

中药消痰散结方对人胃癌裸鼠原位移植瘤 VEGF, KDRmRNA 表达的影响

许玲, 苏晓妹, 陈亚琳, 魏品康

许玲, 苏晓妹, 陈亚琳, 魏品康, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科 上海市 200003
 项目负责人: 许玲, 200003, 上海市凤阳路 415 号, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科. czzyk@smmu.edu.cn
 电话: 021-63610109-73403
 收稿日期: 2003-08-23 接受日期: 2003-09-24

摘要

目的: 研究消痰散结方(以下简称消方)对裸鼠人胃癌原位种植瘤生长转移的抑制作用及其对(vascular endothelial growth factor, VEGF), (kinase insert domain receptor, KDR)表达的影响。

方法: 建立人胃癌裸鼠原位种植高转移模型, 实验动物随机分为 4 组(荷瘤对照组、消痰散结方组、5-FU 化疗组、联合组), 于接种第 12 wk 处死动物, 取肝脏及淋巴结, 作组织病理学检查, 观察消方对肿瘤转移的抑制率, 同时留取部分标本运用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)对 VEGF、KDRmRNA 作定量检测。

结果: 所有荷瘤鼠胃壁均有肿瘤生长, 且有不同程度的远处转移。RT-PCR 检测发现, 消方组、化疗组、联合组癌组织内 VEGF、KDRmRNA 含量均显著低于荷瘤对照组 ($P < 0.01$), 且消方组中癌组织 VEGF、KDRmRNA 表达量较化疗组、联合组亦明显降低 ($P < 0.01$), 具有统计学意义。

结论: 消方具有一定抑制胃癌转移的作用。其作用机制之一可能是下调了肿瘤组织 VEGF、KDRmRNA 表达水平而起到抗胃癌浸润转移的作用。

许玲, 苏晓妹, 陈亚琳, 魏品康. 中药消痰散结方对人胃癌裸鼠原位移植瘤 VEGF, KDRmRNA 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(4):988-990
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/988.asp>

0 引言

运用消痰散结法治疗胃癌, 不仅提高了患者的生活质量, 而且有抑制肿瘤转移的作用^[1-2]。然而其抑制肿瘤转移的机制尚须进一步研究。近几年新生血管形成在肿瘤转移的分子水平机制研究中, 已受到人们的重视。实体肿瘤生长及转移需要血管生成, 实体肿瘤形成后进入无血管的浸润前期, 此时肿瘤细胞依靠弥漫供给营养, 当肿瘤结节生长到 1-2 mm³ 以后, 肿瘤必须有新生血管生成供给营养, 才能继续增生和转移^[3-7]。肿瘤细胞可分泌多种血管生成因子诱导血管生成, 其中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前已知的最主要、最直接的血管生成因子^[4, 8-9], 与相

关受体结合后, 可直接刺激内皮细胞增生, 增加血管通透性, 参与诱导肿瘤血管形成, 为肿瘤浸润转移提供条件。因此, 拟以 VEGF 及其受体为研究点来探讨消痰散结方的作用机制^[10-11]。

1 材料和方法

1.1 材料 BALB/C nu/nu 裸鼠由中科院国家啮齿类上海实验分中心提供, ♂, 6 周龄, 体重 18-20 g, 在 SPF 级条件下分笼饲养。人胃腺 Ca SGC-7901 细胞株, 由中科院上海细胞生物研究所提供, 于裸鼠右腋后皮下注射并传代 6 次成实体瘤。消痰散结方由天南星 15 g, 半夏 15 g, 茯苓 15 g, 枳实 10 g, 陈皮 9 g, 鸡内金 15 g, 炙甘草 6 g 等中药组成, 由第二军医大学长征医院药物制剂中心高压制成无菌针剂, 每毫升含生药 2.5 g。使用前先以生理盐水配成所需浓度, 置于 4 °C 冰箱备用。实验动物用氯胺酮 50 mg/kg 腹腔麻醉后, 常规皮肤消毒, 选择左侧正中旁切口, 打开腹腔, 暴露胃壁, 在胃大弯近胃窦处用 1 mL 空针头划破胃壁浆肌层, 植入直径 1 mm 大小的瘤组织块后, 在瘤块表面滴上一滴 OB 生物胶(广州白云医用胶公司提供), 使其覆盖瘤组织表面 40 s 凝固后缝合腹膜及皮肤, 关腹。

