

L-Arginine Combined with Docetaxel Inhibiting Lung Cancer

Bin Wu^{1,2,3}, Liang Wei^{1,2,3}, Bingyu Feng^{1,2,3}, Dong Zhang^{1,2,3}, Yuangang Zu³, Shougang Jiang^{1,2,3*}

¹College of Chemistry, Chemical Engineering and Resource Utilization, Northeast Forestry University, Harbin Heilongjiang

²Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin Heilongjiang

³State Engineering Laboratory of Bio-Resources Eco-Utilization, Northeast Forestry University, Harbin Heilongjiang

Email: *602404389@qq.com

Received: Apr. 23rd, 2020; accepted: May 6th, 2020; published: May 13th, 2020

Abstract

By establishing the model of Lewis lung tumor cells injected in C57BL/6 mice, the inhibitory effect of L-arginine (L-Arg) combined with docetaxel (DTX) on lung cancer was evaluated. The results showed that the average survival time of the blank control group, L-arginine group, docetaxel group, and combination drug group was (24.20 ± 5.87 d), (28.00 ± 3.09 d), (29.60 ± 2.90 d), (35.40 ± 6.26 d); the survival of the combined drug group was significantly longer than that of the control group (n = 6, p < 0.01). Therefore, the combined drug had a significant inhibitory effect on lung cancer. This study provides new ideas for the development of highly effective anti-lung cancer drugs.

Keywords

L-Arginine, Docetaxel, Drug Combination, Lung Cancer

L-精氨酸联合多西紫杉醇抗肺癌的研究

吴斌^{1,2,3}, 魏亮^{1,2,3}, 冯冰玉^{1,2,3}, 张东^{1,2,3}, 祖元刚³, 姜守刚^{1,2,3*}

¹东北林业大学, 化学化工与资源利用学院, 黑龙江 哈尔滨

²东北林业大学, 森林植物生态学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨

³东北林业大学, 生物资源利用国家地方联合工程实验室, 黑龙江 哈尔滨

Email: *602404389@qq.com

*通讯作者。

摘要

通过以C57BL/6小鼠腋下接种Lewis肿瘤细胞建立肺癌模型，评估了L-精氨酸(L-Arg)联合多西紫杉醇(DTX)对肺癌的抑制作用。结果表明，空白对照组、L-精氨酸组、多西紫杉醇组、联合用药组平均生存期分别为(24.20 ± 5.87 d)、(28.00 ± 3.09 d)、(29.60 ± 2.90 d)、(35.40 ± 6.26 d)，联合用药组生存期较空白组有显著的延长(n = 6, p < 0.01)，因此，联合用药对肺癌有显著的抑制作用。本研究为开发具有高效的抗肺癌药物联用提供新思路。

关键词

L-精氨酸，多西紫杉醇，联合用药，肺癌

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

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



Open Access

1. 引言

肺癌发病率在我国居民恶性肿瘤中居于首位[1]，化疗是治疗肺癌的重要手段之一，而多西紫杉醇是治疗肺癌的重要临床用药[2]，但还不能根治肺癌，疗效有待提高。多西紫杉醇属于紫杉烷类抗肿瘤药物，其治疗恶性肿瘤的作用机制为促使微管蛋白的聚合及阻止微管解聚，从而对肿瘤细胞的有丝分裂及增殖具有抑制功能[3]。

L-精氨酸是一种非必需氨基酸，在体内是鸟氨酸循环的中间代谢产物[4] [5]，研究表明其具有一定的抗肿瘤效应，低浓度的 L-Arg 可以促进癌细胞的生长，高浓度的 L-Arg 则可能通过生成高浓度的 NO 而抑制癌细胞的增殖和诱导癌细胞的凋亡[6]。抗肺癌机制可能为通过抑制 P13K/Akt 信号通路激活来实现[7]。由于 L-精氨酸对肿瘤具有一定的疗效，且毒性较小[8]，联合肺癌的临床用药多西紫杉醇治疗肺癌，有望具有协同效应。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料

2.1.1. 材料与试剂

L-精氨酸(上海源叶生物科技有限公司)；多西紫杉醇(江苏恒瑞医药股份有限公司)；清洁级 C57BL/6 小鼠(哈尔滨医科大学附属二院动物中心)；75%酒精(天津市天力化学试剂有限公司)。

2.1.2. 试验仪器

ALC-1104 型分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)；FLC-3 型生物洁净工作台(北京东联哈儿仪器制造有限公司)；22R 型高速离心机(德国 Heraeus Sepatech 公司)；Eclipse TS100 型培养倒立显微镜(Nikon 公司)；E191IR 型 CO₂ 细胞培养箱(美国西蒙有限公司)；紫外线杀菌灯车(江阴市飞扬器械有限公司)；Zf11-01 型洁净动物饲养柜(东北林业大学植物药工程研究中心设计监制)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 建立小鼠肺癌模型

