

## 血府逐瘀汤对裸鼠食管癌移植瘤的放射增敏作用及机制

陈乐君, 黄腾, 王逸君, 赵迪, 黄维, 马珺, 鹿红, 于大海\*

(南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨血府逐瘀汤对食管癌皮下移植瘤放射增敏的可能作用机制。方法:建立人食管癌ECA-109裸鼠皮下移植瘤模型,将其随机分为模型组、单纯照射组、血府逐瘀汤组、联合组,每组6只。干预结束后剥除移植瘤并称量其质量,计算各组抑瘤率;然后用免疫组化法(IHC)检测缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )、血管内皮生长因子A(VEGFA)蛋白表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测移植瘤中人哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)蛋白表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测移植瘤中mTOR、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA mRNA表达。结果:与模型组比较,单纯照射组、血府逐瘀汤组瘤质量明显下降( $P<0.05$ ),联合组瘤质量显著下降( $P<0.01$ );与单纯照射组比较,联合组瘤体质量明显下降( $P<0.05$ ),该组抑瘤率达到57.37%;与模型组比较,单纯照射组、血府逐瘀汤组、联合组VEGFR2、p-mTOR、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA蛋白水平明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),单纯照射组、血府逐瘀汤组、联合组mTOR、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA mRNA水平明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );与单纯照射组比较,联合组VEGFR2、p-mTOR、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA蛋白表达明显下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),联合组mTOR、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA mRNA表达明显下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论:血府逐瘀汤可以抑制食管癌ECA109裸鼠移植瘤的生长,与放疗联用具有明显的放射增敏作用,其机制可能与抑制mTOR/HIF-1 $\alpha$ /VEGFA乏氧信号通路的表达相关。

**[关键词]** 食管癌;放射增敏;血府逐瘀汤;缺氧诱导因子-1 $\alpha$

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)09-0023-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220629

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220129.1441.005.html>

**[网络出版日期]** 2022-01-29 17:06

### Radiosensitization Effect and Mechanism of Xuefu Zhuyutang on Transplanted Esophageal Carcinoma in Nude Mice

CHEN Le-jun, HUANG Teng, WANG Yi-jun, ZHAO Di, HUANG Wei, MA Jun, LU Hong, YU Da-hai\*  
(Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the radiosensitization and underlying mechanism of Xuefu Zhuyutang on subcutaneous transplanted esophageal carcinoma. **Method:** The subcutaneous xenograft model of human esophageal carcinoma ECA-109 in nude mice was induced and the model mice were divided into a model group, an irradiation group, a Xuefu Zhuyutang group, and a combination group, with six nude mice in each group. After the intervention, the transplanted tumors were removed and weighed, and the tumor inhibition rate of each group was calculated according to the formula. The protein expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) was detected by immunohistochemistry (IHC). The protein expression of mammalian target of rapamycin (mTOR), HIF-1 $\alpha$ , VEGFA, and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) in transplanted tumors was detected by Western blot. The mRNA expression of

