

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

臧文华,唐德才*,尹刚,李冰冰
(南京中医药大学基础医学院,南京 210046)

[摘要] 目的:探讨补气活血药黄芪-莪术配伍以及联合顺铂(DDP)对人肝癌裸鼠原位移植瘤生长的抑制作用。方法:构建人肝癌裸鼠原位移植瘤模型。成瘤后,将其随机分为 8 组:模型对照组、阳性对照组(DDP 2 mg·kg⁻¹, ip)、黄芪-莪术配伍高剂量组(H,12 g·kg⁻¹·d⁻¹, ig)、黄芪-莪术配伍中剂量组(M,6 g·kg⁻¹·d⁻¹, ig)、黄芪-莪术配伍低剂量组(L,3 g·kg⁻¹·d⁻¹, ig)、黄芪-莪术配伍高剂量+顺铂组(H+DDP)、黄芪-莪术配伍中剂量+顺铂组(M+DDP)、黄芪-莪术配伍低剂量+顺铂组(L+DDP),每组 8 只。观察黄芪-莪术配伍对原位移植瘤的作用及与 DDP 合用的效果;免疫组化 SP 法检测肿瘤组织缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)的表达。结果:黄芪-莪术配伍 H, M, L 组的平均瘤重分别为(1.28 $\pm$ 0.21), (1.61 $\pm$ 0.28), (1.65 $\pm$ 0.27) g,平均瘤体积分别为(1 065.42 $\pm$ 275.63), (1 398.77 $\pm$ 358.75), (1 419.28 $\pm$ 405.17) mm³,均低于模型对照组的平均瘤重(2.19 $\pm$ 0.30) g 及平均瘤体积(1 866.21 $\pm$ 433.49) mm³(P <0.05, P <0.01);H+DDP, M+DDP, L+DDP 的平均瘤重分别为(0.48 $\pm$ 0.19), (0.83 $\pm$ 0.29), (1.01 $\pm$ 0.31) g,平均瘤体积分别为(381.86 $\pm$ 273.14), (704.09 $\pm$ 386.52), (827.75 $\pm$ 424.58) mm³,均低于 DDP 组,H+DDP 组有显著性差异(P <0.05)。免疫组化结果提示,黄芪-莪术配伍 H, M, L, H+DDP, M+DDP, L+DDP 各组 HIF-1 α , VEGF 阳性表达强度均下降,与模型对照组比较有显著性差异(P <0.05, P <0.01)。结论:黄芪-莪术配伍对人肝癌裸鼠原位移植瘤的生长有抑制作用,且抑制作用与剂量有一定的正相关性,其机制可能与对 HIF-1 α , VEGF 表达的抑制有关,与 DDP 合用表现为协同增效和相加作用。

[关键词] 黄芪;莪术;肝细胞癌;裸鼠;抑瘤
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)05-0131-06
[doi] 10.11653/syfy2014050131
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131218.1416.014.html>
[网络出版时间] 2013-12-18 14:16

Inhibition Effects of Compatibility of Astragali Radix and Curcumae Rhizoma
and Combination with Cisplatin on Orthotopic Tumor in
Nude Mice Bearing Human Hepatocellular Carcinoma

ZANG Wen-hua, TANG De-cai*, YIN Gang, LI Bing-bing
(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] Objective: To study the anti-tumor effects of Astragali Radix and Curcumae Rhizoma on the growth of transplanted human hepatocarcinoma in nude mice and its combinative effect with cisplatin (DDP). Method: Human hepatocarcinoma cells HepG2 were transplanted into nude mice to form the model, and the modeled mice were divided at random into 8 groups: model group, cisplatin (DDP) group (intraperitoneal injection with 2 mg·kg⁻¹ DDP), high dosage of Astragali Radix and Curcumae Rhisoma (H) (intragastric

