

益气化瘀解毒方对人肝癌裸鼠 HepG2 移植瘤 MVD、HIF1 α 、VEGF/KDR 表达的影响

曾普华¹, 郜文辉², 潘敏求¹, 蒋益兰¹, 李勇敏¹, 李跃辉¹, 唐珍¹

(1. 湖南省中医药研究院附属医院肿瘤科 湖南 长沙 410006;

2. 湖南中医药大学中医学院 湖南 长沙 410208)

摘 要:目的: 观察益气化瘀解毒方对人肝癌裸鼠 HepG2 移植瘤 MVD、HIF1 α 、VEGF/KDR 表达的影响。方法: 建立人肝癌移植瘤模型, 分为7组, 分别以益气化瘀解毒方、黄芪、莪术、重楼、壁虎、顺铂药物干预21 d后, 取瘤组织行免疫组化检测。结果: ①对 MVD 的影响: 全方组与除顺铂外的其它组比较有统计学意义($P < 0.05$); 除黄芪、莪术外的其它组与空白组比较有统计学意义($P < 0.05$)。②对 HIF1 α 的影响: 全方组与除黄芪外的其它组比较有统计学意义($P < 0.05$); 各组与空白组比较有统计学意义($P < 0.05$)。③对 VEGF 表达的影响: 全方组与除顺铂外的其它组比较均有统计学意义($P < 0.05$); 莪术组与空白组比较无统计学意义($P > 0.05$)。④对 KDR 表达的影响: 全方组与其它各组比较均有统计学意义($P < 0.05$); 黄芪组与空白组比较无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 益气化瘀解毒方能明显抑制人肝癌裸鼠移植瘤 MVD、HIF1 α 、VEGF 和 KDR 的表达而发挥抗血管生成作用; 各单味药对其作用各有侧重, 但作为整方的有机组成从不同环节发挥了协同作用。

关键词: 益气化瘀解毒方; 人肝癌裸鼠 HepG2 移植瘤; MVD; HIF1 α ; VEGF/KDR

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-7717(2014)08-1563-03

Effect of Prescription of Strengthening Qi and Clearing Poison and Toxin on Expressions of MVD, HIF1 α and VEGF/KDR from Hepg2 Hepatocellular Carcinoma Nude Mice Transplantation Tumor

ZENG Puhua¹, GAO wenhui², PAN Minqiu¹, JIANG Yilan¹, LI Yongmin¹, LI Yuehui¹, TANG Zhen¹

阴两虚组及基线。在兼证中, 兼瘀血的 TC、TG、LDL 水平要高于基线及其他两个兼证, 并且 LDL 升高更明显, 具有统计学意义。在慢性肾炎蛋白尿 CKD1~2 期的患者中, 血脂的证型分布特点与一般的高血脂是相似的。

在研究6个月的随访后, 患者的 TC、TG 无明显变化, LDL 变化最大。在对照组, LDL 升高了 7.77%, 但无统计学差异($P > 0.05$)。试验组的 LDL 下降了 8.91%, 有统计学差异($P < 0.05$)。6 个月后组间比较, 试验组明显低于对照组($P < 0.05$)。

我们的观察发现, 在治疗蛋白尿的同时, 对于脾肾两虚的患者, 中药辨证治疗能降低 LDL 水平, 但对 TC、TG 水平无明显影响。这种变化对预后的影响还需更长时间的观察。

参考文献

收稿日期: 2014-03-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(81001522); 湖南省自然科学基金项目(13JJ4138); 首届中国中西医结合学会-金港槐香燭中医药肿瘤研究基金项目(2010-F10)