**[收稿日期]** 2021-09-26

**[基金项目]** 江苏省中医药管理局科技项目(YB201815);江苏省研究生科研创新计划项目(KYCX21\_1707);江苏省中医院科技项目(Y21022)

**[第一作者]** 陈乐君,在读硕士,住院医师,从事肿瘤放射治疗研究,E-mail:clj213@126.com

**[通信作者]** \*于大海,博士,主任医师,从事肿瘤放射治疗研究,E-mail:yudahaipmc@hotmail.com

mTOR, HIF-1 $\alpha$ , and VEGFA in transplanted tumors was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with the conditions in the model group, the tumor weight decreased in the irradiation group and the Xuefu Zhuyutang group ( $P<0.05$ ), as well as the combination group ( $P<0.01$ ). Compared with the irradiation group, the combination group showed decreased tumor weight ( $P<0.05$ ), with tumor inhibition rate of 57.37%. Compared with the model group, the irradiation group, the Xuefu Zhuyutang group, and the combination group showed decreased protein expression of VEGFR2, p-mTOR, HIF-1 $\alpha$ , and VEGFA ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) and reduced mRNA expression of mTOR, HIF-1 $\alpha$ , and VEGFA ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the irradiation group, the combination group showed down-regulated protein expression of VEGFR2, p-mTOR, HIF-1 $\alpha$ , and VEGFA ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) and reduced mRNA expression of mTOR, HIF-1 $\alpha$ , and VEGFA ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** Xuefu Zhuyutang can inhibit the growth of transplanted esophageal carcinoma ECA-109 in nude mice and shows an obvious radiosensitization effect in combination with radiotherapy. The mechanism may be related to the inhibition of the mTOR/HIF-1 $\alpha$ /VEGFA signaling pathway to improve the hypoxic state of tumors.

[**Keywords**] esophageal carcinoma; radiosensitization; Xuefu Zhuyutang; hypoxia inducible factor-1 $\alpha$

食管癌(EC)是具有地域特性的胸部恶性肿瘤之一,我国食管癌新发病例约占全世界的49.0%<sup>[1]</sup>。本病发病隐匿,约3/4的患者就诊时失去了手术根治的机会,放射治疗是这部分不可手术食管癌患者的主要治疗方式<sup>[2]</sup>。但其疗效堪忧,肿瘤局部未控和/或肿瘤局部复发高达84.9%<sup>[3]</sup>。究其原因,除肿瘤细胞本身的辐射抗性外,肿瘤血管异常导致肿瘤细胞缺氧,进而造成肿瘤放射抵抗是食管癌放疗疗效不佳的重要因素<sup>[4]</sup>。因此,改善肿瘤缺氧是提高放疗疗效的重要方法之一。

血府逐瘀汤是《医林改错·卷上》中的经典活血祛瘀方,与其他逐瘀剂不同的是其主攻胸中瘀血诸证。实验研究发现,血府逐瘀汤可通过抑制具有缺氧信号传递以及触发缺氧效应作用的缺氧诱导因子(HIFs)来调控下游血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶(MMPs)等基因的表达,从而抑制胶质瘤的侵袭及转移<sup>[5]</sup>。体内实验证实加味血府逐瘀汤能明显抑制肝癌H22荷瘤鼠瘤体生长,下调瘤周组织中VEGF蛋白表达<sup>[6]</sup>。彭明尧等<sup>[7]</sup>在食管鳞癌患者的肿瘤组织经免疫组化染色发现VEGF、HIF-1 $\alpha$ 表达水平较正常组织高,且VEGF、HIF-1 $\alpha$ 的高表达与食管鳞癌放疗患者的近期疗效密切相关。近期临床发现,局部晚期食管癌患者在放射治疗过程中服用血府逐瘀汤,对放射性食管炎有较好防治作用,同时发现本方初现抑瘤及增敏的疗效,但其机制尚待明确<sup>[8]</sup>。本实验构建裸鼠食管癌皮下移植瘤模型,拟从HIFs角度进一步观察该方对食管癌移植瘤的放射增敏作用,探讨其放射增敏潜在的分子机制。

## 1 材料

**1.1 细胞株及动物** 人食管癌细胞株ECA109购买于中科院上海生命科学院细胞库,编号TCHU69,传至第3~4代后用于实验。雄性BALB/C-nu裸鼠,4~6周龄,体质量(18.5 $\pm$ 2.5)g,购买于江苏省玛斯生物科技有限公司,许可证号SYXK(苏)2017-0068。裸鼠饲养在南京中医药大学附属医院药理实验室SPF级屏障体系中,适应环境7d后开始实验。动物实验开展已通过南京中医药大学附属医院(江苏省中医院)实验动物伦理委员会批准,批号2019NL-KS42。

**1.2 药物** 血府逐瘀汤由桃仁12g,红花、当归、生地黄、牛膝各9g,赤芍、桔梗、甘草各6g,川芎、枳壳各5g,柴胡3g组成,共79g。以上所用饮片购自江苏省中医院中药房,经该院曹圆药师鉴定均为正品。生药用1L双蒸水浸泡30min后进行煎煮,一煎用10倍量双蒸水武火煎煮45min,滤网过滤药剂备用。二煎用6倍量双蒸水文火煎煮30min,滤网分离后将2次药液混合。依据人-小鼠体表面积等效剂量折算公式<sup>[9]</sup>,小鼠给药剂量12g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>,将混合药液浓缩至含生药1.2g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>,置4 $^{\circ}$ C备用。

