

实验研究

六神丸对 H22 肝癌腹水移植瘤 PDGF 与 VEGF 表达的影响及相关机制探讨

齐元富¹ 李慧杰² 李 静²

(1 山东中医药大学附属医院, 济南, 250011; 2 山东中医药大学, 济南, 250355)

摘要 目的:探讨六神丸对 H22 肝癌腹水移植瘤 PDGF 与 VEGF 表达的影响及其可能机制。方法:建立 H22 肝癌腹水移植瘤模型,分组干预,运用免疫组织化学法测定 PDGF 与 VEGF 的表达情况,进行统计学分析。结果:六神丸组、顺铂组及联合组的 PDGF 及 VEGF 表达平均灰度值及面密度阳性率均显著低于对照组($P < 0.01$),且联合组灰度值最低、抑制作用最明显,提示六神丸与顺铂联合应用产生协同作用。结论:六神丸具有抗肿瘤血管生成作用,其机理与抑制 PDGF 与 VEGF 表达密切相关。

关键词 腹水移植瘤/中医药疗法;PDGF;VEGF;肿瘤血管;@ 六神丸

Effect of Liushen Pill on Expression of PDGF and VEGF on H22 Hepatoma Ascites Transplantable Tumors and Discussion on Relevant Mechanism

Qi Yuanfu¹, Li Huijie², Li Jing²

(1 The Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan, Post code: 250011;

2 Shandong University of TCM, Jinan, Post code: 250355)

Abstract Objective: To explore the effect of Liushen Pill on expression of PDGF and VEGF on H22 hepatoma ascites transplantable tumors. **Methods:** Models of H22 hepatoma ascites transplantable tumor were established for different groups of intervention. Immunohistochemical method was used to measure the expression of PDGF and VEGF for statistic analysis. **Results:** the average grey level and positive rate of area density in Liushen Pill group, cisplatin group and combination group were all significantly lower than that of the control group ($P < 0.01$). The lowest grey level and most obvious inhibition effect in combination group showed that combined application of Liushen Pill and cisplatin would bring synergy. **Conclusions:** Liushen Pill would restrain the generation of tumor blood vessels whose mechanism shows relevance with inhibition of the expression of PDGF and VEGF.

Key Words Hepatoma ascites transplantable tumors/Chinese medical therapy; PDGF; VEGF; Tumor blood vessels; Liushen Pill

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.01.028

Folkman 早在 1971 年就提出了肿瘤发生发展具有血管依赖性的观点,研究肿瘤血管生长调节机制一度成为关注的焦点,而以抑制肿瘤血管生成为靶点阻断肿瘤生长及转移成为肿瘤防治的重要途径^[1]。传统中成药六神丸作为中医学“攻毒治法”的代表方剂,其抗肿瘤的作用日益受到重视。本研究意在探讨六神丸对 H22 肝癌腹水移植瘤 PDGF 与 VEGF 表达的影响及其可能机制,以期为中医药抗肿瘤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物 H22 肝癌荷瘤小鼠(腹水型),昆明小鼠,购自山东省医学科学院。

1.2 主要药品及试剂 六神丸(苏州雷允上制药生产,批号 HA1001),顺铂(齐鲁制药生产,批号 04090291)。兔抗鼠 VEGF 多克隆抗体试剂盒(编号 SA2252),兔抗鼠 PDGF 单克隆抗体(编号 BA1498),

SABC 免疫组化试剂盒(兔 IgG 1/2KIT,编号 SA1065),二氨基联苯胺浓缩显色液(编号 AR1065),均为博士德公司产品。

1.3 主要仪器 高清晰度 HP₂AS-1000 彩色病理图像分析系统。

1.4 H22 肝癌腹水移植瘤模型的建立 脱颈椎处死接种传代 7d 的 H22 肝癌荷瘤小鼠,无菌条件下取腹水于容器冰块保存。并留取部分腹水观察细胞形态及细胞计数,滴腹水于玻片涂片,瑞氏染色,镜下细胞分类计数,其中瘤细胞数应 $\geq 95\%$,并取 0.9mL 加 0.1mL 台盼蓝染色,细胞计数瘤细胞总数及死细胞数,活细胞计数 $> 95\%$ 。将肝素管内细胞调整细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 备用,取昆明小鼠每只于右腋窝皮下接种 0.2mL 备用细胞液建立移植瘤模型。

