

归芪白术方联合奥沙利铂对胃癌荷瘤小鼠EGFR, VEGFR2表达和血管生成的影响

张晗^{1,2}, 苏韞^{1,2*}, 龚红霞^{1,2}, 黄勇^{1,2}, 牛世伟^{1,2}, 曾元丁^{1,2}

(1. 甘肃中医药大学基础医学院, 兰州 730000;

2. 甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究省级重点实验室, 兰州 730000)

[摘要] 目的:探讨归芪白术方联合奥沙利铂对胃癌荷瘤小鼠表皮生长因子受体(EGFR)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)表达及血管生成的影响。方法:昆明种小鼠进行实验并建立胃癌荷瘤模型,造模成功后将小鼠随机分成6组:空白组、模型组、奥沙利铂组($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、联合高、中、低剂量组(奥沙利铂 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 联合归芪白术方 $17.68, 8.84, 4.42\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$);末次给药后,取移植瘤,计算抑瘤率;苏木素-伊红(HE)染色观察瘤组织形态学变化;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清表皮生长因子(EGF)、白细胞介素-8(IL-8)、血管内皮生长因子(VEGF)水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)和免疫组化法(IHC)检测EGFR、磷酸化EGFR(p-EGFR)、VEGFR2、磷酸化VEGFR2(p-VEGFR2)和血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)的表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测EGFR、VEGFR2 mRNA相对表达。结果:给药组瘤体质量较模型组显著下降($P<0.01$);与奥沙利铂组比较,联合高、中剂量组瘤体质量明显下降($P<0.05, P<0.01$);模型组肿瘤细胞密度较高,细胞形状规则,未见明确的组织坏死灶;给药组肿瘤细胞密度降低,可见明确的组织坏死灶及大规模炎性细胞;与空白组比较,模型组与给药组血清中EGF、VEGF和IL-8水平均明显上升($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,给药组血清中EGF、VEGF和IL-8水平显著降低($P<0.01$),EGFR、p-EGFR、VEGFR2、p-VEGFR2和CD31蛋白及EGFR、VEGFR mRNA表达显著降低($P<0.01$);与奥沙利铂组比较,联合高、中剂量组EGF、VEGF和IL-8水平明显降低($P<0.05, P<0.01$),EGFR、p-EGFR、VEGFR2、p-VEGFR2和CD31蛋白及EGFR、VEGFR2 mRNA表达明显下降($P<0.05, P<0.01$);联合低剂量组中EGF、VEGF和IL-8含量降低,EGFR、p-EGFR、VEGFR2、p-VEGFR2和CD31蛋白及EGFR、VEGFR2 mRNA表达也有所下降,但差异无统计学意义。结论:归芪白术方联合奥沙利铂能通过影响EGFR、VEGFR2的表达,抑制胃癌荷瘤小鼠肿瘤组织的生长和血管生成。

[关键词] 表皮生长因子受体(EGFR); 血管内皮生长因子受体2(VEGFR2); 胃癌; 归芪白术方; 血管生成

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)07-0057-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220521

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211224.1421.007.html>

[网络出版日期] 2021-12-27 10:57

Effect of Guiqi Baizhu Prescription Combined with Oxaliplatin on Expression of EGFR and VEGFR2 and Angiogenesis in Gastric Cancer-bearing Mice

ZHANG Han^{1,2}, SU Yun^{1,2*}, GONG Hong-xia^{1,2}, HUANG Yong^{1,2}, NIU Shi-wei^{1,2}, ZENG Yuan-ding^{1,2}

(1. School of Basic Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Provincial-level Key Laboratory for Molecular Medicine of Major Diseases and the Prevention and Treatment with Traditional Chinese Medicine Research in Gansu Colleges and Universities, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Guiqi Baizhu prescription (GQBZ) combined with

[收稿日期] 2021-09-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81660744);甘肃省中医药研究中心专项(zyzx-2020-zx18);甘肃省高等学校创新基金项目(2020A-072);中西医结合基础学科科研培育项目(11)