1.2 方法 裸鼠随机分为 4 组, 每组 12 只。种植后 1 wk, 分别自腹腔注射生理盐水(0.2 mL, 对照组)、2.5 kg/L 消痰散结方(0.2 mL, 消方组)、6 g/L 5-Fu(0.2 mL, 化疗组), 同时给予中药组及化疗组的治疗方案(联合组)。5-Fu 1 次/wk, 余每天一次, 连续 3 wk。于建模后 12 wk 动物濒临死亡时处死荷瘤鼠, 剥离胃壁肿瘤, 取肝脏及淋巴结, 常规石蜡切片, HE 染色, 作组织病理学检查。另留取部分胃癌标本迅速投入液氮中冷冻备用。用高浓度强变性剂异硫氰酸胍等提取移植瘤组织中 RNA, 紫外分光光度计测定总 RNA, A260/A280 鉴定 RNA, 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性。上海博亚生物有限公司合成引物, VEGF 引物序列为: forward: 5' -TGC CTT GCT GCT CTA CCT CC-3', reverse: 5' -TCA CCG CCT CGG CTT GTC AC-3'; 扩增片断 VEGF121、165 分别为 410 bp、540 bp; KDR 引物序列为: forward: 5' -TAC CGG GAA ACT GAC TTG GCC T-3' reverse: 5' -TCA GTT CTT GCT GTA CAA TTT A-3'; 扩增片断为 440 bp。β-actin 序列为: forward: 5' -TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA-3' reverse: 5' -CTC AGG GCA GCG GAA CCG CTC ATT GCC AAT-

3'; 扩增片断为310 bp. 参照TaKaRa公司合成的 Reverse Transcription System Kit 逆转录合成cDNA: 总RNA 1.0 μ L, dNTP 1.0 μ L, oligo (dT)18 1.0 μ L, AMV 1.0 μ L, RNAase inhibitor 1.0 μ L. PCR 扩增的总反应体系 25 μ L. cDNA 模板 1 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.7 μ L, VEGF、KDR 引物各 1 μ L, β -actin 引物 1 μ L, 最后加 Taq 酶 1 μ L, 双蒸水 14.3 μ L. PCR 扩增条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 变性 94 $^{\circ}$ C, 40 s; 退火 55 $^{\circ}$ C, 40 s; 延伸 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 扩增 35 个循环后, 72 $^{\circ}$ C, 5 min 延伸. PCR 产物在 15 g/L 琼脂糖凝胶上电泳, 0.5 mg/L EB 染色, 出现与扩增产物大小相等的电泳条带为阳性.

2 结果

2.1 消方抑制裸鼠胃癌转移作用 对照组、实验组荷瘤鼠胃壁均有肿瘤生长, 多呈圆形, 实质性, 表面有结节状隆起, 呈淡红色鱼肉状, 部分中心有坏死见图 1. 病理学检测表明, 消方能在一定程度上抑制胃癌的转移, 胃癌转移情况见表 1.

