

健脾消癌方对结直肠癌转移模型裸鼠血管内皮生长因子与血管内皮抑素表达的影响

李勇敏, 谭小宁, 徐琳本, 吕元, 奚剑敏, 蒋益兰*

湖南省中医药研究院附属医院, 湖南长沙 410006

摘要: **目的** 观察健脾消癌方对结直肠癌裸鼠转移模型组织中血管内皮生长因子(VEGF)及血管内皮抑素(ES)表达的影响,探讨健脾消癌方拮抗结直肠癌转移的作用机制。**方法** 将 BALB/c-nu 裸鼠按随机数字表随机抽取 8 只作为对照组,其余裸鼠采用盲肠内注射 50 μ L 人结肠癌 HCT116 细胞造模,3 d 后取存活裸鼠 32 只,随机分为健脾消癌方低、高剂量(10、40 g/kg)组,5-氟尿嘧啶(5-FU, 0.13 g/kg)组,模型组,分别 ig 或 ip 相应药物及生理盐水 4 周后,采用 qRT-PCR 法测定裸鼠结直肠癌转移后结肠、肝、肺及盲肠肿瘤组织中 VEGF、ES mRNA 表达量。**结果** 在 VEGF mRNA 表达量方面,各组均较对照组升高,模型组与 5-FU 组最高($P < 0.01$);健脾消癌方 2 组较模型组显著降低($P < 0.05$ 、0.01)。在 ES mRNA 表达量方面,各组均较对照组降低,模型组与 5-FU 组最低($P < 0.01$);健脾消癌方 2 组较模型组显著升高($P < 0.05$ 、0.01)。4 个部位以盲肠组织 VEGF 水平最低,ES 水平基本相当。**结论** 健脾消癌方可能通过使结肠、肝、肺等组织 VEGF 的降低与 ES 的升高来达到拮抗结直肠癌转移的目的。

关键词: 健脾消癌方; 结直肠癌; 转移; 血管内皮生长因子; 血管内皮抑素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)16-2883-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.16.018

Effect of Jianpi Xiaoi Recipe on expression of VEGF and endostatin in nude mice with colorectal cancer metastasis

LI Yong-min, TAN Xiao-ning, XU Lin-ben, LV Yuan, XI Jian-min, JIANG Yi-lan

The Hospital Attached to Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, China

Abstract: Objective This article is aimed at investigating the effect of Jianpi Xiaoi Recipe (JXR) on the mRNA expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and endostatin (ES) in the tissue in nude mice with colorectal cancer metastasis. **Methods** Eight BALB/c-nu nude mice were randomly selected as the control group. The remaining mice, after establishing the metastatic tumor by injecting in the appendix of 50 μ L human colon carcinoma HCT116 cells, then 32 survival nude mice were taken after 3 d, and divided into JXR (low- and high-dose, 10 and 40 g/kg), 5-FU (0.13 g/kg), and model groups. After the mice were ig or ip given corresponding medicine and physiological saline for 4 weeks, the mRNA expression levels of VEGF and ES in the metastatic tumor tissue of colon, liver, lung, and cecum were evaluated by qRT-PCR method. **Results** The mRNA expression of VEGF was higher in all groups except the control group, and the highest was in the model and 5-FU groups ($P < 0.01$). Compared with the model group, the mRNA expression level in two JXR groups were significantly lower ($P < 0.05$, 0.01). ES transcription expression was lower in each group than that in the control group, the lowest was in the model and 5-FU groups ($P < 0.01$). Compared with the model group, the mRNA expression levels in the two JXR groups were significantly higher ($P < 0.05$, 0.01). Among these four organs, the expression level of VEGF in cecum was lowest, while the mRNA expression levels of ES are nearly the same. **Conclusion** JXR is possible to make the mRNA expression level of VEGF decreased, but the mRNA expression level of ES increased in the metastatic tumor tissue of colon, liver, lung, and cecum, so as to resist the metastasis of colorectal cancer.

Key words: Jianpi Xiaoi Recipe; colorectal cancer; metastasis; vascular endothelial growth factor; endostatin

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种能特异作用于血管内皮细胞的生长因子,是一种促血管生成活性的功能性蛋白。有研究表明,实体瘤的进展取决于血管生成,而

收稿日期: 2016-01-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81373602); 湖南省科技计划科研条件创新专项(2013TT1004); 湖南省自然科学基金项目(14JJ5041)