[收稿日期] 20130614(007)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073072;81373990);江苏省高校优势学科建设工程一期项目南京中医药大学中医学一级学科开放研究课题资助项目(YS2012ZYX306)
[第一作者] 臧文华,博士研究生,从事临床中药学研究,E-mail:zangwenhua2004@163.com
[通讯作者] *唐德才,医学博士,教授,博士生导师,从事中药药性、配伍机制及应用研究,Tel:025-85811010,E-mail:talknow@163.com

administration with 12 g · kg⁻¹ · d⁻¹ physic liquor), intermediate dosage of Astragali Radix and Curcumae Rhizoma (M) (intra-gastric administration with 6 g · kg⁻¹ · d⁻¹ physic liquor), low dosage of Astragali Radix and Curcumae Rhizoma (L) (intra-gastric administration with 3 g · kg⁻¹ · d⁻¹ physic liquor), high dosage and cisplatin group (H + DDP), intermediate dosage and cisplatin group (M + DDP), low dosage and cisplatin group (L + DDP), 8 in each group. The effect of Astragali Radix and Curcumae Rhizoma on Transplantation tumor and combinative effect with DDP were observed. Expressions of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and Wascular endothelial growth factor (VEGF) protein in transplantation tumors were determined by immunohisto chemical method with an image analysis system. **Result:** The tumor weight and volume were (1.28 $\pm$ 0.21) g and (1 065.42 $\pm$ 275.63) mm³ in H, (1.61 $\pm$ 0.28) g and (1 398.77 $\pm$ 358.75) mm³ in M, (1.65 $\pm$ 0.27) g and (1 419.28 $\pm$ 405.17) mm³ in L, all significantly lower than those in model group (2.19 $\pm$ 0.30) g and (1 866.21 $\pm$ 433.49) mm³, ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The tumor weight and volume were (0.48 $\pm$ 0.19) g and (381.86 $\pm$ 273.14) mm³ in H + DDP, (0.83 $\pm$ 0.29) g and (704.09 $\pm$ 386.52) mm³ in M + DDP, (1.01 $\pm$ 0.31) g and (827.75 $\pm$ 424.58) mm³ in L + DDP. H + DDP group was significantly lower than DDP group ($P < 0.05$). Contrary to the model group, expressions of HIF-1 α and VEGF protein were significantly down-regulated by H, M, L, H + DDP, M + DDP and L + DDP group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Astragali Radix and Curcumae Rhizoma can inhibit the growth of human hepatocarcinoma in nude mice and the inhibition effect was positive correlation with dosage. The combination of Astragali Radix, Curcumae Rhizoma and DDP showed synergistic action and additive chemotherapeutic effect.

[**Key words**] Astragali Radix; Curcumae Rhizoma; hepatocellular carcinoma; nude mice; anti-tumor

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)具有高侵袭、易复发、预后差的临床病理特点,严重威胁患者的健康甚至生命,其易转移、复发率高是制约预后改善的瓶颈^[1]。中药配伍及其提取物抗肿瘤作用日益受到重视^[2-3]。本研究采用肝癌原位移植整体动物模型,对补气活血药物黄芪与莪术两药配伍联合化疗药物顺铂治疗肝癌进行疗效观察,采用免疫组化技术检测肿瘤组织缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)的表达,探讨补气活血法联合化疗药物对肝癌新生血管生成的影响,并证实其提高化疗药物对肿瘤的敏感性,为丰富和发展方剂配伍理论,指导临床安全合理用药提供科学依据。

1 材料

1.1 药品与试剂 根据课题组前期研究结果^[4],莪术品种采用温郁金。黄芪-莪术分别购自产地内蒙古、浙江,经南京中医药大学药学院吴德康教授鉴定,分别为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus*(Fisch.) Bge. var. *mongholicus*(Bge.) Hsiao 的干燥根以及姜科植物温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥根茎。注射用顺铂(齐鲁制药有限公司,批号 H20073652)。细胞培养液 RPMI 1640(美国 Gibco 公司);新生小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司产品,批

号 040622);胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);兔抗人血管内皮生长因子单克隆抗体(美国 Bioword 公司);SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物科技有限公司。

1.2 细胞株与动物 人肝癌细胞株 HepG2,购于扬州大学中心细胞库。BALB/c 雄性裸鼠,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物许可证号 SCXK(沪)2012-0006,5~6 周龄,体重 18~20 g,裸鼠置于恒温(24~27)℃、恒湿(45%~50%)、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、钴 60 辐射灭菌的专用颗粒饲料及钴 60 辐射灭菌 SPF 小鼠垫料分笼喂养。

