

· 博士之窗 ·

低剂量环磷酰胺联合人参皂甙 Rg3 抑制小鼠肺癌肿瘤血管生成的实验研究

康欣梅¹ 张清媛¹ 佟丹丹² 赵文辉¹

摘要 目的 研究持续低剂量环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)联合人参皂甙 Rg3 对肺癌肿瘤血管生成的影响,观察其抑瘤效果、毒副反应及生存期。**方法** 以荷 Lewis 肺癌的 C57/BL6 小鼠为模型,随机分为 5 组:即低剂量 CTX 组(简称低 CTX 组)、最大耐受剂量 CTX 组(简称高 CTX 组)、人参皂甙 Rg3 组、低剂量 CTX 联合人参皂甙 Rg3 组(简称联合组)及模型组,治疗中观察肿瘤体积、小鼠体重和外周血白细胞计数及小鼠生存期,测定肿瘤微血管密度(microvascular density, MVD)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达情况。**结果** 低 CTX 组肿瘤生长比较缓慢,小鼠体重及外周血白细胞数均无明显下降,生存期延长;联合组抑瘤效果更持久而稳定,毒副反应未增加,小鼠生存期更长($P < 0.01$)。低 CTX 组较高 CTX 组 MVD 下降($P < 0.05$);与模型组比较,低 CTX 组和人参皂甙 Rg3 组 MVD 及 VEGF 表达均下降,两者合用时下降更明显($P < 0.05$)。**结论** 低剂量 CTX 与人参皂甙 Rg3 联合应用显示出明显的抗血管生成协同作用,抑瘤效果显著且持久,毒副反应小,生存期较单药治疗延长。

关键词 环磷酰胺;人参皂甙 Rg3;血管生成;肺肿瘤

Experimental Study on Anti-angiogenesis in Mice with Lewis Lung Carcinoma by Low-dose of Cyclophosphamide Combined with Ginsenoside Rg3 KANG Xin-mei, ZHANG Qing-yuan, TONG Dan-dan, et al. *Department of Internal Medicine, Affiliated Hospital of Oncology, Harbin Medical University, Harbin (150040)*

Abstract Objective To evaluate the anti-angiogenic effect of the combination of low-dose cyclophosphamide(CTX) and ginsenoside Rg3 in mice with Lewis lung carcinoma, and to observe the anti-tumor effect, toxicity, adverse reaction of the treatment and survival time of the tumor bearing mice. **Methods** Holland C57/BL6 Lewis lung carcinoma mice were taken as the model and randomly divided into 5 groups, i. e. the low-dose CTX (LDCTX) group, the maximum tolerable dose CTX (MTDCTX) group, the ginsenoside Rg3 (Rg3) group, the low-dose CTX combined with ginsenoside Rg3 group (LDCTX + Rg3), and the model group. Tumor volume, weight of mice, peripheral white blood cell counts and survival time of mice were observed, tumor microvascular density (MVD) and vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression were determined during the therapeutic course. **Results** In the LDCTX group, tumor grew comparatively slow, no significant decrease in body weight or peripheral white blood cells, and survival time was prolonged. In the LDCTX + Rg3 group, the tumor inhibitory effect was more persistent and steady without any increase of toxicity or adverse reaction. Besides, the survival time of mice was prolonged ($P < 0.01$). MVD was lower in the LDCTX group than that in the MTDCTX group ($P < 0.05$). Compared with the model group, MVD and VEGF expression were lower in the LDCTX and the Rg3 group, and the lowering action was more significant when the two drugs were used in combination ($P < 0.05$). **Conclusion** The combination of low-dose CTX and Rg3 has obvious synergetic action of anti-angiogenesis, it shows significant and persistent tumor inhibitory effect, with less toxic and adverse reaction, and could induce longer survival time than treatment of CTX or Rg3 alone.

