

葡萄大戟醇提物抑制肿瘤和促血管新生的临床应用及效果

李国强¹ 李 岩²

(1 河南省信阳市中心医院肿瘤外科, 信阳, 464000; 2 新汶矿业集团有限责任公司中心医院, 新泰, 271233)

摘要 目的:研究葡萄大戟醇的提物在肿瘤的对抗作用以及在血管新生的抑制作用方法取正常的细胞和肿瘤细胞,用药之后通过 MTT 的方法来对 IC50 进行检测。原代对大鼠胸主动脉内皮细胞(RAECs)进行培养,进行细胞的分析实验,用的是体外 iCELLigence 的方法,此外,还进行了细胞迁移法和细胞管组实验的实验方法,研究了葡萄大戟提取物对 RAECs 的增量、迁移和血管管理的影响,同时对 p-Akt, Akt, p-eNOS, eNOS, TGF- β 1, Smad3 等血管新生相关信号通路蛋白的表达情况进行检测,检测的方法是 Western blot 技术。通过对人肝癌裸鼠移植瘤模型的建立,予以葡萄大戟醇提物,裸鼠体重、肿瘤大小、肿瘤等质量检测,同时对每组裸鼠血清血管内皮生长因子(VEGF)和血小板源性生长因子(PDGF-BB)水平进行检测,检测的方法是 LISA 技术方法,同时还要对移植瘤组织的形态进行观察,移植瘤组织是进行过 HE 染色的。结果:葡萄大戟的提纯物对小鼠的最大的耐受量 MTD 是 94.29/(g·kg)。对于大鼠成肌细胞(L6 细胞株),葡萄大戟醇提物没有明显的抑制作用,而对于对鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株 PC12、人肝癌细胞 HepG-2、大、人非小细胞肺癌细胞株 A549、人宫颈癌细胞细胞株 Hela 来讲,葡萄大戟有明显的抑制作用,此外葡萄大戟醇提物能够增加 RAECs 的值、迁移和血管的形成,也会有显著的抑制作用。结论:葡萄大戟醇提物能够对肿瘤的生长和血管的生成具有很显著的抑制作用,这种情况也是葡萄大戟发挥抗肿瘤作用的有效机制之一。

关键词 葡萄大戟;肿瘤;血管新生

Antitumor and Inhibitory Effect of Ethanol Extract from Euphorbia Prostrate

Li Guoqiang¹, Li Yan²

(1 Cancer surgery in Xinyang Central Hospital of Henan, Xinyang 464000, China; 2 Xinwen Mining Central Hospital of Refco Group Ltd, Xintai 271233, China)

Abstract Objective: To explore the antagonism of ethanol extract from Euphorbia stolon in tumor and its inhibitory effect on angiogenesis. **Methods:** Normal cells and tumor cells were cultured, and IC50 was detected by MTT after medication. The primary rat thoracic aorta endothelial cells (RAECs) were cultured and analyzed by iCELLigence method. The effects of Euphorbia extract on the increment, migration and vascularization of RAECs were studied by cell migration method and cell tube group. Western blot technology was used to detect the expression of p-Akt, Akt, p-eNOS, eNOS, TGF- β 1, Smad3 and other proteins related with angiogenesis signaling pathways. When the model of human liver cancer established with nude mice carried transplanted tumor after intervened by prostrate Euphorbia alcohol extract, the body weight, tumor size and tumor quality of nude mice were detected, and the levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet derived growth factor (PDGF-BB) in the serum of nude mice were detected by LISA technique. At the same time, the morphology of transplanted tumor, which is stained by HE, is observed. **Results:** The maximum MTD tolerance of the extract from Euphorbia stolon was 94.29 g·kg⁻¹. For the rat myoblasts (L6 cell lines), the prostrate alcohol extract has no obvious inhibitory effect, while the prostrate Euphorbia has convincing inhibitory effect on the rat adrenal pheochromocytoma cell line PC12, human hepatoma cell HepG-2, human non-small cell lung cancer cell line A549 and human cervical cancer cell Hela. In addition, ethanol extract of Euphorbia stolon can increase the RAECs value, migration and vascularization, and also have a significant inhibitory effect. **Conclusion:** The prostrate alcohol extract can significantly inhibit the growth of tumor and the formation of blood vessels, which may be one of the effective mechanisms of the antitumor effect of the Euphorbia prostrate.

