

益气活血解毒方对小鼠卵巢癌 ID-8 细胞株增殖及血管生成过程的影响

李怡帆^{1,2}, 李娟¹, 卢雯平^{1*}

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] **目的:**研究益气活血解毒方抑制鼠卵巢上皮癌 ID-8 细胞株增殖的作用,并观察本方对于脐静脉内皮细胞(HUVECs)形成血管过程的作用,为本方发挥疗效提供实验依据。**方法:**采用细胞增殖与检测方法(cell counting kit-8, CCK-8)检测本方对于 ID-8 细胞增殖的抑制作用;将含中药血清、磁珠分选的调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)与抗血管内皮生长因子(VEGF)抗体分组共培养,观察血管生成情况差异。**结果:**与空白组比较,10%,20%含药血清均能够抑制卵巢上皮癌 ID-8 细胞株的增殖,此抑制作用在培养 96 h 时最明显;在 72,96 h 时,20%含药血清组的抑制率明显高于 10%含药血清组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 Tregs(-)各组相比,Tregs(+)各组 HUVECs 细胞呈现明显的血管网状结构,中药含药血清组血管成网不明显,VEGF 抗体联合含药血清组血管成网情况最差。**结论:**益气活血解毒方对小鼠卵巢上皮癌 ID-8 细胞株的增殖过程有显著的抑制作用,同时能够干预血管的形成,这也许与本方影响 Tregs 促进肿瘤新生血管的作用相关。

[关键词] 益气活血解毒方; 卵巢癌; ID-8 细胞株; 调节 T 细胞; 肿瘤血管

[中图分类号] R737.31;R22;R24;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)04-0154-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018040154

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171115.1441.004.html>

[网络出版时间] 2017-11-15 14:41

Effect of Yiqi Huoxue Jiedu Decoction on Proliferation of Ovarian Cancer ID-8 Cells and Angiogenesis

LI Yi-fan^{1,2}, LI Juan¹, LU Wen-ping^{1*}

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the inhibitory effects of Yiqi Huoxue Jiedu decoction on proliferation of ovarian epithelial carcinoma ID-8 cells *in vitro*, observe the effect of this method on angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), and provide experimental basis for its efficacy. **Method:** Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to testify the inhibitory effect of Yiqi Huoxue Jiedu decoction on the proliferation of ovarian cancer ID-8 cells; decoction serum, regulatory T cells (Tregs) isolated by immune magnetic MACS MicroBeads, as well as vascular endothelial growth factors (VEGF) were co-cultured, and then the angiogenesis of HUVEC was observed. **Result:** As compared with blank control group (fetal bovine serum group), drug serum groups with concentration of 10% and 20% showed inhibitory effects on ID-8 cells, and this effect was most significant at 96 h. Serum group with concentration of 20% showed remarkable advantages against 10% group at 72 h ($P < 0.01$) and 96 h ($P < 0.05$). HUVECs cultivated with Treg cells exhibited a better angiogenesis

[收稿日期] 20170711(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473566)

[第一作者] 李怡帆, 硕士, 从事中医内科学肿瘤方向研究, E-mail: 15210694309@126.com

[通信作者] * 卢雯平, 硕士生导师, 主任医师, 教授, 从事乳腺及妇科恶性肿瘤的中西医结合治疗研究, E-mail: lu_wenping@sina.com

process. On the other hand, the vascular network was not obvious in drug serum group, and the inhibitory effect was most significant in anti-VEGF + Yiqi Huoxue Jiedu decoction. **Conclusion:** Yiqi Huoxue Jiedu decoction can restrict the multiplication of ovarian epithelial carcinoma ID-8 cells, and it could intervene the angiogenesis of HUVECs, which is probably associated with the intervention on Tregs.

