

复方肠泰抑制新生血管生成的实验研究

刘静冰 李灵常 魏国利 吴夏慧 李检阅 霍介格
(南京中医药大学附属中西医结合医院肿瘤科, 江苏南京 210028)

摘要 目的:研究复方肠泰对血管内皮细胞迁移、增殖和小管形成,及对小鼠体内新生血管生成的影响。方法:以人脐静脉内皮细胞(HUVEC)为研究对象,划痕试验检测复方肠泰对HUVEC迁移的影响,CCK-8检测复方肠泰对HUVEC增殖的影响,小管形成试验检测复方肠泰对HUVEC小管形成的影响。通过SCID小鼠Matrigel栓试验,模拟体内环境观察复方肠泰对血管生成的影响。结果:与生理盐水对照组比较,质量浓度为10、20、40 mg/mL的复方肠泰水煎液均可抑制HUVEC迁移、增殖和小管形成($P<0.05$),其中复方肠泰40 mg/mL组的迁移抑制率和小管形成抑制率为67.52%和88.89%,复方肠泰抑制HUVEC细胞增殖有时间和浓度依赖性。在SCID小鼠Matrigel栓模拟的体内环境下,复方肠泰各剂量均能抑制Matrigel栓中血红蛋白含量,与模型组比较差异均有统计学意义($P<0.05$),且呈现浓度依赖性。结论:复方肠泰能在体外抑制HUVEC迁移、增殖和小管形成,在体内抑制SCID小鼠Matrigel栓中血红蛋白含量,具有抗新生血管生成作用。

关键词 人脐静脉内皮细胞;复方肠泰;经验方;细胞迁移;细胞增殖;新生血管形成;小鼠;雄性

中图分类号 R285.5 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X (2021) 03-0075-04

基金项目 中国中医科学院江苏分院开放课题(FY201803);国家中医临床研究基地课题(JD2019SZXYB04)

肠癌是最常见的消化系统恶性肿瘤,据《2015年中国癌症数据》报道,2015年我国结直肠癌患者新增人数超过37万人,死亡超过19万人,发病率和死亡率在所有恶性肿瘤中居第五位^[1]。中医药在结直肠癌的治疗中发挥着日益重要的作用。复方肠泰系我院肿瘤科治疗结肠癌的经验方,由人参、薏苡仁、白花蛇舌草、莪术、八月札和藤梨根等六味中药组成。人参中的人参皂苷Rg3是重要的抗血管生成因子,可抑制肝癌、结肠癌等多种肿瘤的新生血

管生成^[2-3]。课题组前期研究发现,复方肠泰通过半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)诱导结肠癌细胞SW480凋亡,诱导自噬体活化巨噬细胞而促进抗肿瘤免疫应答,诱导HT-29移植瘤细胞自噬和凋亡,抑制裸鼠移植瘤生长^[4-5]。因此,我们推测复方肠泰可能具有抗新生血管生成作用,并与其抗结肠癌作用相关,故本研究以人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和SCID小鼠为研究对象,探索复方肠泰对新生血管生成的影响。

- [17] 张从正.儒门事亲[M].北京:中国医药科技出版社,2019:125.
- [18] 薛己.女科撮要[M].北京:中国中医药出版社,2015:1.
- [19] 万全.万氏妇人科[M].武汉:湖北人民出版社,1983.
- [20] 张景岳.景岳全书[M].北京:中国医药科技出版社,2017:266.
- [21] 陈士铎.辨证录[M].北京:人民卫生出版社,1965:114.
- [22] 陈修园.女科要旨[M].北京:人民卫生出版社,1982:11.
- [23] 赵献可.医贯[M].北京:人民卫生出版社,1982:46.
- [24] 李梴.医学入门[M].北京:中国中医药出版社,1995:421.
- [25] 林佩琴.类证治裁[M].上海:上海中医药大学出版社,1997:445.
- [26] 曹炳章.中国医学大成[M].北京:中国中医药出版社,1997:643.
- [27] 彭勃,主编.胎产新书[M].上海:第二军医大学出版社,2005:68.
- [28] 傅山.傅青主女科[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,1997.

