

墓头回提取液对小鼠移植瘤 U14 瘤体内微血管密度 VEGF 和 bFGF 表达的影响

蒋秋燕, 方 刚, 苏莉鸣, 钟 璐

基金项目: 2007 年广西自然科学基金资助项目(No: 桂科自 0728183)及 2007 年广西壮族自治区大型仪器协作共用网资助项目

作者单位: 530023 南宁, 广西中医学院第一附属医院妇产科(蒋秋燕); 530001 广西中医学院(方 刚, 钟 璐); 530012 南宁市红十字会医院(苏莉鸣)

作者简介: 蒋秋燕(1963-), 女, 副主任医师、副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 妇科肿瘤防治研究。E-mail: jay1688@163.com, 电话: 0771-5848620。

[摘要] 目的 探讨墓头回提取液对小鼠宫颈癌 U14 移植瘤瘤体组织微血管密度、VEGF、bFGF 表达的影响。方法 将 SPF 级雌性 KM 小鼠随机分成墓头回提取液高、中、低剂量组、顺铂组及模型组, 以观察墓头回提取液对 U14 实体肿瘤组织微血管密度、血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)表达的影响。结果 墓头回提取液高、中剂量组和顺铂组的宫颈癌 U14 移植瘤瘤体内微血管密度均明显低于模型组; 墓头回提取液高、中剂量组和顺铂组均可降低 U14 移植瘤瘤体内 VEGF 的表达; 墓头回提取液高剂量组和顺铂组均可降低 U14 移植瘤瘤体内 bFGF 的表达。结论 墓头回提取液能明显抑制 U14 移植瘤瘤体血管形成, 并能降低 VEGF、bFGF 的表达, 提示墓头回提取液有抗肿瘤作用。

[关键词] 墓头回提取液; 小鼠宫颈癌 U14; 微血管密度; VEGF; bFGF

[中图分类号] R 737.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2009)01-0004-04

Effect of the extracting solution from mutouhui on the microvessel-density and VEGF/bFGF expression in the U14 replanted tumor tissues of the mice that had cervical carcinoma JIANG Qiu-yan, FANG Gang, SU Li-ming, et al. First Teaching Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of the extracting solution from mutouhui on the microvessel-density and VEGF/bFGF expression in the U14 replanted tumor tissues of the mice that had cervical carcinoma. **Methods** The SPF female mice were divided into high dose/ middle dose/ light dose of the extracting solution group, cisplatin group and model group randomly. Then the effect of the extracting solution from mutouhui on the microvessel-density and VEGF/bFGF expression in the U14 replanted tumor tissues of the mice that had cervical carcinoma were observed. **Results** The microvessel-density in high dose/ middle dose of extracting solution group and cisplatin group was lower than that in model group; VEGF expression in high dose/ middle dose of extracting solution group and cisplatin group was lower than that in model group; bFGF expression in high dose/ middle dose of extracting solution group and cisplatin group was lower than that in model group. **Conclusion** The extracting solution from mutouhui is against the formation of the microvessel-density in U14 transplanted tumor, and it also can reduce the VEGF/bFGF expression, all these show that extracting solution from mutouhui has the effect of anti-tumor.

[Key words] Extracting solution from Mutouhui; Mice of U14 cervical carcinoma; Microvessel density; VEGF; bFGF

为了进一步探讨墓头回提取液抗肿瘤的机理, 我们根据前期实验研究“墓头回提取液对荷 U14 宫颈癌小鼠血液流变学的影响”为基础, 该实验结果证实墓头回提取液可以降低 U14 宫颈癌小鼠的血液

粘度而起到抗肿瘤的作用^[1]。本实验直接从墓头回提取液对小鼠宫颈癌 U14 移植瘤瘤体组织微血管密度、血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)表达的影响来探讨其作用机制, 现

