

鳖甲煎丸对小鼠 Matrigel 种植体新生血管的影响

铁明慧, 王科, 张颖*

(四川大学华西医院, 成都 610041)

[摘要] **目的:**研究鳖甲煎丸对小鼠血管生成及新生血管结构的影响,并探讨可能的作用机制。**方法:**取 Balb/c 小鼠 32 只,采用碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)诱导小鼠腹壁 Matrigel 种植体方法进行血管生成实验,Matrigel 与 b-FGF,肝素混合后植入小鼠腹壁正中区域皮下,将小鼠随机分成鳖甲煎丸高、低剂量组($12, 6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),正常组,内皮抑素组($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组 8 只,在 Matrigel 种植前 3 d,各组分别给予不同的实验药物,连续给药 8 d,第 8 天取出 Matrigel,测量 Matrigel 种植体中血红蛋白含量,并进行苏木素-伊红(HE)染色及免疫组织化学染色,进行微血管计数(MDC),并观察微血管结构特征及发育阶段。**结果:**鳖甲煎丸高、低剂量组血红蛋白含量及 MDC 均低于正常组,且鳖甲煎丸低剂量组血红蛋白含量及 MDC 较高剂量组低;HE 染色显示鳖甲煎丸低剂量及高剂量组可见散在新生血管,新生血管数量较正常组少;CD34 免疫组化显示鳖甲煎丸组内皮细胞数量较正常组减少,且血管结构模糊、内皮细胞着色变浅,且鳖甲煎丸低剂量组细胞数低于鳖甲煎丸高剂量组。**结论:**鳖甲煎丸对新生血管具有抑制作用,抑制作用强度与浓度有关,低剂量鳖甲煎丸抑制血管生成作用强于高剂量鳖甲煎丸。

[关键词] 鳖甲煎丸; Matrigel; 新生血管; 血管正常化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)19-0090-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016190090

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160804.1101.046.html>

[网络出版时间] 2016-08-04 11:01

Effect of Biejiajian Wan on Angiogenesis in Matrigel Implant of Mice

TIE Ming-hui, WANG Ke, ZHANG Ying*

(West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Biejiajian Wan (BP) on angiogenesis and the structure of the new vessels in Matrigel implant of mice induced by basic fibroblast growth factor (b-FGF). **Method:** Totally 32 Balb/c mice were selected, and angiogenesis model was established by matrigel implant assay. Matrigel (500 μL) containing b-FGF and heparin was subcutaneously transplanted into the abdomens of mice, and then the mice were randomly divided into BP high dose and low dose groups ($12, 6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), normal group, endostatin group ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), $n = 8$ in each group. The corresponding drugs were given 3 days before Matrigel implant for 8 days. Matrigel was taken out at the eighth day, and hemoglobin content in Matrigel implant was detected; HE staining and immunohistochemical staining were used to detect microvessel density count (MDC); meanwhile, the structure characteristics and development stage of the new vessels in matrigel implant were observed and compared. **Result:** Hemoglobin content and MDC in high and low dose BP groups were lower than those in normal group; in addition, the hemoglobin content and MDC in low dose BP group were lower than those in high dose group. HE staining results showed some scattered new vessels in low dose and high dose BP groups, and the number of new vessels was lower than that in normal group. Furthermore, CD31 immunohistochemical staining results showed that the number of endothelial cells in BP groups was lower than that

[收稿日期] 20151019(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202784)

[第一作者] 铁明慧, 硕士, 从事中西医结合肿瘤的基础与临床研究, Tel:028-62539431, E-mail: timinghui3737@126.com

[通讯作者] * 张颖, 硕士, 副教授, 副主任医师, 从事肿瘤的基础与临床研究, Tel:028-62539431, E-mail:18980602088@189.cn

in normal group; the structure of the new vessels became fuzzy and the endothelial cells became lighter in color as compared with the control group. **Conclusion:** BP have inhibitory effect on angiogenesis in a concentration-dependent manner; low dose BP has a stronger inhibitory effect than high dose BP on angiogenesis.