[第一作者] 张晗,在读硕士,从事中西医结合防治肿瘤研究,E-mail:zh20202100@163.com

[通信作者] * 苏韞,硕士,教授,从事中西医结合防治肿瘤及中医药防治常见病的免疫学基础研究,E-mail:suyungsz@126.com

oxaliplatin on the expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2) and angiogenesis in gastric cancer-bearing mice. **Method:** The tumor-bearing model of gastric cancer was induced in Kunming mice. The mice were randomly divided into blank group, model group, oxaliplatin group ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and high- ($17.68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), medium- ($8.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and low-dose ($4.42 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) combination groups (GQBZ combined with oxaliplatin). After the last administration, the transplanted tumor was collected and the tumor inhibition rate was calculated. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphological changes of tumor tissues. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the serum content of epidermal growth factor (EGF), interleukin-8 (IL-8), and vascular endothelial growth factor (VEGF). Western blot and immunohistochemistry (IHC) were used to detect the expression of EGFR, phosphorylated EGFR (p-EGFR), VEGFR2, phosphorylated VEGFR2 (p-VEGFR2), and platelet-endothelial cell adhesion molecule (CD31). Real-time fluorescence-based quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA expression of EGFR and VEGFR2. **Result:** The tumor weight in the drug intervention groups was significantly lower than that in the model group ($P < 0.01$). Compared with the oxaliplatin group, the high- and medium-dose combination groups showed reduced tumor weight ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The tumor cells in the model groups were high in cell density and regular in shape, and no clear tissue necrosis was seen. The tumor cell density in the drug intervention groups was reduced, and clear tissue necrosis and large-scale inflammatory cells were visible. Compared with the blank group, the model group and the drug intervention groups showed increased serum levels of EGF, VEGF, and IL-8 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the drug intervention groups showed decreased serum levels of EGF, VEGF, and IL-8 ($P < 0.01$), reduced protein expression of EGFR, p-EGFR, VEGFR2, p-VEGFR2, and CD31, and declining mRNA expression of EGFR and VEGFR ($P < 0.01$). Compared with the oxaliplatin group, the high- and medium-dose combination groups showed decreased serum levels of EGF, VEGF, and IL-8 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), reduced protein expression of EGFR, p-EGFR, VEGFR2, p-VEGFR2, and CD31, and dwindled mRNA expression of EGFR and VEGFR2 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The low-dose combination group showed decreased serum levels of EGF, VEGF, and IL-8, reduced protein expression of EGFR, p-EGFR, VEGFR2, p-VEGFR2, and CD31, and dwindled mRNA expression of EGFR and VEGFR2, but the difference was not statistically significant. **Conclusion:** GQBZ combined with oxaliplatin can inhibit the growth and angiogenesis of tumor tissues in gastric cancer-bearing mice by affecting the expression of EGFR and VEGFR2.

[Keywords] epidermal growth factor receptor (EGFR); vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2); gastric cancer; Guiqi Baizhu prescription; angiogenesis

胃癌(GC)是2020年世界上第5大最常见的恶性肿瘤和第4大癌症死亡的病因^[1]。传统的放、化疗都缺少对肿瘤细胞的靶向性,且有较大的不良反应,而分子靶向疗法则可以精确识别并杀伤肿瘤细胞,且不会损伤正常细胞。在肿瘤细胞增殖、侵袭和转移中起关键因素的是肿瘤血管的生成^[2],其机制是肿瘤微环境中产生大量血管内皮生长因子(VEGF),并与其主要配体血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)结合,促进细胞增殖和信号转导,调控肿瘤细胞的生长、侵袭和转移等^[3]。临床前研究表明表皮生长因子受体(EGFR)和VEGFR通路是相互关联的,可共享下游信号传导,以维持肿瘤细胞的生长^[4]。EGFR过表达或组成性激活在肿瘤细胞中

很常见,并与肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭有关,这使EGFR成为抗癌治疗的一个重要的靶点^[5]。肿瘤细胞表达的VEGF可以促进血管生成以维持肿瘤生长^[6]。因此,通过阻断VEGF信号通路抑制血管生成已成为抗癌的关键治疗策略^[7]。因此,有研究假设EGFR和VEGFR的双重抑制可能会有更强的抗肿瘤功效^[8]。而MASUDA等^[9]研究证实EGFR/VEGF的双重抑制比各自的单一疗法具有更强的抗肿瘤作用。因此,本课题组认为EGFR和VEGFR2是胃癌辅助药物治疗中比较理想的双靶点。

归芪白术方由《普济方》中的“黄芪汤”加白术而成,药物组成为黄芪、白术、当归、大黄(酒)、芍药(白芍)、陈皮、甘草(炒),具有化湿健脾、益气养血、

化痰消癥的功效^[10]。课题组前期研究已证实归芪白术方联合化疗具有增强疗效,改善胃癌患者生存质量,延长生存期等作用,还能抑制胃癌细胞的增殖^[11-12]。基于此,该研究探讨具有活血化瘀健脾功效的归芪白术方在胃癌辅助治疗中的作用。

