

# 槐耳清膏对手术切除结肠癌后肿瘤复发及转移的影响及其机制研究

刘 华 杨贵义 欽传辉

(湖北医药学院附属随州医院 湖北 随州 441300)

**[摘要]** 目的 探讨槐耳清膏对手术切除结肠癌后肿瘤复发及转移的影响及其作用机制。方法 将实施结肠癌根治性手术的患者 64 例按照随机数字表法分为 2 组,对照组仅进行常规治疗,治疗组在常规治疗基础上同时服用槐耳清膏。观察患者肿瘤复发及转移情况,通过免疫组织化学法检测人巨噬细胞金属弹力酶(HME)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达,并通过 Western blot 测定缺氧诱导因子 1- $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )的表达。结果 治疗组的复发率和淋巴结转移率明显低于对照组( $P$ 均 $<0.05$ )。2 组中发生复发转移患者的 HME 表达均较弱,VEGF 表达均较强,2 组比较差异无统计学意义( $P$ 均 $>0.05$ );而未发生复发转移患者中治疗组 HME 表达显著强于对照组( $P<0.05$ ),VEGF 表达显著弱于对照组( $P<0.05$ )。2 组已发生复发转移患者的 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );而未发生复发转移患者中治疗组 HIF-1 $\alpha$  表达低于对照组( $P<0.05$ )。治疗组复发转移患者 HME、VEGF 及 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达与未复发转移患者相比有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ )。结论 槐耳清膏对结肠癌切除术后的转移和复发有显著改善作用,且可以增强患者 HME 表达,抑制 VEGF 的表达,同时降低 HIF-1 $\alpha$  表达。其作用机制可能与其抗血管生成作用有关。

**[关键词]** 槐耳清膏;结肠癌;人巨噬细胞金属弹力酶;血管内皮生长因子;缺氧诱导因子;复发转移

doi: 10.3969/j.issn.1008-8849.2016.09.020

**[中图分类号]** R735.35

**[文献标识码]** B

**[文章编号]** 1008-8849(2016)09-0968-03

结肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤,手术根治性切除是其主要治疗方法,但效果并不理想。手术后复发和转移是导致结肠癌手术失败和患者生存率低的主要原因<sup>[1-2]</sup>。槐耳清

膏<sup>[3]</sup>是药用真菌槐耳发酵后的热水提取物,含有多种有机成分和矿物质元素,蛋白多糖是其发挥抗癌作用的活性成分。已有研究表明,槐耳清膏能够促进肿瘤细胞的凋亡,抗肿瘤血

素的耐药性。

综上所述,阿达帕林联合多西环素治疗痤疮效果佳,不良反应少,复发率低,是一种较好的治疗痤疮的方法,值得临床进一步推广应用,但其长期疗效和耐受性有待进一步研究。

### [参 考 文 献]

[1] 弓月,周淑英.阿奇霉素治疗中度痤疮疗效观察[J].现代中西医结合杂志,2014,22(36):4043-4044

[2] 马英,刘晔,王倩倩,等.夫西地酸对痤疮丙酸杆菌的体外抗菌活性研究[J].中华皮肤科杂志,2014,47(11):823-825

[3] 赵俊茹,胡冬裴.痤疮病因及外治法研究进展[J].现代中西医结合杂志,2015,24(9):1021-1023

[4] 杨擎宇,汪樊,冯爱平.寻常性痤疮严重度的影响因素分析[J].中国皮肤性病学杂志,2009,23(7):425-428

[5] Padilla-Medina A, León-Ordóñez F, Prado-Olivarez J, et al. Assessment technique for acne treatments based on statistical parameters of skin thermal images[J]. J Biomedical Optics, 2014, 19(4):46019

[6] Youn SH, Choi CW, Choi JW, et al. The skin surface pH and its different influence on the development of acne lesion according to gender and age[J]. Skin Res Technol, 2013, 19(2):131-136

