

中药有效成分组方联合顺铂抑制小鼠
肝癌血管生成的机制研究

陈涛^{*}, 付亚玲, 巩仔鹏, 邓李蓉, 胡月琴
(三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002)

[摘要] 目的: 探讨中药有效成分组方(QHF: 其中 Q、H、F 依次为“清热解毒”、“活血化瘀”、“扶正固本”) 联合小剂量化疗药物顺铂(DDP) 抗小鼠 H₂₂ 肝癌血管生成的作用机理。方法: 48 只 BaLb/c 小鼠右腋 sc 小鼠 H₂₂ 肝癌细胞建立荷瘤模型, 随机分设为 QHF 复方组、小剂量顺铂组(DDP)、联合用药组(QHF + DDP) 及生理盐水组(NS) 共 4 组。以抑瘤率为指标观察各药物对荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用; 免疫组化方法检测各药物对小鼠肝癌组织中的血管内皮生长因子(VEGF)、表皮生长因子受体(EGFR) 及基质金属蛋白酶-2(MMP-2) 表达的影响。结果: QHF 组、DDP 组和联合用药组的瘤重均较 NS 对照组明显降低($P < 0.01$); 联合用药组较 QHF 组明显降低($P < 0.01$), 抑瘤率分别为 47.45%, 63.11% 和 72.95%。QHF 组、DDP 组和联合用药组小鼠移植瘤组织内 VEGF, MMP-2 的表达较 NS 对照组明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$ 及 $P < 0.01$); 小鼠移植瘤组织内 EGFR 的表达较 NS 对照组明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$ 及 $P < 0.01$); 联合用药组与各单药组之间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论: QHF 复方与小剂量 DDP 均具有抗肝癌及抗肝癌血管生成的作用; QHF 复方与小剂量 DDP 单独或联合应用抗血管生成作用的机制可能与其下调肝癌组织中 VEGF, EGFR 及 MMP-2 的表达有关。

[关键词] 有效成分; 顺铂; 肝癌; 血管生成; 机制

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010) 05-0157-04

Studies on the Anti-angiogenic Mechanism of the Formula of
Chinese Medicine Active Ingredients Combined with Small Dose
Cisplatin in Mice of Hepatocellular Carcinoma

[收稿日期] 2009-10-15
[基金项目] 湖北省卫生厅中医药中西医结合科研项目(2005-455-33)
[通讯作者] * 陈涛, Tel: (0717) 6397378; E-mail: chentao@ ctgu.edu.cn

[4] Menga M, Tang H, Yuan B Z, *et al.* Positive and negative cis-acting elements are required for hematopoietic expression of zebra fish GATA-1 [J]. Blood, 1999, 93 (2) :500.

[5] Ogilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V, *et al.* Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts[J]. J Biol Chem, 2000, 275(50) : 39754.

[6] Kapur R, Zhang L. A novel mechanism of cooperation between c-Kit and erythropoietin receptor-Stem cell factor induces the expression of Stat5 and erythropoietinreceptor, resulting in efficient proliferation and survival byerythropoietin[J]. J Biol Chem, 2001, 276(2) : 1099.

[7] Chiba T, Ikawa Y, Todokoro K. GATA-1 transactivates erythropoietin receptor gene, and erythropoietin receptor-mediated signals enhance GATA-1 gene expression[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19 (14) : 3843.

[8] Trainor C D, Omichinski J G, Vandergon T L, *et al.* A palindromic regulatory site within vertebrate GATA-1 promoters requires both zinc fingers of the GATA-1 DNA-binding domain for high-affinity interaction [J]. Mol Cell Biol, 1996, 16 (5) : 2238.

[9] Kirito K, Watanabe T, Sawada K, *et al.* Thrombopoietin regulates Bcl-xL gene expression through Stat5 and phosphatidylinositol 3-kinase activation pathways[J]. J Biol Chem, 2002, 277 (10) : 8329.

CHEN Tao^{*}, FU Ya-ling, GONG Zi-peng, DENG Li-rong, HU Yue-qin
(Medical College, Three Gorges University, Yichang 443002, China)

