

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.04.014

鳖甲煎丸对肝癌皮下转移瘤小鼠 肿瘤新生血管及微环境的影响

铁明慧^{1,2}, 张颖^{*}, 王科¹

(1. 四川大学华西医院, 四川省成都市武侯区国学巷 37 号, 610041; 2. 昆明市中医医院)

[摘要] 目的 研究鳖甲煎丸对肿瘤新生血管结构及功能、肿瘤微环境的影响。方法 建立 Hepa1-6 小鼠肝癌皮下转移瘤模型, 将造模成功小鼠随机分为鳖甲煎丸组、贝伐单抗组和对照组, 每组 15 只。鳖甲煎丸组按 6 g/(kg·d) 予鳖甲煎丸混悬液灌胃, 贝伐单抗组腹腔注射贝伐珠单抗注射液 5 mg/(kg·d), 对照组腹腔注射等量生理盐水, 各组连续干预 14 天。14 天后剥取肿瘤组织, 免疫组织化学染色法检测肿瘤组织微血管密度计数、周细胞覆盖率和血管基底膜面积, Evans blue 法检测血管通透性, 免疫荧光检测肿瘤组织的乏氧区域面积。结果 与对照组比较, 贝伐单抗组和鳖甲煎丸组微血管密度计数、Evans blue 染料含量及乏氧区域面积均降低, 周细胞覆盖及基底膜面积均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。鳖甲煎丸组 Evans blue 染料含量及乏氧区域面积较贝伐单抗组高 ($P < 0.01$)。贝伐单抗组和鳖甲煎丸组微血管密度计数、周细胞覆盖及基底膜面积差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 鳖甲煎丸对 Hepa1-6 小鼠肝癌皮下转移瘤具有促使血管结构和功能正常化作用, 能够改善肿瘤组织的乏氧状态。

[关键词] 肝癌; 转移瘤; 鳖甲煎丸; 微血管密度计数; 肿瘤微环境

鳖甲煎丸出自东《金匱要略》, 具有寒热并用、攻补兼施、益气活血、活血化瘀、解毒散结之功。临床中鳖甲煎丸主要用于治疗肝炎、肝硬化等慢性肝脏疾病^[1], 此外, 在治疗肝癌、胃癌等肿瘤方面也有一定疗效^[2-6]。我们的前期体外实验发现, 鳖甲煎丸对新生血管具有抑制作用, 且这种抑制作用呈现浓度依赖关系^[7-8]。为了进一步揭示鳖甲煎丸抗癌机制, 我们观察了鳖甲煎丸对肿瘤新生血管结构、功能以及肿瘤微环境的影响, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞株

SPF 级雌性 C57/BL/6J 小鼠 45 只, 5 ~ 6 周龄, 体重 (18 ± 2) g, 购自成都达硕实验动物有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (川) 2014-028。小鼠肝癌 Hepa1-6 细胞株, 购自中国科学院上海生命科学院细胞资源中心。

1.2 药物

鳖甲煎丸, 武汉中联药业集团股份有限公司;

批号: Z42020772, 50 g/瓶, 称取 12 g 加入 10 ml 生理盐水, 制备成浓度为 0.6 g/ml 的混悬液, 置于 4℃ 冰箱备用; 贝伐珠单抗注射液, 上海罗氏制药有限公司, 100 mg/4 ml, 批号: S20100023。

1.3 主要试剂及仪器

PRMI-1640 培养基 (Hyclone 公司, 批号: SH30809); Pimonidazole 试剂盒 (Hypoxypore 公司, 批号: HP1-400Kit); 大鼠抗小鼠 CD31 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司, 批号: sc1506); 兔抗小鼠肌动蛋白 α (α -SMA) 多克隆抗体 (Abcam 公司, 批号: ab7547); 兔抗小鼠抗 IV 型胶原多克隆抗体 (批号: BD-X20222)、山羊抗小鼠 IgG 抗体 (批号: F030605-CLS), 武汉博士德生物工程有限公司; 驴抗小鼠 Alexa Fluor-555 二抗 (Invitrogen 公司, 批号: CA11001s New); 山羊抗小鼠 Alexa Fluor-488 二抗 (Jackson 公司, 批号: xy-33106ES60); Evans blue 储备液 (Sigma 公司, 批号: SJ009C7151468)。

倒置显微镜 (Olympus 公司, 型号: IX50); 正置荧光显微镜 (型号: Eclipse CI)、成像系统 (型号: DS-U3), 日本尼康公司; 酶标分析仪 (北京普朗新技术有限公司, 型号: hr801); 病理切片

