

# 阿司匹林对 S180 肿瘤生长及血管生长相关因子表达的抑制作用

高雪芹\*, 张维东, 宋守芹, 武利存, 王 丽

(山东省医学科学院基础医学研究所, 山东 济南 250062)

**摘要:**目的 从抗血管生成的角度研究阿司匹林(Asp)预防和治疗肿瘤的机理。方法 昆明种小鼠随机分为对照组, 替加氟组, Asp 50, 25, 10 mg·kg<sup>-1</sup>组, 于接种 S180 肿瘤细胞后 d 2 开始 ig 给药, 连续 9 d, 观察抑瘤率。采用免疫组化的方法研究 Asp 对肿瘤组织环氧合酶-2(COX-2)及血管相关生长因子的作用。结果 Asp 3 个剂量组均有一定的抑瘤作用, 大剂量抑瘤率为 21.1%。免疫组化染色显示 Asp 对肿瘤组织的 COX-2 表达有明显的抑制作用, 同时血管生长相关因子血管内皮生长因子、纤维细胞生长因子-2 表达也明显下调, 肿瘤组织微血管密度明显降低。结论 Asp 对 S180 肿瘤有抑制作用, 它可以抑制与血管生长相关的 COX-2 的表达而抑制肿瘤血管的生长, 进而抑制肿瘤的生长。抑制肿瘤血管的生长可能是 Asp 预防和治疗肿瘤的机理之一。

**关键词:**阿司匹林; 细胞, S180 肉瘤; 前列腺素内过氧化物合酶; 物质, 内皮生长, 血管; 成纤维细胞生长因子, 碱性

中图分类号: R971.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2002)04-0299-03

近年来国内外学者发现阿司匹林(aspirin, Asp)有一定的抗肿瘤作用。Asp 对体内致癌物诱发性肿瘤及移植性肿瘤、体外及流行病学研究均有肿瘤抑制作用<sup>[1~3]</sup>。国外已将 Asp 列为肿瘤化学预防剂。本文报告了 Asp 对移植性 S180 肿瘤的抑制作用, 并通过观察其对环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2),

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), 成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor-2, FGF-2)及肿瘤组织微血管密度(microvessel density)的作用, 研究 Asp 对 COX-2 的抑制作用与血管生长相关因子的关系, 探讨其预防和治疗肿瘤的可能机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

Asp 购自齐鲁制药厂, 为白色粉末。COX-2(H-62)一抗代号 SC7951, VEGF(147)一抗代号 SC507, FGF2(147)一抗代号 SC-79 均为 Santa Cruz 产品, 兔 SP9001 二抗试剂盒, 鼠 SP9003 二抗试剂盒, DAB 显色试剂盒均购自北京中山生物技术公司。COX-1 一抗, 为鼠多抗, Cayman 产品, 购自晶美生物技术有限公司。Fa VIII Ag 相关抗原, 购自博士德生物工程有限公司。替加氟(tegafur, FT207), 批号 981005, 济南制药厂生产。S180 瘤株, 由本院药物所药理室惠赠。

### 1.2 动物处理及方法

昆明种小鼠, 体重 18~22 g, 购自北京动物中心。随机分为对照组, FT207 阳性对照组, 及 Asp 50, 25, 10 mg·kg<sup>-1</sup>组。无菌抽取接种 8 d 的 S180 瘤种小鼠的腹水, 以生理盐水稀释, 计数并调细胞密度至  $2.5 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 。实验 d 1 每鼠右侧腋下接种 0.2 mL S180 细胞悬液, d 2 开始 ig 给药, 对照组给予 5% 可溶性淀粉, FT207 组给予用 5% 可溶性淀粉混悬的 FT207, 每只小鼠 3 mg; Asp 以 5% 可溶性淀粉配制成不同浓度的混悬液, 每天 ig 给药, 10 mL·kg<sup>-1</sup> 体重, 连续 9 d, 于 d 11, 动物称体重, 解剖取瘤组织, 称重。部分组织进行冰冻切片, 用于 COX-2 免疫组化检测。部分组织用 4% 甲醛固定, 进行病理及免疫组化染色。染色方法按说明书进行, 评分标准按 Rahman 等<sup>[4]</sup>方法进行, 各组的抑瘤率及各项免疫组化评分的显著性检验均采用单侧或双侧 *t* 或 *t'* 检验。

