扶正消癌Ⅰ号方对小鼠肠癌肝转移血管内皮生长因子的表达的影响

张艳丽[1] 张红卫[1] 杜 鹃[2] 侯安继[1,3]

(1 上海市第七人民医院肿瘤科,上海,200137; 2 第二军医大学附属长海医院中心实验室,上海,200137;
3 上海市徐汇区中心医院肿瘤科,上海,200137)

摘要 目的:观察自拟扶正消癌Ⅰ号方对 balbc 小鼠移植瘤血管内皮生长因子(VEGF)表达的作用,探讨该方对多种肿瘤的作用机制。方法:采用 balbc 小鼠,脾下注射法建立鼠大肠癌细胞株肝转移的动物模型,随机分为 4 组,每组 12 只:1)阴性对照生理盐水组;2)氟尿嘧啶组;3)扶正消癌Ⅰ号方中药组;4)扶正消癌Ⅰ号中药 + 氟尿嘧啶组。观察生活质量,抑瘤率,免疫组化方法检测 VEGF 蛋白表达的情况。结果:扶正消癌Ⅰ号方 + 氟尿嘧啶组、消癌Ⅰ方组小鼠的生活质量较其他 2 组好,阴性对照组瘤体最大,瘤体中药组其次,联合用药组体积最小,氟尿嘧啶组、中药组及联合用药组均能下调 VEGF 蛋白的表达。结论:扶正消癌Ⅰ号方对鼠大肠癌细胞株肝转移小鼠抑制新生血管的作用机制可能是通过下调 VEGF 的表达,抑制肿瘤微血管生成,可能是该方抗肿瘤的机制之一。

关键词 中医药;血管生成;血管内皮生长因子

Effect of Fuzheng Xiaoai I Decoction on the Expression of VEGF in the Liver Metastasis of Colon Cancer Mice

Zhang Yanli[1], Zhang Hongwei[1], Du Juan[2], Hou Anji[1,3]

(1 *Oncology Department of the Seventh People's Hospital of Shanghai*, *Shanghai* 200137, *China*; 2 *Center Laboratory of Changhai Hospital affiliated to Second Military Medical University*, *Shanghai* 200137, *China*;
3 *Oncology Department of Center Hospital of Xuhui District*, *Shanghai* 200137, *China*)

Abstract **Objective**: To investigate the effect of Fuzheng Xiaoai I decoction on VEGF expression of mice with liver metastasis of colon cancer, and discuss its possible mechanism. **Methods**: The tumor models were established by injecting human carcinoma of CT26 cells under the balbc mice. Balbc mice with liver cancer cells are randomized divided into 4 groups (12 in each group): 1) Control group; 2) 5-Fu group; 3) Fuzheng Xiaoai I group; 4) Fuzheng xiaoai I + 5-Fu group. The life quality of mice, tumor inhibiting rates, and the expression of VEGF in tumor tissue were measured. **Results**: The life quality of group 4 and 3 are better than that of the other groups. Besides, the tumor size of group 4 was the smallest, and that of the control group was the biggest. The levels of VEGF in all groups were decreased. **Conclusion**: Fuzheng Xiaoai I could inhibit the angiogenesis of tumor possibly by down regulating VEGF and obstructing the formation of tumor vessels.

Key Words Traditional Chinese medicine; Angiogenesis; VEGF

中图分类号:R289.5 **文献标识码**:A **doi**:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.06.035

随着人类饮食生活水平的提高和生活水平的改变,结直肠癌的发病率逐年增加,给社会带来了巨大的负担。大肠癌其 5 年生存率仍不高,主要原因是肿瘤的转移和复发,近些年来肿瘤新生血管生成是研究热点,实体肿瘤的生长、侵袭和转移都依赖于肿瘤血管的生成。以益气扶正[1]为根本大法是大肠癌防治中最常用的治疗手段之一,氟尿嘧啶以抗代谢物而起作用,干扰 DNA、RNA 合成而组织肿瘤细胞的合成。本研究利用鼠大肠癌细胞株肝转移的 Bablc 小鼠模型,探讨扶正消癌Ⅰ号联合氟尿嘧啶对荷瘤小鼠血管生长的抑制作用与机制。