1.5 实验分组 将 40 只成功接种 24 h 后的移植瘤模

型小鼠随机分为4组,每组10只,开始给药。1)对照组:灌服生理盐水,0.4mL/只,1次/d;2)六神丸组:灌服浓度为7.5mg/mL的六神丸溶液,0.4mL/只,1次/d;3)顺铂组:腹腔注射浓度为0.1mg/mL的顺铂,0.2mL/只,1次/2日,共2次;4)联合组(六神丸+顺铂):2)+3)。用药10天,末次给药后1h处死小鼠,剥取瘤体组织。

1.6 实验方法 瘤体组织经10%中性福尔马林固定48h,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,每一组织块连续4 μ m切片4张。免疫组化方法采用SABC法染色,脱蜡至水化的切片经微波热抗原修复,血清封闭,按组别加兔抗鼠VEGF多克隆抗体或兔抗鼠PDGF单克隆抗体,并设立阴性对照(以PBS缓冲液替代一抗),DAB染色,具体按试剂盒说明逐步操作。显微镜下观察PDGF与VEGF表达情况,高清晰度HP₂AS-1000彩色病理图像分析系统进行光密度和强度测定,经分析软件扫描统计其平均灰度值和平均面密度阳性率,平均面密度阳性率=阳性目标面密度/(阳性+阴性目标面密度) $\times 100\%$ 。

1.7 统计学方法 所获数据在统计软件SPSS17.0上运行处理,统计方法采用单因素方差分析。

2 实验结果

2.1 肿瘤组织血小板源生长因子(Platelet Derived Growth Factor,PDGF)表达情况 细胞浆或细胞核着棕黄色代表PDGF阳性染色。镜下观察:对照组中可见肿瘤组织及其间质中有大量呈片状或团块状分布的棕黄色颗粒,阳性染色以对照组最明显,而各药组阳性表达相对较少。统计结果显示:对照组移植瘤组织中PDGF表达平均灰度值较高,六神丸组、顺铂组及联合组平均灰度值均显著低于对照组($P < 0.01$),其中,联合组灰度值最低,抑制作用最明显;而与顺铂组比,联合组亦有统计学意义($P < 0.01$);对照组移植瘤组织中PDGF平均面密度阳性率最高,六神丸组、顺铂组及联合组均显著低于对照组($P < 0.01$),以联合组最低;而与顺铂组比,联合组亦有统计学意义($P < 0.01$);说明六神丸与顺铂联用,抑制PDGF表达作用更加显著,见表1。

表1 H22肝癌腹水移植瘤组织PDGF表达情况

组别	例数	平均灰度	平均面密度阳性率
对照组	10	144.13 $\pm$ 6.62	67.40 $\pm$ 4.53
六神组	10	112.38 $\pm$ 7.95 **	51.43 $\pm$ 2.28 **
顺铂组	10	118.94 $\pm$ 7.23 **	53.12 $\pm$ 2.56 **
联合组	10	51.281 $\pm$ 4.75 ** $\Delta\Delta$	18.08 $\pm$ 2.26 ** $\Delta\Delta$

注:与对照组比,** $P < 0.01$;与顺铂组比, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

2.2 肿瘤组织血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor,VEGF)表达情况 肿瘤细胞及其附近的血管内皮细胞浆或胞膜出现棕黄色颗粒代表VEGF染色为阳性表达。镜下可见,对照组肿瘤组织及其间质中有大量呈片状或团块状分布的棕黄色颗粒,阳性染色以对照组最明显,而各药组阳性表达相对较少。统计结果显示:对照组移植瘤组织中VEGF表达平均灰度最高,六神丸组、顺铂组及联合组平均灰度值均显著低于对照组($P < 0.01$),以联合组抑制作用最明显;而与顺铂组比,联合组亦有统计学意义($P < 0.01$);移植瘤及其间质中VEGF表达对照组平均面密度阳性率最高,六神丸组、顺铂组及联合组均显著低于对照组($P < 0.01$),且以联合组最明显;而与顺铂组比,联合组亦有统计学意义($P < 0.01$);说明六神丸与顺铂联用,抑制VEGF表达作用更加显著,见表2。