报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物及瘤株 SPF 级雌性 KM 小鼠 100 只, 体重 (20 ± 2) g, 购于广西医科大学实验动物中心, 符合健康一级动物标准, 合格证号: SCXK 桂 2003-0003。U14 宫颈癌细胞株: 购于上海药物研究所, 在昆明小鼠腹腔内传代。

1.1.2 药物及试剂 墓头回原药材 1.0 kg, 购于广西中医学院第一附属医院中药房, 经广西中医学院中药鉴定研究所鉴定为异叶败酱 (*patrinia heterophylla* bge), 粉碎后用 5000 ml 蒸馏水浸泡 0.5 h, 水煎煮 2 次, 水提取液冷却后与 75% 乙醇以 10:1 比例醇沉 10 h, 真空过滤器过滤, 合并 2 次滤液, 加热浓缩至 100 ml, 水浴加热, 得到浸膏 150 g, 保存备用; 顺铂 (齐鲁制药有限公司, 批号: 706031CF) 临用时以注射用水配制成所需浓度 (1 mg/ml); CD34 免疫组化试剂盒 (福州迈新生物技术开发公司), VEGF、bFGF 免疫组化检测试剂盒 (武汉博士德生物公司); 其他所用试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 移植瘤模型的建立^[2] 将未带瘤 KM 小鼠称重, 随机分为 5 组, 每组 10 只, 墓头回提取液高、中、低 3 个剂量组、顺铂组、模型组。在无菌条件下, 取预先在昆明小鼠体内传代第 7 天的 U14 肿瘤细胞 (腹水), 以无菌生理盐水按 1:3 稀释, 调整细胞数约为 2.0×10^9 个/L, 于每只小鼠右前肢腋下注射 0.2 ml。

1.2.2 给药 参照预实验及活性筛选给药量, 将墓头回浸膏配制为墓头回提取液高、中、低 3 个剂量, 按所含浸膏量计算, 分别为 1500, 750 和 375 mg/(kg·bw); 从接种第 2 天开始, 墓头回提取液组按体重 0.2 ml/(10g·bw) 定时分组灌胃给药; 顺铂组腹腔注射顺铂注射液 3 mg/(kg·bw); 模型组每只每天予生理盐水 0.5 ml 灌胃。以上均连续给药 10 d。

1.2.3 指标检测

1.2.3.1 瘤体组织病理形态观察 剖取实体瘤瘤体, 首先进行肉眼观察形态、色泽, 触摸质地, 部分瘤体剖体观察, 然后对瘤体进行常规石蜡包埋、切片、HE 染色, 光镜下观察。

1.2.3.2 微血管密度 (MVD) 检测^[3] (1) 各组肿瘤组织切片常规脱蜡、水化, EDTA 液抗原修复后, 加抗鼠 CD34 单克隆抗体, 然后按福州迈新两步法试剂盒操作步骤进行: 加试剂 A 和 B, 加新配制的底

物 DAB 溶液。苏木素复染, 盐酸酒精分化, 梯度酒精脱水干燥, 中性树胶封片。实验设阳性与阴性对照。(2) 结果判定标准: CD34 阳性内皮细胞被染成棕黄色。由内皮细胞形成的条状、隙状等孤立或簇状结构并有管腔, 且管腔小于 8 个红细胞大小者为一条血管; 相互分离的内皮细胞但无明显管腔亦按 1 条血管计数。血管腔大于 8 个红细胞或管壁可见平滑肌者不计入内。(3) 微血管密度计数方法: 先在低倍镜下 (100 倍) 确定 3 个 CD34 阳性着色最密集的区域, 然后在高倍视野 (400 倍) 下计数微血管, 取 3 个视野的均值作为微血管密度 (MVD)。肿瘤内硬化区域和肿瘤细胞稀少区域内的微血管不进行计数。

