

· 经典名方 ·

# 加味四君子汤对 H22 荷瘤小鼠移植瘤血管生成的影响

金彤<sup>1,2</sup>, 陈莉媚<sup>1,2</sup>, 宁春桃<sup>2</sup>, 林敬明<sup>2\*</sup>

(1. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515; 2. 南方医科大学珠江医院, 广州 510282)

**[摘要]** 目的:观察加味四君子汤对 H22 荷瘤小鼠移植瘤血管生成的影响,并探讨其机制。方法:小鼠成瘤实验观察加味四君子汤对荷瘤小鼠的抑瘤和对瘤周血管生长的影响。苏木素-伊红(HE)染色及免疫组化(IHC)检测荷瘤小鼠移植瘤中血管分布水平和血管内皮标记物(CD31)的表达水平。逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测肿瘤组织血管内皮生长因子(VEGF),血管内皮生长因子受体2(VEGFR2),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) mRNA 表达。结果:加味四君子汤低、中、高剂量组(*ig*, 11.83, 23.66, 47.32 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)抑瘤率分别达到 29.97%, 59.80%, 82.34%。与模型组相比,加味四君子汤中、高剂量组的平均瘤重明显降低( $P < 0.05$ )。通过观察瘤周血管数及形态发现,加味四君子汤中、高剂量组瘤周血管数较模型组有所减少( $P < 0.05$ ),且血管管腔较窄。HE染色显示加味四君子汤中、高剂量组移植瘤中的血管分布均少于模型组。免疫组化显示加味四君子汤各剂量组的 CD31 阳性表达量均低于模型组( $P < 0.01$ )。RT-PCR 结果显示加味四君子汤中、高剂量组移植瘤 VEGF, VEGFR2, TNF- $\alpha$  mRNA 表达量均低于模型组( $P < 0.01$ )。结论:加味四君子汤能够抑制 H22 荷瘤小鼠肿瘤生长,并抑制移植瘤血管新生,这可能与降低 TNF- $\alpha$ , VEGF, VEGFR2 的表达水平有关。

**[关键词]** 加味四君子汤; 移植瘤; 血管; 血管内皮生长因子; 血管内皮生长因子受体2; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; CD31

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)10-0001-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191025

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190211.2001.005.html>

**[网络出版时间]** 2019-02-12 12:09

## Effect of Modified Si Junzitang on Angiogenesis of H22 Tumor-bearing Mice

JIN Tong<sup>1,2</sup>, CHEN Li-mei<sup>1,2</sup>, NING Chun-tao<sup>2</sup>, LIN Jing-ming<sup>2\*</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of modified Si Junzitang on angiogenesis in transplanted tumor of H22 tumor-bearing mice. **Method:** The effect of modified Si Junzitang on tumor inhibition and growth of peripheral blood vessels in tumor-bearing mice was observed by tumorigenesis experiment in mice. Hematoxylin-eosin (HE) staining and immunohistochemistry (IHC) were used to detect the distribution of blood vessels and the expression of vascular endothelial markers (CD31) in tumor-bearing mice. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in tumor tissue. **Result:** The inhibition rates of modified Sijunzi Tang in low-dose group (*ig*, 11.83 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), middle-dose group (*ig*, 23.66 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) and high-dose group (*ig*, 47.32 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) were 29.97%, 59.80% and 82.34%, respectively. Compared with the model group, the average tumor weight was lower in middle and high-dose groups, with statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). Through the observation of the number and

**[收稿日期]** 20190116(007)

**[基金项目]** 广东省自然科学基金项目(2017A030313741); 海珠区科普计划项目(2014HZKP-DS-2); 广州市科技计划项目(201609010046)

**[第一作者]** 金彤, 硕士, 从事中药抗肿瘤药物的作用机制的研究, E-mail: 741580882@qq.com

**[通信作者]** \*林敬明, 博士, 教授, 从事中草药有效成分的提取分离以及活性研究, E-mail: linjm1231@163.com

morphology of pericardial vessels, the number of pericytes in middle and high-dose modified Sijunzitang groups was reduced compared with the model group ( $P < 0.05$ ), and the vascular lumen was narrow. HE staining showed that the distribution of blood vessels in middle and high-dose modified Si Junzitang groups was less than that of the model group. IHC showed that the positive expression of CD31 in each dose modified Si Junzitang group was lower than that in the model group ( $P < 0.01$ ). RT-PCR showed that the mRNA expressions of VEGF, VEGFR2 and TNF- $\alpha$  in middle and high-dose modified Si Junzitang groups were lower than those in the model group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Modified Si Junzitang can inhibit the tumor growth of H22 tumor-bearing mice and the angiogenesis of transplanted tumors, which may be related to the reduction of TNF- $\alpha$ , VEGF and VEGFR2 expression levels.