**1.3 试剂** RPMI 1640培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶溶液、磷酸盐缓冲液(PBS)(美国Gibco公司,批号分别为C11875500BT、C0232、25200-056、C10010500BT),细胞培养皿(美国Corning公司,批号430166),苏木素伊红(HE)染色试剂盒(碧云天有限公司,批号C0105S),一抗缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )、内皮细胞生长因子A(VEGFA)(武汉三鹰公司,批号分别为20960-1-AP、19003-1-AP),一抗磷酸化人哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)、

人哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)(美国CST公司,批号分别为5536T、2983T、9698S、3700T);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔、小鼠免疫球蛋白(Ig)G二抗(北京中山金桥公司,批号分别为ZB-2301、ZB-2305);FastPure tissue Total RNA Isolation Kit V2提取试剂盒、Hiscript<sup>®</sup> III RT SuperMix (+gDNA wiper)逆转录试剂盒、ACEQ<sup>®</sup> Universal SYBR 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Master Mix试剂盒(南京诺唯赞公司,批号分别为RC112-01、R323-01、Q711-02)。

**1.4 仪器** IX51-A21PH型倒置相差显微镜(日本Olympus公司),7500Fast型Real-time PCR仪(美国Applied Biosystems公司),Mini-Sub cell GT cell型蛋白电泳仪及转膜仪、CHEMIDOC XRS型图像处理仪(美国Bio-Rad公司),PANNORAMIC SCAN型全景切片扫描仪(匈牙利3DHistech公司),Clinac IX系列直线加速器(美国Varian公司)。

## 2 方法

**2.1 动物模型建立及分组处理** 模型建立,根据余倩云<sup>[10]</sup>造模方法,消化、收集对数生长期ECA-109细胞,培养基重悬细胞后调整密度为 $5 \times 10^6$ 个/mL。选取3只BALB/C-nu裸鼠作为供瘤鼠,接种肿瘤细胞悬液,接种体积为0.1 mL/只,部位为右后肢腋下。待瘤体平均体积增至150~200 mm<sup>3</sup>时提示供瘤模型成功。处死小鼠,在超净工作台中将瘤体组织块取出,分割成1 mm<sup>3</sup>左右的组织块,移植到另外24只裸鼠右后肢腋下。分组,移植结束后将小鼠随机分为模型组、单纯照射组、血府逐瘀汤组、联合组,每组6只。模型组、单纯照射组裸鼠予生理盐水0.2 mL灌胃,早晚各1次;血府逐瘀汤组、联合组,药物0.2 mL灌胃,早晚各1次。处理1周后使用直线加速器对单纯照射组、联合组小鼠移植瘤区进行分割照射。根据既往研究基础<sup>[11-12]</sup>,本实验采用单次大剂量(8 Gy)以减少多次分割剂量潜在混杂因素的影响。9 Mev电子线照射,源靶距100 cm,剂量率4 Gy·min<sup>-1</sup>,单次照射剂量为8 Gy,每周1次,总剂量16 Gy/2次/2周。所有组继续原方案灌胃至末次放疗后5 d,干预结束处死小鼠,取组织并进行检测。

**2.2 裸鼠肿瘤质量情况评估** 干预结束后处死裸鼠。超净台中剥取移植瘤,对各组瘤体进行称质量,根据肿瘤质量变化计算出抑瘤率。抑瘤率=(1-各干预组平均瘤质量/模型组平均瘤质量)×100%。

**2.3 裸鼠瘤体免疫组织化学分析** 将4%多聚甲醛

中过夜的小鼠肿瘤组织切片、烘片、脱蜡、修复、孵育并封闭;在各组切片上分别滴加一抗HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA(1:100),4℃下孵育过夜;拿出后放置二抗孵育后显色。经复染、脱水、封片、固定,显微镜下观察各组切片HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA蛋白表达。