- [29] 王肯堂.证治准绳[M].北京:人民卫生出版社,1993:645.
- [30] 顾世澄.疡医大全[M].北京:中国中医药出版社,1994:406.
- [31] 罗国纲.罗氏会约医镜[M].北京:中国中医药出版社,2015:481.
- [32] 武之望.济阴纲目[M].北京:中国中医药出版社,2009:202.
- [33] 竹林寺僧.竹林寺女科[M].太原:山西科学技术出版社,2012:61.

第一作者:贾亦非(1996—),女,硕士研究生在读,中医医史文献专业。

通讯作者:裴丽,医学博士,研究馆员,硕士研究生导师。Peili0221@163.com

收稿日期:2020-10-10

编辑:吕慰秋 蔡强

1 实验材料

1.1 细胞和实验动物 HUVEC: 产品编号 H-007F-C, 澳赛尔生物科技(上海有限公司)。雄性SCID小鼠: SPF级, 上海斯莱克实验动物有限责任公司, 许可证号为SCXK(沪)2017-0005。本研究动物伦理备案号: AEW-20181020-55。

1.2 药物与试剂 复方肠泰, 处方: 人参10 g, 黄芪15 g, 藤梨根15 g, 薏苡仁20 g, 苦参6 g, 八月札10 g。加10倍体积水浸泡30 min后煮2 h, 药渣加8倍水再煮2 h, 煎煮液100目筛网过滤, 冷却后2次滤液经蒸发仪浓缩至220 mL, 作为饮片水煎液, 生药浓度2.50 g/mL。加磷酸缓冲盐溶液(PBS)于离心半径8 cm, 10 000 r/min离心10 min后取上清液, 根据不同浓度需要加入一定量的PBS稀释, 使用滤器过滤除菌, 4℃冰箱保存备用。

内皮细胞培养基(ECM): 货号1001, 品牌ScienCell, 产地美国, 规格500 mL, 北京索莱宝科技有限公司。无血清培养基(SFM): 货号17705-021, 品牌Gibco, 规格500 mL, 南京信帆生物技术有限公司。CCK-8试剂盒: 目录号M4839, 品牌AbMole, 规格5 mL, 奥默生物科技(上海)有限公司。

1.3 主要实验仪器 滚筒式细胞培养装置, cell240, 德国热电; 台式高速离心机, TGL-16G, 中国; 台式低温冷冻离心机, 5417R, 德国Eppendorf; CO₂培养箱, Heracell150, 德国; 生物安全柜, class II, 美国Labconco; 荧光倒置显微镜, CKX41-F32FL, 日本奥林巴斯; 全波长酶标仪, Molecular Devices SpectraMax M5, 美国。

2 实验方法

2.1 HUVEC细胞培养 HUVEC细胞置于ECM中培养, 添加1%血管内皮细胞生长补充物、5%胎牛血清(FBS)及100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素, 置37℃、5%CO₂饱和湿度的温箱中培养。

2.2 HUVEC划痕试验 HUVEC培养至90%融合, 换至0.2%牛血清白蛋白(BSA)的SFM培养基中饥饿4 h, 枪头在每孔中画线并加入生理盐水(对照组)和不同浓度的复方肠泰(10、20、40 mg/mL)培养0.5 h, 每组设3个复孔; 将每孔培养基换为10% FBS和相应浓度复方肠泰继续培养24 h; 每孔置于倒置显微镜(×100)下拍照, 采用图像分析软件Image-Pro Plus分析每孔细胞发生迁移前后照片, 计算损伤后细胞迁移到损伤部位的细胞数。试验重复3次。

