

- tolerance induction. *Transplantation* 1998;66:1530-1536
- 3 He XL, Liu T, Zhu LW, Ling H, Qiu YJ, Li M, Wang PZ. Study on rejection-associated apoptosis of small bowel transplantation in rats. *Chin J OrganTransplant* 2001;22:233-234
- 4 Morris R. Modes of action of FK506 cyclosporineA, and rapamycin. *Transplant Proc* 1994;26:3272-3275
- 5 Wu XT, Li JS. Study on modified techniques for small bowel transplantation in rats. *Chin J Microsurg* 1999;22:48-50
- 6 Toogood GJ, Rankin AM, Tam PK, Morris PJ, Dallman MJ. The immune response following small bowel transplantation. II. A very early cytokine response in the gut-associated lymphoid tissue. *Transplantation* 1997;63:1118-1123
- 7 Wang WZ, Ling R, Song WL, Zhang SH, Chen DL, Li MB, Ji G. Management of intestinal graft in living-related small bowel transplantation. *J Fourth Mil Med Univ* 2000;21:773-775
- 8 Ding Jie, Li CN, Wang WZ, Song WL, Wu GS. Endoscopic monitoring of human small intestinal vivo transplantation. *J Fourth Mil Med Univ* 2000;21:158-159
- 9 Zhao JX, Wang WZ, Song WL, Wu GS, Luo NN, Chen XL, Xu LJ. Effect of internal nutrition on the FK506 blood drug concentration after small intestine transplantation. *J Fourth Mil Med Univ* 2000;21:779-780
- 10 The European FK506 Multicentre Liver Study Group. Reduced incidence of acute, Refractory acute, And chronic rejection after liver transplantation with FK506-Based immuno-suppression. *Transplant Proc* 1994;26:3260-3263
- 11 Neuhaus PJ. Optimised first-line FK506-Based protocols in liver transplantation; Experience from the university hospital rudolf virchow, Berlin. *Transplant Proc* 1994;26:3264-3266
- 12 Li YX, Li N, Wu B, Li JS. Apoptosis of small intestinal epithelial cells in small intestinal allograft rejection. *Chin J Surg* 1999;37:372-374
- 13 林民专. 细胞凋亡与器官移植. *中华器官移植杂志* 1997;18:250-252

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

中药扶正抗癌汤抗肿瘤血管形成治疗肝癌的实验研究

刘少杰, 沈文律, 刘晓珑, 文 军, 崔亚洲

刘少杰, 沈文律, 刘晓珑, 文军, 崔亚洲, 汕头大学医学院第二附属医院普外科 广东省汕头市 515041

通讯作者: 刘少杰, 515041, 广东省汕头市东厦北路, 汕头大学医学院第二附属医院普外科. wisdomalu@163.com

电话: 0754-8900576

收稿日期: 2004-12-17 接受日期: 2005-01-20

摘要

目的: 探讨扶正抗癌汤对裸鼠肝癌移植瘤的血管生成抑制作用。

方法: 裸鼠 32 只, 6 周龄, 随机分为对照组、中药低剂量组、中药高剂量组及阿霉素组, 造模后定期测量肿瘤体积, 40 d 处死裸鼠, 取肝癌组织, 用免疫组化技术检测肿瘤微血管密度(MVD)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)的表达, 并进行组间比较。

结果: 中药低剂量组、高剂量组和阿霉素组抑瘤率分别为 37%, 40% 和 34%, 3 个治疗组之间抑瘤率比较无显著性差异($P>0.05$)。对照组 40 d 肿瘤体积(mm^3)、MVD 值及 VEGF, b FGF 阳性率依次为 $1\ 640.25 \pm 512.13$ 、 16.8 ± 5.2 、88%、75%; 中药低剂量组 $1\ 032.75 \pm 570.01$ 、 10.6 ± 2.7 、38%、25%; 高剂量组 982.00 ± 443.13 、 8.4 ± 2.9 、25%、25%; 阿霉素组 $1\ 089.94 \pm 250.30$ 、 11.5 ± 3.1 、62%、50%。各治疗组肿瘤体积与对照组比较差别均有显著性($P<0.05$)。中药低剂量组和高剂量组 MVD 值及 VEGF, b FGF 表达均明显低于对照组($P<0.05$)。

