

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.09.004

槐耳颗粒联合沙利度胺抑制鼠肝癌 H22 细胞种植瘤的实验

余安平,李雄英,李 凌

Research of Huaier Granules Combined with Thalidomide Inhibits H22 Liver Cancer Cells Subcutaneously Implanted into Mice

YU Anping, LI Xiongying, LI Ling

Department of Oncology, The Affiliated Second Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

Corresponding Author: LI Ling, E-mail: lilkj@163.com

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Huaier Granules combined with Thalidomide inhibited tumor. **Methods** Male Kunming mice were randomly divided into controlled group (group A), Huaier granules group (group B), Thalidomide group (group C), and Huaier granules plus Thalidomide group (group D). Each group consisted of 10 mice. The tumor-bearing mice model was induced by subcutaneously injection of H22 cells. The mass of transplanted tumor and inhibition rate of tumor in all groups were observed. The expression of VEGF and CD 31 protein was assayed by immunohistochemical method. **Results** Compared with those in control group, the mass of transplanted tumor tissue and the positive rate of CD 31 protein in three treated groups were significantly decreased ($P<0.01$). And the positive rate of VEGF protein in group D was significantly decreased ($P<0.01$). Compared with those in group A and group B, the mass of tumor tissue and the positive rate of CD 31 protein in group D were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Huaier granules and Thalidomide had marked and synergy antitumor effect. The mechanism might be related to the apoptosis of tumor cells induced by the down-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) protein.

Key words: Huaier granules; Thalidomide; Tumor inhibiting rates; Vascular endothelial growth factor; Microvessel density

摘要:目的 探讨槐耳颗粒和沙利度胺治疗肿瘤的作用机制。**方法** 将雄性昆明小鼠(每组 10 只)分为对照组(A 组)、槐耳颗粒组(B 组)、沙利度胺组(C 组)和槐耳颗粒+沙利度胺组(D 组)。用 H22 细胞给小鼠皮下注射,复制皮下瘤模型。观察各组移植瘤质量和抑瘤率,采用免疫组织化学法检测各组瘤组织 VEGF、CD31 蛋白表达。**结果** 与对照组比较,3 个用药组小鼠的移植瘤重和瘤组织 CD31 阳性率显著低于对照组 ($P<0.01$),槐耳颗粒+沙利度胺组 VEGF 表达显著低于对照组 VEGF 表达 ($P<0.01$);与沙利度胺组和槐耳颗粒组比较,槐耳颗粒+沙利度胺组小鼠瘤质量和瘤组织 CD31 阳性率显著降低 ($P<0.05$)。**结论** 槐耳颗粒和沙利度胺联合用药有明显抑制肿瘤生长的作用,其机制可能是通过下调 VEGF 蛋白表达和降低微血管密度,促进肿瘤细胞凋亡;并且两者有协同作用。

关键词: 槐耳颗粒;沙利度胺;抑瘤率;血管内皮生长因子;微血管密度

中图分类号: R73-3; R735.7 **文献标识码:** A

0 引言

肝细胞肝癌 (hepatohepatic carcinoma, HCC) 是具有高度侵袭力的恶性肿瘤,其预后受多种因素

的综合影响。其中肿瘤血管的形成、生长与肿瘤的侵袭、转移和预后密切相关。本实验通过观察槐耳颗粒与沙利度胺联合用药对小鼠皮下种植 H22 肝癌细胞瘤的作用,探讨其抑制肿瘤生长的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和药物 槐耳颗粒由启东盖天力药业有限公司生产;沙利度胺由常州制药厂有限公司生

收稿日期:2012-08-27;修回日期:2012-12-24
基金项目:江西省卫生厅中医药科研基金资助项目 (2010A026)
作者单位:330006 南昌,南昌大学第二附属医院肿瘤科
通信作者:李凌, E-mail: lilkj@163.com
作者简介:余安平(1977-),男,硕士在读,主治医师,主要从事肿瘤综合治疗的研究

产; VEGF 和 CD31 免疫组织化学试剂盒为美国 Santa Cruz 公司产品。

1.1.2 实验细胞及实验动物 小鼠肝癌细胞 H22 购于武汉大学典型培养物保藏中心实验室; 昆明种小鼠(合格证号: 医动字第 02196-02 号), 18~22 g 雄性由南昌大学医学院动物实验中心饲养。