[**Key words**] Yiqi Huoxue Jiedu decoction; ovarian cancer; ID-8; regulatory T cells; tumor angiogenesis

卵巢癌是女性肿瘤中死亡率最高的恶性肿瘤, 70% 的患者确诊病情时已经为晚期^[1]。美国国立癌症研究所监测、流行病学和结果数据库 (SEER 数据库) 2012 年的统计数据表明, 尽管医疗手段不断进步, 但 III, IV 期卵巢癌患者的 5 年存活率分别是 36%, 17%, 与 30 年前比较并未有明显改善^[2]。因此, 研究卵巢恶性肿瘤的生物学特点迫在眉睫, 探寻行之有效的新疗法亦成为国内外临床医生迫切需要解决的问题。

大量研究提示, 卵巢癌是免疫相关性的恶性肿瘤, 其免疫微环境当中呈现一种抑制状态, 而调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 是其中重要的免疫抑制因子之一, 它能够通过抑制机体免疫功能并能够促进肿瘤血管的增加, 从而推动卵巢癌的病情进展^[3]。大量研究表明, 卵巢癌的发生发展与肿瘤微环境中的免疫抑制状态以及免疫逃逸密切相关。Tregs 广泛存在于卵巢癌肿瘤组织中, 能够引起免疫逃逸以及免疫抑制^[3-5]。此外, 卵巢癌微环境中 Tregs 的聚集与血管生成密切相关, Tregs 在稳定及缺氧状态下均可以分泌大量的血管内皮生长因子 (VEGF), 促进毛细血管的生成, 进而促进肿瘤发展。此外, 有研究提示, 卵巢癌患者病情的预后与卵巢癌微环境当中 Tregs 细胞数量的增加关系密切^[6-7]。因此, 研究 Tregs 细胞在卵巢癌免疫抑制机制, 以及探寻抑制其血管生成的有效方法, 具有重要的临床意义。

本课题组的前期临床研究表明, 益气活血解毒方能够显著改善晚期卵巢癌患者的生活质量, 并能够显著延长其无进展生存期^[8]; 此外, 本方还能够降低晚期卵巢癌患者外周血 CD4⁺ CD25⁺, CD8⁺ CD28⁺ 调节性 T 细胞的水平, 此外, 能够显著提高患者外周血 CD8⁺ CD28⁺ 细胞毒 T 细胞数量, 从而能够帮助纠正患者的免疫抑制状况^[9]。前期实验研究表明, 本方与树突状细胞 (dendritic cells, DC) 疫苗联合用药, 能够显著抑制小鼠宫颈癌细胞株 U14 细胞的增殖, 同时能够减少转化生长因子 (TGF)- β_1 与白细胞介素 (IL)-10 免疫抑制因子的数目, 而这两种免疫抑制因子均源于 Tregs 细胞, 这提示本方

发挥疗效可能是与本方干预 Tregs 免疫功能相关^[10]。基于此, 为了探究本方是否同时参与了干预肿瘤血管生成的过程, 本实验以小鼠卵巢癌 ID-8 细胞为研究对象, 观察益气活血解毒方对其细胞增殖过程的影响, 以及对于脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 血管生成过程的影响, 并对本方干预 Tregs 细胞促进肿瘤血管生成的作用而进行探讨。

1 材料

1.1 细胞株 小鼠卵巢上皮癌细胞株 ID-8 购自赛百慷生物技术股份有限公司 (上海), HUVECs 购自中国医学科学院肿瘤医院细胞库。

1.2 实验动物 BALB/C 小鼠 20 只, SPF 级, 4~6 周龄, 体质量 (20 \pm 2) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2014-0004, 饲养条件, 清洁级动物室, 室温 (22.6 \pm 0.4) $^{\circ}$ C, 湿度 (75.8 \pm 6.2) %, 12 h 照明, 12 h 黑暗, 标准饲养盒内喂养, 每盒 5 只。

1.3 药品 中药益气活血解毒方所需生药均购自广安门医院中药房, 方剂组成为黄芪 30 g, 枸杞子 15 g, 炒白术 15 g, 山药 15 g, 三棱 6 g, 莪术 9 g, 女贞子 15 g, 海藻 15 g, 青皮 6 g, 乌药 6 g, 肉桂 6 g, 鳖甲 12 g, 全蝎 5 g, 白花蛇舌草 15 g, 青蒿 12 g, 各生药经中国中医科学院广安门医院王丽霞主任药师鉴定, 符合 2015 年版《中国药典》规定, 各生药称重后加水没过药材表面, 浸泡 40 min, 先后煎煮 2 次, 过滤, 浓缩, 水煎剂由广安门医院煎药室制备。

