

罗勒胶囊对大鼠移植性肝癌经肝动脉化疗栓塞术后骨桥蛋白和诱导性一氧化氮合酶表达的影响

冯兵^{1,2}, 贺嵩敏^{1,2}, 郑广娟^{1,2*}, 刘福利³

(1. 广东省中医院, 广州 510120; 2. 广东省中医药科学院, 广州 510006;
3. 山东省立医院, 济南 250355)

[摘要] **目的:** 观察罗勒胶囊对大鼠移植性肝癌经肝动脉化疗栓塞术(TACE)后细胞中骨桥蛋白(OPN)和诱导性一氧化氮合酶(iNOS)表达的影响, 探讨罗勒胶囊对肝肿瘤乏氧微环境的影响及意义。**方法:** 建立大鼠移植性肝癌模型, 10 d后将造模成功的大鼠随机分为5组。对TACE+生理盐水组和TACE+罗勒胶囊高、中、低剂量组4组大鼠进行TACE, 并分别给予生理盐水 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 和罗勒胶囊 $300, 150, 75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ig, 对非TACE对照组大鼠只进行开腹操作, 不进行TACE。给药10 d后取出移植性肝癌病理标本, 免疫组化法检测肿瘤组织中OPN和iNOS表达情况。**结果:** 瘤重: 行TACE的4组大鼠与非TACE组比较均明显减轻($P < 0.05$), TACE+罗勒胶囊高剂量组较TACE+生理盐水组显著减轻($P < 0.05$); OPN和iNOS阳性表达率: TACE+生理盐水组与非TACE组比均显著升高($P < 0.01$); TACE+罗勒胶囊高、中剂量组较TACE+生理盐水组显著降低($P < 0.01$); TACE+罗勒胶囊高剂量组较TACE+罗勒胶囊中、低剂量组阳性表达率低($P < 0.01$)。**结论:** 中药罗勒胶囊能改善肝肿瘤局部的乏氧微环境并促进细胞凋亡, 使TACE后肿瘤组织中OPN和iNOS表达降低, 抑制大鼠移植性肝癌TACE术后肿瘤的复发。

[关键词] 罗勒胶囊; 大鼠移植性肝癌; 经肝动脉化疗栓塞术; 骨桥蛋白; 诱导性一氧化氮合酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0154-05

Effect of Basil Capsule on Expression of Osteopontin and Inducible Nitric Oxide Synthase for Transplanted Liver Cancer in Ratafter Transcatheter Arterial Chemoembolization

FENG Bing^{1,2}, HE Song-min^{1,2}, ZHENG Guang-juan^{1,2*}, LIU Fu-li³

(1. Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China;
2. Guangdong Provincial Academy of Chinese Medical Sciences, Guangzhou 510006, China;
3. Shandong Provincial Hospital, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To research the effect of Basil capsule on expression of osteopontin (OPN) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) for transplanted liver cancer in rat after transcatheter arterial chemoembolization (TACE), and to discussion the effect of basil capsule on hypoxia environmental. **Method:** Ten days after transplanted rat liver cancer model established, the successful rats model were randomly divided into five groups: without TACE group (A); TACE + Saline group (B); TACE + high-dose Basil capsule group (C); TACE + middose Basil capsule group (D); TACE + low-dose Basil capsule group (E). For B to simulate the heal of TACE

[收稿日期] 20110731(005)

[基金项目] 山东省自然科学基金项目(Y2007C021)

[第一作者] 冯兵, 硕士, 从事中医药防治肿瘤、心血管疾病的药理学研究, Tel:020-39318470, E-mail:bing19831@163.com

[通讯作者] * 郑广娟, 博士, 教授, Tel:020-81887233-38505, E-mail:zhengguangjuan@163.com

and give normal saline $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. For C, D and E to carry out Basil capsules $300, 150, 75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig, A of rats only for abdominal operations, without TACE. Ten days after embolism, the rats were sacrificed and the tumors were taken out and treated with chemoembolization. To demonstrate the expression rate of OPN and iNOS. **Result:** The expression rate of OPN and iNOS on B were higher than A ($P < 0.01$). The expression rate of OPN and iNOS on C and D were lower than B ($P < 0.01$). The expression rate of OPN and iNOS between D and E were higher than C ($P < 0.01$). **Conclusion:** Basil capsule can obviously improve hypoxia environmental in local of rat hepatoma and can depress the expression of OPN and iNOS, can inhibit rat liver transplant tumor recurrence after TACE.