Key Words Euphorbia prostrate; Tumor; Angiogenesis

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.05.054

大戟属植物具有丰富的抗癌活性成分,如一年生草本、草药等,但仅能抵抗药理学、驱虫剂、腹泻等

的炎性反应,没有报道报道过大戟属植物有抗肿瘤的活性。然而,在肿瘤转移和增加的过程中,会发生

血管生成。都知道,新生血管的形成则是依赖于内皮细胞的增值、迁移和成管的过程当中。与此同时也会有很多的信号的通路在血管新生过程中参与调控的重任。相关医学研究表明,在控制肿瘤血管的生成方面,有一定的控制作用,此方法在抗肿瘤方面很有效,在对抗肿瘤血管生成的研究热门中,大戟属植物已经成为研究的最佳药物。通过本文的初步研究,采用的是体内和体外的试验方法,探讨了在体外实验中对匍匐大戟醇提物抗肿瘤血管生成的作用,对匍匐大戟醇提物的药用价值做了进一步的研究,并在今后的医学研究中奠定了基础。

1 材料

以昆明种小鼠作为此次的研究对象,雌雄数量均为总数量的一半,体重在 18 ~ 22 g 之间,是昆明医科大学实验动物中心和重庆腾鑫生物技术有限公司提供的试验小鼠。此次研究用肝癌细胞系(HepG 2)、非小细胞肺癌细胞系(A549)、大鼠肾上腺嗜铬细胞患者行(PC12)以及宫颈癌细胞系(海拉)作为研究对象细胞,同时还用了老鼠细胞系(16种)成肌细胞作为研究细胞,中国科学院昆明动物所细胞库是此次研究细胞的购买处,而大鼠主动脉的内皮细胞是用此次试验的原代进行培养的。

2 方法

2.1 匍匐大戟醇提物对 RAECs 增殖、迁移、成管及细胞通路的影响

2.2.1 用免疫荧光的方法来对 RAECs 内皮细胞传至的第3代进行鉴定 用胰蛋白酶进行消化,浓度为 0.25%,在 24 孔板进行接种,周期是 24 h,单层均匀的覆盖在培养箱内,时刻进行观察试验。将 24 孔板从培养箱中取出,把先前用的培养基去掉,用 PBS 进行 3 ~ 4 次的清洗,用中性的福尔马林进行固定,时间是 20 min;然后再用 PBS 进行 3 次的清洗,然后再对其进行孵化处理,用的试剂是含量为 1% 的牛血清蛋白和含量为 1% Tween-20 的 PBS,在常温下并伴随震荡进行孵化,时间是 120 min;然后再用 PBS 清洗 3 次,对其加入一抗(Anti-CD31 抗体),孵化一夜,保持 4 °C 的温度;然后再用 PBS 清洗 3 次,之后再加入 FITC 二抗(兔抗鼠多克隆抗体 IgG)继续孵化,保持室温 37 °C,维持 1 h,再用 PBS 进行 3 次的清洗;之后对其进行染色,染色剂是 5 mg/L 的 DAPI,染色时间是 3 ~ 5 min,再用 PBS 清洗 3 次,之后每个孔添加到 PBS 500 μL 后,然后采用荧光显微镜对细胞进行观察。将实验分为 CD31 和空白 2 个组别,使用一抗和二抗孵化作为 CD31 正常组,而