1.3 仪器 GBB16 CO₂ 培养箱(德国 Heraen 公司),YJ-1450 型超净工作台(苏州净化设备厂),台式低速离心机(LDS-ZA,中国北京医用离心机厂),微量移液器(德国 Eppendorf 公司),倒置相差电子显微镜(日本 Olympus),石蜡切片机(RM2135,德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 HepG2 细胞培养 将人肝癌 HepG2 细胞置于含 10% 小牛血清、青霉素(100 U · mL⁻¹)、链霉素(100 U · mL⁻¹)的 RPMI 1640 培养液中,37℃、5% CO₂ 条件下培养,细胞贴壁生长,细胞生长至 3 d 左右,于倒置显微镜下观察细胞长满贴壁,即可传代,

每3 d传代1次。

2.2 造模 取对数生长期的人肝癌 HepG2 细胞,注射到裸鼠颈部皮下(每只接种 HepG2 细胞 $5 \times 10^6/100 \mu\text{L}$),1 周左右出现肉眼可见肿瘤,3 周肿瘤生长至 $0.8 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm} \times 1.2 \text{ cm}$ 时处死荷瘤裸鼠,无菌条件下剥离瘤体,放入 RPMI 1640 培养液中,剔除结缔组织,将肿瘤组织分割成 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 的组织碎块。另取一批裸鼠用 1% 戊巴比妥钠 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 行腹腔注射麻醉,手术视野皮肤消毒,于右肋缘下做长约 1 cm 的横切口,逐层入腹,暴露肝右叶;用眼科剪在肝实质剪出长约 2 mm、深约 2 mm 的切口,湿纱布压迫止血,将 1 块 HepG2 组织碎块植入切口内,用 8-0 外科无创缝线缝合固定。仔细检查无活动性出血后,用 5-0 外科缝线逐层关腹。整个操作过程在超净工作台中完成,术后不用抗生素。

2.3 药物制备 取黄芪-莪术各 150 g,加水浸泡 0.5 h,加 5 倍量水提取 2 次,每次 1 h,合并滤液,浓缩至 250 mL,回收莪术油,加入相应药液中,所得药液即为黄芪-莪术配伍高剂量组(黄芪-莪术质量浓度均为 $0.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),中剂量组药液浓度为高剂量的 1/2,低剂量组药液浓度为高剂量的 1/4。

2.4 动物分组及给药 肿瘤移植后的第 3 天,将 64 只裸鼠按体重随机分为 8 组,即模型对照组、阳性对照组(DDP)、黄芪-莪术配伍高剂量组(H)、黄芪-莪术配伍中剂量组(M)、黄芪-莪术配伍低剂量组(L)、黄芪-莪术配伍高剂量+顺铂组(H+DDP)、黄芪-莪术配伍中剂量+顺铂组(M+DDP)、黄芪-莪术配伍低剂量+顺铂组(L+DDP),每组 8 只,并开始给药治疗。根据“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”^[5]换算本实验的用药剂量,裸鼠给药剂量为人的 9 倍量,黄芪配伍莪术剂量标准: $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,中剂量为上述标准剂量,高剂量为标准剂量的 2 倍,低剂量为标准剂量的 1/2 倍。模型对照组予生理盐水灌胃给药,阳性对照组予 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 顺铂腹腔注射给药, H 组灌胃给予 $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 药液, M 组灌胃给予 $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 药液, L 组灌胃给予 $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 药液, H+DDP 组、M+DDP 组、L+DDP 组分别灌胃给予 12, 6, 3 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 药液联合 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 顺铂腹腔注射给药。灌胃给药体积均为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,每天 1 次,连续 21 d;顺铂每 3 d ip 1 次,共 7 次。用药期间每日观察各组裸鼠的精神、饮食、活动、大小便的一般情况,用药前后称取体重。

