

文章编号:1005-6947(2004)08-0578-05

实验研究 ·

槐耳清膏治疗肝癌的实验研究

陈大兴, 陈孝平, 张万广

(华中科技大学同济医学院同济医院 肝脏外科中心, 湖北 武汉 430022)

摘要:目的 探讨槐耳清膏对人胎脐静脉内皮细胞的作用, 以及其对裸鼠皮下接种肝癌细胞形成肝癌的抑制作用及其可能机制。方法 用不同浓度的槐耳清膏作用于人胎脐静脉血管内皮细胞, 观察其对细胞的增殖能力、迁移能力、附壁能力及血管生成的影响, 同时观察其对裸鼠皮下接种肝癌细胞形成肝癌过程的影响。结果 槐耳清膏 2mg/ml 时可显著降低肿瘤组织的血管内皮细胞增殖能力, 减少血管形成, 抑制血管内皮细胞的迁移、黏附, 从而降低微血管密度。槐耳清膏(3g/kg) + MMC(500 μ g/kg) 同时作用于裸鼠的肝癌组织, 其抑瘤作用最强, 后依次为 MMC 组, 槐耳清膏(3g/kg) 组。结论 槐耳清膏对肝癌有抑制作用, 其可能机制是作用于血管内皮细胞, 影响血管内皮细胞的增殖能力、迁移能力、附壁能力及血管生成, 从而抑制肝癌组织的血管生成, 降低肝癌组织的微血管密度而发挥抑制肝癌生长的作用。

关键词: 肝肿瘤/ 药物治疗; 槐耳/ 治疗应用; 脐静脉/ 胚胎学; 内皮细胞/ 药物作用

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A

Experimental research of the Fungi of Huai Er in treating liver cancer

CHEN Da-xing, CHEN Xiao-ping, ZHANG Wan-guang

(Center of Liver Surgery, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of Fungi of Huai Er on human umbilicus vein endothelial cell (HUVEC) and its inhibiting effect on liver cancer formation by liver cancer cells implanted under nude mice subcutaneous tissue, and to study the possible mechanism. **Methods** HUVEC was cultured with different concentrations of fungi of Huai Er and/or mitomycin(MMC) to observe the effect of Fungi of Huai Er on HUVEC's hyperplasia, motility and adherence ability, and on the generation of blood vessels. In addition, the effect the Fungi of Huai Er on liver cancer formation by liver cancer cells implanted in nude mice subcutaneous tissue was also observed. **Results** Fungi 2mg/ml, can apparently reduce the hyperplasia ability, inhibit motility and adherence ability of HUVEC, and the formation of blood vessels. The strongest effect on inhibiting the subcutaneous tumor formation was Fungi(3g/kg) plus MMC(500 μ g/kg), followed by MMC, and Fungi(3g/kg). **Conclusions** Possible mechanism of the inhibiting effect of Fungi on liver cancer is that the Fungi inhibits the hyperplastic ability, motility and adherence ability of HUVEC, and this inhibits the growth of blood vessels. Therefore, the growth of blood vessels is reduced and the development of liver cancer is suppressed.

Key words: LIVER NEOPLASMS/ drug ther; HUI ER/ ther use UMBILICUS VEIN/ embryol; ENDOTHELIAL CELL/ drug eff

CLC number: R735.7

Document code: A

收稿日期:2003-11-19; 修订日期:2004-02-19。

作者简介:陈大兴(1969-),男,湖北咸宁人,华中科技大学同济医学院同济医院硕士研究生,主治医师,主要从事肝胆外科疾病方面的研究。

随着肿瘤治疗方法的增多,肿瘤患者5年生存率在不断f提高。但中晚期癌症不论能否手术,很多患者往往不能耐受放疗、化疗的毒副作用。因此,寻找一些耐药性小、毒副作用少而有良好免疫增强作用的药物是治疗的理想目标。有研究^[1]发现,槐耳清膏在体外具有细胞毒性,能诱导人肺腺癌细胞系凋亡,还能促进顺铂耐药的A549DDP抗药性发生逆转,对顺铂的化疗起增强作用。槐耳清膏对裸鼠移植人乳浸润性导管癌的生长有一定抑制作用,同时也能降低肿瘤内微血管密度(MVD)。二期临床试验证明,槐耳颗粒治疗原发性肝癌,有效率11.9%,稳定率64.06%^[2]。本文从槐耳颗粒对肝癌血管生成的作用探讨其治疗肝癌的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