[Abstract] Objective: To investigate the anti-angiogenic mechanism of QHF (a formula of Chinese medicine ingredients, abbreviation Q for Qingrejiedu, H for Huoxuehuayu and F for Fuzhengguben) combined with small dose chemotherapy drug cisplatin(DDP) in H₂₂ mice of hepatocellular carcinoma. **Method:** The forty eight Balb/c mice were inoculated with cell suspension of mouse hepatocellular carcinoma cell line H₂₂ under the right axillary skin to establish the solid tumor model. Then they were randomly divided into four groups as follows: QHF group, DDP group, QHF + DDP group and NS (normal saline) group. The inhibition rates of tumor growth in tumor-bearing mice by drugs as an indicator were observed. The expression of VEGF, EGFR and MMP-2 in the tissue of mice tumor was detected with immunohistochemistry. **Result:** The weight of tumor was significantly lower in QHF, DDP and QHF + DDP group than that of in NS group($P < 0.01$), while the weight of mice tumor was significantly lower in QHF + DDP group than that of in QHF group. Their inhibition rate was 47.45%, 63.11%, 72.95%, respectively. The expression of VEGF and MMP-2 in the tissue of mice tumor was significantly lower in QHF, DDP and QHF + DDP group than that of in NS group($P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.01$). Moreover, The expression of EGFR in the tissue of mice tumor was significantly lower in QHF, DDP and QHF + DDP group than that of in NS group($P < 0.01$, $P < 0.05$ and $P < 0.01$). However, the difference between QHF + DDP group and other groups has no significance($P > 0.05$). **Conclusion:** Both of QHF and small dose DDP have the anti-tumor and anti-angiogenic effect in H₂₂ mice of hepatocellular carcinoma. Moreover, one of anti-angiogenic mechanism may be concerned with the downregulation of the expression of VEGF, EGFR and MMP-2 in the tissue of mice tumor.

[Key words] active ingredients; hepatic cell cancer; cisplatin; angiogenesis; mechanism

扶正培本、活血化瘀、清热解毒是中医治疗肿瘤及防治肿瘤转移的常用组方原则^[1]。QHF 复方^[2]是我们根据肝癌中医病机特点,从具有清热解毒(Q)、活血化瘀(H)、扶正固本(F)作用的中药所提取的多个抗肝癌有效成分中,通过动物实验,采用均匀设计法筛选得到的组方,由华蟾素、人参皂甙 Rg3、三七总皂甙及香菇多糖组成。前期实验我们将 QHF 复方与小剂量顺铂联合干预肝癌 H₂₂ 移植性小鼠,发现 QHF 复方与顺铂均能够下调肝癌组织中微血管密度的表达,具有抗肝癌血管生成的作用。因此,该实验主要通过检测药物治疗后对荷瘤小鼠肿瘤组织中血管内皮生长因子(VEGF)、表皮生长因子受体(EGFR)及基质金属蛋白酶-2(MMP-2)表达的影响,从血管生成角度进一步探讨其抗肿瘤作用的机制。

1 材料

1.1 动物与细胞株 雄性 Balb/c 纯系小鼠,清洁级,4~6 周龄,体重(20±2)g,48 只,由湖北省实验动物中心提供。小鼠肝癌 H₂₂ 细胞由本校免疫教研室保存,以腹水型传代保种,第 3 代用于实验。

1.2 药品与试剂 注射用顺铂(冻干型),购自锦州九泰药业有限责任公司,批号 20080802;华蟾素片,购自安徽金蟾生化股份有限公司,批号 20071108;参一胶囊(人参皂甙 Rg3),购自吉林亚泰制药有限公司,批号 20071009;血塞通片(三七总皂苷),购自云南省玉溪市维和制药有限公司,批号 20080511;香菇多糖片,购自浙江金华埃森药业有限公司,批号 050202;以上各药物使用前均用灭菌生理盐水稀释至一定浓度。兔抗鼠 VEGF,EGFR,MMP-2 单克隆抗体均购自北京中山生物技术有限公司。即用型免疫组化试剂盒(SABC 试剂盒)及 DAB 显色剂均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 仪器 电子分析天平(MP200A 型),上海良平仪器厂;光学显微镜,日本 Olympus 公司;多功能显微镜及测量系统(DM-R 型),德国 Leica 公司;电热恒温鼓风干燥箱(GZX-9070MBE 型),上海博迅实业有限公司。

2 方法

2.1 动物模型的建立 肝癌 H₂₂ 细胞株 Balb/c 小鼠体内连续传代 3 代后,抽取接种 7 d 左右种鼠腹

水,呈乳白色,D-Hanks 液洗涤离心($800\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}\times5\text{ min}$)2 次,调整细胞浓度至 $5.0\times10^6\text{ 个}\cdot\text{mL}^{-1}$,台盼蓝拒染法检测存活率 $\geq95\%$,将细胞悬液注射至健康 BaLb/c 小鼠右腋皮下,每只 0.2 mL,建立实体瘤模型。全程严格无菌操作,1 h 内完成。