收稿日期: 2001-10-29 接受日期: 2002-04-26

**作者简介:**高雪芹(1964-), 女, 山东济南人, 副研究员, 医学硕士, 主要从事肿瘤发病机理的研究及肿瘤表达谱基因芯片的研制工作。

\* 联系作者 Tel: (0531)2919608, Fax: (0531)2911586, E-mail: xueqingao@hotmail.com

## 2 结果

### 2.1 阿司匹林对 S180 移植性肿瘤的抑制作用

FT207 阳性对照组肿瘤重量明显减小,抑瘤率 79.4%。Asp 高、中、低各组的抑瘤率分别为 21.1%, 16.7%, 23.4%, 经单侧检验,高剂量可使肿瘤明显抑制(表 1)。同时还观察到尽管 Asp 抑瘤率低于 FT207,但动物的一般状态较好,动物的体重继续增长,说明 Asp 不仅对肿瘤有抑制作用,还可改善肿瘤对动物的消耗作用。

### 2.2 阿司匹林对 S180 肿瘤组织环氧合酶-2 的表达的影响

由表 2 可见,FT207 对肿瘤组织的 COX-2 蛋白的表达无明显影响,而大剂量 Asp 可明显抑制 COX-2 的表达活性,说明 Asp 确实可抑制 S180 肿瘤细胞 COX-2 表达。使其可能作为预防及治疗肿瘤的靶点。

### 2.3 阿司匹林对 S180 移植性肿瘤中血管生长的影响

FT207 对 VEGF 的表达无明显影响,Asp 大、中、

小剂量组对 VEGF 蛋白的表达均有明显的抑制作用,说明 Asp 可能对 VEGF 诱导的肿瘤血管生成有抑制作用(表 2)。同样 FT207 对 FGF-2 的表达无明显抑制作用。而 Asp 对 FGF-2 的作用呈剂量依赖性,各组均可明显抑制 FGF-2 的表达,说明 Asp 可能对 FGF-2 诱导的血管生成有抑制作用(表 2)。微血管密度计数显示,FT207 对肿瘤血管的密度无明显影响。Asp 各组对微血管密度有一定抑制作用,小剂量组明显抑制,说明 Asp 对微血管的形成有抑制作用(表 2)。

## 3 讨论

国外研究表明 Asp 对移植性肥大细胞艾氏腹水症和 Lewis 肺癌均有明显的抑制作用<sup>[5]</sup>。本研究表明,Asp 50 mg·kg<sup>-1</sup>给药 9 d 可明显抑制 S180 肿瘤的生长,说明 Asp 对 S180 肉瘤有一定的治疗作用。在抑制肿瘤生长的同时,动物体重增长不受影响。说明 Asp 可抑制肿瘤对机体的消耗作用。本研究还表

Tab 1. Inhibitory effects of aspirin on sarcoma 180

Group	Drug/mg·kg <sup>-1</sup>	n	Body weight/g		Tumor weight/g	Inhibitory rate/%
			Before experiment	After experiment		
Control	5% soluble starch	18	21.8 ± 1.5	27.7 ± 2.8	2.09 ± 0.68	-
Tegafur	3 mg per mouse	13	21.0 ± 1.6	20.0 ± 3.3	0.43 ± 0.29* *	79.4
Aspirin	50	11	20.8 ± 2.1	29.1 ± 4.5	1.65 ± 0.59*	21.1
	25	12	21.2 ± 1.4	29.5 ± 3.8	1.74 ± 0.71	16.7
	10	12	21.9 ± 1.6	29.6 ± 2.4	1.60 ± 1.09	23.4

On d 1, all the mice were vaccinated S180 cells 2.5 × 10<sup>10</sup> L<sup>-1</sup> 0.2 mL. On d 2, the mice were ig 5% soluble starch 0.2 mL (control group), tegafur (3 mg per mouse) and different dose of aspirin for 9 consecutive days.  $\bar{x} \pm s$ . \*  $P < 0.05$ , \* \*  $P < 0.01$ , compared with control group by one-sided test.

Tab 2. Effects of aspirin on cyclooxygenase-2 (COX-2) and angiogenesis

Group	Drug/mg·kg <sup>-1</sup>	COX-2 score	VEGF score	FGF-2 score	MVD/count
Control	5% soluble starch	4.4 ± 0.7(6)	5.6 ± 0.7(10)	5.6 ± 0.8(8)	10.1 ± 4.9(10)
Tegafur	3 mg per mouse	3.5 ± 1.8(4)	5.8 ± 0.9(9)	4.9 ± 1.1(7)	7.1 ± 2.3(10)
Aspirin	50	2.7 ± 0.7(5)*	2.3 ± 1.9(9)* *	3.6 ± 0.5(6)* *	9.1 ± 4.5(7)
	25	4.3 ± 0.8(7)	3.6 ± 1.1(8)* *	3.9 ± 0.8(6)* *	6.8 ± 2.8(8)
	10	3.7 ± 0.9(9)	3.0 ± 2.1(10)* *	3.9 ± 0.9(6)* *	6.5 ± 3.6(11)*

