

槐耳清膏抑制结肠癌切除后肿瘤复发机制探讨

白 岩

(天津市第五中心医院,天津 300450)

摘要:目的 探讨槐耳清膏抑制结肠癌肿瘤术后复发的作用及其机制。方法 采用 36 只 4~6 周龄 BALB/c 裸鼠,随机分为槐耳清膏组[槐耳清膏 4.5 g/(kg·d)灌胃]、5-FU 组(5-FU 150 mg/d 灌胃)、空白对照组(生理盐水 0.1 mL/d 灌胃),每组各 12 只。在皮下种植结肠癌细胞 SW480 构建荷瘤模型,待肿瘤生长 3 周后,切除初发肿瘤,观察各组药物对肿瘤复发生长及转移的影响。半定量 RT-PCR 检测复发肿瘤组织 VEGF 和 HIF-1 α mRNA 表达水平,Westernblot 检测两者蛋白表达水平,采用免疫组织化学对复发肿瘤微血管密度(MVD)检测。结果 槐耳清膏组、5-FU 组、空白对照组 MVD 分别为 3.98%、1.65%、6.43%,槐耳清膏组、5-FU 组 MVD 均低于空白对照组($P < 0.01$),5-FU 组 MVD 低于槐耳清膏组($P < 0.05$)。槐耳清膏组及 5-FU 组复发肿瘤中 VEGF 及 HIF-1 α mRNA 表达水平均低于空白对照组($P < 0.01$)。Westernblot 检测显示槐耳清膏组及 5-FU 组 VEGF 和 HIF-1 α 的蛋白表达均较空白对照组下降($P < 0.01$),5-FU 组复发肿瘤中 VEGF 和 HIF-1 α mRNA 及蛋白的表达均高于槐耳清膏组($P < 0.05$)。结论 槐耳清膏能够降低手术切除结肠癌后肿瘤复发及转移,可能与其抗血管生成作用有关。

关键词:结肠癌;槐耳;血管因子;缺氧诱导因子;中药

doi:10.3969/j.issn.1002-266X.2013.38.012

中图分类号:R735.3 文献标志码:A 文章编号:1002-266X(2013)38-0033-03

消化道恶性肿瘤中结肠癌具有较高的发病率。研究发现,结肠癌早期诊断率仅为 11%~15%,80% 以上患者被确诊时已经属于中晚期,晚期结肠癌 5 年生存率低于 20%^[1]。研究显示,中药在恶性肿瘤治疗中发挥着重要作用。槐耳是一种药用真菌,槐耳清膏由槐耳菌质提取所得,含有多种有机成分和十余种矿物质元素,其主要抗癌活性成分为蛋白多糖。研究证明,槐耳清膏能诱导直肠癌细胞凋亡,但其对抑制结肠癌肿瘤术后转移复发的研究未见报道。目前血管内皮生长因子(VEGF)及其调节基因缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)是重要的促进血管生成因子,在抑制肿瘤新生血管形成方面已成为当前抗肿瘤治疗热点。2011 年 6 月~2013 年 2 月,我们对槐耳清膏抑制结肠癌术后肿瘤复发的作用及相关机制进行研究,为临床治疗结肠癌提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 动物与材料 采用中科院上海生命科学院细胞库人结肠癌 SW480 细胞,生长迅速且稳定;BALB/C nu/nu 雄性裸鼠,4~6 周龄,购于上海史莱克动物公司;Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;改良型 RPMI-1640 培养基购自 HyClone 公司,含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素。槐耳清膏购自美国 Wyeth 公司;5-FU 购自深圳万乐药业公司。采用光

谱法以检测和验证确定药物浓度。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 36 只裸鼠随机分为槐耳清膏组[槐耳清膏 4.5 g/(kg·d)灌胃]、5-FU 组(5-FU 150 mg/d 灌胃)、空白对照组(生理盐水 0.1 mL/d 灌胃),每组各 12 只。

1.2.2 结肠癌荷瘤裸鼠模型的构建 无菌条件下,取处于对数生长期的 SW480 人结肠癌细胞,制备成 4×10^7 /mL 的细胞悬液,100 μ L/只接种于各组裸鼠皮肤,观察 SW480 人结肠癌细胞在裸鼠体内的生长和成瘤及转移情况。

