

新加良附方联合 5-Fu 对荷人胃癌裸鼠血清 VEGF、bFGF 水平的影响

侯 丽¹ 许 晶² 王 婧¹ 郭晓青¹ 宋延平³

(1 北京中医药大学东直门医院肿瘤血液科,北京,100700; 2 陕西中医学院,咸阳,712046; 3 陕西省中医药研究院药理室,西安,710003)

摘要 目的:观察新加良附方联合 5-Fu 对荷人胃癌移植瘤裸鼠血清血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)、碱性成纤维生长因子(Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF)水平的影响。方法:建立移植性人胃癌细胞(SGC-7901)裸鼠移植瘤模型,并将模型动物随机分为空白组、5-Fu 组及新加良附方高、中、低剂量组、联合给药组(新加良附中剂量+5-Fu 组)6 组。新加良附方高、中、低剂量组给药剂量分别为 $10\text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $5\text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $2.5\text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$;5-Fu 组给药剂量为 $17\text{ mg} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$;空白组给予等量无菌生理盐水,新加良附方联合 5-Fu 组剂量为新加良附中剂量($5\text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$)联合应用 5-Fu($17\text{ mg} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$)。给药结束后,采用免疫学方法(ELISA)检测裸鼠血清中 VEGF、bFGF 的含量。结果:VEGF 含量显示:联合给药组,5-Fu 组,新加良附大、中、小剂量组裸鼠血清中含量较空白对照组均明显降低($P < 0.01$),新加良附各剂量组对 VEGF 含量减低作用具有一定的剂量依赖性,联合用药组 VEGF 含量低于 5-Fu 组、新加良附中剂量组,但无统计学意义($P > 0.05$)。bFGF 含量显示:联合给药组,5-Fu 组,新加良附大、中、小剂量组裸鼠血清中含量较空白对照组均明显降低($P < 0.01$)。结论:新加良附方可以下调人胃癌裸鼠的血清中 VEGF、bFGF 表达水平,提示新加良附方具有一定抗胃癌新生血管生成作用。

关键词 新加良附方;新加良附方联合 5-Fu; VEGF; bFGF

The Effects of Modified Liang-Fu Formula Combined with 5-Fu on VEGF, bFGF Expression of Human Gastric Cancer Xenografts in Nude Mice

Hou Li¹, Xu Jing², Wang Jing¹, Song Yanping³

(1 Department of Oncology and Hematology, Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 2 Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Shanxi Xianyang 712046, China; 3 Pharmacology Department, Shanxi Institute of Traditional Chinese Medicine, Shanxi Xi'an 710003, China)

Abstract Objective: To observe the effect of Modified Liang-fu Formula (MLFF) combined with 5-Fu on VEGF and bFGF expression in the serum of human gastric cancer xenografted nude mice. **Methods:** The animal model of SGC-7901 xenografted nude mice was established, and all the mice were randomly divided into 6 groups; namely model control group (the same amount of normal sterile saline), 5-Fu group ($17\text{ mg} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$), MLFF high-dose group ($10\text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$), MLFF medium-dose group ($5\text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$), MLFF low-dose group ($2.5\text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$) and drug combination group ($5\text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ MLFF combined with $17\text{ mg} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 5-Fu). After 10 days of continuous treatment, eyeball blood was withdrew, the mice were killed, and the expression of VEGF and bFGF in the serum were detected using ELISA method. **Results:** Compared to model control group, the expression levels of VEGF in nude mice serum were significantly reduced in 5-Fu group, MLFF high-dose group, MLFF medium-dose group, MLFF low-dose group and drug combination group, respectively ($P < 0.01$), while MLFF reduced VEGF expression in a dose-dependent manner. The combination group showed a lower level of VEGF compared to 5-Fu group and MLFF medium-dose group, but there was no significant difference ($P < 0.05$). Meanwhile, compared to model control group, the expression level of bFGF in nude mice serum was significantly decreased in 5-Fu group, MLFF high-dose group, MLFF medium-dose group, MLFF low-dose group and drug combination group, respectively ($P < 0.01$). **Conclusion:** MLFF can down-regulate the expression of VEGF, bFGF in the serum of human gastric cancer xenografted nude mice. It indicates that MLFF has the potential to serve as anti-angiogenesis agent for gastric cancer.