作者简介: 曾普华(1976-), 男, 副教授, 硕士研究生导师, 博士, 研究方向: 肝癌的中西医结合诊治研究。

通讯作者: 郜文辉(1977-), 女, 讲师, 博士, 研究方向: 中医药抗肿瘤药理研究。E-mail: 476541034@qq.com。

- [1] 中华人民共和国卫生部. 2006 中国卫生统计年鉴[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2006.
- [2] 李莹, 陈志红, 周北凡, 等. 血脂和脂蛋白水平对我国中年人群缺血性心血管病事件的预测作用[J]. 中华心血管病杂志, 2004, 32(7): 643-647.
- [3] National Kidney Foundation. K/DOQ. Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification[J]. Am J Kidney Dis 2002, 39(suppl): S1-266.
- [4] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 5.
- [5] 胡鹏. 肾脏疾病进程中的脂代谢紊乱[J]. 临床儿科杂志, 2007, 25(9): 794-796.
- [6] Saito T. Abnormal lipid metabolism and renal disorders[J]. Tohoku J Exp Med 2004, 18(1): 321.
- [7] 钮金英, 杨永青. 慢性肾脏疾病诊断中血脂分析及 CTn 和 ET 测定的临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2009, 22(5): 457-459.
- [8] 李学旺, 李航, 张国娟. 脂质异常肾损害的机制及他汀类药物对慢性肾脏疾病发生发展的作用[J]. 实用医院临床杂志, 2008, 5(4): 125.
- [9] 李妍妍. 中医药对老年高血脂症的治疗研究进展[J]. 中国医药指南, 2012, 10(15): 97-98.
- [10] 闻莉, 刘松林, 梅国强. 高血脂症的中医临床证型分布及辩证规律研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(3): 220-221.

(1. State Administration of Traditional National Key Disciplines ,Affiliated Hospital ,
Hunan Academic University of TCM ,Changsha 410006 ,Hunan ,China;

2. Affiliated institute of TCM ,Hunan University of Chinese Medicine ,Changsha 410208 ,Hunan ,China)

Abstract: *Objective:* To observe the effects of Prescription of Strengthening Qi and clearing stasis and poison(SQCSP) of the expressions of MVD ,HIF1a and VEGF/KDR from HepG2 hepatocellular carcinoma nude mice transplantation tumor (HepG2 Tumor) . *Methods:* HepG2 tumor was divided into 7 groups ,respectively intervened by SQCSP ,astragalus root , rhizoma zedoariae ,paris polyphylla ,gecko and cisplatin. After 21 d of drug intervention ,immunohistochemical detection was carried out in tumor tissue. *Results:* (1) The effect on MVD: SQCSP group compared with the others except the cisplatin group was statistically significant ($P < 0.05$) . In addition to the radix astragali ,rhizoma zedoariae in other groups compared with that of blank group was statistically significant ($P < 0.05$) . (2) The effect on HIF1a: SQCSP group compared with others except astragalus membranaceus group was statistically significant ($P < 0.05$) . Each group compared with the blank group was statistically significant ($P < 0.05$) . (3) The expression of VEGF: the influence of SQCSP group compared with the others except the cisplatin group had statistical significance ($P < 0.05$) . Rhizoma zedoariae group compared with the blank group had no statistical significance ($P > 0.05$) . (4) The expression of KDR: the influence of SQCSP group compared with other groups had statistical significance ($P < 0.05$) . Astragalus membranaceus group compared with the blank group had no statistical significance ($P > 0.05$) . *Conclusion:* SQCSP can inhibit the expressions of MVD ,HIF1a and VEGF/KDR from HepG2 hepatocellular carcinoma nude mice transplantation tumor and enhance anti - angiogenesis. Each single herb has own effect particularly ,but as the whole party ,they play a synergy effect.

Key words: Prescription of SQCSP; HepG2 hepatocellular carcinoma nude mice transplantation tumor; MVD; HIF1a; VEGF/KDR

课题组前期研究发现益气化瘀解毒方具有抗血管生成、稳定瘤体、抗肿瘤侵袭和转移作用,全方组发挥了协同效应,能明显抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖和裸鼠移植瘤生长。本研究将进一步探讨其抗血管生成协同作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 BALB/c - nu 裸鼠 38 只,雌性,16 ~ 20 g,SPF 级,购于长沙斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号: SCXK(湘) 2011 - 0003。

1.1.2 人肝癌 HepG2 细胞为中南大学湘雅医学院肿瘤研究所惠赠。

1.1.3 药物 中药材购于湖南省药材公司。益气化瘀解毒方:黄芪、白参、莪术、重楼、壁虎。顺铂购于齐鲁制药有限公司(批号: 1120431DB 规格: 10 mg/瓶)。