1 材料

1.1 实验动物 清洁级 Balb/c 小鼠 48 只,雌雄各半,体质量(20 + 2)g,由第二军医大学,长海医院实

基金项目:上海市卫生局中医药科研基金项目(编号:2012QJ006B),上海市浦东新区卫生系统重点学科群建设项目(编号:PWZxq2014-12),上海市第七人民医院"七院新星"培养计划(编号:qyxx-2012-26)

作者简介:张艳丽(1983.04—),女,硕士研究生,主治医师,研究方向:中西医结合肿瘤防治,Tel:(021)58670561-6340,E-mail:yanly_zhang@163.com

通信作者:侯安继(1964.12—),男,博士研究生,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:中西医结合消化道肿瘤临床和实验研究,Tel:(021)58670561-6337,E-mail:anjihou@163.com

验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2012-0003,实验动物使用许可证号 SYXK(沪)2007-0003。分笼饲养,适应环境 3 d 后开始实验。

1.2　实验药物　扶正消癌 I 号方(由上海市第七人民医院中药房提供,每毫升含生药 2.8 g,相当于人用量的 5 倍),密封,4 ℃保存,临用前配置。氟尿嘧啶(5-Fu)(上海旭东海普药业有限公司生产,生产批号:FA140418,规格:10 mL:0.25 g)。小鼠大肠癌细胞株 CT26.WT 细胞,ATCC 公司提供。RPMI1640,Sigma 提供,小牛血清,杭州四季青公司提供。EnVision 试剂(HRP/Rabbit and mouse)(货号:K500711 kit,丹麦 Dako)

2　实验方法

2.1　造模方法　本研究参考国内外文献,用脾脏注射法建立小鼠大肠癌细胞株(CT26)肝转移模型[2]。常规培养小鼠大肠癌细胞株 CT26,接种于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基,置于 37 ℃、50 mL/L CO_2 恒温箱中培养。于对数生长期细胞,用生理盐水,制成 5×10^7 细胞/mL 浓度的细胞悬液,取 50 L 接种于 4 ~ 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠脾被膜下。在注射部位可见脾被膜发白、肿胀,拔出针头,立即止血按压,约 3 min,观察无出血后,把脾脏送回腹腔内,关腹。严格无菌操作。术后继续在 SPF 条件下饲养。

2.2　分组与给药方案

2.2.1　分组　当小鼠肝脏部位出现约 0.5 cm 直径大小瘤体时编号,采用数字表法随机分为 4 组,即扶正消癌 I 号中药方(简称消癌 I 方) + 氟尿嘧啶组、消癌 I 方组、氟尿嘧啶及阴性对照生理盐水组,每组 12 只均置于 SPF 环境下饲养。

2.2.2　给药方案　1)阴性对照生理盐水组:生理盐水,1.5 mL/只,1 次/d,灌胃,连续给药 2 周;2)氟尿嘧啶组(20 mg/kg),1.5 mL/只,每隔 2 d 给药 1 次,腹腔注射,连续给药 2 周;3)扶正消癌 I 号方中药组,中药方(36 g/kg),1.5 mL/d,1 次/d,灌胃,连续给药 2 周;4)扶正消癌 I 号中药 + 氟尿嘧啶组:中药方(36 g/kg),1.5 mL/d,1 次/d,灌胃;氟尿嘧啶(20 mg/kg),每隔 2 d 给药 1 次,腹腔注射,连续给药 2 周。上述治疗组均于随机分组当日起给药;饲料、饮水自由。

