

温阳通窍中药复方对大鼠脑胶质瘤作用机制的体内实验研究*

李文畅¹, 沈洪昇¹, 白雪², 冯文茹¹, 胡人杰¹, 周洁²

(1.天津市医药科学研究所, 天津 300020; 2.天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150)

摘要: [目的] 研究温阳通窍中药复方对大鼠 C6 脑胶质瘤的抑制作用机制。 [方法] C6 胶质瘤细胞大鼠颅内接种, 建立脑胶质瘤模型。磁共振成像(MRI)条件下将模型动物随机分为对照组、温阳通窍复方低剂量组和高剂量组。除对照组外, 其余各组给予对应剂量的药物, 3 周后取脑胶质瘤组织, 进行病理组织学检测并进行相关分析, 检测基质细胞衍生因子-1(SDF-1)、结缔组织生长因子(CTGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)指标。 [结果] MRI 检测表明体内实验成功构建大鼠脑胶质瘤模型。组织病理学观察结果显示, 与对照组动物相比, 给药组动物肿瘤微血管减少, 可见变性坏死瘤细胞, 瘤组织坏死较对照组明显, 高剂量治疗组略强。温阳通窍给药组 SDF-1、CTGF、bFGF 较对照组呈降低趋势。 [结论] 温阳通窍中药复方对 C6 脑胶质瘤细胞的增殖确有抑制作用, 该作用或许与肿瘤组织中 SDF-1、CTGF、bFGF 的表达相关。

关键词: C6 脑胶质瘤; 温阳通窍中药复方; SDF-1; CTGF; bFGF

中图分类号: R285.5A

文献标志码: A

文章编号: 1673-9043(2015)03-0156-04

脑胶质瘤是神经系统最常见的肿瘤, 占脑内肿瘤的 40%~50%^[1], 恶性度高, 同时也是颅内预后最差的肿瘤, 近 30 年来对脑胶质瘤的治疗并没有显著突破^[2]。目前常规治疗方法是手术切除辅以化疗, 术后易复发^[3], 临床将卡莫司汀作为基本化疗药物。研究发现, 多种中药及复方对肿瘤有抑制作用^[4-5]或对抗肿瘤药物产生增效减毒作用^[6], 且因中药具有较高的安全性, 故而被应用在肿瘤治疗中。

温阳通窍中药复方由附子、麻黄、桂枝、蜈蚣、鳖甲、黄芪、川芎、当归、泽泻、防己、藁本等药物组成, 攻痰逐湿, 清热解毒, 从整体角度祛邪扶正。笔者尝试以温阳通窍中药复方治疗大鼠 C6 脑胶质瘤, 检测其相关指标, 探讨温阳通窍中药复方对脑胶质瘤的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞 实验动物: SD 大鼠, 雄性, 体质量 220~240 g, 购自中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 动物许可证号 SCXK-(军)2009-007, 动物合格证号 0001506。大鼠

脑胶质瘤 C6 细胞: 由天津医科大学总医院惠赠。

1.1.2 试剂 温阳通窍中药复方生药材, 由天津中医药大学第二附属医院药剂科提供。培养基(DMEM/F12), Gibco 公司, 批号 1285082。钆双胺注射液, 规格 15 mL:4.305 g, 通用电气药业(上海)有限公司生产, 批号 11870116。水合氯醛, 规格 100 mL:10 g, 购自天津医科大学总医院, 院内制剂。康派特医用胶喷雾型, 规格: 喷雾型每只 1.5 mL, 批号 120125。Hyclone 血清, 天津瑞博星科技有限公司, 批号 GDB0058。RNA 提取枪尖、EP 管等耗材, 购自 Axygen 公司。RNA 提取试剂盒, 北京百泰克公司的 RP2402。RNA 酶抑制剂, 购自 Invitrogen 公司, 批号 15518012。cDNA 逆转录试剂盒, 购自 Invitrogen 公司, 批号 C28025032。实时定量聚合酶链反应(PCR)耗材, 购自 ABI 公司, 批号 4306737、4360954。SYBR 染料, 购自 ABI 公司, 批号 4472918。PCR 引物, 购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 仪器 培养瓶, 规格 25 mL、75 mL, 美国 Corning 公司, 批号: 430168。二氧化碳(CO₂)孵育箱(C-2021型), TyTe 公司。内热蒸汽消毒器(yxQG02), 山东新华医疗器械厂。台式离心机(LD4-2型), 北京医用离心机厂。PL-203 型电子天平, Mettler-Toledo 公司产品。生物光学显微镜, 日本产 Nikon。96 孔板(655180), Greinerbio-one。微量进样器, 规格 25 μL,