作者简介: 李勇敏,男,硕士生导师。Tel/Fax: (0731)88719079 E-mail: lym0937@126.com

*通信作者 蒋益兰,女,主任医师,博士研究生导师,从事中医药防治恶性肿瘤的临床及实验研究。E-mail: tianshangren624@163.com

VEGF 为关键的促血管生成因子,其基因包括 8 个外显子、7 个内含子和若干单核苷酸多态性,这些因子使 VEGF 在肿瘤细胞的诱导分化中起重要作用;阻断 VEGF 可使血管网恢复,并抑制肿瘤生长^[1-2]。血管内皮抑素(endostatin, ES)采自胶原蛋白的非胶原域,是一种内源性血管生成抑制因子,可特异性地作用于新生微血管的内皮细胞,具有抗肿瘤作用^[3-4]。健脾消癌方是湖南省名中医蒋益兰教授的经验方,本项目组前期临床研究表明^[5],健脾消癌方可有效拮抗大肠癌术后复发,提高生存质量,有效延长生存期;实验研究^[6]表明健脾消癌方可有效延长裸鼠生存期,增加其体质量,降低 VEGF、VEGF 受体(VEGFR-2)蛋白表达量。本研究在前期研究基础上,进一步观察健脾消癌方对结直肠癌转移模型裸鼠各组织中 VEGF 和 ES mRNA 表达的影响,探讨健脾消癌方抗结直肠癌转移的血管生成调节作用。

1 材料

1.1 动物及细胞株

SPF 级 BALB/c-nu 裸鼠 60 只,雌性,4~6 周龄,购自湖南斯莱克实验动物有限公司,合格证号 43004700012242,许可证号 SCXK(湘)2011-0003。人结肠癌细胞株 HCT116 购买于中国科学院细胞库,编号 TCHu 99。

1.2 药物

健脾消癌方由党参、白术、茯苓、法半夏、黄芪、灵芝、炒枳壳、薏苡仁、仙灵脾、郁金、莪术、白花蛇舌草、半枝莲、重楼、甘草组成。上述药物按《中国药典》2010 年版标准规格采购,购自湖南省中医药研究院附属医院中药房。取以上 15 味中药,5 倍量处方,提取 2 次,第 1 次加 8 倍量水浸泡 0.5 h,加热煎煮 1 h,滤过;第 2 次加 6 倍水,煎煮 1 h,滤过;合并滤液,静置 24 h,离心,上清液减压浓缩至约 850 mL,冰箱内冷藏 48 h。将冷藏液离心,上清液滤过,得药液约 800 mL,灭菌。制成每毫升含 2.1 g 生药的水煎液,密封后,4 ℃ 保存备用。5-氟尿嘧啶(5-FU),上海旭东海普药业有限公司生产,批号 FA130908。

1.3 试剂

逆转录试剂盒, Fermentas; Trizol, Invitrogen; Taq 酶, Genstar; 引物, 上海生工生物工程有限公司; DEPC, Sigma; DL2000 DNA Marker, Genstar; dNTP, Genstar; EB, Sigma; SYB GREEN

PCR Mix, ABI。

1.4 仪器

荧光定量 RCP 仪, Thermo; 恒温水浴箱, Thermo; J-MAX 旋涡混合器, 其林贝尔仪器制造有限公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 电动匀浆器, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

2 方法

2.1 模型制备

按文献方法^[7],于无菌环境下用 2.5%戊巴比妥钠 ip 麻醉裸鼠,左下腹切开约 2.5 cm 切口,暴露盲肠。用微量注射器将 50 μ L HCT116 细胞(浓度约 4×10^7 /mL)注入盲肠浆膜和肌层之间,用 3%碘酒清洁注射区域,缝合腹壁。接种细胞 15~20 d,可见裸鼠腹部有小肿块,表明肿瘤形成,开始向淋巴、肝、肺转移。

2.2 分组及给药

裸鼠购进后,适应性饲养 3 d 后随机抽取 8 只作为对照组。取 32 只造模成功且存活的裸鼠按照随机数字表随机分为 4 组,即健脾消癌方高、低剂量组,5-FU 阳性对照组及模型组。按照人体体表面积与小鼠体表面积比例换算,健脾消癌方低、高剂量组裸鼠分别 ig 10、40 g/kg(相当于临床等效剂量的 1、4 倍)健脾消癌方水煎液,每天 1 次;5-FU 组 ip 0.13 g/kg 5-FU,隔 3 d 给药 1 次;模型组及对照组 ig 生理盐水,连续给药 4 周。末次给药 2 h 后处死动物,即刻打开腹腔,取肝、肺(有转移结节者以结节为中心取材)、结肠及盲肠肿瘤组织约 0.5 g,液氮冷冻。