**[Key words]** modified Si Junzitang; transplanted tumor; blood vessel; vascular endothelial growth factor (VEGF); vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2); tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); CD31

原发性肝癌是全球癌症死亡的第三大原因,在全球诸多死亡病例中,仅我国就占 50%,这严重威胁了我国人民的生命和健康<sup>[1]</sup>。原发性肝癌主要包括肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC),肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)和 HCC-ICC 混合型 3 种不同病理类型,其中肝细胞癌占 85%~90%<sup>[2]</sup>。传统的治疗原发性肝癌的手段主要有手术治疗、系统化疗和靶向治疗等<sup>[3]</sup>,但是这些治疗效果并不十分理想,存在着易复发且预后差的缺陷。因此,寻找新的治疗方法至关重要。近年来,中医药在辅助治疗肿瘤方面发挥着其独特的作用,其参与辅助治疗肿瘤的方案也日趋多样化,包括抗肿瘤血管新生、提高机体免疫功能、诱导肿瘤细胞凋亡、肿瘤细胞自噬<sup>[4]</sup>等途径。其中中医药在抗肿瘤血管新生这方面具有丰富的经验。中医认为肿瘤血管生成的病机相当于中医癌病“络道亢进、络脉生成”,具体可以概括为瘀血、痰浊、湿毒等诸邪长期互结于络道,邪毒内蕴阻迫,致使络道恣行,增生无制,亢而为变,引起络脉生成的结果。因此,破血逐瘀、软坚散结、解毒通络、荣养络脉等方法为其主要治则<sup>[5]</sup>。

四君子汤出自宋代《太平惠民和剂局方》,是健脾益气的代表方,现代被广泛应用于肝癌等肿瘤的临床辅助治疗<sup>[6]</sup>。石斛具有滋阴清热、保肝护胆、抗肿瘤的功能<sup>[7]</sup>。半枝莲具有清热解毒、败毒抗癌、消肿散结的作用。本课题组前期研究发现半枝莲提取物能够抑制 HepG2<sup>[8]</sup>和 QGY-7701<sup>[9]</sup>细胞增殖,促进细胞凋亡。本研究以四君子汤为基础,加味半枝莲和石斛以提升四君子汤健脾益气、扶正祛邪和抗肿瘤的作用,组成加味四君子汤。由于大多数文献报道中药复方在抗肿瘤的同时常伴随着抑制血管生成的作用<sup>[10]</sup>,虽然本课题组前期已证实加味

四君子汤含药血清能体外抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖<sup>[11]</sup>,但加味四君子汤影响肿瘤血管新生的研究目前尚无报道。为进一步探讨加味四君子汤抗肿瘤与肿瘤血管新生的关系,本研究以 H22 荷瘤小鼠为模型,探讨加味四君子汤对肝癌血管生成的影响。

## 1 材料

**1.1 药物制备** 加味四君子汤方药组成:人参片 9 g,白术 9 g,茯苓 9 g,炙甘草 6 g,半枝莲 30 g,石斛 15 g,以上药材由南方医科大学珠江医院中药房提供,经南方医科大学中医药学院张宏伟教授鉴定符合 2015 年版《中国药典》标准。10 倍量加味四君子汤药材(人参片 90 g,白术 90 g,茯苓 90 g,炙甘草 60 g,半枝莲 300 g,石斛 150 g)加入 10 倍量的超纯水浸渍 30 min,回流提取 3 次,每次 2 h,合并 3 次提取液,过滤,旋转蒸发仪浓缩药液至含生药 1.0 g·mL<sup>-1</sup>,4 ℃ 储存备用。

**1.2 动物和细胞** 56 只 SPF 级 6 周龄雌性昆明种小鼠,体质量(25 ± 2)g,购自南方医科大学动物中心,合格证号 SCXK(粤)2016-0041,经南方医科大学伦理委员会通过。鼠肝癌 H22 细胞由南方医科大学中西医结合医院肿瘤科馈赠。