CD31 的对照组的添加剂是取代一抗的含量为 5% 的 BSA,添加正常。

2.2.2 RAECs 增殖实验 E-Plate L8 细胞培养板 将培养基加入到每个孔内,将入量为 50 μL,并将 E-Plate L8 细胞培养板放入检测台进行检测,并检测其基线,并对实验过程中对数期细胞悬浮液浓度的变化进行收集和计数,最后配制成实验需要的细胞浓度 2×10^4 个/mL,5 min 后对基线进行检测,同时加入 50 μL 细胞悬液向 E-Plate 检测板中,在超净室内放 E-Plate L8 细胞培养板,室温放置,0.5 h 将其放到检测台上进行检测,再此过程中会有细胞的增值,并对细胞的增值进行实时的动态检测。匍匐大戟醇提物抗肿瘤及抑制血管新生作用全贴壁后,将培养基加入到每个 E-Plate 检测板,然后开展细胞增值的实时动态试验,连续 72 h,在此过程中需要对药物作用数据进行不断收集。

2.2.3 生长期细胞的对数选取 先要消化处理胰蛋白酶,其含量为 0.25%,计数的细胞浓度为 8×10^4 个/mL,在 6 孔板上进行接种。等待细胞的生长,达到 90% 时,在孔中划十字线,用的是 100 μL 的微量移液器吸头,将死细胞清洗掉,用的是 PBS 清洗液,将不同药物浓度体积的(低剂量 0.1 g/L,中剂量 1 g/L,高剂量 5 g/L)的培养基分别加入其中,放在 CO₂ 培养箱中进行培养能够,浓度为 5%,保持恒温 37 °C,用显微镜观察 0,12,24,36 h 时的细胞动态,对每孔细胞进行统计,并将数据拍下存储起来。

2.2.4 RAECs 成管实验 Matrigel 提前在 4 °C 冰箱冰上过夜解冻。把 Matrigel 铺到 96 孔板中,每孔的量为 50 μL,保持 37 °C 的恒温,将其放置 CO₂ 的培养箱中,浓度含量也为 5%,时间为 30 min,直到凝固为止。在这过程中,把消化细胞配合成细胞悬液,所含药物的浓度不同,均匀配置,将含药(药物质量浓度为低剂量 0.1 g/L,中剂量 1 g/L,高剂量 5 g/L)细胞悬液加入到每孔中,剂量为 250 μL。保持 37 °C 恒温,在 CO₂ 培养箱中进行培养,含量也是 5%,培养时间为 6 h,2,4,6 h 的时候用显微镜来观察微管的形成状况。每孔选 5 个不同的部位,分别是上下左右及中间,计算出形成微管的数量,并开展统计学处理。

2.2.5 Western blot 法检测血管生成相关信号通路 在孔板中细胞长至蛋白表达 90% 的时候,将含有不同药物浓度(药物质量浓度为低剂量 0.1 g/L,中剂量 1 g/L,高剂量 5 g/L)的培养基加入其中,体积均相同,保持 37 °C 的恒温,在 CO₂ 培养箱中进行

培养,含量为5%,24 h之后,从培养箱中取出细胞培养瓶,用PBS进行3次的清洗,加入RIPA裂解液(内含1% PMSF),用12 000 r/min的器皿进行离心处理,时长15 min,然后对总蛋白Bradford的法定量进行提取;蛋白样品使用SDS-聚丙烯酰胺凝胶完成离心操作,然后使用半干法完成转膜,之后再封闭2 h,将一抗进行过夜孵化,并保持恒温4℃。洗膜采用TBST,在室温下摇床孵育二抗2 h,之后显色采用HRP-ECL,并使用凝胶成像仪完成扫描成像,来计算目的蛋白的表达水平,用的是目的蛋白(Akt, p-Akt, eNOS, p-eNOS, TGF- β 1, Smad3 蛋白)与 β -actin 灰度值的比值,此方法连续进行5次($n=5$)。

3 结果

3.1 匍匐大戟醇提物影响RAECs的增殖作用 在RAECs细胞方面匍匐大戟醇提物有一定的抑制作用,IC₅₀为12.294 g/L。

3.2 RAECs迁移能力受到匍匐大戟醇提物的影响 对比于对照组,高剂量组和阳性组在36 h内的移动性不同,低剂量组的移动性有所降低,当12 h后无差异,4 h内的剂量组明显减少,后无差异。通过上述结果可以得知,内皮细胞受到匍匐大戟提取物的影响,其在二维水平上的迁移受到了抑制,而且剂量也过于依赖时间。