2.3 指标检测

采用 qRT-PCR 测定组织中 VEGF 和 ES 的 mRNA 表达。取约 0.1 g 组织在液氮下研磨碎,用 1 mL Trizol 提取组织总 RNA,紫外分光光度计测定浓度。用 1%变性琼脂糖凝胶,0.2 g 琼脂糖,0.5 μ L EB (10 mg/mL),混匀制胶;取 2 μ L 提取的 RNA,按 1:5 的比例与 loading buffer premix 混匀,170 V 恒压电泳,溴酚蓝前沿迁移至凝胶总长 2/3 处停止电泳;凝胶成像系统下观察。以组织总 mRNA 为模板,逆转录 cDNA。 β -actin 引物序列 F: 5'-CATCCTGCGTCTGGACCTGG-3', R: 5'-TAATGTCACGCACGATTTCC-3'; VEGF 引物序列 F: 5'-TCGGAGAGCAACGTCATATG-3', R: 5'-TTTAAACCGGGATTCTTG-3'; ES 引物序列 F: 5'-GCA-TCAAGGCCGAACATC-3', R: 5'-TCCAGTGCG-

GGACCAAG-3'。实时定量 PCR, SYBR 法, 定量 PCR 扩增程序: 预变性, 95 °C、10 min; 变性, 95 °C、10 s; 40 个循环。退火/延伸: VEGF, 58 °C、50 s; ES, 60 °C、50 s。

2.4 统计学处理

采用 $2^{-\Delta Ct}$ 法计算目的基因 mRNA 转录水平, 实验结果采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 两组间比较符合方差齐性者用 t 检验, 不符合方差齐性者用 t' 检验。

3 结果

3.1 各组裸鼠不同组织中 VEGF mRNA 表达的比较

与对照组比较, 模型组裸鼠结肠、肝、肺和盲

肠肿瘤组织的 VEGF mRNA 表达量明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较, 健脾消癌方 2 组裸鼠结肠、肝、肺和盲肠肿瘤组织的 VEGF mRNA 表达量明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。4 个部位以盲肠肿瘤组织中 VEGF mRNA 水平最低, 结果见表 1。

3.2 各组裸鼠不同组织中 ES mRNA 表达的比较

与对照组比较, 模型组裸鼠结肠、肝、肺及盲肠肿瘤组织的 ES mRNA 表达量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 健脾消癌方 2 组裸鼠结肠、肝、肺和盲肠肿瘤组织的 ES mRNA 表达量显著升高 ($P < 0.01$); 4 个组织中 ES mRNA 表达水平基本相当, 结果见表 2。

表 1 各组裸鼠不同组织中 VEGF mRNA 表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tabel 1 Comparison on mRNA expression level of VEGF in different tissues of nude mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数/只	VEGF mRNA 相对表达量 ($\times 10^{-3}$)			
			结肠	肝	肺	盲肠肿瘤
对照	—	8	1.66 ± 0.74	1.93 ± 0.97	1.75 ± 0.82	0.97 ± 0.49
模型	—	8	5.38 ± 1.80**	4.80 ± 1.42**	5.08 ± 1.30**	4.96 ± 1.43**
健脾消癌方	40	7	2.71 ± 0.96 ^{##}	2.30 ± 0.91 ^{##}	3.23 ± 1.01 ^{##}	1.73 ± 0.90 ^{##}
	10	8	3.11 ± 1.19	2.86 ± 1.15 ^{##}	3.26 ± 1.15 [#]	2.11 ± 0.97 ^{##}
5-FU	0.13	8	6.14 ± 2.04	5.02 ± 1.23	4.62 ± 1.24	3.85 ± 1.34

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group, same as below

表 2 各组裸鼠不同组织中 ES mRNA 表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tabel 2 Comparison on mRNA expression level of ES in different tissues of nude mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数/只	ES mRNA 相对表达量 ($\times 10^{-3}$)			
			结肠	肝	肺	盲肠肿瘤
对照	—	8	6.31 ± 1.40	6.25 ± 1.35	6.90 ± 1.34	5.75 ± 1.16
模型	—	8	4.32 ± 1.30*	4.04 ± 1.23**	3.78 ± 1.22**	2.64 ± 0.89**
健脾消癌方	40	7	6.63 ± 1.48 ^{##}	7.59 ± 1.40 ^{##}	7.48 ± 1.36 ^{##}	5.98 ± 1.50 ^{##}
	10	8	5.56 ± 1.35	7.46 ± 1.36 ^{##}	7.21 ± 1.37 ^{##}	6.75 ± 1.41 ^{##}
5-FU	0.13	8	2.42 ± 0.86	2.73 ± 0.78	2.77 ± 0.81	2.11 ± 0.71

