

合江佛手挥发油靶向 VEGF/VEGFR 信号通路 抗 U87 细胞肿瘤新生血管的生成

韩江云^{1,2}, 陈晓霞¹, 阳丽娟², 刘睿涵³, 杨文娅², 张丹²

(1. 西南医科大学附属中医医院, 四川泸州 646000) (2. 西南医科大学药学院, 四川泸州 646000)

(3. 四川中医药高等专科学校临床医学系, 四川绵阳 621000)

摘要: 本文研究合江佛手挥发油体外抗肿瘤活性及体内对裸鼠人神经胶质瘤 U87 细胞移植瘤血管生成的抑制作用。采用细胞增殖实验 CCK-8 法筛选合江佛手挥发油体外敏感的肿瘤细胞。皮下接种建立裸鼠 U87 细胞移植瘤模型, 观察合江佛手挥发油 (12.5、25、50 mg/kg) 体内对裸鼠 U87 细胞移植瘤生长、MVD (微血管密度) 和 VEGF 及其受体 (flt-1、KDR) 表达的影响。研究发现合江佛手挥发油对 4 株肿瘤细胞 U87、MCF-7、A549、HepG2 的 IC₅₀ 分别为 82.19、173.99、215.83、192.87 μg/mL, 其中敏感性最强的是 U87 细胞。合江佛手挥发油灌胃给药后明显降低 TV (肿瘤体积)、RTV (相对肿瘤体积)、T/C% (相对肿瘤增殖率), 对裸鼠移植瘤的生长具有明显抑制作用; 阳性对照及合江佛手挥发油治疗组肿瘤微血管稀疏分布, U87 细胞 MVD 值由对照组的 63.24 分别降低到 30.65、46.88、40.18、36.56。蛋白相对表达 VEGF 由对照组的 0.93 分别降低到 0.19、0.52、0.33、0.16, flt-1 由对照组的 0.82 分别降低到 0.18、0.50、0.32、0.09, KDR 由对照组的 0.78 分别降低到 0.14、0.48、0.30、0.11。合江佛手挥发油具有一定的体外抗肿瘤性活性, 特别是对 U87 细胞作用最敏感。体内抗神经胶质瘤的分子其机制可能与靶向抑制 VEGF/VEGFR 信号通路, 抗肿瘤新生血管生成有关。

关键词: 合江佛手挥发油; U87 细胞; 裸鼠; 微血管密度; 血管内皮生长因子

文章编号: 1673-9078(2021)08-36-43

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.8.1174

Anti-angiogenesis by Volatile Oil of *Citrus medica* var. *sarcodactylis* from Hejiang on U87 Cells through the VEGF/VEGFR Signaling Pathway

HAN Jiang-yun^{1,2}, CHEN Xiao-xia¹, YANG Li-juan², LIU Rui-han³, YANG Wen-ya², ZHANG Dan²

(1. Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

(2. School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

(3. Department of Clinical Medicine, Sichuan College of Traditional Chinese Medicine, Mianyang 621000, China)

Abstract: To study the *in vitro* antitumor activity of the volatile oil of *Citrus medica* var. *sarcodactylis* from Hejiang and its anti-angiogenic effects on the transplanted human glioma cells U87 in nude mice, a CCK-8 assay was used to screen tumor cells sensitive to the volatile oil *in vitro*. Tumor models were established by transplanting the U87 cells to nude mice to observe the effects of volatile oil (at 12.5, 25, and 50 mg/kg) on the tumor growth, microvessel density (MVD), expressions of vascular endothelial growth factors (VEGF), and expressions of the receptors VEGFRs (flt-1 and KDR) of the transplanted U87 cells *in vivo*. As the IC₅₀ values of the volatile oil on four tumor cell lines, namely U87, MCF-7, A549, and HepG2 are

引文格式:

韩江云,陈晓霞,阳丽娟,等.合江佛手挥发油靶向 VEGF/VEGFR 信号通路抗 U87 细胞肿瘤新生血管的生成[J].现代食品科技,2021,37(8):36-43

HAN Jiang-yun, CHEN Xiao-xia, YANG Li-juan, et al. Volatile oil of Hejiang bergamot anti-angiogenesis in U87 cells through inhibiting VEGF/VEGFR signaling pathway [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(8): 36-43

收稿日期: 2020-12-17

基金项目: 四川省科技厅重点研发项目 (2019YFS0116); 合江县人民政府-西南医科大学科技专项项目 (2018-HJXNYD-2); 大学生创新创业项目 (S201910808177X; S202010632121)

作者简介: 韩江云 (1987-), 男, 在读硕士, 研究方向: 中药制剂工艺、中药生物活性

通讯作者: 张丹 (1975-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 中药药剂与药效

82.19 $\mu\text{g/mL}$, 173.99 $\mu\text{g/mL}$, 215.83 $\mu\text{g/mL}$, and 192.87 $\mu\text{g/mL}$, respectively, U87 cells are the most sensitive to the oil. After the oral administration of the volatile oil, the tumor volume (TV), relative TV, and relative tumor proliferation ratio decrease significantly; therefore, the volatile oil can significantly inhibit the growth of transplanted tumors in nude mice. The microvessel distribution of the volatile oil-treated group is sparse compared to that of the control. Meanwhile, the MVD value decreases from 63.24 (control) to 30.65, 46.88, 40.18, and 36.56, whereas the relative expression of VEGF decreases from 0.93 to 0.19, 0.52, 0.33, and 0.16. The relative expression of flt-1 reduces from 0.82 to 0.18, 0.50, 0.32, and 0.09, whereas that of KDR reduces from 0.78 to 0.14, 0.48, 0.30, and 0.11. In short, the volatile oil exhibit significant *in vitro* antitumor activity, with its effects on U87 cells being the most evident. The *in vivo* antiangioma effects may be realized via the VEGF/VEGFR signaling pathway to achieve antiangiogenesis in tumors.