2.3 HUVEC CCK-8试验 HUVEC以3.5×10³/孔接种于96孔板中过夜, 饥饿4 h后用生理盐水(对照组)和不同浓度的复方肠泰(10、20、40 mg/mL)培养1 h, 每个浓度设3个复孔。将培养基换成含相应浓度的复

方肠泰和2% FBS的SFM, 分别继续培养12、24或48 h后, 加入CCK-8孵育4 h。酶标仪检测各孔450 nm处吸光值(A), 增殖抑制率=(A阴性对照-A样品)/(A阴性对照-A空白对照)×100%。试验重复3次。

2.4 HUVEC小管形成试验 HUVEC加入铺好Matrigel的96孔培养板中, 加入生理盐水(对照组)和不同浓度的复方肠泰(10、20、40 mg/mL), 每个浓度设5个复孔, 放入37℃培养箱中孵育24 h。将每孔置于倒置显微镜(×100)下拍照, 图像分析各孔形成小管的数量。试验重复3次。

2.5 SCID小鼠Matrigel栓试验 将20只6周龄雄性SCID小鼠随机分为4组, 每组5只。每只小鼠背部左侧皮下注射GFR-Matrigel混合物400 μL, 背部右侧皮下注射Matrigel混合物400 μL。第2日开始每组小鼠予生理盐水(模型组)和不同浓度的复方肠泰(13.90、27.80、55.60 g/kg)灌胃, 每日1次, 每次0.2 mL。连续灌胃7 d后处死小鼠, 取出背部Matrigel栓。各组胶栓在离心管中剪碎, 加入RIPA裂解液500 μL, 离心后取上清200 μL/样本, 移入96孔酶标板中, 酶标仪415 nm波长读取血红蛋白A值。

2.6 统计学方法 使用SPSS 19.0软件进行统计学分析, 数据以($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用ANOVA分析, 2组间比较采用t检验, P<0.05为具有显著性差异。

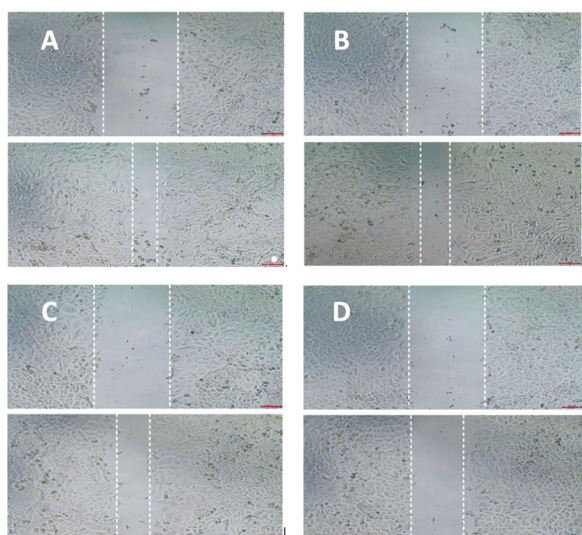
3 实验结果

3.1 复方肠泰对HUVEC迁移能力的影响 在划痕试验中, 复方肠泰组HUVEC细胞划痕间伤口愈合距离百分比低于对照组, 说明复方肠泰能抑制HUVEC向损伤部位迁移(图1)。迁移量化分析显示(图2), 与对照组比较复方肠泰各剂量均能明显抑制HUVEC迁移(P<0.05), 复方肠泰10 mg/mL、20 mg/mL和40 mg/mL组的迁移抑制率分别为23.46%、45.64%和67.52%, 40 mg/mL组抑制率显著高于10 mg/mL和20 mg/mL组(P<0.05), 其抑制作用具有浓度依赖性。

3.2 复方肠泰对HUVEC增殖的影响 CCK-8检测结果表明: 同一作用时间下, 随复方肠泰浓度增加, 细胞增殖抑制率升高; 而在同一作用浓度下, 随作用时间延长, 增殖抑制率升高。说明复方肠泰能抑制HUVEC增殖, 且具有浓度和时间依赖性。见图3。