1 材料

1.1 细胞及动物 小鼠胃癌细胞株 MFC,批号 PNS-MC-20,购自武汉普诺赛生命科技有限公司。SPF级昆明种小鼠 60只,雌雄各半,体质量 18~22 g,购自甘肃中医药大学动物实验管理中心;动物合格证号 SCXK(甘)2020-0001。本研究根据甘肃中医药大学伦理委员会指导进行,编号 2020-283。

1.2 药物 归芪白术方由君药黄芪 20 g,臣药当归 10 g、白术 10 g、白芍 10 g,佐药酒大黄 6 g、陈皮 6 g,使药甘草 6 g组成,先将饮片用蒸馏水浸泡 1 h,用武火煮沸后调小火煎煮 30 min,过滤药液留存,药渣加水,大火煮沸后调小火煎煮 30 min,过滤药液留存,把前后 2次药液合并,浓缩至生药质量浓度为 1.776 8、0.884、0.442 g·mL⁻¹,4℃冰箱保存备用^[12]。以上药物均自甘肃中医药大学附属医院药房购买。药物经甘肃中医药大学药学院中药学教研室杨秀娟副教授鉴定均为正品。奥沙利铂(山东罗欣药业有限公司,批号 519121041)。

1.3 试剂 表皮生长因子(EGF)、VEGF、白细胞介素(IL)-8酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(江苏菲亚生物科技有限公司,批号分别为 MM-0043M2、MM-0128M2、MM-0123M2),4%多聚甲醛(北京索莱宝科技有限公司,批号 P1110),RPMI 1640培养液(Gibco公司,批号 11835-030),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号 11012-8611),TRIzol总RNA提取试剂盒、cDNA Synthesis Kit、2×SYBR Green qPCR mix(德国 Qiagen公司,批号分别为 74256、205824、330611),苏木素-伊红(HE)染液、免疫组化试剂盒、CD31抗体(Servicebio公司,批号分别为 G1003、GDP1001、GB11063-2),EGFR、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国 GeneTex公司,批号分别为 GTX628887、GTX100118),磷酸化(p)-EGFR抗体(Boster公司,批号 BM4115),VEGFR2抗体(Proteintech公司,批号 26415-1-AP),p-VEGFR2抗体、二抗(Immunoway公司,批号分别为 YP1546、RS0002)。

1.4 仪器 MG-100型倒置荧光显微镜(广州 Mshot公司),IX51型光学显微镜(日本 Olympus公司),S1000型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-

time PCR)仪、CFX96型 Real-time 荧光定量、S20122209型 iMark 酶标分析仪、MiNiPROTEAN Tetra Cell型垂直电泳槽、S20110429型电泳仪,ChEMI DOC XRS型凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及小鼠胃癌荷瘤模型的建立 参照刘艳菊等^[13]建模法,将 MFC 胃癌细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养,放在 37℃、5%CO₂培养箱中。将细胞培养至对数生长期并将密度调整为 1×10⁷个/mL,并将细胞悬液 0.2 mL 接种于每只小鼠的右腋下。接种 5~7 d 可触及结节且直径长至 5 mm 时造模成功。

2.2 动物分组及给药 将造模成功的胃癌荷瘤小鼠随机分成模型组、奥沙利铂组、联合高、中、低剂量组(奥沙利铂加归芪白术方高、中、低剂量),每组 10 只。根据人和小鼠表面积比值 0.002 6 计算小鼠给药剂量^[14],奥沙利铂为 10 mg·kg⁻¹,归芪白术方高、中、低剂量分别为 17.68、8.84、4.42 g·kg⁻¹。给药量为 0.2 mL,周期为 14 d。另外 10 只正常昆明小鼠为空白组,给予空白组和模型组等体积生理盐水。

2.3 计算抑瘤率 最后 1 次给药后 24 h,从小鼠眼球中取血,离心分离血清并冷冻备用。颈椎脱臼处死小鼠后,将皮下移植瘤完全剥离,称质量并记录。抑瘤率=(模型组瘤质量-药物组瘤质量)/模型组瘤质量×100%,最后抑瘤率取平均值。

2.4 HE 染色观察瘤组织形态的改变 将适当大小的肿瘤组织固定在 4%多聚甲醛溶液中,脱水、包埋在透明石蜡中。再通过脱蜡、梯度乙醇脱水、分化冲洗,HE 染色,置于显微镜下观察。

2.5 Real-time PCR 检测瘤组织中 EGFR, VEGFR2 mRNA 表达水平 按照 TRIzol 法从合适的肿瘤组织中提取总 RNA,并根据逆转录反应试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,逆转录条件为 25℃,5 min;55℃,15 min;85℃,5 min;进行 PCR 反应,反应条件:95℃,5 min;95℃,10 s;55℃,20 s;72℃,20 s;40 个循环,绘制溶解曲线,基于各组 C_t值,通过内参数值和目的基因数值,计算 ΔC_t和 ΔΔC_t,最终得出 2^{-ΔΔC_t},即各组 EGFR, VEGFR2 mRNA 相对表达值。PCR 引物序列由生工生物工程(上海)有限公司合成,引物序列见表 1。

