

鳖甲煎丸对肝癌荷瘤小鼠肿瘤组织生长及转移的影响

罗庆东^{1,2}, 王月飞¹, 赵红晔¹, 王滨¹, 姜德友^{2*}

(1. 齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

2. 黑龙江中医药大学基础医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 150040)

[摘要] 目的: 观察中药鳖甲煎丸对肝癌荷瘤小鼠肿瘤组织生长及转移的影响。方法: 小鼠肝癌荷瘤小鼠分为模型组、环磷酰胺组(0.02 g·kg⁻¹)和鳖甲煎丸高、中、低剂量组(3.699, 1.233, 0.411 g·kg⁻¹), 连续 ig 15 d 后断颈椎处死小鼠, 钝性分离肿瘤组织, 多聚甲醛固定, 应用免疫组化法检测血管内皮细胞生长因子(VEGF)及其受体 Flt-1 的表达。采用 MIAS 医学图像分析系统计算 VEGF, Flt-1 平均阳性面积百分率及计算每 100 个肿瘤细胞中的阳性细胞数。结果: VEGF 阳性面积鳖甲煎丸高、中、低剂量为(2.28 ± 0.53)%, (2.76 ± 0.56)%, (3.26 ± 0.46)%, 模型组为(6.20 ± 0.78)%, VEGF 阳性细胞数鳖甲煎丸高、中、低剂量为(29.12 ± 1.53), (30.95 ± 1.02), (32.64 ± 2.08)个, Flt-1 阳性面积鳖甲煎丸高、中、低剂量为(1.35 ± 0.78)%, (1.96 ± 0.36)%, (2.78 ± 0.73)%, 模型组为(5.20 ± 0.48)%, Flt-1 阳性细胞数鳖甲煎丸高、中、低为(19.45 ± 1.03), (21.85 ± 1.82), (22.78 ± 1.18)个, 模型组为(27.38 ± 1.23)个, 鳖甲煎丸高、中、低剂量组 VEGF, Flt-1 染色强度较模型组明显下降(P < 0.01)。结论: 鳖甲煎丸可能通过抑制肿瘤组织中 VEGF 的高表达及下调其受体 Flt-1 的表达抑制肝癌的侵袭和转移。

[关键词] 鳖甲煎丸; 血管内皮生长因子; Flt-1; 肝癌

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0230-03

医圣张仲景所创的鳖甲煎丸具有寒热并用、攻补兼施、行气化瘀、软坚散结之功效。原方用治疟病日久而成的“疟母”、“癥瘕”病症。该方自汉代以来, 除用于治疗因疟疾等各种原因引起的肝脾大、肝硬化等症外, 也广泛应用于肝纤维化、肝癌、胃癌及卵巢囊肿等疾病。近年来肝癌与血管相关性研究已成为热点课题。许多研究表明, 肿瘤的生长和转移依赖于新的血管生成, 肿瘤的血管生成特性与其侵袭性关系密切。本实验采用 H22 小鼠肝癌细胞皮下移植法建立荷瘤小鼠模型, 观察不同剂量鳖甲煎丸混悬液对 H22 肝癌肿瘤组织血管内皮细胞生长因子(VEGF)及其受体 Flt-1 表达的影响, 观察鳖甲煎丸对肝癌的侵袭和转移的影响, 探讨其抗肝癌的可能机制, 为其临床推广和应用提供科学依据。

1 材料

1.1 药物 鳖甲煎丸, 武汉中联药业集团股份有限

公司, 批号 020602; 环磷酰胺片, 天津金世制药有限公司, 批号 10071121。

1.2 动物及瘤株 昆明种小鼠, 雄性, 18 ~ 22 g, 大连医科大学实验动物中心, 合格证号 SCXK(辽)2008-0002, 质量合格证号 0001120。H22 小鼠肝癌细胞株, 购于北京北纳创联生物技术研究院。

1.3 试剂 VEGF 和 Flt-1 免疫组化 SABC 试剂盒均为武汉博士德生物工程有限公司产品, 批号 06L16BJ。

1.4 仪器 IMT-2 倒置显微镜(Olympus 公司), 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司), CO₂ 培养箱(Thermo Electron Corporation), Motic B5 显微镜摄像系统(台湾麦克奥迪实业公司)。

