

理冲汤加减联合 5-氟尿嘧啶对 H22 荷瘤小鼠移植瘤 上皮间质转化的影响

王惠, 吴坚, 陈敏, 刘沈林, 徐陆周*
(南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

[摘要] **目的:**探讨理冲汤加减联合 5-氟尿嘧啶(5-FU)对 H22 荷瘤小鼠皮下移植瘤上皮间质转化(EMT)的影响。**方法:**构建小鼠移植性肝癌模型。成瘤后,将其随机分为空白组,5-FU 组(5-FU, 2.5 mg·kg⁻¹),理冲汤加减联合 5-FU 组(5-FU + 理冲汤加减组),理冲汤加减组(理冲汤加减 25 g·kg⁻¹),每组 10 只。观察理冲汤加减对小鼠皮下移植瘤的作用及与 5-FU 合用的效果;采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组瘤体中 EMT 相关基因上皮型钙黏蛋白(E-cadherin),神经型钙黏蛋白(N-cadherin),锌指转录因子 Snail, Twist mRNA 表达;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组瘤体内 EMT 相关蛋白 E-cadherin, N-cadherin, Snail, 波形蛋白(Vimentin)的表达。**结果:**5-FU 组,5-FU + 理冲汤加减组,理冲汤加减组的抑瘤率分别为 59.18%, 84.42%, 10.39%, 均能抑制肝癌移植瘤的生长,且 5-FU + 理冲汤加减组抑瘤率显著高于 5-FU 组($P < 0.01$)。胸腺指数、脾指数显示,5-FU + 理冲汤加减组胸腺指数与脾指数均高于 5-FU 组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。PCR 显示,与空白组比较,5-FU 组,5-FU + 理冲汤加减组 E-cadherin 的表达上调,N-cadherin, Snail, Twist 的表达下调($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 5-FU 组比较,5-FU + 理冲汤加减组 E-cadherin 的表达上调,N-cadherin, Snail, Twist 的表达下调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。Western blot 显示,与空白组比较,5-FU 组,5-FU + 理冲汤加减组,理冲汤加减组 E-cadherin 的表达上调,N-cadherin, Snail, Vimentin 的表达下调($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 5-FU 组比较,5-FU + 理冲汤加减组 E-cadherin 的表达上调,N-cadherin, Snail, Vimentin 的表达下调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**理冲汤加减与 5-FU 单独和联合使用均对肝癌小鼠移植瘤的生长有抑制作用,且两药合用能增强化疗效果,且一定程度上抑制了 5-FU 的毒性,其机制可能与对肝癌 EMT 的抑制有关。

[关键词] 理冲汤加减; H22 肝癌细胞; 荷瘤小鼠; 皮下移植瘤; 上皮间质转化

[中图分类号] R22; R242; R285.5; R279 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)01-0082-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20182123

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180822.1024.001.html>

[网络出版时间] 2018-08-23 10:54

Effect of Modified Lichongtang Combined with 5-Fluorouracil on Epithelial Mesenchymal Transition in H22 Tumor-bearing Mice

WANG Hui, WU Jian, CHEN Min, LIU Shen-lin, XU Lu-zhou*

(Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of modified Lichongtang combined with 5-fluorouracil (5-FU) on tumor epithelial-mesenchymal transition (EMT) in H22 tumor-bearing mice. **Method:** Mouse models of transplanted hepatoma were constructed. After tumor formation, they were randomly divided into 4 groups: blank group, 5-FU group (2.5 mg·kg⁻¹ 5-FU intraperitoneal injection), modified Lichongtang combined with 5-FU group (5-FU + Chinese medicine group), and modified Lichongtang group (Chinese medicine group,

[收稿日期] 20180412(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473605,81704031);江苏省卫计委青年医学人才项目(QNRC2016641);江苏省中医院高峰学术人才项目(Y2018RC33)