1.2.3 肿瘤体积测量 造模 3 周后,切除各组裸鼠初发肿瘤,于距肿瘤边缘 1.0 cm 切除初发肿瘤,观察各组裸鼠的一般情况及初发肿瘤生长情况。初发肿瘤切除后 1 周,各组开始持续给予相应药物,15 d 后处死裸鼠,测量复发肿瘤的大小,计算初发及复发肿瘤体积 $V = ab^2/2$ 。

1.2.4 肺部转移观察 造模成功后,余经过处理后 15 d 处死裸鼠,解剖患者肺部是否存在肿瘤转移,以转移数/成功建模数计算肺部转移率。

1.2.5 肿瘤微密度(MVD)测定 采用免疫组织化学法。采用肿瘤石蜡标本,一抗 CD₃₁ 抗体,通过显微镜连接摄像机,高倍镜下观察微血管热点区域,非

坏死区的照片,每个热点区域血管阳性染色面积与该热点区域的面积相除便为该热点区域的 MVD。

1.2.6 VEGF 及 HIF-1 α mRNA 表达测定 采用 RT-PCR 法。取复发肿瘤组织,加入 1 mL Trizol,用匀浆器打匀,将匀浆室温放置 5 min,分别先后加入氯仿震荡混匀 30 s,12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,后分别加入异丙醇、乙醇等反复离心,所有操作冰上进行,最后将得到 RNA 沉淀,DEPC-H₂O 溶解,Ultrospec2000 光电比色仪测定其纯度和含量。按 Promega 公司 RT-PCR 说明书行下一步逆转录为 cDNA。采用 1% 琼脂糖凝胶中电泳,采用天能 GIS 凝胶图像分析系统测得吸光度(A)光度,以 β -actin 基因为内参基因,评估各基因的相对表达水平。

1.2.7 VEGF 和 HIF-1 α 蛋白表达测定 采用 Western blot 法。收集复发肿瘤组织,切成小块,加入含抑制剂的蛋白裂解液,用匀浆器低速匀浆,提取总蛋白,Braford 法测定蛋白浓度。配制 12% SDS-PAGE 凝胶,行电泳分离,5% 脱脂奶粉室温封闭、靶蛋白与抗体反应、漂洗。采用天能 GIS 凝胶图像分析系统读取蛋白条带吸光度(A)光度,以 β -actin 蛋白为内参蛋白。

1.3 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件,数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠的一般情况及肿瘤生长情况 槐耳清膏组、5-FU 组裸鼠一般状态尚可,精神一般,但空白对照组 4 只大鼠于切除初发肿瘤后 2 周内死亡,解剖发现肺、肝多处转移,且复发肿瘤体积较大,体质量明显降低,考虑肿瘤侵袭,多器官衰竭引起死亡。各组初发、复发的肿瘤体积比较见表 1。

表 1 各组初发、复发肿瘤体积比较 (cm³, $\bar{x} \pm s$)

组别	初发肿瘤体积	复发肿瘤体积
槐耳清膏组	0.815 \pm 0.082	0.045 \pm 0.006 **
5-FU 组	0.807 \pm 0.077	0.036 \pm 0.004 *
空白对照组	0.792 \pm 0.063	0.630 \pm 0.051

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与 5-FU 组比较,** $P < 0.05$

2.2 肺部转移情况 解剖后槐耳清膏组及 5-FU 组肺部转移率分别为 41.7% (5/12) 和 16.7% (2/12),空白对照组为 100% (12/12),槐耳清膏组及 5-FU 组肺部转移率均较空白对照组低($P < 0.05$)。

2.3 MVD 结果 通过免疫组化及热点观察,槐耳清膏组及 5-FU 组均能够明显抑制肿瘤细胞血管生成,在显微镜下显示阳性染色主要集中在肿瘤血管胞质及内皮细胞膜中,并且微血管表现分支状或星状,形态不一。槐耳清膏组、5-FU 组、空白对照组

MVD 分别为 3.98%、1.65%、6.43%,槐耳清膏组、5-FU 组 MVD 均低于空白对照组($P < 0.01$),5-FU 组 MVD 低于槐耳清膏组($P < 0.05$)。

