

To Discuss the Effect and Mechanism of LBP on Colorectal Cancer in Mice Based on the Induction of Tumor Interstitial Vascular

Zhiqing Zhou¹, Yuanyuan Li², Zhiwen Xu³, Wenli Mao¹, Biaoyan Du¹, Yanli He^{1*}

¹School of Basic Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong

²Guangzhou Institute of Respiratory Health, Guangzhou Guangdong

³Clifford School, Guangzhou Guangdong

Email: *blhhh@gzucm.edu.cn

Received: Jul. 3rd, 2019; accepted: Jul. 23rd, 2019; published: Jul. 30th, 2019

Abstract

Objective: To investigate the effect and mechanism of *Lycium barbarum* polysaccharides (LBP) on the growth and angiogenesis of mice with colorectal cancer. **Methods:** Firstly, we observed LBP administration inhibition effect of tumor growth and drew the tumor growth curve based on the CT26 colorectal cancer mouse model we built. Then, CD31 expression of tumor tissue sections, detected by immunohistochemical, was to measure the tumor interstitial microvascular density. Secondly, rat aortic ring experiment was to confirm the effect of LBP on angiogenesis. *In vitro* RT-PCR was used to detect the effect of LBP on the expression of brain specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1). **Result:** The tumor growth curve found that LBP could inhibit the growth of mouse model of colorectal cancer tumor, the tumor weight of LBP group was (0.31 ± 0.04) g which was significantly less than that of the control group (0.63 ± 0.06) g ($P < 0.05$), CD31 staining showed that the tumor interstitial microvascular density (42.3 ± 3.28) of control group was more than that of LBP group (31.6 ± 2.45) ($P < 0.05$; LBP); the concentration of microvascular of LBP was less than that of control group, the obvious inhibitory angiogenesis effect was observed on rat aortic ring, which was related with the LBP concentration. *In vitro* LBP could increase the expression of BAI1 mRNA (brain tissue specific angiogenesis inhibitor 1). **Conclusion:** The inhibitory effect of LBP on the growth of colorectal cancer in mice may be related to the inhibition of angiogenesis and upregulation of BAI1 expression, but the specific mechanism needs further clarification.

Keywords

Lycium barbarum Polysaccharides, Colorectal Cancer, Angiogenesis

基于影响肿瘤间质血管生成探讨枸杞多糖抗小鼠结直肠癌作用及机制

*通讯作者。

文章引用: 周芷晴, 李媛媛, 徐志文, 茆文莉, 杜标炎, 何彦丽. 基于影响肿瘤间质血管生成探讨枸杞多糖抗小鼠结直肠癌作用及机制[J]. 中医学, 2019, 8(4): 293-299. DOI: 10.12677/tcm.2019.84049

周芷晴¹, 李媛媛², 徐志文³, 茆文莉¹, 杜标炎¹, 何彦丽^{1*}

¹广州中医药大学基础医学院, 广东 广州

²广州呼吸健康研究院, 广东 广州

³广州市番禺区祈福英语实验学校, 广东 广州

Email: blhhh@gzucm.edu.cn

收稿日期: 2019年7月3日; 录用日期: 2019年7月23日; 发布日期: 2019年7月30日

摘要

目的: 观察枸杞多糖(Lycium barbarum polysaccharide, LBP)对小鼠结直肠癌皮下移植瘤生长的抑制作用, 并探讨其作用的可能机制。方法: 建立CT26小鼠结直肠癌皮下移植瘤模型, LBP给药12天, 观察小鼠状态, 测量移植瘤长短径绘制肿瘤生长曲线; 肿瘤组织切片免疫组织化学方法检测CD31蛋白表达, 观察肿瘤间质血管密度改变; 大鼠动脉环实验观察LBP对血管形成的影响。体外实验RT-PCR检测LBP对血管生成抑制因子1 (BAI1)表达的影响。结果: 肿瘤生长曲线发现LBP可抑制小鼠结直肠癌皮下移植瘤的生长, LBP给药组小鼠肿瘤体质量为 0.31 ± 0.04 g明显小于对照组 0.63 ± 0.06 g ($P < 0.05$), CD31染色显示LBP给药组肿瘤间质微血管密度为 31.6 ± 2.45 , 小于肿瘤模型组 42.3 ± 3.28 , 差异具统计学意义($P < 0.05$); 同时发现LBP对大鼠动脉环血管形成具有明显抑制作用, 且呈浓度依赖性; RT-PCR检测发现LBP可上调BAI1 mRNA表达。结论: LBP具有抗小鼠结直肠癌肿瘤生长的作用, 其机制可能与抑制肿瘤微血管形成、上调BAI1表达有关, 其具体的作用机制有待进一步探究。