[第一作者] 王惠,在读硕士,从事中医内科学脾胃病研究,E-mail:wanghui.2007.0k@163.com

[通信作者] *徐陆周,博士,主任中医师,从事中医内科学脾胃病研究,E-mail:Xuluzhou@aliyun.com

25 g·kg⁻¹ gavage), $n = 10$ in each group. The effect of modified Lichongtang combined with 5-FU on the tumor inhibition rate of subcutaneous transplanted tumor was observed. The gene expression levels of E-cadherin, N-cadherin, Snail, and Twist in transplanted tumor were observed by Real-time PCR. The protein expression levels of E-cadherin, N-cadherin, Snail, and Vimentin were detected by using Western blot. **Result:** The tumor inhibiting rate was 59.18%, 84.42%, and 10.39% respectively in 5-FU group, 5-FU + Chinese medicine group, and Chinese medicine group. All of these can inhibit the growth of liver cancer transplantation tumor, and the tumor inhibiting rate of 5-FU + Chinese medicine group was significantly higher than that in 5-FU group ($P < 0.01$). Thymus index and spleen index in 5-FU + Chinese medicine group were significantly higher than those in 5-FU group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Results of Real-time PCR indicated that, as compared with blank group, expression levels of E-cadherin were up-regulated, but expression levels of N-cadherin, Snail, and Twist were down-regulated in 5-FU group, 5-FU + Chinese medicine group, and Chinese medicine group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). As compared with the 5-FU group, expression levels of E-cadherin were up-regulated, but expression levels of N-cadherin, Snail, and Twist were down-regulated in the 5-FU + Chinese medicine group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Results of Western blot showed that, as compared with blank group, expression levels of E-cadherin were up-regulated, but expression levels of N-cadherin, Snail, Vimentin were down-regulated in 5-FU group, 5-FU + Chinese medicine group, and Chinese medicine group ($P < 0.05$, $P < 0.01$); as compared with 5-FU group, expression levels of E-cadherin were up-regulated, but expression levels of N-cadherin, Snail, and Vimentin were down-regulated in the 5-FU + Chinese medicine group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Modified Lichongtang, 5-FU and their combination have inhibitory effect on the growth of transplanted tumors of hepatocarcinoma mice, and the combination of the two drugs can enhance the effect of chemotherapy and to some extent inhibit the toxicity of 5-FU. The mechanism may be related to the inhibition of liver cancer EMT.

[**Key words**] modified Lichongtang; H22 hepatocarcinoma cells; tumor-bearing mice; subcutaneous transplanted tumor; epithelial-mesenchymal transition

肝癌指由肝细胞或肝内胆管上皮细胞发生的恶性肿瘤^[1],是全球范围内发病率最高的恶性肿瘤之一,我国每年约有 39.3 万人死于肝癌,约占全球肝癌死亡总数的 51.2%^[2],其引起的死亡占肿瘤相关死亡的第 3 位^[3]。肝癌起病隐匿,临床症状不典型,确诊后多属晚期,治疗方法常限制在放化疗和免疫治疗,而放化疗对肝癌的治疗毒副作用大,适应症少,疗效差,且价格昂贵,易于复发转移,大量研究表明中医药在提高晚期化疗后肝癌患者的生活质量、免疫力及生存期上都发挥了一定的积极作用^[4]。因此,近年来越来越多临床医生开始尝试使用与化疗药物联合使用来加强其抗肿瘤功效并减少化疗的毒副作用。

刘沈林教授为江苏省名中医,深谙张锡纯医学思想,根据多年临床诊治晚期肝癌的经验,总结出其病机为正气亏损、瘀毒内积,故拟益气化痰为其治疗大法。临证之时,常选用黄芪、党参片、三棱、莪术 4 药组成基本方,并根据正虚与毒瘀消长关系,症状表现,随证加减,既能防止消癥药过伤正气,又能助行气,化血瘀。该基本方黄芪、党参、三棱、莪术出自张

锡纯所著《医学衷中参西录》之理冲汤。方中黄芪、党参片、三棱、莪术 4 药配伍,其妙处是“用三棱、莪术以消冲中瘀血,而即用参、芪诸药,以保护气血,则瘀血去而气血不至伤损。且党参、黄芪能补气,得三棱、莪术以流通之,则补而不滞,而元气愈旺。元气既旺,愈能鼓舞三棱、莪术之力以消癥瘕,此其所以效也”^[5]。现代药理研究表明黄芪有提高机体免疫力、抑菌及抑制病毒、调节内分泌及抗衰老、抗肿瘤等作用^[6]。武超等^[7]研究表明黄芪的主要成分黄芪皂苷 II 通过抑制磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 (p-ERK1/2) 的表达增加 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 对人肝癌细胞 HepG2 增殖抑制作用。党参性味甘平无毒,入脾肺二经,具有补中益气、健脾益肺、生津止渴的作用。除传统作用外,近年来,党参片在抑制肿瘤方面研究倍受关注,研究发现党参片的提取物 (ESCL) 能清除由于乙醇产生的自由基,抑制氧化应激,从而减缓肝脏的损伤,对乙醇性的脂肪肝和肝癌起到预防的作用^[8]。三棱苦、辛,功能破血行气,消积止痛。现代研究表明,三棱中主要含挥发油、苯丙素、黄酮类等化学成分,具有抗血栓、抗炎、镇痛、抗肿瘤

等药理作用^[9]。李学臣等^[10]研究发现三棱水提物能够抑制 H22 荷瘤小鼠肿瘤生长,且抑瘤率与药物浓度呈正相关,又发现血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素(IL)-2 上调。莪术其性味辛、苦、温,归肝、脾经,能破血祛瘀行气、消肿止痛。莪术的主要成分之一为姜黄素,研究表明姜黄素可通过提高上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)的表达,抑制肿瘤细胞的浸润和转移;还可以同时在体外和体内抑 DNA 甲基转移酶 1(DNMT1)的阳性调节剂,如核转录因子(NF)- κ B p65 的表达来降低 DNMT1 mRNA 和蛋白质的表达水平,从而发挥抗肿瘤的作用^[11]。