1.1.4 试剂 多聚赖氨酸、一抗、SP、Dab(河北博海生物工程有限公司); MVD ,Bs - 5085R ,0.1 mL(北京博奥森生物技术有限公司); VEGF ,BA0407 ,0.1 mL(武汉博士德生物工程有限公司); KDR/FLK1 ,BS5541 ,0.1 mL(Bioworld Technology); 抗兔的 sp kit sp - 9001 18mL(河北博海生物工程有限公司); DAB ,ZLI - 9033 ,10mL(北京中衫金桥生物技术有限公司)

1.2 方法

1.2.1 人肝癌裸鼠移植瘤模型的建立 人肝癌 HepG2 细胞株,用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。细胞铺满 80% ~ 90% 时开始传代,约 1 ~ 2 d 传代 1 次。细胞培养至约 80 个 T25 瓶量时(每瓶长满约 5 × 10⁶ 个细胞),收集细胞以胰酶消化,低速离心机 2000 转 5 min 离心,调整至约 1 × 10⁷ /0.2 mL。

1.2.2 细胞接种造模及分组 将收集好的细胞尽快接种。一只手将裸鼠背部皮肤提起,另一手以 1 mL 注射器接种至裸鼠背部皮下,每只接种 0.2 mL(含细胞数约 1 × 10⁷ 个),接种 1 周后 38 只裸鼠背部接种处均形成一约绿豆大小隆起。随机分为 7 组,全方组 5 只、黄芪组 5 只、莪术组 6 只、重楼组 5 只、壁虎组 6 只、顺铂组 5 只、空白组 6 只。

1.2.3 药品制备、给药方法及取材 全方由白参、黄芪、莪术、重楼、壁虎组成,药物先粉碎成粗颗粒,用 10 倍温水浸泡 0.5 h,加热先煎 2 h,趁热过滤。药渣再加 8 倍水煎煮 2 次,每次 30 min。趁热滤过,将 3 次水煎溶液混匀,过滤,减压浓缩至浓度为 1 g/mL。各单味药黄芪、莪术、重楼、壁虎提取方法相同。提取后密封 4 ℃ 保存。

以 60 kg 体重全方 100 g 计算,裸鼠每日剂量为: (100/60) × 12 = 20 g/kg; 黄芪 12 g/kg; 莪术 10 g/kg; 重楼 12 g/kg; 壁虎 10 g/kg。顺铂以成人 20 mg/m² 计算。裸鼠腹腔注射剂量约为 5 mg/kg。

用药 3 周后取瘤,将组织用 4% 多聚甲醛固定。

1.2.4 免疫组化法检测瘤组织 MVD、HIF1a、VEGF、VEGFR 表达 瘤组织经固定,包埋,切片后附于经多聚赖氨酸附膜的载玻片上。脱蜡后入水,滴加抗原修复液、正常山羊血清封闭液、一抗、二抗(IgG)、辣根酶标记链霉卵白素工作液(S - A/HRP),经 DAB 显色,苏木素复染细胞核,水洗,脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。拍照,进行图象分析。

1.2.5 统计学方法

用 SPSS 17.0 统计分析软件处理,数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,计量资料采用单因素方差分析;所有统计检验均采用双侧检验,检验水平采用 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 对 MVD 的影响

全方组与顺铂组比较无统计学意义($P>0.05$),与其它组比较有显著统计学意义($P<0.05$);黄芪组、莪术组与空白组比较无统计学意义($P>0.05$),其它组与空白组比较有显著统计学意义($P<0.05$);重楼与壁虎组比较无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

2.2 对 HIF1 α 的影响

全方组与黄芪组比较无统计学意义($P>0.05$),与其它组比较有统计学意义($P<0.05$);各组与空白组比较有统计学意义($P<0.05$);莪术组、壁虎组、顺铂组间比较无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