1.4 试剂 DMEM, RPMI 1640 细胞培养基, 胎牛血清, 胰蛋白酶, 100 \times 青霉素链霉素溶液 (美国 Gibco 公司, 批号分别为 11995065, 31800022, 10099141, 15050065, 15140122); matrigel 胶 (美国 BD 公司, 批号 354230); 细胞增殖与检测方法试剂盒 (CCK-8, 日本 Dojindo 公司, 批号 CK04); CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell isolation Kit (德国 Miltenyi 公司, 批号 130-091-041); RBC Lysis buffer (美国 Biolegend 公司, 批号 420301); 抗 VEGF 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司, 批号 ab46154)。

1.5 仪器 Model 680 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); Observer. D1 型显微镜 (德国 Zeiss 公司);

5417R 型离心机(德国 Eppendorf 公司); MILi-Qso 型超纯水仪(美国 Millipore 公司); Heraguard ECO 1300 SERIES A2 型超净工作台, BBD6220 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 卵巢癌细胞 ID-8 与 HUVECs 细胞株复苏、培养、传代及冻存 ID-8, HUVECs 细胞用 DMEM 与 RPMI 1640 细胞培养基, 在 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞融合度达到 80% ~ 90% 时进行传代, 传代方法参照文献[11]。用 90% 培养基 + 10% 二甲基亚砜(DMSO)配置冻存液, 将离心后的细胞分装至冻存管中, 置于 -80 °C 冷冻过夜后于液氮罐中长期保存备用。

2.2 益气活血解毒方含药鼠血清制备 将 BALB/C 小鼠 20 只编号、称重后, 随机分为中药组和空白组, 每组 10 只。中药组小鼠灌服益气活血解毒方, 灌胃所需剂量参考等效剂量公式计算, 小鼠剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) = 人临床常规药量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) \times 15, 人体重按照 70 kg 计算, 小鼠灌胃剂量即为 20 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 次, 约 0.4 g/次/只, 空白组小鼠每日对应灌服等量的去离子水, 两组小鼠皆灌胃 3 日, 每日 2 次。第 3 日第 2 次灌胃 1 h 后, 于小鼠眼眶静脉丛取血。将取出血液常温静置 2 h, 4 °C, 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min。取上清液, 将两组上清液分别混合均匀, 后于 56 °C 水浴箱中水浴灭活 30 min, 后以微孔滤膜以过滤除菌(22 μm)。将滤过液装于 4 mL 离心管内, 放置于 -80 °C 冰箱备用。

2.3 CCK-8 法测定益气活血解毒方抑制 ID-8 细胞的作用 将 ID-8 细胞接种于 96 孔板中(200 μL /孔, 细胞密度 1.5×10^4 个/mL)。置于 5% CO₂ 培养箱内 37 °C 连续培养 24 h, 替换原始培养基为以下 6 种不同血清培养基: 10% 胎牛血清, 20% 胎牛血清, 10% 空白血清, 20% 空白血清, 10% 含药血清, 20% 含药血清, 每组添加培养基 250 μL , 各组均连续培养 0, 24, 48, 72, 96 h。到达相应时间点时, 移除 96 孔板当中各组的培养基, 代之以含 CCK-8 溶液的培养基(CCK-8 100 μL /孔), 继续培养。3 h 后于酶标仪 450 nm 处测定各孔的吸光度 A , 并计算各组细胞的抑制率, 抑制率 = $(1 - A_{\text{含药血清}}/A_{\text{空白血清}}) \times 100\%$ 。

2.4 Tregs 细胞分选及细胞共培养 取 8 只 BALB/C 小鼠, 于小鼠眼后眶静脉丛采血, 置于抗凝管中, 参考 RBC Lysis buffer 说明书, 裂红血细胞并去除红细胞, 获得 3.8×10^7 个细胞。运用 CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell isolation Kit 洗脱 CD4⁺ CD25⁺ 细胞,