**1.3 药物与试剂** 环磷酰胺(百特国际有限公司,批号 6F125A,0.2 g/片);高糖 DMEM(美国 BI 公司,批号 0033617);胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 42Q7380K);CD31 抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号 GB13063);总 RNA 提取试剂盒(北京天漠科技开发有限公司,批号 TM180926);苏木素-伊红(HE,上海贝博生物科技有限公司,批号 BB-44202-1);引物由武汉赛维尔生物科技有限公司设计和合成, $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin, 287 bp):上游 5'-GTGACGTTGACATCCGTAAGA-3',下游 5'-GTAACACTCCGCCTAGAAGCAC-3';血管内皮生

长因子 (VEGF, 198 bp): 上游 5'-AGGAGTACCCC GACGAGATAGA-3', 下游 5'-CACATCTGCTGTGCT GTAGGAA-3'; 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , 205 bp): 上游 5'-TGGAAGTGGCAGAAGAGGCAC-3', 下游 5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACTGA-3'; 血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2, 177 bp): 上游 5'-TTTGG CAAATACAACCCTTCAGA-3', 下游 5'-GCTCCAGTA TCATTTCCAACCA-3'。

**1.4 仪器** B220 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); Centrifuge 5415R 型高速冷冻离心机 (美国 Eppendorf AG 公司); SZX-11LB200 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); HE600 型全自动 HE 染色机 (瑞士罗氏公司); TP600 型 PCR 仪 (日本 TaKaRa 公司); TY2795 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 H22 细胞培养** 鼠肝癌 H22 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基培养于培养皿中, 置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中, 隔天换液, 倒置显微镜下观察细胞的生长状态, 当细胞的汇合度达到 70% ~ 80% 时, 进行传代或用于实验。

**2.2 昆明种小鼠腹水获取** 取对数生长期 H22 细胞, 800 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 去上清, 细胞计数, 调整细胞密度为 1 × 10<sup>7</sup> 个/mL。随机取 2 只昆明种小鼠, 用 1 mL 注射器取细胞混悬液 0.2 mL 注入每只小鼠腹腔中, 观察腹部状态, 7 ~ 10 d 后, 若见小鼠腹部明显膨大, 说明接种成功, 可进行腹水传代<sup>[12]</sup>。将小鼠颈椎脱臼处死, 于超净台中抽取乳白色腹水, 用 PBS 稀释腹水细胞密度至 1 × 10<sup>7</sup> 个/mL, 继续取细胞 0.2 mL 注入小鼠腹腔, 3 次传代后, 取第 3 代腹水细胞即可进行昆明小鼠荷瘤实验。

**2.3 昆明种小鼠皮下成瘤实验** 取第 3 代腹水 H22 细胞, 细胞计数, 调整细胞密度为 5 × 10<sup>6</sup> 个/mL, 于 42 只雌性昆明种小鼠腹部中线皮下注射细胞悬液, 每只 0.2 mL。接种 1 ~ 2 d 后, 若用游标卡尺测得肿瘤直径为 1 mm<sup>3</sup> 左右, 随机分为假手术组, 模型组, 环磷酰胺组, 加味四君子汤低、中、高剂量组, 每组 7 只, 另取 7 只未作任何处理的小鼠设为空白组。根据“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”计算小鼠等效剂量, 加味四君子汤低、中、高剂量组灌胃 11.83, 23.66, 47.32 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 环磷酰胺组环磷酰胺腹腔注射 20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 空白组和模型组灌胃生理盐水剂量为 20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 假手术组不作灌胃处理。加味四君子汤低、中、高剂量组、空白组、模型组每日灌胃给药 2 次, 早晚各

1 次, 环磷酰胺组每日给药 1 次。各组均连续给药 10 d, 第 10 天禁食不禁水, 次日, 眼眶取血后断颈处死小鼠, 剥取腹部瘤周皮肤和肿瘤, 计数肿瘤血管生成条数, 称量肿瘤质量, 记录瘤质量, 计算各组抑瘤率。各移植瘤切取 1 cm × 1 cm × 0.3 cm 大小组织 1 块, 放于 10% 甲醛中固定 24 h, 石蜡包埋, 其余组织于 -80 °C 保存, 以备后续实验。