[**Key words**] Basil capsule; transplanted liver cancer in rat; transcatheter arterial chemoembolization; osteopontin; inducible nitric oxide synthase

经导管肝动脉化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)作为肝癌非手术治疗的主要手段之一应用广泛,但 TACE 的治疗不能彻底杀灭肿瘤细胞^[1], TACE 后,仅有 5% 左右病例肿瘤完全坏死,其余 95% 的肿瘤包膜内外均可见存活的癌细胞,残存的癌细胞具有很强的增殖和侵袭能力,研究发现这一现象与肿瘤细胞乏氧^[2]有关。部分中药能改善机体血液循环,增加局部血流量,改善局部乏氧状态,促进细胞凋亡,使抗癌药物易于发挥作用,对放疗、化疗有增效作用^[3-4]。中药罗勒胶囊是从经典的活血化瘀药中发现的抗肿瘤转移新药,正在进行临床研究,罗勒胶囊有效成分为罗勒多糖,通过该药的抗肿瘤基础与临床研究,发现其具有较强的抗血小板及活血化瘀作用,对几种移植瘤转移模型具有抗转移作用。本实验通过对 Wistar 大鼠 TACE 后用中药罗勒胶囊进行治疗,检测肿瘤细胞中骨桥蛋白(OPN)和诱导性一氧化氮合酶(iNOS)表达及相互关系,探讨中药罗勒胶囊对肝肿瘤乏氧微环境的影响及意义。

1 材料

1.1 动物与瘤株 SPF 级 Wistar 大鼠 80 只,雌性,体重(200 ± 30)g,购于山东中医药大学实验动物中心,合格证号 SCXK(鲁)20080015。肿瘤细胞 Walker-256 瘤株购于上海医药工业研究院。

1.2 药物与试剂 罗勒胶囊(Basil capsule)主要成分是罗勒多糖(basil polysaccharide),是以唇形科植物罗勒(*Ocinum basilicum*)中经水提醇沉提取的有效成分,北京四环科宝制药有限公司研发部提供,批号 20080526。超液态碘油(上海华联制药有限公司,批号 200080413)。5-Fu 注射液($0.025 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)(上海旭东海普药业公司生产,批号 070305)。

RabbitAnti-OPN (bs-0026R)、RabbitAnti-iNOS (bs-0955R)(北京博奥森生物技术有限公司生产)。SP-9001 免疫组化试剂盒(批号 K82721E)、DAB 显色试剂盒(批号 375230AJ)(北京中杉金桥生物有限公司生产)。

1.3 仪器 XDS-200D 倒置相差显微镜(日本 Olympus), YP600 电子天平(上海精科天平厂), MODEL5804 台式离心机(德国 Eppendorf), CS101-1DS 电热干燥箱(重庆实验仪器设备厂), LEICA-RM2135 石蜡切片机(德国莱卡), GKC 控温水浴箱(上海苏达实验仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物模型的建立 将 Walker-256 瘤株接种于传代 Wistar 大鼠右后肢内侧皮下,一周后皮下长出肿瘤结节者待用。无菌条件下取出实体瘤,切成 1 mm^3 大小的碎块备用。将 80 只大鼠腹腔麻醉,打开腹腔,暴露肝脏,用眼科镊刺破肝包膜,于肝表面成 30 度角刺入 3~5 mm,形成一隧道,然后将取出的瘤块植入,用小块明胶海绵封堵创口,压迫止血待无持续出血后逐层关腹,消毒手术切口^[5]。术后 10 d 经超声监测选取符合条件的肿瘤长至 1 cm 的 65 只大鼠。