2.3 对 VEGF 表达的影响

全方组与顺铂组比较无统计学意义($P>0.05$),与其它组比较均有统计学意义($P<0.05$);莪术组与空白组比较无统计学意义($P>0.05$),与其它组比较有统计学意义($P<0.05$);黄芪组、重楼组、壁虎组间比较无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

2.4 对 KDR/Flk-1 表达的影响

全方组与其它各组比较均有统计学意义($P<0.05$);黄芪组与空白组比较无统计学意义($P>0.05$),与其它组比较均有统计学意义($P<0.05$);莪术组、重楼组、壁虎组、顺铂组间比较无显著统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 对瘤组织 MVD、HIF1 α 、VEGF、KDR/Flk-1 表达的影响($n=38$, $\bar{x}\pm s$)

裸鼠组别 (n)	MVD	HIF1 α	VEGF	KDR/Flk-1
全方组(5)	3.0 $\pm$ 0.7 $\star\blacktriangle$	9.8 $\pm$ 1.9 $\bullet\circ$	19.4 $\pm$ 2.7 $\star\bullet$	19.2 $\pm$ 8.78 $\star\blacktriangle$
黄芪组(5)	9.0 $\pm$ 0.8 $\blacktriangle$	13.4 $\pm$ 2.7 $\bullet\circ$	52.4 $\pm$ 17.8 $\star\bullet\triangle$	74.8 $\pm$ 5.93 $\blacktriangle$
莪术组(6)	7.8 $\pm$ 0.9 $\blacktriangle$	25.5 $\pm$ 4.6 $\star\circ\triangle$	69.5 $\pm$ 13.2 $\star\bullet$	34.0 $\pm$ 2.36 $\star\bullet\circ$
重楼组(5)	6.4 $\pm$ 1.1 $\star\circ$	31.4 $\pm$ 2.7 $\star\circ\triangle$	34.2 $\pm$ 6.3 $\star\bullet\triangle$	37.6 $\pm$ 1.51 $\star\bullet\circ$
壁虎组(6)	6.6 $\pm$ 0.8 $\star\circ$	23.6 $\pm$ 2.3 $\star\circ\triangle$	33.1 $\pm$ 6.2 $\star\bullet\triangle$	41.0 $\pm$ 4.28 $\star\bullet\circ$
顺铂组(5)	2.2 $\pm$ 0.8 $\star\blacktriangle$	24.4 $\pm$ 9.5 $\star\circ\triangle$	9.0 $\pm$ 5.3 $\star\bullet$	28.4 $\pm$ 2.06 $\star\bullet\circ$
空白组(6)	10.0 $\pm$ 1.8 $\blacktriangle$	56.0 $\pm$ 3.7 $\circ$	68.1 $\pm$ 9.5 $\star\bullet$	70.16 $\pm$ 7.33 $\blacktriangle$

注:①MVD比较:全方组与顺铂组比较, $\star P>0.05$,与其它组比较, $\star P<0.05$;黄芪组、莪术组与空白组比较, $\blacktriangle P>0.05$,与其它组与空白组比较, $\blacktriangle P<0.05$;重楼与壁虎组比较, $\circ P>0.05$ 。

②HIF1 α 比较:全方组与黄芪组比较, $\bullet P>0.05$,与其它组比较, $\star P<0.05$;各组与空白组比较, $\circ P<0.05$;重楼组、莪术组、壁虎组、顺铂组间比较, $\triangle P<0.05$;莪术组、壁虎组、顺铂组间比较, $\star P>0.05$ 。

③VEGF比较:全方组与顺铂组比较, $\star P>0.05$,与其它组比较, $\star P<0.05$;莪术组与空白组比较, $\blacktriangle P>0.05$,与其它组比较, $\bullet P<0.05$;黄芪组、重楼组、壁虎组间比较, $\blacktriangle P>0.05$ 。

④KDR比较:全方组与其它各组比较, $\star P<0.05$;黄芪组与空白组比较, $\blacktriangle P>0.05$,与其它组比较, $\star P<0.05$;莪术组、重楼组、壁虎组、顺铂组间比较, $\circ P>0.05$ 。