本课题组前期通过总结刘沈林教授治疗晚期肝癌的经验发现由理冲汤化裁的基本方黄芪、党参配伍三棱、莪术可以延长晚期肝癌患者的生存期,提高生活质量^[12]。此前臧文华等^[13-14]通过体内实验研究表明黄芪-莪术配伍能抑制人肝癌裸鼠原位移植瘤的生长,且抑制作用与剂量有一定的正相关性,其机制可能与对低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α),内皮生长因子(VEGF)表达的抑制有关,与顺氯氨铂(DDP)合用表现为协同增效和相加作用。其进一步通过体外实验研究发现黄芪-莪术能显著诱导 HepG2 凋亡,且诱导凋亡作用与剂量有一定的正相关性,其机制可能与显著下调 B-淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)表达,上调微小 mRNA(miR)-122a,下调 miR-221,miR-151 的表达有关,与 DDP 合用表现为协同增效作用。但目前尚未有对于黄芪、党参、三棱、莪术 4 种药物配伍使用作用于肝癌机制的研究报道。因此本实验采用 H22 荷瘤小鼠为实验模型,观察理冲汤加减联合 5-FU 对小鼠皮下移植瘤生长的抑制作用,并从上皮间质转化(EMT)方面探讨其分子机制,以期对肝癌的临床治疗提供新的思路和治疗选择。

1 材料

1.1 细胞及动物 实验细胞株 H22 肝癌细胞(由江苏省中医院中心实验室馈赠,传至第 3 代)。SPF 级 BALB/c 小鼠 40 只,雌雄各半,4 周龄,体质量 18~22 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司南京分公司,合格证号 SCXK(苏)2016-0003,小鼠置于恒温(21~29)℃,恒湿(50%~60%),新鲜空气高度除尘除菌、无特殊病原菌(SPF)环境下,用高压灭菌饮用水、专用颗粒饲料及 SPF 小鼠垫料分笼喂养实验动物。取得南京医科大学伦理委员会批准,编号 IACUC-1703033。

1.2 药物和试剂 黄芪、党参、三棱、莪术经南京中医药大学严辉副教授鉴定,黄芪为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* 的干燥根(产地甘肃),党参为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* 的干燥根,三棱为黑三棱科植物黑三棱 *Sparganium stoloniferum* 的干燥块茎,莪术为姜科植物广西莪术 *Curcuma kwangsiensis* 的干燥根茎(安徽省万生中药饮片有限公司,产地分别为甘肃,甘肃,浙江,广西,批号分别为 17092110, 1710001, 17090936, 171003)。黄芪-党参片-三棱-莪术水提液的制备:党参片 15 g,黄芪 30 g,三棱 15 g,莪术 15 g,用蒸馏水 750 mL 加热回流提取 2 次,每次 1 h,合并提取的药液,水浴浓缩,配制成相当于生药 1.25 g·mL⁻¹ 的水提液,灭菌备用。5-FU(天津金耀氨基酸有限公司,批号 0904152);RPMI-1640 培养液,胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 1517544,10270);胰酶细胞消化液(南京碧云天公司,批号 C0201);trizol RNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 66006);SYBR 试剂盒,RNA 逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号分别为 1407466,AK4002);鼠抗人 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(日本 Sigma 公司,批号 BTX82559);兔抗人 E-cadherin,神经型钙黏蛋白(N-cadherin),波形蛋白(Vimentin),Snail 单克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 3195,13116,5741,3879);二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 zdr5102)。

1.3 仪器 HERAcell 1501 型 CO₂ 养箱,1300A2 型生物安全柜(美国 Thermo 公司);IX51 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);biophotometer plus 型紫外分光光度仪,2720 型 PCR 扩增仪,7500fas 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);MP-4 型电泳仪及转印槽(美国 Bio-Rad 公司);odyssey-SA 型双色红外激光成像系统(上海仪涛生物仪器有限公司);58048 型冷冻离心机(德国 Eppen-Dorf 公司);MDF-38 型超低温冰箱(日本三洋公司)。

2 方法

2.1 造模 根据 WU 等^[15]造模方法,从液氮中复苏 H22 肝癌细胞,取处于对数生长期生长状态好的细胞,吹打成细胞悬液,收集细胞,取 0.3 mL 注射到小鼠腹腔,10 d 后,观察小鼠形态,待小鼠腹部膨隆且柔软时,将小鼠脱颈处死后,在超净工作台中从腹腔抽出瘤液,制成肿瘤细胞悬液,计数并调节细胞数为 1×10¹⁰ 个/L。BALB/c 小鼠常规饲养,每只小鼠右侧腋下接种细胞悬液 0.2 mL。当小鼠右侧腋下