2.3　标本提取　第 15 天处死。严格无菌操作取瘤重 W,清除部分坏死和纤维结缔组织,取一小块组织管,-80 ℃液氮冷冻保存,10% 中性福尔马林溶液固定、石蜡包埋的残留组织,连续 4 mm 切片,免疫组化检测。每组 2 例。免疫组化法检测血管内皮生长因子的表达。濒死小鼠及时处死解剖,瘤组织切取和保存方法同前。

2.4　检测指标

2.4.1　观察小鼠每天的饮食、水,体重,活动度,毛发光泽度及精神状况。

2.4.2　瘤重、抑瘤率　建模治疗后,观察抗肿瘤效果,每隔 3 d 用游标卡尺测量肿瘤最大直径和横向尺寸的估计量,平均各组,绘制生长曲线:1/2(直径×宽度)。第 15 天称重,脱颈处死小鼠,并在无菌操作下取出肿瘤组织,并迅速称重 W。每组 2 例肝肿瘤。计算实体肿瘤生长抑制率(IR):IR(%) = (1 —治疗组平均瘤重/对照组平均瘤重)×100%。

2.4.3　免疫组化法检测 VEGF 蛋白表达　采用 Envision 免疫组化染色法。在普通显微镜下观察并摄片。操作步骤参照说明书:每个肿瘤组织切片常规脱蜡,在高温柠檬酸抗原修复后,加 3% 过氧化氢,用 PBS 洗涤,滴 VEGF 抗体 1∶100(50 μL/组织块),4 ℃过夜,用 PBS 洗涤,二抗 37 ℃孵育,DAB 显色,复染,脱水,封片。阳性细胞细胞质呈棕黄色颗粒。参考刘曼曼等检测方法[3],先在低倍镜下(100),阳性染色最密集的区域,然后在 400 次从 5 个随机选择的视觉范围,输入的显微图像分析系统(leica QV3 系统),染色强度的变化的阳性细胞作为定量指标,计算平均灰度值的阳性表达水平,灰度值越小,阳性表达水平愈高,反之亦然。

2.5　统计学方法　运用 SPSS 15.0 统计软件包进行统计处理。符合正态齐性和方差齐性,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　结果

3.1　一般情况　各组小鼠用药期间活动性表现差异明显。在整个过程中,氟尿嘧啶组有小鼠因一般情况较差,有 2 只未完成实验。其中生理盐水组小鼠瘤体增长最大,进食量明显减少,小鼠精神状态较差,活动度减少,随时间延长,其明显消瘦,消癌 I 方组小鼠虽然瘤体大,但是摄食、饮水量、精神状态较其他组明显好。消癌 I 方组、氟尿嘧啶组、联合用药组体重较生理盐水组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),而各用药组体重差异无统计学意义。

3.2　瘤重、抑瘤率　初期各组小鼠肿瘤体积均随着时间推移呈现增长趋势,阴性对照组 > 消癌 I 方组 > 氟尿嘧啶组 > 联合用药组(见表 1)。用药组中,联合用药组小鼠的瘤体生长速度较其他组慢,单纯中药组、中药和氟尿嘧啶联合用药组其瘤体生长速

度最快，但小鼠生活精神状态较其他用药组改善，随着时间延长，氟尿嘧啶组和联合用药组均出现缩小趋势，但均未出现肿瘤消失情况。抑瘤率分别为中药组 59.83%，氟尿嘧啶组 73.68%，联合用药组 84.48%（见表 2）。各用药组与对照组瘤体治疗差异均有统计学意义（$P<0.01$）。

表 1　各组小鼠种植瘤的生长情况

时间	阴性对照组	消癌 I 方组	氟尿嘧啶组	中药 + 氟尿嘧啶组 + 氟尿嘧啶组
D1	71 ± 25	65 ± 30	57 ± 10	54 ± 36
D4	107 ± 25	78 ± 42	62 ± 14	68 ± 25
D8	237 ± 50	95 ± 35	75 ± 23	77 ± 23
D12	321 ± 49	140 ± 49	110 ± 13	79 ± 42
D15	360 ± 52	150 ± 32	105 ± 35	68 ± 35