[7] 王晓红,胡二为,高炎.自拟方联合维甲酸制剂治疗寻常性痤疮临床观察[J].中国中西医结合皮肤性病学杂志,2012,11(4):249-250

[8] 彭安厚,陆洪光,梁巍,等.复方甘草酸苷片联合多西环素胶囊、0.025%维A酸乳膏治疗中重度痤疮的临床观察[J].中华皮肤科杂志,2014,47(11):828-829

[9] 袁江,代国知,唐小滨,等.红、蓝光联合5%过氧化苯甲酰凝胶治疗寻常痤疮150例临床观察[J].中国皮肤性病学杂志,2013,27(11):1198-1200

[10] 王端,徐巧瑜,丁雯,等.痤疮面部清除术联合红蓝光治疗仪治疗面部痤疮的疗效观察[J].激光杂志,2015,36(2):139-141;144

[11] 陈富祺,李雪莲,郭祖安,等.当归苦参丸联合阿达帕林凝胶治疗寻常性痤疮45例疗效观察[J].中国美容医学,2014,23(4):325-327

[12] 乔爱莲,刘秦安.异维A酸胶囊与阿达帕林凝胶联合治疗痤疮的疗效观察[J].吉林医学,2011,32(23):4794-4795

[13] 籍红,郑玲玲.红蓝光联合阿达帕林治疗轻中度痤疮临床疗效观察[J].中国中西医结合皮肤性病学杂志,2012,11(1):36-37

[14] 岳宗栋.阿达帕林凝胶联合异维A酸胶囊治疗痤疮56例临床观察[J].亚太传统医药,2011,7(6):79-80

[15] 杨荣明,田丽娟,曹丽琴,等.异维A酸胶囊联合阿达帕林凝胶治疗痤疮临床观察[J].亚太传统医药,2013,9(5):176-177

[16] 杨捷,李景蓉,方锐华,等.阿奇霉素联合阿达帕林凝胶治疗中重度寻常痤疮临床疗效观察[J].皮肤性病诊疗学杂志,2010,17(6):426-428

[收稿日期] 2015-10-10

管生成,对化疗药物有增敏和逆转耐药作用,能调节机体免疫等<sup>[4]</sup>,但对抑制结肠癌肿瘤术后转移复发的研究未见报道。本研究选取2011年3月—2013年3月来我院实施结肠癌根治性手术的64例患者,分析槐耳清膏对手术切除结肠癌后肿瘤复发及转移的影响及相关机制,旨在为临床治疗结肠癌提供实验依据。

## 1 临床资料

### 1.1 一般资料

选取上述时期来我院实施结肠癌根治性手术的患者64例,均经病理学检查确诊为结肠癌,为首次手术;经2位医生评估生存时间>3年;患者自愿参加本研究,签署知情同意书。排除处于妊娠期、老年或儿童期;有其他重大并发症者。术前诊断时均未发现临床远端转移证据,术中亦未发现肝脏及远处转移的证据,手术前均未行放、化疗治疗,术后有明确的组织病理学诊断。按照随机数字表法将患者分为2组:治疗组32例,男24例,女8例;年龄(56±5)岁;肿瘤大小≤3 cm 14例,>3 cm 18例;按照Duke's分期标准,A期11例,B期9例,C期12例。对照组32例,男18例,女14例;年龄(55±4)岁;肿瘤大小≤3 cm 15例,>3 cm 17例;Duke's分期:A期11例,B期11例,C期10例。2组一般资料比较差异无统计学意义( $P$ 均>0.05),具有可比性。

### 1.2 方法

2组均给予结肠癌术后规范治疗。在此基础上,治疗组服用槐耳清膏(医院自制)6~9 g/d,分3次服用,连续服用3~6个月;对照组不服用槐耳清膏。要求结肠癌患者术后1年内每隔3个月复查1次;2~5年内每隔6个月复查1次。至少完成3年随访。复发转移病例经病理、CT、B超、X射线检查4项中至少1项证实,病理切片通过再次手术或肠镜检查获得;未复发病例结肠切片通过肠镜检查获得。