各组抑瘤率 = (1 - 给药组平均瘤质量/模型组平均瘤质量) × 100%

**2.4 HE 染色观察** H22 荷瘤小鼠移植瘤组织中血管生成水平 肿瘤组织制作蜡块切片, 全自动 HE 染色机进行 HE 染色, 显微镜下观察并采集图像。

**2.5 免疫组化法检测** H22 荷瘤小鼠移植瘤组织中 CD31 的蛋白表达水平 肿瘤组织石蜡切片常规脱蜡至水, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性, 热修复抗原 5 min。滴加 CD31 (1:200), 37 °C 孵育 2 h, DAB 室温下显色。苏木精复染, 脱水、透明、中性树胶封片, 显微镜下观察并采集图像。用图像处理 Image J (1.50) 软件进行半定量分析, 测量 CD31 的积分吸光度 IA 及面积 (area), 用平均吸光度 = IA/area 来反映 CD31 蛋白表达变化。

**2.6 逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测** 肿瘤组织 VEGF, VEGFR-2, TNF- $\alpha$  mRNA 相对表达 取保存于 -80 °C 的瘤组织, 用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 微量分光光度计检测 RNA 样品纯度, 然后按照反应体系进行逆转录以及 PCR 反应。PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 循环 40 次。PCR 产物琼脂糖电泳, 电泳结束后, 在凝胶成像系统紫外线照射下观察电泳条带情况并拍照。用图像处理 Image J (1.50) 软件对电泳条带进行灰度分析, 以目的条带的灰度值与  $\beta$ -actin 条带的灰度值的比值, 半定量分析 mRNA 的表达情况。

**2.7 统计学方法** 采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较方差齐时采用 LSD 检验, 方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 加味四君子汤对 H22 荷瘤小鼠抑瘤率的影响** 加味四君子汤对 H22 荷瘤小鼠的移植瘤生长具有明显抑制作用, 加味四君子汤低、中、高剂量组抑瘤率分别为 29.97%, 59.80%, 82.34%。与模型组比较, 加味四君子汤中、高剂量组的平均瘤重均明显减小 (P < 0.05)。与环磷酰胺组比较, 加味四君子汤

高剂量组平均瘤重有所减小,但差异无统计学意义。见表 1。

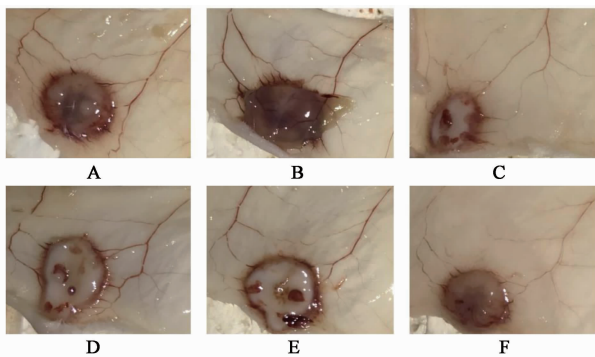
表 1 加味四君子汤对 H22 荷瘤小鼠抑瘤率的影响

Table 1 Effect of modified Si Junzitang on tumor inhibition rate of H22 tumor-bearing mice

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	瘤重( $\bar{x} \pm s, n=7$ )/g	抑瘤率/%
假手术	-	0.94 ± 0.46	-
模型	-	1.07 ± 0.27	-
环磷酰胺	20	0.21 ± 0.03 <sup>1)</sup>	79.91
加味四君子汤	11.83	0.77 ± 0.15 <sup>1)</sup>	29.97
	23.66	0.43 ± 0.03 <sup>1,2)</sup>	59.80
	47.32	0.19 ± 0.04 <sup>1)</sup>	82.34

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与环磷酰胺组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$  (表 2 同)。

**3.2 加味四君子汤对 H22 荷瘤小鼠癌周血管生长的影响** 假手术组与模型组瘤体边缘表面分布着大量的新生血管,血管管腔粗大且分支多而卷曲。与模型组比较,加味四君子汤低剂量组肿瘤周边血管管腔狭窄,分支有所减少;加味四君子汤中剂量组肿瘤周边新生血管数量有所减少,分支血管管腔狭窄;加味四君子汤高剂量组肿瘤表面新生血管数量明显减少,血管管腔明显狭窄;环磷酰胺组肿瘤表面新生血管有所减少,血管排列紊乱,血管管腔狭窄。计数癌周血管数结果显示,与模型组比较,加味四君子汤高剂量组癌周血管数相对较少( $P < 0.05$ )。与环磷酰胺组比较,加味四君子汤高剂量组癌周血管数有所减少( $P < 0.05$ )。见图 1,表 2。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 环磷酰胺组; D. 加味四君子汤低剂量组; E. 加味四君子汤中剂量组; F. 加味四君子汤高剂量组 (图 2 ~ 4 同)