2.6 检测血清中 EGF, VEGF 和 IL-8 水平 将冷冻血清按照 ELISA 试剂盒的说明检测 EGF, VEGF, IL-8 水平。

表1 引物序列

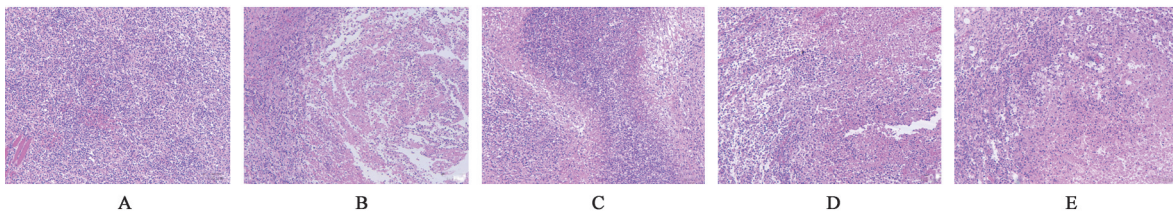
Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 GGTGTGAACGGATTTGG	238
	下游 GACTCCACGACATACTCAGC	
EGFR	上游 CCAAGCCCACTTGAGGATATT	136
	下游 TGGGATCCAGAGACCCTTATAC	
VEGFR2	上游 GCGGAGACGCTCTCATAATA	294
	下游 GACAAGAAGGAGCCAGAAGAA	

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测瘤组织中EGFR, p-EGFR, VEGFR2和p-VEGFR2蛋白表达

从适当大小的肿瘤组织中提取蛋白质,按照BCA法测定蛋白质浓度,在沸水中,煮沸变性5 min,并储存在-20℃的冰箱中。通过SDS-PAGE凝胶电泳将蛋白质转移到PVDF膜上后,用含5%的脱脂奶粉封闭2 h,用一抗稀释液(EGFR 1:5 000, p-EGFR、VEGFR2、p-VEGFR2 1:1 000),并在4℃冰箱中冷藏过夜。TBST洗涤3次,将其在二抗稀释液(1:5 000)中室温孵育2 h,并用ECL曝光条带。利用ImageJ软件分析蛋白质条带的灰度值,并与内参进行比较,分析各蛋白质的相对表达值。

2.8 免疫组化法检测瘤组织中CD31蛋白表达 对肿瘤组织石蜡切片依次放入二甲苯中脱蜡15 min,在梯度乙醇中脱水,蒸馏水漂洗;将切片置于柠檬酸抗原修复缓冲液中,高压抗原修复,3%双氧水溶液中,室温避光孵育25 min以阻断内源性过氧化物酶,PBS冲洗3次。室温密封30 min;加入CD31抗体稀释液(1:800),湿盒内4℃孵育过夜。加入二抗稀释液(1:200),室温摇床孵育50 min。加入二氨基联苯胺(DAB)显色液,复染细胞核,脱水封片。在显微镜下观察颜色变化。



注:A.模型组;B.奥沙利铂组;C.联合高剂量组;D.联合中剂量组;E.联合低剂量组(图2、图3同)

图1 归芪白术方联合奥沙利铂对MFC胃癌小鼠模型瘤组织病理形态的影响(HE,×100)

Fig. 1 Effect of GQBZ combined with oxaliplatin on tumor tissue morphology of MFC gastric cancer mouse model(HE,×100)

3.3 对胃癌荷瘤小鼠模型血清中EGF、VEGF和IL-8含量的影响 与空白组比较,模型组与各给药组EGF、VEGF和IL-8含量均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,各给药组EGF、VEGF和IL-8

2.9 统计学分析 使用SPSS 22.0应用软件进行统计学处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差性检验和单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对胃癌荷瘤小鼠模型皮下移植瘤的影响 奥沙利铂组和联合高、中、低剂量组抑瘤率分别为46.45%、64.53%、60.89%、55.82%;与模型组比较,各给药组瘤质量均显著下降($P<0.01$);与奥沙利铂组比较,联合高、中剂量组瘤质量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),联合低剂量组有所下降,但差异无统计学意义,呈明显的剂量依赖关系。见表2。