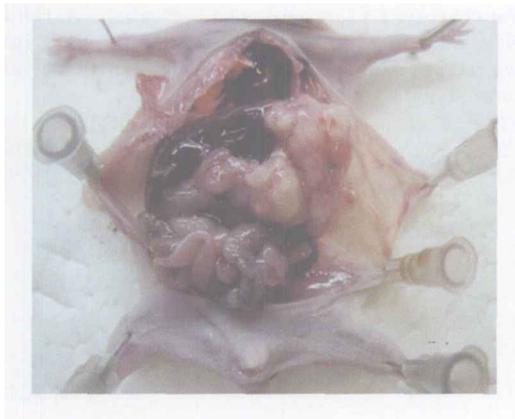


图 1 人胃癌 SGC-7901 裸鼠原位移植模型.

表 1 消痰散结方对裸鼠胃癌转移的抑制作用 (单位: $n=12$, %(n))

| 分组 | 胃周淋巴结转移 | 肝脏转移 | 腹水形成 |
|--------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 对照组 | 100 (12) | 75.0 (9) | 83.3 (10) |
| 5-FU 组 | 66.7 (8) ^a | 41.7 (5) ^a | 50.0 (6) ^a |
| 消方组 | 41.7 (5) ^b | 25.0 (3) ^b | 33.3 (4) ^b |
| 联合组 | 33.3 (4) ^b | 16.7 (2) ^b | 25.0 (3) ^b |

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 对照组.

2.2 胃癌组织中 VEGF, KDR 基因的表达 β -actin 在所有标本中均有表达, 各实验组、对照组中 VEGF、KDRmRNA 均有不同程度表达. 消方组 VEGF, KDR 的 cDNA 扩增产物的条带宽窄及深浅经计算机图像分析其面积灰度值较对照组显著下降 ($P < 0.01$); 在消方组胃癌组织内 VEGF, KDRmRNA 表达量亦较 5-FU 组明显下降, 具有统计学意义见表 2. 说明消方能下调胃癌组织中 VEGF, KDRmRNA 的表达见图 2, 3.

表 2 裸鼠胃癌组织 VEGF, KDR 的 cDNA 扩增产物面积灰度值(A)

| 分组 | VEGF121DNA | VEGF165DNA | KDRDNA |
|--------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 对照组 | 0.615 \pm 0.0024 | 0.673 \pm 0.0033 | 0.455 \pm 0.0051 |
| 消方组 | 0.450 \pm 0.0016 ^{bd} | 0.522 \pm 0.0016 ^{bd} | 0.406 \pm 0.0027 ^{bd} |
| 5-FU 组 | 0.579 \pm 0.0042 ^b | 0.630 \pm 0.0033 ^b | 0.429 \pm 0.0041 ^b |
| 联合组 | 0.448 \pm 0.0044 ^{bd} | 0.520 \pm 0.0030 ^{bd} | 0.402 \pm 0.0029 ^{bd} |

^b $P < 0.01$, vs 对照组; ^d $P < 0.01$, vs 5-FU 组; ^f $P < 0.01$, vs 联合组.

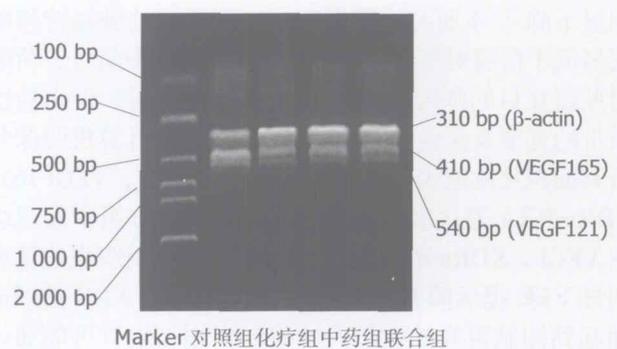


图 2 各组胃癌组织中 VEGFmRNA 的表达.