关键词

枸杞多糖, 结直肠肿瘤, 血管形成

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

结直肠癌(CRC)是我国常见恶性肿瘤之一, 其死亡率在全部恶性肿瘤中持续位居前 5 位, 文献报道 2015 年男性新增患病人数 21.57 万, 女性新增 16.06 万, 男性死亡人数为 11.11 万, 女性为 8 万[1], 对人类健康及生命造成严重威胁。近年来, 抗血管治疗无论在基础研究还是临床应用中都取得了一定的成果, 如贝伐单抗是美国食品药品监督管理局批准的一线治疗 CRC 的重组人源化单克隆抗体, 但靶向抗肿瘤血管药物却存在价格昂贵、容易出现不良反应及药物耐药等缺点。我国传统中医药治疗肿瘤具有提高机体整体的抗癌能力及多靶点的特点, 同时中药价格低廉, 毒副作用小, 联合治疗可以减轻靶向药物的毒副作用, 可望弥补此类药物的缺陷[2] [3]。本课题组前期实验结果表明 LBP 可抑制自发性乳腺癌 MMTV-PyMT 小鼠肿瘤生长, 并抑制肿瘤细胞增殖和血管新生[4], LBP 是否对结直肠癌肿瘤具有同样的作用? 其具体作用机制是什么需要深入探讨。

2. 仪器和材料

2.1. 仪器

二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司); 超净工作台(苏州净化), 白光拍摄显微镜(奥林巴斯日本)。

2.2. 实验动物与细胞

6~8 周 SD 大鼠 6 只, 雌性, 体重(200 ± 20) g, 购于广东省医学实验动物中心, 许可证号: SCXK (粤) 2013-0002。

6~8 周 Balb/c 小鼠 16 只, 雄性, 体重(20 ± 2) g, 购于广东省医学实验动物中心, 许可证号: SCXK (粤) 2013-0002。实验动物饲养于室温 $20^{\circ}\text{C} \sim 26^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 40%~70% 的环境中, 昼夜明暗光照时间(12 h 明/12 h 暗)。

小鼠结直肠癌细胞 CT26 和人真皮微血管内皮细胞 HDMEC 由本实验室保种。

2.3. 实验药物与试剂

LBP (质量分数大于 50%) 购于中国西安开来生物工程有限公司, 生产批号: K140828; CD31 抗体购于 Abcam 公司, 免疫组化抗兔二抗购于中国北京中杉金桥生物技术公司; PCR 引物由中国英潍捷基公司合成, DAB 购于美国 CST 公司; Matrigel 购于美国 BD 公司, SYBR Green Mix 和逆转录试剂盒购于 Takara 公司。

3. 方法

3.1. 建立小鼠结直肠癌模型

小鼠随机分为对照组和实验组, 每组 8 只, 将对数期生长的 CT-26 细胞按照每只小鼠 $2 \times 10^5/0.2\text{ml}$ 接种于小鼠左侧腋前皮下。4 天后可见肿瘤长出, 开始给药, 依据实验室之前研究基础[5] [6], 选取最佳给药浓度为 $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 腹腔注射, 每 2 天给药 1 次, 游标卡尺测量肿瘤的长短径 1 次/2 天, 绘制肿瘤生长曲线, 共给药 12 天。在给药结束后, 脱臼处死小鼠, 肿瘤剥离后称重, 放入体积分数为 10% 甲醛溶液固定 24 小时, 常规脱水石蜡包埋、病理制片。