2.5 计算各组瘤体体积及瘤重 给药结束后第 2

天,颈椎脱臼处死裸鼠,完整剥离原位种植瘤,游标卡尺测量肿瘤长(a)、短径(b),并称瘤重,分别计算瘤体积抑制率及瘤重抑制率^[6]。

$$\text{瘤体积} = ab^2/2$$

$$\text{瘤体积抑制率} = (\text{对照组平均瘤体积} - \text{给药组平均瘤体积}) / \text{对照组平均瘤体积} \times 100\%$$

$$\text{瘤重抑制率} = (\text{对照组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}) / \text{对照组平均瘤重} \times 100\%$$

2.6 联合用药效应 根据金氏公式计算 q 值,判断黄芪-莪术配伍与 DDP 联合用药的效应: $q = E_{(a+b)} / (E_a + E_b - E_a \times E_b)$, E_a 和 E_b 为各药单用的抑制率, $E_{(a+b)}$ 为两药合用的抑制率,若 $q < 0.85$ 说明两药合用有拮抗作用,若 $0.85 < q < 1.15$ 说明两药合用有相加作用,若 $q > 1.15$ 说明两药合用有协同作用。

2.7 免疫组化检测 HIF-1 α , VEGF 的表达 肿瘤组织用 4% 中性甲醛固定、石蜡包埋,连续切片,片厚 5 μm 。免疫组化采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化氢酶(S-P)法:石蜡切片脱蜡至水,3% H_2O_2 室温孵育,以清除内源性过氧化物酶的活性;抗原微波热修复,5% ~ 10% 正常山羊血清封闭非特异性位点;倾去血清,滴加 40 μL HIF-1 α , VEGF 一抗工作液(抗体稀释倍数 1:400),4 $^\circ\text{C}$ 过夜;滴加 40 μL 生物素标记的二抗工作液和辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素工作液;DAB 染色,苏木素复染,乙醇梯度脱水,封片,光镜观察。以 PBS 代替一抗作阴性对照,光镜下观察免疫组化切片阳性表达情况,高倍视野下($\times 400$)每张切片随机选取 5 帧图像,运用 Image-Pro Plus 6.0 免疫组化彩色图像分析系统对图片进行定量分析,分析、测定整帧图片的阳性点的个数、面积、HIF-1 α 及 VEGF 阳性表达的积分吸光度(IA)等参数,结果取 5 帧图像 IA 平均值。平均积分吸光度值是平均吸光度和面积的乘积,可反映蛋白表达量(IA 值越大,反映蛋白表达量越高),从而反映 HIF-1 α , VEGF 在组织中的表达强度。

2.8 统计学分析 所有实验结果用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,检测结果比较用 t 检验、单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 裸鼠一般状况和体重比较 实验过程中,各组裸鼠精神状态均良好,活动正常,反应灵敏,皮肤颜色如常,大便正常,DDP 组用药后期出现进食下降,全部裸鼠存活至实验结束。给药前各组鼠重差异无统计学意义。给药结束后,DDP 组裸鼠体质量减轻

幅度较大。与模型对照组比较,DDP 组体质量有明显差异($P < 0.01$),H, M, L, H + DDP, M + DDP, L + DDP 各组鼠重差异无统计学意义;与 DDP 组比较,H, M, L, H + DDP, M + DDP, L + DDP 组体质量有明显差异($P < 0.01$);H, M, L, H + DDP, M + DDP, L + DDP 组间裸鼠体质量无统计学差异,但以 H + DDP 组体质量最大。见表 1。

3.2 黄芪-莪术配伍以及联合顺铂对人肝癌裸鼠原位移植瘤的影响 与模型对照组比较,H, M, L, H + DDP, M + DDP, L + DDP 组平均瘤重及平均瘤体积均降低,具有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),以 H + DDP 组平均瘤重及瘤体积最低,说明黄芪-莪术配伍以及联合顺铂能够抑制肿瘤的生长,且抑制作用与剂量有一定的正相关性;与阳性对照组(DDP)比较,M + DDP, L + DDP 组的平均瘤重及瘤体积未表现出明显差异,但较 DDP 组的平均瘤重及瘤体积减低,抑瘤率增加;H + DDP 组的平均瘤重及瘤体积则有显著性差异($P < 0.05$)。H + DDP,