2.2 分组及给药 小鼠造模后第 3 天,随机分为 4 组,每组 12 只。生理盐水(NS)组每只小鼠 NS 0.4 mL ig,同时予生理盐水 0.2 mL ip;QHF 复方组予以下 4 种药物(华蟾素 $800\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、人参皂甙 Rg3 $14\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、三七总皂甙 $5.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,香菇多糖 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)各 0.1 mL 总共 0.4 mL/只 ig,同时予 0.2 mL 生理盐水 ip;DDP 组予生理盐水 0.4 mL/只 ig,同时予 DDP 0.2 mL(剂量 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)ip;联合用药(QHF+QHF)组:给予 QHF 0.4 mL/只 ig,同时予 DDP 0.2 mL ip。以上给药均为 1 次/d,连续 10 d。

2.3 瘤重及抑瘤率 末次给药 24 h 后,颈椎脱臼法处死小鼠,完整剥离肿瘤组织,电子天平称重,计算抑瘤率(Inhibition rate,IR)。抑瘤率(IR)= $\frac{\text{模型组瘤重(g)}-\text{用药组瘤重(g)}}{\text{模型组瘤重(g)}}\times100\%$

2.4 SABC 法检测肝癌组织中 VEGF,EGFR 及 MMP-2 蛋白的表达 具体方法参考 SABC 试剂盒说明书,检测时以 PBS 代替一抗作为阴性对照。结果判定标准:VEGF 以胞浆内含有棕黄或棕褐色、颗粒状、定位明确的瘤细胞为阳性细胞。参照文献^[3]采用半定量积分法,以阳性表达的强度和阳性细胞数为综合判断。即对每张切片的阳性细胞染色程度(基本不着色、着色淡、着色适中、着色强)及阳性细胞表达率($\leq5\%$, $5\%\sim25\%$, $25\%\sim50\%$, $\geq50\%$)分别计分为 0,1,2,3,然后根据两项评分之和判断结果:0~2 分为阴性(-),3~4 分为阳性(+), ≥5 分为强阳性(++)。阳性细胞表达率的计算方法:显微镜下每张切片随机观察 10 个高倍视野($\times400$ 倍),每个视野观察 100 个细胞,记数 VEGF 的阳性细胞数,计算 VEGF 阳性细胞表达率。VEGF 阳性细胞表达率=阳性细胞数/计数细胞总数 $\times100\%$ 。EGFR 以胞膜内含有棕黄或棕褐色、颗粒状、定位明确的瘤细胞为阳性细胞。其余同 VEGF。MMP-2 以胞浆内含有棕黄或棕褐色、颗粒状、定位明确且染色明显的瘤细胞为阳性细胞,MMP-2 在部分间质细胞也表达。其余同 VEGF。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计分析软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素

方差分析;计数资料以百分率(%)表示,采用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 药物对小鼠肿瘤生长情况的影响 接种 5 d 内,小鼠外观无明显改变。5 d 后各组可触及右腋皮下瘤块,NS 对照组小鼠肿瘤生长迅速,局部肿胀,压迫症状明显;各用药组小鼠肿瘤生长比 NS 对照组缓慢。

各组小鼠的瘤重及抑瘤率见表 1。各用药组的瘤重均明显低于 NS 组,差异有显著性($P<0.01$)。用药组两两比较:联合用药组的瘤重明显低于 QHF 组($P<0.01$),但与 DDP 组相比,差异无统计学意义($P>0.05$);QHF 组与 DDP 组的差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 各组小鼠的瘤重及抑瘤率比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	肿瘤重量/g	抑瘤率/%
NS	—	1.22 ± 0.22	—
QHF	配比 1	$0.63\pm0.16^{1,2)}$	47.54
DDP	2	$0.45\pm0.23^{1)}$	63.11
QHF+DDP	配比 2	$0.33\pm0.15^{1)}$	72.95

注:与 NS 组比较¹⁾ $P<0.01$;与联合用药组(QHF+DDP)比较²⁾ $P<0.01$ 。配比 1 为华蟾素 $800\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,人参皂苷 Rg3 $14\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,三七皂苷 $5.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,香菇多糖 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (下同);配比 2 为华蟾素 $800\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,人参皂苷 Rg3 $14\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,三七皂苷 $5.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,香菇多糖 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,顺铂 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (下同)

3.2 肿瘤组织中 VEGF,EGFR 和 MMP-2 蛋白的表达 见表 2。与 NS 对照组比较,QHF 组、DDP 组及 QHF+DDP 组肿瘤组织的 VEGF 表达均明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$ 、 $P<0.01$ 及 $P<0.01$);联合用药组与各单药组比较下降,但差异无统计学意义($P>0.05$);QHF 组与 DDP 组无统计学差异($P>0.05$)。