表2 归芪白术方联合奥沙利铂对MFC胃癌小鼠瘤体质量及抑瘤率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of Guiqi Baizhu prescription (GQBZ) combined with oxaliplatin on tumor weight and tumor inhibition rate of MFC gastric cancer mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	瘤质量/g	抑瘤率/%
模型组		1.27±0.12	-
奥沙利铂组	10×10^{-3}	0.67±0.07 ¹⁾	46.45±0.08
联合高剂量组	$10 \times 10^{-3}+17.68$	0.45±0.05 ^{1,3)}	64.53±0.03
联合中剂量组	$10 \times 10^{-3}+8.84$	0.49±0.07 ^{1,2)}	60.89±0.07
联合低剂量组	$10 \times 10^{-3}+4.42$	0.56±0.08 ¹⁾	55.82±0.08

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.01$;与奥沙利铂组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表4-表5同)

3.2 对胃癌荷瘤小鼠模型瘤组织病理形态的影响

模型组肿瘤细胞密度较高,细胞形状规则,有少量淋巴细胞浸润,未见明确肿瘤坏死灶;各给药组肿瘤细胞密度降低,可见明显肿瘤坏死灶及大量炎性细胞浸润,其中联合高、中剂量组肿瘤细胞密度降低明显,并伴有大片坏死灶。见图1。

含量显著降低($P<0.01$);与奥沙利铂组比较,联合高、中剂量组EGF、VEGF和IL-8含量明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),联合低剂量组有所下降,但差异无统计学意义。见表3。

表3 归芪白术方联合奥沙利铂对MFC胃癌小鼠模型血清EGF、VEGF和IL-8含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of GQBZ combined with oxaliplatin on the contents of serum EGF, VEGF and IL-8 in MFC gastric cancer mouse model ($\bar{x}\pm s, n=10$) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	EGF	VEGF	IL-8
空白组		341.17±41.49	117.62±17.78	161.30±34.40
模型组		681.17±60.66 ²⁾	315.16±19.16 ²⁾	401.96±22.25 ²⁾
奥沙利铂组	10×10^{-3}	519.83±44.30 ^{2,3)}	220.41±9.65 ^{2,3)}	276.20±17.24 ^{2,3)}
联合高剂量组	$10\times 10^{-3}+17.68$	398.17±35.05 ^{1,3,5)}	177.30±17.18 ^{1,3,5)}	215.43±21.55 ^{1,3,5)}
联合中剂量组	$10\times 10^{-3}+8.84$	429.83±17.62 ^{1,3,4)}	188.11±15.55 ^{1,3,4)}	226.96±18.87 ^{1,3,4)}
联合低剂量组	$10\times 10^{-3}+4.42$	469.83±14.35 ^{1,3)}	204.51±8.65 ^{1,3)}	239.24±10.71 ^{1,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.01$;与奥沙利铂组比较⁴⁾ $P<0.05$,⁵⁾ $P<0.01$

3.4 对胃癌荷瘤小鼠模型瘤组织中EGFR、VEGFR2 mRNA表达的影响 与模型组比较,各给药组瘤组织中EGFR、VEGFR2 mRNA表达显著下降($P<0.01$);与奥沙利铂组比较,联合高、中剂量组瘤组织中EGFR、VEGFR2 mRNA表达明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表4。

表4 归芪白术方联合奥沙利铂对MFC胃癌小鼠模型瘤组织中EGFR、VEGFR2 mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of GQBZ combined with oxaliplatin on expression of EGFR, VEGFR2 mRNA in MFC gastric cancer mouse model ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	EGFR	VEGFR2
奥沙利铂组	10×10^{-3}	0.74±0.01 ¹⁾	0.74±0.02 ¹⁾
联合高剂量组	$10\times 10^{-3}+17.68$	0.63±0.02 ^{1,3)}	0.66±0.03 ^{1,3)}
联合中剂量组	$10\times 10^{-3}+8.84$	0.65±0.01 ^{1,2)}	0.68±0.01 ^{1,2)}
联合低剂量组	$10\times 10^{-3}+4.42$	0.69±0.05 ¹⁾	0.71±0.02 ¹⁾

注:设模型组EGFR、VEGFR2 mRNA相对表达为1

3.5 对胃癌荷瘤小鼠模型瘤组织EGFR、p-EGFR、VEGFR2、p-VEGFR2蛋白表达的影响 与模型组

比较,各给药组瘤组织中EGFR、p-EGFR、VEGFR2、p-VEGFR2蛋白表达显著下降($P<0.01$);与奥沙利铂组比较,联合高、中剂量组瘤组织中EGFR、p-EGFR、VEGFR2、p-VEGFR2蛋白表达明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见图2,表5。