本实验已获得动物实验伦理许可。为研究 L-Arg 和 DTX 联用的抗肺癌效果, 首先建立小鼠肺癌模型 [9]。取指数生长期的 Lewis 肺癌细胞经胰蛋白酶消化后, 用培养液调整细胞浓度 1.0×10^9 个细胞/L。将小鼠置于通风厨内操作台上, 用体积分数为 75% 的酒精溶液消毒小鼠左腋下, 取调整好浓度的 Lewis 肺癌细胞 0.2 ml, 接种于小鼠左腋下。

2.2.2. 药物制备

L-Arg 溶液制备: 称取 600 mg L-Arg, 取两支试管备用, 将药品加入其中一支试管内, 加 1 ml 生理盐水至溶解, 用 5 ml 注射器取生理盐水加入试管定容到 8 ml, 最后过滤膜转移至另一试管中备用, 得浓度为 75 mg/ml 的 L-Arg 溶液。

DTX 溶液制备: 称取 5 mg DTX, 取两支试管备用, 将药品加入其中一支试管内, 先加 100 μ l 吐温 80, 再加 200 μ l 乙醇溶解 DTX 后用生理盐水定容到 10 ml, 最后过滤膜转移至另一试管中备用, 得浓度为 0.5 mg/ml 的 DTX 溶液。

2.2.3. 分组、给药及测量

将 6 周龄雌 C57BL/6 小鼠, 随机分为空白对照组, L-Arg 组, DTX 组, L-Arg 和 DTX 联用组, 每组 6 只。L-Arg 组以 1.5 g/kg 给药剂量灌胃 [10], DTX 组以 5 mg/kg 给药剂量腹腔注射, L-Arg 和 DTX 联用组给药方式为分别用上述方法给药。接种后隔 3 天测一次体重, 每 5 天用游标卡尺测量一次肿瘤长径 a 和短径 b , 按公式计算肿瘤体积 $v = \frac{a \times b^2}{2}$, 计算每组瘤体积平均值, 绘制肿瘤生长曲线, 计算抑瘤率,

公式为: 肿瘤抑制率 = $\frac{v_{\text{空白对照组}} - v_{\text{治疗组}}}{v_{\text{空白对照组}}} \times 100\%$ 。记录每组小鼠死亡时间, 绘制小鼠生存曲线 [11]。

协同作用测定: 金氏公式是金正均教授提出的可用于评价合并用药作用强度的公式, 公式为:

$$q = \frac{E_{a+b}}{E_a + E_b - E_a \times E_b},$$

E_a 为 L-Arg 单用时的肿瘤抑制率, E_b 为 DTX 单用时的肿瘤抑制率, E_{a+b} 为 L-Arg

和 DTX 分别以各自单用剂量联合使用时的肿瘤抑制率。 $q > 1.15$ 时, 表示 DTX 和 L-Arg 联用产生协同作用, $0.85 < q < 1.15$ 时, 表示 L-Arg 和 DTX 联用产生相互作用, $q < 0.85$ 时, 表示 L-Arg 和 DTX 联用产生拮抗作用 [12]。

2.3. 数据分析方法

数据统计学分析采用 SPSS 17.0 统计软件进行 Kaplan-Meier, One-way ANOVA 和 Kruskal-WallisH 相关分析。

3. 结果与分析

3.1. 模型小鼠体重变化情况分析

造模后小鼠体重变化如图 1, 四组小鼠进食均减少, 体重均下降, 空白组由于肿瘤发展较快导致体重减轻较慢。联合用药作用体重下降较快, 可能是肿瘤生长较缓慢导致的。空白对照组小鼠平均体重为 18.69 ± 0.61 g, L-Arg 组小鼠平均体重为 18.35 ± 0.56 g, DTX 组小鼠平均体重为 18.18 ± 0.96 g, L-Arg 和 DTX 联用组平均体重为 17.29 ± 1.02 g, 仅联用组与空白组相比有显著性差异 ($*P < 0.05$), 暗示联用组小鼠肿瘤得到有效控制。

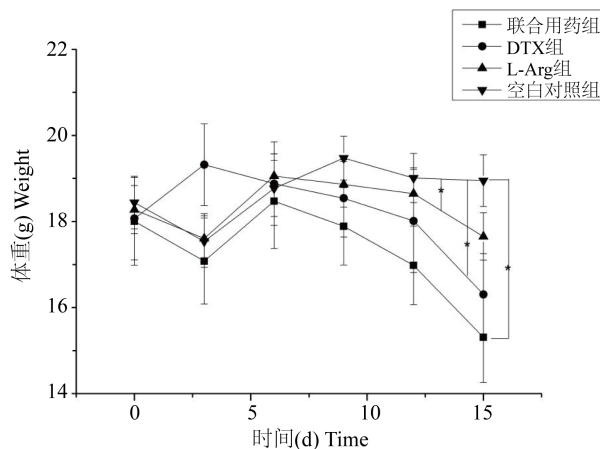


Figure 1. The weight change curve after modeling ($*P < 0.05$)
图 1. 造模后小鼠体重变化曲线($*P < 0.05$)