1.2 方法

1.2.1 荷瘤小鼠模型建立 H22 小鼠肝癌细胞常规复苏, 用 RPMI1640 培养液洗涤对数生长期的肝癌细胞, 收集并重新悬浮细胞于 RPMI1640 培养液中, 将肝细胞培养于含体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液(含青霉素 100 u/ml, 含链霉素 100 μg/ml)中, 置于 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 的培养箱内常规传代培养。倒置显微镜下观察细胞呈悬浮生长, 形态良好无退化, 待其悬浮满瓶 70%~80% 时, 以 1000 r/min 转速离心 5 min, 弃上清液, 加入适量的 RPMI1640 培养液调整至细胞浓度 1.0×10^7 /ml, 以锥虫蓝测定细胞活力在 95% 以上备用, 常规无菌操作后在小鼠右侧腹背皮下接种 0.2 ml 细胞悬液制备移植瘤模型。

1.2.2 动物分组及处理 模型复制当天, 将 KM 小鼠随机分为 4 组(10 只/组): A 组(对照组); B 组(槐耳颗粒组); C 组(沙利度胺组)和 D 组(槐耳颗粒+沙利度胺组)。B 组每天按 2 g/kg 槐耳颗粒灌胃, 连续 28 天; C 组每天按沙利度胺 50 mg/kg 灌胃, 连续 28 天; D 组联合应用 B 组、C 组的处理方法; A 组则每天用等量的 0.9% 氯化钠溶液灌胃, 连续 28 天。实验过程中, 无小鼠死亡。

1.2.3 标本采集 用药 4 周, 结束用药后 1 天脱颈椎处死小鼠, 立即切取瘤组织, 称质量, 置于 4% 多聚甲醛固定, 浸蜡包埋, 行免疫组织化学染色。

1.2.4 检测指标及判定 (1) 抑瘤率测定: 剥离皮下瘤称质量, 计算抑瘤率。抑制率 = (对照组平均瘤重 - 给药组平均瘤重) / 对照组平均瘤重 × 100%。(2) H22 肝癌组织微血管密度(microvessel density, MVD)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)测定。

免疫组织化学 SP 法染色步骤参考试剂盒说明书进行。

MVD 测定方法: 参照 Weidner 等^[1]方法, 从每只小鼠的肿瘤切片中随机选出 5 张, 先用低倍镜扫描整个玻片, 寻找血管密度最高的区域, 即“热点”。热点多位于肿瘤的边缘部位, 但也可见于肿瘤的其他部位。找到“热点”后, 在 5 个高倍镜视野下计数被染色的血管平均数目。血管生成的判断标准: 任何被 CD31 抗体染成棕黄色的单个细胞或细胞团,

不管是否形成管腔, 只要与周围的微血管、肿瘤细胞和其他连接组织成分有清楚的分隔, 都认为是 1 个可计数的微血管。肿瘤内硬化区以及与肿瘤交界处软组织内的微血管不计数, 有厚的平滑肌壁以及管腔直径 > 8 个红细胞直径的血管也排除在外。实验结果由专人盲法计算。

VEGF 表达判断标准: 以细胞质或细胞质和核膜同时着棕黄色或黄褐色为阳性反应。阳性表达水平采用染色强度评分乘以阳性细胞面积评分的积分表示。染色强度评分为: 0 级: 阴性染色, 与背景色一致; 1 级: 弱阳性染色, 淡黄色; 2 级: 阳性染色, 黄色; 3 级: 强阳性染色, 棕黄色。阳性细胞面积分为 0 级: 阳性细胞占 < 10%; 1 级: 阳性细胞占 10%~25%; 2 级: 阳性细胞占 > 25%~50%; 3 级: 阳性细胞占 > 50%~75%; 4 级: 阳性细胞占 > 75%。两者定性积分表达 ≤ 3 分为阴性(-), 4~6 分为弱阳性(+), 7~9 分为阳性(++), 10~12 分为强阳性(+++)。阴性、弱阳性为低表达, 阳性、强阳性为高表达。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13 统计软件进行分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素方差分析, 组间两两比较用 *q* 检验; 计数资料用四格表确切概率法 Fisher 检验; *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组抑瘤率比较