Key Words Modified Liang-fu formula; Modified Liang-fu formula combined with 5-Fu; VEGF; bFGF

中图分类号:R287 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.12.020

肿瘤血管生成是指肿瘤组织在已存在微血管床基础上,以毛细血管为主的新生血管系统芽生与发展过

程,是肿瘤生长和转移的重要病理学基础。自 70 年代初 Folkman 等^[1]首先提出肿瘤生长依赖于新生血管生

成以来,肿瘤血管生成机理与肿瘤血管抑制剂研究日趋活跃。经过几十年的应用基础研究发现,肿瘤新生血管形成是肿瘤发生、进展和转移的重要生物学行为。新加良附方由《良方集腋》中的良附丸加味而来,由高良姜、香附和穿山龙三味药物组成,处方中单味药均有抗癌作用的文献报道^[2-7]。在前期新加良附方抗肿瘤血管生成的体内研究中,我们发现,新加良附方可以下调抑制移植型小鼠肝癌 H22 实体瘤组织中 VEGF 表达和微血管密度(Microvessel Density, MVD),初步表明新加良附方可能通过抑制肿瘤血管生成而发挥抗肿瘤效应^[8];新加良附方大、中剂量组可以抑制移植型人胃癌 MGC803 实体瘤组织的 MVD、下调 VEGF 蛋白表达,表明新加良附方能够抑制人胃癌新生血管形成^[9]。为进一步探讨新加良附方抗肿瘤血管生成效应及其机制,我们进行本次体内实验,从分子水平观测其对荷人胃癌 SGC-7901 移植瘤裸鼠血清中血管生成相关因子表达的影响。

1 材料

1.1 动物及细胞系 BALB/C 无胸腺裸鼠, SPF 级, 4~5 周龄, 60 只, 雌雄各半, 购于中国人民解放军第四军医大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(湘)2011-00023, 合格证号: 4300470001967, 在第四军医大学动物实验中心屏蔽系统辅以洁净层流柜环境中饲养。人胃癌(SGC-7901)细胞系, 购于第四军医大学实验动物中心。

1.2 主要药物 按照中药新药制备工艺制备, 新加良附方(浸膏或干燥原粉)由陕西星华制药有限公司提供; 阳性药: 注射用 5-氟尿嘧啶(5-Fu)由上海旭东海普药业有限公司生产, 国药准字: H31020593, 产品批号 110608。

1.3 仪器与试剂 实验试剂: 1640 培养液购自 Gibco 公司; 小牛血清购自杭州四季青公司; 胰蛋白酶; VEGF、bFGF 酶联免疫吸附检测(ELISA)试剂盒。实验仪器: 超净工作台 SW-CJ-IF(美国 BIOLOGICAL 公司); CO₂ 恒温培养箱(美国 SHELDON 公司); TDZ4AWS 台式低速自动平衡离心机; 低温冰箱(日本 SANYO 公司); 酶标仪(美国伯乐)。

2 方法

2.1 复苏与培养 液氮罐中取出含有 SGC-7901 细胞的冻存管, 放入 37℃ 水浴内, 使其溶化吸取细胞悬液并加入培养液(10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液), 人胃癌细胞株 SGC-7901 置于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中, 在 37℃ 饱和温度, 5% CO₂ 条件下培养传代。待细胞长满单层, 用 0.25% 胰酶消化, 培

养液吹打离心 1 000 r/min, 5 min, 去上清液收集细胞, 传代培养或接种。

2.2 接种 将收集的细胞用 PBS 稀释, 镜下细胞计数, 调整细胞悬液浓度至 1×10^7 个细胞/mL, 每只裸鼠以 0.2 mL 接种于颈背部, 待肿瘤长至 1 000 mm³ 时移植。

2.3 分组 待已接种裸鼠肿瘤体积约在 100~300 mm³ 之间时, 据性别, 肿瘤体积大小将造模成功的裸鼠分成六组, 空白组、5-Fu 阳性对照组、新加良附大剂量组、新加良附中剂量组、新加良附小剂量组、联合给药组(即新加良附中剂量 + 5-Fu 组), 10 只/组, 称重标号。

2.4 给药剂量时间及方法 空白组: 以生理盐水每天 0.2 mL/10 g 灌胃; 5-Fu 组: 按 $17 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量腹腔注射, 2 次/周。新加良附方各剂量组: 高剂量组以 $10 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药, 相当于成人剂量的 20 倍; 中剂量组以 $5 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药, 相当于成人剂量的 10 倍; 小剂量组以 $2.5 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药, 相当于成人剂量的 5 倍。联合给药组: 即新加良附中剂量组与 5-Fu 联合给药, 新加良附中剂量与 5-Fu 剂量同上, 连续给药 10 d。