3.2. 免疫组化染色

常规脱蜡 - 切片, PBS 洗 3 次, 每次 5 分钟, 柠檬酸钠修复液(PH 6.0)高温高压热修复 8 分钟, 自然冷却后放入 3% H_2O_2 甲醇溶液 37°C 浸泡 30 分钟, PBS 洗 3 次, 每次 5 分钟, 加 10% BSA 封闭, 加 CD31 一抗置于 4°C 过夜; 将组织切片从封闭盒中取出继续孵育 1 小时, PBS 洗 3 次, 每次 5 分钟; 滴加二抗置于室温孵育 1 小时, PBS 洗 3 次, 每次 5 分钟; DAB 显色 10 秒, 流水冲; 苏木素复染 30 秒, 流水冲。常规脱水, 中性树胶封片, 自然晾干。每次实验设立阳性和阴性对照[4]。

3.3. 大鼠动脉环实验

6~8 周龄 SD 雄性大鼠, 乙醚麻醉后脱臼处死; 将大鼠浸泡于 75% 酒精中 2 分钟, 打开胸腔, 沿脊柱剪下大鼠胸主动脉; 将血管置于大培养皿中, 加入无菌 PBS 洗 3 遍, 除去血液, 剥离剔除血管周围结缔组织, 将血管剪成 1 mm 高圆环; 用 4°C 预冷中枪头加 matrigel $100 \mu\text{L}$ 入 48 孔板中, 避免气泡产生, 轻轻拍打使其分布均匀, 放入 37°C 细胞培养箱中 15 分钟使 matrigel 凝固; 将剪好的血管环放入凝固的 matrigel 中, 使其位于中央, 再加入 matrigel $100 \mu\text{L}$, 避免气泡, 放入 37°C 细胞培养箱中 15 分钟使 matrigel 凝固。根据预实验, 选取 LBP 药物浓度为 $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ 及 $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 两个浓度, 用 EBM 培养基配制, $500 \mu\text{L}/\text{孔}$, 每天观察血管生长情况, 8 天后, 向 48 孔板中加入 4% 多聚甲醛固定液, 室温固定 30 分钟后拍照。

3.4. QPCR 检测 HUMED 中 BAI1 基因的表达

细胞培养, 对数期生长的细胞汇合度达到 90%, 消化, 计数, 于 $1.0 \times 10^5/\text{孔}$ 铺六孔板。第二天, 弃

掉培养基, 用 EBM 培养基配置 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LBP 为给药组, 对照组加入相同体积的 EBM 培养基, 培养 48 小时。48 小时后, 弃掉培养基, PBS 洗 3 次, 弃掉 PBS; RNA 提取、逆转录严格按照试剂说明书进行, cDNA 用 DEPC 稀释 8 倍后, 按照试剂盒说明进行操作分析。

利用 Primer5.0 进行引物设计, BAI1 引物序列如下:

Primer 1 5'-CAGAGGAGCAGGTGGACAGAGAAAG-3'

Primer 2 5'-TCAGGA GACAGTGGAAGCAGCG-3'。

3.4. 数据处理

肿瘤组织血管密度采用 Image pro plus 软件对结果进行处理, 血管环周长用 ipip 软件计算。所有数据采用 GraphPad Prism 5.0 软件作图。数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 两组间用两独立样本 t 检验方法, $P < 0.05$ 具有统计学差异。

4. 实验结果

4.1. LBP 对 CT26 小鼠结直肠肿瘤生长的作用

LBP 给药组 CT26 结直肠癌小鼠肿瘤体质量为 (0.31 ± 0.04) g 小于对照组 (0.63 ± 0.06) g ($P < 0.05$) (见图 1(A)); 绘制肿瘤生长体积曲线, 发现枸杞多糖 LBP 可抑制小鼠肿瘤的生长 ($P < 0.05$) (见图 1(B))。