基金项目: 国家自然科学基金 (81202784)

* 通讯作者: 18980602088@189.cn, (028) 62539431

机(上海徕卡仪器有限公司, 型号: RM2016)。

1.4 Hepal-6 小鼠肝癌皮下移植瘤模型

根据参考文献 [9-10], 取对数生长期的 Hepal-6 细胞, 反复洗涤、离心制成细胞悬液, 并调整细胞密度约为 $2 \times 10^7/\text{ml}$ 。按 0.1ml/鼠 (2×10^6 个细胞) 的量分别接种至 C57/BL/6J 小鼠左侧腋窝皮下。接种后定期观察小鼠肿瘤生长情况, 以游标卡尺测量肿瘤的最长径 (A, mm), 并测量与最长径垂直的最短径 (B, mm), 根据公式估算肿瘤体积, 肿瘤体积 (TV) = $AB^2/2$ 。

1.5 实验分组及干预方法

造模 14 天时, 待肿瘤体积约 $100 \sim 200 \text{ mm}^3$, 采用随机数字表法将荷瘤小鼠分为鳖甲煎丸组、贝伐单抗组、对照组, 每组 15 只。鳖甲煎丸组按 6g/(kg·d) 予鳖甲煎丸混悬液灌胃, 贝伐单抗组腹腔注射贝伐单抗注射液 5mg/(kg·d), 对照组腹腔注射等量生理盐水, 各组连续干预 14 天。

1.6 观察指标及方法

各组分别选取 5 只直接颈椎脱臼处死剥取肿瘤组织; 另外 5 只于干预第 14 天参照文献 [11], 采用 Evans blue 法检测肿瘤血管的通透性; 剩余 5 只小鼠给予尾静脉注射 Pimonidazole 稀释液 60mg/kg, 20min 后处死小鼠剥取肿瘤组织, 用 4% 多聚甲醛固定备用。

1.6.1 免疫组织化学染色观测肿瘤血管结构 将 CD31、Ⅳ型胶原、 α -SMA 分别作为血管内皮细胞、基底膜、周细胞标志物。将上述 4% 多聚甲醛中过夜的肿瘤组织切成薄片, $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白酶 K 消化, 正常山羊血清封闭; 加一抗: 大鼠抗小鼠 CD31 单克隆抗体 (1:500)、兔抗小鼠抗Ⅳ型胶原多克隆抗体 (1:2000)、兔抗小鼠 α -SMA 多克隆抗体 (1:400), 4°C 孵育过夜; 分别滴加生物素化的二抗 (1:100) $50 \mu\text{l}$, 37°C 30min; DAB 显色后用苏木素轻度复染 40s, 乙醇脱水并封片。显微镜下读片: 1) 微血管密度计数 (MDC), 被 CD31 抗体染成棕黄色的内皮细胞或内皮细胞簇, 同时根据管腔大小区分新老血管内皮细胞, 然后以内皮细胞面积占总面积的百分比计算。在 100 倍光镜下扫描整个切片, 寻找血管高密度区, 再在高倍镜 (400 倍) 下采集 4 个相应血管高密度区视野照片, 每个高倍镜视野的面积为 $150 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ 。后用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件计算每高倍视野中的微血管像素面积, 以该面积占总面积的百分比代表各组肿瘤微血管密度计数; 2) 肿瘤血管周细胞覆盖率、基底膜面积计算: 按上述同样的方法在

400 倍光镜下选择 α -SMA 及Ⅳ型胶原高表达的 5 个高倍视野, 采用上述同样的方法, 计算周细胞及Ⅳ型胶原蛋白在每个视野中的像素面积, 并计算平均值。

1.6.2 Evans blue 法检测血管通透性 取 2% Evans blue 储备液分别配置成浓度为 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、16.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的工作液, 以酶标分析仪于 630nm 波长处测各浓度的 OD 值, 以浓度为横坐标, OD 值为纵坐标绘制标准曲线, 并计算回归方程, $y = 0.015x + 0.026$, $R^2 = 0.997$ 。小鼠尾静脉注射 $100 \mu\text{l}$ 2% Evans blue 储备液, 循环 20min。采用 4mg/100g 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠, 待小鼠进入麻醉状态后, 于左心室插管, 右心房引流, 用 15ml 生理盐水缓慢灌洗, 充分清洗残留在循环系统中的 Evans blue 染料, 直至引流液变清后剥取肿瘤组织, 分成大小大致相等的小块, 加入 1.5ml 甲酰胺, 萃取 72h。萃取液 2000r/min 离心 5min 后, 取其上清液, 以酶标分析仪于 630nm 波长处检测各组标本的 OD 值, 每个标本测 3 次, OD 值取其平均值。参考所得方程, 计算各组标本组织内 Evans blue 的含量。