2.5 标本收集及检测方法 给药第 10 d 后, 裸鼠眼球取血 1 mL, 离心后取血清冻存, 采用酶联免疫吸附双抗夹心法(ELISA)检测 VEGF、bFGF 的表达水平, 严格按照说明书由专人操作。

2.6 统计学方法 结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析处理, 采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$, 有统计学意义。

表 1 各组 VEGF、bFGF 蛋白表达水平($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

分组	VEGF	bFGF
空白组	159.83 ± 21.14	4.68 ± 0.42
联合给药组	60.33 ± 13.96 **	3.79 ± 0.44 $\Delta\Delta$
5-Fu 组	65.79 ± 25.94 **	3.33 ± 0.17 $\Delta\Delta$
新加良附高剂量组	65.65 ± 8.11 **	3.30 ± 0.27 $\Delta\Delta$
新加良附中剂量组	67.13 ± 8.04 **	2.99 ± 0.32 $\Delta\Delta$
新加良附低剂量组	70.04 ± 35.26 **	3.01 ± 0.28 $\Delta\Delta$

注: 与空白组相比, ** $P < 0.01$; 与空白组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

3 结果

VEGF 含量显示: 联合给药组, 5-Fu 组, 新加良附大、中、小剂量组裸鼠血清中 VEGF 含量较空白对照组均明显降低($P < 0.01$), 且新加良附方各组对 VEGF 抑制作用具有一定的量效关系。联合用药组 VEGF 含量低于与新加良附中剂量组及 5-Fu 组, 但无统计学意义($P > 0.05$)。bFGF 含量显示: 联合给药组, 5-Fu 组, 新加良附大、中、小剂量组裸鼠血清中 bFGF 含量较空

白对照组均明显降低($P < 0.01$),新加良附方各剂量组 bFGF 含量无明显量效关系,见表 1。

4 结论

胃癌在世界范围内最常见的恶性肿瘤中排名第四,为第二大癌症死因^[10-11]。根据世界卫生组织统计及 2012 年中国肿瘤登记年报数据显示,2009 年胃癌位居我国恶性肿瘤发病率第二位,死亡率第三位,发病人数占全球胃癌发病总人数的一半左右,是胃癌大国,与日韩等国不同,我国胃癌发病率和病死率高、仅 10% 左右为早期胃癌、以进展期病例为主要诊治对象等特点。近年来新发胃癌患者呈现年轻化趋势,30 岁以下年轻患者的比例由上世纪 70 年代的 1.7% 蹿升至当前的 3.3%,严重影响了社会劳动力和社会生产,给家庭和社会带来了很大危害^[12]。近年来,随着新药的开发和新方法的应用,晚期胃癌的治疗效果有一定程度的提高,但远不如人们期望的那样乐观。中医药在缓解临床症状、对放疗化疗减毒与增效、提高患者生活质量、预防肿瘤复发与转移等方面具有优势与特色。通过临床实践发现,在胃癌发生与进展过程中,常有胃脘部隐痛、畏寒怕冷、得温则舒、遇寒加重等前驱症状,结合胃部肿块、胀痛、食欲减退、暖气或呕吐、疲乏、消瘦、舌质青紫、脉象细涩等临床特征,与“寒主收引、主凝滞、主痛”等中医理论相符,其病机关键是“寒凝→气滞→血瘀”,故而确立了“温阳散寒,理气活血”为胃癌基本治疗原则^[13-15],拟定由高良姜、香附、穿山龙组成的新加良附方(高良姜:香附:穿山龙为 1:1:2),方中高良姜性味辛、大热,归脾、胃经,具有温中暖胃、散寒止痛之功效,为君药,针对寒邪凝结脾胃治疗;香附性味辛、微苦、微甘、平,归肝、脾、三焦经,具有疏肝理气之功效,为臣药,协助君药理寒凝之气滞,疏肝行气以止痛。两药相配,一散寒凝,二行气滞。穿山龙性味甘、苦、温,归心、肺经,活血通络,化瘀行血为佐药,助君药化寒凝之血瘀,协臣药理寒凝之气滞。三药合用具有“温胃散寒,理气活血”之功效,用以治疗或辅助治疗中晚期胃癌,在前期体内外实验及临床应用中取得一定疗效^[16-17]。

胃癌生长具有明确的血管依赖。表皮生长因子受体(Epithelial Growth Factor Receptor, EGFR)、血管内皮生长因子受体(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, VEGFR)和人表皮生长因子受体-2(Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, HER-2)的过表达与胃癌患者较差的预后存在相关性^[18]。临床试验证明曲妥珠单抗(抗 HER-2 抗体)联合化疗对 HER-2 阳性的晚期胃癌或食管癌患者临床疗效优于单纯化疗^[19]。