获得细胞 2×10^5 个。离心去培养基后将细胞分为 4 份, Tregs 细胞密度约为 0.5×10^5 个/mL, 悬浮于 10% 血清培养基 1 mL 中, 并接种于 24 孔板。分为以下 8 组进行细胞共培养并做好标记: A 组, 空白血清培养基; B 组, 空白血清培养基 + 抗 VEGF 抗体; C 组, 含药血清培养基; D 组, 含药血清培养基 + 抗 VEGF 抗体; E 组, 空白血清培养基 + Tregs 细胞; F 组, 空白血清培养基 + 抗 VEGF 抗体 + Tregs 细胞; G 组, 含药血清培养基 + Tregs 细胞; H 组, 含药血清培养基 + 抗 VEGF 抗体 + Tregs 细胞。其中抗 VEGF 抗体(+)组中添加抗 VEGF 抗体(1:50)20 μL 。8 组细胞均连续培养 24 h, 24 h 后小心收集各组细胞上清, 置于 -80 °C 冰箱中冻存。

2.5 小管形成检测 首先将 matrigel 胶置于 4 °C 冰箱内 8 ~ 12 h 解冻; 将 96 孔细胞板置于 -20 °C 冰箱预冷。将解冻后的 matrigel 胶 80 μL 加入到细胞板并铺匀, 后将其置于培养箱在 37 °C 条件下培养约 1 h。使用 1640 培养基(10% FBS)培养 HUVECs 细胞系, 并于实验前使用无血清 1640 培养基培养 HUVECs, 对其进行饥饿培养, 用胰酶消化, 先后用 10% FBS 和无血清 1640 培养基各自洗涤 1 次 HUVECs。用 2.4 项下 8 组细胞上清液分别悬浮洗涤后的细胞, 细胞悬浮液密度 2×10^5 个/mL。后取悬浮细胞接种于上述处理过的 matrigel 胶中, 约每组 100 μL , 做好标记后分别置于 37 °C 培养箱培养, 约 6 h 后, 观察到空白组 HUVEC 细胞成网明显, 取出, 于显微镜下拍照并记录。

2.6 统计学分析 使用 SPSS 22.0 统计软件, 计量结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 样本均数间差异以 t 检验分析, 组间比较以单因素方差进行分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 益气活血解毒方对于 ID-8 细胞增殖抑制的影响 在培养 96 h 时, 10%, 20% 含药血清组对 ID-8 细胞的抑制作用均最为显著, 抑制率分别为 14.82%, 15.66%; 在培养 72, 96 h 时, 与 10% 含药血清组相比, 20% 含药血清组对 ID-8 细胞增殖的抑制作用明显($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

3.2 益气活血解毒方对细胞小管形成的影响 与 Tregs(-)分组(A, B, C, D 组)比较, Tregs(+)各组(E, F, G, H 组)HUVEC 细胞表现出较好的运动、分化能力。其中, A, E 组中 HUVEC 细胞成网很明显, 甚至可见类似于毛细血管的完整闭合管腔的形成, 与抗 VEGF 抗体(B, F 组)或含药血清(C, G 组)共培养

表 1 益气活血解毒方对 ID-8 细胞株的抑制作用

Table 1 Anti-proliferation effect of Yiqi Huoxue Jiedu decoction on ID-8 cells

组别	0 h		24 h		48 h	
	$A(\bar{x} \pm s, n=3)$	抑制率/%	$A(\bar{x} \pm s, n=3)$	抑制率/%	$A(\bar{x} \pm s, n=3)$	抑制率/%
10% 空白鼠血清	0.125 ± 0.008		0.213 ± 0.006		0.400 ± 0.011	
10% 含药鼠血清	0.123 ± 0.012	-	0.210 ± 0.013	1.43	0.393 ± 0.007	1.78
20% 空白鼠血清	0.130 ± 0.015		0.218 ± 0.011		0.382 ± 0.017	
20% 含药鼠血清	0.128 ± 0.009	-	0.210 ± 0.005	3.81	0.351 ± 0.016	8.83
组别	72 h		96 h			
	$A(\bar{x} \pm s, n=3)$	抑制率/%	$A(\bar{x} \pm s, n=3)$	抑制率/%		
10% 空白鼠血清	0.805 ± 0.015		1.627 ± 0.063			
10% 含药鼠血清	0.772 ± 0.007	4.27	1.417 ± 0.008	14.82		
20% 空白鼠血清	0.746 ± 0.018		1.315 ± 0.010			
20% 含药鼠血清	0.674 ± 0.021	10.68 ²⁾	1.137 ± 0.063	15.66 ¹⁾		