表 2　各组药物对小鼠移植瘤的抑制作用

组别	鼠数	瘤体质量（g）	抑瘤率（%）
生理盐水	12	3.61 ± 0.76	
消癌 I 方组	12	1.45 ± 0.56	59.83**
氟尿嘧啶组	12	0.95 ± 0.72	73.68**
中药 + 氟尿嘧啶组	10	0.56 ± 0.32	84.48**

注：与阴性对照组比较：** $P<0.01$。

表 3　各组对肠癌 CT26 细胞小鼠移植瘤 VEGF 的蛋白表达水平的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	鼠数	VEGF（平均灰度）
生理盐水组	12	114.8 ± 6.3
消癌 I 方组	12	145.3 ± 4.3**
氟尿嘧啶组	12	151.7 ± 6.3**
中药 + 氟尿嘧啶组	10	122.6 ± 5.3**

注：与阴性对照组比较：** $P<0.01$，* $P<0.05$。

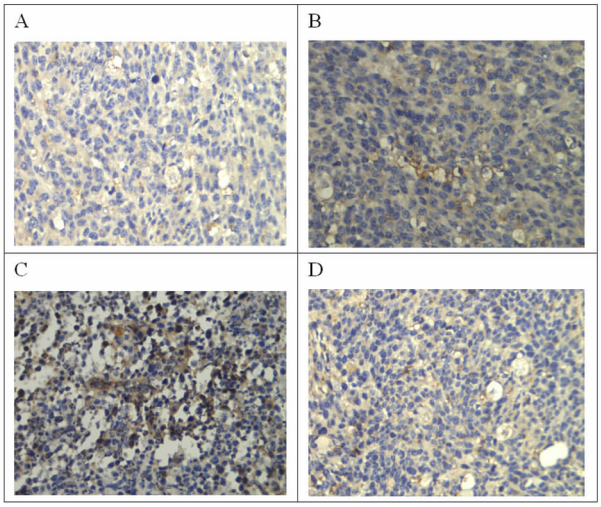

图 1　免疫组化检测荷瘤组织中 VEGF 表达

注：A：生理盐水阴性对照组，光学显微镜（×40）；B：消癌 I 方组，光学显微镜（×40）；C：氟尿嘧啶组，光学显微镜（×40）；D：中药 + 氟尿嘧啶组，光学显微镜（×40）。

3.3　对 VEGF 蛋白表达的影响　阳性细胞细胞质呈棕黄色颗粒。本实验的结果表明，与生理盐水阴性组比较，联合用药组、消癌 I 方组、氟尿嘧啶组治疗均可降低 VEGF 蛋白的表达，差异均有统计学意义（$P<0.01$），与氟尿嘧啶组比较，虽然中药组 VEGF 表达无统计学意义（$P>0.05$），但有减少的趋势。统计分析表明，消癌 I 方组单独或联合氟尿嘧啶，均可显著抑制荷瘤瘤体 VEGF 的表达。（见表 3，图 1）