3 讨论

原发性肝癌(以下简称肝癌)恶性程度高,起病隐匿,病情进展快,容易侵袭转移,肿瘤侵袭转移是肝癌治疗失败的主要原因。肝癌属于一种血管生成依赖性实体瘤,其生长、侵袭和转移都需要新生血管。其血管形成的调节受血

管生成促进因子和抑制因子的共同调控。

益气化瘀解毒方以人参、黄芪益气健脾,莪术行气化瘀散结,重楼清热解毒,壁虎攻毒散结,全方药物配伍精要,扶正抗癌,标本兼治。我们前期研究发现该方具有调节免疫、稳定瘤体、下调 VEGF 表达、抗血管生成等作用^[1-2];整方组发挥了协同效应,能明显抑制人肝癌 HcPG2 细胞增殖和裸鼠移植瘤生长。本研究探讨了其抗血管生成协同作用机制。

肿瘤微血管密度(MVD)能直接量化反映肿瘤血管生成的程度,肿瘤血管数越多,肿瘤细胞进入血液循环的机会就越大,许多恶性肿瘤组织中的 MVD 计数都显著增高,MVD 计数高者易发生转移和复发,是一个仅次于淋巴结转移的独立预后评估因子,它与肿瘤细胞的营养和供氧有关。本研究结果发现,益气化瘀解毒方明显抑制移植瘤组织 MVD 表达,优于单味药重楼、壁虎,单味药黄芪、莪术对 MVD 无影响。

血管内皮生长因子(VEGF)专一作用于血管内皮细胞,是最强、最特异的生长因子。VEGF 在肝癌血管形成中具有重要地位,癌细胞生长、侵袭和转移,都有 VEGF 的参与。VEGFR 主要分布于血管内皮细胞表面,主要包括3种亚型,即 VEGFR-1/Flt-1、VEGFR-2/KDR/Flk-1 和 VEGFR-3/Flt-4。其中 KDR 是 VEGF 介导的肝癌发展和血管生成的主要受体^[3],与内皮细胞的分化和增殖有关,主要表达在窦状血管内皮细胞。VEGFR 几乎表达于所有的内皮细胞上,并且 VEGFR 在肝癌细胞上也有表达,可能属于一种自分泌行为^[4]。本研究表明益气化瘀解毒方能明显抑制 VEGF、KDR 的表达,莪术对 VEGF 表达无作用,黄芪对 KDR 表达无作用。

VEGF 的生成受多种因素的影响,其中最主要的因素是缺氧,它可以通过缺氧诱导因子1(HIF1 α)诱导肿瘤组织中 VEGF 生成。缺氧可以通过 HIF1 α 增加 VEGF 基因转录,并使 VEGF-mRNA 稳定性增加,VEGF 受体表达上调,使 VEGF 的生物学效应增强。本研究结果发现,益气化瘀解毒方能明显抑制移植瘤组织 HIF1 α 表达,黄芪对 HIF1 α 表达无作用。

综上所述研究结果表明:益气化瘀解毒方能明显抑制人肝癌裸鼠移植瘤 MVD、HIF1 α 、VEGF 和 KDR 的表达而发挥抗血管生成作用;各单味药对其作用各有侧重,但作为整方的有机组成从不同环节发挥了协同作用。

参考文献

- [1] 曾普华,邵文辉,潘敏求,等.益气化瘀解毒方加减联合鸦胆子油乳经血管介入治疗中晚期原发性肝癌的临床研究[J].辽宁中医杂志,2013,1(40):19-20.
- [2] 邵文辉,曾普华,滕久祥,等.益气化瘀解毒方含药血清对鸡胚尿囊膜血管生成的影响[J].中华中医药学刊,2013,31(1):19-20.
- [3] Gianneli G, Sgarra C, Porelli L, et al. EGFR and VEGFR as potential target for biological therapies in HCC cells[J]. Cancer Lett, 2008, 262(2):257-264.
- [4] Zhao A, Dou K, Li K, et al. The effects of the expression of VEGF and KDR on the angiogenesis, growth and metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. Zhong hua Wai Ke Za Zhi, 2000, 38(6):453-456.