出现直径为 5~7 mm 的硬结,造膜成功。

2.2 动物分组和给药 将 40 只小鼠随机分为 4 组,分别为空白组,5-FU 组,理冲汤加减联合 5-FU 组(5-FU + 理冲汤加减组),理冲汤加减组,每组 10 只。本实验根据“人和动物体表面积折算的系数”^[16]换算用药剂量,小鼠给药剂量为人的 9 倍,前期预实验发现低于临床等效剂量,抑瘤效果欠佳,故本实验采用相当于临床等效用量 2 倍的剂量,相当于人的 20 倍。空白组予生理盐水灌胃,每日 1 次;5-FU 组予 5-FU(2.5 mg·kg⁻¹)腹腔注射,隔日 1 次;5-FU + 理冲汤加减组予理冲汤加减 25 g·kg⁻¹灌胃,每日 1 次,予 5-FU(2.5 mg·kg⁻¹)腹腔注射,隔日 1 次;理冲汤加减组予理冲汤加减 25 g·kg⁻¹灌胃,每日 1 次。接种后次日给药,每日 1 次,连续 14 d。末次给药后次日称体质量,按规定处死动物,剖取瘤组织、胸腺、脾脏称重。

2.3 记录各组小鼠体质量、瘤重的变化并计算抑瘤率 接种后第 1,3,7,11,15 天各小鼠称重,并观察小鼠的一般情况及荷瘤的生长情况,末次给药后次日处死小鼠,剥离称重。

$$\text{抑瘤率}^{[17]} = (\text{空白组平均瘤重} - \text{药物组平均瘤重}) / \text{空白组平均瘤重} \times 100\%$$

2.4 合并用药疗效^[18] 按照金氏公式判断两药协同效应:拮抗、相加或增强。 $q = E(A + B) / (EA + EB - EA \times EB)$, $E(A + B)$ 为两药合用时的抑制率; EA, EB 为各药单独使用时的抑制率。若 $q < 0.85$ 表示联合用药有拮抗效应;若 $q > 1.15$ 表示联合用药有增强效应;而 $0.55 < q < 0.85$ 表示联合用药有相加效应。

2.5 计算各组小鼠的胸腺指数、脾指数^[18] 末次给药后处死小鼠,取出脾脏和胸腺,用滤纸吸干后称重。

$$\begin{aligned} \text{胸腺指数} &= \text{胸腺质量} / \text{小鼠体质量} \\ \text{脾脏指数} &= \text{脾脏质量} / \text{小鼠体质量} \end{aligned}$$

2.6 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测瘤体中 E-cadherin, N-cadherin, Snail, Twist mRNA 的表达水平 在液氮中取出各组瘤组织,剪成 0.2 cm³ 大小,磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 2 次。按照试剂说明书的步骤,提取各组肿瘤组织中总 RNA,用紫外线分光光度仪检测 RNA 样品浓度及纯度,再进行逆转录。用 TaKaRa PCR 试剂盒,对 cDNA 进行 PCR 检测,引物由 Invitrogen 公司合成,具体序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
β -actin	上游 CATGTACGTTGCTATCCAGGC	134
	下游 CTCCTTAATGTCACGCACGAT	
E-cadherin	上游 CTCGGCCTGAAGTGACTGTAAC	95
	下游 CAGCAACGTGTTTCTGCATTTTC	
N-cadherin	上游 GTGCCATTAGCCAAGGGAATTCAGC	92
	下游 GCGTTCCTGTTCACCTCATAGGAGG	
Snail	上游 TAGGCCCTGGCTGCCTACAAG	133
	下游 GCCCTCCCTCCACAGAAATG	
Twist	上游 CTTACGGAGGAGCTGCAGACC	146
	下游 CGCCCTGTTCTTTGAATTTG	

Real-time PCR 采用 TaKaRa PCR 试剂盒,按试剂盒的操作说明书配制反应体系,进行 PCR,扩增条件:预变性,95 °C 30 s 循环 1 次;PCR 反应,95 °C 5 s,60 °C 30 s,循环 40 次;融解曲线分析:95 °C 15 s,60 °C 60 s,95 °C 15 s,循环 1 次。采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 对 PCR 结果进行数据分析,计算 $\Delta C_t = C_{t\text{目的基因}} - C_{t\text{内参基因}}$; $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{给药组}} - \Delta C_{t\text{对照组}}$; 差别倍数 = 2^{- $\Delta\Delta C_t$} ,其中正常组的数值均为 1。检测瘤体中 E-cadherin, N-cadherin, Snail, Twist mRNA 表达。

2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测瘤体内 EMT 相关蛋白表达 分别称取各组移植瘤组织 0.1 g, PBS 洗涤 1 次,加入 RIPA 裂解液 200 μ L,提取总蛋白,分装于离心管中。用 BCA 法测定组织蛋白浓度,每个样品取上样量 20 μ g 进行 Western blot。经聚丙烯酰胺凝胶分离后转到 PVDF 膜上,用 5% BSA 封闭 1 h,取出封闭好的膜,放入一抗 (1:1 000) 孵育,水平置入 4 °C 冰箱过夜。次日用 TBST 漂洗 3 次后放入二抗 (1:1 万) 中室温避光孵育 1 h,经 TBST 漂洗 4 次,采用双色红外激光成像系统进行发光和条带分析。采用分析软件 Image J 进行分析。

2.8 统计学方法 数据结果采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行处理分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。满足正态分布和方差齐性的多组之间均数比较采用单因素方差分析,进一步两两比较用 LSD 法;方差不齐者采用 Dunnett's T3 检验。 $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