由500g瓶装的槐耳清膏制剂(江苏启东盖天力制药有限公司提供,批号BH08)制成8mg/ml的PR-MI-1640浓缩含药培养液。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)(美国Sigma公司生产,批号0402CY081),血管内皮细胞生长因子(VEGF)(美国Sigma公司生产,批号01110),胶原I(西安巨子公司提供),纤维连接蛋白(FN)(美国Sigma公司生产,批号21100940),丝裂霉素(MMC)(浙江海正药业生产,批号20010804),人胎脐静脉内皮细胞系(HUVEC)(武汉大学保藏中心提供,批号304),裸鼠(同济医科大学动物中心提供,雌雄各12只,鼠龄3~5周)。

1.2 方法

1.2.1 体外实验

(1)人胎脐静脉内皮细胞(下简称内皮细胞)培养 将HUVEC置于含10%小牛血清的1640培养液中培养。

(2)内皮细胞血管生成体外模型的建立^[3] 胶原I溶解于0.1mol/L的无菌乙酸溶液中,终浓度为1.5mg/ml,4℃保存。将胶原I溶液在冰上与适量10%小牛血清F12培养液混匀,调pH值至7.5,800μl/孔加入6孔板中,37℃孵育1h使其凝固。将内皮细胞均匀接种于凝胶上,以10%小牛血清F12培养液培养。待细胞生长近融合状态后,吸去上清液,以无菌磷酸盐缓冲液洗2次。再次制备胶原I凝胶混合液,每孔200μl覆盖于内皮细胞上,凝胶凝固后,换以1%小牛血清F12培养液培养,并加入

bFGF10ng/ml和VEGF15ng/ml诱导血管生成。第1,2,3孔分别加入槐耳清膏2mg/ml,3mg/ml,4mg/ml,第4孔加入0.4μg/ml的MMC,第5孔加入槐耳清膏3mg/ml+MMC0.4μg/ml,对照组加入生理盐水。每48h换药1次,共同培养120h。每24h在相差显微镜观测1次,每孔随机选取6个视野,记录拉长变形的细胞数目,拉长的细胞有芽生状管状结构伸出,记其数目及管状结构长度。重复3次试验。

(3)内皮细胞迁移能力测定^[3] 将内皮细胞接种于6孔板中,待细胞生长近融合状态后,以无血清培养基静止12h,用无菌刮铲划痕,造成细胞间的刮沟。无菌磷酸盐缓冲液冲洗后,将槐耳清膏2mg/ml,3mg/ml,4mg/ml,MMC0.4μg/ml及槐耳清膏3mg/ml+MMC0.4μg/ml分别加入1~5孔中,另设1孔做对照,仍以无血清培养基培养。每孔随机选取4点标记,并于24h观察划痕宽度变化,连续2d,重复3次试验。

(4)内皮细胞增殖能力测定^[3] 将内皮细胞接种于96孔板中,以10%小牛血清F12培养液培养24h,然后以无血清培养基静止24h,用无菌磷酸盐缓冲液冲洗后,进行细胞计数。再把(3)中所述各组药物分别加入相应孔中,以10%小牛血清F12培养液继续孵育24h。每次设6个复孔,重复3次试验。

(5)内皮细胞黏附能力测定^[3] 将(3)中所述各组不同剂量的槐耳清膏和MMC分别预处理3h的内皮细胞,以胰酶-EDTA消化并吹打成单个细胞,以1×10⁵孔加入预先FN包被的24孔板中。同时加入相应浓度的槐耳清膏和MMC,37℃孵育1h后吸去上清,PBS洗后在倒置显微镜下每孔随机取4个视野计数贴壁细胞数。每组设4个复孔,重复3次实验。

1.2.2 动物试验

(1)抑瘤实验 将HepG2细胞(武汉大学保藏中心提供)第30代分别等量(10⁶)接种到24只裸鼠皮下,分4组,每组6只。喂养2周见肿瘤长出后,第1组每天喂以槐耳清膏3g/kg;第2组槐耳清膏3g/kg+肌注MMC500μg/kg;第3组肌注MMC500μg/kg;每天上午给药1次。第4组不作任何处理作为对照组。每周称裸鼠体重并测量瘤体直径大小。喂养1个月后杀死动物,完整取出瘤体,比较各组瘤重,计算抑瘤率。