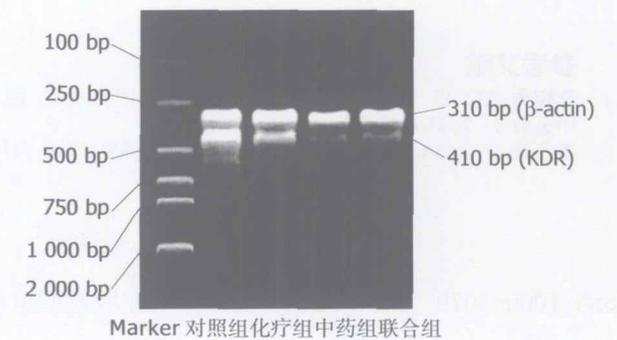


图 3 各组胃癌组织中 KDRmRNA 的表达.

3 讨论

VEGF 有 4 种异构体, 即 VEGF121, VEGF165, VEGF189, VEGF206, 其中 VEGF165 是主要分泌分子, 也是主要效应分子, VEGF121 作用稍弱, 二者以旁分泌形式促进血管内皮细胞分裂增生, 增加微血管通透性, 促进肿瘤浸润和转移. 肿瘤的恶性程度越高、体积越大、转移越广的癌细胞内 VEGFmRNA 含量就越高. VEGF 受体目前发现至少有 2 种以上, 即 fms 样酪氨酸激酶 Flt 和胎儿肝激酶-1/ 含激酶插入功能区受体 KDR, 二者均为酪氨酸激酶受体, KDR 主要表达于生长期的血管内皮细胞上, 是 VEGF 发挥主要功能的受体, 是 VEGF 诱导血管生成的主要通路^[1]. KDR 与其配体结合后其胞内信号传导机制可能是通过 VEGFRs 二聚化, 受体酪氨酸激活, 促使底物磷酸化而产生促进内皮细胞增生, 提高血管通透性, 改变细胞外基质的作用.

祖国医学认为肿瘤的形成主要是痰、瘀、毒互结而成^[2]. 中医理论的痰既是一种脏腑功能失调后的病理产物, 同时又是一种致病因素, 他形成后阻于脏腑经络

中,一方面可致气滞血瘀,结而成块;另一方面,又可随气升降流行附注于其他部位形成新的病灶,这一特点与肿瘤的生物行为非常相类似。因此痰瘀交阻与肿瘤的形成和转移密切相关。消痰散结方主要由半夏、南星等燥湿化痰药组成,针对肿瘤痰瘀互结的特性,以化痰除痞、散结聚、消除肿块为目的,进而阻断肿瘤的生长和转移^[13-14]。中医辨证发现,临床患者均具有不同程度的痰瘀互结的现象,采用消痰散结中药治疗一段时间后,病情可得到不同程度的缓解,血清 VEGF 水平明显下降^[2]。本研究结果发现,中药组远处脏器转移率明显低于荷瘤对照组及 5-FU 化疗组,且中药组、荷瘤对照组在目的基因片断处均出现 DNA 条带,但中药组条带的宽窄及深浅与对照组均不一致,经计算机图像分析其面积灰度值表明,消方可使 VEGF121, VEGF165, KDR mRNA 表达水平显著下降,且在消方组中癌组织内 VEGF, KDR mRNA 表达量较化疗组癌组织表达量亦明显下降。提示消方可能通过下调 VEGF, KDR 基因进而起到抑制胃癌的生长及转移的作用,也有可能通过竞争性地抑制 VEGF 与其受体 KDR 的结合来抑制新生血管形成,来达到抑制肿瘤的生长转移。