See Tab 1 for the treatment. All the tumor tissues were dissected into two parts, one part was sectioned by ice CYTOSTAT for immunohistochemical detection of COX-2. The other part was fixed by 4% formaldehyde and routinely paraffin sectioned for the immunohistochemical detection of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and microvessel density (MVD). The scores were evaluated by the method of Rahman, *et al*<sup>[4]</sup>. The number in bracket implies the number of animals observed.  $\bar{x} \pm s$ . \*  $P < 0.05$ , \* \*  $P < 0.01$ , compared with control group.

明 Asp 可抑制肿瘤组织的 COX-2 活性。VEGF, FGF-2 在小鼠 S180 组织中也呈高表达, 而给予 Asp 后, VEGF, FGF-2 表达明显降低, 且 Asp 对 MVD 有一定的抑制作用, 说明 Asp 有可能通过抑制 COX-2 而抑制 VEGF, FGF-2 释放, 从而抑制血管形成。抑制肿瘤血管生成是 Asp 肿瘤化学预防和治疗的机理之一。

#### 4 参考文献:

- [1] Barnes CJ, Hardman WE, Cameron IL, Lee M. Aspirin, but not sodium salicylate, indomethacin, or nabumetone, reversibly suppresses 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic aberrant crypt foci in rats[J]. *Dig Dis Sci*, 1997, **42**(5): 920 - 926.
- [2] Ricchi P, Pignata S, Di Popolo A, Memoli A, Apicella A, Zarrilli R, *et al.* Effect of aspirin on cell proliferation and differentiation of colon adenocarcinoma Caco-2 cells[J]. *Int J Cancer*, 1997, **73**(6):880 - 884.
- [3] Sandler RS, Galanko JC, Murray SC, Helm JF, Woosley JT. Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory agents and risk for colorectal adenomas[J]. *Gastroenterology*, 1998, **114**(3):441 - 447.
- [4] Rahman MA, Dhar DK, Yamaguchi E, Maruyama S, Sato T, Hayashi H, *et al.* Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus-positive cases[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, **7**(5):1325 - 1332.
- [5] Hial V, Horakova Z, Shaff FE, Beaven MA. Alteration of tumor growth by aspirin and indomethacin: studies with two transplantable tumors in mouse [J]. *Eur J Pharmacol*, 1976, **37**(2):367 - 376.

## Inhibitory effects of aspirin on the transplanted sarcoma S180 and the expression of angiogenesis related factors

GAO Xue-Qin, ZHANG Wei-Dong, SONG Shou-Qin, WU Li-Cun, WANG Li

(*Institute of Basic Medical Sciences, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China*)

**Abstract:** **AIM** To investigate the antiangiogenesis by which aspirin exerts its tumor chemopreventive and chemotherapeutic effects. **METHODS** Kunming mice were randomizedly divided into control group, tegafur (3 mg per mouse) positive group and aspirin 50, 25, 10 mg · kg<sup>-1</sup> groups. One day after inoculation of 0.2 mL S180 cell (2.5 × 10<sup>10</sup> L<sup>-1</sup>) suspension, tegafur and aspirin was given by gastric intubation for 9 d. The inhibition rate on S180 was calculated routinely. The expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and microvessel density (MVD) was detected by immunohistochemical staining. **RESULTS** The growth of sarcoma S180 was significantly inhibited by aspirin at the dose of 50 mg · kg<sup>-1</sup>, with the inhibitory rate

21.1%. The expression of COX-2 in the tumor tissue was also inhibited by aspirin. And accordingly the expression of VEGF, FGF-2 and MVD was also markedly inhibited dose-dependently by aspirin. **CONCLUSION** Aspirin has inhibitory effects on sarcoma S180, and it decreases the expression of COX-2 in tumor tissue. There has positive relation between the expression of COX-2 and angiogenesis related factor. Antiangiogenesis may be one of mechanisms by which aspirin exerts its tumor chemopreventive and therapeutic effects.

**Key words:** aspirin; cells, sarcoma 180; prostaglandin-endoperoxide synthase; substance, endothelial growth, vascular; fibroblast growth factor, basic

(本文编辑 乔虹)