结论: 扶正抗癌汤对裸鼠肝癌移植瘤有明显的抑制作用, 可能通过抑制肿瘤血管内皮生长因子合成而抑制肿瘤血管生成达到抗癌效果。

刘少杰, 沈文律, 刘晓珑, 文军, 崔亚洲. 中药扶正抗癌汤抗肿瘤血管形成治疗肝癌的实验研究. *世界华人消化杂志* 2005;13(7):908-910
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/908.asp>

0 引言

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一, 年死亡率占肿瘤死亡率的第 2 位。中医中药是我国传统医学的重要组成部分, 在肿瘤治疗领域中发挥着独特的功效。近年来在肿瘤的治疗和辅助治疗方面国内学者进行了诸多研究, 取得了一定进展。我们过去的研究已证实, 中药扶正抗癌汤有抑制肿瘤生长、增进食欲、增加体液免疫和减轻化疗毒副作用等功效^[1]。现就该药物的抗癌机制作进一步研究, 特别在抗肿瘤血管形成治疗肝癌的机制上作进一步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 6 周龄 Balb/c nu/nu 裸小鼠由中山大学实验动物中心提供, 汕头大学医学院肿瘤医院中心实验室饲养, SPF 级, 体质量 20 g 左右, 雌雄不限。肝癌细胞株 BEL-7402, 广州中山肿瘤医院赠送, 用含 100 mL/L 小牛血清

的RPMI1640培养液在37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中培养。扶正抗癌汤(主要成分为红参、黄芪、灵芝、黄芩等), 均购于汕头医药材公司, 文火煎成100%浓度, 即每毫升含中药1 g;阿霉素, 10 mg/支, 汕头经济特区明志医药有限公司制造;兔抗大鼠VIII因子、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(b FGF)抗体及成套试剂盒均购自北京中山生物技术公司。

1.2 方法 待BEL-7402肝癌细胞至指数生长期, 将单细胞悬液调整为浓度 8×10^4 /L, 每只裸鼠接种单细胞悬液0.2 mL于一侧腋部皮下, 以皮下结节直径达0.5 cm为成瘤标准, 5-7 d成瘤, 成瘤率100%。32只裸鼠随机分成中药低剂量组、中药高剂量组、阿霉素组和对照组, 每组8只。中药组裸鼠予扶正抗癌汤灌胃, 其中低剂量组每日30 g/kg, 高剂量组40 g/kg;阿霉素组予阿霉素灌胃, 1.5 mg/kg;对照组予无菌生理盐水灌胃, 0.8 mL/d。各组均为模型建立后24 h开始给药, 连续给药10 d, 停药10 d, 再给药10 d, 停药10 d^[1]。给药期间观察裸鼠的一般情况及移植瘤的生长情况, 每10 d测量一次移植瘤体积。测量方法为:用游标卡尺测量肿瘤长轴(*a*)和短轴(*b*), 根据公式 $V = \frac{a \times b^2}{2}$ 计算肿瘤体积并在半对数坐标上绘制肿瘤生长曲线(图1)。按照公式抑瘤率 = (对照组平均肿瘤体积 - 治疗组平均肿瘤体积) / 对照组平均肿瘤体积来计算抑瘤率。给药后第40 d杀死裸鼠后将皮下移植瘤完整取出, 将移植瘤标本中生长良好且无坏死的瘤组织制备成石蜡包埋组织块, 将石蜡标本重新制备4 μm连续切片, 1张做常规HE染色, 余片采用链霉亲和素-生物素-酶复合物(SABC)法行VIII因子、VEGF及b FGF免疫组化染色。VIII因子染色阳性血管内皮细胞呈棕黄至棕褐色, 先于40倍镜下选择瘤巢内及瘤巢周围微血管密度最高的区域, 然后在200倍镜下计数VIII因子阳性内皮细胞, 镜下孤立可分的棕黄色内皮细胞或内皮细胞簇为1个血管计数。取5个视野下VIII因子阳性内皮细胞计数的均数作为微血管密度(MVD)值^[2]。VEGF及b FGF染色阳性细胞均呈细胞质棕黄色染色。VEGF半定量判定标准:每高倍镜视野计数100个细胞, 阳性染色细胞<5%为阴性(-), 5-15%为弱阳性(+), 16-50%为阳性(++), >50%为强阳性(+++) ^[3]。b FGF的表达用阳性和阴性表示, ≤10%为阴性(-), >10%