(2)MVD测定 采用免疫组化法。肿瘤组织常

规石蜡包埋切片,片厚 $5\mu\text{m}$,按北京中山生物技术有限公司提供的 SP 试剂盒操作说明进行染色。MVD 判断标准^[4]:凡由内皮细胞或幼稚内皮细胞形成的管状,窄隙状,囊状和空泡状染成为黄褐色的结构即判断为可计数的血管。首先低倍镜下寻找新生血管最密集区,然后在 400 倍视野下,观测染成棕色的单个细胞和细胞丛,并以此作为一个血管。分别计数 6 个视野,以计数的平均值作为该例的 MVD。但有肌层的血管或管腔 $>50\mu\text{m}$ 应排除。

1.3 统计学方法

结果均为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组与对照组比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 体外实验中 HUVEC 的血管生成及内皮细胞形态的变化

对照组胞体拉长并有芽生状管状结构伸出而使胞体不规则,相邻的变形细胞间常以管状结构相互连接,沿胞体纵轴或外伸管状结构中常可见半透明的空泡或裂隙出现。槐耳清膏 4mg/ml 组及槐耳清膏 + MMC 组的内皮细胞生成变形细胞数目、管状结构数目和长度较对照组均有显著降低 ($P < 0.05$)。槐耳清膏 3mg/ml 组的变形细胞数在 24, 72, 96, 120h 点,管状结构数目在 48 ~ 120h 点,管状结构长度在各时间点均较对照组有显著降低 (均 $P < 0.05$);槐耳清膏 2mg/ml 组的变形细胞在 24, 96, 120h,管状结构数目在各时间点,管状结构长度在 72 ~ 120h 时间点与对照组比较均有显著差异 (均 $P < 0.05$)。MMC 组内皮细胞产生的上述变化与对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。说明槐耳清膏能抑制内皮细胞血管生成,降低血管生成数量;而 MMC 对内皮细胞血管生成无影响 (表 1)。

表 1 槐耳清膏对 HUVEC 体外血管生成的影响 (每高倍镜 250 倍视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	24h	48h	72h	96h	120h
变形细胞数					
槐耳清膏(4mg/ml)组	90 $\pm 7^1$	93 $\pm 6^1$	95 $\pm 9^1$	100 $\pm 12^1$	97 $\pm 11^1$
槐耳清膏(3mg/ml)组	93 $\pm 6^1$	94 $\pm 9^2$	95 $\pm 13^1$	99 $\pm 13^1$	100 $\pm 12^1$
槐耳清膏(2mg/ml)组	92 $\pm 7^1$	95 $\pm 10^2$	97 $\pm 13^2$	101 $\pm 8^1$	105 $\pm 11^1$
槐耳清膏 + MMC 组	93 $\pm 5^1$	93 $\pm 9^1$	96 $\pm 11^1$	100 $\pm 9^1$	101 $\pm 10^1$
MMC(0.4 $\mu\text{g/ml}$)组	95 $\pm 9^2$	98 $\pm 6^2$	99 $\pm 14^2$	110 $\pm 9^2$	109 $\pm 8^2$
对照组	97 ± 8	99 ± 12	103 ± 13	112 ± 10	114 ± 11
芽生管状结构数					
槐耳清膏(4mg/ml)组	75 $\pm 5^1$	72 $\pm 4^1$	75 $\pm 7^1$	78 $\pm 9^1$	79 $\pm 6^1$
槐耳清膏(3mg/ml)组	76 $\pm 7^2$	73 $\pm 9^1$	75 $\pm 6^1$	80 $\pm 6^1$	77 $\pm 5^1$
槐耳清膏(2mg/ml)组	74 $\pm 8^1$	77 $\pm 9^1$	76 $\pm 8^1$	82 $\pm 8^1$	78 $\pm 9^1$
槐耳清膏 + MMC 组	75 $\pm 8^2$	73 $\pm 7^1$	74 $\pm 6^1$	79 $\pm 7^1$	77 $\pm 6^1$
MMC(0.4 $\mu\text{g/ml}$)组	80 $\pm 7^2$	83 $\pm 6^2$	84 $\pm 7^2$	85 $\pm 7^2$	86 $\pm 8^2$
对照组	79 ± 7	82 ± 9	83 ± 6	86 ± 6	85 ± 8
管状结构长度(μm)					
槐耳清膏(4mg/ml)组	32 $\pm 4^1$	33 $\pm 5^1$	35 $\pm 3^1$	35 $\pm 4^1$	37 $\pm 5^1$
槐耳清膏(3mg/ml)组	33 $\pm 4^1$	35 $\pm 3^1$	35 $\pm 4^1$	36 $\pm 2^1$	37 $\pm 5^1$
槐耳清膏(2mg/ml)组	36 $\pm 4^2$	36 $\pm 4^2$	36 $\pm 3^1$	38 $\pm 3^1$	39 $\pm 5^1$
槐耳清膏 + MMC 组	33 $\pm 5^1$	34 $\pm 4^1$	35 $\pm 5^1$	35 $\pm 2^1$	36 $\pm 6^1$
MMC(0.4 $\mu\text{g/ml}$)组	35 $\pm 3^2$	37 $\pm 3^2$	37 $\pm 4^2$	40 $\pm 5^2$	40 $\pm 4^2$
对照组	36 ± 2	38 ± 4	40 ± 2	42 ± 3	42 ± 4