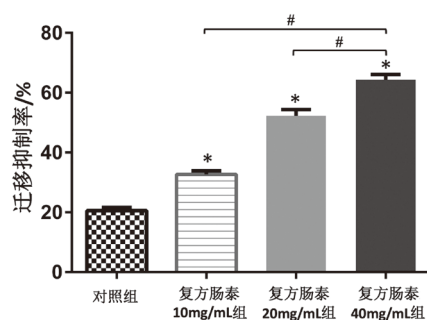
3.3 复方肠泰对HUVEC小管形成的影响 复方肠泰能够抑制HUVEC在Matrigel上形成网状小管结构。10 mg/mL、20 mg/mL和40 mg/mL复方肠泰的小管抑制率分别为38.89%、72.22%和88.89%(P<0.05), 说明复方肠泰能抑制HUVEC小管形成并有浓度依赖性, 见图4。

3.4 复方肠泰对SCID小鼠皮下移植matrigel栓中血红蛋白含量的影响 Matrigel栓试验结果显示,小鼠予13.90、27.80、55.60 g/kg复方肠泰灌胃后,皮下移植的matrigel栓中血红蛋白含量分别为 $(0.81 \pm 0.04) \mu\text{g}/\text{mg}$ 、 $(0.47 \pm 0.02) \mu\text{g}/\text{mg}$ 和 $(0.28 \pm 0.01) \mu\text{g}/\text{mg}$,明显低于对照组($P < 0.05$);且复方肠泰55.60 g/kg组matrigel栓中血红蛋白含量亦明显低于复方肠泰13.90 g/kg和27.80 g/kg组($P < 0.05$)。说明复方肠泰对SCID小鼠体内的血管新生有明显的抑制作用,该作用有浓度依赖性。见图5。



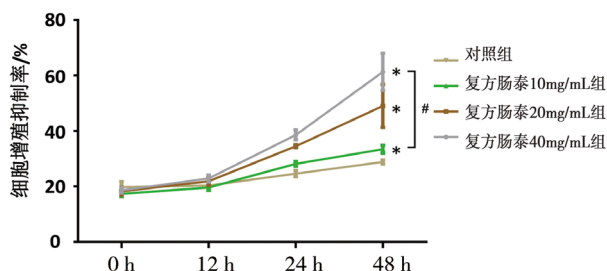
A-对照组; B-复方肠泰10 mg/mL组; C-复方肠泰20 mg/mL组; D-复方肠泰40 mg/mL组

图1 各组HUVEC迁移能力比较($\times 100$)



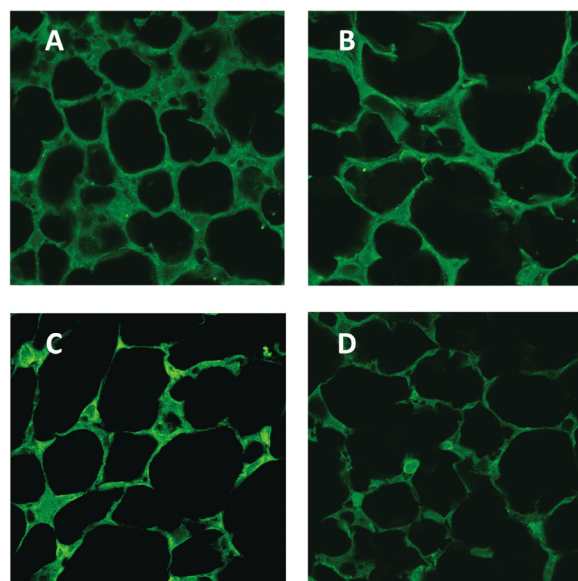
注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与复方肠泰40 mg/mL组比较,# $P < 0.05$ 。