4 参考文献

- 李相勇,魏品康.金龙蛇口服液治疗晚期胃癌的疗效观察.湖北中医杂志 2001;23:3-5
- 魏品康,许玲,秦志丰,张申,李相勇,郭晓东,王建平,李峻,肖艳,施俊,刘咏英.胃癌从痰论治的机制与临床研究.中国中医基础医学杂志 2002;3:18-20
- Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989;339:58-61
- 张宏图,胡祥.血清中血管内皮生长因子与胃癌侵袭和转移的关系.世界华人消化杂志 2003;11:344-345
- Kamei S, Kono K, Amemiya H, Takahashi A, Sug Ichihara F, Fujii H, Matsumoto Y. Evaluation of VEGF and VEGF-C expression in gastric cancer cells producing alpha-fetoprotein. *J Gastroenterol* 2003;38:540-547
- Gururaj AE, Belakavadi M, Salimath BP. Antiangiogenic effects of butyric acid involve inhibition of VEGF/KDR gene expression and endothelial cell proliferation. *Mol Cell Biochem* 2003;243:107-112
- Lewy-Trenda I, Wierchniewska-Lawska A. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human thyroid tumors. *Pol J Pathol* 2002;53:129-132
- Tang K, Breen EC, Wagner PD, Hu protein R-mediated post-transcriptional regulation of VEGF expression in rat gastrocnemius muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1497-1504
- Mints M, Blomgren B, Falconer C, Palmblad J. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family in human endometrial blood vessels. *Scand J Clin Lab Invest* 2002;62:167-175
- Wang D, Lehman RE, Donner DB, Matli MR, Warren RS, Welton ML. Expression and endocytosis of VEGF and its receptors in human colonic vascular endothelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G1088-1096
- Waltenberger J, Claessen-Welsh L, Siegbahn A, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor J. *J Biol Chem* 1994;269:26988-26995
- 徐伯平.痰瘀同源与癌瘤.中医杂志 1997;38:378
- 王庆才.恶性肿瘤从痰论治初探.辽宁中医杂志 1996;23:209-211
- 钱彦方.肿瘤从痰论治探讨.中国中医基础医学杂志 1999;5:42-44

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

肝纤维化大鼠肝细胞凋亡和增生的关系

曲宝戈,严茂祥,陈芝芸,项柏康

曲宝戈,山东省泰山慢性病医院 山东省泰安市 271000
 严茂祥,陈芝芸,项柏康,浙江省中医院消化研究室 浙江省杭州市 310006
 浙江省教委资助, No. 19990360
 项目负责人:严茂祥, 310006,浙江省杭州市邮电路 54 号,浙江省中医院消化研究室, meshyale@sohu.com
 电话: 0571-87071380 传真: 0571-87077785
 收稿日期: 2003-05-10 接受日期: 2003-06-04

摘要

目的: 在四氯化碳诱导的实验性肝纤维化大鼠中研究肝细胞凋亡及 Fas 抗原和 Bcl-2 蛋白表达与增生细胞核抗原(PCNA)的关系。

方法: 将 SD 大鼠 44 只随机分成 2 组, 每组 22 只, 分别造模。常规石蜡切片, TUNEL 原位标记法检测细胞凋亡指数, 免疫组织化学法检测 Fas 抗原、Bcl-2 蛋白和 PCNA。

结果: 病理模型组实验大鼠肝组织细胞凋亡指数(AI)明显低于正常对照组 (0.31 ± 0.12 vs 0.49 ± 0.10), $P < 0.01$ 。与正常对照组相比, 病理模型组实验大鼠肝组织 Fas 阳性表达计分明显降低 (2.72 ± 0.47 vs 1.75 ± 0.67), $P < 0.01$ 。Fas 与 Bcl-2 呈明显负相关 ($r = -0.67$, $P < 0.05$)。AI 与 Bcl-2 ($r = -0.28$, $P > 0.05$)、PI ($r = -0.33$, $P > 0.05$) 和 Fas ($r = 0.31$, $P > 0.05$) 均无相关性。

结论: Fas 和 Bcl-2 参与肝纤维化的发生过程中, 二者在其中起着相反的作用, 细胞凋亡在肝纤维化中明显低下, 而细胞增生无明显变化, 表明在肝纤维化中存在细胞凋亡和增生失衡。

曲宝戈, 严茂祥, 陈芝芸, 项柏康. 肝纤维化大鼠肝细胞凋亡和增生的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(4):990-993

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/990.asp>