图 1 加味四君子汤对 H22 荷瘤小鼠癌周血管生长的影响

Fig.1 Effect of modified Si Junzitang on pericancerous vascular growth in H22 tumor-bearing mice

**3.3 加味四君子汤对 H22 荷瘤小鼠移植瘤血管新生的影响** 假手术组和模型组肿瘤组织内伴有大量新生血管,肿瘤细胞排列紧密,并见小片坏死灶。与

表 2 加味四君子汤对 H22 荷瘤小鼠癌周血管生长的影响( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

Table 2 Effect of modified Si Junzitang on pericancerous vascular growth in H22 tumor-bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	血管数/条
假手术	-	9.40 ± 2.30
模型	-	9.40 ± 1.67
环磷酰胺	20	4.40 ± 1.14 <sup>1)</sup>
加味四君子汤	11.83	6.60 ± 2.97
	23.66	6.20 ± 3.59 <sup>1)</sup>
	47.32	3.00 ± 0.71 <sup>1,2)</sup>

模型组比较,环磷酰胺组和加味四君子汤高剂量组肿瘤组织内仅有少数新生血管,肿瘤细胞排列松散,呈现大片坏死域,加味四君子汤中剂量组肿瘤组织内新生血管明显减少,肿瘤细胞排列松散,呈现较大面积的坏死区域,加味四君子汤低剂量组肿瘤组织内新生血管有所减少,肿瘤细胞排列松散,呈现一定范围的坏死灶。见图 2。

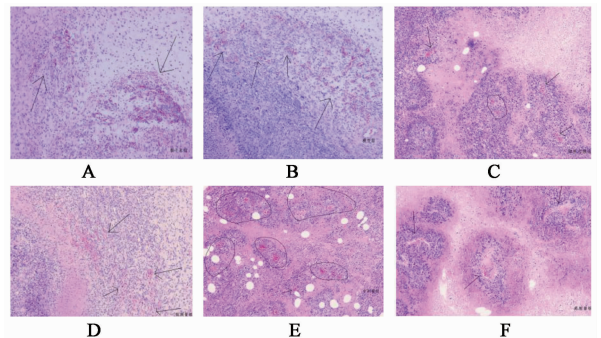


图 2 加味四君子汤对 H22 荷瘤小鼠移植瘤血管新生的影响 (HE, ×100)

Fig.2 Effect of modified Si Junzitang on angiogenesis of H22 tumor-bearing mice (HE, ×100)

**3.4 加味四君子汤对 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织 CD31 蛋白表达的影响** 模型组肿瘤组织弥散着 CD31 黄褐色沉着。与模型组比较,加味四君子汤低、中、高剂量组肿瘤组织 CD31 阳性表达均显著减弱( $P < 0.01$ )。与环磷酰胺组比较,加味四君子汤低、中、高剂量组肿瘤组织 CD31 阳性表达均显著升高( $P < 0.01$ )。见表 3,图 3。

**3.5 加味四君子汤对 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织 VEGF, VEGFR2, TNF- $\alpha$  mRNA 表达的影响** 与模型组相比,环磷酰胺组、加味四君子汤中、高剂量组 VEGF, VEGFR2, TNF- $\alpha$  mRNA 表达含量均降低( $P < 0.01$ )。与环磷酰胺组比较,加味四君子汤低、中、高剂量组 VEGF, VEGFR2, TNF- $\alpha$  mRNA 表达含量

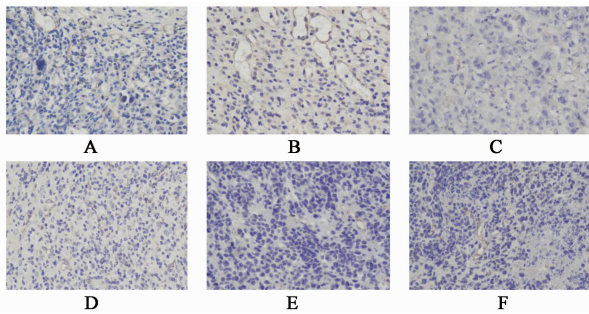


图 3 加味四君子汤对 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织中 CD31 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of modified Si Junzitang on CD31 protein expression in tumor tissue of H22 tumor-bearing mice (IHC, ×400)