图2 各组HUVEC迁移抑制率比较



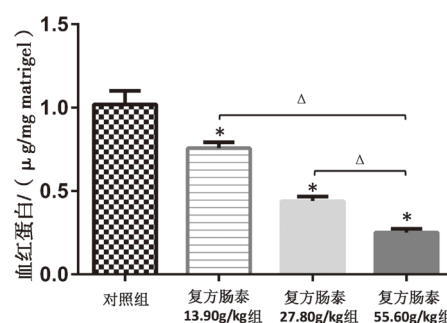
注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与复方肠泰40 mg/mL组比较,# $P < 0.05$ 。

图3 各组HUVEC增殖抑制率比较



A-对照组; B-复方肠泰10 mg/mL组; C-复方肠泰20 mg/mL组; D-复方肠泰40 mg/mL组

图4 复方肠泰对HUVEC小管形成的影响($\times 100$)



注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与复方肠泰55.60 g/kg组比较,Δ $P < 0.05$ 。

图5 各组Matrigel栓中血红蛋白含量比较

4 讨论

肠癌可归属于中医学“癥瘕”“积聚”“肠覃”“锁肛痔”等范畴。李东垣《脾胃论》云:“脾胃元气既伤,元气亦不能充,而诸病之所由生也。”明代《外科正宗》载:“蕴毒结于脏腑,火热流注肛门,结而为肿,其患痛连小腹,肛门坠重,二便乖违,或泻或秘,肛门内蚀,串烂经络,污水流通大孔……凡犯此未得见其有生。”肠癌病机总属本虚标实,本课题组将其总结为“脾虚是结直肠癌发病的基础,湿热瘀毒互结是发病的关键”^[6],治疗当以益气健脾、清热解毒、活血化瘀、消肿止痛为主。复方肠泰方中人参益气健脾、扶正固本,薏苡仁健脾化湿,白花蛇舌草清热解毒,莪术活血化瘀、消肿散结,八月札和藤梨根行气活血、消积止痛。在临床应用中,复方肠泰联合化疗能显著改善肠癌患者临床症状和生活质量,提高CD3⁺和CD4⁺淋巴细胞计数,

提高结肠癌患者体力状况和免疫状态,起到减毒增效作用^[7]。

20世纪70年代,哈佛大学的Folkman教授首次提出“肿瘤血管生成”的概念,认为肿瘤新生血管为肿瘤生长提供营养,迂曲的血管造成局部缺氧微环境甚至诱导耐药,脱落的癌细胞通过循环运送至全身导致转移^[8]。血管新生是一个多步骤的过程,血管内皮细胞首先迁移到靶部位,黏附到组织后细胞开始增殖,增殖后的内皮细胞会形成网状的小管样结构。HUVEC是用胶原酶消化脐带静脉所得的血管内皮细胞,具有高活性、高纯度、可在体外培养的优点^[9],常常作为抗血管生成研究的良好研究对象。本研究我们通过划痕试验、CKK-8和小管形成试验,发现复方肠泰可以显著抑制HUVEC的迁移、增殖和小管形成。Matrigel是一种可溶的肿瘤基底膜提取物,含有丰富的促血管新生物质,在室温下凝固重新构成基底膜。因而将Matrigel注射到小鼠皮下形成Matrigel栓模拟肿瘤基质诱导新生血管生成,而通过检测Matrigel栓中的血红蛋白量可反映含有血流的血管数,从而间接反映新生血管生成的能力。本研究将Matrigel注射到SCID小鼠皮下形成Matrigel栓,小鼠予复方肠泰灌胃后可以看到Matrigel栓中血红蛋白量明显低于模型组,从而证明复方肠泰在体内可以抑制新生血管生成。