3 结果

3.1 理冲汤加减联合 5-Fu 对 H22 荷瘤小鼠体质量的影响 给药前各组小鼠体质量差异无统计学意义。给药结束后,5-FU 组小鼠体质量减轻幅度最大。与空白组比较,用药后第 7,11,15 天 5-FU 组,

5-FU + 理冲汤加减组体质量均有下降 ($P < 0.05$); 与 5-FU 组相比, 用药后第 11, 15 天 5-FU + 理冲汤

加减组、理冲汤加减组小鼠体质量增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 2。

表 2 理冲汤加减联合 5-FU 对 H22 荷瘤小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 11 天	第 15 天
空白	-	20.06 ± 1.08	21.36 ± 0.92	22.47 ± 0.94	23.94 ± 1.13	24.00 ± 1.69
5-FU	2.5×10^{-3}	21.01 ± 1.16	21.07 ± 0.88	18.9 ± 1.65 ¹⁾	17.53 ± 1.92 ¹⁾	16.47 ± 1.94 ¹⁾
5-FU + 理冲汤加减	$2.5 \times 10^{-3} + 25$	21.47 ± 0.82	21.27 ± 0.97	19.79 ± 1.44 ¹⁾	19.29 ± 1.38 ^{1,2)}	19.09 ± 1.77 ^{1,2)}
理冲汤加减	25	20.43 ± 0.95	21.03 ± 1.52	22.19 ± 1.12 ³⁾	23.17 ± 0.86 ³⁾	23.23 ± 0.72 ³⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 5-FU 组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.2 理冲汤加减联合 5-FU 对 H22 荷瘤小鼠皮下移植瘤的影响 与空白组比较, 5-FU 组, 5-FU + 理冲汤加减组瘤重显著降低 ($P < 0.01$); 与 5-FU 组比较, 5-FU + 理冲汤加减组瘤重明显降低 ($P < 0.05$)。5-FU + 理冲汤加减组瘤重的 q 为 1.33, 5-FU 与理冲汤加减联合用药效应表现为增强效应。见表 3, 图 1。

表 3 理冲汤加减联合 5-FU 对 H22 荷瘤小鼠瘤重的影响

Table 3 Effect of modified Lichongtang combined with 5-FU on tumor weight in H22 bearing mice

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	瘤重 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)/g	抑瘤率/%
空白	-	1.54 ± 0.61	0
5-FU	2.5×10^{-3}	0.63 ± 0.43 ¹⁾	59.18
5-FU + 理冲汤加减	$2.5 \times 10^{-3} + 25$	0.24 ± 0.11 ^{1,2)}	84.42
理冲汤加减	25	1.38 ± 0.49 ³⁾	10.39

3.3 理冲汤加减联合 5-FU 对 H22 荷瘤小鼠胸腺指数和脾指数的影响 与空白组比较, 5-FU 组, 5-FU + 理冲汤加减组, 胸腺、脾指数均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 5-FU 比较, 5-FU + 理冲汤加减组、理冲汤加减组胸腺、脾指数均明显增高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 4。

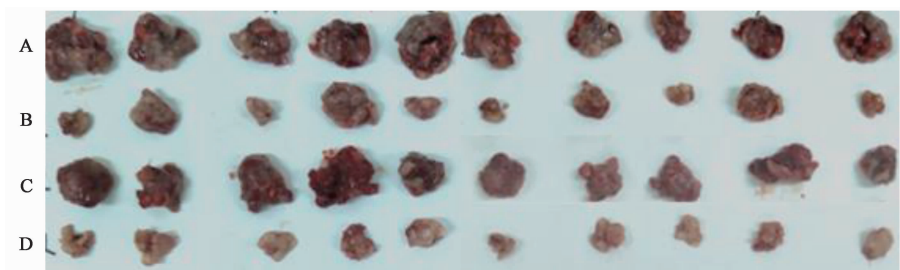
表 4 理冲汤加减联合 5-FU 对 H22 荷瘤小鼠胸腺指数和脾指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of modified Lichongtang combined with 5-FU on thymus index and spleen index in H22 bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	胸腺指数 ($\times 10^{-4}$)	脾指数 ($\times 10^{-4}$)
空白	-	0.30 ± 0.04	0.85 ± 0.22
5-FU	2.5×10^{-3}	0.05 ± 0.01 ²⁾	0.38 ± 0.17 ²⁾
5-FU + 理冲汤加减	$2.5 \times 10^{-3} + 25$	0.09 ± 0.03 ^{2,3)}	0.61 ± 0.05 ^{1,3)}
理冲汤加减	25	0.29 ± 0.07 ⁴⁾	0.80 ± 0.22 ⁴⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 5-FU 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 5, 6 同)。

3.4 理冲汤加减联合 5-FU 对 H22 荷瘤小鼠对瘤体中 EMT 相关 mRNA 表达的影响 与空白组相比, 5-FU 组, 5-FU + 理冲汤加减组 E-cadherin mRNA 表达均明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), N-cadherin, Snail, Twist 的表达均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 5-FU 组比较, 5-FU + 理冲汤加减组 E-cadherin 的表达显著升高 ($P < 0.01$), N-cadherin, Snail, Twist 的表达均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 5。