M + DDP, L + DDP 组的瘤重 q 值分别为 1.18、1.08 和 0.96,瘤体积 q 值分别为 1.17、1.08 和 0.98,H + DDP 组的联合用药效应表现为协同作用,M + DDP, L + DDP 组表现为相加作用。见表 2。

表 1 黄芪-莪术配伍以及联合顺铂
对人肝癌裸鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	药物剂量 /g·kg ⁻¹	体重/g	
		用药前	用药后
模型对照	—	18.79 ± 0.91	22.75 ± 1.49
DDP	2 × 10 ⁻³	18.89 ± 1.03	16.18 ± 1.01 ¹⁾
黄芪-莪术	12	18.80 ± 1.00	23.05 ± 1.41 ²⁾
	6	18.78 ± 1.07	22.78 ± 1.25 ²⁾
	3	18.66 ± 0.83	22.69 ± 1.51 ²⁾
黄芪-莪术 + DDP	12 + 2 × 10 ⁻³	18.91 ± 0.94	24.02 ± 1.71 ²⁾
	6 + 2 × 10 ⁻³	18.96 ± 0.87	23.06 ± 1.43 ²⁾
	3 + 2 × 10 ⁻³	18.90 ± 1.01	22.94 ± 1.32 ²⁾

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 DDP 组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 黄芪-莪术配伍以及联合顺铂对人肝癌裸鼠原位移植瘤的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	药物剂量 /g·kg ⁻¹	成瘤率 /%	平均瘤重 /g	瘤重抑制率 /%	瘤重 q 值	平均瘤体积 /mm ³	瘤体积抑制率 /%	瘤体积 q 值
模型对照	—	100	2.19 ± 0.30	—	—	1 866.21 ± 433.49	—	—
DDP	2 × 10 ⁻³	100	1.27 ± 0.25 ²⁾	42.01	—	1 054.41 ± 442.57 ²⁾	43.50	—
黄芪-莪术	12	100	1.28 ± 0.21 ²⁾	41.55	—	1 065.42 ± 275.63 ²⁾	42.91	—
	6	100	1.61 ± 0.28 ¹⁾	26.48	—	1 398.77 ± 358.75 ¹⁾	25.05	—
	3	100	1.65 ± 0.27 ¹⁾	24.66	—	1 419.28 ± 405.17 ¹⁾	23.95	—
黄芪-莪术 + DDP	12 + 2 × 10 ⁻³	100	0.48 ± 0.19 ^{2,3)}	78.08	1.18	381.86 ± 273.14 ^{2,3)}	79.54	1.17
	6 + 2 × 10 ⁻³	100	0.83 ± 0.29 ²⁾	62.10	1.08	704.09 ± 386.52 ²⁾	62.27	1.08
	3 + 2 × 10 ⁻³	100	1.01 ± 0.31 ²⁾	53.88	0.96	827.75 ± 424.58 ²⁾	55.65	0.98

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 DDP 组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