Key words: volatile oil of *Citrus medica* var. *sarcodactylis* from Hejiang; U87 cell; nude mice; microvessel density; vascular endothelial growth factor (VEGF)

神经胶质瘤是中枢神经系统常见的占位性病变, 恶性程度较高, 呈易浸润性生长, 预后不佳, 目前发病率与致死率均是临床上最高的颅脑肿瘤之一^[1,2]。目前, 神经胶质瘤发病和进展的分子机制尚不完全清楚, 但含丰富的新生血管, 血管生成能明显促进胶质瘤的生长及远处转移^[3]。研究证实 VEGF (vascular endothelial growth factor 血管内皮生长因子) 又称血管通透因子, 在正常人脑组织中低表达, 但在 I~II 级神经胶质瘤患者脑组织中异常过度表达, 同时也高水平表达于多形性胶质瘤母细胞瘤^[4]。VEGF-受体 (VEGFR) 家族主要包括 fms 样酪氨酸激酶受体 VEGFR-1 (fms-like tyrosine, flt-1)、胎儿肝激酶插入区受体 VEGFR-2 (Kinase insert domain-containing receptor, KDR) 及表达诱导淋巴内皮细胞的 VEGFR-3 (flt-4) 等, 它们均具有酪氨酸激酶活性^[5]。许多研究证实^[6,7], VEGF/VEGFR 在脑肿瘤微血管生成过程中发挥着关键作用, 如果肿瘤体积超过 1~2 mm^3 , 会不断释放 VEGF、bFGF (basic fibroblast growth factor, 碱性成纤维细胞生长因子) 等血管调控因子, 其中 VEGF 可与 VEGFR 如 flt-1、KDR 结合, 能明显促进内皮细胞的增殖与迁移, 最终形成肿瘤新生血管, 因此, VEGF/VEGFR 信号通路一直是抗肿瘤血管生成重要的分子靶标。

近年来, 中药有效部位或成分凭借其毒性低, 且具有多靶点、多途径、多环节等优势, 逐渐成为抗肿瘤重要的研究热点之一^[8]。中药挥发油是通过超临界流体萃取或蒸馏等从中药材中提取的挥发成分, 许多中药挥发油具有明显的抗肿瘤活性, 如抑制肿瘤细胞增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡的肉桂、白介子、葡萄柚、洋葱等植物挥发油^[9,10]。此外, 定心藤、檬香茅、樟油、野西瓜等中药挥发油, 还能明显抑制荷瘤小鼠肿瘤的生长^[11]。作为药食同源的合江佛手是四川合江道地中药材, 种植面积较大, 具有很好的药用和经济价值^[12,13]。合江佛手挥发油是西南医科大学张丹课题组采用水蒸气蒸馏法, 从合江佛手中提取的主要有效部位, 主要成分柠檬烯和 γ -松油烯。研究证实, 柠檬烯具有抗肿

瘤、抗炎、抗菌等活性, γ -松油烯具有抗肿瘤、抗氧化、抗真菌等作用^[14]等。本研究采用 CCK-8 筛选合江佛手挥发油体外敏感的肿瘤细胞, 同时复制裸鼠神经胶质瘤 U87 细胞移植瘤模型, 观察合江佛手挥发油对荷瘤裸鼠肿瘤生长、血管生成指标 MVD (microvessel density 微血管密度) 及 VEGF、flt-1、KDR 蛋白表达的影响, 旨在系统评价合江佛手挥发油的抗肿瘤活性, 阐明其抗神经胶质瘤血管生成的分子机制。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

合江佛手: 合江佛手购自 GAP 认证的泸州合江正海中药饮片公司, 由西南医科大学生药鉴定教研室税丕先教授进行药材鉴定。RPMI1640 培养基、胎牛血清、CCK8 (cell counting kit-8) 及 PV 法兔二抗试剂盒均购自碧云天生物技术研究; 贝伐单抗注射液 (Bevacizumab, Avastin): Roche 公司, 批号: B9387。兔抗鼠 VEGF 多克隆抗体、兔抗鼠 Flt-1、KDR 单克隆抗体、CD34 单克隆抗体均购自英国 Abcam 公司。

1.2 细胞株

选择 4 株人肿瘤细胞进行体外抗肿瘤活性评价, 包括神经胶质瘤细胞 (U87)、乳腺癌细胞 (MCF-7)、肺腺癌细胞 (A549)、肝癌细胞 (HepG2), 均购自 CCTCC (中国典型培养物保藏中心), 采用 RPMI1640 细胞培养基, 在西南医科大学药学院实验室长期常规培养、传代、保存。

1.3 实验动物

雄性 SPF 级 BALB/c-nu 裸鼠 55 只, 5~6 w 龄, 体重 18 ± 2 g, 购自成都达硕实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号: SYXK (川) 2018-24。饲养于西南医科大学实验动物中心, SPF 级动物实验室, 40%~70% 的相对湿度, 温度控制在 20~25 $^{\circ}\text{C}$, 各组裸鼠自由摄

食饮水。

1.4 试验方法

1.4.1 合江佛手精油的提取与 GC-MS 分析

合江佛手精油的提取：合江佛手购自 GMP 认证的泸州合江正海中药饮片公司，由西南医科大学税丕先教授进行药材鉴别。首先冷冻干燥处理，然后粉碎过 60 目筛（Φ200×50mm）。提取时准确称取合江佛手粉 100 g（精确至 0.01 g），采用水蒸气蒸馏法提取。收集含少量水的精油，3000×g 离心 10 min 后脱水处理，最后加入无水硫酸钠适量制备成合江佛手精油，4℃下用棕色密封瓶保存、备用。