A. 空白组; B. 5-FU 组; C. 理冲汤加减组; D. 5-FU + 理冲汤加减组

图 1 理冲汤加减联合 5-FU 对各组 H22 荷瘤小鼠移植瘤的影响

Fig. 1 Transplantation tumor of H22 tumor bearing mice in each group

表 5 理冲汤加减联合 5-FU 对 H22 荷瘤小鼠瘤体中 EMT 相关 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of modified Lichongtang combined with 5-FU on expression of EMT related gene mRNA in H22 tumor bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	E-cadherin	N-cadherin	Snail	Twist
空白	-	1	1	1	1
5-FU	2.5 × 10 ⁻³	1.60 ± 0.24 ¹⁾	0.53 ± 0.10 ²⁾	0.32 ± 0.04 ²⁾	0.37 ± 0.03 ¹⁾
5-FU + 理冲汤加减	2.5 × 10 ⁻³ + 25	2.78 ± 0.11 ^{2,4)}	0.18 ± 0.12 ^{2,3)}	0.14 ± 0.05 ^{2,3)}	0.11 ± 0.02 ^{2,4)}
理冲汤加减	25	1.41 ± 0.23	0.64 ± 0.18 ¹⁾	0.42 ± 0.09 ¹⁾	0.46 ± 0.23 ¹⁾

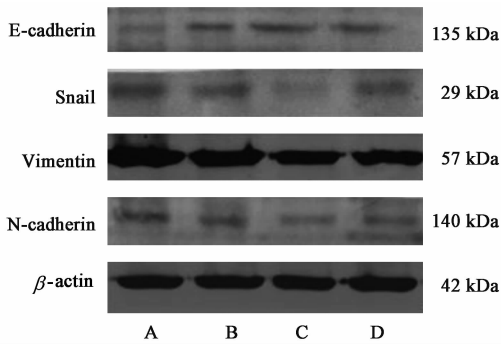
3.5 理冲汤加减联合 5-FU 对 H22 荷瘤小鼠瘤体中 EMT 相关蛋白表达的影响 与空白组相比,5-FU 组,5-FU + 理冲汤加减组,理冲汤加减组 E-cadherin 蛋白表达升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), N-cadherin,

Snail, Vimentin 蛋白表达下降 ($P < 0.05$); 与 5-FU 组比较,5-FU + 理冲汤加减组 E-cadherin 表达上调 ($P < 0.05, P < 0.01$), N-cadherin, Snail, Vimentin 蛋白表达下调 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 6, 图 2。

表 6 理冲汤加减联合 5-FU 对 H22 荷瘤小鼠瘤体中 EMT 相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effect of modified Lichongtang combined with 5-FU on expression of EMT associated protein in H22 tumor bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	E-cadherin/ β -actin	N-cadherin/ β -actin	Snail/ β -actin	Vimentin/ β -actin
空白	-	0.29 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.58 ± 0.04	1.80 ± 0.20
5-FU	2.5 × 10 ⁻³	0.45 ± 0.03 ²⁾	0.08 ± 0.01 ²⁾	0.32 ± 0.05 ²⁾	1.15 ± 0.04 ¹⁾
5-FU + 理冲汤加减	2.5 × 10 ⁻³ + 25	0.81 ± 0.02 ^{2,4)}	0.05 ± 0.01 ^{2,4)}	0.15 ± 0.01 ^{2,3)}	0.76 ± 0.13 ^{2,3)}
理冲汤加减	25	0.60 ± 0.15 ¹⁾	0.09 ± 0.02 ²⁾	0.36 ± 0.01 ¹⁾	0.84 ± 0.20 ²⁾



A. 空白组; B. 5-FU 组; C. 5-FU + 理冲汤加减组; D. 理冲汤加减组

图 2 H22 荷瘤小鼠瘤体中 EMT 相关蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of EMT associated protein in H22 tumor bearing mice

4 讨论

晚期肝癌患者正气亏虚, 癌毒入里, 此时患者若运用大量的化疗药物导致正气愈亏, 癌毒愈盛。刘沈林教授认为晚期肝癌患者体内正气亏虚, 正不胜邪, 余留的癌毒流窜, 更伤正气, 而至瘀血留滞, 故应以益气化瘀为治疗原则。5-FU 是肝癌的一线化疗药物, 是目前应用最广的抗嘧啶类药物。故为探讨益气化瘀基本方理冲汤加减联合化疗药物 5-FU 对肝癌肿瘤的协同抑制作用和对免疫器官的保护作用, 本实验以 H22 荷瘤小鼠为模型, 记录其体质量