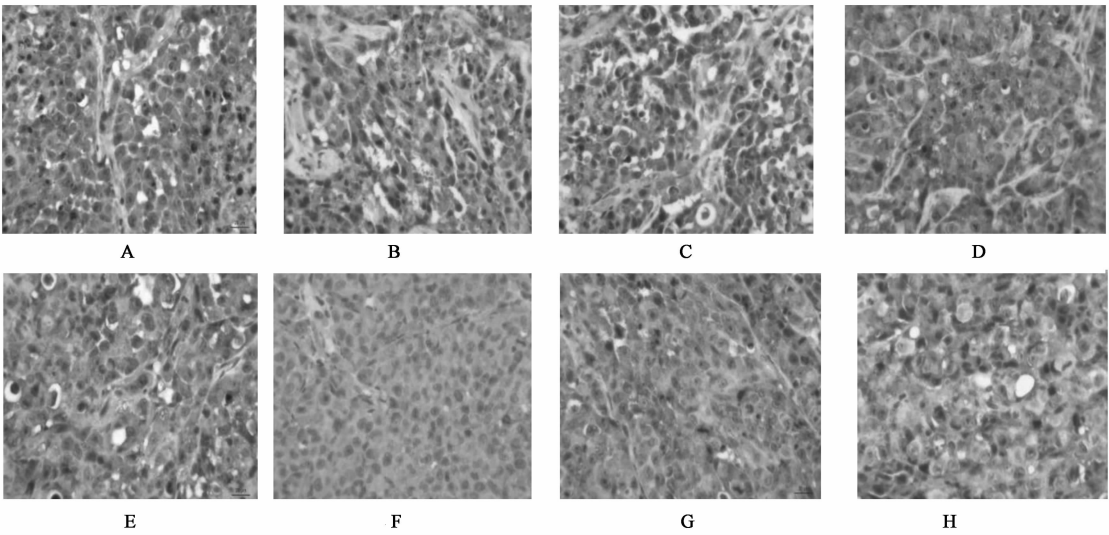
3.3 各组药物对人肝癌裸鼠 HIF-1 α , VEGF 表达的影响 免疫组织化学结果显示,HIF-1 α 阳性染色呈棕黄色颗粒,定位于肿瘤细胞胞质内,见图 1;VEGF 阳性染色为棕黄色颗粒,定位于肿瘤细胞胞膜及胞质内,见图 2;结合 Image-Pro Plus 6.0 软件分析 HIF-1 α , VEGF 阳性表达的积分吸光度值(A)。与模型对照组比较,DDP, H, M, L, H + DDP, M + DDP, L + DDP 各组 HIF-1 α , VEGF 阳性表达 IA 均下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 DDP 组比较,H + DDP, M + DDP 组 HIF-1 α , VEGF 阳性表达 IA 下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 3。

4 讨论

化疗是目前应用于肝癌的主要治疗方法之一,

传统化疗药物会对人体正常细胞产生不同程度损伤,严重影响患者对治疗的依从性及治疗效果。研究表明中药联合化疗药物治疗恶性肿瘤具有减毒增效作用及化疗增敏作用^[7-8],且与维拉帕米等传统化疗增敏剂相比具有高效、低毒、价廉的优势,例如柴胡皂苷 A 可以增强化疗药对肝癌细胞 HepG2 的杀伤作用^[9]。

肿瘤生长过程中,消耗机体大量气血津液,手术、放疗、化疗更是耗伤正气、损伤脾胃,导致气虚诸证;气不行则血不畅,肿瘤为有形之物,压迫阻滞脉络而血液瘀滞,从而使肿瘤患者更易产生气虚血瘀证,正气亏虚、瘀血阻滞始终伴随于肝癌发生、发展、转移过程中,因此补气活血药配伍使用成为中医药



A. 模型对照组;B. DDP 2 mg·kg⁻¹;C. 黄芪-莪术配伍 12 g·kg⁻¹;D. 黄芪-莪术配伍 6 g·kg⁻¹;E. 黄芪-莪术配伍 3 g·kg⁻¹;F. 黄芪-莪术配伍 12 g·kg⁻¹ + DDP 2 mg·kg⁻¹;G. 黄芪-莪术配伍 6 g·kg⁻¹ + DDP 2 mg·kg⁻¹;H. 黄芪-莪术配伍 3 g·kg⁻¹ + DDP 2 mg·kg⁻¹ (图 2 同)

图 1 各组裸鼠肝癌原位移植瘤组织中 HIF-1α 蛋白的表达 (SP, ×400)