[**Key words**] Biejiajian Wan; Matrigel; angiogenesis; vascular normalization

鳖甲煎丸出自东汉医家张仲景所著《金匱要略》，具有寒热并用、攻补兼施、益气活血、活血化瘀、解毒散结之功。该方目前广泛应用于临床^[1]，用于治疗肝癌^[2-3]、胃癌^[4]等肿瘤疾病及慢性肝炎^[5]、肝硬化^[6]等肝脏疾病，并取得一定疗效，但其作用机制尚未明确。近年的动物实验研究表明鳖甲煎丸能够显著降低肿瘤组织的微血管密度及抑制血管内皮生长因子(VEGF)，增殖细胞核抗原(PCNA)的表达^[7-8]，对肝癌细胞的增殖迁移及侵袭具有抑制作用^[9]，能够抑制人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)的快速增殖并且显著地降低 HepG2 中 VEGF 的表达水平^[10]。另外，符宇等^[11]的研究结果表明鳖甲煎丸能够通过保护血管内皮细胞起到抗动脉粥样硬化的作用，张艺凡等^[12]认为鳖甲煎丸能够显著减轻肝纤维化大鼠肝脏组织病理损害，下调血小板源性生长因子(PDGF)，Ras, ERK1 蛋白的表达。但关于鳖甲煎丸对血管新生的影响方面的报道较少，为探究鳖甲煎丸对正常微血管新生及对其结构及功能的影响，同时为研究鳖甲煎丸对血管的作用机制及其是否可诱导肿瘤血管正常化打下基础。本实验拟研究鳖甲煎丸对小鼠 Matrigel 种植体新生血管的影响。

1 材料

1.1 动物 Balb/c 小鼠，雌雄各半，6~8 周，18~20 g，32 只，由四川大学华西实验动物供应站普通饲料喂养，自由饮水。

1.2 药物及试剂 鳖甲煎丸(武汉中联药业集团股份有限公司，批号 Z42020772)，Matrigel(美国 BD 公司，批号 356234)；鼠内皮抑素(ER)，碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)及牛血清白蛋白(BSA)(美国 Sigma 公司，批号分别为 E8279, 010899, B121101)；肝素钠(美国 Anresco 公司，批号 051219)。

1.3 仪器 DNM-9602A 型多功能酶标仪(北京普朗新科技有限公司)，MM-800LFA/LMAF 型显微镜(日本 Nikon 公司)，HemaMini4K 型低温冷冻离心机(珠江黑马医学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 药液配置 用蒸馏水将鳖甲煎丸分别配成含 1.2, 0.6 g·mL⁻¹ 的悬浊液，4℃ 冰箱保存，用时摇匀。

2.2 分组及给药 将小鼠随机分成鳖甲煎丸高、低剂量组、正常组、内皮抑素组，每组 8 只，共 32 只。在 Matrigel 种植前 3 d，鳖甲煎丸高、低剂量组分别按每天 12, 6 mg·kg⁻¹ ig，正常组给相同剂量的生理盐水 ig，内皮抑素组将内皮抑素按 5 mg·kg⁻¹ 标准加入该组 Matrigel 中混匀后注入小鼠腹壁正中皮下。连续给药 8 d。

2.3 Matrigel 植入 Matrigel 于 4℃ 冰箱冰过夜融化；高压灭菌过的移液器吸头和离心管 4℃ 预冷。以含 100 g·L⁻¹ 牛血清白蛋白的 PBS 溶液稀释 b-FGF 至 2 μg·L⁻¹，稀释肝素至 1 U·μL⁻¹。于给药后 3 d，取 b-FGF 50 μL(100 pg)，肝素 50 μL(50 U)与冰浴中的 Matrigel 500 μL 混匀；另将内皮抑素按 2 000 μg·L⁻¹ 标准加入含 b-FGF 及肝素钠各 50 μL 的 500 μL Matrigel 中备用。上述 Matrigel ih 于每组小鼠腹部正中区域(注射前针头左右摆动，造皮丘)(以上操作步骤要在冰上进行)。5 d 后，小鼠经后颈椎脱臼处死，解剖时沿着小鼠腹中线剪开皮肤，小心剥离基质胶栓(防止出血)，用 PBS 冲洗清洗 2~3 次后拍照，每组各取 4 块 Matrigel 种植体共 16 块用于血红蛋白测定，每组再另取 4 块 Matrigel 种植体共 16 块用 10% 的甲醛固定。