各用药组(B、C、D 组)移植瘤平均重量均显著低于对照组(A 组)(*P* < 0.01); 槐耳颗粒+沙利度胺组(D 组)移植瘤平均瘤重显著低于槐耳颗粒组(B 组)及沙利度胺组(C 组)(B、C 组与 D 组比较 *P* < 0.05), 见表 1、2。

表 1 各组小鼠肿瘤瘤体重量及抑瘤率的两两比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparisons of weight and tumor-inhibition rate in all groups ($\bar{x} \pm s$)

Groups (<i>n</i> = 10)	Mean weight of tumor(g)	Tumor- inhibition rate (%)
Control group (A)	5.8804 ± 1.15868 *	—
Huaier granules group (B)	4.2574 ± 0.57328 *△	27.60
Thalidomide group (C)	4.1575 ± 0.44869 *△	29.29
Huaier granules and Thalidomide group(D)	3.1100 ± 0.16866 *△	47.11

Note: group A compared with group B, C, D, *: *P* < 0.01; group D compared with group B, C, △: *P* < 0.05

2.2 各组移植瘤组织 MVD 计数比较

各用药组(B、C、D 组)移植瘤组织 MVD 计数均显著低于对照组(A 组)(B、C、D 组与 A 组比较 *P*

<0.01);槐耳颗粒+沙利度胺组(D组)移植瘤组织MVD计数显著低于槐耳颗粒组(B组)及沙利度胺组(C组)(B、C组与D组比较 $P<0.01$),见表3、4、图1。

表 2 各组抑瘤率具体数据统计学分析情况
Table 2 The specific statistics analysis of tumor-inhibition rate in all groups

Group(I)	Group(J)	Mean Difference (I-J)	Sig.
A	B	1.6230 *	0.000
	C	1.7229 *	0.000
	D	2.7704 *	0.000
B	C	0.0999	0.748
	D	1.1474 *	0.001
C	D	1.0475 *	0.0002

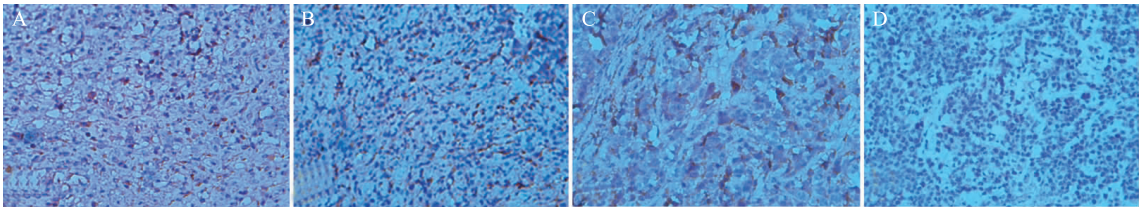
Note;the mean difference is significant at the 0.05 level; *: $P<0.05$;A: control group, B: Huaier granules group, C: Thalidomide group, D: Huaier granules and Thalidomide group ; I-J: the mean difference between the group in column I and group in column J

表 3 各组小鼠肿瘤组织微血管密度的两两比较($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Comparisons of microvessel density of tumor in all groups ($\bar{x}\pm s$)

Groups($n=10$)	MVD
Control group (A)	$30.8000\pm4.21110^*$
Huaier granules group(B)	$21.8000\pm4.66190^*\triangle$
Thalidomide group (C)	$20.1000\pm3.31495^*\triangle$
Huaier granules and Thalidomide group (D)	$12.4000\pm4.90351^*\triangle$

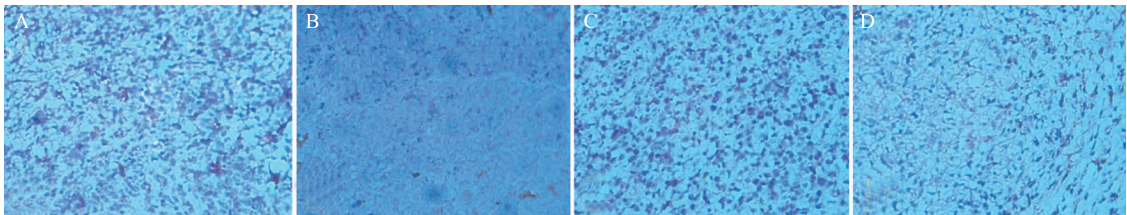
Note; group A compared with group B, C, D, *: $P<0.01$; group D compared with group B, C, $\triangle$: $P<0.01$