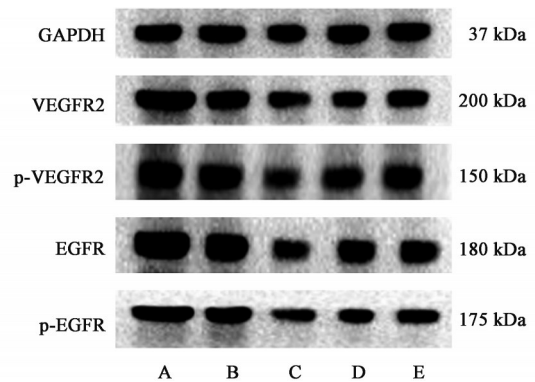


图2 MFC胃癌小鼠模型瘤组织EGFR、p-EGFR、VEGFR2、p-VEGFR2蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of EGFR, p-EGFR, VEGFR2 and p-VEGFR2 protein expression in MFC gastric cancer mouse model tumor tissue

表5 归芪白术方联合奥沙利铂对MFC胃癌小鼠模型瘤组织中EGFR、p-EGFR、VEGFR2、p-VEGFR2蛋白表达影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of GQBZ combined with oxaliplatin on expression of EGFR, p-EGFR, VEGFR2 and p-VEGFR2 protein in MFC gastric cancer mouse model ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	EGFR/GAPDH	p-EGFR/GAPDH	VEGFR2/GAPDH	p-VEGFR2/GAPDH
模型组		1.29±0.02	1.26±0.05	1.45±0.02	1.12±0.01
奥沙利铂组	10×10^{-3}	0.97±0.03 ¹⁾	1.01±0.02 ¹⁾	1.01±0.04 ¹⁾	0.90±0.01 ¹⁾
联合高剂量组	$10\times 10^{-3}+17.68$	0.85±0.02 ^{1,3)}	0.84±0.05 ^{1,3)}	0.90±0.03 ^{1,3)}	0.82±0.02 ^{1,3)}
联合中剂量组	$10\times 10^{-3}+8.84$	0.92±0.02 ^{1,2)}	0.90±0.03 ^{1,2)}	0.94±0.01 ^{1,2)}	0.86±0.01 ^{1,2)}
联合低剂量组	$10\times 10^{-3}+4.42$	0.95±0.02 ¹⁾	0.95±0.04 ¹⁾	0.96±0.03 ¹⁾	0.87±0.03 ¹⁾

3.6 对胃癌荷瘤小鼠模型瘤组织中CD31蛋白表达的影响 CD31标记的是血管内皮细胞,呈棕褐色,胃癌荷瘤小鼠模型组可见大量的CD31染色阳性,表明有大量血管生成;与模型组比较,奥沙利铂组

CD31阳性染色明显降低,血管生成明显减少;与奥沙利铂组比较,联合组CD31阳性染色均明显降低,其中联合高、中剂量组降低明显,血管数量明显减少。见图3。

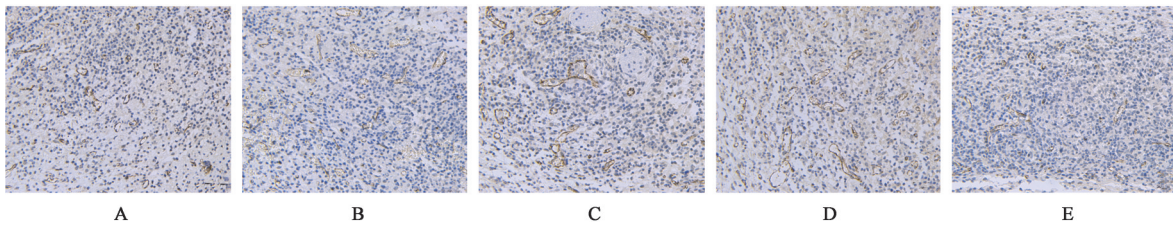


图3 归芪白术方联合奥沙利铂对MFC胃癌小鼠模型瘤组织中CD31蛋白表达的影响(IHC, ×200)

Fig. 3 Effect of GQBZ combined with oxaliplatin on expression of CD31 protein in MFC gastric cancer mouse model (IHC, ×200)