2.4 血红蛋白含量测定 小鼠体内取出的 Matrigel 种植体置于 -70℃ 冰箱过夜脱水，后悬浮于 0.5 mL (1 g·L⁻¹) Triton X-100 中常温静置 2 h，后移入 4℃ 冰箱保存 2 h，取出后用吸管吹打成悬液，低温冷冻离心机 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min，取上清液于 405 nm 处测定吸光度 A，测量的结果用鼠血红蛋白标准曲线换算成血红蛋白含量。

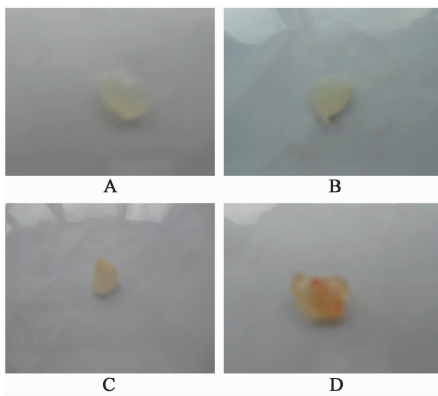
2.5 微血管计数(MDC)和血管结构观察 小鼠体内取出的 Matrigel 种植体用 10% 甲醛室温固定 3 d，石蜡包埋，切片，常规苏木素-伊红(HE)染色或用于免疫组化染色。用免疫组织化学法对血管内皮细胞 CD34 分子进行染色后，按照 Weidner^[13] 标准进行血管密度计数，被 CD34 抗体染成棕黄色的内皮细胞或内皮细胞簇，只要与其他结缔组织成分有明显区别，无论其有无管腔，均作为一个微血管计数。在 100 倍光镜下扫查整个切片，寻找血管高密度区，在高倍镜(400 倍)下记录 10 个视野被染成棕黄色的

血管数,每个高倍镜视野(HP)的面积为 $150\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$,取其平均值作为微血管密度。另在显微镜下观察血管周细胞和内皮细胞的覆盖情况,并采图。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学方法为单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 肉眼观察 Matrigel 种植体 肉眼观察内皮抑素组 Matrigel 种植体颜色最淡;鳖甲煎丸组小鼠获得的 Matrigel 种植体比正常组小鼠的种植体颜色偏淡,提示可能是血管含量较少的表现。见图 1。



A. 内皮抑素组;B. 鳖甲煎丸 $6\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;C. 鳖甲煎丸 $12\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;D. 正常组

图 1 各组小鼠体内 Matrigel 种植体的颜色

Fig.1 Color of Matrigel plug in groups of mice

3.2 对小鼠 Matrigel 种植体中血红蛋白含量的影响 对取下的 Matrigel 种植体测定其血红蛋白含量,经统计学分析,实验组中的鳖甲煎丸高、低剂量组及内皮抑素组血红蛋白含量均低于正常组($P < 0.01$);鳖甲煎丸高、低剂量组血红蛋白含量高于内皮抑素组($P < 0.01$);鳖甲煎丸低剂量组血红蛋白含量低于鳖甲煎丸高剂量组($P < 0.01$)。见表 1。