* 基金项目: 天津市科技支撑计划项目(11JCYBJC12500)。

作者简介: 李文畅(1988-), 女, 研究实习员, 从事肿瘤药物研发。

通讯作者: 周洁, E-mail: cnzhoujie@126.com。

上海高鸽工贸有限公司。磁共振成像(MRI),西门子 Verio3.0 T 成像系统。

1.2 实验方法

1.2.1 药物溶液的制备 将生药材 600 g 用 2400 mL 冷水浸泡,静置过夜。将浸泡药物煎制 45 min 后过滤。取滤渣加入 1 500 mL 冷水继续煎制 20 min 后过滤。将两次滤液合并,浓缩得浸膏 175 g。实验时配制成所需浓度。

1.2.2 动物造模 肿瘤接种过程^[7]:1)常规细胞培养。2)将处于对数生长期的细胞用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化、离心后,以含琼脂糖(15 g/L),不含血清的 DMEM/F12 混合培养液制备细胞悬液,细胞浓度为 $3 \times 10^7/\text{mL}$ 。3)大鼠用 10% 的水合氯醛麻醉,固定头部,常规消毒、铺巾、切开,暴露前囟,用牙科钻于中线右 3.5 mm、冠状缝后 1 mm 处钻孔。以颅骨表面计算,进针 3.5 mm,退 0.5 mm,皮质、白质交界处,接种 C6 细胞,以 25 μL 注射器吸取细胞悬液,接种量为 10 μL ,注射速度 1 $\mu\text{L}/\text{min}$,注射完毕留针 5 min。4)骨蜡封闭骨孔。5)表面皮肤伤口用医用胶粘合。大约 1 h 后动物苏醒,分笼饲养,随时观察动物的状态。观察 14 d 后,MRI 检测^[8],投照条件:层厚 1.5 mm, Fov 80 mm \times 80 mm(视野内),层距 0.15 mm,冠状、矢状及横断面 T1 加权 (TR/TE=540/22 ms),T2 加权 (TR/TE=4 400/22 ms),注射造影剂钆双胺注射液每只 0.4 mL,T1 加权扫描。

1.2.3 观测指标 按随机数字表法将造模成功大鼠分成对照组、低剂量组(含生药 6.5 g/kg)和高剂量组(含生药 26 g/kg)。连续灌胃给药 21 d,对照组灌胃等量蒸馏水。末次给药后 24 h,开颅取脑组织,做病理学观察,提取肿瘤组织做相关指标的 PCR 检测。

1.3 数据分析 应用 SPSS18.0 for windows 软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示,正态分布计量资料组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法,偏态分布计量资料

组间比较采用秩和检验,组间两两比较采用 Nemenyi 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 大鼠 C6 脑胶质瘤造模模型检测 MRI 法检测造模大鼠,正常大鼠脑组织(见图 1)无明显病理变化,接种 C6 脑胶质瘤大鼠脑组织(见图 2)可观察到接种位置异常信号,边界较清晰。

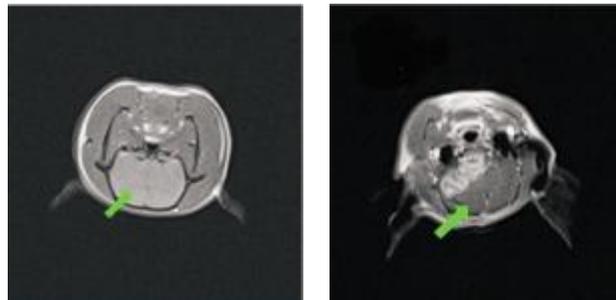


图 1 正常大鼠脑组织 图 2 C6 胶质瘤大鼠脑组织

2.2 病理学检测 经福尔马林液固定脑组织标本,取材于肿瘤接种部位,乙醇梯度脱水、包埋,制片、苏木精-伊红(HE)染色,显微镜观察,经 IDA-2000 高清晰度数码显微图像分析系统采图。病理结果见图 3、图 4、图 5。

造模大鼠脑组织对照组,可见瘤细胞密集,无一定排列,细胞异型性明显,细胞核分裂相易见,瘤细胞恶性特征明显,未见明显包膜,呈浸润性生长,可见肿瘤组织变性,中心可见明显的出血及小片状、大片状坏死或栅栏状坏死。正常脑组织与肿瘤交界处虽能见到肿瘤细胞浸润,但仍能见到一个较明显的界线,肿瘤微血管丰富。药物作用后,瘤细胞仍具恶性特征,肿瘤微血管减少,可见变性坏死瘤细胞,瘤组织坏死较对照组明显,高剂量治疗组略强。提示温阳通窍中药复方具有一定抗肿瘤作用。