4 讨论

血管形成受血管生成因子与抗血管生成因子所调控。在肿瘤的形成或伤口愈合时, 血管生成因子占主导, 血管内皮细胞被激活, 血管扩张和通透性增加, 血管内皮细胞增殖、迁移和成管^[3]。研究表明, 结直肠癌转移患者采用 VEGF 抑制剂靶向治疗取得良好的临床疗效, 然而, 但有些患者很快耐药或无效, 其原因是患者处于高脂肪合成高氧化磷酸化状态和存在丝氨酸合成信号^[8]。

来源于胶原蛋白的 ES 具有血管生成和血管内

皮细胞自噬调节剂双重活性, 可能成为治疗癌症的新靶点, 人工重组 ES (恩度) 已取得较好的治疗效果^[9]。然而, 一些癌症包括结直肠癌, 其血液中 ES 浓度升高, 尽管有研究证明, ES 水平升高可能是由于结直肠癌浸润肠道壁致使肌层胶原蛋白 XVIII 降解增加, 但肿瘤组织中 ES 未见升高^[10]。但这种情况往往使临床治疗非常困难。

中医认为, 大肠癌发病的根本原因是先天不足, 正气亏虚; 六淫邪毒、情志郁结、饮食内伤等。本课题组认为结直肠癌术后转移患者以脾胃亏虚、

气血不足、瘀毒未尽,“虚、瘀、毒”并存为其病机特点,须健脾益气,化瘀解毒,方为良策^[11]。健脾消癌方是蒋益兰教授治疗结直肠癌临床经验的总结,以健脾益气、化瘀解毒为治法,由人参、茯苓、薏苡仁、仙灵脾、白花蛇舌草、石见穿、莪术、郁金等组成。前期研究证实本方能缓解结直肠癌术后肝转移,临床配合化疗,结果表明其可有效延长患者生存期,降低复发转移率^[5]。

虽然癌症靶向药物针对性很强,但治疗面有限。中医药从整体出发,全面治疗,但作用机制复杂。本实验研究发现,健脾消癌方能降低结直肠癌转移裸鼠肠、肝、肺组织中 VEGF 表达,升高 ES 表达,提示可能通过调节二者 mRNA 表达水平,达到拮抗结直肠癌转移的作用。但转录水平的改变与蛋白表达有一定的差距,另外,血管生成的影响因素较多,需进行更深入的研究。值得注意的是本研究采用 5-FU 为阳性对照药,因其为细胞毒性药物,对血管生成影响甚微。故在以后的研究中宜选用更合适的阳性对照药物进行深入探讨。

参考文献

- [1] Chekhonin V P, Shein S A, Korchagina A A, *et al.* VEGF in tumor progression and targeted therapy [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(4): 423-443.
- [2] Paré-Brunet L, Glubb D, Evans P, *et al.* Discovery and functional assessment of gene variants in the vascular endothelial growth factor pathway [J]. *Hum Mutat*, 2014, 35(2): 227-235.
- [3] Chung, S, Dwabe S, Elshimali Y, *et al.* Identification of novel biomarkers for metastatic colorectal cancer using angiogenesis-antibody array and intracellular signaling array [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0134948.
- [4] Alahuhta I, Aikio M, Väyrynen O, *et al.* Endostatin induces proliferation of oral carcinoma cells but its effect on invasion is modified by the tumor microenvironment [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 336(1): 130-140.
- [5] 蒋益兰, 潘敏求, 蔡 美. 健脾消癌饮配合化疗拮抗大肠癌术后复发转移 62 例总结 [J]. 湖南中医杂志, 2007, 23(1): 1-3.
- [6] 蒋益兰, 罗 星, 李勇敏, 等. 健脾消癌方对裸鼠大肠癌肝转移模型 VEGF 以及 VEGFR-2 表达的影响 [A] // 第十四届全国中西医结合肿瘤学术大会论文集 [C]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.
- [7] Céspedes M V, Espina C, García-Cabezas M A, *et al.* Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(3): 1077-1085.
- [8] Pommier A J, Farren M, Patel B, *et al.* Leptin, BMI, and a Metabolic Gene Expression Signature Associated with Clinical Outcome to VEGF Inhibition in Colorectal Cancer [J]. *Cell Metab*, 2016, 23(1): 77-93.
- [9] Poluzzi C, Iozzo R V, Schaefer L. Endostatin and endorepellin, a common route of action for similar angiostatic cancer avengers [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 97: 156-173.
- [10] Kantola T, Väyrynen J P, Klintrup K, *et al.* Serum endostatin levels are elevated in colorectal cancer and correlate with invasion and systemic inflammatory markers [J]. *Br J Cancer*, 2014, 111(8): 1605-1613.
- [11] 蒋益兰, 荆 珍. 中医药防止大肠癌转移作用与机制的研究概况 [J]. 湖南中医杂志, 2009, 25(1): 103-104.