变化, 计算其抑瘤率、合并用药效应、胸腺指数、脾脏指数, 研究结果显示理冲汤加减联合 5-FU 对小鼠肝癌皮下移植瘤的抑制作用最强, 可高达 84.42%。理冲汤加减联合 5-FU 组的小鼠体质量、胸腺指数、脾指数较 5-FU 组增高, 综上所述理冲汤加减不仅能起到增强化疗药物抑制肿瘤生长的作用, 还能对免疫脏器起到一定的保护作用。

自 1982 年 Greenburg 提出 EMT 的概念以来, 科研工作者们对 EMT 进行了深入的研究。肿瘤细胞的 EMT 是指上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞转化为更具迁移和侵袭能力的间质细胞的生物过程^[19-20]。EMT 可以视为肿瘤细胞浸润转移的开始^[21]。研究表明 EMT 的现象特征是^[22] 上皮细胞标志物 E-cadherin 表达的下调, 间充质细胞标志物 Vimentin, N-cadherin 等表达的上调以及转录因子 Snail, Twist 等的上调。E-cadherin 是一种钙依赖性跨膜糖蛋白, 与细胞外的免疫球蛋白结构域、细胞质内的 α, β 连接蛋白及 p120 与肌动蛋白骨架相互连接构成稳定的细胞间接触^[23-24]。因此 E-cadherin 能够维持细胞连接的稳定性。N-cadherin 是间质细胞骨架蛋白, 起到介导成纤维细胞动态黏附的作用, 有利于间质细胞的运动, 而且它介导细胞的侵袭能力可高于 E-cadherin 介导细胞间的黏附能力^[25]。

Vimentin 是属于细胞中间丝蛋白家族的成员,主要存在于间充质细胞中的一种中间纤维蛋白。研究表明 Vimentin 的表达升高在肿瘤的发生及转移过程中起到重要作用,其表达可作为判断肿瘤转移和预后的指标之一^[26-27]。转录因子如 Snail, Twist, 它们与肿瘤侵袭和转移相关^[28]。Snail 是细胞中一个重要的转录因子,最初发现于果蝇,它被证明是中胚层形成的基础它作为转录因子中的一种,对 EMT 有很重要的意义^[29],具有下调 E-cadherin 的作用^[30]。Twist 主要表达于胎盘、胚胎中胚层和某些中胚层来源的未分化组织,参与肌细胞、软骨细胞、骨原细胞等多种细胞系的分化,在诱导细胞迁移及组织塑型中起主要作用^[31]。Twist 是诱导肿瘤细胞 EMT 的主要因素之一,能够直接诱导 EMT 或通过影响其他转录因子而诱导 EMT,从而引发肿瘤细胞的转移^[32]。HU 等^[33]研究发现抑制 EMT 的进程同时可以降低肿瘤在机体内成瘤的能力,提示抑制 EMT 不仅能降低肿瘤的侵袭和转移能力,还能够降低肿瘤的成瘤能力。为进一步探讨理冲汤加减联合 5-FU 在体内抑制肝癌肿瘤生长的机制,本实验运用 Real-time PCR 和 Western blot 观察该方联合 5-FU 对 EMT 相关标志物 E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Twist, Snail mRNA 和蛋白表达的影响。Real-time PCR 结果显示 5-FU 组, 5FU + 理冲汤加减组均能上调 E-cadherin, 且 5-FU + 理冲汤加减组上调程度高于 5-FU + 理冲汤加减组; 5-FU 组, 5FU + 理冲汤加减组, 理冲汤加减组均能下调 N-cadherin, Snail, Twist, 且其下调程度由高至低依次为 5-FU + 理冲汤加减组, 5-FU 组, 理冲汤加减组。Western blot 结果显示 5-FU 组, 5FU + 理冲汤加减组, 理冲汤加减组均能上调 E-cadherin, 且其上调程度由高至低依次为 5-FU + 理冲汤加减组, 5-FU 组, 理冲汤加减组; N-cadherin, Snail, Vimentin, 且其下调程度由高至低依次为 5-FU + 理冲汤加减组, 5-FU 组, 理冲汤加减组, 这与文献报道多种实体恶性肿瘤中表达趋势的结论一致^[34]。

综上所述,益气化瘀基本方理冲汤加减与 5-FU 联用起到协同抑制肝癌肿瘤生长的作用,且能降低 5-FU 对免疫器官的毒副作用,起到减毒增效的作用。进一步通过 Real-time PCR 及 Western blot 检测瘤体内 EMT 相关标志物 E-cadherin, N-cadherin, Snail, Vimentin, Twist 表达,说明益气化瘀基本方理冲汤加减配合 5-FU 单独及联合使用均能抑制肝癌 EMT, 且理冲汤加减与 5-FU 联用效果优于 5-FU 单

独使用,进一步阐明了理冲汤加减与 5-FU 联用抑制肿瘤生长可能是通过抑制肿瘤 EMT 实现的,但是肿瘤生长的调控机制受多方面影响,关于理冲汤加减的抑瘤机制尚待进一步探索研究。

[参考文献]