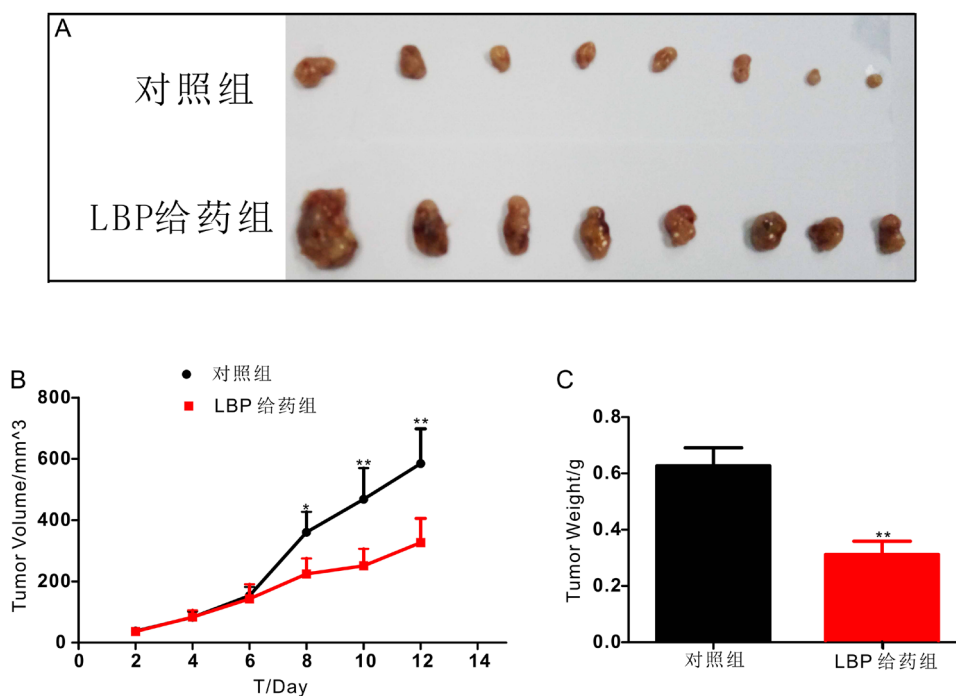


Figure 1. The effect of LBP on colorectal cancer growth in mice * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1. LBP 对小鼠结直肠癌肿瘤生长的影响 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4.2. LBP 对结直肠癌小鼠肿瘤间质血管的影响

CD31 单抗免疫组织化学染色检测肿瘤组织中的血管密度, 并在 $200\times$ 高倍视野 (HP) 下计数血管数目, 发现 LBP 给药组血管数 $(31.6 \pm 2.45)/\text{HP}$ 明显少于对照组 $(42.3 \pm 3.28)/\text{HP}$ ($P < 0.05$), 表明 LBP 可抑制肿瘤血管的形成 (见图 2)。

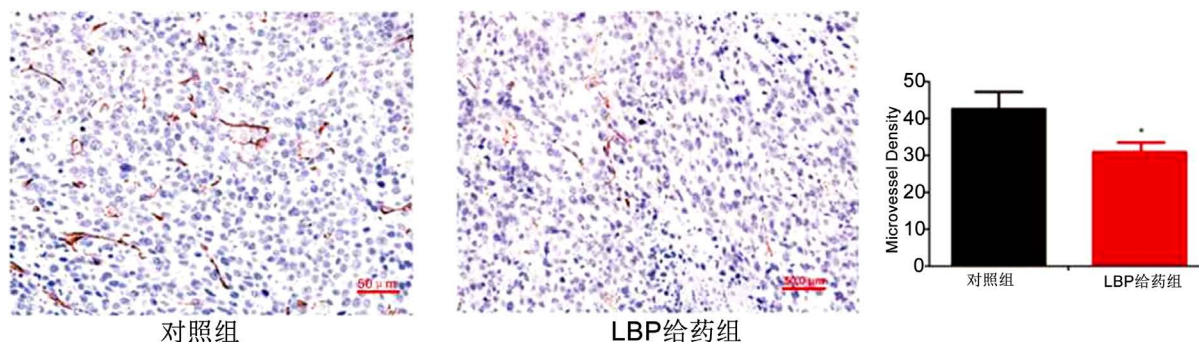


Figure 2. The effect of LBP on tumor vascular formation

图 2. LBP 对肿瘤血管形成的影响 * $P < 0.05$

4.3. LBP 对大鼠动脉环血管形成的影响

观察动脉环周围的新生成的血管数量发现, LBP 给药剂量分别在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时血管数明显少于对照组, 表明 LBP 对大鼠动脉环血管形成具有抑制作用, 且与浓度相关(见图 3)。