4　讨论

现代医学研究表明，在 1971 年，Folkman 等[4]人首次发现肿瘤的生长依赖于肿瘤组织的血管生成。如果没有营养支持，肿瘤不能超过 1 ~ 2 mm^3。新生血管是肿瘤生长和转移的必备条件，血管内皮细胞具有低突变性、稳定遗传性，抗血管生成、抑制血管内皮生长因子直接针对肿瘤血管内皮细胞。许多恶性肿瘤细胞 VEGF 的自分泌作用，促进局部血管的形成。血管内皮生长因子是最重要的促血管生成因子，直接促进内皮细胞的增殖，促进新生血管的形成[4-5]。结直肠癌患者血清中，VEGF、MVD 与预后相关，可作为检测大肠癌预后的参考指标[6]。近年来，血管内皮生长因子是抗血管生成治疗的重要靶点，已成为一个热门话题，从而引起科学家们的关注[7]。贝伐单抗（BEV）通过直接阻断 VEGF 抑制肿瘤血管生成，抑制肿瘤血管的生长[9-10]。但目前大多数文献通过临床组织标本和体外实验细胞的检测，探讨与肿瘤血管生成的关系，中药复方[11-14]以健脾补气行气、活血化瘀法见多。针对目前很多不能耐受化疗的患者，中医学在这方便发挥了极大的优势。我们从临床观察中肿瘤晚期患者服用补气活血化瘀中药后[15-17]能明显提高其近期疗效和改善生活质量。扶正抗癌 I 号方是上海市第七人民医院肿瘤科治疗肠癌的长期经验总结，全方组成黄芪 15 g，太子参 15 g，茯苓 10 g，白术 10 g，山药 10 g，白花蛇舌草 30 g，藤梨根 15 g，山慈菇 15 g，蜈蚣 2 条等组成，处方中以扶正益气之黄芪、太子参、茯苓、白术等为君，攻伐抗癌之白花蛇舌草、山慈菇等为臣，佐以藤梨根、蜈蚣等，使以甘草，全方共奏扶正抗癌之效。前期临床观察中能明显改善晚期肿瘤患者的生活质量[18-19]，我们的实验结果发现，消癌 I 方组、氟尿嘧啶组、联合瘤体均有减小，各用药组中，中药组瘤体质量最大，但生活质量较氟尿嘧啶组一般情况好，说明扶正益气为主的重要能对改善生活质量起到一定作用。联合用药组、消癌 I 方组、氟尿嘧啶组治疗均

可降低 VEGF 蛋白的表达，差异均有统计学意义（$P<0.01$），与氟尿嘧啶组比较，虽然单纯消癌 I 方中药组 VEGF 表达无统计学意义（$P>0.05$），但有减少的趋势。扶正消癌 I 号方、氟尿嘧啶及联合用药均可明显抑制大肠癌细胞株 CT26 移植瘤的生长，因此，我们认为，消癌 I 号联合氟尿嘧啶在荷瘤鼠体内均具有抗血管生成作用。消癌 I 号方抗血管生成可能是通过下调 VEGF 的表达间接抑制肿瘤血管形成，直接作用于血管内皮细胞，抑制肿瘤组织生长。

参考文献

[1] 侯安继，刘源，胡艳，等. 扶正消癌 I 号方治疗晚期结直肠癌疗效观察[J]. 时珍国医国药，2009，20(11)：2908-2910.

[2] 文军宝，聂飚，姜泊. 两种大肠癌细胞株小鼠肝转移模型的建立及比较[J]. 南方医科大学学报，2007，27(7)：1044-1046.

[3] 刘曼曼，余涛，陈旻，等. 抑癌方对小鼠肠癌移植瘤微血管生成及 VEGF、HIF-1a 表达的影响[J]. 辽宁中医药大学学报，2011，13(6)：73-76.

[4] Folkman J. Tumor angiogenesis：therapeutic implications[J]. N Engl Med，1971，285(21)：1182-1186.

[5] Young，RJ，Read MW. Anti-angiogenic therapy：concept to clinic[J]. 2012，19(2)：115-125.

[6] Zhang D，Li B，Shi J，et al. Suppression of tumor growth and metastasis by simultaneously blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and VEGF-C with a receptor-immunoglobulin fusion protein[J]. Cancer Research，2010，70(6)：2495-2503.

[7] 赵春清，刘志，闫威，等. VEGF、MVD、Ki-67 联合检测与大肠癌临床病理特征及预后相关性的研究[J]. 河北医药，2014，36(12)：3226-3229.

[8] Botelho F，Pina F，Lunet N. VEGF and prostatic cancer：a systematic review[J]. Eur J Cancer Prev，2010，19(5)：385-392.

[9] Zhang L，Hannay JA，Liu J，et al. Vascular endothelial growth factor overexpression by soft tissue sarcoma cells：implications for tumor growth，metastasis，and chemoresistance[J]. Cancer Res，2006，66(17)：8770-8778.