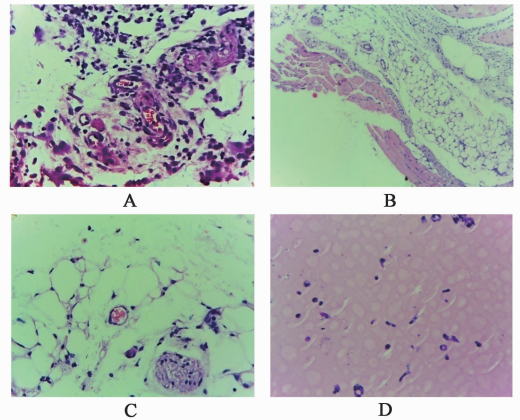
表 1 鳖甲煎丸对小鼠 Matrigel 种植体中血红蛋白含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effects of Biejiajian Wan on amount of hemoglobin in Matrigel plug of mice($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	血红蛋白/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	103.08 ± 1.96
内皮抑素	5	$26.85 \pm 1.96^{(1)}$
鳖甲煎丸	6	$43.14 \pm 1.96^{(1,2,3)}$
	12	$96.22 \pm 1.96^{(1,2)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与内皮抑素组比较²⁾ $P < 0.01$;鳖甲煎丸高剂量组³⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对小鼠 Matrigel 种植体病理学的影响 正常组基质胶体种植体内有许多新生的血管,血管腔内大量红细胞聚集。说明血流相对丰富;而鳖甲煎丸低、高剂量组可见散在新生血管,数量较少;且鳖甲煎丸低剂量组较高剂量组血管数少;内皮抑素组血管最少,仅偶见新生血管。见图 2。



A. 正常组;B. 鳖甲煎丸 $12\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;C. 鳖甲煎丸 $6\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;D. 内皮抑素组(图 3 同)

图 2 鳖甲煎丸对小鼠 Matrigel 种植体病理学的影响(HE, $\times 100$)

Fig.2 Effects of Biejiajian Wan on pathology of Matrigel plug in mice(HE, $\times 100$)

3.4 Matrigel 种植体免疫组织化学染色 选用 CD34 作为血管内皮细胞的标记物,对 Matrigel 种植体内新生血管内皮细胞进行免疫组织化学染色。结果显示,正常组细胞数量多,可见较多染成棕黄色的内皮细胞或内皮细胞簇,血管结构清晰、内皮细胞着色较深;鳖甲煎丸组细胞数量较正常组减少,且血管结构模糊、内皮细胞着色变浅;鳖甲煎丸低剂量组细胞数低于鳖甲煎丸高剂量组;内皮抑素组偶见棕黄色颗粒。见图 3。

3.5 对小鼠 Matrigel 种植体内 MDC 的影响 与正常组比较,鳖甲煎丸高、低剂量组及内皮抑素组的 MDC 均明显升高($P < 0.01$);鳖甲煎丸低剂量组的 MDC 低于鳖甲煎丸高剂量组($P < 0.05$);鳖甲煎丸高、低剂量组 MDC 均高于内皮抑素组($P < 0.01$);上述结果与血红蛋白含量测定结果相同。见表 2。

4 讨论

活血化瘀是临床上中医治疗肿瘤的重要治疗法则之一。研究表明活血化瘀药物有抑制肿瘤血管新生和促进肿瘤血管生成 2 个相互矛盾的作用^[14-16]。其对非肿瘤状态下的瘀阻血络可以起到“通”的作用,而对肿瘤的血络是发挥阻抑功能^[17]。可以看出活血化瘀药物抗肿瘤作用具有双向调节作用。

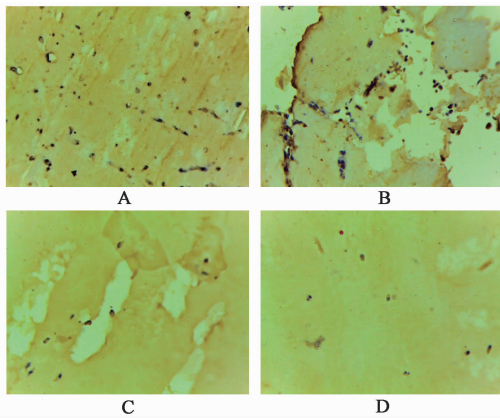


图 3 鳖甲煎丸对小鼠 Matrigel 种植体 CD34 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effects of Biejajian Wan on CD34 protein expression of Matrigel plug mice(IHC, ×400)