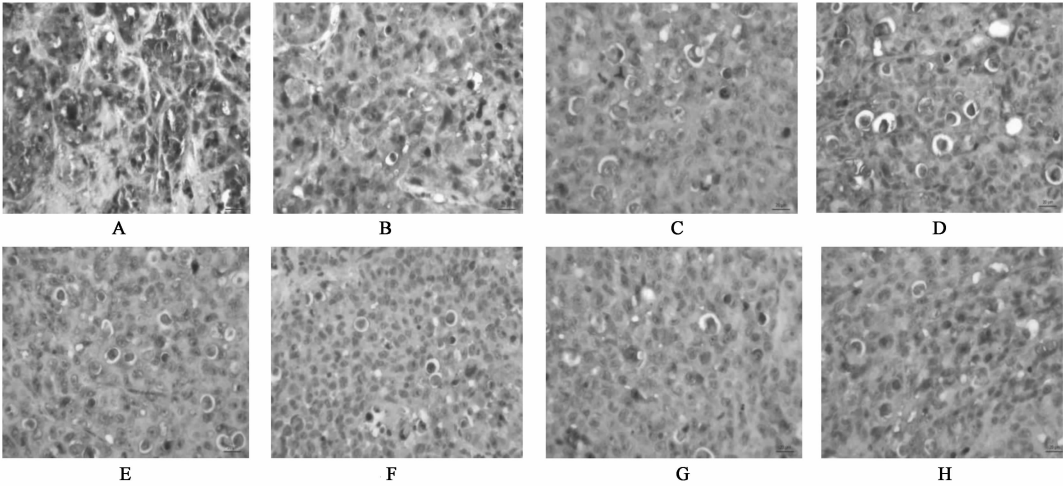


图 2 各组裸鼠肝癌原位移植瘤组织中 VEGF 蛋白的表达 (SP, ×400)

表 3 黄芪-莪术配伍以及联合顺铂对人肝癌裸鼠原位移植瘤 HIF-1α, VEGF 阳性表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)				IA	
组别	药物剂量 /g·kg ⁻¹	HIF-1α	VEGF		
模型对照	—	119.51 ± 15.14	121.15 ± 13.29		
DDP	2 × 10 ⁻³	56.63 ± 7.46 ²⁾	67.65 ± 8.32 ²⁾		
黄芪-莪术	12	53.87 ± 6.29 ²⁾	68.20 ± 7.19 ²⁾		
	6	79.73 ± 7.82 ¹⁾	81.93 ± 8.55 ¹⁾		
	3	87.62 ± 11.71 ¹⁾	88.92 ± 7.31 ¹⁾		
黄芪-莪术 + DDP	12 + 2 × 10 ⁻³	25.64 ± 2.89 ^{2,4)}	28.68 ± 3.11 ^{2,4)}		
	6 + 2 × 10 ⁻³	32.03 ± 3.75 ^{2,3)}	45.30 ± 4.38 ^{2,3)}		
	3 + 2 × 10 ⁻³	62.13 ± 4.16 ²⁾	62.14 ± 5.53 ²⁾		

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与 DDP 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

治疗肝癌的重要法则。故本研究选择补气活血药经典药对黄芪-莪术,观察其配伍使用以及联合化疗药物顺铂对人肝癌裸鼠原位移植瘤生长的抑制作用。

本实验结果显示黄芪-莪术配伍高、中、低剂量组原位移植瘤质量、体积均明显小于模型对照组,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),高剂量组 (12 g·kg⁻¹) 瘤重及瘤体积抑制率分别可达到 41.55%, 42.91%, 表明单独应用中药黄芪-莪术配伍对 HepG2 原位移植瘤即具有生长抑制作用。中药顺铂联合使用,瘤重及瘤体积均降低,具有显著性差异 ($P < 0.01$),以黄芪-莪术配伍高剂量联合顺铂组平均瘤重及瘤体积最低,瘤重及瘤体积抑制率分别可达到 78.08%, 79.54%。

HIF-1 在促进肿瘤血管生成和肿瘤的侵袭性方

面起中心作用^[10]。HIF-1 α 是 HIF-1 唯一的氧调节亚单位,决定了 HIF-1 的活性,目前已在多种恶性肿瘤及癌前病变中检测到 HIF-1 α 高表达,表明 HIF-1 α 与肿瘤血管新生、侵袭及转移密切相关^[11]。HIF-1 α 还可通过上调其下游靶基因如 VEGF 而成为肿瘤血管生成潜在的促进剂,通过诱导 VEGF 表达而促进肿瘤内血管生成。