表 3 加味四君子汤对 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织中 CD31 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

Table 3 Effect of modified Si Junzitang on CD31 protein expression in tumor tissue of H22 tumor-bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	CD31
假手术	-	0.23 ± 0.01
模型	-	0.24 ± 0.02
环磷酰胺	20	0.04 ± 0.01 <sup>1)</sup>
加味四君子汤	11.83	0.11 ± 0.01 <sup>1,2)</sup>
	23.66	0.09 ± 0.01 <sup>1,2)</sup>
	47.32	0.06 ± 0.01 <sup>1,2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与环磷酰胺组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 4 同)。

均升高( $P < 0.01$ )。见图 4,表 4。

表 4 加味四君子汤对 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织 VEGF, VEGFR2, TNF- $\alpha$  mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

Table 4 Effect of modified Si Junzitang on mRNA expressions of VEGF, VEGFR2 and TNF- $\alpha$  in tumor tissues of H22 tumor-bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	VEGF/ $\beta$ -actin	VEGFR2/ $\beta$ -actin	TNF- $\alpha$ / $\beta$ -actin
假手术	-	0.932 ± 0.011	0.979 ± 0.053	1.091 ± 0.031
模型	-	0.985 ± 0.007	1.062 ± 0.021	1.028 ± 0.018
环磷酰胺	20	0.360 ± 0.004 <sup>1)</sup>	0.441 ± 0.003 <sup>1)</sup>	0.233 ± 0.036 <sup>1)</sup>
加味四君子汤	11.83	0.971 ± 0.013 <sup>2)</sup>	0.796 ± 0.004 <sup>1,2)</sup>	0.935 ± 0.026 <sup>1,2)</sup>
	23.66	0.649 ± 0.009 <sup>1,2)</sup>	0.558 ± 0.011 <sup>1,2)</sup>	0.321 ± 0.016 <sup>1,2)</sup>
	47.32	0.386 ± 0.001 <sup>1,2)</sup>	0.462 ± 0.020 <sup>1,2)</sup>	0.279 ± 0.015 <sup>1,2)</sup>

2 年,肿瘤的复发明显低于对照组患者,生存率明显高于对照组患者,这可能与四君子汤的扶正固本,提高机体免疫力的作用有关<sup>[13]</sup>,该方与不同功效的中药和中药复方联合应用后更能多方位、多靶点发挥其抗肿瘤作用<sup>[14]</sup>。半枝莲清热解毒、活血化瘀,石斛滋阴清热、保肝护胆,两者均具有抗肿瘤作用,本课题组前期研究也发现半枝莲能抑制肝癌细胞

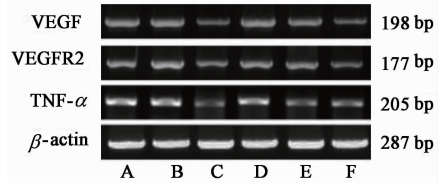


图 4 加味四君子汤作用 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织 VEGF, VEGFR2, TNF- $\alpha$  mRNA 表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of modified Si Junzitang VEGF, VEGFR2 and TNF- $\alpha$  mRNA expressions in tumor tissues of H22 tumor-bearing mice

#### 4 讨论

在中医理论中,肿瘤血管生成相当于中医癌病“络道亢进、络脉生成”,是一种病机,类同中医“病络”。其治疗方法为,在肿瘤“病络”初期可通过破血逐瘀、软坚散结的方法来阻抑络道亢变,减少癌毒对癌瘤周围组织的侵蚀。在肿瘤“病络”中后期可通过解毒通络、荣养络脉等方法针对络脉久病导致的机体自我抵御、修复能力进行性减弱,癌证病情恶化、缠绵难愈等状况。因此,运用活血化瘀药,对肿瘤的血络具有阻抑效能。运用补益药,对肿瘤后期具有扶正固本的作用<sup>[5]</sup>。四君子汤出自宋代《太平惠民和剂局方》,由人参片、白术、茯苓、炙甘草组成,全方不偏不盛,不热不燥,不仅在肿瘤晚期、正气亏虚之时,发挥了其“调补正气,扶正固本”的作用,临床研究发现, HCC 根治后患者口服四君子汤

