌病”范畴,证属本虚标实,易见正气亏虚,气血瘀滞,邪毒久而至气阴两虚。大量临床研究^[11-14]已经发现具有益气养阴功效的参麦注射液具有增强化疗效果降低化疗副反应的作用,而其机制尚不完全明确。进一步研究参麦注射液抗结直肠肿瘤及与化疗药物的协同作用机制有助于为临床治疗结直肠恶性肿瘤提供新的思路,降低化疗副反应,提高肿瘤患者生活质量,延长患者生命。

本实验按文献[5]方法建立裸鼠移植瘤模型。一系列可靠的实验结果表明,较低剂量参麦注射液单独使用抑瘤作用不佳而奥沙利铂及参麦注射液联合用药对裸鼠移植瘤的生长均有明显抑制作用,联合给药组较奥沙利铂组作用更为显著。本实验结果显示,红参、麦冬加入辅料制成的中药复方制剂的水溶液与奥沙利铂在免疫缺陷裸小鼠体内环境下的联合应用可以有效的降低肿瘤细胞组织局部微血管生成。转录因子缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)^[15-16]在病理状态下肿瘤团块的内部缺氧环境中得以保持稳定表达,其诱导表达的包括血管内皮生长因子(VEGF)^[17]和生长因子(FGF)^[18]在内的多种与血管生成相关的生物因子在病理状态局部缺氧条件下极易形成微妙的正相关协同效应。FGF通过自分泌或旁分泌的途径与靶细胞表面受体结合,在多种生物因子与蛋白激酶的共同作用下直接诱导肿瘤组织的微血管生成^[19-20],VEGF通过pi3k/akt等信号通路促进血管渗透性增加,加剧局部的缺血缺氧,进一步促使肿瘤微血管生成,形成局部组织缺氧-微血管代偿性增生-血管通透性增加加剧缺氧的恶性循环。本实验结果显示,参麦注射液可协同奥沙利铂抑制结肠癌肿瘤细胞的生长,下调HIF-1 α 表达,抑制肿瘤组织微血管的生成,发挥抗肿瘤作用。

综上,参麦注射液与奥沙利铂在小鼠体内条件下的联合应用能有效的抑制结肠恶性肿瘤细胞的生长,其机制可能与抑制 HIF-1 α 介导的血管生成信号通路相关。

参考文献:

- [1] 李玉明,李东芳,王云启. 中药联合化疗治疗对大肠癌患者 CEA、CD3 及 CD8 水平表达的影响[J]. 实用癌症杂志, 2016,31(11):1909.
- [2] 王子宽,杨竞肖,白宝宝,等. 参麦注射液联合不同类型他汀类药物治疗不稳定型心绞痛的近期疗效比较 [J]. 现代生物医学进展, 2017,17(4):664-667.
- [3] 袁立全,邓桂明,陈镇,等. 参麦注射液临床应用分析[J]. 中国现代药物应用, 2016,12(12):274-276.
- [4] 张盛奇,林丽芳,郑泓斌,等. 参麦注射液联合化疗治疗晚期贲门癌的临床观察 [J]. 中国医药指南, 2013,11(12):12-13.
- [5] 郭立达,薛佳伟,渠开跃,等. 姜黄素联合奥沙利铂对人结肠癌 LoVo 细胞裸鼠移植瘤的抗癌作用研究 [J]. 中草药, 2013,44(16):2261-2266.
- [6] ZHOU Z J, XIE J L, WEI P, et al. Pathologic subtyping of primary lymphoma of breast and prognostic analysis[J]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 2017,46(9):618-622.
- [7] 张俊利. 三仙胶囊对裸鼠原位移植肾癌 HIF-1 α , VEGF, AQP1 的影响[D]. 太原:山西省中医药研究院, 2014.
- [8] MASHINO K, SADANAGA N, YAMAGUCHI H, et al. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma[J]. Cancer Res, 2002,62(10):2937-2941.
- [9] RAYMOND E, FAIVRE S, CHANEY S, et al. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin [J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2002,1(3):227-235.
- [10] 曹洋,李鹏,谭开基,等. 参麦注射液防治晚期非小细胞肺癌化疗不良反应的临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2006,26(6):550-552.
- [11] 雍金鹏. 参麦注射液联合替吉奥治疗气阴两虚型消化道肿瘤的临床研究[D]. 郑州:河南中医药大学, 2016.
- [12] 樊斌. 参麦注射液联合 mFOLFOX4 化疗治疗 II、III 期大肠癌的临床研究[D]. 大连:大连医科大学, 2016.
- [13] LIANG J, XU D S, WEI Y I. Clinical Observation of Shenmai Injection Treatment for Cancer Related Fatigue [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012,17(1):23-26.
- [14] ZHANG S Q, LIN L F, ZHENG H B, et al. Clinical Observation of Advanced Gastric Cardia Cancer Treated with Shenmai Injection Combined with Chemotherapy[J]. Guide of China Medicine, 2013,12(1):55-56
- [15] CHEN H, FENG J, ZHANG Y, et al. Pien Tze Huang Inhibits Hypoxia-Induced Angiogenesis via HIF-1 / VEGF-A Pathway in Colorectal Cancer [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015:454279.
- [16] ZHANG J, ZHU L, FANG J, et al. LRG1 modulates epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in colorectal cancer via HIF-1 α activation [J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2016,35(1):1-11.
- [17] CARMELIET P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer[J]. Oncology, 2005,69(6):4-10.
- [18] CROSS M J, CLAESSEONWELSH L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition [J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2001,22(4):201-207.
- [19] MAWALLA B, YUAN X, LUO X, et al. Treatment outcome of anti-angiogenesis through VEGF-pathway in the management of gastric cancer: a systematic review of phase II and III clinical trials [J]. BMC Research Notes, 2018,11(1):21.
- [20] INCIO J, LIGIBEL J A, MCMANUS D T, et al. Obesity promotes resistance to anti-VEGF therapy in breast cancer by up-regulating IL-6 and potentially FGF-2 [J]. Science Translational Medicine, 2018,10(432):945.