2.2 带瘤大鼠经肝动脉化疗栓塞术(TACE)治疗 将造模成功的 65 只大鼠,随机分为 5 组,每组 13 只:非 TACE 对照组、TACE + 生理盐水组、TACE + 罗勒胶囊高剂量组、TACE + 罗勒胶囊中剂量组、TACE + 罗勒胶囊低剂量组。对 TACE 4 组大鼠进行 TACE,对非 TACE 对照组大鼠只进行开腹操作,不进行 TACE。沿上次手术切口逐层剪开腹腔,在手术显微镜下,用眼科弯镊分离肝总动脉和胃十二指肠动脉,经胃十二指肠动脉将自制的微导管插至肝固

有动脉内,经导管分别注入 5-Fu $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,加超液态碘油 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,术后拔管,结扎胃十二指肠动脉近端,分笼饲养^[6-7]。TACE 成功后,对 TACE + 罗勒胶囊 ($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),TACE + 罗勒胶囊 ($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 组,TACE + 罗勒胶囊 ($75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 组,TACE + 生理盐水组给予 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,非 TACE 组不予用药,均连续 ig 10 d。由于手术过程复杂及感染等原因,部分大鼠死亡。取出移植肿瘤肝叶,剥离肿瘤,称重。免疫组化法检测肿瘤组织中 OPN 和 iNOS 的表达。

2.3 免疫组织化学的检测与判定 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶联结法 (SP) 法进行免疫组化染色,操作步骤按照试剂盒说明进行。光镜下观察并拍照,每组 30 个视野计数表达 OPN 和 iNOS 的瘤细胞数,计算阳性细胞表达百分率。OPN 表达阳性细胞为镜下组织细胞结构清晰,细胞浆(部分细胞核)内有棕黄色颗粒沉着(阳性对照片为结肠癌组织切片)。iNOS 表达产物主要位于细胞浆,染色阳性呈棕褐色(阳性对照片为胃癌组织切片)。

2.4 统计学处理 实验数据采用统计软件包 SPSS 13.0 进行统计分析处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 形态观察 5 组荷瘤大鼠的肝叶均见肿瘤生长,呈圆形,结节状,无包膜,灰白色,鱼肉样,质硬。肿瘤称重,与非 TACE 组比较, TACE 各组瘤重均减轻,有显著性差异 ($P < 0.05$); 各 TACE 组间,

TACE + 罗勒高剂量组与 TACE + 生理盐水组比较有显著性差异 ($P < 0.05$); TACE + 罗勒中、低剂量组与 TACE + 生理盐水组比较,无显著性差异(表 1)。表明罗勒胶囊可以降低 TACE 术后大鼠肝癌瘤重,对术后大鼠移植性肝癌细胞增殖有抑制作用,且与用药剂量有一定关系。