既往大量研究表明,中医药具有抗血管生成作用。薏苡仁注射液、人参皂苷Rg3以及某些中药复方能降低肿瘤微血管密度,下调血管内皮生长因子(VEGF)等促肿瘤血管生成因子的表达,对肿瘤血管生成具有抑制作用^[10-12]。人参中的人参皂苷Rg3通过降低肿瘤细胞分泌的VEGF来抑制肿瘤新生血管生成^[13],通过减少肿瘤细胞分泌金属基质蛋白酶-9(MMP-9)来抑制血管内皮细胞的增殖和迁移^[14]。本研究结果表明,复方肠泰具有抗新生血管生成作用,为进一步开展Ⅲ期临床研究和扩大临床应用增加了基础研究的支撑,另外也说明中药复方的抗肿瘤作用不像西药那样单一,具有泛靶点、多机制的特点,因而不容易出现耐药。

综上所述,复方肠泰在细胞水平能抑制HUVEC与新生血管生成相关的多步骤的生物学行为,包括HUVEC的迁移、增殖和小管形成,在动物水平能显著抑制SCID小鼠体内的血管新生,据此推断复方肠泰能抑制新生血管生成。课题组后续将以荷结肠癌小鼠为研究对象,进一步研究复方肠泰对小鼠结肠癌新生血管的影响,及其涉及的信号通路和抗血管生成的具体机制。

参考文献

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: A Cancer J Clin, 2016, 66 (2): 115.
- [2] HU S, ZHU Y, XIA X, et al. Ginsenoside Rg3 prolongs survival of the orthotopic hepatocellular carcinoma model by inducing apoptosis and inhibiting angiogenesis[J]. Anal Cell Pathol (Amst), 2019, 2019: 3815786.
- [3] TANG Y C, ZHANG Y, ZHOU J, et al. Ginsenoside Rg3 targets cancer stem cells and tumor angiogenesis to inhibit colorectal cancer progression in vivo[J]. Int J Oncol, 2018, 52 (1): 127.
- [4] 张舒, 沈明勤, 丁永芳, 等. 复方肠泰抑制人结肠癌SW480细胞增殖的实验研究[J]. 中成药, 2010, 32 (3): 374.
- [5] 江晶晶, 端梓任, 王建华, 等. 复方肠泰对人结肠癌裸鼠移植瘤生长的影响及机制研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29 (3): 513.
- [6] 王小宁, 霍介格. 中医治疗大肠癌的思路与方法探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13 (9): 681.
- [7] 李灵常, 方明治, 王小宁, 等. 复方肠泰联合FOLFOX4方案治疗大肠癌的临床观察[J]. 临床肿瘤学杂志, 2010, 15 (10): 919.
- [8] FOLKMAN J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 285 (21): 1182.
- [9] 张小燕, 梁朝, 赵林, 等. 人脐静脉内皮细胞分离培养的改进及其鉴定[J]. 中华医学研究杂志, 2005, 5 (5): 158.
- [10] 毕缓, 曾宇, 付水, 等. 人参皂苷Rg3联合125I粒子植入对中晚期前列腺癌的疗效及对患者血清TGF和VEGF的影响[J]. 疑难病杂志, 2019, 18 (3): 280.
- [11] 初海蛟, 韩增祥, 梁芳. 中药复方抗肿瘤血管生成研究简况[J]. 实用中医内科杂志, 2018, 32 (4): 74.
- [12] 何建成, 王利. 中医药对血管新生促进或抑制作用的研究进展[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2018, 39 (6): 775.
- [13] CAO Y, YE Q, ZHUANG M F, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits angiogenesis in a rat model of endometriosis through the VEGFR-2-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. PLoS One, 2017, 12 (11): e0186520.
- [14] 刘兴山, 董雪. 人参皂苷Rg3抑制血管形成的研究[J]. 长春中医药大学学报, 2014, 30 (5): 820.

第一作者:刘静冰(1975—),女,医学硕士,主任中医师,从事中医药防治胃肠肿瘤的临床与基础研究。

通讯作者:霍介格,医学博士,主任医师,教授,博士研究生导师。huojiege@jstcm.com

修回日期:2020-11-16

编辑:吴宁