Key words cyclophosphamide; ginsenoside Rg3; angiogenesis; pulmonary carcinoma

基金项目:黑龙江省科技攻关项目(No. GC03C604-2)

作者单位:1. 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院内科(哈尔滨 150040);2. 哈尔滨医科大学病理学教研室

通讯作者:康欣梅, Tel:0451-86298275, E-mail: kxm791107@163.com

化疗作为治疗晚期肺癌的主要方法,其毒副反应和耐药性的产生严重影响了治疗效果,采用持续低剂量给药方法,增加了靶向于肿瘤微血管的效果,并具有毒副反应小和不易产生耐药的优点^[1]。同时,该效果在合用另一种抗血管生成药物时更为明显^[2]。为跟踪国际研究进展,本实验中将低剂量 CTX 和抗血管生成中药人参皂甙 Rg3 联合应用于荷 Lewis 肺癌小鼠,观察其抗肿瘤血管生成作用、抑瘤效果、毒副反应及对小鼠生存期的影响,探讨它们联合应用的价值。

材料与方 法

1 材 料

1.1 Lewis 肺癌细胞株:购自上海细胞生物学研究所细胞库。

1.2 动物 C57/BL6 小鼠,6~8 周龄,雌性,体重 18~20g,购自北京实验动物中心。

1.3 药物 环磷酰胺(CTX):由江苏恒瑞医药公司生产;人参皂甙 Rg3:由吉林亚泰制药有限公司提供,从我国东北红参中提取,纯度为 99.5%。

1.4 试剂及仪器 CD34、VEGF 单克隆抗体及免疫组化试剂盒等,购自北京中山生物技术公司;美国 Coulter JT 型全自动血细胞分析仪、德国 Leica 切片 机、CS-B 型摊片烤片机等。

2 方 法

2.1 荷瘤小鼠模型的建立 将 Lewis 肺癌细胞置于完全培养基中培养,取生长良好的细胞,将浓度调整至 10^7 个/ml 以供注射。取 100 只 C57/BL6 小鼠,将 10^6 个/0.1ml Lewis 肺癌细胞接种于每只小鼠右季肋部皮下,待 1 周后肿瘤长至约 $100\sim 200\text{mm}^3$ 时开始抑瘤实验。

2.2 分组及给药方法 将荷瘤小鼠随机分成 5 组,每组 20 只,即模型组:予生理盐水(0.2ml/只)灌胃,每日 1 次;高 CTX 组:予 CTX 100mg/kg(0.2ml/只)隔日 1 次皮下注射,3 次后间歇 2 周再重复 3 次,共 6 次;低 CTX 组:予 CTX 25mg/kg 灌胃,每日 1 次;人参皂甙 Rg3 组:予人参皂甙 Rg3 10mg/kg 灌胃,每日 1 次;联合组:每日予 CTX 25mg/kg 加人参皂甙 Rg3 10mg/kg 灌胃(以上各组药物由生理盐水溶解 0.2ml/只灌胃)。各组用药时间均为 6 周。

2.3 观察项目及检查方法 每周观察下列项目,直至小鼠死亡。(1)瘤体积:用游标卡尺测量瘤体长径和短径,计算瘤体积(公式:体积 = 短径² × 长径/2),绘制各组肿瘤生长曲线;(2)体重:用天平称量小鼠体重;

(3)外周血白细胞数:小鼠尾静脉采血后用自动血细胞计数仪计数;(4)生存期;(5)测定肿瘤微血管密度(MVD)、血管内皮生长因子(VEGF)的表达。实验终末小鼠死亡时将肿瘤组织剥离,经甲醛固定、石蜡包埋后切片,采用 S-P 法染色,操作步骤按试剂盒要求进行,分别滴加 CD34 和 VEGF 单抗,以 PBS 代替一抗作阴性对照,以已知阳性的切片作阳性对照。

染色结果判定标准:MVD 测定以 CD34 单抗标记内皮细胞,任何胞浆染成棕色的内皮细胞或内皮细胞团,均按独立的微血管分别计数。计数时先于低倍镜下选择癌灶浸润最明显处,然后在 200 倍镜下计数 5 个视野内微血管数目,取其平均值作为微血管密度:VEGF 阳性表达为肿瘤胞浆棕染,阳性细胞数 $\geq 10\%$ 定为高表达, $< 10\%$ 为低表达。

2.4 统计学方法 计量资料采用方差分析,其中两两比较用 S-N-K 检验;计数资料采用 χ^2 检验中 Fisher 精确概率法;用 Kaplan-Meier 法作生存分析。所有数据均使用 SPSS 10.0 软件进行统计分析。