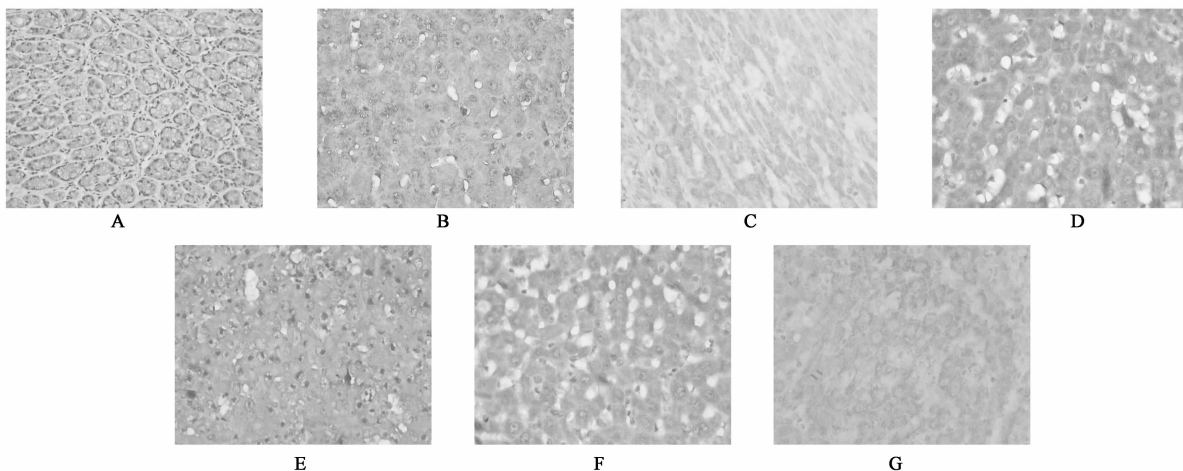
表 1 各实验组大鼠移植性肝癌瘤重 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	瘤重 /g
非 TACE 对照	11	-	3.30 ± 0.88
TACE + 生理盐水	9	-	$2.54 \pm 0.69^{1)}$
TACE + 罗勒	9	300	$1.92 \pm 0.52^{2,3)}$
	10	150	$2.40 \pm 0.63^{1)}$
	9	75	$2.46 \pm 0.74^{1)}$

注:与非 TACE 对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 TACE + 生理盐水组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

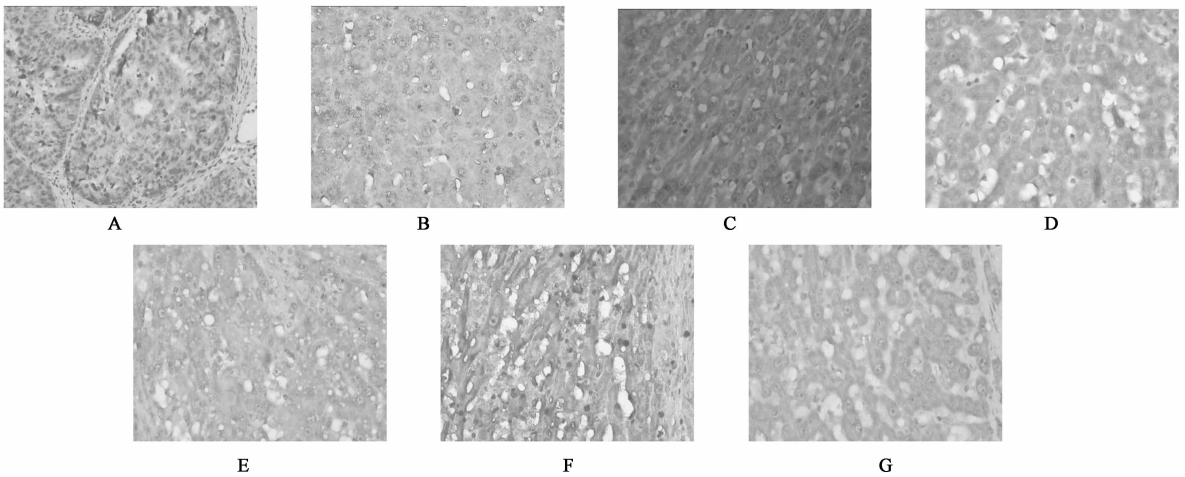
3.2 OPN 和 iNOS 的表达 光镜下观察切片, OPN 表达阳性细胞为镜下组织细胞结构清晰,细胞浆(部分细胞核)内有棕黄色颗粒沉着,染色明显高于背景。各实验组肿瘤组织 OPN 免疫组化表达结果见表 2。

iNOS 基因表达产物主要位于细胞浆,染色阳性呈棕褐色,在瘤内坏死区周围及栓塞后残存癌组织中可见灶状分布的 iNOS 阳性染色细胞,而在瘤周正常肝细胞染色较弱,染色明显高于背景。各实验组肿瘤组织 iNOS 免疫组化表达结果见表 2。见图 1~2。