注:与对照组比 1) $P < 0.05$; 2) $P > 0.05$

2.2 对内皮细胞迁移能力的影响

与对照组相比,MMC 组无明显差异 ($P > 0.05$);2mg/ml 槐耳清膏组与对照组差异有显著性 ($P < 0.05$),3mg/ml 及 4mg/ml 槐耳清膏组、槐耳清膏(3mg/ml) + MMC 组与对照组差异有极显著性 ($P < 0.01$),说明槐耳清膏降低内皮细胞的迁移能力与浓度有关。

表 2 槐耳清膏对 HUVEC 迁移能力的影响 ($n / HP \times 250, \bar{x} \pm s$)

组别	24h	48h
槐耳清膏(4mg/ml)组	55 ±6 ²⁾	57 ±5 ²⁾
槐耳清膏(3mg/ml)组	56 ±5 ²⁾	57 ±6 ²⁾
槐耳清膏(2mg/ml)组	59 ±6 ¹⁾	61 ±7 ¹⁾
槐耳清膏(3mg/ml) + MMC 组	56 ±6 ²⁾	57 ±5 ²⁾
MMC(0.4μg/ml)组	63 ±4	64 ±5
对照组	64 ±3	65 ±4

注:与对照组比 1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$

2.3 对内皮细胞增殖能力的影响

槐耳清膏 2mg/ml 组内皮细胞的增殖能力的明显低于对照组 ($P < 0.05$);其他 4 组内皮细胞的增殖能力也显著低于对照组,差异有极显著性 ($P < 0.01$) (表 3)。说明槐耳清膏、MMC 均能抑制体外人胎脐静脉内皮细胞的增殖能力。

表 3 槐耳清膏对 HUVEC 增殖能力的影响 ($n / HP \times 250, \bar{x} \pm s$)

组别	24h
槐耳清膏(4mg/ml)组	1950 ±220 ¹⁾
槐耳清膏(3mg/ml)组	1990 ±198 ¹⁾
槐耳清膏(2mg/ml)组	2012 ±181 ²⁾
槐耳清膏(3mg/ml) + MMC 组	1780 ±183 ¹⁾
MMC 组	1931 ±202 ¹⁾
对照组	2172 ±220

注:与对照组比 1) $P < 0.01$; 2) $P < 0.05$

2.4 对内皮细胞附壁能力的影响

MMC 组对内皮细胞的附壁能力与对照组相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。2mg/ml, 3mg/ml, 4mg/ml 槐耳清膏组、槐耳清膏(3mg/ml) + MMC 组

与对照组相比,内皮细胞的附壁能力差异有显著性 ($P < 0.05$) (表 4)。说明槐耳清膏能抑制内皮细胞的附壁能力,MMC 对其附壁能力无影响。

表 4 槐耳清膏对 HUVEC 附壁能力的影响 ($n / HP \times 250, \bar{x} \pm s$)

组别	24h
槐耳清膏(4mg/ml)组	175 ±10 [†]
槐耳清膏(3mg/ml)组	177 ±16 [†]
槐耳清膏(2mg/ml)组	185 ±13 [†]
槐耳清膏(3mg/ml) + MMC 组	176 ±16 [†]
MMC 组	194 ±15
对照组	196 ±14

注:†与对照组比, $P < 0.05$

2.5 槐耳清膏对裸鼠皮下接种肝癌细胞形成的影响

存活 23 只裸鼠接种部位见肿瘤生长,裸鼠其他部位和器官未见肿瘤生长,对肝癌的抑制作用以槐耳清膏(3g/kg) + MMC 500μg/kg 共同作用于肝癌的作用最强,后依次为 MMC 500μg/kg 组、槐耳清膏(3g/kg)组。肿瘤组织的 MVD 与对照组比:槐耳清膏(3g/kg)组、槐耳清膏(3g/kg) + MMC 组的 MVD 降低明显,差异有显著性 ($P < 0.05$)。MMC 组与对照组比,MVD 的形成无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 5)。说明槐耳清膏能降低接种形成的肝癌的 MVD。而 MMC 组降低不明显。