**2.4 裸鼠瘤体蛋白免疫印迹法(Western blot)蛋白检测** 取少量瘤体组织放入裂解液及磷酸酶抑制剂中,提取蛋白,经BCA检测提取蛋白浓度。配置8%、10%、12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶,电泳,转膜,封闭,剪膜,放置于加一抗p-mTOR、mTOR、VEGFA、VEGFR2、 $\beta$ -actin(1:1 000),HIF-1 $\alpha$ (1:500),孵育盒中4℃过夜,二抗室温摇床孵育后进行曝光。运用Chemi DocXRS系统显像曝光,得到目的条带经图像分析软件Image-lab测定条带灰度值及分析。

**2.5 裸鼠瘤体Real-time PCR检测** 取各组肿瘤组织按提取试剂盒提取总RNA。用超微量紫外线光度仪对样品进行检测,吸光度 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 介于1.8~2.0代表纯度适宜,100~1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 代表质量浓度适宜。按照逆转录试剂盒说明书,用PCR扩增仪42℃、2 min去除残留DNA,37℃、15 min逆转录,85℃、5 s失活逆转录酶,合成cDNA。根据SYBR法荧光定量试剂盒配置PCR反应预混液,PCR反应条件为预变性95℃、5 min,随后95℃、15 s,60℃、30 s循环反应40次,60℃延伸1 min。反应结束后检测C<sub>t</sub>值并计算2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup> 以分析基因表达谱。检测瘤体mTOR、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA mRNA表达。引物由北京擎科生物科技有限公司合成,见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
mTOR	上游 ATGCTTGGAACCGGACCTG	173
	下游 TCTTGACTCATCTCTCGGAGTT	
HIF-1 $\alpha$	上游 GAACGTCGAAAAGAAAAGTCTCG	124
	下游 CCTTATCAAGATGCGAACTCACA	
VEGFA	上游 AGGGCAGAATCATCACGAAGT	75
	下游 AGGGTCTCGATTGGATGGCA	
$\beta$ -actin	上游 CACTGTGCCATCTACGAGG	155
	下游 TAATGTCACGCACGATTTC	

**2.6 统计学处理** 所有数据用SPSS 23.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析各组数据, $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 血府逐瘀汤对ECA109荷瘤鼠瘤体质量的影响** 药物及射线干预2周后取各组瘤体进行称质

量。与模型组比较,单纯照射组、血府逐瘀汤组瘤体质量明显降低( $P<0.05$ ),联合组瘤体质量显著下降( $P<0.01$ )。与单纯照射组比较,联合组瘤体质量明显降低( $P<0.05$ )。见表2。

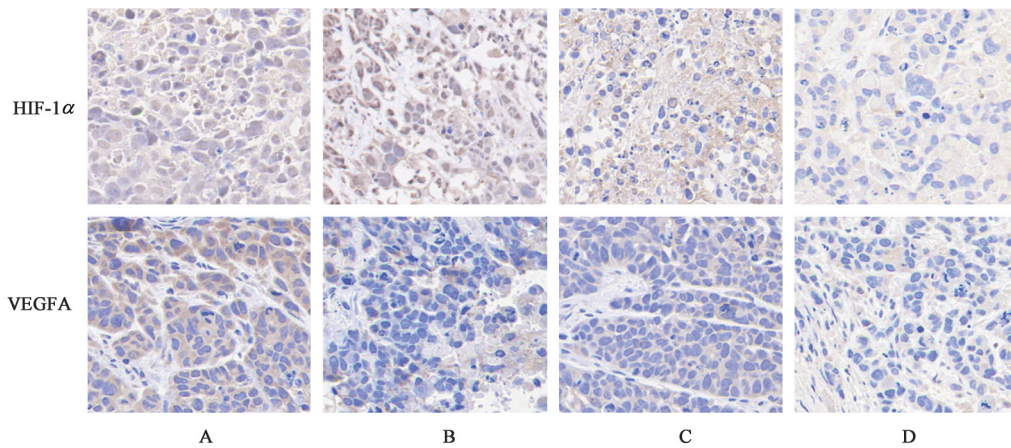
表2 血府逐瘀汤对 ECA-109 荷瘤鼠瘤体质量的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )  
Table 2 Effects of Xuefu Zhuyutang on tumor quality of ECA-109 tumor-bearing mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	瘤体质量/mg	抑瘤率/%
模型组		421.83±81.73	-
单纯照射组	8 Gy	296.33±42.10 <sup>1)</sup>	29.75
血府逐瘀汤组	12	313.17±131.19 <sup>1)</sup>	25.76
联合组	12+8 Gy	179.83±53.59 <sup>2,3)</sup>	57.37