表 2 鳖甲煎丸对小鼠 Matrigel 种植体内 MDC 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of Biejajian Wan on MDC in matrigel plug of mice

($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	MDC/血管数·HP ⁻¹
正常	-	6.80 ± 2.09
内皮抑素	5	7.80 ± 2.09 ¹⁾
鳖甲煎丸	6	14.2 ± 2.09 ^{1,2,3)}
	12	18.80 ± 2.09 ^{1,2)}

注:与正常组比较¹⁾ P < 0.01;与内皮抑素组比较²⁾ P < 0.01;鳖甲煎丸高剂量组³⁾ P < 0.05。

鳖甲煎丸中含有大量的活血化瘀、软坚散结中药如大黄、土鳖虫、蜣螂、牡丹皮、芍药、桃仁、鳖甲等,为消癥化结之名方。临床上多用于治疗慢性肝病、心绞痛、血管性痴呆等疾病,近年来亦用于治疗各种肿瘤疾病^[2,4]。但其治疗肿瘤机制至今尚不是十分明确。那么鳖甲煎丸治疗肿瘤的机制是否与抗血管生成有关,是否具有双向调节作用,需要进一步去研究。陈达理^[18]及贺松其等^[19]通过动物实验表明鳖甲煎丸可通过抑制肿瘤的 VEGF 来实现抑制肿瘤的血管生成,进而发挥抗肿瘤转移作用。但一些国外前期临床试验表明 VEGF 抑制剂促进肿瘤转移^[20-21]。当然,自 1971 年 Folkman^[22]教授提出著名的“饿死肿瘤疗法”理论至今 40 多年,大量的报道表明抗肿瘤血管生成治疗确实有效,能提高放疗、化疗、免疫治疗疗效^[23-24]。面对这些矛盾 Jain^[25]于 2005 年提出了“适量的抗血管生成药的应用可以促进肿瘤血管正常化”的理论。该理论是近年研究热点,大量研究表明适度的抗血管治疗诱导肿瘤血管正常化,过度的抗血管治疗却能使肿瘤血管退化,诱导持续的肿瘤血管正常化是抗血管治疗急需解决的

问题^[26]。

本研究采用血管生成实验的常用方法之一 Matrigel 种植体技术^[27],观察鳖甲煎丸对正常新生血管的影响,结果表明鳖甲煎丸高、低剂量组均能抑制 Matrigel 种植体内的血管生成,且低剂量组作用较高剂量组强;本研究结果与郑艳等^[10]的研究结果一致,鳖甲煎丸对新生血管有抑制作用,且与浓度有关,但与张绪慧等^[7]的结果不相同,他们的结果表明鳖甲煎丸高剂量组对新生血管的抑制作用较低剂量组鳖甲煎丸强,这种差异可能与剂量设计及标本取材不同有关,也提示鳖甲煎丸剂量不同对血管抑制的强度不同,其机制有待进一步探索。另外,鳖甲煎丸高、低剂量组均对新生血管内皮细胞结构具有一定的影响。本研究探究鳖甲煎丸对正常血管结构和功能的影响,为研究鳖甲煎丸对血管的作用机制及其是否可诱导肿瘤血管正常化打下基础。同时进一步阐明活血化癥药物作用机制,为临床用药提供实验依据。

[参考文献]

[1] 罗庆东,姜德友. 鳖甲煎丸的临床研究与进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2012,33(6):764-766.

[2] 姚世勇. 鳖甲煎丸加减治疗原发性肝癌 54 例[J]. 辽宁中医药大学学报,2009,11(6):161-162.

[3] 武如通. 鳖甲煎丸对中期肝癌保肝抑制瘤的临床研究[J]. 按摩与康复医学,2014,5(4):139-140.