1.6.3 免疫荧光检测肿瘤组织的乏氧状态 尾静脉注射 Pimonidazole 稀释液 60mg/kg, 20min 后处死小鼠剥取肿瘤组织。石蜡包埋, 切成厚 $4 \mu\text{m}$ 切片, 常规方法脱蜡脱水, 按操作说明进行免疫组织化学染色, PBS 漂洗, FITC 标记的 Pimonidazole 单克隆抗体 4°C 孵育过夜, PBS 漂洗后加二抗, 置室温 30min, PBS 漂洗后 DAB 显色, 苏木精衬染。荧光显微镜下观察片并采图, 判断标准为肿瘤细胞浆中出现棕黄色颗粒为乏氧细胞, 用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件分析肿瘤组织乏氧区域面积。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 数据用均数 $\pm$ 标准差表示, 多组间比较当方差齐时采用单因素方差分析, 方差不齐时采用秩和检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠肿瘤血管内 MDC、周细胞覆盖率、基底膜面积比较

以抗 CD31 的单克隆抗体标记肿瘤血管内皮细胞, 免疫组织化学染色显示, 对照组细胞数量多, 可见较多染成棕黄色的内皮细胞或内皮细胞簇, 血管结构清晰、内皮细胞着色较深; 鳖甲煎丸组和贝伐单抗组细胞数量较对照组减少, 且血管结构模糊、内皮细胞着色变浅。通过血管周细胞抗体

α -SMA 多克隆抗体标记血管周细胞, 免疫组织化学染色可见鳖甲煎丸组和贝伐单抗组较多被染成深褐色的周细胞均匀覆盖于血管内皮细胞周围, 且贝伐单抗组周细胞覆盖最为普遍, 而对照组内皮细胞周围则缺乏周细胞覆盖。通过抗 IV 型胶原多克隆抗体标记基底膜, 在免疫组织化学染色中可见染成棕褐色的圈状 IV 型胶原蛋白, 从形态学观察发现对照组基底膜较厚, 形态分布不均一; 而鳖甲煎丸组和贝伐单抗组基底膜则厚薄较为均匀, 形态分布更均一, 与内皮细胞的连接更紧密。表 1 示, 与对照组比较, 贝伐单抗组和鳖甲煎丸组 MDC 均降低, 周细胞覆盖及基底膜面积均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但鳖甲煎丸组与贝伐单抗组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠肿瘤血管内 MDC、周细胞覆盖率、基底膜面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	MDC	周细胞覆盖率	基底膜面积
对照组	5	19.49 $\pm$ 1.64	25.98 $\pm$ 3.73	25.98 $\pm$ 3.73
贝伐单抗组	5	11.28 $\pm$ 1.57**	93.57 $\pm$ 8.29**	93.57 $\pm$ 8.29**
鳖甲煎丸组	5	14.16 $\pm$ 1.25*	83.16 $\pm$ 5.85**	83.16 $\pm$ 5.85**

注: MDC, 微血管密度计数; 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 各组小鼠肿瘤组织 Evans blue 染料含量、乏氧区域面积比较

表 2 示, 与对照组比较, 鳖甲煎丸组和贝伐单抗组肿瘤组织内 Evans blue 染料含量及乏氧区域面积降低 ($P < 0.01$)。鳖甲煎丸组 Evans blue 染料含量及乏氧区域面积较贝伐单抗组高 ($P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠肿瘤组织 Evans blue 染料含量、乏氧区域面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Evans blue 染料含量 (μg)	乏氧区域面积 (%)
对照组	5	37.120 $\pm$ 0.309	29.40 $\pm$ 12.36
贝伐单抗组	5	18.386 $\pm$ 0.204*	12.60 $\pm$ 3.01*
鳖甲煎丸组	5	25.660 $\pm$ 1.315* Δ	19.51 $\pm$ 8.87* Δ

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与贝伐单抗组比较, $\Delta P < 0.01$

3 讨论

鳖甲煎丸原方包括鳖甲、乌扇、黄芩、柴胡、鼠妇、干姜等 23 味中药, 用治疟病日久而成的“疟母癥瘕”病症, 具有益气养血、软坚散结、活血化癥等作用。随着现代医学对该方研究的不断加深, 其临床应用范围不断扩大且疗效卓著。孙海涛等^[12]研究表明, 鳖甲煎丸能够下调肝癌细胞中血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达水平, 从而达到抑制肿瘤生长目的。黄鸿娜等^[13]研究则进一步表