1.2.3.3 VEGF 和 bFGF 表达检测^[4] 免疫组化 SABC 法检测 VEGF、bFGF 表达水平。免疫组化 SABC 法, 具体操作按说明书进行。免疫组化染色评分按 Rahman 等^[5] 的方法进行, 即 VEGF、bFGF 的评分标准是以细胞质呈棕褐色颗粒状染色为阳性反应。根据着色细胞的比例 (染色范围) 染色强度及染色范围 (阳性细胞比率) 分为 0~4 级, 阴性为 0 分; 阳性细胞 1%~25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, 76%~100% 为 4 分; 染色强度划分为 0~3 级, 阴性为 0 分, 弱阳性为 1 分, 中等强度为 2 分, 强阳性为 3 分, 两者得分相加为最后评分。

1.3 统计方法 采用 SPSS11.0 统计学软件包进行统计学处理, VEGF、bFGF 的表达及微血管密度记数以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。VEGF、bFGF 的表达及微血管的密度比较行 *t* 检验。

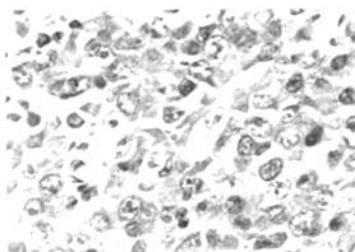
2 结果

2.1 墓头回提取液对小鼠宫颈癌 U14 瘤体病理形态观察

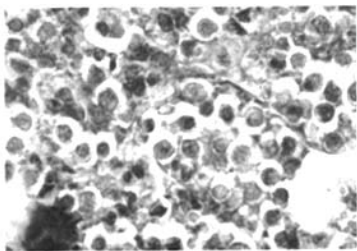
2.1.1 肉眼观察 KM 小鼠 U14 实体瘤为球形结节状, 质脆细嫩, 剖面呈鱼肉状。模型组瘤体体积明显大于墓头回提取液组高、中剂量组和顺铂组, 少数可见侵袭性生长现象, 未见有腹水形成。墓头回提取液组高、中剂量组和顺铂组小鼠的瘤体较小, 形状规则, 易剥离, 无侵袭性生长现象和腹水形成。

2.1.2 光镜观察 通过对瘤体进行 HE 染色, 光镜观察显示, 模型组细胞生长旺盛, 多呈团灶状分布, 有的呈腺样排列, 细胞核形态规则, 一般呈椭圆形或卵圆形, 细胞核膜结构清晰、完整, 核内常染色质多等 (见图 1-A); 墓头回提取液低剂量组与模型组之间无明显差异。墓头回提取液高剂量组肿瘤细胞呈

团索状实性排列或弥漫性分布,细胞大小不等,形态不规则,多有变性,可见多数肿瘤细胞坏死,坏死区周围可见部分凋亡细胞(见图 1-B);墓头回提取液中剂量组肿瘤细胞出现坏死区域和数量明显少于墓头回提取液高剂量组。顺铂组肿瘤细胞呈弥漫性分布,可见片状坏死,细胞正常结构消失。



A.模型组 (40×): 细胞呈团灶状分布,细胞核形态规则,细胞核膜结构清晰、完整



B.墓头回提取液高剂量组 (40×): 细胞有坏死,坏死区周围可见部分凋亡细胞

图 1 小鼠宫颈癌 U14 瘤体组织病理形态

2.2 墓头回提取液对小鼠宫颈癌 U14 瘤体微血管密度的影响 经免疫组化染色后的切片,CD34 阳性细胞呈现棕黄色或棕褐色染色,多位于瘤细胞之间,显示的微血管形态不一,结构紊乱,呈椭圆、裂隙状等,只有部分可见明确管腔。模型组可见微血管广泛分布于肿瘤组织间质内,墓头回提取液低剂量组与空白模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,墓头回提取液高、中剂量组和顺铂组能明显降低瘤组织微血管密度,差异均有统计学意义($P<0.01$)。见表 1。