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与单纯照射组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表3-表4同)

3.2 血府逐瘀汤对 ECA109 移植瘤中 mTOR、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA、VEGFR2 蛋白的影响 免疫组化显示,与模型组比较,单纯照射组、血府逐瘀汤组、联合组 HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA 蛋白表达均减少。其中,联合组 HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA 蛋白表达减少最明显。见图1。

Western blot显示,与模型组比较,单纯照射组、血府逐瘀汤组 p-mTOR、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA、VEGFR2 蛋白水平明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),联合组 p-mTOR、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA、VEGFR2 蛋白水平显著下调( $P<0.01$ );与单纯照射组比较,联合组 HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA 蛋白表达明显下降( $P<0.05$ ), p-mTOR、VEGFR2 蛋白表达显著降低( $P<0.01$ )。见表3、图2。



注:A. 模型组;B. 单纯照射组;C. 血府逐瘀汤组;D. 联合组(图2同)

图1 血府逐瘀汤对 ECA-109 移植瘤 HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA 蛋白表达的影响 (免疫组化,  $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of Xuefu Zhuyutang on HIF-1 $\alpha$  and VEGFA protein expression in ECA-109 transplanted tumor (IHC,  $\times 400$ )

表3 血府逐瘀汤对 ECA-109 移植瘤中 mTOR、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA、VEGFR2 蛋白的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of Xuefu Zhuyutang on mTOR, HIF-1 $\alpha$ , VEGFA, VEGFR2 protein expression in ECA-109 transplanted tumor ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	p-mTOR/mTOR	p-mTOR/ $\beta$ -actin	mTOR/ $\beta$ -actin	HIF-1 $\alpha$ / $\beta$ -actin	VEGFA/ $\beta$ -actin	VEGFR2/ $\beta$ -actin
模型组		1.00±0.12	1.00±0.10	1.00±0.07	1.00±0.05	1.00±0.09	1.00±0.07
单纯照射组	8 Gy	0.76±0.09 <sup>1)</sup>	0.79±0.04 <sup>1)</sup>	1.04±0.14	0.67±0.24 <sup>1)</sup>	0.70±0.20 <sup>1)</sup>	0.77±0.01 <sup>1)</sup>
血府逐瘀汤组	12	0.67±0.10 <sup>2)</sup>	0.77±0.04 <sup>1)</sup>	1.15±0.21	0.49±0.23 <sup>2)</sup>	0.56±0.13 <sup>2)</sup>	0.69±0.10 <sup>2)</sup>
联合组	12+8 Gy	0.42±0.04 <sup>2,4)</sup>	0.51±0.16 <sup>2,4)</sup>	1.18±0.24	0.21±0.10 <sup>2,3)</sup>	0.28±0.05 <sup>2,3)</sup>	0.51±0.13 <sup>2,4)</sup>

3.3 血府逐瘀汤对 ECA-109 移植瘤 mTOR、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA mRNA 表达的影响 与模型组比较,单纯照射组 HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA mRNA 表达明显降低( $P<0.05$ ), mTOR mRNA 表达显著下降( $P<0.01$ ), 血府逐瘀汤组和联合组 mTOR、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA mRNA 表达显著降低( $P<0.01$ );与单纯照射组比较,联合组 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达明显降低( $P<0.05$ ), mTOR、VEGFA mRNA 表达显著下降( $P<0.01$ )。见表4。