4 讨论

胃癌在我国的发病率和死亡率一直居高不下,分别位于我国恶性肿瘤发病率第3位,死亡率第2位,与世界平均水平比较,我国胃癌的发病率和死亡率均高于两倍以上^[15]。被批准用于临床的靶向药物,其对肿瘤的作用活性远远低于预期,可能是信号通路之间的相互作用降低了靶向药物的活性,提示可以探寻一种可抑制多条通路,共同发挥抑瘤作用的靶向药^[16]。EGFR/VEGF(R)通路的相互串扰表明,这些通路对于联合靶向治疗会很有效果^[17]。中医可以从“多成分、多靶点、多途径”的作用机制入手,从多维度、多层面对中药的药理和药效进行评价,揭示其可能的靶向分子机制^[18]。

胃癌在中医学属于“噎膈”“癥瘕积聚”范畴^[19]。胃癌患者多以脾虚湿困、气血两虚兼血瘀为主要病机,因此选归芪白术方,该方具有攻补兼施以扶正祛邪的特点,其中黄芪为君药可补益中气;白术健脾运化,大补脾气,以资化源,使气化血生,同时白术配黄芪补脾燥湿以治脾虚;血为气之母,营为卫之守,当归养血合营,则阳生阴长,气旺血生和血补血;白芍合营补血,三味共为臣药,一则辅助黄芪、白术补气之功,二则兼顾邪伤血分而调之;酒大黄活血化瘀,促进毒邪排泄;陈皮理气行滞,醒脾和胃,行气以助活血,反佐黄芪补气之偏盛而生腹胀,共为佐药;甘草解毒止痛,调和诸药之性为使^[20]。

肿瘤血管生成是肿瘤生长的重要特征之一。EGF可刺激肿瘤细胞产生多种炎症因子,如IL-8、IL-12、IL-6、IL-1等,以吸引白细胞,从循环中进入肿瘤组织,有助于炎症环境的形成;另一方面,招募的白细胞或活化的肿瘤细胞可以再次释放炎症介质来调节肿瘤发展^[21]。其中IL-8是趋化因子中的一种,能够诱导内皮细胞分裂增生,诱导肿瘤细胞迁移。临床研究表明,在胃癌组织中,IL-8基因和蛋白表达均明显增高,且肿瘤中的微血管密度也明显升高,说明IL-8能够促进血管再生,是一种促血管

再生的趋化因子^[22]。本实验也发现模型组血清EGF、IL-8水平较空白组明显升高,说明EGF可刺激肿瘤细胞中IL-8分泌增多。

胃癌中EGFR基因的扩增和过表达现象很常见,其与配体EGF结合后活化受体的酪氨酸激酶,再将活化后的信号向下游传递诱导激活下游的VEGF高表达,并与其主要配体VEGFR2结合,促进肿瘤组织的血管生成^[23]。VEGF还能够以旁分泌的方式作用于内皮细胞,以促进血管生成^[24]。有研究表明,在肝细胞癌和非小细胞肺癌中同时靶向抑制EGFR和VEGFR2,比单一靶向抑制EGFR或VEGFR2有更显著的抗肿瘤生长疗效,且有一定的抑制肿瘤血管生成的能力^[9,25]。因而,双靶点既能够同时阻断两种不同的信号通路,也能够一边靶向肿瘤细胞,另一边靶向微环境细胞,将肿瘤细胞和肿瘤微环境细胞连接起来,从而调节微环境的平衡。EGFR和VEGFR2在肿瘤细胞及肿瘤血管生成中高表达的特性成为一个良好的双靶点的靶标。

本实验结果显示,各给药组对胃癌荷瘤小鼠模型均有抑瘤作用,瘤体质量也有所下降,各给药组肿瘤细胞密度较模型组显著下降,尤以联合高剂量组下降最为明显,说明归芪白术方具有增效作用。通过免疫组化观察CD31蛋白表达的变化评价瘤组织血管新生的情况,结果显示各给药组对胃癌荷瘤小鼠模型血管新生均有抑制作用,尤其以联合高剂量组明显,说明归芪白术方可辅助增强奥沙利铂抑制肿瘤血管的生成。进一步实验观察到各给药组血清中EGF、VEGF表达水平降低;EGFR、p-EGFR、VEGFR2和p-VEGFR2蛋白表达降低;EGFR、VEGFR2 mRNA表达也下降,其中以联合高、中剂量组下降明显,表明归芪白术方可以降低血清中EGF、VEGF水平和组织中EGFR、VEGFR2蛋白表达,从而抑制肿瘤组织血管形成。