贝伐珠单抗(抗 VEGFR 抗体)、索拉非尼和西妥昔单抗(抗 EGFR 抗体)的安全性及疗效也得到了 II 期临床试验初步肯定。基于 AVAGAST 研究显示的 PFS 优势,提示应进一步开展抗新生血管生成研究。中药或有效成分抑制肿瘤血管生成研究包括单味中药及其提取物以及中药复方的研究,如人参与人参皂苷 Rg₃^[20-21]、莪术与榄香烯^[22]等多项研究。

课题组在前期研究发现新加良附大、中剂量组能够抑制移植型人胃癌 MGC803 实体瘤模型以 CD31 作为标记的 MVD,因此认为调控胃癌新生血管可能是新加良附颗粒抑制胃癌生长的效应机制之一^[9]。肿瘤血管生成受到促血管生成因子(如 VEGF、bFGF)的正反馈调节。本研究通过检测裸鼠血清中 VEGF 和 bFGF 表达水平来评估新加良附方的抗血管生成效应及机制。其中,VEGF 是血管内皮细胞生长增殖的主要因子,对肿瘤血管生成具有较强和特异的调节作用,通过与血管内皮细胞生长因子受体结合,引起一系列的信号转导,刺激血管(淋巴管)内皮细胞增殖和迁移,VEGF 高表达促进了肿瘤微血管生成且与胃癌进展密切相关,并与神经纤毛蛋白-1(Neuropilin-1, NRP-1)表达存在协同关系^[23]。本研究显示新加良附方可以下调荷人胃癌移植瘤裸鼠血清中 VEGF 表达水平,且该作用具有一定的剂量依赖性;新加良附方和 5-Fu 联合用药对 VEGF 表达抑制作用优于单独用药,但尚无统计学意义。bFGF 是成纤维细胞生长因子家族中的一员,对多种细胞具有促进增殖促分化的功能,是一种生物活性较强的促分裂素,定位于染色体 4q。bFGF 不仅能刺激和调节血管内皮细胞、上皮细胞、成纤维细胞等分化增殖,还可促进成纤维细胞产生胶原,调控基质合成和降解,在肿瘤浸润转移和血管生成方面发挥重要作用,与 VEGF、PDGF 等细胞因子相互协同组成血管新生的调节网络^[24]。本项研究显示新加良附方可以下调荷人胃癌移植瘤裸鼠血清中 bFGF 表达水平,但无明显量效关系。综上所述,本研究选择 VEGF、bFGF 两项指标从血管生成角度进行了研究探讨,发现新加良附方可以下调人胃癌裸鼠的血清中 VEGF、bFGF 表达水平,且对 VEGF 作用具有量效关系,提示其具有一定抗胃癌新生血管生成作用。但血管生成是一个复杂的网络系统,这两项指标还远远不够,仅依赖某一因子的变化评价疗效存在不确定性,应在下一步研究中综合考虑多个因子的变化,从动态平衡的角度予以评价。