3.2. 模型小鼠瘤体体积变化情况

小鼠肺癌模型建立 8d 后, 各组小鼠均可见肿瘤生长, 小鼠腋下均可触摸到肿块, 且肿块随时间增加逐渐增大, 肿瘤生长曲线如图 2。L-Arg 和 DTX 联用组小鼠肿瘤体积明显小于其他三组, L-Arg 组肿瘤抑制率为 $37.75 \pm 6.83\%$, DTX 组为 $38.62 \pm 1.41\%$, 联用组为 $57.15 \pm 7.61\%$, L-Arg 和 DTX 联用组与 L-Arg 组和 DTX 组均有显著性差异($*P < 0.05$), 经协同作用测定 $q = 0.97$, 说明 L-Arg 和 DTX 联用产生相互作用, 即是说 L-Arg 和 DTX 的联用比单独用药更有效果, 并且不会产生相互抑制而引起其他副作用。

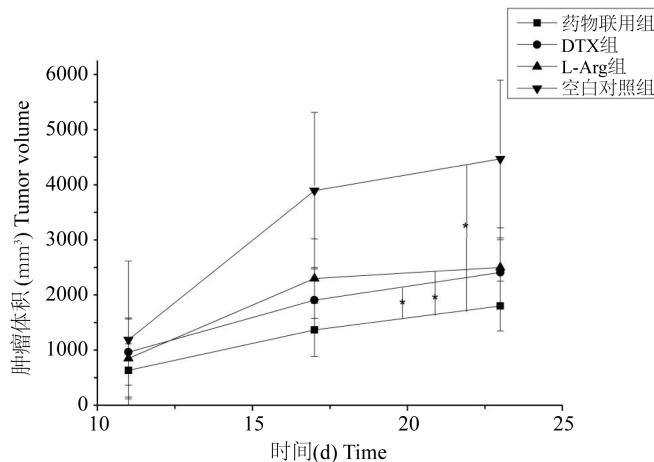


Figure 2. The tumor growth curve after modeling ($*P < 0.05$)
图 2. 造模后小鼠肿瘤生长曲线($*P < 0.05$)

3.3. 模型小鼠生存期分析

小鼠造模后, 每天观察小鼠的生存状态, 精神状态并记录生存期。对各组的小鼠采用 SPSS 17.0 软件中 Kaplan-Meier 法进行生存期分析, 生存曲线如图 3 所示。空白对照组小鼠平均生存周期为 24.20 ± 5.87 d, L-Arg 组为 28.00 ± 3.09 d, DTX 组为 29.60 ± 2.90 d, 联合用药组为 35.40 ± 6.26 d, L-Arg 和 DTX 联用组与其他各组均有显著性差异($P = 0.003$, $P = 0.009$, $P = 0.038$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$), 结果表明联合用药组生存期显著增长, 所以 L-Arg 和 DTX 联用有延长小鼠生存期的作用。

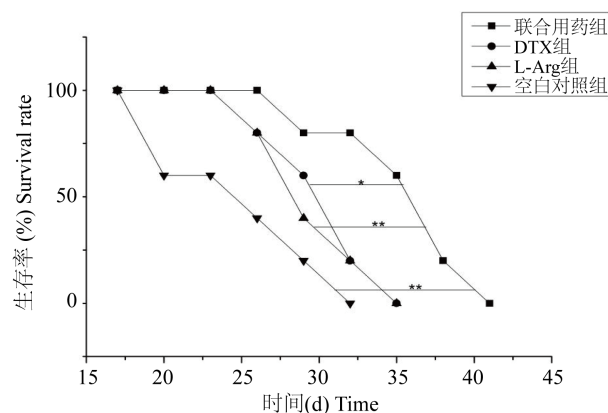


Figure 3. Survival time curve of model mice (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

图3. 模型小鼠的生存期曲线(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

4. 讨论

研究抗肺癌的新疗法具有重要意义。DTX 属于广谱抗肿瘤药物，活性是紫杉醇的 2 倍[13]，具有较好的抗肺癌效果，常作为二线化疗药物用于非小细胞肺癌(NSCLC)的单药和联合治疗[14]，其抗癌机制主要是阻滞细胞周期，从而诱导癌细胞发生细胞凋亡。单一药物化疗会产生耐药性，用药初期癌细胞迅速被杀灭，肿瘤体积明显缩小，但多次反复使用后癌细胞由于基因突变而产生化疗抵抗(耐药性)。