本研究通过成功构建胃癌荷瘤小鼠模型,观测到传统化疗药和联合均对胃癌荷瘤小鼠有抑瘤效

果,且联合增效显著,呈现出明显的剂量依赖关系;归芪白术方联合奥沙利铂的分子机制可能是通过降低EGFR、VEGFR2的表达,抑制肿瘤组织中血管的形成,为临床联合提供新的方法和实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] TELEANU R I, CHIRCOV C, GRUMEZESCU A M, et al. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic strategies for cancer treatment [J]. *J Clin Med*, 2019, 9(1):84.
- [3] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [4] FERRARA N, ADAMIS A P. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(6):385-403.
- [5] CORSO S, PIETRANTONIO F, APICELLA M, et al. Optimized EGFR blockade strategies in EGFR addicted gastroesophageal adenocarcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(11):3126-3140.
- [6] APTE R S, CHEN D S, FERRARA N. VEGF in signaling and disease: Beyond discovery and development [J]. *Cell*, 2019, 176(6): 1248-1264.
- [7] LE X, NILSSON M, GOLDMAN J, et al. Dual EGFR-VEGF pathway inhibition: A promising strategy for patients with EGFR-mutant NSCLC [J]. *J Thorac Oncol*, 2021, 16(2):205-215.
- [8] KAYATANI H, OHASHI K, IMAO T, et al. Combination effect of anti-VEGFR-2 antibody with erlotinib on EGFR mutant non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(14): 5198.
- [9] MASUDA C, YANAGISAWA M, YOROZU K, et al. Bevacizumab counteracts VEGF-dependent resistance to erlotinib in an EGFR-mutated NSCLC xenograft model [J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(2):425-434.
- [10] LI L, JIN X J, LI J W, et al. Systematic insight into the active constituents and mechanism of Guiqi Baizhu for the treatment of gastric cancer [J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(5):1772-1784.
- [11] 李玲, 王凤梅, 刘永琦, 等. 归芪白术方辅助治疗胃癌患者的临床研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(13):1184-1187.
- [12] 苏韞, 李春波, 龚红霞, 等. 归芪白术方含药血清对胃癌 MKN-45 细胞增殖和 IL-17、NF- κ B 表达的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(15):1824-1829.
- [13] 刘艳菊, 刘景超, 王永飞. 绞股蓝多糖对 MFC 胃癌荷瘤小鼠肿瘤生长抑制及免疫调节作用 [J]. *中成药*, 2019, 41(12):2876-2881.
- [14] 舍雅莉, 赵晓文, 李俊杰, 等. 敦煌平胃丸及其拆方对 SCG-7901 胃癌荷瘤小鼠的抑瘤作用及对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(5):70-76.
- [15] FENG R M, ZONG Y N, CAO S M, et al. Current cancer situation in China: Good or bad news from the 2018 global cancer statistics? [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2019, 39(1):22.
- [16] TCHEKMEDYIAN V, SHERMAN E J. Targeting VEGF and EGFR: A combination worth re-exploring? [J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(8):1007-1009.
- [17] LARSEN A K, OUARET D, EL OUADRANI K, et al. Targeting EGFR and VEGF(R) pathway cross-talk in tumor survival and angiogenesis [J]. *Pharmacol Ther*, 2011, 131(1):80-90.
- [18] 李亚, 李蕊白, 王俭, 等. 中药复方抗胃癌基础研究现状与展望 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(20):3142-3146.
- [19] 朱萌萌, 崔倩倩. 胃癌患者化疗前后的中医研究 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2018, 16(8):封3-封4.
- [20] 李春波, 苏韞, 薛轩, 等. 基于中药分子机制的生物信息学在线分析归芪白术方辅助治疗胃癌的作用机制 [J]. *甘肃中医药大学学报*, 2019, 36(6):7-13.
- [21] HUANG P, XU X, WANG L, et al. The role of EGF-EGFR signalling pathway in hepatocellular carcinoma inflammatory microenvironment [J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(2):218-230.
- [22] 贾忠, 沈伟敏, 封光华, 等. 趋化因子 IL-8 与胃癌组织血管再生的相关性实验研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(1):39-43.
- [23] 刁艺, 田新华, 黄延林, 等. 靶向表皮生长因子受体和血管内皮生长因子受体-2 治疗多形性胶质母细胞瘤 [J]. *中华实验外科杂志*, 2010, 27(3):358-360.
- [24] CHEN Z, LI Y, TAN B, et al. Progress and current status of molecule-targeted therapy and drug resistance in gastric cancer [J]. *Drugs Today (Barc)*, 2020, 56(7):469-482.
- [25] GIANNELLI G, SGARRA C, PORCELLI L, et al. EGFR and VEGFR as potential target for biological therapies in HCC cells [J]. *Cancer Lett*, 2008, 262(2): 257-264.

[责任编辑 张丰丰]