表 2 各组小鼠移植瘤组织中 VEGF,EGFR 和 MMP-2 的比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	VEGF/分	EGFR/分	MMP-2/分
NS	—	4.50 ± 1.22	4.17 ± 1.21	4.33 ± 1.03
QHF	配比 1	$2.33\pm1.63^{1)}$	$1.17\pm0.89^{2)}$	$2.17\pm1.60^{1)}$
DDP	2	$1.83\pm1.47^{2)}$	$1.83\pm1.57^{1)}$	$1.50\pm1.38^{2)}$
QHF+DDP	配比 2	$1.67\pm1.37^{2)}$	$0.67\pm0.47^{2)}$	$0.83\pm0.41^{2)}$

注:与 NS 组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$

与 NS 组比较,QHF 组、DDP 组及 QHF+DDP 组肿瘤组织的 EGFR 表达均明显下降(分别为 $P<$

0.01, $P < 0.05$ 及 $P < 0.01$); 联合用药组与各单药组比较有下降, 但差异无统计学意义($P > 0.05$); QHF 组与 DDP 组无统计学差异($P > 0.05$)。

与 NS 对照组比较, QHF 组、DDP 组及 QHF + DDP 组肿瘤组织的 MMP-2 表达均明显下降(分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 及 $P < 0.01$); 联合用药组与各单药组比较有下降, 但差异无统计学意义($P > 0.05$); QHF 组与 DDP 组无统计学差异($P > 0.05$)。

4 讨论

血管生成是一个多因子参与的复杂调控过程, 包括血管内皮细胞被激活、增殖、血管外基质降解, 继而内皮细胞发生迁移, 直到新生血管腔的形成^[4]。

血管生成受血管生长刺激因子和抑制因子等因素的调控。VEGF 是目前发现的体内最强的一种促血管生成因子^[5]。它是高度特异的血管内皮细胞有丝分裂原, 通过多种信号通路引起内皮细胞增殖、趋化、迁移, 诱导微血管形成, 与肿瘤血管生成关系密切。VEGF 作为重要的血管生成调控因子, 在多种正常组织细胞和肿瘤细胞中都有表达, 但是其表达水平却相去甚远。比如在肝癌细胞中, VEGF 的表达比邻近组织明显升高, VEGF 在肝癌新生血管中起关键作用。研究表明, 多数肿瘤细胞都高水平表达 VEGF。抑制 VEGF 可有效抑制肿瘤的生长和转移^[6]。在血管形成的过程中, 表皮生长因子(EGF)及其受体, 也是重要的促血管生成因子。EGF 受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在相当一部分肿瘤中存在高表达。EGFR 在肿瘤转移中发挥重要作用, 其介导的信号转导对肿瘤细胞的迁移、增殖及肿瘤血管形成, 具有调节作用^[7]。EGFR 高表达的肿瘤患者预后较差, 易发生转移, 复发周期短, 复发率高, 存活期短。而对于肿瘤血管, 基质金属蛋白酶家族(MMPs)则是其生成的关键酶, 其中明胶酶 A(MMP-2)被认为是肿瘤“血管生成开关”的一种调

节因子, 具有直接促血管生成作用, 在肝细胞癌中常过量表达^[8]。

该研究发现, QHF 组、DDP 组及联合应用组肝癌组织中 VEGF, EGFR, MMP-2 的表达明显下降, 且联合用药组下降更为明显, 提示下调 VEGF, EGFR, MMP-2 的表达而阻断细胞周围基质的降解是 QHF 复方与 DDP 的抗肿瘤血管生成的机理之一。

[参考文献]

- [1] 李佩文. 中药预防肿瘤转移的可能途径[J]. 中医杂志, 1999, 40(2): 115.
- [2] Chen T, Li D, Fu YL, *et al.* Screening of QHF formula for effective ingredients from Chinese herbs and its anti-hepatic cell cancer effect in combination with chemotherapy[J]. Chinese Medical Journal, 2008, 121(4): 363.
- [3] Gallo O, Franchi A, Magnelli L, *et al.* Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer[J]. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. Neoplasia, 2001, 3: 53.
- [4] Klagsbrun M, Moses MA. Molecular angiogenesis[J]. Chem Biol, 1999, 6(8): 217.
- [5] Kraizer Y, Mawasi N, Seagal J, *et al.* Vascular endothelial growth factor and angiopoietin in liver regeneration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 287: 209.
- [6] 吕健东, 刘彤, 安雪青, 等. VEGF、VEGI 与大肠癌临床病理特征的关系[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2006, 12(4): 397.
- [7] Eric Raymond, Sandrine F. Epidermal growth factor receptor tyrosin kinase as a target for anticancer[J]. Drugs, 2000, 60(1 suppl): 15.
- [8] 王利霞, 楼善贤, 沈蔚. CD147 和 MMP-2、VEGF 在原发性肝癌的表达及意义[J]. 实用肿瘤学杂志, 2005, 19(2): 109.