#### 4 讨论

放射治疗是中晚期 EC 不可或缺的治疗方式,但肿瘤细胞的放射抵抗使根治性放疗效果欠佳。肿瘤的高增殖率以及氧供应受限造成实体瘤乏氧微环境<sup>[13]</sup>。研究证实肿瘤乏氧也是 EC 放疗抵抗而影响疗效的重要原因<sup>[14]</sup>。祖国医学将 EC 归于“噎膈”范畴,其病机主要涵盖正虚、瘀滞、痰凝、热毒等<sup>[15]</sup>。目前学者认为射线是一种具有火热性质

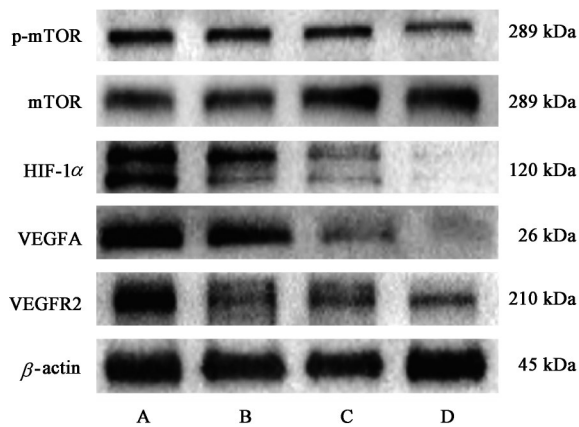


图2 ECA-109移植瘤mTOR、HIF-1α、VEGFA、VEGFR2蛋白电泳  
Fig. 2 Electrophoresis of mTOR, HIF-1α, VEGFA, VEGFR2 protein expression in ECA-109 transplanted tumor

表4 血府逐瘀汤对移植瘤中mTOR、HIF-1α、VEGFA mRNA表达 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 4 Effect of Xuefu Zhuyutang on mTOR, HIF-1α, VEGFA mRNA expression in ECA-109 transplanted tumor ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	mTOR	HIF-1α	VEGFA
模型组		1.00±0.20	1.00±0.21	1.00±0.06
单纯照射组	8 Gy	0.64±0.08 <sup>2)</sup>	0.76±0.06 <sup>1)</sup>	0.70±0.22 <sup>1)</sup>
血府逐瘀汤组	12	0.46±0.06 <sup>2)</sup>	0.67±0.03 <sup>2)</sup>	0.22±0.13 <sup>2)</sup>
联合组	12+8 Gy	0.29±0.11 <sup>2,4)</sup>	0.54±0.02 <sup>2,3)</sup>	0.13±0.00 <sup>2,4)</sup>

的“毒邪”，放疗干预后会形成以瘀阻毒结、气阴耗伤为主的病机。血府逐瘀汤功效除活血化瘀外，兼具滋阴养血，理气止痛。方中桃红破血行滞止痛为君，芍药助君活血化瘀，牛膝引经下行，共作臣药。当归、地黄养血滋阴，枳椏柴疏肝行气宽胸，升阳理气行血，共作佐药。甘草调和，兼为使药。现代药理学研究认为本方具有抗癌、改善缺氧、减轻炎症、止痛等作用<sup>[16-17]</sup>。既往研究发现本方有效减少EC放疗后放射性食管炎及肺炎的发生率，同时体现增敏抑瘤的疗效<sup>[8]</sup>。本研究发现血府逐瘀汤联合放疗治疗对EC移植瘤具有放射增敏的效果，同时降低瘤体组织中VEGFR2、mTOR、HIF-1α、VEGFA蛋白及mRNA表达。说明血府逐瘀汤通过抑制HIF-1α对乏氧信号的传递以调控下游VEGFA、VEGFR2等基因表达，在EC荷瘤鼠体内发挥放射增敏的作用。

缺氧诱导因子(HIFs)是在缺氧环境下细胞发生代谢和生理反应的主要介质，研究证实HIF是影响肿瘤转移和放疗抵抗的重要原因<sup>[18]</sup>。HIFs由α和β 2个亚基组成，可以激活百余种基因的表达，调节细胞的增殖、转移、血管生成等<sup>[19]</sup>。HIFs主要通过调节α亚基以激发自身活性，HIF-1α在乏氧肿瘤