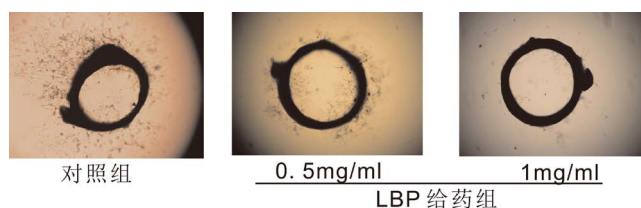


Figure 3. The effect of LBP on vascular formation in rat aortic ring assay

图 3. LBP 对大鼠动脉环血管形成的影响

4.4. RT-PCR 检测 LBP 对 HDMEC 内皮细胞 BAI1 表达的影响

LBP 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理 HDMEC 细胞 48 h, 检测 BAI1 mRNA 水平的变化, 发现与肿瘤模型组比较, LBP 给药后 BAI1 表达上调, 且具有统计学意义($P < 0.05$) (见图 4)。

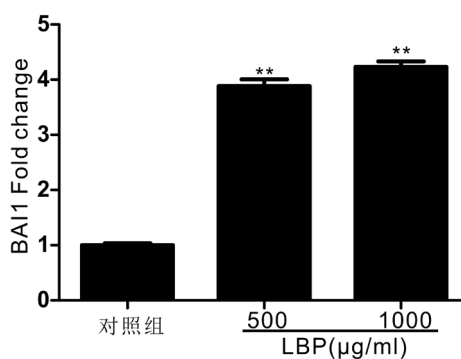


Figure 4. BAI1 expression of HDMEC cells after 48 h LBP treatment

图 4. LBP 处理 HDMEC 细胞 48 小时后, BAI1 的表达 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

5. 结论

恶性肿瘤侵袭与转移是肿瘤治疗失败的主要原因, 血管形成为肿瘤细胞提供了丰富的氧及营养物质, 为促进其转移等恶性生物学行为创造了条件[7]。抗血管生成药物通过切断恶性肿瘤细胞的养分补给, 并

阻断侵袭转移的血行通道,使肿瘤细胞静止于休眠状态,因此,以抑制肿瘤血管形成为目的的生物治疗受到广大研究者关注与青睐。

研究证实许多中药具有抗血管作用,例如[8]蜂毒素、去甲斑蝥素、蟾毒灵三种抗肿瘤中药对人体肝癌细胞 HepG2 细胞及人脐静脉内皮细胞 ECV304 细胞的生长均有不同程度抑制作用,在一定范围内呈浓度和时间的依赖性,鸡胚绒毛尿囊膜实验证实三种药物不同浓度均能抑制肿瘤血管形成($P < 0.01$)。潘子民等[9]研究发现人参皂苷 Rg3 可通过下调肿瘤 VEGF2mRNA 及蛋白的表达量,阻滞肿瘤血管生成。这些传统中医药治疗肿瘤具有多靶点的特点,以及价格低廉,毒副作用小的优势,联合给药渴望减少靶向药物使用剂量,弥补靶向药物抗肿瘤血管治疗方面的缺陷,从而为肿瘤的治疗开辟更好的途径。

本课题前期实验结果表明 LBP 可抑制 H22 肝癌腹水移植瘤模型小鼠外周血 VEGF 的表达[4],也发现 LBP 可抑制自发乳腺癌小鼠肿瘤间质血管形成[2]。本研究在体内实验中,采用 CT26 结肠癌小鼠皮下移植瘤模型 LBP 整体给药,与对照组比较,又一次验证了 LBP 对小鼠结肠癌皮下移植瘤的生长具有一定的抑制作用(见图 1),采用免疫组织化学检测发现肿瘤间质血管在给药后明显减少(见图 2),通过大鼠动脉环实验我们进一步发现 LBP 对血管形成具有抑制作用(见图 3),LBP 在体外细胞培养实验发现对细胞没有明显的细胞毒作用,推测 LBP 在体内抑制血管形成可能是通过一些复杂的微环境及细胞因子分泌变化,间接干扰或抑制了内皮细胞的功能,进而影响了血管的形成。