2.4 VEGF 及 HIF-1 α 表达 半定量 PCR 结果显示,槐耳清膏组及 5-FU 组复发肿瘤中 VEGF 及 HIF-1 α mRNA 表达水平均低于空白对照组($P < 0.01$)。Westernblot 检测显示槐耳清膏组及 5-FU 组 VEGF 和 HIF-1 α 的蛋白表达均较空白对照组下降($P < 0.01$),5-FU 组复发肿瘤中 VEGF 和 HIF-1 α mRNA 及蛋白的表达均高于槐耳清膏组($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组复发肿瘤组织中 VEGF 及 HIF-1 α 的表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	VEGF		HIF-1 α	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
槐耳清膏组	3.53 \pm 0.17 *	0.15 \pm 0.04 *	2.54 \pm 0.09 *	0.39 \pm 0.04 *
5-FU 组	2.75 \pm 0.26 **	0.12 \pm 0.07 **	1.25 \pm 0.10 **	0.26 \pm 0.01 **
空白对照组	6.78 \pm 0.36	0.77 \pm 0.05	7.21 \pm 0.13	0.95 \pm 0.02

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与 5-FU 组比较,** $P < 0.05$

3 讨论

结肠癌的发生是一个复杂的过程,其中多基因参与。在肿瘤形成与演进的细胞黏附、信号传导、血管发生等多方面,促血管生长因子均起着重要作用^[2,3]。VEGF 是目前所知的在肿瘤生长中作用最强的促进血管内皮生长因子。HIF-1 α 是参与调节细胞适应缺氧环境的基因转录,包括调节 VEGF 等基因^[4,5]。本研究发现,槐耳清膏能够同传统抗肿瘤药物 5-FU 一样起到良好的抗肿瘤作用,且抑制肿瘤复发及转移,其抑制肿瘤生长的机制可能与抑制 VEGF 和 HIF-1 α mRNA 及蛋白相关,同时复发肿瘤的 MVD 的降低,也说明槐耳清膏对于血管生长因子的抑制。

研究显示 HIF-1 可以通过对靶基因 VEGF 基因调节影响肿瘤的生长。用槐耳清膏后 VEGF 及 HIF-1 α mRNA 表达却无显著降低,认为槐耳清膏并非在基因水平上调节 HIF-1 α 的表达,认为可能是通过增强 HIF-1 α 的清除或减少 HIF-1 α 的合成有关^[6,7]。本研究发现,槐耳清膏明显抑制 VEGF 及 HIF-1 α mRNA 的表达,这可能同其富含的抗癌活性成分多糖蛋白有关。在多种恶性肿瘤中均有 Bcl-2 基因的表达,通过研究显示 Bcl-2 家族在细胞凋亡信号转导中发挥重要作用,是影响细胞凋亡的关键因素,传统抗肿瘤药物 5-FU 对 Bcl-2 家族的主要促凋亡蛋白均起着一定的作用,能够促进此类蛋白的表达^[8-10]。

近年来,随着对中药抗肿瘤研究的不断深入,从

中药中筛选提纯出如中药多糖等抗肿瘤成分,为中药抗癌提供了新的理论和实验依据。近年来槐耳清膏已经在临床抗肿瘤的治疗中取得了一定的疗效,同时结合其的治疗方案能够减轻化疗的毒性,改善患者的免疫状态,改善其造血功能等。研究发现,槐耳清膏抑制肿瘤的生长及对于 VEGF 及 HIF-1 α mRNA 及蛋白的表达可能与促凋亡、促进 DNA 断裂等有关^[11,12]。

目前大量研究发现,槐耳清膏在肿瘤的单独治疗和综合治疗中都表现出独特且较好的疗效。本研究发现,槐耳清膏能够抑制肿瘤转移,抑制 VEGF 及 HIF-1 α mRNA 及蛋白的表达,显示了良好的抗肿瘤复发及抑制肿瘤转移的功效,为临床进一步应用槐耳清膏治疗结肠癌复发提供了实验和理论依据。