组织中高表达被认为是缺氧环境下诱导基因表达的主要调节剂<sup>[20]</sup>。同时HIF-1α高表达与EC的浸润深度、分化、淋巴渗透和转移有关，具有直接且独立的诱导肿瘤细胞放射抵抗的特性<sup>[21-22]</sup>。因此，HIFs是改善瘤内乏氧以增强放射敏感性的主要靶点之一。HIF-1α的表达受到多种细胞因子及信号通路的调控，而抑制其上游mTOR磷酸化可以降低癌细胞的耗氧量，以减少肿瘤组织内缺氧<sup>[23-24]</sup>。此外，缺氧对血管生成的调节是动态平衡的，这种平衡可以纠正肿瘤发生过程中异常的血管生成。VEGFA是在肿瘤微环境中与异常脉管系统发展有关的主要血管生成分子，VEGFA在缺氧环境中被上调后与其主要信号受体VEGFR2结合，通过修剪异常血管，增加药物递送，减少瘤内乏氧，从而增强放射敏感性<sup>[25-26]</sup>。一项针对血清VEGF与放射敏感性关系的临床研究表明，VEGF低表达的非小细胞肺癌患者可获得较长的总生存期，说明VEGF可作为一种与放射敏感性及预后相关的生物标志物<sup>[27]</sup>。

结果表明，血府逐瘀汤具有抑制裸鼠食管癌ECA-109瘤体生长的作用。联合组较单纯照射组的抑瘤率升高，证明血府逐瘀汤对EC移植瘤具有放射增敏的作用。为了进一步明确放射增敏的机制，笔者从具有氧敏感性及诱导放射抗性的转录基因HIF-1α入手，经IHC检测移植瘤瘤体发现，各干预组肿瘤组织HIF-1α、VEGFA表达均有所减少，其中联合组降低最明显。接着检测HIF-1α及其上下游的分子发现，血府逐瘀汤能下调瘤体中p-mTOR、HIF-1α、VEGFA、VEGFR2蛋白表达，抑制mTOR、HIF-1α、VEGF mRNA表达水平。据此推测血府逐瘀汤增强EC荷瘤鼠放疗敏感性的机制，可能与抑制mTOR/HIF-1α/VEGFA缺氧信号通路相关。

综上，本实验在动物水平证实血府逐瘀汤对ECA-109食管癌荷瘤鼠瘤具有放射增敏的作用，其分子机制可能与抑制mTOR/HIF-1α/VEGF mRNA及蛋白表达相关。然而中药协同放疗对于食管癌的防治往往是多现象及多靶点的，其更加深层次的影响机制还需要通过体外实验进行研究和证实。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (6) :