为阳性(+)。

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 移植瘤生长及体积变化 用药(图1)10, 20, 30, 40 d测定肿瘤体积, 20, 30和40 d各治疗组肿瘤体积均小于对照组;中药低剂量组、中药高剂量组和阿霉素组三组抑瘤率分别为37%, 40%和34%;各治疗组肿瘤体积与对照组比较, 差别有显著性($P < 0.05$);给药后中药高剂量组(40%)肿瘤体积小于低剂量组(37%)和阿霉素组(34%), 但各治疗组之间抑瘤率无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 肿瘤形态学比较 从大体形态上观察, 各治疗组移植瘤生长缓慢, 瘤体凸出皮面较明显, 色泽呈灰白, 与邻近皮肤颜色区别较明显;而对照组移植瘤生长迅速, 瘤体呈“铁饼状”, 凸出不显著, 瘤体色泽与邻近皮肤颜色相近。另外, 中药组与阿霉素组虽然移植瘤体积接近, 但在大体形态上有所区别:中药组移植瘤为一整块, 质地较硬;阿霉素组瘤体为多个结节攒成, 呈“饭团状”, 质地稍软。光镜(×200)下观察各组HE切片, 可见各治疗组细胞生长缓慢, 局部细胞坏死点多, 呈大片坏死;而对照组细胞生长旺盛, 散在少量坏死, 且坏死点范围较小。

2.3 MVD值及VEGF, b FGF表达 中药低剂量组、中药高剂量组肿瘤组织中MVD明显低于对照组, 差异有显著性($P < 0.05$), 表明扶正抗癌汤可有效抑制肿瘤内血管的形成;中药低剂量组、中药高剂量组肿瘤组织中VEGF和b FGF的表达也都明显低于对照组, 差异同样具有显著性($P < 0.05$, 表1)。

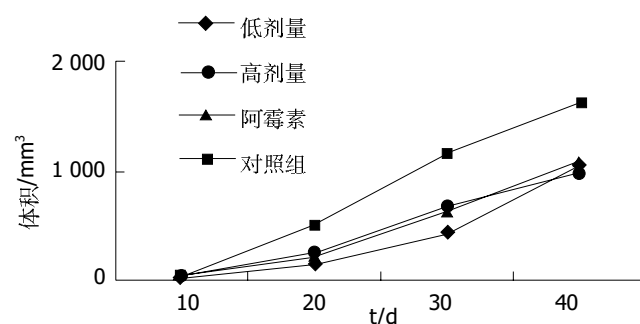


图1 各组肿瘤体积变化曲线。

表1 各组小鼠肿瘤细胞MVD值及VEGF、b FGF的表达

分组	MVD(mean±SD/HP)	VEGF 阳性				b FGF 阳性	
		+++	++	+	(%)	+	(%)
对照组	16.8 ± 5.2	2	3	2	88%	6	75%
低剂量	10.6 ± 2.7 ^a	1	2	0	38% ^a	2	25% ^a
高剂量	8.4 ± 2.9 ^a	0	2	0	25% ^a	2	25% ^a
阿霉素	11.5 ± 3.1 ^a	1	3	1	62%	4	50%

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

3 讨论

扶正抗癌汤遵循辨证施治的原则,从气血双补,健脾除湿,培土益木,疏肝理气等方面着手,在临床应用治疗肝癌的效果已初步证实,配合手术能够有效延长患者生存时间,抑制肿瘤复发,减轻化疗毒副作用。本实验中,两中药组抑瘤率均超过30%,与常规化疗药物阿霉素比较,抑瘤率无明显差别($P>0.05$),证实该方剂对裸鼠移植瘤抑瘤效果确切。中药大都是通过多个环节发挥辅助治疗作用的,目前对于中药治疗肝癌的机制研究主要集中在对肝癌细胞增生的杀伤与抑制^[4],诱导肝癌细胞凋亡^[5],诱导肝癌细胞向正常分化^[6],抑制DNA、RNA及蛋白质合成^[7],影响端粒酶活性^[8-9]和调控癌基因的表达^[10]等方面,而对于肿瘤血管方面的机制的研究较少。1971年Folkman首次提出“肿瘤生长依赖于血管形成”的观点^[11-12]。研究表明,肿瘤血管生成是肿瘤细胞生长和转移的基础,没有营养血管的支持,肿瘤直径一般不会超过2 cm^[13]。实验和临床研究结果都已证明了血管生成与肿瘤生长、转移和预后间存在这种密切关系,给予血管生成抑制剂可明显抑制肿瘤的生长和转移,改善荷瘤动物和患者的预后^[14]。恶性肿瘤组织的微血管密度较良性肿瘤组织及正常黏膜组织为高,并且肝癌是典型的多血管肿瘤,抑制肿瘤血管形成治疗肝癌的方法在理论上切实可行。且中药大多作用温和,抑制肿瘤血管形成应该是中药抗癌的主要途径之一。