增殖、诱导其凋亡和周期阻滞<sup>[8-9]</sup>,WANG 等<sup>[15]</sup>发现半枝莲乙醇提取物能够明显抑制血管生成。因此本方在四君子汤的基础上加味半枝莲、石斛,提升四君子汤扶正祛邪、抗肿瘤的作用,全方健脾益气、活血通络、化毒解瘀、扶正固本,顺应了肿瘤“病络”初中后期的治疗原则。前期研究已证实加味四君子汤含药血清抑制肝癌 HepG2 细胞生长的机制可能

通过影响肝癌的磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路,抑制其关键靶点 Akt, mTOR, 4EBP1 的磷酸化,进而上调 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bax) 的表达,下调 Bcl-2, 细胞周期蛋白 (cyclinD<sub>1</sub>) 的表达,从而诱导细胞凋亡,抑制肝癌细胞的增殖<sup>[11]</sup>。

小鼠成瘤实验是经典的药物抗肿瘤实验,该实验具有特异性强、干扰因素少等优点。本研究发现加味四君子汤除了具有抑瘤作用,通过肉眼观察发现加味四君子汤高剂量组的癌周血管数明显少于模型组,且血管管腔狭窄,分支减少。通过肿瘤组织 HE 染色观察可见,模型组肿瘤组织内伴随大量新生血管,而加味四君子汤高剂量组肿瘤组织内仅有少数新生血管。血小板-内皮细胞黏附分子 CD31 是血管内皮分化的标志,主要存在于血管内皮组织,对 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织 CD31 免疫组化染色,可以评估加味四君子汤对肿瘤血管新生的影响<sup>[16]</sup>。本实验免疫组化结果显示,加味四君子汤高剂量组的 CD31 阳性表达量明显低于模型组,说明加味四君子汤可以影响体内肿瘤的血管新生。

自 1971 年 Folkman 教授提出了“肿瘤生长和转移依赖于新生血管生成”的理论,即通过抑制肿瘤血管相关基因的表达,抑制肿瘤血管生成,使肿瘤细胞无法得到生长所需的物质,从而有效阻断肿瘤的发展进程,该理论的出现为抗肿瘤研究提供了新的方向和理论基础<sup>[17]</sup>。近年来,以 VEGF 及其受体 VEGFR 为靶点的肿瘤抗血管治疗是国内外癌症治疗研究的热点<sup>[18]</sup>。VEGF, VEGFR 是介导新生血管生成的重要因素,可强烈促使血管内皮细胞进行有丝分裂,进而形成新的血管,是促进肿瘤血管生成最强的细胞因子,VEGF 包括多个亚型 VEGF-A, B, C, D, E, F 等,VEGFR 包括 VEGFR1 和 VEGFR2<sup>[19]</sup>。Lee 等<sup>[20]</sup>发现间充质干细胞 (MSCs) 的外泌体可以下调肿瘤细胞 VEGF 的表达,从而在体外和体内抑制血管生成。王容容等<sup>[21]</sup>发现健脾消癌方可能是通过调控磷酸酶和张力蛋白同源物 (PTEN)/PI3K/Akt 信号通路降低组织 VEGF 和 VEGFR2 表达,达到抗血管生成从而拮抗大肠癌肝转移的目的。WANG 等<sup>[22]</sup>发现 PAC-1 及其衍生物 WF-210 可以通过抑制 VEGF/VEGFR 途径抑制血管生成。而在肿瘤发生过程中常伴随着炎症反应,炎症细胞分泌各种炎性因子, TNF- $\alpha$  是炎症反应的最基本因子之一,除了具有促进肿瘤细胞的增生、侵袭、转移等作用,也可对 VEGF 的表达进行调节,从而间接促进血

管的生成。Kim 等<sup>[23]</sup>发现人翼状胬肉成纤维细胞被 TNF- $\alpha$  刺激后, VEGF-C 的表达水平显著提高。本研究 RT-PCR 结果显示,和模型组相比,加味四君子汤高剂量组的 VEGF, VEGFR2, TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平明显降低,这说明加味四君子汤可能在肿瘤发生的炎症反应过程中,下调 TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平,减少 VEGF, VEGFR2 的表达,从而抑制肿瘤血管新生。