脑组织特异性血管生成抑制因子 1 (brain-specific angiogenesis inhibitor 1, BAI1)属于 G 蛋白偶联受体的 B 家族,是从人类脑组织中提取出来的一种抑癌基因。近年来研究证明人类肿瘤中 BAI1 表达水平与肿瘤的发生发展有着密切的关系,且具有抑制血管生成作用[10],而在许多肿瘤组织中,BAI1 的表达水平明显减低。BAI1 抗血管的作用一般认为是与其膜外区域经蛋白酶水解产生的 Vstat120 和 Vstat40 片段有关,研究表明 Vstat120 和 Vstat40 可与内皮细胞上的 CD36 结合,进而发挥抗血管生成作用[11],我们通过 RT-PCR 检测发现 LBP 可促进 BAI1 表达上调(见图 4),因此认为 LBP 抑制小鼠结肠癌肿瘤生长的作用可能与上调 BAI1 表达,间接抑制了血管形成有关,此方面的研究还有待进一步深入。由于 LBP 抗肿瘤作用具有多靶点的特征,其体内抑制肿瘤生长作用的机制还需要多方面深入探明。

基金项目

国家自然科学基金项目(No.81873154),广州中医药大学“高水平大学建设”项目(No.A1-AFD018171Z11003)。

参考文献

- [1] Chen, W., Zheng, R., Baade, P.D., et al. (2016) Cancer Statistics in China, 2015. *Ca: A Cancer Journal for Clinicians*, 66, 115. <https://doi.org/10.3322/caac.21338>
- [2] 李俊秀. 克拉霉素联合香菊胶囊治疗慢性鼻窦炎的疗效及安全性观察[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016(16): 142-143.
- [3] 沙湖, 梁翼, 余文景, 王翠萍, 王磊, 吴佳, 李敏. 雷公藤多苷片联合来氟米特治疗类风湿关节炎疗效及对白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 水平影响[J]. 临床军医杂志, 2019(4): 390-391.
- [4] 李媛媛, 亓翠玲, 周芷晴, 等. 枸杞多糖对自发乳腺癌 MMTV-PyMT 小鼠肿瘤生长和转移的作用[J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(6): 618-621.
- [5] 胡妮, 杜标炎, 谭宇蕙, 等. 从诱导树突状细胞成熟角度探讨枸杞多糖联合 CXC 趋化因子配体 10 抗癌作用机制[J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(4): 641-647.
- [6] 何彦丽, 应逸, 苏宁, 等. 枸杞多糖抗实验性肝癌作用及对 VEGF 表达与分泌的影响[J]. 广东医学, 2006, 27(7): 950-952.
- [7] Abdelrahim, M., Konduri, S., Basha, R., Philip, P.A. and Baker, C.H. (2010) Angiogenesis: An Update and Potential Drug Approaches. *International Journal of Oncology*, 36, 5-18. <https://doi.org/10.3892/ijo.00000470>

- [8] 翟笑枫, 吕详, 顾伟, 等. 三种抗肿瘤中药有效成分对人脐静脉内皮细胞生长的影响[J]. 中国药物与临床, 2011, 11(7): 752-754.
- [9] 潘子民, 叶大风, 谢幸, 等. 人参皂甙 Rg3 对荷卵巢癌的严重联合免疫缺陷鼠的抗肿瘤血管生成作用的研究[J]. 中华妇产科杂志, 2002, 37(4): 227-230.
- [10] Duda, D.G., Sunamura, M., Lozomehi, L., *et al.* (2002) Overexpression of the p53-Inducible Brain-Specific Angiogenesis Inhibitor 1 Suppresses Efficiently Tumor Angiogenesis. *British Journal of Cancer*, **86**, 490-496. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600067>
- [11] Klenotic, P.A., Huang, P., Palomo, J., Kaur, B., Van Meir, E.G., Vogelbaum, M.A., Febbraio, M., Gladson, C.L. and Silverstein, R.L. (2010) Histidine-Rich Glycoprotein Modulates the Anti-Angiogenic Effects of Vasculostatin. *The American Journal of Pathology*, **176**, 2039-2050. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090782>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网首页: <http://cnki.net/>, 点击页面中“外文资源总库 CNKI SCHOLAR”, 跳转至: <http://scholar.cnki.net/new>, 搜索框内直接输入文章标题, 即可查询;
或点击“高级检索”, 下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2166-6067, 即可查询。
2. 通过知网首页 <http://cnki.net/>顶部“旧版入口”进入知网旧版: <http://www.cnki.net/old/>, 左侧选择“国际文献总库”进入, 搜索框直接输入文章标题, 即可查询。

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: tcm@hanspub.org