2.3 相关指标 测定脑胶质瘤组织中的基质细胞衍生因子-1(SDF-1)、结缔组织生长因子(CTGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)肿瘤生长和转移

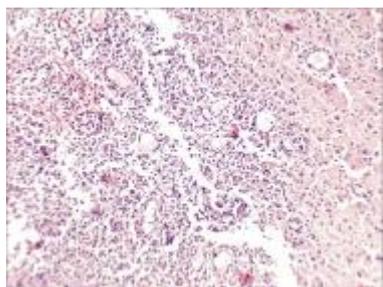


图 3 对照组(HE 染色 $\times 100$)

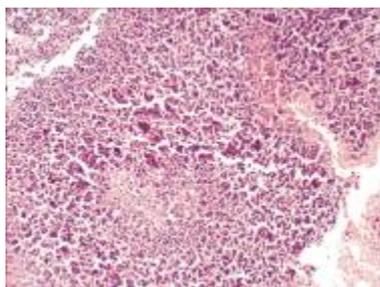


图 4 低剂量组(HE 染色 $\times 100$)

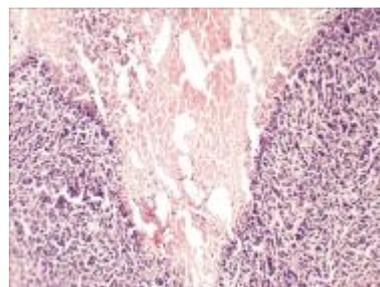


图 5 高剂量组(HE 染色 $\times 100$)

相关因子的表达,结果见表1、图6、图7、图8。结果表明温阳通窍高剂量组和低剂量组的3种因子水平均低于对照组。

表1 脑胶质瘤组织指标检测($\bar{x} \pm s$) %

| 组别 | n | SDF-1 | CTGF | bFGF |
|------|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| 对照组 | 8 | 0.348 1±0.144 5 | 1.016 5±0.292 7 | 0.298 1±0.192 1 |
| 低剂量组 | 8 | 0.297 4±0.075 1 | 0.552 0±0.329 8 | 0.187 5±0.051 1 |
| 高剂量组 | 8 | 0.276 4±0.173 9 | 0.699 1±0.521 9 | 0.197 9±0.065 2 |

3 讨论

脑胶质瘤是原发性神经系统肿瘤中发病率较高的恶性肿瘤,MRI法可以较准确诊断其发病情况^[9]。由于脑胶质瘤发病位置特殊且易浸润生长,手术切除对周围组织容易造成损伤,故而往往不易切除完全,残余肿瘤细胞如果不能被机体自身免疫系统抑制和杀灭,则极有可能复发。临床常用化疗药物如卡莫司汀等会产生骨髓抑制、肝肾损伤等毒副作用,肿瘤细胞也会对药物产生耐药性^[10]。中医以整体观念,辨证论治,调动患者自身的调节机制,以达治愈疾病的目的^[11]。近年来,中药因其安全性较高逐渐成为抗肿瘤研究的新方向。中医学将气和血视为人体生理功能的重要基础,认为脑胶质瘤是由于脏腑功能失调,痰湿内生,感受外邪,上犯清窍,瘀阻脑络而产生。温阳通窍中药复方是治疗脑胶质瘤的经验方,由附子、麻黄、桂枝、蜈蚣、鳖甲、黄芪、川芎、当归、泽泻、防己、藁本组成。现代药理证明,方中君药附子性辛、甘,大热,有大毒,其性刚雄,通行十二经,温五脏之阳,具有回阳救逆,祛风除湿,散寒止痛等功效,且有抗炎抗肿瘤作用,张亚平等^[12]认为附子总生物碱能够改善小鼠乳腺癌的体寒血瘀体征,阻止肿瘤进展;桂枝、麻黄畅达阳气,使血脉通畅;川芎活血行气;黄芪补气升阳,行滞通痹,脱毒排脓^[13];鳖甲主消散,蜈蚣善走窜,两者软坚散结,对肿瘤细胞增长有抑制作用^[14-15],凡气血凝聚之处皆能开之,亦有黄芪鳖甲汤用于肿瘤治疗的临床案例;