参考文献

[1] Folkman J. Tumor angiogenesis; Therapeutic implication [J]. N Engl J

- Med, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [2] 刘影, 梅晰凡, 王晶, 等. 高良姜素对人肝癌 SMMC-7721 细胞 PI3K/AKT 信号通路的影响[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(1): 40-42.
- [3] 许云霞, 赵新淮. 高良姜素对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖、周期循环和凋亡的体外影响[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(15): 1274-1278.
- [4] 宋宇, 赵琦, 曹阳, 等. 高良姜素对人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖的影响及其机制的研究[J]. 中国医学工程, 2012, 20(5): 56-58.
- [5] 薛刚, 邹玺, 王瑞平. 竹节香附素 A 抗肿瘤研究进展[J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38(2): 224-226.
- [6] 张风霞, 王新陆, 高聆, 等. 薯蓣皂苷元的研究[J]. 吉林中医药, 2013, 33(1): 75-77.
- [7] 王晓荣, 李湧健, 程彬彬. 薯蓣皂苷元抗肿瘤作用及其机制研究[J]. 西部中医药, 2014, 27(5): 140-142.
- [8] 雒琳, 马成杰, 陈信义. 新加良附方影响小鼠肝癌组织 VEGF 与 MVD 表达的研究[J]. 北京中医药, 2008, 27(5): 378-380.
- [9] 倪磊, 田劭丹, 马成杰, 等. 新加良附方影响人胃癌裸小鼠移植瘤新生血管形成的研究[J]. 山西中医, 2010, 26(4): 50-52.
- [10] Ahn H, Lee HJ, Yoo MW, et al. Changes in clinicopathological features and survival after gastrectomy for gastric cancer over a 20-year period[J]. Br J surg, 2011, 98(2): 255-260.
- [11] Jeong O, Park YK. Clinicopathological features and surgical treatment of gastric cancer in South Korea: the results of 2009 nationwide survey on surgically treated gastric cancer patients[J]. J Gastric cancer, 2011, 11(2): 69-77.
- [12] 季加孚. 我国胃癌防治 30 年回顾[J]. 中国肿瘤临床, 2013, 40(22): 1346-1351.
- [13] 王婧, 田劭丹, 陈信义. 胃癌中医证素探讨[J]. 天津中医药, 2009, 26(5): 402-404.
- [14] 王婧, 田劭丹, 陈信义. 中医药治疗中晚期胃癌进展[J]. 世界中西医结合杂志, 2009, 4(8): 596-600.
- [15] 刘庆, 李忠, 田劭丹. 等. 167 例进展期胃癌中医证型研究分析[J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(4): 273-276.
- [16] 田劭丹, 董青, 侯丽, 等. 新加良附方对移植性人胃癌细胞 Bax/Bcl-2 表达影响[J]. 中国医药指南, 2010, 8(9): 21-23.
- [17] 董青, 田劭丹, 侯丽, 等. 新加良附方对移植性人胃癌细胞 F/FL 表达的影响[J]. 中国医学创新, 2010, 7(5): 28-30.
- [18] Wagner AD, Moehler M. Development of targeted therapies in advanced gastric cancer: promising exploratory steps in a new era[J]. Curr Opin Oncol 2009, 21(4): 381-385.
- [19] Bang Y, Chung H, Xu J, et al. Pathological features of advanced gastric cancer (GC): Relationship to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positivity in the global screening programme of the ToGA trial [abstract]. J Clin Oncol 2009, 27(15): 4556.
- [20] 王兵, 王杰军, 徐钧, 等. 人参皂苷 Rg₃ 对胃癌诱导血管内皮细胞增殖的抑制作用[J]. 肿瘤防治杂志, 2010, 8(3): 234-236.
- [21] 王沛, 陈国荣. 人参皂苷 Rg₃ 对表达多耐药基因的晚期胃癌患者生存期的影响[J]. 中国社区医师, 2014, 30(15): 11-13.
- [22] 李秋营, 韩峰, 陈腾, 等. 榄香烯对裸鼠胃癌原位移植瘤血管生成的抑制作用[J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(3): 287-290.
- [23] 李明, 李强. Neuropilin-1 及 VEGF 在胃癌组织中的表达与微血管生成的关系[J]. 中国肿瘤临床, 2014, 41(5): 332-336.
- [24] 王小军, 杨文平. bFGF、MMPs 和 TIMPs 在肿瘤临床研究中的进展[J]. 中国现代医药杂志, 2012, 14(2): 126-128.

(2014-02-11 收稿 责任编辑: 徐颖)

(上接第 1635 页)

- [8] 姚李吉, 沈洪. 抗抑郁中医方药的实验研究进展[J]. 光明中医, 2008, 23(5): 696.
- [9] 沈渔邨. 精神病学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 663.
- [10] 董瑞婕, 吴爱勤. 糖皮质激素受体在抑郁症病理机制中的地位[J]. 上海精神医学, 2008, 20(4): 243.
- [11] Oquendo MA, Placidi GP, Malone KM, et al. Positron emission tomography of regional brain metabolic responses to a serotonergic challenge and lethality of suicide attempts in major depression[J]. Arch Gen Psychiatry, 2003, 60(1): 14-22.
- [12] Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression[J]. Arch Gen Psychiatry, 1997, 54: 597-606.
- [13] Stockmeier CA, Mahajan GJ, Konick KLC, et al. Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression[J]. Biol Psychiatry, 2004, 56(9): 640-50.
- [14] Lin YH, Liu AH, Xua Y, et al. Effect of chronic unpredictable mild stress on brain-pancreas: relative protein in rat brain and pancreas[J]. Behav Brain Res, 2005, 165(1): 63-71.
- [15] 许晶, 李晓秋. 慢性应激抑郁模型的建立及其评价[J]. 中国行为医学科学, 2003, 12(1): 14-17.
- [16] Ulrich-lai YM, Figueire do HF, Ostrander MM, et al. Chronic stress induces adrenal Hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006, 291(5): 1965.

(2014-04-09 收稿 责任编辑: 曹柏)