注:与 10% 含药血清组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

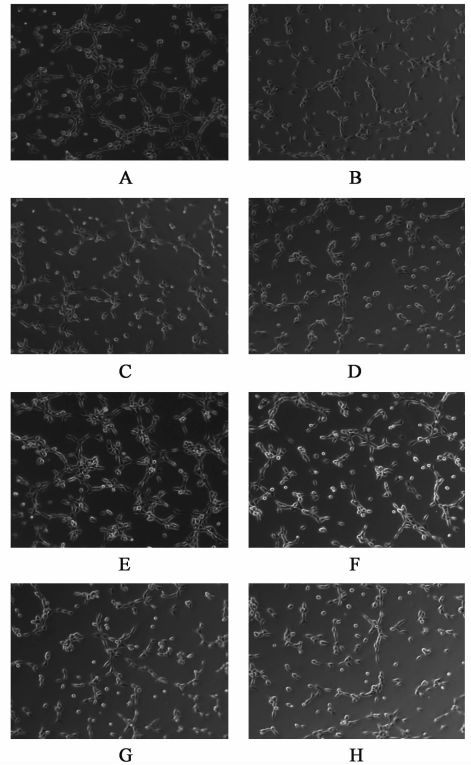
的 HUVEC 细胞的管腔结构则遭到破坏,镜下呈现不完整的、稀疏的网状结构。中药 + 抗 VEGF 组(D, H 组)二者联合时,在镜下视野内几乎没有完整的闭管腔形成, HUVEC 成团聚集,完整管腔结构分别较 A, E 组显著减少。见图 1。

4 讨论

卵巢癌的死亡率在女性恶性肿瘤当中为第 1 位,由于其发病早期症状不明显,同时尚没有特异的早期筛查以及诊断手段,因而在确诊卵巢癌的患者当中,约 70% 的已经为中晚期。卵巢恶性肿瘤目前的标准治疗手段为肿瘤细胞减灭术结合化疗(紫杉 + 铂类),随着过去几年化疗药物研发与应用的突飞猛进,卵巢癌的复发率仍居高不下,维持在 55% ~ 75%^[12]。

恶性肿瘤的进展与肿瘤微环境中新生血管的形成紧密相关,可以说,肿瘤的新生血管是其浸润周围组织和远端转移的必要因素之一。在欧洲,拮抗 VEGF 的抗体贝伐珠单抗联合化疗药使用,已经成为卵巢癌肿瘤细胞减灭术后一线辅助治疗^[13]。研究表明, Tregs 细胞除了能够在卵巢癌肿瘤免疫微环境中发挥免疫抑制以及免疫逃逸作用外,还能够促进肿瘤血管的生成,进而推动肿瘤的发生发展^[3]。因此,研究如何减少 Tregs 细胞数量,拮抗 Tregs 细胞功能,同时延缓并阻止肿瘤新生血管的形成是目前肿瘤治疗研究的核心问题。

大量研究表明,卵巢癌的进展与免疫抑制状态及新生血管生成的关系密不可分,这其中的关键因子即 Tregs 细胞。Tregs 细胞广泛存在于卵巢恶性肿瘤组织当中,组成了卵巢癌肿瘤复杂免疫微环境中重要的



A. 空白组; B. 抗 VEGF 组; C. 含药血清组; D. 抗 VEGF + 含药血清组; E. Tregs 组; F. Tregs + 抗 VEGF 组; G. Tregs + 含药血清组; H. Tregs + 抗 VEGF + 含药血清组

图 1 益气活血解毒方对 HUVEC 细胞血管生成的影响(倒置显微镜, ×200)

Fig. 1 Effect of Yiqi Huoxue Jiedu decoction on angiogenesis of HUVECs (inverted microscope, ×200)