### 1.3 人巨噬细胞金属弹性蛋白酶(HME)和血管内皮生长因子(VEGF)及缺氧诱导因子1- $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )表达检测

所有获得的病理组织经4%多聚甲醛固定、乙醇梯度脱水、石蜡包埋,切片厚度4  $\mu$ m。载玻片经多聚赖氨酸溶液预处理以防止脱片。采用过氧化物标记的链霉卵白素染色法(S-P法)操作严格按照试剂盒(购自福州迈新公司)说明进行,使用羊抗人HME多克隆抗体和鼠抗人VEGF多克隆抗体(均购自Santa Cruz公司)按上述方法进行HME和VEGF的免疫组织化学染色。HME及VEGF主要定位于胞浆内,阳性者可见胞浆内的棕黄色颗粒,观察组织的阳性细胞率及着色强度。采用Western blot法测定2组肿瘤组织中HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达情况。

### 1.4 统计学方法

结果采用SPSS 16.0统计软件进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 $t$ 检验;计数资料以率表示,差异比较采用 $\chi^2$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 2组术后肿瘤复发和转移情况

在3年随访过程中经B超、CT或结肠镜检查发现,对照组有18例出现肿瘤复发,复发率为56%;治疗组有6例出现肿瘤复发,复发率为18%。治疗组复发率明显低于对照组( $P < 0.05$ )。对照组有15例出现淋巴结转移,有4例出现肝转移,转移率为59%;治疗组

有6例出现淋巴结转移,2例出现肝转移,转移率为25%。治疗组肿瘤转移率明显低于对照组( $P < 0.05$ )。

### 2.2 HME、VEGF、HIF-1 $\alpha$ 在患者结肠癌组织内的表达

HME阳性表达主要位于肿瘤细胞胞浆中的棕黄色颗粒、间质中炎性细胞、部分成纤维细胞中;VEGF表达主要位于肿瘤细胞胞浆或胞膜,非癌组织中也可见表达。本研究中2组已发生复发转移患者的HME表达差异比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而未发生复发转移患者中治疗组HME表达较对照组明显升高( $P < 0.05$ ),且治疗组内复发转移与未复发转移患者HME表达比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。2组已发生复发转移患者的VEGF的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而未发生复发转移患者中治疗组VEGF表达较对照组降低( $P < 0.05$ ),且治疗组内复发转移与未复发转移患者VEGF表达比较有统计学意义( $P < 0.05$ )。Western blot检测显示2组已发生复发转移患者的HIF-1 $\alpha$ 蛋白相对表达量差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而未发生复发转移患者中治疗组HIF-1 $\alpha$ 的蛋白相对表达量较对照组显著下降( $P < 0.05$ ),且治疗组内复发转移与未复发转移患者HIF-1 $\alpha$ 蛋白相对表达量有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 2组术后组织内HME、VEGF水平及HIF-1 $\alpha$ 蛋白相对表达量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	复发转移情况	HME表达/%	VEGF表达/%	HIF-1 $\alpha$
治疗组	32	复发转移	36.54±8.79	65.45±6.45	1.89±0.05
		未复发转移	79.65±7.86 <sup>①②</sup>	29.51±7.65 <sup>①②</sup>	0.45±0.07 <sup>①②</sup>
对照组	32	复发转移	35.62±5.65	67.59±9.23	1.98±0.09
		未复发转移	35.78±7.85	64.56±8.23	1.51±0.06

注:①与复发转移比较, $P < 0.05$ ;②与对照组比较, $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

近年来,结肠癌的发病率逐年增高,占胃肠道肿瘤的第3位。其好发部位为直肠及直肠与乙状结肠交界处,发病多在40岁以后,男女之比为(2~3):1。结肠癌的临床表现随其病灶大小所在部位及病理类型而有所不同。不少早期结肠癌患者在临床上可毫无症状,但随着病程的发展和病灶的不断增大,可以产生一系列结肠癌的常见症状,诸如大便次数增多、大便带血和黏液、腹痛、腹泻或便秘、肠梗阻以及全身乏力、体重减轻和贫血等症状<sup>[5]</sup>。该病具有起病隐匿、早发现率低和预后差等特点,严重危及患者生命安全<sup>[6]</sup>。目前随着诊疗技术的发展和人们健康意识的增加,早期结肠癌的诊断率和治疗率明显上升。手术仍是公认的治疗结肠癌的方法之一。但是复发和转移是导致结肠癌切除手术失败和患者死亡的主要原因,且有结肠癌家族史的患者为结肠癌术后复发的高危人群<sup>[7]</sup>。这些问题仍是困扰医生和相关研究人员的焦点问题,因此研究结肠癌术后复发和转移具有重要的临床意义,能够为采用科学合理的治疗方案提供参考依据,以便最大限度地改善患者的预后。