A. 阳性对照片(结肠癌);B. 阴性对照片;C. 非 TACE 组;D. TACE + 生理盐水组;
E. TACE + 罗勒 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;F. TACE + 罗勒 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;G. TACE + 罗勒 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;(图 2 同)

图 1 免疫组化法检测肝肿瘤组织中 OPN 的表达(免疫组化, $\times 100$)

图2 免疫组化法检测肝肿瘤组织中 iNOS 的表达(免疫组化, $\times 100$)表2 各实验组肿瘤组织 OPN 和 iNOS 免疫组化表达($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	OPN 阳性表达率	iNOS 阳性表达率
非 TACE 对照	11	-	32.43 ± 1.80	41.16 ± 4.13
TACE + 生理盐水	9	-	$59.57 \pm 3.31^{1)}$	$60.95 \pm 4.16^{1)}$
TACE + 罗勒	9	300	$41.47 \pm 2.80^{1,2)}$	$32.56 \pm 4.27^{1,2)}$
	10	150	$47.85 \pm 3.13^{1,2,3)}$	$39.23 \pm 4.02^{2,3)}$
	9	75	$56.58 \pm 2.60^{1,3)}$	$42.32 \pm 3.32^{2,3)}$

注:与非 TACE 对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 TACE + 生理盐水组比较²⁾ $P < 0.01$;与 TACE + 罗勒高剂量组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

4.1 罗勒胶囊明显抑制肿瘤血管新生 肿瘤细胞在缺氧的条件下,可以产生并释放各种促血管生成因子、细胞因子、趋化因子和基质金属蛋白酶等诱导内皮细胞的活化,从而促进毛细血管的新生。新生毛细血管能改善肿瘤细胞的血供,但由于肿瘤细胞无限增殖的特性,新生毛细血管进一步促进肿瘤细胞的增殖,造成新的缺氧,从而使肿瘤的血管生成与肿瘤的生长进入恶性循环之中。肿瘤组织局部的 iNOS 产生一定浓度的 NO 促进肿瘤血管生成,而 NO 促血管生成的作用通路又与血管内皮生长因子(VEGF)有关。VEGF 促进内皮细胞增殖和血管形成需要 NO 的存在,VEGF 是最强的可溶性血管形成因子,能与其受体结合,通过细胞内钙调蛋白和磷酸肌醇途径介导内皮细胞 iNOS 的表达,导致 NO 的产生和释放,NO 则介导细胞内的信号传导,促进内皮细胞分裂、增殖,诱导血管形成。

本实验研究表明罗勒胶囊显著降低肿瘤局部尤其是瘤体周围组织中的 iNOS 的表达,与 TACE + 生理盐水组相比, TACE + 罗勒胶囊组肿瘤组织 iNOS 表达率显著降低($P < 0.01$);在前期研究中发现,经

罗勒胶囊治疗后,在瘤周、瘤内坏死区周围及栓塞后残存癌组织中特别是新生血管周围的 VEGF 的表达亦显著降低($P < 0.05$),这些都表明罗勒胶囊可以通过抑制肿瘤乏氧环境中的血管新生而起到抑制肿瘤侵袭转移的作用。

4.2 罗勒胶囊促进肿瘤细胞凋亡 研究显示,高浓度的 NO 可以将蛋白质、酶类等硝基化或亚硝基化,还可直接使细胞 DNA 硝基化,引起核酸复制、转录和翻译障碍,甚至分子断裂,引起细胞癌发生。另有研究表明:NO 促进肿瘤发生与 p53 蛋白有关。Calmels^[9]等进行的重组野生型 p53 蛋白受 NO 供体影响其构象和 DNA 结合性能改变的体外研究显示,在较高浓度的 NO 供体存在下,出现 p53 构象的改变和特异性的 DNA 结合力下降,表明高浓度 NO 可能通过损伤肿瘤抑制基因而致癌。