合江佛手精油成分分析采用 GC-MS 处理，得总离子流图见图 1，定量分析采用峰面积归一化法。

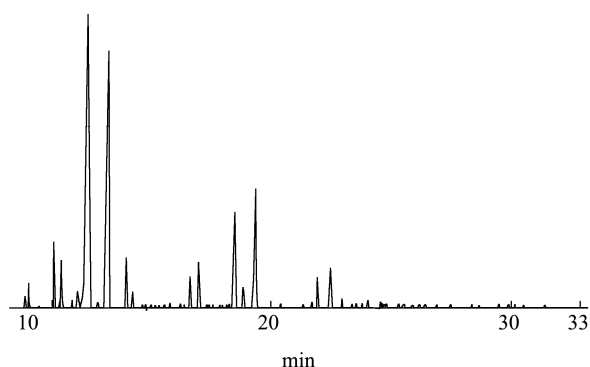


图 1 合江佛手精油的总离子流图

Fig.1 Total ion flow diagram of essential oil of volatile oil of Hejiang bergamot

1.4.2 体外抗肿瘤活性筛选

体外实验选择 4 株人肿瘤细胞（U87、MCF-7、A549、HepG2 细胞），各肿瘤细胞培养至指数生长期后，细胞悬液浓度调整为 5×10^4 /mL，按照每孔 90 μ L 种板，待细胞贴壁 24 h 后加药。合江佛手挥发油先用吐温溶解，再用 NS 稀释为不同浓度，每孔加入 10 μ L，最终受试药物浓度分别为 31.25 μ g/mL、62.50 μ g/mL、125 μ g/mL、250 μ g/mL、500 μ g/mL，各浓度均设 3 复孔。阴性对照加 10 μ L 培养基，阳性对照为 10 μ L 顺铂。药物干预 48 h 后每孔加入检测试剂 CCK-8 10 μ L，孵育 1 h 后采用酶标仪，在 450 nm 波长下检测每孔吸光度（A）。以吸光度值计算增殖抑制率（%），绘制浓度-抑制率曲线，半数抑制浓度 IC_{50} 计算采用 IC_{50} 软件进行。

$$\text{增殖抑制率} / \% = \frac{1 - (A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白孔}})}{A_{\text{阴性对照组}} - A_{\text{空白孔}}} \times 100\%$$

1.4.3 体内对 U87 细胞裸鼠移植瘤生长的影响

体内实验选择处于指数生长期的神经胶质瘤细胞 U87 细胞，调整细胞浓度为 5×10^6 /mL，按 0.2 mL 接

种于 3 只裸鼠右侧皮下，待形成明显瘤组织后，无菌条件下剪成约 1.5 mm³ 大小的瘤块，然后分别接种于 52 只裸鼠右侧腋窝皮下。筛选已形成瘤块、且瘤径 ≥ 50 mm³ 的裸鼠，按照随机原则分为 5 个实验组，阴性对照组（等体积生理盐水灌胃给药）、阳性对照组（贝伐单抗注射液，5 mg/kg 腹腔注射给药）和合江佛手挥发油低、中、高三个剂量组（12.5 mg/kg、25 mg/kg、50 mg/kg，灌胃给药）。参考抗肿瘤药药效学研究指导原则，给药周期设为 30 d，其中每周给药 5 d，停药 2 d。实验中每 3 d 用游标卡尺准确测量裸鼠移植瘤瘤径 1 次，分别计算 3 个肿瘤生长评价指标：肿瘤体积（TV）、相对肿瘤体积（RTV）及相对肿瘤增殖率（T/C%）。实验结束后处死动物，剥取瘤组织，称瘤重。计算公式如下：

(1) TV (tumor volume) = $1/2 \times a \times b^2$ ，其中 a、b 为裸鼠移植瘤的长径和宽径；

(2) RTV (relative tumor volume) = $\frac{V_t}{V_0}$ ，其中 V_0 为初次给药时 (d_0) 所测得的移植瘤体积， V_t 为每三天测量的移植瘤体积；

(3) T/C% = $\frac{T_{RTV}}{C_{RTV}} \times 100\%$ ， T_{RTV} 、 C_{RTV} 分别是治疗组、阴性对照组的 RTV。

疗效评价标准^[3]：T/C%（相对肿瘤增殖率） $\leq 60\%$ 且有统计学差异为有效；如 T/C% $> 60\%$ 则为无效。

1.4.4 裸鼠 U87 细胞移植瘤 MVD 测定

取裸鼠移植瘤组织，依次切片、脱蜡、水化，按免疫组化实验步骤进行。CD34 单克隆抗体按照 1:100 稀释，滴加 CD34 单抗后 4℃孵育过夜，滴加二抗。阴性对照用磷酸盐缓冲液代替 CD34 单抗。采用 DAB 染色，光镜下观察结果。先在低倍如 40 倍找到“热点”（视野下在染成棕色条索状的血管内皮细胞/血管内皮细胞群，只要与邻近肿瘤细胞、血管内皮细胞或其它结缔组织细胞分开，就视为一个微血管，也就是“热点”）。然后在 200 倍视野下，找到裸鼠 U87 细胞移植瘤区域内，“热点”分布最密集的 5 个区域，通过 400 倍光镜计数选取的 5 个区域，计算平均值，作为裸鼠 U87 移植瘤的微血管密度 MVD。

1.4.5 Western blot 检测瘤组织中 VEGF、flt-1 及 KDR 的表达

各组裸鼠 U87 细胞移植瘤组织匀浆，经组织裂解液裂解后离心提取总蛋白。蛋白含量测定采用 BCA 法，然后 SDS-PAGE 胶垂直电泳，转膜、封闭。VEGF、flt-1、KDR 及 β -actin 一抗按照 1:1000 稀释，滴加一抗后孵育 1 h，再加入 PV 法兔二抗 4℃孵育 1 h。加入化学发光液