参考文献:

- [1] 许戈良, 荚卫东, 马金良, 槐耳清膏体外抑制血管生成的实验研究, 2003, 19(12): 1410-1412.
- [2] 吕赤, 苏琪, 徐锋, 等, 槐耳清膏对缺氧结肠癌 SW480 细胞 VEGF 及 HIF-1 α 表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(15): 1054-1057.
- [3] Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(6): 678-685.
- [4] Hoenig MR, Bianchi C, Rosenzweig A, et al. Decreased vascular

repair and neovascularization with ageing: mechanisms and clinical relevance with an emphasis on hypoxia-inducible factor-1[J]. Curr Mol Med, 2008, 8(5): 754-767.

- [5] Yang BW, Liang Y, Xia JL, et al. Biological characteristics of fluorescent protein-expressing human hepatocellular carcinoma xenograft model in nude mice[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2008, 20(7): 1077-1084.
- [6] 张巨波, 孙惠川, 薛琼, 等, 槐耳清膏联合氟尿嘧啶抑制肝癌生长转移的实验研究[J]. 中华外科杂志, 2007, 45(6): 632-634.
- [7] 徐华祥, 朱小东, 孔令群, 等, 槐耳清膏抑制肝癌切除术后复发瘤的生长及机制[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(10): 1445-1447.
- [8] 陈建华. 结肠癌及癌前病变组织中 COX-2 及 VEGF 的表达[J]. 世界华人消化杂志 2007, 15(19): 2167-2169.
- [9] Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, et al. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation[J]. Cell, 2002, 111(5): 709-720.
- [10] 薛丹青, 凌立君, 肇毅, 等, 槐耳清膏体外逆转人乳腺癌细胞 MCF-7 耐三苯氧胺的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(11): 1663-1665.
- [11] 张莉, 刘皋林. 针对肿瘤血管内皮细胞的抗癌治疗研究进展[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(10): 987-990.
- [12] 陈大兴, 陈孝平, 张万广, 槐耳清膏治疗肝癌的实验研究[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(8): 578-582.

(收稿日期: 2013-06-10)

· 告读者 ·

《山东医药》参考文献著录要求

每篇论文须标引参考文献 10~20 条。正文中引用的文献采用顺序编码制,以引用文献的先后顺序连续编码,并将序号置于方括号中。文后参考文献按 GB/T7714-2005《文后参考文献著录规则》采用顺序编码制标注,序号置于方括号中,排列于文后。内部刊物、未发表资料、个人通信等请勿作为文献引用,确需引用时,可将其在正文相应处注明。引用文献(包括文字和表达的原意)务请作者与原文核对无误。日文汉字请按日文规定书写,勿与我国汉字及简化字混淆。参考文献中的作者前 1~3 名全部列出,3 名以上只列前 3 名,后依文种加表示“等”的文字。作者姓名一律姓氏在前,名字在后,外国人的名字采用首字母缩写姓氏,缩写名后不加缩写点;不同作者之间用“,”隔开。外文期刊名称用缩写,以 Index Medicus 中的格式为准;中文期刊用全名。论文题目后加文献类型及标识,如专著[M]、期刊文章[J]等。每条参考文献均须著录卷、期及起止页。作者必须自行核对参考文献原文,无误后将其按引用顺序(用阿拉伯数字)排列于文末。举例:

- [1] 杜贾军, 孟龙, 陈景寒, 等. 手辅助电视胸腔镜食管切除胃食管胸内吻合术[J]. 山东医药, 2004, 44(27): 1-3.
- [2] Takano M, Mizuno K, Okamatsu K, et al. Mechanical and structural characteristics of vulnerable plaques: analysis by coronary angiography and intravascular ultrasound[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 38(1): 99-104.
- [3] 叶任高, 陆再英. 内科学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 277-280.

槐耳清膏抑制结肠癌切除后肿瘤复发机制探讨

作者: [白岩](#)
作者单位: [天津市第五中心医院, 天津, 300450](#)
刊名: [山东医药](#) 
英文刊名: [Shandong Medical Journal](#)
年, 卷(期): 2013, 53(38)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_shandy201338012.aspx