- 394-424.
- [ 2 ] CHUN S G, SKINNER H D, MINSKY B D. Radiation therapy for locally advanced esophageal cancer [J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2017, 26 (2) : 257-276.
- [ 3 ] 李晔雄,殷蔚伯,余子豪,等. 肿瘤放射治疗学[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2018:826.
- [ 4 ] BARKER H E, PAGET J T, KHAN A A, et al. The tumour microenvironment after radiotherapy: Mechanisms of resistance and recurrence [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(7):409-425.
- [ 5 ] LIU J, ZHANG J, HUANG L, et al. Xuefu Zhuyu Tang exerts antitumor effects by inhibiting glioma cell metastasis and invasion via regulating tumor microenvironment [J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 3603-3612.
- [ 6 ] 李延,田伟,马中龙. 加味血府逐瘀汤抗肿瘤作用的实验研究[J]. *世界中医药*, 2012, 7(1):72-74.
- [ 7 ] 彭明尧,周雪宇,蒋利华. VEGF、HIF-1 $\alpha$ 表达对食管鳞癌患者放疗疗效的影响[J]. *实用癌症杂志*, 2020, 35(10):1631-1634.
- [ 8 ] 刘俊波,黄常江,蔡凯,等. 血府逐瘀汤防治急性放射性食管炎30例临床观察[J]. *四川中医*, 2011, 29(9): 72-73.
- [ 9 ] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:1698.
- [ 10 ] 余倩云,许建华,李朝衡,等. “肠胃清”对结肠癌皮下移植瘤奥沙利铂治疗的增敏作用及对肿瘤组织坏死凋亡的影响研究[J]. *江苏中医药*, 2018, 50(1) : 75-78.
- [ 11 ] ZHU H, YANG X, DING Y, et al. Recombinant human endostatin enhances the radioresponse in esophageal squamous cell carcinoma by normalizing tumor vasculature and reducing hypoxia [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:14503.
- [ 12 ] QIN Q, CHENG H, LU J, et al. Small-molecule survivin inhibitor YM155 enhances radiosensitization in esophageal squamous cell carcinoma by the abrogation of G<sub>2</sub> checkpoint and suppression of homologous recombination repair [J]. *J Hematol Oncol*, 2014, 7:62.
- [ 13 ] 李周雷,张祥松. 分子影像学及肿瘤乏氧(一):肿瘤乏氧机制[J]. *影像诊断与介入放射学*, 2020, 29(6): 457-460.
- [ 14 ] ZHANG H, SI J, YUE J, et al. The mechanisms and reversal strategies of tumor radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2021, 147(5):1275-1286.
- [ 15 ] 郑玉玲,陈玉龙. 中医药治疗食管癌研究述评[J]. *中医肿瘤学杂志*, 2020, 2(3):1-4.
- [ 16 ] 吴剑宏,陈幸谊. 血府逐瘀汤方剂的现代药理研究进展[J]. *中成药*, 2013, 35(5):1054-1058.
- [ 17 ] 林建国,姚魁武,王擎擎,等. 基于网络药理学和分子对接探讨血府逐瘀汤治疗心肌梗死的作用机制[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(4):885-893.
- [ 18 ] SHI R, LIAO C, ZHANG Q. Hypoxia-driven effects in cancer: Characterization, mechanisms, and therapeutic implications [J]. *Cells*, 2021, 10(3):678.
- [ 19 ] SCHEUERMANN T H, YANG J, ZHANG L, et al. Hypoxia-inducible factors Per/ARNT/Sim domains: Structure and function [J]. *Methods Enzymol*, 2007, 435:3-24.
- [ 20 ] WIGERUP C, PAHLMAN S, BEXELL D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 164:152-169.
- [ 21 ] MACEDO S C, MIRANDA G V, HENRIQUE R, et al. The critical role of hypoxic microenvironment and epigenetic deregulation in esophageal cancer radioresistance [J]. *Genes (Basel)*, 2019, 10(11):927.
- [ 22 ] JING S W, WANG J, XU Q. Expression of hypoxia inducible factor 1 alpha and its clinical significance in esophageal carcinoma: A Meta-analysis [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(7):1010428317717983.
- [ 23 ] ZHOU X, LIU H, ZHENG Y, et al. Overcoming radioresistance in tumor therapy by alleviating hypoxia and using the HIF-1 inhibitor [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(4):4231-4240.
- [ 24 ] KELLY C J, HUSSIEN K, FOKAS E, et al. Regulation of O<sub>2</sub> consumption by the PI3K and mTOR pathways contributes to tumor hypoxia [J]. *Radiother Oncol*, 2014, 111(1):72-80.
- [ 25 ] SHAIK F, CUTHBERT G A, HOMER V S, et al. Structural basis for vascular endothelial growth factor receptor activation and implications for disease therapy [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(12):1673.
- [ 26 ] JAYSON G C, KERBEL R, ELLIS L M, et al. Antiangiogenic therapy in oncology: Current status and future directions [J]. *Lancet*, 2016, 388 (10043) : 518-529.
- [ 27 ] FU Z Z, SUN X D, LI P, et al. Relationship between serum VEGF level and radiosensitivity of patients with nonsmall cell lung cancer among asians: A Meta-analysis [J]. *DNA Cell Biol*, 2014, 33(7):426-437.

[责任编辑 张丰丰]