表2 H22肝癌腹水移植瘤组织VEGF表达情况

组别	例数	平均灰度	平均面密度阳性率
对照组	10	136.92 $\pm$ 6.08	67.92 $\pm$ 4.33
六神组	10	111.94 $\pm$ 7.86 **	51.63 $\pm$ 2.32 **
顺铂组	10	118.52 $\pm$ 7.42 **	56.01 $\pm$ 2.48 **
联合组	10	50.07 $\pm$ 4.89 ** $\Delta\Delta$	20.02 $\pm$ 2.16 ** $\Delta\Delta$

注:与对照组比,** $P < 0.01$,与顺铂组比, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

3 讨论

恶性肿瘤是当今全球突出的公共卫生问题,目前已成为威胁人类健康的最严重疾病之一,近10年来,其总体发病情况在世界各国呈上升趋势,防治形势十分严峻^[2]。基于血管生成可促进肿瘤生长、浸润和转移,以抗肿瘤血管生成达到抑制肿瘤生长和转移为目的成为治疗肿瘤的有效策略,而血管生成抑制物多通过直接作用于血管内皮细胞、阻断血管生成因子,抑制基质反应或降解等几个环节达到抑制作用^[3]。在众多与血管有关的因子中,VEGF是迄今鉴定出来的最重要的血管生成因子,其可刺激血管内皮细胞的有丝分裂、诱导血管新生,在病理生理性血管生长过程中起关键作用,与多种肿瘤的发生密切相关^[4]。PDGF是重要的血管生长因子及强有力的促细胞分裂原,研究发现其参与多种肿瘤的发生发展^[5]。肿瘤细胞释放PDGF不仅可诱导细胞迁移及刺激细胞增殖,对肿瘤血管发生起着直接的作用,还可通过上调VEGF表达水平间接诱导血管生成,即肿瘤中PDGF可通过自分泌和旁分泌信号途径加速肿瘤细胞生长、浸润及刺激血管再生^[6]。传统中医药在肿瘤防治中发挥着重要作用,研究发现一些中药的有效成分及复方有明显的抗新生血管作用,在抑制肿瘤血管生成中具有良好的应

用前景。而六神丸是攻毒治法的代表方剂,其抗肿瘤作用一方面可直接杀伤肿瘤细胞,另一方面可通过提高机体免疫力、利用自身防御机能间接杀伤肿瘤细胞^[7]。

前期工作中初步研究表明六神丸对肿瘤血管形成有明显抑制作用^[8],为进一步探讨其机制,本研究采用体内动物实验方法,在建立 H22 肝癌腹水移植瘤模型的基础上分组给药干预,运用免疫组织化学法测定 PDGF 与 VEGF 的表达情况。结果显示:移植瘤中六神丸组、顺铂组及联合组的 PDGF 及 VEGF 表达平均灰度值及面密度阳性率均显著低于对照组,经统计有显著性意义,且联合组灰度值最低、优于六神丸及顺铂单用,抑制作用最明显,提示六神丸与顺铂联合应用产生协同作用。进一步证实,六神丸抗肿瘤血管生成的机理与其抑制 PDGF 与 VEGF 表达密切相关,进而发挥抗肿瘤作用。