表 5 各实验组瘤重(g)及 MVD 值 ($n / HP \times 400$)

组别	动物数	MVD 值	瘤重	抑瘤率(%) ²⁾
槐耳清膏(3g/kg)组	6	97.53 ±5.36 ¹⁾	1.12	10.4
MMC(500μg/kg)组	6	112.96 ±9.35	0.97	22.4
槐耳清膏(3g/kg) + MMC 组	5	98.87 ±7.26 ¹⁾	0.92	25.6
MMC 组				
对照组	6	113.76 ±10.15	1.25	

注:1)与对照组比, $P < 0.05$

2) 肿瘤抑瘤率(%) = $\frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}}$

3 讨论

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,进展快,预后不理想,年病死率 1/10 000^[5]。一般症

状出现后如不作治疗,患者可短期内死亡。能否寻找一种对肝癌治疗有效而对人体毒副作用小的药物,为人们感兴趣的研究课题。槐耳是生长在中国古槐树上的一种天然菌,其入药史已有1500年余。槐耳清膏是槐耳菌质经热水提取,含有多种有机成分,10余种矿质元素,其主要活性成分是蛋白多糖。其制剂具有调节与促进机体免疫功能,杀伤、抑制肿瘤细胞的作用^[2]。目前已有其成品槐耳颗粒应用于临床。其对肝癌、肺癌、食管癌、肠癌等都有明显疗效^[2]。

正常组织的血管内皮细胞处于相对静止状态,而肿瘤组织的血管内皮细胞处于迅速增殖状态。肿瘤细胞在生长过程中能分泌产生多种血管内皮细胞生长的细胞因子,在这些因子的作用下,血管内皮细胞迅速增殖,增殖血管的组织结构和生物学性能发生变化而成为肿瘤血管内皮细胞。这种增殖的血管内皮细胞与正常血管内皮细胞不同^[6]。在肿瘤组织中,每个小血管供应数量庞大的细胞群,损伤少量的血管内皮细胞即可引起大量癌细胞死亡,产生放大效应。血管内皮细胞与血流接触紧密,克服了在癌细胞作为靶子时常见的药物传递困难。血管内皮细胞是非转化性的,发生耐药性突变机会少^[7]。人胎脐静脉内皮细胞具有分化能力,具有新生血管的特性,类似肿瘤组织的血管内皮细胞。内皮细胞的迁移、黏附、增殖、分化等多种能力共同决定了细胞的血管生成能力。研究药物对人胎脐静脉来源的内皮细胞的迁移、黏附、增殖能力的影响,可以了解该药物对肿瘤细胞的影响。本实

验结果显示:一定浓度的槐耳清膏可显著降低肿瘤组织的血管内皮细胞增殖能力,减少血管形成,抑制血管内皮细胞的迁移、黏附,降低血管密度,并能抑制肿瘤组织生长。

本组动物试验结果说明,槐耳清膏对肝癌的抑制作用的可能机制是:先作用于血管内皮细胞,影响内皮细胞的增殖能力、迁移能力、附壁能力及血管生成,从而抑制肝癌组织的血管生成,降低肝癌组织的MVD而发挥抑制肝癌生长的作用。MMC能抑制肝癌组织生长但不影响肝癌组织的MVD。

参考文献:

- [1] 黄涛,孔庆志,卢宏达,等. 槐耳清膏诱导人肺腺癌细胞A549凋亡的实验研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(8): 503 - 504.
- [2] 庄毅. 真菌抗癌药物槐耳颗粒的研制[J]. 中国肿瘤, 1999, 8(12): 542.
- [3] 黄海东,刘志红,刘浩,等. 霉酚酸及地塞米松对内皮细胞血管生成能力的影响[J]. 中华医学杂志, 2001, 81(13): 801 - 804.
- [4] 李宏江,敬静,朱精强,等. 乳腺疾病中微血管的观察分析[J]. 中国普外基础与临床杂志, 1999, 6(5): 285 - 287.
- [5] 吴阶平,裘法祖. 黄家驷外科学[M]. 第5版. 北京:人民卫生出版社, 1992. 1325 - 1326.
- [6] 刘丽,肖畅,王焯,等. 重组可溶性KDR及其抗体对内皮细胞的增殖抑制作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2002, 9(1): 23 - 26.
- [7] 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.