结 果

1 各组抑瘤效果比较 见图 1。模型组小鼠肿瘤迅速生长,生长曲线陡直;高 CTX 组在治疗初期肿瘤生长得到一定控制,但后期肿瘤又快速生长;低 CTX 组在治疗开始后第 2 周即可观察到肿瘤生长延缓($P < 0.01$),在较长一段时间内(几乎 50 天)肿瘤生长很缓慢;人参皂甙 Rg3 组较模型组肿瘤生长延缓,抑制作用较持久,与低 CTX 组相当;联合组的抑瘤效果较其各自单独应用时更为明显($P < 0.01$),肿瘤生长曲线低平。

2 各组小鼠治疗过程中体重及外周血白细胞变化比较 见图 2、3。模型组小鼠体重及外周血白细胞数无明显波动;高 CTX 组小鼠在每周期给药后 1 周内,即可观察到皮毛失去光泽、行动迟缓、反应迟钝、体重及外周血白细胞数下降等毒副反应($P < 0.01$);低 CTX 组及人参皂甙 Rg3 组小鼠毛色光泽,活动灵活,并没有明显的体重减轻或白细胞下降等毒性迹象;两者合用时毒副反应未增加($P > 0.05$)。

3 各组小鼠治疗后生存期比较 见图 4。模型组小鼠于接种后 43 天内全部死亡;高 CTX 组小鼠于接种后 60 天内全部死亡;低 CTX 组小鼠于接种后第 70 天时仍有 50% 存活,生存期较模型组和高 CTX 组均延长($P < 0.01$);人参皂甙 Rg3 组小鼠生存期明显延长,与低 CTX 组比较,差异无显著性($P > 0.05$);联