2.3 血管内皮生长因子阳性率比较



A: control group; B: huaier granules group; C: thalidomide group; D: huaier granules and thalidomide group

图 1 各组移植瘤组织中CD 31的表达(SP ×400)
Figure 1 The expression of CD31 in all groups of the transplantation tumor tissue (SP ×400)



A: control group; B: huaier granules group; C: thalidomide group; D: huaier granules and thalidomide group
图 2 各组移植瘤组织中血管内皮生长因子的表达(SP ×400)
Figure 2 The expression of vascular endothelial growth factor in all groups of the transplantation tumor tissue (SP ×400)

表 4 各组移植瘤组织中 MVD 具体数据统计学分析情况
Table 4 The specific statistics analysis data about MVD of the transplantation tumor tissue in all groups

Groups (I)	Groups (J)	Mean Difference (I-J)	Sig.
A	B	9.0000 *	0.000
	C	10.7000 *	0.000
	D	18.4000 *	0.000
B	C	1.7000	0.384
	D	9.4000 *	0.000
C	D	7.7000 *	0.000

Note;the mean difference is significant at the 0.05 level, *: $P<0.05$; A: control group; B: huaier granules group; C: thalidomide group; D: huaier granules and thalidomide group; I-J: the mean difference between the group in column I and group in column J

槐耳颗粒+沙利度胺组(D组)VEGF 阳性率显著低于对照组(A组)($P<0.01$),见表5、图2。

3 讨论

20 世纪 70 年代初,Folkman 首先提出肿瘤血管生成的理论,认为肿瘤在新生血管形成以前,只能生长到 $1\text{ mm}^3\sim2\text{ mm}^3$,不会发生转移;在新生血管形成以后,肿瘤会成倍增长,转移的机会随之增加。现已公认,新生血管形成是肿瘤生长、侵袭、转移、复发的关键环节,是瘤细胞诱导毛细血管形成而建立血液循环的过程。微血管密度是衡量肿瘤血管生成的量化指标,一般应用 FVIaG、CD31、CD34 来标记肿瘤血管。肿瘤血管生成受许多血管生成因子与抑制因子的调节。血管内皮细胞生长因子(vascular

表 5 各组移植瘤组织中血管内皮生长因子表达情况的两两比较（四格表确切概率法 Fisher 检验）

Table 5 Comparisons of vascular endothelial growth factor expression in all groups of the transplantation tumor tissue (Fisher exact test)

	Group A	Group B	Group A	Group C	Group A	Group D	Group B	Group C	Group B	Group D	Group C	Group D
Low expression	2	6	2	7	2	9	6	7	6	9	7	9
High expression	8	4	8	3	8	1	4	3	4	1	3	1
Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>df</i>	1		1		1		1		1		1	
χ^2	0.952		5.051		9.899		1.818		5.495		1.250	
<i>P</i>	0.628		0.070		0.005 Δ		0.370		0.057		0.582	

Note: group D compared with group A , Δ :*P*<0.01

endothelial growth factor, VEGF)是最强有力的血管生成因子,其是一种糖基化分泌性多肽因子,是高度特异的血管内皮分裂素。VEGF 的功能主要是使内皮细胞分裂增殖、血管构建和升高血管肿瘤防治研究的通透性。一些血管生成因子的血管生成作用是通过增强 VEGF 的表达及生成作用来实现的。VEGF 在肿瘤组织中有较高的表达,与肿瘤的浸润、转移密切相关。肝癌则是典型的血管生成依赖实体肿瘤,肝癌细胞的快速生长导致癌组织内的缺氧环境是 VEGF 分泌的最强诱导剂,实验证实 VEGF 在肝癌组织中表达显著高于癌旁组织、正常肝组织,并且与肝癌的恶性程度密切相关,提示 VEGF 在肝癌发生发展、侵袭转移中起着重要的作用,使其成为肝癌患者预后不良的独立危险因素^[2],而且 VEGF 表达还是 HCC 发生转移的预测指标^[3-4]。癌细胞发生远处转移还与癌细胞的侵袭能力、免疫逃避能力、适应继发部位的微环境的能力有关。