(1:1的溶液A和溶液B), 完全覆盖PVDF膜, 采用凝胶成像系统曝光显影、拍照, 蛋白条带分析采用专业的Image Lab 3.0与 β -actin内参比较, 计算裸鼠移植瘤组织中VEGF、flt-1及KDR的蛋白相对表达量。

1.4.6 统计学方法

计量资料数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm S$)表示, 统计学处理采用 SPSS 20.0 统计学软件进行方差分析, 以 $p < 0.05$ 为统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 GC-MS 分析

本研究通过水蒸气蒸馏法提取合江佛手挥发油, 得率为 0.71%; 通过 GC-MS 测定, 面积归一化法计算其精油中柠檬烯和 γ -松油烯相对质量分数分别为 48.46%和 35.39%, 结果见图 1。

2.2 体外抗肿瘤活性筛选

选择 4 株人肿瘤细胞进行体外试验, 合江佛手挥发油干预后, 对 U87、MCF-7、A549、HepG2 等肿瘤细胞的增殖均有一定的抑制作用, 且随着浓度的增加抑制作用增强, 图 2 为合江佛手挥发油对各种肿瘤细胞的浓度-增殖抑制率曲线。根据增殖抑制率, 合江佛手挥发油对 U87、MCF-7、A549、HepG2 细胞的 IC_{50} 分别为 82.19 $\mu\text{g/mL}$ 、173.99 $\mu\text{g/mL}$ 、215.83 $\mu\text{g/mL}$ 、192.87 $\mu\text{g/mL}$ 。

佛手 (*Citrus medica* L.var. *sarcodactylis* Swingle) 属芸香科香橼的变种, 因产地不同有川佛手、广佛手、建佛手、金佛手之分, 但中国佛手种植面积以四川最大, 其产量也最高^[15]。第四次四川中药资源普查表明, 川佛手主要种植区位于洪雅、夹江、石棉、峨眉、乐山、犍为、沐川、宜宾叙州区、泸州合江^[16]等岷江流域及长江流域上游的山区。合江佛手作为药食同源的四川泸州道地中药材, 种植面积大, 药用和经济价值较大。本研究采用水蒸气蒸馏法提取合江佛手的有效

部位, 得到合江佛手挥发油, 提取得率为 0.71%, 经 GC-MS 成分分析, 主要成分为柠檬烯和 γ -松油烯, 分别为 48.46%、35.39%^[17-19]。近年来, 有不少关于佛手挥发油抗肿瘤研究的报道, 如邵邻相等研究证实^[20]50 mg/kg 的佛手挥发油对荷 B16 黑色素瘤小鼠移植瘤的生长具有明显的抑制作用, 也有研究报道^[21], 佛手挥发油灌胃给药后能明显抑制人乳腺癌细胞 MDA-MB-435 的增殖, 作用机制与阻滞细胞周期停留 S 期、G2/M 期, 诱导其凋亡有关。本研究结果显示, 合江佛手挥发油体外对 4 株肿瘤细胞如 U87、MCF-7、A549、HepG2 细胞有一定的抑制作用, 其中敏感性最强的是神经胶质瘤 U87 细胞, 因此, 我们后续选择了 U87 细胞进行体内实验研究。

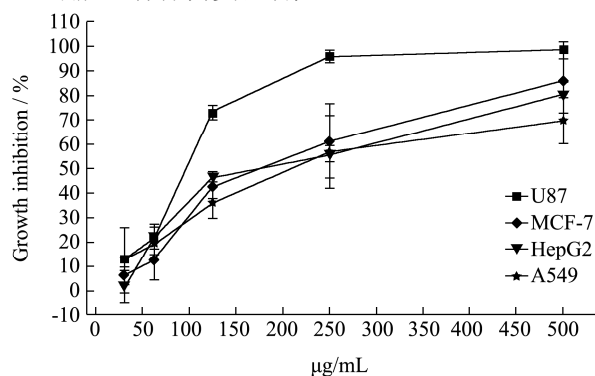


图 2 体外对人肿瘤细胞的浓度-增殖抑制率曲线

Fig.2 Concentration-inhibition curve of human tumor cells *in vitro* (n=3)

2.3 体内对裸鼠 U87 细胞移植瘤生长的影响

裸鼠 U87 细胞移植瘤实验结果显示, 合江佛手挥发油灌胃给药后, 裸鼠 U87 细胞移植瘤的肿瘤体积 TV, 肿瘤相对体积 RTV 和相对肿瘤增殖率 T/C%均缓慢下降, 在治疗最佳时间 (d_{24}), T/C%分别为 65.22%、58.74%、51.36%。由于合江佛手挥发油中、高剂量组 T/C%低于 60%, 且与对照组比较 $p < 0.05$ 或 $p < 0.01$, 差异有统计学意义, 提示治疗有效。结果见表 1、图 3~5。

表 1 治疗最佳时间 (d_{24}) 对裸鼠 U87 细胞移植瘤 TV, RTV 和 T/C%的影响

Table 1 Effects on TV, RTV and T/C% of transplanted U87 cells in nude mice at the optimal treatment time (d_{24} , $\bar{x} \pm S$)

组别	剂量/(mg/kg)	n	TV/mm ³		RTV	T/C%
			d_0	d_{24}		
Control	-	6	123.49 \pm 13.62	1026.45 \pm 97.24	8.91 \pm 0.65	100
Bevacizumab	5	6	117.18 \pm 12.55	489.76 \pm 56.27**	3.87 \pm 0.29**	43.42
VO-HB	5	6	119.42 \pm 14.54	823.42 \pm 71.22*	5.81 \pm 0.37*	65.22
VO-HB	10	6	124.72 \pm 13.41	687.35 \pm 65.43**	5.23 \pm 0.35**	58.74
VO-HB	20	6	121.77 \pm 12.95	575.26 \pm 59.47**	4.57 \pm 0.39**	51.36