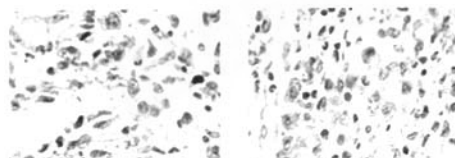
表 1 墓头回提取液对小鼠宫颈癌 U14 瘤体微血管密度的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	剂量	微血管密度	t	P
	前	后 [mg/(kg·bw)]	(条/cm ²)		
模型组	10	9	0	19.61±3.09	
墓头回低剂量组	10	9	375	17.94±3.08	1.147 0.268
墓头回中剂量组	10	9	750	15.00±2.46**	3.501 0.003
墓头回高剂量组	10	10	1500	12.10±2.32**	6.034 0.000
顺铂组	10	9	3	9.83±1.66**	8.364 0.000

注:各用药组与模型组比较,** $P<0.01$

2.3 墓头回提取液对小鼠宫颈癌 U14 瘤体 VEGF 表达的影响 免疫组化结果显示:模型组 U14 小鼠

瘤体组织中 VEGF 有较高表达(图 2-A);墓头回提取液低剂量组与模型组比较无明显降低瘤体组织中 VEGF 表达的作用($P>0.05$);与模型组比较,墓头回提取液中剂量组能降低瘤组织中 VEGF 表达,差异有统计学意义($P<0.05$) (图 2-B);与模型组比较,墓头回提取液高剂量组和顺铂组能明显降低瘤组织中 VEGF 表达,差异均有统计学意义($P<0.01$) (图 2-C)。见表 2。

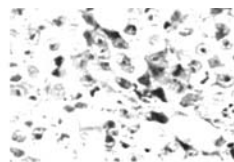


A.模型组 (40×)

B.墓头回提取液中剂量组 (40×)



C.墓头回提取液高剂量组 (40×)



D.阴性对照组 (40×)

图 2 VEGF 在小鼠宫颈癌 U14 瘤体组织中的表达变化

表 2 墓头回提取液对小鼠宫颈癌 U14 瘤体组织 VEGF 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	剂量	VEGF 表达	t	P
	前	后 [mg/(kg·bw)]	(分)		
模型组	10	9	0	5.61±0.70	
墓头回低剂量组	10	9	375	5.06±0.92	1.447 0.167
墓头回中剂量组	10	9	750	4.61±0.86*	2.714 0.015
墓头回高剂量组	10	10	1500	3.55±0.98**	5.208 0.000
顺铂组	10	9	3	2.89±0.78**	7.796 0.000

注:各用药组与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.4 墓头回提取液对小鼠宫颈癌 U14 瘤体 bFGF 表达的影响 免疫组化结果显示:模型组 U14 小鼠瘤体组织中 bFGF 均有较高表达(图 3-A);墓头回提取液中、低剂量组对瘤体组织 bFGF 表达与空白模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,墓头回提取液高剂量组和顺铂组能降低瘤组织中 VEGF 表达,差异有统计学意义($P<0.05$) (图 3-B)。见表 3。

表 3 墓头回提取液对小鼠宫颈癌 U14 瘤体组织 bFGF 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	剂量	VEGF 表达	t	P
	前	后 [mg/(kg·bw)]	(分)		
模型组	10	9	0	5.11±0.74	
墓头回低剂量组	10	9	375	4.78±0.62	1.037 0.315
墓头回中剂量组	10	9	750	4.50±0.87	1.609 0.127
墓头回高剂量组	10	10	1500	4.10±0.99*	2.489 0.023
顺铂组	10	9	3	4.06±1.04*	2.474 0.025