沙利度胺(thalidomide)是一种谷氨酸衍生物,作为 TNF- α 抑制剂,可以抑制肿瘤血管形成,同时刺激 T 细胞 IL-2 增值,抑制中性粒细胞趋化作用,降低单核细胞的吞噬作用具有抗血管生成和免疫调节双重作用^[5],临床实践证实沙利度胺对肝癌确有一定的疗效^[6-7],但大剂量使用沙利度胺往往有一些严重的并发症。动物实验和临床研究表明小剂量的沙利度胺也能起到抗肿瘤血管生成作用^[8-10]。因此本研究沙利度胺的用量仅为每天 50 mg/kg 灌胃一次,连续 28 天,取得了预期效果。

槐耳是一种入药 1 500 年但已湮没 300 余年的重要药用菌,李时珍《本草纲目》等有关本草均有记载,味苦辛无毒,能“治风”、“破血”、“益力”(《本草纲目·菜部·二十八卷》)。它曾经是中国历史上著名的药用真菌,民间多用于治疗癌症及炎症。槐耳颗粒冲剂作为中药是国家一类新药的典型代表,含有多 种有机成分,主要活性成分是多糖蛋白(PS-T),具

有抑瘤、增强免疫的双重作用。其免疫调节机制包括:(1)激活巨噬细胞或中性粒细胞活性;(2)激活自然杀伤细胞(NK)活性;(3)促使 T 淋巴细胞分裂、增殖、成熟及分化;(4)提高体液免疫能力;(5)诱导和产生 d 及 1-干扰素。该药临床应用于消化系统、血液系统恶性肿瘤的治疗疗效明显,尤其是对中、晚期肝癌具有显著抑制肿瘤生长的作用^[11]。动物实验表明槐耳颗粒冲剂不仅能防癌、抑癌,而且能预防和抑制肝硬化的形成^[12]。其治疗肿瘤的机制近年来也成为一个研究热点。该药不仅能抑制肿瘤细胞的生长,增强机体免疫力,还具有抑制由血管内皮生长因子(VEGF)诱导的血管内皮细胞增殖分化构建新生血管的作用^[13]。Chen 等^[11]报道,在体外实验中槐耳颗粒冲剂能够抑制由 VEGF 诱导的血管内皮细胞增殖分化构建新生血管的过程,提示槐耳颗粒冲剂可能通过影响 VEGF 诱导血管内皮细胞增殖分化而具有潜在的抗血管生成作用。陈大兴等^[14]利用槐耳颗粒清膏影响裸鼠皮下接种肝癌细胞形成肝癌过程,发现槐耳颗粒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。

本实验研究显示槐耳颗粒和沙利度胺均有明显的抑制肿瘤生长的作用。槐耳颗粒抑制肿瘤生长的作用可能与增强免疫和通过影响 VEGF 诱导血管内皮细胞增殖分化而具有潜在的抗血管生成作用有关;沙利度胺抑制肿瘤生长的作用可能与有效抑制由 bFGF 和 VEGF 诱导的血管生成和选择性的抑制了 TNF- α 的表达有关。两药在体内均可以降低 VEGF 和 CD31 的表达,并且槐耳颗粒与沙利度胺联合用药降低瘤组织内 VEGF 和 CD31 表达的作用较单纯使用槐耳颗粒和沙利度胺组更明显,发挥了显著的协同作用,对于临床用药有一定的参考价值,值得进一步研究与探讨。但是肿瘤的发生、发展、扩散

及转移机制非常复杂,本实验只做了初步的探讨,对于其他可能的机制如抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡等等均有待于进一步的深入研究。而且小鼠与人体的结构相差甚远,在移植瘤模型上取得的结果是否与人体一致也需进一步验证。

参考文献:

[1] Weidner N. Intratumoral microvessel density as a prognostic factor in cancer [J]. *Am J Pathol*,1995,147(1):9-19.

[2] Jia JB, Zhuang PY, Sun HC, *et al.* Protein expression profiling of vascular endothelial growth factor and its receptors identifies subclasses of hepatocellular carcinoma and predicts survival[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135(6): 847-54.