L-Arg 不但有抗癌的作用，而且 L-Arg 在体外循环全身灌注中能够抑制中性粒细胞激活和对血管内皮的粘附，清除氧自由基，降低血液粘滞性，改善微循环，降低外周血管阻力。改善生物材料相容性，减轻全身炎症反应[15]。

L-Arg 的抗癌、低毒性及对机体的保护作用，与 DTX 的优秀的抗癌能力联合可以在即保证抗癌效果的同时，又能有效地延长小鼠的生存期，实验结果也进一步证明 L-Arg 与 DTX 联用的抗肺癌效果。

5. 结论

综上所述，本实验通过建立 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌模型，研究了 L-Arg 和 DTX 药物联用对小鼠肺癌的抑制作用，通过观察记录，将 L-Arg 和 DTX 联用组与空白对照组、L-Arg 组和 DTX 组的小鼠体重、肿瘤体积和生存期进行比较发现联用药物组肿瘤生长速度减慢，提高了对肺癌的抑制率，最终延长了小鼠生存期，所以 L-Arg 和 DTX 药物联用为治疗肺癌提供了新的联合给药方法，为提高 DTX 治疗肺癌的疗效提供了新思路。

参考文献

- [1] 陈万青, 李贺, 孙可欣, 等. 2014 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2018, 40(1): 5-13.
- [2] 潘鑫焱, 霍伟, 朱晓敏, 孔楠. 培美曲塞二钠与多西紫杉醇单药治疗晚期非小细胞肺癌的对比分析[J]. 中国医药指南, 2018, 16(24): 130-131.
- [3] 崔超等. 多西紫杉醇或紫杉醇联合顺铂治疗老年晚期非小细胞肺癌的疗效比较[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(23): 5866-5867.
- [4] Sayantani, R., et al. (2011) 17 β -Estradiol-Linked Nitro-L-Arginine as Simultaneous Inducer of Apoptosis in Melanoma and Tumor-Angiogenic Vascular Endothelial Cells. *Molecular Pharmaceutics*, **8**, 350-359. <https://doi.org/10.1021/mp2000346>
- [5] Cho-Chung, Y.S., et al. (1981) Growth Arrest and Morphological Change of Human Breast Cancer Cells by Dibutyryl Cyclic AMP and L-Arginine. *Science*, **214**, 77-79. <https://doi.org/10.1126/science.6269181>

-
- [6] 尹晓燕, 姜军梅, 朱菊人. 5-氟尿嘧啶联合 L-精氨酸治疗裸鼠人肝癌移植瘤及其机制[J]. 世界华人消化杂志, 2004(10): 213-216.
- [7] 刘单, 洪羽, 胡智, 邓述恺. L-精氨酸抑制人肺腺癌 A549 细胞增殖及对 PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2017, 44(9): 585-589.
- [8] 范玉丽. L-精氨酸对大鼠急性肺损伤内皮系统的影响及机理[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海交通大学, 2015.
- [9] 任威, 李娟. 痰热清注射液辅助化疗对 Lewis 肺癌模型小鼠免疫功能及血管内皮生长因子、血管抑素、内皮抑素水平的影响[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(11): 2775-2778.
- [10] 罗海吉. 补充 L-Arg 对高温下血清 NO 含量和淋巴细胞增殖的影响[C]//中国营养学会. 中国营养学会第九次全国营养学术会议论文摘要汇编. 中国营养学会, 2004: 172.
- [11] 唐元章, 申文, 张井浪, 等. 小鼠跟骨癌性疼痛模型的制备[J]. 中国肿瘤, 2008, 17(1): 71-74.
- [12] 李淑艳, 张春晶, 王淑英, 等. 细胞因子诱导的杀伤细胞对 Lewis 肺癌细胞的抑瘤作用及抑瘤机制的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2007(21): 2605-2608.
- [13] 彭长征, 黄慧, 杨小林. 多西紫杉醇联合顺铂辅助化疗对非小细胞肺癌的疗效及不良反应影响[J]. 癌症进展, 2016, 14(2): 182-184.
- [14] 胡建平, 汤兵祥, 韩俊垒. 多西紫杉醇联合 GP 化疗方案对晚期非小细胞肺癌患者炎性因子、免疫功能及临床症状的影响[J]. 癌症进展, 2017, 15(10): 1168-1170.
- [15] 兰智新. 含 L-精氨酸氧合温血肺动脉持续灌注对体外循环肺损伤的临床研究[D]: [硕士学位论文]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2008.