3.3 RAECs小管形成受到了匍匐大戟醇提物的影响 对比于对照组,阳性组和匍匐大戟醇提物均处于不同的时间段。能够对小管的形成有抑制作用的是高、中、低剂量组。结果表明,匍匐大戟醇提物可以对小管形成有明显的抑制作用,并在剂量依赖性上有所体现。

4 讨论

在人体的正常发育和许多疾病的发展中血管的形成起着非常重要的作用。从目前研究中可以看出,血管新生即是血管的生成,血管新生以2种方式体现:一是指萌芽成长,也称为嵌套的增长,向内凹陷从血管壁通过,毛细血管在促进血管腔分裂的同时,还有助于血管网络的形成。而是在原有血管的基础上,促进新血管形成的过程。“肿瘤的生长和转移依赖于血管生成”是udahFolkman于1971年首次提出的,在人体内血管内皮细胞起着很重要的作用,比如肿瘤血管生成。Jain还提出了“正常化”肿瘤血管来治疗肿瘤的想法。日前医学的研究表明,在医学领域中,抗肿瘤血管生成的研究已经成为了重点对象。此次研究的体外细胞,从研究结果可以看出来,MTT比色显示匍匐大戟醇提物能够对肿瘤细胞

有一定的抑制作用,但是对某些细胞没有抑制作用,比如正常的L6细胞,并且也可以从急性毒性实验结果可以看出,在匍匐大戟醇提物在抗肿瘤和抑制血管生成中是没有毒性的。这些结果说明匍匐大戟在抗肿瘤方面的价值非常重要;而且在RAECs迁移、增殖和成管等方面,匍匐大戟醇提物能具有一定的抑制作用,由此得出血管新生会受到匍匐大戟的抑制影响,通过匍匐大戟结果可以得知,匍匐大戟醇提物对血管内皮功能正常蛋白AKT和eNOS磷酸化相关的信号有一定的促进作用,能够使血管的蛋白表达和稳定的相关信号增加,成熟蛋白对Smad3和TGF-beta 1的表达,可推测匍匐大戟在肿瘤的生长方面有一定的抑制作用,这种抑制的表现是通过促进血管的稳定性和成熟来完成的;在裸鼠血清试验中,测定裸鼠血清中VEGF、PDGF-BB用的试剂盒是ELISA,结果可以看出,比较于对照组,给药组VEGF含量在裸鼠血清中减少了,而PDGF-BB在裸鼠血清中含量反而升高,由此推测匍匐大戟可对RAECs中VEGF分泌起到抑制作用,从而抑制血管新生,还可以对PDGF-BB分泌有一定的促进作用,进而促进了血管的成熟性和稳定性。该实验结果与Western blot的研究具有一致性。总而言之,从一定程度上来讲,匍匐大戟能够抵抗肿瘤,而且分子机制能够抑制肿瘤血管的新生,此过程还是对内皮细胞的调节和血管新生相关的生长因子且分子如VEGF,PDGF-BB等来完成的抑制作用,与此同时,还可以使新生血管的成熟性和稳定性得到提升,逐渐促进肿瘤血管的正常化。