[3] Wang S, Liu H, Ren L, *et al.* Inhibiting colorectal carcinoma growth and metastasis by blocking the expression of VEGF using RNA interference[J]. *Neoplasia*,2008,10(4):399-407.

[4] Fu H, He SX, Xu JL, *et al.* Effect of tanshinone II A on vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma cell[J]. *Xi'an Jiao Tong Da Xue Xue Bao (Yi Xue Ban)*,2009,30(1):115-8. [符寒,和水祥,徐俊丽,等. 丹参酮 II A 对肝癌细胞血管内皮生长因子表达的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版),2009,30(1):115-8.]

[5] Huang Z. Hepatocellular carcinoma molecular targeted therapy progress [J]. *Shi Yong Zhong Liu Za Zhi*, 2011, 26 (4) : 340-2. [黄振. 肝细胞肝癌分子靶向治疗进展[J]. 实用肿瘤杂志,2011,26(4): 340-2.]

[6] Lin AY, Brophy N, Fisher GA, *et al.* Phase II study of thalidomide in patient with unresectable hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer*,2005,103(1): 119-25.

[7] PattYZ, Hassan MM, Lozano RD, *et al.* Thalidomide in the treatment of patient with hepatocellular carcinoma : a phase II trial[J]. *Cancer*, 2005, 103(4):749-55.

[8] Li L, Xu XM, Li CL, *et al.* Experiment study on combination of intratumor scutellaria Barbata injection and Thalidomide on liver cancer [J]. *Zhongguo Zhong Yi Yao Xin Xi Za Zhi*, 2009,

16(2) : 30-1. [李凌,徐雪明,李春来,等. 半枝莲联合反应停治疗肝癌的实验研究[J]. 中国中医药信息杂志,2009,16(2): 30-1.]

[9] Yu AP, Li L, Feng L, *et al.* Large dose of cisplatin and endostain perfusion in ShenShi combined with Thalidomide in treatment of advanced liver cancer [J]. *Shi Yong Zhong Liu Za Zhi*,2012, 27(3):286-9. [余安平,李凌,冯龙,等. 大剂量顺铂恩度申时灌注联合沙利度胺治疗中晚期肝癌[J]. 实用肿瘤杂志,2012,27(3):286-9.]

[10] Kong Y, Jiang D, Zhang M. Effect of Thalidomide on VEGF-C and its receptor expression in human breast cancer cell lines [J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2007, 34 (12) : 921-3. [孔雁,姜达,张敏. 沙利度胺对人乳腺癌细胞血管内皮生长因子-C 及其受体表达的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2007, 34 (12): 921-3.]

[11] Chen L, Lu ZX, Lu P, *et al.* Anticancer effect of PS-T on the experimental hepatocellular carcinoma [J]. *Zhong De Lin Chuang Zhong Liu Xue Za Zhi (Ying Wen Ban)*,2004,3(1):55-9. [陈莉,陆正鑫,陆鹏,等. 对实验性肝癌中槐耳抗癌作用的研究[J]. 中德临床肿瘤学杂志(英文版), 2004,3(1):55-9.]

[12] Li LX, Ye SL, Wang YH, *et al.* Research on apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells induced by trametes robiniophila [J]. *Zhongguo Lin Chuang Yi Xue*,2005,12(6):1152-3. [李立新,叶胜龙,王艳红,等. 槐耳浸膏诱导肝癌细胞凋亡的实验研究[J]. 中国临床医学,2005,12(6):1152-3.]

[13] Xu GL, Jia WD, Ma JL. Experimental study of extract of fungus of huai'er on angiogenesis in vitro [J]. *Zhongguo Yao Li Xue Tong Bao*,2003,12 (12):95-7. [许戈良,茆卫东,马金良. 槐耳清膏体外抑制血管生成的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2003,19(12):95-7.]

[14] Chen DX, Chen XP, Zhang WG. Experimental research of the Fungus of Huai Er in treatment liver cancer [J]. *Zhongguo Pu Tong Wai Ke Za Zhi*,2004,13(8):20-4. [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):20-4.]

[编辑:周永红;校对:杨 卉]