2 方法

2.1 鳖甲煎丸药液的制备^[1] 根据人用药量, 结合转换公式计算小鼠的用量。含鳖甲煎丸制剂量 1.233 g·kg⁻¹(等效剂量)作为中剂量组, 含鳖甲煎丸制剂量 3.699, 0.411 g·kg⁻¹分别作为鳖甲煎丸高、低剂量组。用超纯水分别配制成不同质量浓度的悬浊液(0.12, 0.37, 0.04 g·mL⁻¹), 置于 4 °C 冰箱, 用时震荡混匀。

2.2 分组 将 50 只小鼠称重, 按照体重进行蛇形分组, 分成 5 组, 分别为: 模型组、阳性药环磷酰胺组、鳖甲煎丸高、中、低剂量组, 每组 10 只。

2.3 肿瘤造模 H22 小鼠肝癌细胞接种于小鼠腹

[收稿日期] 20120328(266)

[基金项目] 黑龙江省教育厅 2012 年度科学技术研究(面上)项目(12521648)

[第一作者] 罗庆东, 主任医师, 从事经方治疗疑难杂病的临床与基础研究, Tel: 0452-2663855, E-mail: 326487704@qq.com

[通讯作者] *姜德友, 教授, 博士, 从事经方治疗疑难杂病的临床与基础研究, Tel: 0451-82193627, E-mail: jiangdeyou@hljucm.net

腔,10 d后断颈椎处死小鼠,无菌抽取腹水,用生理盐水溶液 1:1 稀释,经台盼蓝染色后计算活细胞数应 >95%,调肿瘤细胞密度为 1.5×10^7 个/mL,每只小鼠右腋窝 sc 0.2 mL。24 h 后用药。

2.4 给药 鳖甲煎丸高、中和低剂量组分别 0.2 mL/只 ig,模型组以同容量蒸馏水 ig,环磷酰胺组 0.02 g·kg⁻¹,每天 0.2 mL/只 ip。连续 15 d。

2.5 取材及处理 末次药后 24 h,急性断颈椎处死小鼠,钝性分离肿瘤组织且用滤纸吸干后,多聚甲醛固定、常规制片后备测 VEGF 及其受体 Flt-1 的表达。

2.6 免疫组化 SABC 法检测 VEGF 及其受体 Flt-1 的表达 按试剂盒说明书操作。以细胞胞浆内出现棕黄色颗粒为阳性。200 倍光镜下每张切片随机选取 5 个视野,采用 MIAS 医学图像分析系统计算平均阳性面积百分率^[2]。阳性面积百分率是指阳性目标面积占统计场面积的百分率。同时计算每个高倍镜视野 100 个肿瘤细胞中的阳性细胞数,取其平均值作为 VEGF 及其受体 Flt-1 的阳性细胞数。结果综合阳性面积百分率及阳性细胞数两方面进行分析。

2.7 统计学分析 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对肿瘤组织 VEGF 的影响 VEGF 蛋白主要表达于各组肿瘤细胞的胞浆中,其次是在胞膜也有表达,染色呈浅黄色或棕褐色,小片状或弥漫性分布。鳖甲煎丸高、中、低剂量组 VEGF 蛋白表达较模型组下降 ($P < 0.01$),见表 1。

表 1 鳖甲煎丸对肿瘤组织 VEGF 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	阳性面积/%	阳性细胞数/个
模型	-	6.20 ± 0.78	36.78 ± 1.45
环磷酰胺	0.020	3.64 ± 0.76 ¹⁾	29.57 ± 2.13 ¹⁾
鳖甲煎丸	3.699	2.28 ± 0.53 ¹⁾	29.12 ± 1.53 ¹⁾
	1.233	2.76 ± 0.56 ¹⁾	30.95 ± 1.02 ¹⁾
	0.411	3.26 ± 0.46 ¹⁾	32.64 ± 2.08 ¹⁾