综上所述,本课题组推测加味四君子汤可能通过下调 H22 荷瘤小鼠 VEGF, VEGFR2, TNF- $\alpha$  水平,减弱肿瘤组织 CD31 表达,减少肿瘤组织新生血管,抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡,从而抑制 H22 荷瘤小鼠肿瘤生长,具体发生机制还有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Meglynn K A, Petrick J L, London W T. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma an emphasis on demographic and regional variability [J]. Clin Liver Dis, 2015, 19(2): 223-238.
- [3] 邵艳, 管静芝. 原发性肝癌治疗进展 [J]. 传染病信息, 2016, 29(4): 248-252.
- [4] 张甘霖, 杨国旺, 于明薇, 等. 自噬——中医药抗肿瘤研究的新方向 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(2): 507-510.
- [5] 奚胜艳, 高学敏, 张建军, 等. 从中医络病与病络理论认识肿瘤血管生成 [J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(12): 804-807, 822.
- [6] 张广唱, 武哲丽. 四君子汤治疗肝癌实验研究概况 [J]. 山东中医杂志, 2015, 34(8): 643-645.
- [7] 许婉琦, 王奕博, 孙志蓉. 石斛属植物抗肿瘤研究情况分析 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(1): 130-134.
- [8] 林敬明, 刘煜, 罗荣城. 半枝莲提取物抗人肝癌 Hep-G2 细胞增殖及其机制研究 [J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(7): 975-977.
- [9] 林敬明, 刘煜, 罗荣城. 半枝莲抑制人肝癌 QGY-7701 细胞增殖研究 [J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(5): 591-593.
- [10] 初海蛟, 韩增祥, 梁芳. 中药复方抗肿瘤血管生成研究简况 [J]. 实用中医内科杂志, 2018, 32(4): 74-77.
- [11] 施胜英, 林海楨, 周激, 等. 加味四君子汤含药血清对肝癌 HepG2 细胞的影响 [J]. 中国实验方剂学杂

- 志, 2016, 22(18): 88-93.
- [12] 何小喜, 莫书荣. 红景天苷对腹水型 H<sub>22</sub> 肝癌抑制作用及其机制的初步研究 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(5): 688-691.
- [13] 陈燕, 胡浩, 张诗军, 等. 四君子汤对原发性肝癌术后患者 T 淋巴细胞和 NK 细胞的影响及意义 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2017, 27(1): 8-10.
- [14] 禹雯琦, 孙珏, 周诣, 等. 四君子汤及加味方治疗恶性肿瘤的临床及基础研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2017, 31(5): 95-101.
- [15] WANG T S, CHEN L J, WANG Z Y, et al. Purified alkaloid extract of *Scutellaria barbata* inhibits proliferation of hepatoma HepG-2 cells by inducing apoptosis and cell cycle arrest at G<sub>2</sub>/M phase [J]. Afr J Pharm Pharmacol, 2011, 5(8): 1046-1053.
- [16] Majchrzak K, Kaspera W, Szymas J, et al. Markers of angiogenesis (CD31, CD34, rCBV) and their prognostic value in low-grade gliomas [J]. Neurol Neurochir Pol, 2013, 47(4): 325-331.
- [17] 郭晓强, 隋爱霞. 癌症抗血管生成疗法——“饿死肿瘤, 挽救患者”治癌策略 [J]. 生命世界, 2016(8): 76-81.
- [18] Sitohy B, Nagy J A, Dvorak H F. Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: reassessing the target [J]. Cancer Res, 2012, 72(8): 1909-1914.
- [19] WANG Y, Nakayama M, Pitulescu M E, et al. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. Nature, 2010, 465(7297): 483-486.
- [20] Lee J K, Park S R, Jung B K, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e84256.
- [21] 王容容, 谭小宁, 李勇敏, 等. 健脾消癌方对大肠癌肝转移裸鼠模型肝组织 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(6): 177-181.
- [22] WANG F, WANG L, LI Y, et al. PAC-1 and its derivative WF-210 Inhibit Angiogenesis by inhibiting VEGF/VEGFR pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 821:29-38.
- [23] Kim K W, Lee S J, Kim J C. TNF-alpha upregulates HIF-1 alpha expression in pterygium fibroblasts and enhances their susceptibility to VEGF independent of hypoxia [J]. Exp Eye Res, 2017, 164:74-81.

[责任编辑 张丰丰]