免疫抑制因素,能分泌 TGF- β , IL-10 等抑制性的细胞因子,进而干扰细胞正常的代谢过程,破坏靶细胞结构,同时能够干预 T 细胞正常的活化过程,进而能够

促进肿瘤免疫微环境中发生免疫抑制及免疫逃逸^[14-15]。

此外, Tregs 细胞与卵巢癌的新生血管生成也有紧密的关系。无论在稳定情况下还是缺氧状态下, Tregs 细胞都能够分泌大量的 VEGF, 从而直接促进肿瘤血管生成; 此外, 当肿瘤微环境中处于缺氧状态时, 趋化因子 CCL28 表达会上调, 使 Tregs 细胞加速聚集于卵巢肿瘤组织中, 进而上调 VEGF 的表达。除了直接促进血管生成, Tregs 细胞还能够通过影响抑制血管生成的相关因子释放, 如肿瘤坏死因子(TNF)- α , 趋化因子 CXCL9, 10, 11, 干扰素(IFN)- γ 等细胞因子, 从而使 VEGF 表达上调, 间接促进肿瘤新生血管形成。而当 Tregs 细胞数量减少或被清除后, VEGF 的表达水平以及新生血管则呈现显著抑制状态^[4-5, 16]。

本血管生成实验结果提示, 益气活血解毒方能够发挥与抗 VEGF 抗体类似的作用, 抑制 HUVEC 细胞的血管生成。Tregs(+) 各组与 Tregs(-) 各组相比, 血管成网普遍明显, 从侧面提示 Tregs 细胞能够促进血管生成。Tregs(+) 各组中添加中药含药血清以及抗 VEGF 抗体后, 呈现不同程度血管结构疏松破坏, 提示益气活血解毒方发挥抗血管疗效可能是与拮抗 Tregs 细胞的作用相关。

前期实验研究提示, 益气活血解毒方能够降低来源于 Tregs 细胞的免疫抑制因子 TGF- β_1 和 IL-10 的表达水平, 故推测本方临床发挥抗癌疗效的机制, 可能是通过调节 Tregs 细胞相关的免疫抑制作用并干预其促进免疫逃逸的功能来实现的。本实验研究发现益气活血解毒方能够抑制小鼠卵巢癌 ID-8 细胞株的增殖, 同时能够抑制新生血管的生成, 而这一过程可能是与干预了 Tregs 细胞的功相关, 这为本方发挥临床疗效提供了第 2 种可能。

近代名医张锡纯在其《医学衷中参西录·治女科方》中记载了治疗妇人癥瘕的名方“理冲汤”, 由黄芪、白术、天花粉、知母、党参、山药、三棱、莪术、鸡内金组成, 共奏益气活血, 调经祛瘀的功效, 被广泛用来治疗妇女月经量少, 血虚经闭, 血瘀恶露, 以及脏腑癥瘕积聚等。益气活血解毒方以理冲汤为基础, 结合治疗妇科恶性肿瘤的临床经验, 加枸杞子、青皮、海藻、全蝎、白花蛇舌草等加减化裁而来, 共奏消补兼施, 扶正祛瘀之功效, 是用于治疗气虚血瘀型卵巢癌的有效验方。

中医病名中并没有卵巢癌的确切记述, 应归于“癥瘕积聚”的范畴。晚期卵巢癌患者正虚邪实, 气

虚血瘀, 加之现代患者在接受肿瘤细胞减灭手术以及化疗等剧烈疗法后, 正气甚为亏耗, 气虚益加无力鼓动血行, 因此血行不畅, 日久瘀毒内生。所以根据晚期卵巢癌上述病机特点, 辨病分析结合辨证分析, 同时结合卵巢恶性肿瘤病久易入络, 入络日久易化热化火, 从而津伤气耗的病机特点, 在原方的基础上添加全蝎等虫类药物, 以加强活血化瘀、通络散结的功效, 同时辅以清化之品, 如白花蛇舌草、青蒿等, 用以清热解毒、滋阴生津。从而使全方诸药共奏益气活血、解毒散结的功效。