[4] 蔡新生,闫朝光,王广春,等. 鳖甲煎丸预防胃癌术后复发转移临床研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2013,15(11):218-219.

[5] 徐礼通. 鳖甲煎丸治疗慢性乙型肝炎早期肝硬化 36 例[J]. 中国药业,2012,21(1):149-150.

[6] 赵治友,姚真敏,钟庆平,等. 鳖甲煎丸对慢性肝病肝纤维化治疗作用的临床研究[J]. 新中医,2005,37(4):29-30.

[7] 张绪慧,梁磊,蔡长青,等. 鳖甲煎丸对 H22 荷瘤小鼠肿瘤血管抑制作用的研究[J]. 山东中医杂志,2010,29(5):330-331.

[8] 张绪慧,梁磊. 鳖甲煎丸对荷瘤小鼠 VEGF、PCNA 表达的影响[J]. 云南中医中药杂志,2010,31(3):48-49.

[9] 程咏,贺松其,朱云,等. 鳖甲煎丸抑制肝癌细胞增殖、黏附及侵袭作用的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,2013,33(5):664-667.

[10] 郑艳,贺松其,文彬,等. 鳖甲煎丸对 HUVEC 增殖及 HepG2 中 VEGF 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(20):132-136.

[11] 符宇,余海滨. 鳖甲煎丸对糖尿病合并动脉粥样硬化

- 大鼠血脂、血管内皮功能以及基质金属蛋白酶9的影响[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(5):1010-1013.
- [12] 张艺凡, 王飞, 李风华, 等. 化瘀通络中药鳖甲煎丸对肝纤维化大鼠 PDGF 及 Ras 信号转导通路的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(27):4060-4067.
- [13] Weidner N. Intratumormicrovessel density as a prognostic factor in cancer[J]. *Am J Pathol*, 1995, 147(1):9-13.
- [14] 王文江, 孙珏. 活血化瘀防治恶性肿瘤侵袭转移研究进展[J]. 江西中医药, 2013, 44(7):69-73.
- [15] 孟华, 朱妙章, 郭军, 等. 中药当归、川芎、丹参提取液促血管生成作用的实验研究[J]. 中药材, 2006, 29(6):574-576.
- [16] 高连印, 韦艾凌. 活血化瘀药调控肝细胞癌微环境细胞因子影响肿瘤转移复发机制初探[J]. 环球中医药, 2014, 7(2):119-121.
- [17] 张春丽. 中药对肿瘤血管生成抑制作用的研究[J]. 北京中医药, 2011, 30(2):156-160.
- [18] 陈达理. 鳖甲煎丸抗肿瘤血管生成的实验研究[J]. 浙江中医杂志, 2004, 39(12):535-537.
- [19] 贺松其, 姚飞龙. 鳖甲煎丸抗肝癌转移的理论依据及分子机制探讨[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(11):2579-2581.
- [20] Páez-Ribes M, Allen E, Hudock J, et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis [J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(3):220-231.
- [21] Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(8):592-603.
- [22] Folkman J. Tumorangiogenesis: therapeutic implications [J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21):1182-1186.
- [23] Wong C S, Sceney J, House C M, et al. Vascular normalization by loss of Siah2 results in increased chemotherapeutic efficacy [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(7):1694-1704.
- [24] EKaffas A, Giles A, Czarnota G J. Dose-dependent response of tumor vasculature to radiation therapy in combination with Sunitinib depicted by three-dimensional high-frequency power Doppler ultrasound [J]. *Angiogenesis*, 2013, 16(2):443-454.
- [25] Jain R K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy [J]. *Science*, 2005, 307(576):58-62.
- [26] Goel S, Duda D G, Xu L, et al. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases [J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(3):1071-1121.
- [27] 李杰, 缪维芳, 吴秀兰. Matrigel 在肿瘤体内外研究模型中的应用[J]. 海峡药学, 2014, 26(8):74-76.

[责任编辑 周冰冰]