- [1] 陆再英,钟南山.内科学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2012:457.
- [2] WANG F S, FAN J G, ZHANG Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. Hepatology, 2014, 60(6):2099-2108.
- [3] 马文杰,蒋春鹤.中医药治疗原发性肝癌的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2015,15(A4):45-46.
- [4] 邱宇航,孙珏.中医药治疗对提高肿瘤患者生存质量的意义[J].内蒙古中医药,2017,36(16):99-100.
- [5] 张锡纯.医学衷中参西录[M].太原:山西科学技术出版社,2009:168.
- [6] 吕玲,张立,李能莲,等.黄芪的抗肿瘤作用[J].世界临床药物,2014,35(5):324-328.
- [7] 武超,许杜娟,杨翠,等.黄芪皂苷 II 增加 5-氟尿嘧啶对人肝癌细胞株 HepG2 增殖抑制作用[J].安徽医科大学学报,2016,51(1):78-82.
- [8] 武静莲,徐强,谢亲建,等.党参抗肿瘤药理作用研究[J].西部中医药,2016,29(8):18-21.
- [9] 冯娅茹,张文婷,李二文,等.三棱化学成分及药理作用研究进展[J].中草药,2017,48(22):4804-4818.
- [10] 李学臣,张涛,魏晓东.三棱提取物对 H22 荷瘤小鼠的抑瘤作用[J].黑龙江医药科学,2010,33(5):78.
- [11] 赵志梅,张立杰,夏天,等.莪术主要单体成分抗炎、抗肿瘤作用研究进展[J].药物评价研究,2017,40(1):119-124.
- [12] 卢冬雪,祁明浩,薛恬,等.刘沈林治疗晚期消化道肿瘤用药经验[J].世界中西医结合杂志,2017,12(8):1064-1068.
- [13] 臧文华,唐德才,尹刚,等.黄芪-莪术配伍及联合顺铂对人肝癌裸鼠原位移植瘤生长的抑制作用[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(5):131-136.
- [14] 臧文华,黄显章,唐德才,等.黄芪-莪术联合顺铂诱导肝癌细胞凋亡及其对 miR-122a, miR-221, miR-151 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(17):87-91.
- [15] WU S X, WU G X, HE S, et al. Antitumor effect of volatile oil from sinapis albae semen on H₂₂-bearing mice and its mechanism[J]. Chin Trad Herbal Drugs, 2013,

- 44(21):3024-3029.
- [16] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000:145.
- [17] Sanceau J, Poupon M F, Delattre O, et al. Strong inhibition of ewing tumor xenograft growth by combination of human interferon-alpha or interferon-beta with ifosfamide [J]. *Oncogene*, 2002, 21 (50): 7700-7709.
- [18] 金正均. 等概率和曲线与“ Q_{50} ”——估计合并用药效果的一种新方法[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 1981, 1(1):15-18,86.
- [19] Hay E D. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it[J]. *Dev Dyn*, 2005, 233(3):706-720.
- [20] Boyer B, Vallés A M, Edme N. Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60(8):1091-1099.
- [21] KANG Y, Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions; twist indevelopment and metastasis [J]. *Cell*, 2004, 118(3):277-279.
- [22] Kalluri R. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6):1417-1419.
- [23] Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology [J]. *Pathology*, 2007, 39(3):305-318.
- [24] Tepass U, Truong K, Godt D, Ikura M, et al. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, 1(2):91-100.
- [25] Hazan R B, Phillips G R, QIAO R F, et al. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis [J]. *J Cell Biol*, 2000, 148(4):779-790.
- [26] 魏荷花, 杨英捷, 訾聘. N-cadherin 和肿瘤干细胞相关标志物在卵巢上皮性肿瘤中的表达[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(5):1055-1057.
- [27] 申震. E-Cadherin 及 Vimentin 在子宫颈鳞癌中的表达及其与上皮-间质转化的相关性[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2013.
- [28] Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression; an alliance against the epithelial phenotype [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(6):415-428.
- [29] Grau Y, Carteret C, Simpson P. Mutations and chromosomal rearrangements affecting the expression of Snail, a gene involved in embryonic patterning in DROSOPHILA MELANOGASTER [J]. *Genetics*, 1984, 108(2):347-360.
- [30] WANG Y, Ngo VN, Marani M, et al. Critical role for transcriptional repressor Snail2 in transformation by oncogenic RAS in colorectal carcinoma cells [J]. *Oncogene*, 2010, 29(33):4658-4670.
- [31] Salerno P, Garcia-Rostan G, Piccinin S, et al. Twist1 plays a pleiotropic role in determining the anaplastic thyroidcancer phenotype [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(5):772-781.
- [32] 方雪妮, 周天, 李泉旺, 等. TWIST 表达与恶性肿瘤转移关系的研究进展 [J]. 中国肿瘤, 2016, 25(11):893-897.
- [33] HU F W, TSAI L L, YU C H, et al. Impairment of tumor-initiating stem-like property and reversal of epithelial-mesenchymal transdifferentiation in head and neck cancer by resveratrol treatment [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2012, 56(8):1247-1258.
- [34] Fischer K R, Durrans A, Lee S, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance [J]. *Nature*, 2015, 527(7579):472-476.

[责任编辑 张丰丰]