参考文献

- [1] 张春丽. 中药对肿瘤血管生成抑制作用的研究[J]. 北京中医药, 2011, 30(2): 156-160.
- [2] 汤钊猷. 现代肿瘤学[M]. 3 版. 上海: 复旦大学出版社, 2011: 15.
- [3] 郑幼伟, 郑启昌. 肿瘤血管生成抑制物的研究进展[J]. 肿瘤研究与临床, 2008, 15(5): 356-359.
- [4] 许维, 沈佐君. PDGF 及其受体介导的信号转导与肿瘤关系研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(11): 1286-1288.
- [5] Chen KT, Lin JD, Liou MJ, et al. An aberrant autocrine activation of the platelet-derived growth factor alpha-receptor in follicular and papillary thyroid carcinoma cell lines[J]. Cancer Lett, 2006, 23(2): 192-205.
- [6] 陈珊, 金伟, 闵平, 等. 血管内皮生长因子家族及其受体与肿瘤血管生成研究进展[J]. 生命科学, 2009, 16(1): 19-23.
- [7] 刘寨东, 齐元富, 李秀荣. 六神丸抗肿瘤实验研究现状[J]. 山东中医杂志, 2011, 10(7): 519-520.
- [8] 张春荣, 姜伟, 齐元富. 六神丸对鼠 S180 生长的抑制作用与抑制血管生成的关系[J]. 中国预防医学杂志, 2005, 6(4): 327-330.

(2012-06-02 收稿)

气滞血瘀证大鼠 NO/NOS 体系的变化

宁天一 王婷婷 姜 静 程嘉艺

(辽宁中医药大学, 沈阳, 110032)

摘要 目的: 观察气滞血瘀证大鼠一氧化氮/一氧化氮合成酶(NO/NOS)的体系变化。方法: 将 Wistar 大鼠随机分成 4 组, 对照组、模型组、血府逐瘀汤低、高剂量组。采用多因素联合刺激法建立气滞血瘀模型。运用分光光度法测定血浆和肝组织中 NO 含量以及肝组织中 NOS 活性, 利用 RT-PCR 法测定肝组织中 NOS 基因表达。结果: 模型组血浆 NO 含量(0.52 ± 0.33) $\mu\text{mol/L}$ 显著低于对照组(2.77 ± 1.73) $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$), 低剂量组 NO 含量(2.37 ± 0.53) $\mu\text{mol/L}$ 显著高于模型组(0.52 ± 0.33) $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$); 模型组肝组织 NO 含量(0.52 ± 0.24) $\mu\text{mol/mg}$ 显著低于对照组(5.87 ± 1.72) $\mu\text{mol/mg}$ ($P < 0.01$), 低剂量组 NO 含量(3.72 ± 1.53) $\mu\text{mol/mg}$ 显著高于模型组(0.52 ± 0.24) $\mu\text{mol/mg}$ ($P < 0.01$); 模型组肝组织 eNOS 基因表达水平显著低于对照组 ($P < 0.01$), 低剂量组肝组织 eNOS 显著高于模型组 ($P < 0.05$)。结论: 气滞血瘀证大鼠 NO/NOS 体系下调, 为进一步研究治疗血瘀类疾病提供了借鉴和思路。

关键词 气滞血瘀; 一氧化氮; 一氧化氮合成酶

Change of NO/NOS in Rats of Qi-blood Stagnation

Ning Tianyi, Wang Tingting, Jiang Jing, Cheng Jiayi

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Post code: 110032)

Abstract Objective: To investigate change of nitric oxide(NO)/NO synthase(NOS) in Qi-blood stagnation of rats. **Methods:** Wistar rats were randomized to four groups; normal control group, model group, low concentration group, and high concentration group. The Qi-blood stagnation model was established by complex pathogens. The content of NO in plasma and liver tissues of rats was measured by spectrophotometric. RT-PCR was used to analyze liver tissues NOS mRNA expression. **Results:** The plasma NO of model group [0.52 ± 0.33] $\mu\text{mol/L}$ decreased significantly compared with normal control group [2.77 ± 1.73] $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$). The plasma NO of treatment group [2.37 ± 0.53] $\mu\text{mol/L}$ increased significantly compared with model group [0.52 ± 0.33] $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$). The NO in liver tissues of model group [0.52 ± 0.24] $\mu\text{mol/mg}$ decreased significantly compared with normal control group [5.87 ± 1.72] $\mu\text{mol/mg}$ ($P < 0.01$). The NO in liver tissues of treatment group [3.72 ± 1.53] $\mu\text{mol/mg}$ increased significantly compared with model group [0.52 ± 0.24] $\mu\text{mol/mg}$ ($P < 0.01$). The expression of NOS in liver tissues NOS mRNA expression in model group de-