注: d_0 : 给药第 0 d (分笼给药开始), d_{24} : 给药第 24 d (实际疗效最佳时间); 与对照组比较: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

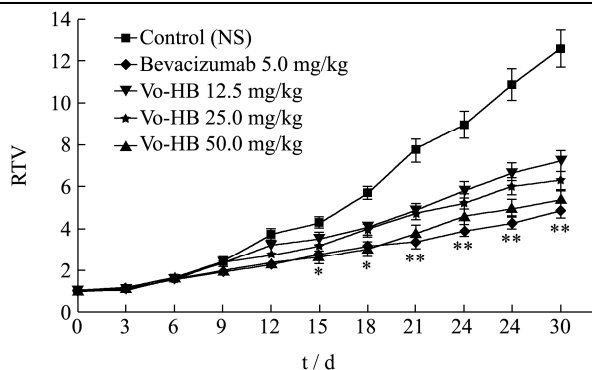


图3 对裸鼠U87细胞移植瘤RTV的影响

Fig.3 Effects on RTV of transplanted U87 cell in nude mice

($\bar{x} \pm S, n=8$)

注: 与对照组比较: * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

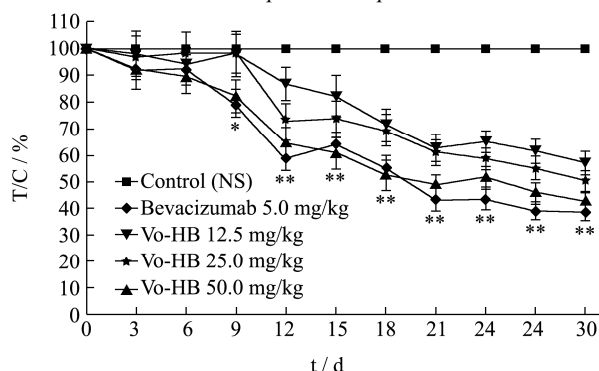


图4 对裸鼠U87细胞移植瘤T/C%的影响

Fig.4 Effects on T/C% of transplanted U87 cell line in nude mice

($\bar{x} \pm S, n=8$)

注: 与对照组比较: * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

神经胶质瘤是发生于神经外胚叶组织的恶性肿瘤, 由于人类生存环境的不断恶化, 我国神经胶质瘤发病率与致死率呈现明显的逐年升高趋势。2019年中国分地区肿瘤分布数据显示^[22], 神经胶质瘤年发病率已达到5~8人/10万人, 而五年生存率不足10%, 仅次于肺癌和胰腺癌, 为预后较差的恶性肿瘤之一。目前, 我国神经胶质瘤存在早期发现较难的问题, 多数患者诊断明确时已经失去早期手术机会, 而化学治疗又存在毒副作用较大, 不易穿透血脑屏障, 且易产生多药耐药性等问题, 因此, 神经胶质瘤难以取得理想的临床效果。研究发现^[23], 配合使用一些小分子靶向药物及中药复方, 特别是中药有效部位或成分, 可适当减少胶质瘤术后的转移及复发, 也能延长肿瘤患者的中位生存时间。抗肿瘤药效学指导原则指出, 体内抗肿瘤疗效评价标准: T/C% (相对肿瘤增殖率) $\leq 60\%$ 且有统计学差异为有效。合江佛手挥发油25、50 mg/kg治疗组的T/C%均小于60%, 且有一定的剂量依赖关系, 揭示合江佛手挥发油体内也有较强的抗神经胶质

瘤活性, 具有较好的开发前景, 有希望用于神经胶质瘤的临床的辅助治疗。

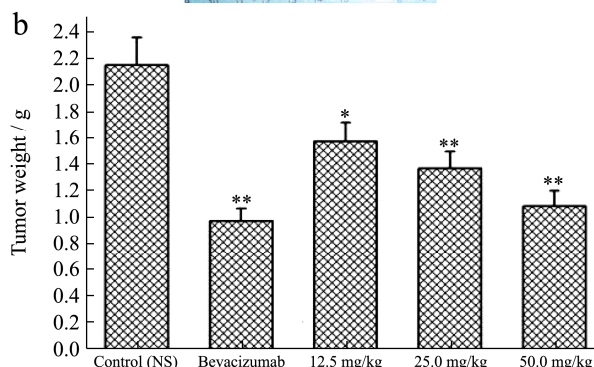
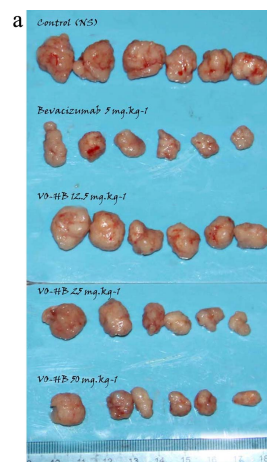


图5 治疗结束时对裸鼠U87细胞移植瘤重量的影响

Fig.5 Effects on weight tumor of transplanted U87 cell line in nude mice at the end of treatment

($\bar{x} \pm S, n=6$)

注: a: 各组移植瘤; b: 瘤重统计学分析; 与对照组比较:

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

2.4 对瘤组织中MVD及VEGF、flt-1、KDR表达的影响

免疫组化结果表明, 对照组裸鼠瘤组织呈明显的棕褐色索状, “热点”分布较多。贝伐单抗阳性组与合江佛手挥发油三个治疗组裸鼠瘤组织, “热点”稀疏分布, MVD值由对照组的63.24分别降低到30.65、46.88、40.18、36.56, 与对照组比较 $p<0.05$ 或 $p<0.01$, 结果图6。Western blot检测结果显示, 对照组瘤组织中有大量的VEGF、Flt-1及KDR蛋白表达, 贝伐单抗阳性组与合江佛手挥发油三个治疗组减少VEGF、flt-1及KDR蛋白的相对表达, 与对照组比较, 蛋白相对表达VEGF由对照组的0.93分别降低到0.19、0.52、0.33、0.16, flt-1由对照组的0.82分别降低到0.18、0.50、0.32、0.09, KDR由对照组的0.78分别降低到0.14、0.48、0.30、0.11, $p<0.01$ 。结果见图7。

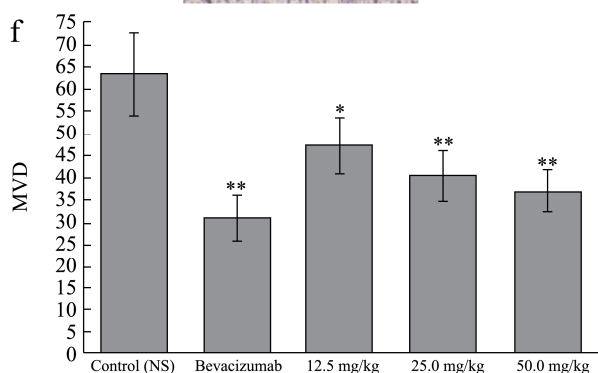
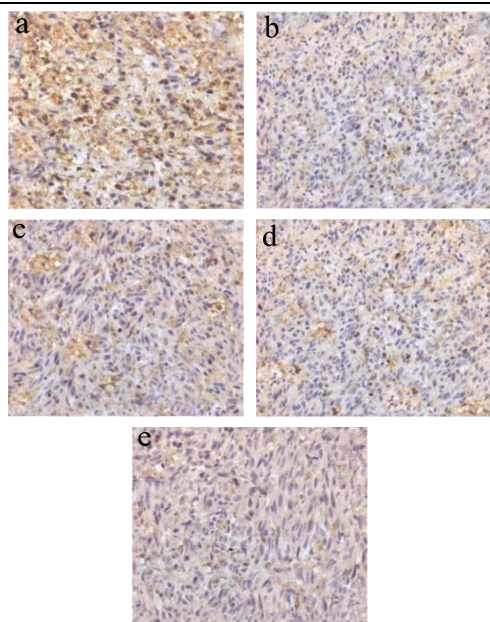


图6 对U87细胞裸鼠移植瘤组织中微血管密度的影响(×200)

Fig.6 Effect on MVD in transplanted U87 cells in nude mice (×200)

注: a: 对照组; b: 贝伐单抗 5 mg/kg; c: VO-HB 12.5 mg/kg; d: VO-HB 25mg/kg; e: VO-HB 50mg/kg; f: MVD 的统计学分析。与对照组比较: * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

研究证实, 缺氧耐受是肿瘤新生血管生成的启动信号, 也是恶性肿瘤血管增殖、迁移及小管形成的关键促进因素。HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1, 低氧诱导因子-1) 是重要的血管生成调控的上游因子, 参与了多种恶性肿瘤的血管生成以及其发生、发展和转移^[24]。神经胶质瘤的生物学特征与其他恶性肿瘤相似, 当营养需求不能被满足导致恶性肿瘤局部缺血、缺氧时, 肿瘤细胞HIF-1基因被大量激活, 直接激活血管内皮生长因子及其受体 (VEGF/VEGFR), 从而起到促进神经胶质瘤内皮细胞的增殖、迁移和小管形成, 形成新生血管。VEGF-165在神经胶质瘤中优势表达, 是VEGF主要存在构型, 当VEGF与VEGFR结合后, 通过信号转导, 充分发挥生物学功能促进神经胶质瘤血管生成。迄今为止, VEGFR的5种异构受体已经得到确认: VEGFR-1 (Flt-1)、VEGFR-2 (KDR/Flk-1)、

VEGFR-3、NP-1和NP-2。Wojtukiewicz MZ等^[25]研究发现, Flk-1受体是VEGF促进血管生成的先决条件, 而应用VEGFR-2单克隆抗体如贝伐单抗, 则可通过拮抗VEGF、bFGF导致的肿瘤血管生成。有研究发现^[26,27]肿瘤组织微血管密度 (MVD) 作为肿瘤血管生成间接评价的一项重要指标, 与恶性肿瘤的临床分期、病理分级、远处转移以及肿瘤预后密切相关。随着合江佛手挥发油剂量的增加, 裸鼠U87移植瘤组织棕褐色条索状分布较少, “热点”稀疏, MVD值明显降低。Western blot检测结果表明, 合江佛手挥发油随着药物浓度的增高而减少VEGF、flt-1及KDR蛋白的相对表达, 揭示抑制VEGF/VEGFR信号通路可能是其抑制人神经胶质瘤裸鼠移植瘤血管生成的重要分子机制之一。

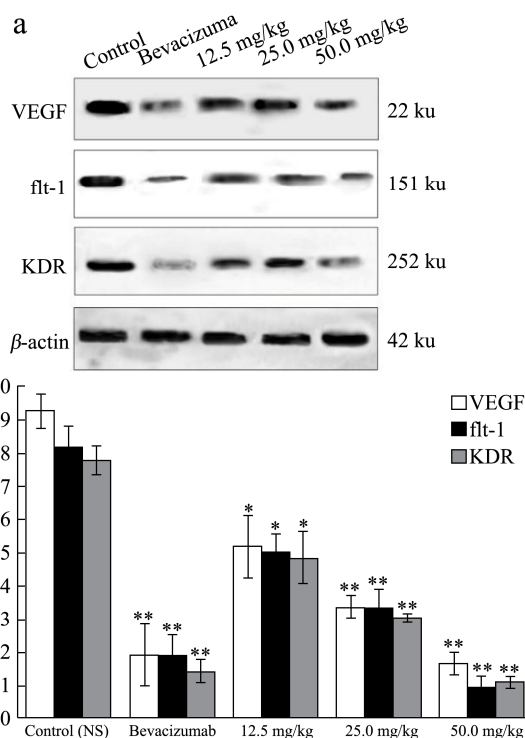


图7 U87细胞裸鼠移植瘤组织中VEGF, flt-1和KDR的蛋白相对表达

Fig.7 Relative expression of VEGF, Flt-1, and KDR protein in transplanted U87 cells in nude mice