VEGF是目前已知的最重要、最直接,在原发性肝癌肿瘤血管生成中作用最强的血管生成诱导因子,其表达与MVD密切相关^[15];而bFGF作为最早发现的促血管生成因子,肿瘤组织中的表达强度可超过正常组织的10倍以上,并与肿瘤的分级及MVD水平相关^[16];MVD在反映肿瘤预后方面是一个独立而且重要的因素,高MVD往往提示易发生转移和预后不良。本实验中中药低剂量组、中药高剂量组VEGF表达的阳性率分别为38%和25%,bFGF表达的阳性率均为25%,较之对照组,差别明显,具有显著性($P<0.05$),说明扶正抗癌汤可有效抑制VEGF、bFGF的合成,在肿瘤组织的血管形成过程中使血管形成促进因子浓度下调,血管形成开关失衡,使开关关闭,从而抑制肿瘤血管形成,达到治疗目的。本实验中中药低剂量组、中药高剂量组MVD值分别为 10.6 ± 2.7 和 8.4 ± 2.9 ,与对照组(16.8 ± 5.2)相比,差异也有显著性($P<0.05$),证实了本方剂抑制肿瘤血管形成有明显效果。

扶正抗癌汤为复方汤剂,成分复杂,抑制肿瘤生长的途径是多方面的,各种具体有效成分尚未明确;另外,中药组与阿霉素组移植瘤在大体形态上的差别提示本方剂的作用途径与常规化疗药物有所区别,具体作用机制和作用环节尚待深入研究,进一步将中医和西医的有效治疗手段完善的结合起来。

4 参考文献

- 1 沈文律,张旋波,白绍槐.扶正抗癌汤对裸鼠接种人肝细胞癌的抑制作用. *华西医学* 1994;9:89-91
- 2 Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1-8
- 3 Park YN, Kim YB, Yang KM, Park C. Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:1061-1065
- 4 谢文杰,刘欣,王哲,王娜,付桂芳,张瑾峰.莪棱舌草I号对人肝癌细胞抑制作用的研究. *首都医科大学学报* 2003;24:100-103
- 5 韦长元,李挺,唐宗平,埃高莫·比佐,刘剑仑,杨南武.薏苡仁提取物对人肝癌细胞增生、凋亡及p53表达的影响. *广西医科大学学报* 2001;18:793-795
- 6 黄炜,黄济群,张东方,廖兆全.全反式维甲酸、 18β -甘草次酸和甘草酸诱导人肝癌细胞分化和凋亡的研究. *中西医结合肝病杂志* 2003;13:148-150
- 7 朴云峰,明月,李靖涛.西洋参多糖I、II、III对肝癌细胞DNA合成抑制作用的研究. *临床肝胆病杂志* 1999;15:213-214
- 8 黎丹戎,张玮,唐东平,张丽生.茶多酚对人肝癌BEL-7404细胞端粒酶的抑制作用及诱导细胞凋亡的能力. *中国药理学通报* 2003;19:934-939
- 9 刘坚,屈丽波,李瀚旻,杨玲,晏雪生,肖琳,王伯祥.搏癌丸对人肝癌Hep-G2细胞端粒酶活性的影响. *中西医结合肝病杂志* 2002;12:272-273
- 10 陈莉,陈小义,徐瑞成.鲨鱼软骨制剂诱导人肝癌细胞凋亡及p21^{WAF1}和PCNA表达调控的研究. *中草药* 2000;31:683-685
- 11 Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-257
- 12 Tsao MS, Liu N, Nicklee T, Shepherd F, Viallet J. Angiogenesis correlates with vascular endothelial growth factor expression but not with Ki-ras oncogene activation in non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 1997;3:1807-1814
- 13 Gervaz P, Scholl B, Padrun V, Gillet M. Growth inhibition of liver metastases by the anti-angiogenic drug TNP-470 [J]. *Liver* 2000;20:108-113
- 14 Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, Sawada T, Sowa M. Prognostic value of vascular endothelial factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996;77:858-863
- 15 Takanami I, Tanaka F, Hashizume T, Kodaira S. Tumor angiogenesis in pulmonary adenocarcinomas: relationship with basic fibroblast growth factor, its receptor, and survival. *Neoplasia* 1997;44:295-298
- 16 Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-364

编辑 潘伯荣 审读 张海宁