VEGF 具有促进内皮细胞增殖,诱导新生血管形成的作用,并可使血管通透性增加^[12]。恶性肿瘤生长、浸润和转移依赖于血管形成,而肿瘤组织的血管生成由多种血管生成因子参与,其中 VEGF 与肿瘤血管生成尤为密切,正常组织不表达或表达很低,但在恶性实体瘤中表达很高,且表达量与肿瘤的恶性程度呈正相关^[13]。HCC 作为典型的富血管实体肿瘤,血管生成在其恶性生物学行为中扮演了重要角色^[14]。本实验结果显示,模型对照组 HepG2 原位移植瘤中 HIF-1 α , VEGF 高表达,与文献报道多种实体恶性肿瘤中表达上调的结论一致^[15]。单独应用中药黄芪-莪术配伍即可降低 HIF-1 α , VEGF 阳性表达 IA,联合顺铂使用,IA 显著下降,以黄芪-莪术配伍高、中剂量联合顺铂组作用最为明显 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。由此可推测,黄芪-莪术配伍使用以及联合顺铂对人肝癌裸鼠原位移植瘤的抑瘤作用,是通过下调 HIF-1 α , VEGF 表达从而抑制其在促肿瘤新生血管生成中发挥的关键性作用,使肿瘤新生血管生成受到抑制,降低或阻断肝癌组织血液供应,并有可能进一步抑制肝癌浸润转移。

总之,本实验提示黄芪-莪术配伍能抑制 HepG2 原位移植瘤的生长,下调肿瘤组织 HIF-1 α , VEGF 的表达,与顺铂联合用药能发挥协同增效的作用,这将有助于克服单用化疗药所引起的不良反应大、容易发生耐药等缺点,为二者联合用于临床提供更充分的理论依据。但是肿瘤生长的调控受多方面因素的影响,关于黄芪-莪术配伍使用的抑瘤机制尚待深入研究。

[参考文献]

[1] Tang Z Y, Ye S L, Liu Y K, et al. A decade's studies on metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Res Clin Oncol,2004,130(4):187.
[2] Yim D, Singh R P, Agarwal C, et al. A novel anticancer agent, decursin, induces G₁ arrest and apoptosis in human prostate carcinoma cells[J]. Cancer Res,2005,65(3):1035.

[3] 周滢,周萍. 邓中甲教授治疗肝癌经验分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):260.
[4] 唐德才,臧文华,冯海红. 莪术不同品种含药血清对人胃癌细胞 BGC823 增殖、凋亡及核质比的影响[J]. 北京中医药大学学报,2013,36(4):254.
[5] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:145.
[6] 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 ifosfamid [J]. Oncogene,2002,21(50):7700.
[7] 栗敏,马洪宇,沈继朵,等. 复方阿胶浆对 H22 肝癌荷瘤小鼠 5-FU 化疗的增效减毒作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(20):216.
[8] 刘秀均,刘婷. 苦参碱联合顺铂抗肝癌的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(6):37.
[9] Wu W S, Hsu H Y. Involvement of P-15(INK4b) gene expression in saikosaponina and TPA-induced growth inhibition of HepG2 cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001,13(2):183.
[10] Kaur B, Khwaja F W, Severson E A, et al. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis[J]. Neuro-Oncol,2005,7(2):134.
[11] Jubb A, Hillan K. Expression of HIF-1 alpha in human tumours[J]. Clin Pathol, 2005, 58(12):1344.
[12] Harris S R, Schoeffner D J, Yoshi ji H, et al. Tumor growth enhancing effects of vascular endothelial growth factor are associated with increased nitric oxide synthase activity and inhibition of apoptosis in human breast carcinomaxenografts [J]. Cancer Lett, 2002, 179(1):95.
[13] Sanchez Elsner T, Botella L M, Velasco B, et al. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor- β pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression [J]. Biol Chem, 2001, 276:38527.
[14] 詹启敏. 分子肿瘤学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:474.
[15] Appelmann I, Liersch R, Kessler T, et al. Angiogenesis inhibition in cancer therapy: platelet-derived growth factor (PDGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors: biological functions and role in malignancy [J]. Recent Results Cancer Res, 2010,180:978.

[责任编辑 聂淑琴]