注: a: 蛋白条带; b: 以 β -actin 为内参的相对表达量。与对照组比较, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

3 结论

3.1 体外实验结果表明, 合江佛手挥发油对 U87、MCF-7、A549、HepG2 细胞的增殖具有较强的抑制作用, 其中对人神经胶质瘤 U87 细胞作用最敏感。由于合江佛手挥发油体外抗肿瘤具有一定的选择性, 因此, 我们后续选择了 U87 细胞进行裸鼠移植瘤实验研究。

3.2 裸鼠 U87 细胞移植瘤实验结果显示,合江佛手挥发油三个治疗组裸鼠 U87 细胞移植瘤三个肿瘤生长的评价指标 TV、RTV 和 T/C% 明显下降,治疗最佳时间 (d_{24}) T/C% 分别为 65.22%、58.74%、51.36%。25、50 mg/kg 治疗组的 T/C% 低于 60% 且与对照组比较有统计学差异,揭示合江佛手挥发油体内抗肿瘤为有效,具有较好的开发前景,有望临床用于神经胶质瘤的辅助治疗。

3.3 神经胶质瘤是多血管的恶性肿瘤,其生长、转移离不开肿瘤血管的生成。肿瘤血管生成与多种血管调控因子如 VEGF、bFGF、PDGF 等密切相关。合江佛手挥发油随着药物浓度的增高而减少 VEGF、flt-1 及 KDR 蛋白的相对表达,具有抑制神经胶质瘤裸鼠移植瘤血管生成的作用。综上所述,合江佛手挥发油体内抗神经胶质瘤的分子机制可能与靶向抑制 VEGF/VEGFR 信号通路,抗肿瘤新生血管生成有关。

参考文献

- [1] 孙可欣,郑荣寿,张思维,等.2015 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J].中国肿瘤,2019,28(1):1-11
SUN Ke-xin, ZHENG Rong-tao, ZHANG Si-wei, et al. Report of cancer incidence and mortality in different areas of China, 2015 [J]. China Cancer, 2019, 28(1): 1-11
- [2] Ostrom Q T, Cioffi G, Gittleman H, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012-2016 [J]. Neuro-oncology, 2019, 21: v1-v100
- [3] Navone S E, Guarnaccia L, Cordiglieri C, et al. Aspirin affects tumor angiogenesis and sensitizes human glioblastoma endothelial cells to temozolomide, bevacizumab, and sunitinib, impairing vascular endothelial growth factor-related signaling [J]. World Neurosurg, 2018, 120: e380-e391
- [4] 王非一凡,王苟思义,曹航,等.脑胶质瘤血管生成研究进展[J].转化医学电子杂志,2018,5(7):9-16
WANG Fei-yi-fan, WANG Gou-si-yi, CAO Hang, et al. Research progress of angiogenesis in glioma [J]. E-Journal of Translational Medicine, 2018, 5(7): 9-16
- [5] Nagano H, Tomida C, Yamagishi N, et al. VEGFR-1 regulates EGF-R to promote proliferation in colon cancer cells [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(22): 5608
- [6] Färkkilä A, Anttonen M, Pociuviene J, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 are highly expressed in ovarian granulosa cell tumors [J]. Eur J Endocrinol, 2011, 164(1): 115-122
- [7] 夏雨,李涛,孙名扬.中药复方肠复康胶囊通过 VEGF/VEGFR2 信号通路干预结肠癌血管生成实验研究[J].中国免疫学杂志,2020,36(11):1318-1323
XIA Yu, LI Tao, SUN Ming-yang. Experimental study on intervention of traditional Chinese medicine compound cerebiogen capsule for intervention of colon cancer angiogenesis via VEGF/VEGFR2 signaling pathway [J]. Chinese Journal of Immunology, 2020, 36(11): 1318-1323
- [8] Wang Y, Zhang Q, Chen Y, et al. Antitumor effects of immunity-enhancing traditional Chinese medicine [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121: 109570
- [9] 汪镇朝,张海燕,宋远斌,等.中药挥发油抗肿瘤作用机制及其发展研究[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(24):219-226
WANG Zhen-chao, ZHANG Hai-yan, SONG Yuan-bin, et al. Study on the anti-tumor mechanism and development of volatile oil of traditional Chinese medicine [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2020, 26(24): 219-226
- [10] 邓锦松,张海燕,杨启悦,等.中药挥发油抗白血病机制及问题探讨[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(19):226-234
DENG Jin-song, ZHANG Hai-yan, YANG Qi-yue, et al. Discussion on the mechanism and problems of anti-leukemia by volatile oil of traditional Chinese medicine [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2019, 25(19): 226-234
- [11] 杨超,唐洁,熊苏慧,等.中药材挥发油类抗肿瘤活性研究进展[J].中南药学,2017,15(9):1190-1194
YANG Chao, TANG Jie, XIONG Su-hui, et al. Anti-tumor activity of volatile oil in Chinese medicine [J]. Central South Pharmacy, 2017, 15(9): 1190-1194
- [12] 赵永艳,张军银,彭腾,等.不同产地佛手的挥发油成分比较分析[J].中国药房,2020,31(4):44-49
ZHAO Yong-yan, ZHANG Jun-yin, PENG Teng, et al. Comparative analysis of the components of volatile oil in citrus medica from different producing areas [J]. China Pharmacy, 2020, 31(4): 423-428.9
- [13] 刘盼,雷素娟,何兵,等.合江佛手两种香豆素含量测定及指纹图谱研究[J].食品研究与开发,2019,40(3):184-189
LIU Pan, LEI Su-juan, HE Bing, et al. Determination of two coumarins and fingerprint of fructus Citri sarcodactylis from Hejiang [J]. Food Research and Development, 2019, 40(3): 184-189
- [14] 崔广林,李隆云,谭均,等.不同产地川佛手中 8 种化学成分的分析与评价[J].天然产物研究与开发,2019,31(2):250-260, 324