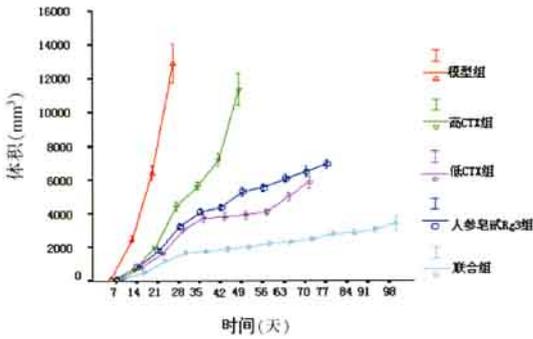


图 1 各组肿瘤的生长曲线

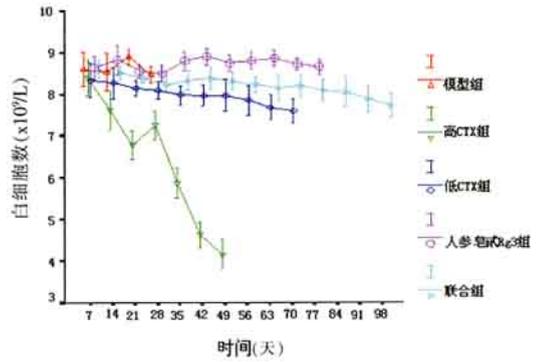


图 3 各组小鼠治疗过程中外周白细胞数变化比较

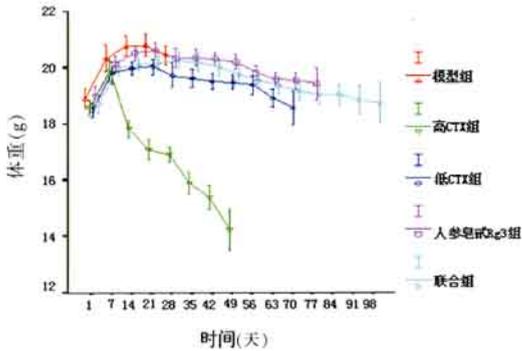


图 2 各组小鼠治疗过程中体重变化比较

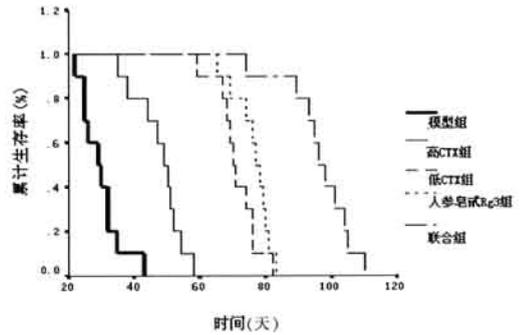


图 4 各组小鼠治疗后的生存曲线

合组小鼠生存期最长,第 96 天时 50% 小鼠仍存活 ($P < 0.01$)。

4 各组小鼠肿瘤组织 MVD 及 VEGF 表达比较见表 1。与模型组比较,各治疗组肿瘤组织 MVD 及 VEGF 的表达均下降,差异有显著性 ($P < 0.05$);与高 CTX 组比较,低 CTX 组肿瘤组织 MVD 表达下降 ($P < 0.05$);与低 CTX 组和人参皂甙 Rg3 组比较,联合组 MVD 及 VEGF 表达下降更多 ($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠肿瘤组织 MVD 及 VEGF 表达比较

组别	n	MVD (个/×200, $\bar{x} \pm s$)	VEGF(例)	
			低表达	高表达
模型	20	27.96 ± 4.24	4	16
高 CTX	20	21.63 ± 3.55*	8	12
低 CTX	20	14.11 ± 2.27* ^{△▲}	10	10* [△]
人参皂甙 Rg3	20	14.10 ± 1.77* [△]	11	9* [△]
联合	20	6.98 ± 1.87*	17	3*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与联合组比较,[△] $P < 0.05$;与高 CTX 组比较,[▲] $P < 0.05$

讨论

由于恶性肿瘤的生长和转移有赖于瘤体内血管的形成,抗肿瘤血管生成治疗日益成为人们研究的热点。近期国外文献报道,多种细胞毒化疗药物在体内外实验中显示出抗血管生成活性,这些药物如环磷酰胺 (CTX)、紫杉醇、长春花碱等。Klement G 等^[3]的近期

实验显示活性增殖的内皮细胞较增殖的肿瘤细胞对化疗药物更敏感,理论上可通过降低化疗药物的浓度以特异性地靶向于肿瘤内皮细胞。将这样低浓度的化疗药物长期使用,避免了常规化疗方案中内皮细胞在化疗间歇期的恢复,增加其抗血管生成效果,起到长期抑制肿瘤的作用。因此,国外又将这种连续规律的低剂量化疗称为抗血管生成化疗^[4]。本实验应用持续低剂量 CTX 治疗荷 Lewis 肺癌小鼠,检测到肿瘤微血管密度 (MVD) 较模型组和最大耐受剂量 CTX 组明显下降,血管内皮生长因子 (VEGF) 水平也较模型组下降,证实了 CTX 持续低剂量给药计划的抗血管生成作用。

人参皂甙 Rg3 为从人参根浸出液中分离出的一种有效成分,为四环三萜皂甙,其结构式为 $C_{42}H_{72}O_{13}$ 。近年人们发现人参皂甙 Rg3 具有抑制肿瘤血管生成的作用。Mochizuki M 等^[5]曾报道,荷黑色素瘤小鼠连续 3 天静脉注射或口服人参皂甙 Rg3,相隔 48h 静脉注射 1% 伊凡蓝后处死,解剖镜下可观察到皮下伊凡蓝染色的肿瘤血管数量显著减少。本研究中人参皂甙 Rg3 治疗组 MVD 和 VEGF 表达均较模型组降低,说明它可能通过降低促血管生成因子 VEGF 表达而抑制肿瘤血管生成。据文献报道,人参皂甙 Rg3 抗肿瘤血管生成机制可能有以下几点:(1)阻止肿瘤细胞分

血管生成因子(TAFs),包括 VEGF、bFGF 等;(2)阻断 TAFs 效应,如降低 bFGF 受体结合率;(3)抗内皮细胞增殖和迁移,如抑制金属蛋白酶表达;(4)干扰内皮细胞与细胞外基质的相互作用等^[6,7]。