中药能调节机体免疫力,使术后患者的免疫系统功能得到恢复、增强,与化疗有协同增效与减毒作用,特别对化疗引

起的消化道反应、造血机能抑制等有保护作用,故不仅在国内,在世界上一些发达国家也日益受到重视。对结肠癌术后患者,中医一般采用益气健脾、清热解毒治法。根据辨证结果,还可结合络散结法,具体用药因人而异,根据不同病期、不同体质、不同证型等情况,进行个体化治疗<sup>[8]</sup>。

槐耳是我国民间中药的药用真菌,其味苦辛、性平无毒,有“治风”“破血”“益力”之功效<sup>[9]</sup>。化学分析其槐耳提取物槐耳清膏中槐耳多糖蛋白(PS-T)是主要活性成分,多糖蛋白为蛋白结合杂多糖,具有抗癌活性。其抗癌机制主要为促进巨噬细胞功能、诱导细胞因子、促进细胞免疫功能、提高体液免疫力、抑制肿瘤血管生成、诱导肿瘤细胞凋亡、逆转耐药细胞株等<sup>[10]</sup>。目前,临床上已广泛用于治疗肝癌、乳腺癌及消化道恶性肿瘤。本文研究显示,加用槐耳清膏治疗后,结肠癌术后肿瘤复发率降低,淋巴结转移和肝转移速率降低,说明槐耳清膏具有一定地抑制结肠癌复发和转移的作用。

由于结肠癌生长转移是一个多阶段、多步骤、多因素的发展过程,因此需要研究相关的生物活性产物在体内的表达<sup>[11]</sup>。HME是基质金属蛋白酶家族(MMP)中的一员<sup>[12-13]</sup>。MMP已被证实可通过抑制肿瘤微血管生成来减少肿瘤体积和肝转移的发生率,HME又称为基质金属蛋白酶12(MMP-12),可使纤溶酶原转化为血管稳定因子,是一种重要的肿瘤血管形成的抑制因子。HME在人结肠癌组织中的表达与肿瘤浸润转移呈负相关,可发挥抗肿瘤血管生成的作用。血管内皮生长因子也称血管通透性因子(VPF)或促血管素,最初是由多种培养的肿瘤细胞系中发现的一种新型的生长因子,它能增加微血管与小静脉血管的通透性<sup>[14-15]</sup>。后来发现,该因子特异性地作用于血管内皮细胞,并促进血管内皮细胞的增殖,所以定名为血管内皮生长因子。是目前所知的在肿瘤生长中作用最强、特异性最高的血管生成调控因子,在许多肿瘤新生血管的形成中起着关键作用,与结肠癌发展过程中新生血管的形成和转移也有密切关系<sup>[16]</sup>。

本研究中,通过免疫组织化学法观察2组术后复发患者和未复发患者间HME和VEGF表达的差异,结果显示未复发转移的患者中,治疗组HME表达高于对照组,VEGF表达低于对照组,治疗组内复发转移与未复发转移患者HME、VEGF表达有显著性差异。提示槐耳清膏可以通过抗肿瘤血管生成作用,增强抑制患者HME,降低VEGF的表达,从而减少肿瘤的复发和转移。缺氧诱导因子HIF-1 $\alpha$ 可通过调控多种靶基因表达以逃避或适应相对低氧环境,参与肿瘤生长、浸润和转移<sup>[17]</sup>。本研究治疗组经槐耳清膏治疗后,显示未复发转移的患者中HIF-1 $\alpha$ 表达降低,组内复发转移与未复发转移患者HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达有显著性差异。说明槐耳清膏抑制结肠癌肿瘤复发和转移的机制与HME和VEGF的表达有关,通过抑制HIF-1 $\alpha$ 的生成,下调相关因子的表达,从而抑制肿瘤复发和转移。进一步提示槐耳清膏有抗血管生成的作用。