参考文献

- [1] 张蓓蓓,戴源,廖志新.大戟属植物的化学成分及药理活性研究进展[J].东南大学学报:医学版,2016,29(1):99.
- [2] 郑万钧,傅立国.中国植物志[M].7卷.北京:科学出版社,2015,30(1):56-58.
- [3] 阎锡蕴.肿瘤新生血管及分子靶向治疗新策略[J].生物物理学报,2015,31(26):180.
- [4] lu dongli. Study on the effect and mechanism of phlegm water tincture on the mice of ascites tumor[J]. Second military medical university, 2016,35(1):95-97.
- [5] 赵洪雯,余荣杰.大鼠内皮祖细胞的分离培养与鉴定[J].重庆医学,2016,45(36):1836.
- [6] 何风雷.狼毒大戟二萜内酯对人癌细胞体外抑制作用的研究[J].中药材,2016,38(23):623.
- [7] 王顺官,王筱婧,李琳,等.灵芝孢子粉对人肝癌细胞HepG2及裸鼠移植瘤生长的抑制作用[J].世界华人消化杂志,2015,23(16):1114.
- [8] hu xiaodong. QingChen. The role of receptor tyrosine kinase in tumor angiogenesis[J]. Medical review,2016,35(5):68-70.

[9]肖炜明,卜平,龚卫娟. 汉黄芩素抗肿瘤和免疫调节作用的研究进展[J]. 中国中药杂志,2017,39(14):3004.

[10]金惠铭. 血管新生与疾病[J]. 细胞分子病理生理学,2016,5(3):266-281.

[11]胡小冬,卿晨. 受体酪氨酸激酶在肿瘤血管新生中的作用[J]. 医学综述,2015,40(1):57-59.

[12]peng fang, Chen Ming. Research progress of anti-angiogenesis and tumor vessel normalization[J]. China lung cancer journal,2016,38(2):70-73.

[13]吕东来. 消痰利水酊剂对于艾氏腹水瘤小鼠的作用及机理研究[J]. 第二军医大学,2015,40(3):86-89.

[14]彭芳,陈明. 抗血管生成和肿瘤血管正常化的研究进展[J]. 中国肺癌杂志,2016,38(2):70-73.

[15]zhang beiBei, dai yuan, liao zhixin. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of euphorbia[J]. Journal of southeast university:medical edition,2015,30(1):90.

(2018-04-15 收稿 责任编辑:徐颖)

世界中联第十届中医儿科国际学术交流大会
世界中联儿科专业委员会换届改选会议
通 知

经世界中医药学会联合会批准,世界中联第十届中医儿科国际学术交流大会将于 2018 年 7 月在新加坡(7.21 - 7.23)、马来西亚(7.24 - 7.28)召开。会议由世界中医药学会联合会儿科专业委员会、新加坡中医研究院联合主办。

世界中联儿科专业委员会第二届理事会任期已届满,本次会议期间将同时召开儿科专业委员会换届改选会议,产生第三届理事会。本次改选工作将按照世界中联专业委员会章程要求,在海内外中医儿科同行中广泛发动,按条件遴选产生新一届理事会。通知如下:

一、大会主题

中西医儿科团结合作,为各国儿童健康服务

二、会议内容

助力一带一路建设,推进中医儿科国际学术交流与合作

在新加坡、马来西亚两国举办世界中联第十届中医儿科国际学术交流大会召开世界中联儿科专业委员会换届改选会议

三、征文内容

1. 著名中医西医儿科专家学科前沿学术报告
2. 儿科热点疾病的临床与实验研究成果报告
3. 外治疗法推拿疗法针灸疗法儿科临床应用
4. 面向国际的循证性中医临床诊疗指南研究

5. 中医儿科医疗、教学、科研工作经验交流

四、征文要求

见《儿科通讯》78 期。

五、会议日程

7 月 21 日报到,20:00 - 21:30 儿科专业委员会换届改选会

7 月 22 - 23 日第十届中医儿科国际学术交流大会新加坡学术交流、访问

7 月 24 - 27 日第十届中医儿科国际学术交流大会马来西亚学术交流、访问

7 月 28 日返程

六、会议费用

注册费:新加坡代表每人 150 新元;中国及其他国家地区代表每人:300 新元,或人民币 1500 元。差旅正联系旅行社办理。以上两项费用交付办法待通知。往返机票自购。

七、联系方式

联系人:戴启刚(中国):86 - 18112938805

Sally Koh(新加坡):65 - 97973096,联系邮箱:szlek@126.com

世界中医药学会联合会儿科专业委员会
2017. 12. 14