藁本祛风散寒,泽泻、防己利水消肿,化浊降脂。本方祛邪扶正,清热解毒,活血通络,软坚散结,调节机体内在功能的平衡,从整体上抑制肿瘤的发生发展。

肿瘤发生发展的重要条件是血管生成,许多生长因子如bFGF、CTGF等都与肿瘤的增长和侵袭密切相关。SDF-1是细胞趋化因子的一种,该因子的表达及其受体CXCR4与人类多种肿瘤密切相关^[16]。该因子参与肿瘤细胞的增殖与生长,增加了肿瘤细胞向远处转移的活性,同时,SDF-1能够加快肿瘤细胞的增殖,提高其生存力,并通过与CXCR4的结合对肿瘤细胞转移起到趋化作用。CTGF是结缔组织生长因子,它与细胞外基质相互作用,可调节细胞间的黏附与细胞迁移,促进有丝分裂的发生,参与血管生成,与恶性肿瘤的发生发展、浸润转移均密切相关^[17]。CTGF是转化生长因子(TGF-beta)的下游介质,可被TGF-beta诱导产生。有文献报道在人乳腺癌细胞MCF-7中CTGF作为前凋亡因子,部分下调bcl-2蛋白表达,增强Caspase-3活性,能够促进细胞凋亡^[18]。Lee等^[19]通过基因角度的分析证明CTGF沉默能够降低胶质瘤细胞的迁移。碱性成纤维细胞生长因子bFGF具有促有丝分裂和诱导血管生成的作用,能够促进细胞迁移。文献指出bFGF在肿瘤组织中的含量与肿瘤的恶性程度正相关^[20]。

本课题组对SDF-1、CTGF、bFGF进行了检测,温阳通窍中药复方作用下肿瘤组织中3个指标含量均低于对照组,尽管没有统计学意义,但结合相关实验结果综合分析,考虑其对C6脑胶质瘤的抑制作用与该因子降低趋势呈一定的相关性。在今后相关实验中,如增加实验样本数量、延长用药时间,该相关指标或许能够得到更为满意的结果。综上所述,温阳通窍中药复方制剂所具有的抗肿瘤作用机制尚需进一步深入的探讨。

参考文献:

[1] 虞欢东,于海涛,夏建国,等.顺铂联合吡柔比星对脑胶质

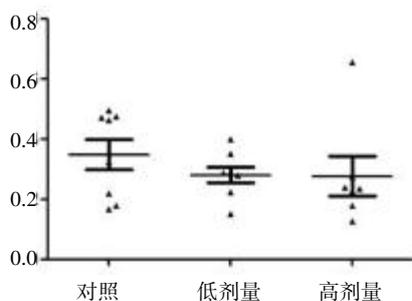


图6 SDF-1

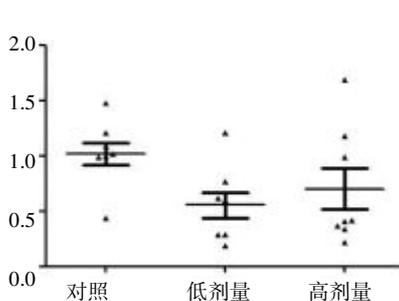


图7 CTGF

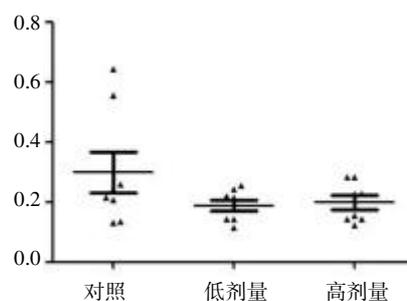


图8 bFGF

- 瘤 U87 细胞株增殖的抑制作用[J].中国现代医生, 2014, 52(15):1-3.
- [2] 徐培坤,邓鹏程,朱立新,等.脑胶质瘤中 ppENK、EDNRB 和 CLDN-7 基因甲基化状态的研究[J].安徽医科大学学报, 2014, 49(8):1124-1127.
- [3] 张兰凤,肖学文.髓鞘碱性蛋白在脑胶质瘤的表达和临床意义[J].赣南医学院学报, 2014, 34(3): 352-353.
- [4] 张文谨,彭 瑶,连增林,等.复方苦参注射液对子宫内瘤 HEC-1B 细胞 Bcl-2/Bax、P27 表达的影响[J].天津中医药大学学报, 2012,31(2):88-91.
- [5] 陈 伟,刘华一.中医药防止胃癌前病变机制的实验研究进展[J].天津中医药大学学报, 2007,26(1):54-56.
- [6] 胡文雷,张 燕.加味生脉散合瓜蒌薤白半夏汤防治阿霉素引起心脏毒性的临床观察[J].中国中医药科技, 2014, 21(3):318-320.
- [7] 王伟民,朱 诚,张光霁,等.脑立体定向接种 C6 细胞建立大鼠脑胶质瘤模型[J].中华实验外科杂志, 1995,12(4): 221-222.
- [8] 王自勇,王 鹏,杨渭川,等.大鼠 C6 脑胶质瘤生长规律的 MRI 与病理学观察[J].安徽医学, 2009, 30(12): 1423-1426.
- [9] 李 颖,马 林.脑胶质瘤动物模型的构建和 MRI 研究进展[J].中国医学影像学杂志, 2014(5): 387-390.
- [10] 安玉胜.脑胶质瘤细胞系 U251 中 Nanog 基因表达和细胞耐药及侵袭力的关系[J].军医进修学院学报, 2012,33(11):1164-1166.
- [11] 郑文科,商洪才.中医药在防治肿瘤中的特色和优势[J].天津中医药大学学报, 2010,29(3):166-168.
- [12] 张亚平,杜钢军,孙 婷,等.附子总生物碱对乳腺癌小鼠的抗肿瘤作用[J].中草药, 2012,43(10):1986-1990.
- [13] 陈 璇,东 方.黄芪抗肿瘤机制研究进展及临床应用[J].黑龙江医药, 2014,26(1):985-986.
- [14] 罗庆东,王月飞,赵红晔,等.鳖甲煎丸对肝癌荷瘤小鼠肿瘤组织生长及转移的影响[J].中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14):230-231.
- [15] 蔡文武,李清龙,苗雄鹰,等.蜈蚣提取液对大鼠胰腺癌治疗作用的研究[J].中国医师杂志, 2013,15(12):1646-1649.
- [16] 郑淑芳,展晓红,时丽芳,等.大肠癌中 SDF-1 与 CXCR4 的表达及临床意义[J].临床与实验病理学杂志, 2013, 29(1):9-13.
- [17] Garcia P, Leal P, Ili C, et al. Inhibition of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in gallbladder cancer cells leads to decreased growth in vitro[J].Int J Exp Pathol, 2013, 94(3):195-202.
- [18] Hishikawa K, Oemar BS, Tanner FC, et al. Connective tissue growth factor induces apoptosis in human breast cancer cell line MCF-7[J]. J Biol Chem, 1999, 274(52):37461-37466.
- [19] Lee HK, Bier A, Cazacu S, et al. MicroRNA -145 is downregulated in glial tumors and regulates glioma cell migration by targeting connective tissue growth factor[J]. PLoS One, 2013,8(2):e54652.
- [20] 陈文慧,徐 萌.肿瘤治疗新靶点:碱性成纤维细胞生长因子及其受体信号[J].中国肿瘤临床, 2014, 41(7):466-470.

(收稿日期:2015-03-01)

In vivo study of traditional Chinese medicine Wenyang Tongqiao effect on rat Glioma mechanism

LI Wen-chang¹, SHEN Hong-sheng¹, BAI Xue², FENG Wen-ru¹, HU Ren-jie¹, ZHOU Jie²

(1. Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China; 2. The Second Hospital Affiliated to Tianjin University of TCM, Tianjin 300150, China)

Abstract: [Objective] To study Wenyang Tongqiao traditional Chinese herbal compound inhibition on rat C6 glioma mechanism. [Methods] Put C6 glioma cells in rats with intracranial inoculation, and establish glioma model. Under the MRI (magnetic resonance imaging) conditions the animals were randomly divided into a control group model, Wenyang Tongqiao compound low dose and high dose group. In addition to the control group, the rest of the group was given the corresponding doses of the drug. After three weeks, extract glioma tissue, and use histopathological detection and correlation analysis to detect SDF-1 (stromal cell-derived factor 1), CTGF (connective tissue growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) indicators. [Results] MRI detected that successfully rat glioma model in vivo tests is constructed. Histopathological observation showed that, compared with control animals, tumor microvessels of animals administered reduce. Visible necrosis of tumor cells, tumor necrosis are more obvious compared with the control group, and the high dose group was slightly stronger. Wenyang Tongqiao administration group SDF-1, CTGF, bFGF compared with the control group showed a decreasing trend. [Conclusion] Wenyang Tongqiao Chinese herbal compound on C6 glioma cell proliferation inhibition indeed, perhaps related to the role of the SDF-1, CTGF, bFGF expression in tumor tissue.

Key words: C6 glioma; Wenyang Tongqiao; SDF-1; CTGF; bFGF