国外有关研究表明低剂量抗血管生成化疗计划的抗肿瘤效果可因合用一种特异靶向于内皮细胞的药物而明显提高。例如,Klement G 等^[8]将 VEGFR-2 单克隆抗体(DC101)与 VLB 联合应用,发现较其单独应用可更好地控制肿瘤生长,组织病理学显示联合治疗组有广泛的内皮细胞坏死。Browder T 等^[9]的实验中也可观察到在 CTX 低剂量给药计划中加用 TNF-470 后,耐药的 Lewis 肺癌可被根除。本研究将低剂量 CTX 与抗血管生成中药人参皂甙 Rg3 联合应用检测到 MVD 和 VEGF 水平较各自单独应用时下降更为明显,反映了二者具有协同抗血管生成作用。因肿瘤的血管生成是涉及多个因素相互作用的过程,只针对于其中的某一环节恐怕不能完全阻止肿瘤的血管生成,只有联合多种抗血管生成剂多环节一起阻断才可能更有效地抑制其血管生成。

从肿瘤生长曲线上可以看出,常规 MTD 方案在治疗初期抑瘤作用较明显,而后期肿瘤又快速生长,考虑是因肿瘤细胞产生了抗药性,而在低剂量 CTX 治疗组和人参皂甙 Rg3 组中肿瘤生长在较长一段时间内得到了控制,这一点可更好地用其抗血管生成作用来解释,由于其靶点为内皮细胞,遗传性质稳定,不易产生耐药^[10]。由于正常成年人的血管形成基本停止,内皮细胞常处于不分裂状态,只有在妊娠、月经周期、炎症、外伤和肿瘤等特殊情况下,血管形成才被启动,因此,抗血管生成治疗还具有良好的特异性,对机体正常组织影响小^[11]。本实验结果显示低剂量 CTX 方案治疗小鼠时毒副反应较小,将低剂量 CTX 和人参皂甙 Rg3 合用时毒副反应未增加,抑瘤作用更显著且持久,生存期较单药治疗延长,反映了二者具有协同抗肿瘤作用。

总之,本研究发现低剂量 CTX 和人参皂甙 Rg3 联合应用显示出协同抗血管生成作用,并且治疗毒副反应小,不易产生耐药,抑瘤效果显著且持久,生存期得到延长。从循证医学的角度看,疗效判定的终点指标应为生存期的延长或生活质量的提高,因此,这种抗

血管生成联合治疗将为肺癌治疗的临床研究提供一种新的安全有效的思路。

参 考 文 献

- 1 Miller KD, Sweeney CJ, Sledge GW. Refining the target: chemotherapeutics as antiangiogenics. *J Clin Oncol* 2001;19(4):1195—1206.
- 2 Bello L, Carrabba G, Giussani C, et al. Low-dose chemotherapy combined with an antiangiogenic drug reduces human glioma growth *in vivo*. *Cancer Res* 2001;61(10):7501—7506.
- 3 Klement G, Huang P, Mayer B, et al. Differences in therapeutic indexes of combination metronomic chemotherapy and an anti-VEGFR-2 antibody in multidrug-resistant human breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 2002;8(1):221—232.
- 4 Gately S, Kerbel R. Antiangiogenic scheduling of lower dose cancer chemotherapy. *Cancer* 2001;7(9):427—436.
- 5 Mochizuki M, Yoo YC, Matsuzawa K, et al. Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside-Rb2, 20(R)-and 20(S)-ginsenoside-Rg3 of red ginseng. *Biol Pharm Bull* 1995;18(9):1197—1202.
- 6 Tao X, Tang D. Advances in the study of tumor angiogenesis and anti-angiogenic Chinese herbal drugs. *J Chin Materia Medica* 2003;26(5):379—381.
- 7 Shinkai K, Akedo H, Mukai M, et al. Inhibition of *in vitro* tumor cell invasion by ginsenoside Rg3. *Jpn J Cancer Res* 1996;87(4):357—362.
- 8 Klement G, Baruchel S, Rak J, et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest* 2000;105(5):1045—1047.
- 9 Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2000;60(8):1878—1886.
- 10 Shimizu K, Oku N. Cancer anti-angiogenic therapy. *Biol Pharm Bull* 2004;27(5):599—605.
- 11 Vos FY, Willemse PH, Vroes EG, et al. Endothelial cell effects of cytotoxics: balance between desired and unwanted effects. *Cancer Treat Rev* 2004;30(6):495—513.

(收稿:2004-12-03 修回:2005-04-01)