从中医角度解释本方发挥疗效的可能机制, 人体免疫系统相当于是“正气”的最重要组成部分, 而肿瘤发生发展过程中呈现的免疫抑制状态则相当于中医所谓的“正气亏损”, 所以肿瘤免疫疗法的本质即相当于“益气扶正”, 益气活血解毒方当中包含黄芪、白术、山药、枸杞子, 能够补益正气, 现代药理研究也证实这些中药能够改善机体免疫抑制状态, 提升免疫力。此外, 乏氧环境促进肿瘤新生血管形成, 进而促进肿瘤进展, 而益气活血解毒方中含有的三棱、莪术、全蝎等药物, 能够活血化瘀、消癥散结, 此类活血化瘀中药能够促进血液流通, 改善肿瘤微环境中的乏氧状态, 从而抑制血管内皮细胞增生, 进而抑制新生血管的形成。

综上所述, 结合前期研究与本研究, 推断益气活血解毒方的临床抗肿瘤疗效是通过其抑制血管生成过程发挥作用的, 而这种拮抗作用可能与其干预 Tregs 细胞抑制免疫系统以及促进免疫逃逸的过程相关。本方发挥抑制血管的作用, 是否是通过 HUVEC 细胞生成血管相关蛋白以及 Tregs 相关细胞因子的表达产生的影响, 以及本方中的具体有效成分及作用位点有哪些, 则需要进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Tiwari R C, Murray T, et al. Cancer statistics, 2004 [J]. CA: Cancer J Clin, 2004, 54(1): 8-29.
- [2] Baldwin L A, HUANG B, Miller R W, et al. Ten-year relative survival for epithelial ovarian cancer [J]. Obstet Gynecol, 2012, 120(3): 612-617.
- [3] Facciabene A, Motz G T, Coukos G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis [J]. Cancer Res, 2012, 72(9): 2162-2168.
- [4] Scarlett U K, Conejo-Garcia J R. Modulating the tumor immune microenvironment as an ovarian cancer treatment strategy [J]. Expert Rev Obstet Gynecol, 2012, 7(5): 413-419.

- [5] Facciabene A, Santoro S, Coukos G. Know the enemy: why are tumor-infiltrating regulatory T cells so deleterious? [J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1 (4): 575-577.
- [6] Curiel T J, Coukos G, ZOU L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival [J]. *Nat Med*, 2004, 10(9):942-949.
- [7] Kryczek I, WEI S, ZHU G, et al. Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma [J]. *Can Res*, 2007, 67 (18): 8900-8908.
- [8] 夏恺, 闫会苓, 卢雯平. 益气活血解毒方对晚期卵巢癌患者无复发生存时间及生活质量的影响 [J]. *中国医药*, 2014, 9(2):244-246.
- [9] 闫会苓, 马丹, 卢雯平. 益气活血解毒方对晚期卵巢癌患者免疫调节的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2016, 23(1):27-30.
- [10] 卢雯平, 李向英, 李晓, 等. 益气活血解毒中药联合树突状细胞疫苗对荷瘤小鼠免疫抑制的调控 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2013, 20(3):46-48.
- [11] 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术 [M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997:295-451.
- [12] Haldar K, Gaitskell K, Bryant A, et al. Epidermal growth factor receptor blockers for the treatment of ovarian cancer [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2011, 5 (10): CD007927.
- [13] 俞弋, 徐丛剑. 卵巢癌靶向治疗的研究进展 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2012, 39(2):152-157.
- [14] Ianni M D, Papa B D, Cexxhini D, et al. Immunomagnetic isolation of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ natural T regulatory lymphocytes for clinical applications [J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 156(2):246-253.
- [15] Kandalaf L E, Motz G T, Duraiswamy J, et al. Tumor immune surveillance and ovarian cancer: lessons on immune mediated tumor rejection or tolerance [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2011, 30(1):141-151.
- [16] Lavoue V, Thedrez A, Leveque J, et al. Immunity of human epithelial ovarian carcinoma: the paradigm of immune suppression in cancer [J]. *J Transl Med*, 2013, 11(1):147-152.

[责任编辑 张丰丰]