[10] Weidner N，Gasparini G. Determination of epidermal growth factor receptor provides additional prognostic information to measuring tumor angiogenesis in breast carcinoma patients[J]. Breast Cancer Res Treat，1994，29(1)：97-107.

[11] 刘静，史勤，吕祥. 健脾复方对人大肠癌移植瘤裸小鼠血管内皮生长因子及肿瘤微血管密度的影响[J]. 上海中医药杂志，2010，44(4)：62-65.

[12] 董晶，郭勇，方红明，等. 复方藤梨根制剂对小鼠 CT26 移植瘤生长及对 MVD 影响的研究[J]. 中华中医药学刊，2014，32(7)：1691-1693.

[13] 侯丽，许晶，王婧，等. 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[J]. 世界中医药，2014，9(12)：1636-1639.

[14] 高冬，陈文元，林薇，等. 血府逐瘀汤促血管新生中 VEGF 通路的作用研究[J]. 中国中药杂志，2012，17(37)：2622-2625.

[15] 王旺胜，尤建良，浦琼华. 微调三号方(WD-3)对小鼠大肠癌肝转移灶 nm23-H1 mRNA、CD44 mRNA、VEGF mRNA 的影响[J]. 四川中医，2011，29(8)：21-23.

[16] 任为民，张培彤. 血瘀证及活血药对肿瘤转移影响的相关分子机制研究概况[J]. 中国肿瘤，2011，20(7)：509-514.

[17] 刘曼曼，余涛，陈晏，等. 抑癌方对小鼠肠癌移植瘤微血管生成及 VEGF、HIF-a 表达的影响[J]. 辽宁中医药大学学报，2011，13(6)：73-76.

[18] 侯安继，陈友香，项荣. 扶正消癌 I 号方治疗中晚期上消化道恶性肿瘤的临床研究[J]. 中国中西医结合消化杂志，2004，12(6)：332-334.

[19] 胡艳，侯安继，周维，等. 扶正消癌 I 号方对 FOLFOX4 方案治疗晚期结直肠癌减毒增效的临床研究[J]. 上海中医药杂志，2009，43(2)：30-31.

（2015－07－12 收稿　责任编辑：张文婷）

（上接第 1065 页）

[8] 喻斌，阮鸣，张志芬，等. 大柴胡颗粒对胆色素结石豚鼠保护作用机制研究[J]. 中草药，2013，44(10)：1309-1313.

[9] 王福忠. 茵陈大柴胡汤加减治疗淤胆性肝炎 18 例[J]. 内蒙古中医药，2010，29(16)：9-10.

[10] 胡煜明，李顺祥，严建业，等. 柴胡、黄芩药对的研究进展[J]. 湖南中医杂志，2014，11(7)：199-201.

[11] 杨广栋，陈兰羽，张莎莎，等. 茵陈在肝病治疗中的应用[J]. 吉林中医药，2011，31(5)：455-457.

[12] 何琦，谢冬梅. 大黄在肝性脑病灌肠治疗中应用的研究进展[J]. 北方药学，2015，12(10)：86-87，122.

[13] 王君明，刘菊，崔瑛，等. 金钱草提取物对雷公藤多苷致肝损伤的保护作用及机制研究[J]. 中国药学杂志，2013，48(1)：30-34.

[14] 张永红，曾妍，唐晓鹏. 黄芪注射液促进脐血干细胞向肝细胞分化：具有增强移植干细胞治疗大鼠肝衰竭的效果[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2010，14(1)：103-107.

[15] 周承. 中药黄芪药理作用及临床应用研究[J]. 亚太传统医药，2014，10(22)：100-101.

[16] 梁巧文，陈稚，马丽，等. 枳实白芍配伍中化学成分变化及药效相关性研究[J]. 广州中医药大学学报，2014，31(4)：592-596.

（2016－01－08 收稿　责任编辑：洪志强）