注:各用药组与模型组比较,* $P<0.05$

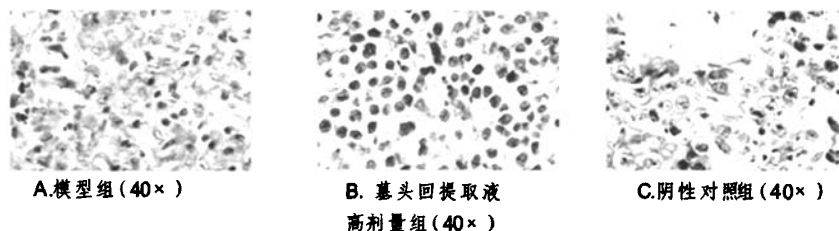


图 3 bFGF 在小鼠宫颈癌 U14 瘤体组织中的表达变化

3 讨论

3.1 VEGF 是最有效的血管形成因子之一,对内皮细胞具有特异性分裂能力。近几年 VEGF 表达情况的研究表明,肿瘤 VEGF 的高表达与肿瘤已达晚期或不良预后明显相关^[6]。VEGF 是一种可溶性肽,可由肿瘤分泌进入各种体液当中。VEGF 的生物功能主要有刺激内皮细胞增生,促进血管形成并增加微小血管的渗透性,为肿瘤细胞的生长和血管网的建立提供营养。bFGF 是一种多功能的生长因子,是一种多肽因子,因其信号传导复杂、生物学作用具多效性而倍受关注。其除对成纤维细胞和血管内皮细胞有促增殖作用外,还参与肿瘤的发生和发展,特别是对肿瘤浸润和转移有重要意义。它可通过受体与相应的靶细胞(如血管内皮细胞和成纤维细胞)结合,增加内皮细胞的化学趋向性,促进血管内皮细胞分裂和毛细血管出芽生长,诱导蛋白溶解酶生成,有利于内皮细胞芽穿透基质等,新生的毛细血管既为肿瘤的生长提供了营养,又为肿瘤的转移准备了有利的条件。血管生成与肿瘤的生长和转移密切相关。

3.2 本实验前期研究从降低血液粘度方面进行抗宫颈肿瘤研究,此次实验检测了基头回提取液对小鼠宫颈癌 U14 瘤体组织中基本形态变化、MVD、VEGF、bFGF 表达的影响,其中基本形态变化结果显示,基头回提取液可使肿瘤细胞呈团索状实性排列或弥漫性分布,导致多数肿瘤细胞坏死,坏死区周围可见部分凋亡细胞。观察微血管密度发现,基头

回提取液高、中剂量组能明显降低瘤组织微血管密度,并且均能降低 U14 小鼠瘤体组织中 VEGF、bFGF 的表达,并呈一定的量效关系,这可能与基头回提取液通过降低了瘤体组织中 VEGF、bFGF 的表达,使肿瘤血管形成受到抑制,从而起到抑制肿瘤生长的作用有关。

因此,基头回提取液不仅可导致小鼠宫颈癌 U14 瘤体中肿瘤细胞坏死,还可通过降低瘤体中 VEGF、bFGF 的表达,提示基头回提取液有抗肿瘤作用。

参考文献

- 1 蒋秋燕,钟璐,方刚,等.基头回提取液对荷 U14 宫颈癌小鼠血液流变学的影响[J].中国中医药信息杂志,2008,15(10):25-26.
- 2 叶连宝,陈晓东,赵华,等.阿魏酸锗对小鼠子宫癌 14 号的抑制作用[J].安徽医药,2005,9(8):570-571.
- 3 吴学敏,金艳书,姜金丽,等.威麦宁抑制小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的生长及其血管生成的实验研究[J].数理医药学杂志,2007,20(5):630-631.
- 4 冯刚,黄涛,卢宏达,等.莪术油注射液对小鼠移植性 S180 肉瘤血管形成的抑制作用[J].肿瘤研究与临床,2005,17(4):233-235.
- 5 Rahman A, Dhar DK, Yamaguchi E, et al. Coexpression of inducible nitric oxide synthase and cox-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver, possible involvement of cox-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus positive case[J]. Clin Can Res, 2001, 7(5):1325.
- 6 Poon R T, Fan S T, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients [J]. J Clin Oncol, 2001, 19(4): 1207-1225.

[收稿日期 2008-11-10][本文编辑 韦挥德 刘京虹]