本研究结果显示, TACE + 生理盐水组肿瘤组织 iNOS 表达较非 TACE 组明显增高($P < 0.01$),认为可能是由于 TACE 造成缺氧,刺激 iNOS 的表达增加,产的高浓度的 NO 作用于肿瘤抑制基因,引起细胞 DNA 复制、翻译、转录障碍,从而引发细胞发生癌变。罗勒胶囊治疗组明显降低术后 iNOS 的表达率

($P < 0.01$), 以高剂量罗勒胶囊组最明显, 说明罗勒胶囊具有促进肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤增殖的作用。

4.3 罗勒胶囊抑制肝癌的癌周浸润 在缺氧条件下, 糖皮质激素可使 OPN 表达增加, OPN 和肿瘤细胞转移表型密切相关。研究发现, OPN 可以与 CD44, integrin 产生协同作用, 激活肿瘤细胞内的信号传导通路, 促进细胞的运动, 从而影响细胞的黏附、转移、增殖和分化。有学者研究发现, 血浆中 OPN 浓度与肿瘤的预后密切相关, 并且发现与肿瘤的侵袭转移程度呈正相关^[10-11]。

本实验结果显示, 与非 TACE 组比较, TACE + 生理盐水组 OPN 表达显著升高 ($P < 0.01$), 说明在缺氧条件下, OPN 表达增加; 与 TACE + 生理盐水组比较, TACE + 罗勒胶囊高、中剂量组 OPN 表达率显著降低 ($P < 0.01$); HE 染色显示, 罗勒胶囊高剂量组肿瘤周围组织的炎细胞浸润程度较 TACE + 生理盐水组明显减轻, 瘤体质量也较之为减轻。分析实验结果发现, 可能是由于罗勒胶囊改善了肿瘤局部缺氧状态, 使肿瘤局部 OPN 表达降低, 影响了肿瘤细胞的黏附、增殖、分化、转移等因素, 从而抑制了癌细胞局部的浸润。

综上所述, 中药罗勒胶囊通过抑制肝肿瘤血管新生、促进肿瘤细胞凋亡、抑制肝肿瘤细胞的癌周浸润等多个环节抑制 TACE 后肝肿瘤的发生发展。

[参考文献]

[1] 黄洁夫, 李绍强, 梁力建, 等. 肝动脉化疗栓塞在发

性肝癌治疗中的地位和作用[J]. 中华肝胆外科杂志, 2000, 6(1):3.

[2] 董兰兰. 乏氧诱导因子促进肿瘤侵袭转移的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2006, 13(5):62.

[3] 杨振江. 活血化痰对肿瘤转移影响的研究概况[J]. 湖南中医学院学报, 2002, 22(4):66.

[4] 蒋跃绒, 殷惠军, 陈可冀. 赤芍 801 研究现状[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(8):760.

[5] 杨继金, 朱永法, 左长京, 等. 大白鼠移植性肝癌模型的制作[J]. 中国放射学杂志, 1993, 27(2):122.

[6] 瞿雪梅, 顾伟. 大鼠移植性肝癌模型血管介入的护理[J]. 实验动物科学与管理, 2005, 22(2):56.

[7] 赵素欣, 李爱华. 肝脏介入术后的护理[J]. 中国临床医药研究杂志, 2003, 18(7):519.

[8] 顾建华, 王广义, 孟宪璞, 等. 诱导型一氧化氮合酶抑制剂对胃癌 MFC 细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中华胃肠外科杂志, 2004, 7(6):496.

[9] Calmels S, Hainaut P, Ohshima H. Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein [J]. Cancer Res, 1997, 57:3365.

[10] Rittling S R, Chambers A F. Role of osteopontin in tumour progression [J]. Br J Cancer, 2004, 90(10):1877.

[11] 丁凌, 郑树. 大肠癌及其肝转移组织骨桥蛋白 mRNA 的表达[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(14):970.

[责任编辑 聂淑琴]