综上所述,槐耳清膏能够抑制结肠癌肿瘤复发和转移,抑

制HIF-1 $\alpha$ 的表达,从而增强HME表达,下调VEGF的表达,起到了很好的抗肿瘤作用,为临床进一步应用槐耳清膏治疗结肠癌复发和转移提供了实验和理论依据,值得临床推广应用。但本研究所用样本量有限,需进一步深入研究和验证槐耳清膏的疗效。

#### [参 考 文 献]

- [1] Dinu D, Birla R, Caragui A, et al. Therapeutic strategies in colonic cancer[J]. *Chirurgia (Bucur)* 2014, 109(6): 741-746
- [2] 梁建刚. 结肠癌手术治疗进展[J]. *西南军医* 2013, 15(3): 268-270
- [3] 关若丹, 郑远, 陈前军. 槐耳颗粒防止可手术乳腺癌短期复发转移的回顾性队列研究[J]. *广东医学* 2011, 32(11): 1490-1492
- [4] 姜南阳, 朱安龙, 朴大勋, 等. 结直肠癌术后应用槐耳颗粒有效性分析[C]. 第十六届中国中西医结合学会大肠肛门病专业委员会学术会议, 2013
- [5] 万德森. 结直肠癌流行病学与预防[J]. *中国中西医结合外科杂志* 2011, 17(1): 3-7
- [6] Aoyagi T, Terracina KP, Raza A, et al. Current treatment options for colon cancer peritoneal carcinomatosis[J]. *World Journal of Gastroenterology* 2014, 35(12): 12493-12500
- [7] 岳亚丽, 郑坚, 朱莹杰, 等. 晚期结肠癌的全身治疗进展[J]. *现代中西医结合杂志* 2012, 21(15): 1701-1705
- [8] 陈文海, 田逸, 师彦敏, 等. 中西医结合治疗晚期结肠癌疗效观察[J]. *现代中西医结合杂志* 2014, 23(11): 1172-1173
- [9] 沈泽天, 武新虎, 李兵, 等. 槐耳颗粒联合同步放化疗治疗局部晚期直肠癌的临床研究[J]. *现代肿瘤医学* 2014, 22(5): 1114-1117
- [10] 白岩. 槐耳清膏抑制结肠癌切除后肿瘤复发机制探讨[J]. *山东医药* 2013, 53(38): 33-35
- [11] 宋鸿程. 老年结肠癌患者的病理特征及根治术后复发转移的相关因素分析[J]. *现代中西医结合杂志* 2015, 24(6): 577-579
- [12] Gauthier T, Siegerth F, Monteil J, et al. Follow-up of endometrial cancer[J]. *Bull Cancer* 2014, 101(7/8): 741-747
- [13] Szmida E, Karpiński P, Leszczynski P, et al. Aberrant methylation of ERBB pathway genes in sporadic colorectal cancer[J]. *J Applied Genetics* 2015, 56(2): 185-192
- [14] 刘刚. 基于中医“治未病”理论的大肠肿瘤的防治及其与VEGF的关系[D]. 广州: 广州中医药大学, 2013
- [15] Kjaer-Frifeldt S, Fredslund R, Lindebjerg J, et al. Prognostic importance of VEGF-A haplotype combinations in a stage II colon cancer population[J]. *Pharmacogenomics* 2012, 13(7): 763-770
- [16] Huang SM, Chen TS, Chiu CM, et al. GDNF increases cell motility in human colon cancer through VEGF-VEGFR1 interaction[J]. *Endocr Relat Cancer* 2013, 21(1): 73-84
- [17] Hoehnig 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

[收稿日期] 2015-06-23