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对肿瘤组织 VEGF 受体 Flt-1 的影响 Flt-1 蛋白主要表达于毛细血管内皮细胞及肿瘤细胞的胞浆,在少数肿瘤细胞膜上也有表达,阳性细胞内含有棕黄或棕褐色颗粒。鳖甲煎丸高、中、低剂量组 Flt-1 蛋白表达较模型组明显下降 ($P < 0.01$),见表 2。

表 2 鳖甲煎丸对肿瘤组织 VEGF 受体 Flt-1 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	阳性面积/%	阳性细胞数/个
模型	-	5.20 ± 0.48	27.38 ± 1.23
环磷酰胺	0.020	2.94 ± 0.45 ¹⁾	22.57 ± 1.13 ¹⁾
鳖甲煎丸	3.699	1.35 ± 0.78 ¹⁾	19.45 ± 1.03 ¹⁾
	1.233	1.96 ± 0.36 ¹⁾	21.85 ± 1.82 ¹⁾
	0.411	2.78 ± 0.73 ¹⁾	22.78 ± 1.18 ¹⁾

4 讨论

医圣张仲景所创的经方鳖甲煎丸是经典的治疗肝癌药品,临床应用广泛。有实验研究表明鳖甲煎丸具有抑制肿瘤的作用^[3],但是其对肝癌转移的抑制作用及机制相关报道不多。恶性肿瘤的生长、侵袭及转移过程受到多种因素影响,其中肿瘤诱导的血管生成反应与其生物学行为关系密切。VEGF 在肿瘤生成和转移中有两方面的作用:其一,诱导血管生成^[4-5],促进癌细胞转移;另一方面抑制树突状细胞的成熟,降低机体对癌细胞有效的免疫应答^[6-7]。VEGF 的高表达预示肿瘤转移风险增高和预后差^[8-9]。VEGF 可以通过与其受体 Flt-1 结合发挥促血管内皮生长和迁移作用,从而促进肿瘤的生长和转移。

本实验研究发现,鳖甲煎丸可显著抑制 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织 VEGF 及其受体 Flt-1 的表达 ($P < 0.01$)。鳖甲煎丸通过抑制 VEGF 和 Flt-1 在肝癌组织中的共同高表达,抑制肿瘤组织周围血管新生^[10-11],减少肿瘤细胞营养供给,抑制血管内皮细胞迁移,降低血管的通透性^[12],减少血浆内蛋白原等物质外渗,增加血管的屏障作用,抑制了肿瘤的侵袭和转移。因此,鳖甲煎丸可能是通过抑制肿瘤组织中 VEGF 的高表达及下调其受体 Flt-1 的表达来抑制肝癌的侵袭和转移。

[参考文献]

[1] 王北婴,李仪奎.中药新药研制开发技术与方法[M].上海:上海科学技术出版社,2001:789.
 [2] 何俊堂,刘海峰,房殿春,等.慢传输型便秘大鼠结肠肌间神经丛内 VIP 能神经、SP 能神经的免疫组化研究[J].消化外科,2004,3(2):122.
 [3] 张绪慧,陈达理,罗荣城.鳖甲煎丸对荷瘤小鼠抑瘤作用及其对胸腺、脾指数影响的实验研究[J].江苏中医药,2006,27(9):72.
 [4] Qu Y, Zhang S, Xu X, et al. Octreotide inhibits choroidal neovascularization in rats [J]. Ophthalmic Res,2009,42(1):36.

柿叶黄酮对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

王明贤^{1*}, 胡思进²

(1. 乐山职业技术学院, 四川 乐山 614000; 2. 广州中医药大学药学院 2010 级博士生, 广州 510120)

[摘要] 目的: 研究柿叶黄酮 (FLDK) 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。方法: 采用酶抑制剂筛选模型观察柿叶黄酮 0.25 ~ 8.0 mg·mL⁻¹ 对大鼠小肠 α -葡萄糖苷酶的作用, 用人类结肠癌细胞株 (Caco-2) 细胞筛选模型观察柿叶黄酮 0.1 mg·mL⁻¹ 对麦芽糖酶、蔗糖酶的作用。结果: 在酶抑制剂筛选模型体外实验中, FLDK 对蔗糖酶、麦芽糖酶、乳糖酶活性的抑制作用呈浓度依赖性, 当质量浓度达 8.0 mg·L⁻¹ 时, 其对蔗糖酶、麦芽糖酶、乳糖酶的抑制作用均超过 70%。在人类结肠 Caco-2 细胞中, FLDK 对蔗糖酶、麦芽糖酶的抑制作用均超过 75%。结论: FLDK 对 α -葡萄糖苷酶有较好的抑制作用, 可用于防治糖尿病。