- CUI Guang-lin, LI Long-yun, TAN Jun, et al. Analysis and evaluation of eight active ingredients in fructus *Citris sarcodactylis* from different regions [J]. Natural Product Research and Development, 2019, 31(2): 250-260, 324
- [15] 邓祥,黄小梅,王芬.川佛手中多酚类物质的微波和超声波联合提取工艺优化[J].化学研究,2017,28(3):353-358
- DENG Xiang, HUANG Xiao-mei, WANG Fen. Process optimization of microwave and ultrasonic extraction of polyphenols from Chuan bergamot [J]. Chemical Research, 2017, 28(3): 353-358
- [16] 牛曼思,李薪宇,汪小玉,等.四川合江县中药资源普查研究[J].安徽农业科学,2019,47(19):193-196,200
- NIU Man-si, LI Xing-yu, WANG Xiao-yu, et al. Investigation of Traditional Chinese Medicine Resources in Hejiang County of Sichuan Province [J]. J.Anhui. Agric. Sci. 2019, 47(19): 193-196, 200
- [17] 王春龙,罗禹,段灵鑫,等.GC-MS 法比较分析不同产地川佛手精油成分[J].食品工业科技,2021,42(7): 274-281
- WANG Chun-long, LUO Yu, DUAN Ling-xin, et al. Comparative analysis of essential oils of citrus bergamot from different habitats by GC-MS [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(7): 274-281
- [18] 曹甜,刘晓艳,丁心,等.柠檬烯的研究与应用进展[J].农产品加工,2017,16:51-54
- CAO Tian, LIU Xiao-yan, DING Xin, et al. Advances in research and application of limonene [J]. Farm Products Processing, 2017, 16: 51-54
- [19] 潘乾广,石瑶,叶秀峰,等.松油烯 4 醇体内外诱导 A549 细胞自噬及抑制增殖作用[J].第三军医大学学报,2014,36(21): 2201-2206
- PAN Qian-guang, SHI Yao, YE Xiu-feng, et al. Terpinen-4-ol induces autophagy and inhibits proliferation in A549 cells and xenograft tumor of nude mice [J]. Journal of Third Military Medical University, 2014, 36(21): 2201-2206
- [20] 邵邻相,高海涛,成文召,等.佛手挥发油对小鼠体内 B16 黑色素瘤生长的影响[J].浙江师范大学学报(自然科学版), 2012,35(2):184-188
- SHAO Lin-Xiang, GAO Hai-Tao, CHENG Wen-Zhao, et al. The effect of fingered citron volatile oil on mouse B16 melanoma growing *in vivo* [J]. Journal of Zhejiang Normal University Natural Sciences, 2012, 35(2): 184-188
- [21] 麻艳芳,邵邻相,张均平,等.佛手挥发油对 MDA-MB-435 人乳腺癌细胞体外增殖的影响[J].中国药学杂志,2010,45(22): 1737-1741
- MA Yan-fang, SHAO Lin-xiang, ZHANG Jun-ping, et al. Effects of fingered citron essential oil on proliferation of MDA-MB-435 cells *in vitro* [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2010, 45(22): 1737-1741
- [22] 王文岩,薛晓英.2020 年低级别脑胶质瘤诊疗指南解读[J].河北医科大学学报,2020,41(9):993-998,1074
- WANG Wen-yan, XUE Xiao-ying. Interpretation of guidelines for diagnosis and treatment of low-grade gliomas in 2020 [J]. Journal of Hebei Medical University, 2020, 41(9): 993-998, 1074
- [23] 赵雯,徐宏治.脑胶质瘤的中药治疗现状[J].上海医药,2020, 41(10):3-7
- ZHAO Wen, XU Hong-zhi. Current Situation of traditional Chinese medicine in the treatment of glioma [J]. Shanghai Medical & Pharmaceutical Journal, 2020, 41(10): 3-7
- [24] Wang Z, Li Q, Xia L, et al. Borneol promotes apoptosis of human glioma cells through regulating HIF-1 α expression via mTORC1/eIF4E pathway [J]. J Cancer, 2020, 11(16): 4810-4822
- [25] Wojtukiewicz M Z, Sierko E, Skalijs P, et al. Granulocyte-colony stimulating factor receptor, tissue factor, and vegf-r bound vegf in human breast cancer in Loco [J]. Adv Clin Exp Med,2016, 25(3): 505-511
- [26] Berretta M, Cobellis G, Franco R, et al. Features of microvessel density (MVD) and angiogenesis inhibitors in therapeutic approach of hepatocellular carcinoma (HCC) [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(22): 10139-10150
- [27] 张依琳.胶质瘤的 3D-ASL 灌注指数与胶质瘤级别、MVD、VEGF、Ki-67 的相关性研究[D].大连:大连医科大学,2019
- ZHANG Yi-Lin. The correlation between 3D-ASL perfusion index and tumor grade、MVD、VEGF、Ki-67 in glioma [D]. Dalian: Dalian Medical University, 2019