[关键词] 柿叶黄酮; α -葡萄糖苷酶; 血糖; 糖尿病

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0232-03

柿叶为柿 *Diospyros kaki* L f 的干燥叶。柿叶含有黄酮类、生物碱、挥发油、鞣质、酚类、香素、三萜类、多糖、有机酸、 β -胡萝卜素、维生素 C 等多种成分^[1]。其中主要成分是柿叶黄酮 (flavone from leaves of *Disopyros kaki*, FLDK)。研究表明柿叶醇提取物^[2]、水提取物^[3]、柿叶黄酮^[4]、柿叶多糖^[5]均有较强的降糖作用。

α -葡萄糖苷酶抑制剂 (α -GI) 能与小肠中的 α -葡萄糖苷酶的中心活性部位结合, 阻抑酶活性的发挥, 阻滞双糖水解为单糖, 吸收时间后延, 从而对降低餐后高血糖起到有益的作用^[6]。第三类降糖药

α -GI 常作为降低餐后血糖的一线药物^[7]。从天然产物中筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂日益受到重视^[8]。本实验研究 FLDK 对 α -葡萄糖苷酶活性影响, 旨在进一步探讨柿叶的降糖作用机制。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体重 180 ~ 220 g, 购自四川省医科院实验动物研究所, 合格证号 SCXK(川)2004-16。动物自由摄食和饮水, 动物室温度 21 ~ 23 °C, 相对湿度 50% ~ 55%。每天给予 12 h 光照和 12 h 黑暗的人工照明环境。

1.2 细胞系及培养条件 人类结肠癌细胞系 (Caco-2) (中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心), 用含 10% 的胎牛血清和双抗 (青霉素和链霉素 100 U·mL⁻¹) 的 DMEM 培养液于 37 °C, 5% CO₂ 条件下贴壁培养。在细胞长至对数增长期时,

[收稿日期] 20120305(215)

[通讯作者] * 王明贤, 副教授, 从事天然药物与生物化学研究, Tel: 1389064542, E-mail: 1347386821@qq.com

[5] 郑志, 陈海冰, 许迅, 等. ACEI 对糖尿病大鼠视网膜 VEGF 表达的作用 [J]. 眼科研究, 2008, 26(4): 270.
[6] LI H, DU Y M, GUO L, et al. The role of hERG1 K⁺ channels and a functional link between hERG1 K⁺ channels and SDF-1 in acute leukemic cell migration [J]. Exp Cell Res, 2009, 315(13): 2256.
[7] LI H, GUO L, JIE S, et al. Berberine inhibits SDF-1-induced AML cells and leukemic stem cells migration via regulation of SDF-1 level in bone marrow stromal cells [J]. Biomed Pharmacother, 2008, 62(9): 573.
[8] Liang J F, Wang H K, Xiao H, et al. Relationship and prognostic significance of SPARC and VEGF protein expression in colon cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29(1): 71.
[9] 顾宇, 陆枫林. 血管内皮生长因子在肝癌中的作用

[J]. 现代医学, 2009, 37(5): 386.

[10] Su L, Xu X, Zhao H, et al. *In vitro* and *in vivo* antiangiogenic activity of a novel decapeptide derived from human tissue-type plasminogen activator kringle 2 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396(4): 1012.
[11] Xu Y, Zhao H, Zheng Y, et al. A novel antiangiogenic peptide derived from hepatocyte growth factor inhibits neovascularization *in vitro* and *in vivo* [J]. Mol Vis, 2010, 16: 1982.
[12] Ciulla T A, Rosenfeld P J. Anti-vascular endothelial growth fact therapy for neovascular ocular diseases other than age-related macular degeneration [J]. Curr Opin Ophthalmol, 2009, 20(3): 166.

[责任编辑 何伟]