明, 鳖甲煎丸可通过抑制环氧化酶 2 (COX-2)、VEGF 蛋白的表达, 改善肝癌细胞微环境, 抑制肝脏微血管生成的病理进程, 抑制肿瘤的生长。

促血管新生因子及血管新生抑制因子共同调节控制血管新生, 在肿瘤生长过程中, 促血管新生因子占主导, 血管趋向于不断新生, 使血管结构和功能异常, 使血管迂曲膨大, 成囊状扩张, 分支无序杂乱; 血管壁渗漏, 通透性增强, 组织间质液压升高, 有效血流灌注减少, 肿瘤组织内乏氧, 导致肿瘤微环境异常, 肿瘤对放疗及化疗的敏感性降低, 化疗及靶向治疗等药物在肿瘤组织内的输送减少, 药物的疗效减弱^[14]。那么, 只要能干预血管新生环节, 诱导血管新生正常化, 则可改善肿瘤微环境, 提高放疗及化疗疗效。

内皮细胞是血管的重要结构, 其附着于血管内膜面; 周细胞覆盖在血管内皮细胞的基膜外, 是血管成熟的标志; 基底膜可保持血管形态、防治血管渗漏, 亦是血管结构的重要成分之一, 其主要成分为 IV 型胶原蛋白^[15-16]。上述结构共同维持血管功能, 然而在肿瘤血管中, 由于周细胞覆盖减少、基底膜与内皮细胞连接松散等结构缺陷, 肿瘤血管壁往往有许多缝隙, 即肿瘤血管壁是渗漏的, 其通透性增强^[14]。本实验通过免疫组织化学方法研究鳖甲煎丸对肿瘤血管结构的影响, 发现其可减少内皮细胞增生、增加周细胞的覆盖率, 使血管内皮与基底膜之间的联系更紧密。同时肿瘤组织中 Evans blue 染料含量亦明显降低, 说明鳖甲煎丸可降低血管的通透性。组织乏氧是肿瘤微环境的重要标志之一^[17-18], 本实验研究表明, 鳖甲煎丸能够减少肿瘤组织的乏氧区域面积, 进而改善肿瘤微环境。分析原因可能是血管结构修复后, 肿瘤血管趋于正常, 使肿瘤组织中的有效血流灌注增多, 向组织内部携带更多的氧, 氧弥散到肿瘤内部, 从而使肿瘤组织的乏氧状态减轻, 改善肿瘤微环境。虽然切入点不同, 但这与黄晶晶等^[19]的研究结果一致。

综上所述, 鳖甲煎丸可使肿瘤血管正常化, 减少肿瘤乏氧面积, 降低血管通透性, 从而改善肿瘤微环境, 可能是其抑制肿瘤生长的作用机理之一。下一步我们将进行鳖甲煎丸联合化疗药物共同干预, 进一步研究鳖甲煎丸增效减毒及其对肿瘤的抑制作用。

参考文献

- [1] 罗庆东, 姜德友. 鳖甲煎丸的临床研究与进展 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2012, 33(6): 764-766.

- [2] 蔡新生, 闫朝光, 王广春, 等. 鳖甲煎丸预防胃癌术后复发转移临床研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15 (11): 218-219.
- [3] 程旻, 贺松其, 朱云, 等. 鳖甲煎丸抑制肝癌细胞增殖、黏附及侵袭作用的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33 (5): 664-667.
- [4] 常欣峰. 鳖甲煎丸对 H₂₂ 荷瘤小鼠和人肝癌细胞 Bel-7402 的影响及机制研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.
- [5] 顾丰华, 陈嘉, 刘翔, 等. 鳖甲煎丸治疗乳腺增生的药效研究 [J]. 世界临床药物, 2015, 36 (2): 90-95.
- [6] 文彬, 孙海涛, 贺松其, 等. 鳖甲煎丸对 HepG2 裸鼠移植瘤的抑制作用及瘤体组织中 β -catenin、Tbx3 表达水平的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2016, 36 (2): 210-214, 219.
- [7] 铁明慧, 王科, 张颖. 鳖甲煎丸对体外培养大鼠主动脉环血管新生的影响 [J]. 中医杂志, 2016, 57 (15): 1322-1326.
- [8] 铁明慧, 王科, 张颖. 鳖甲煎丸对小鼠 Matrigel 种植体新生血管的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22 (19): 90-94.
- [9] 张志灯, 曹治云. Hepa1-6 细胞的培养及小鼠皮下移植瘤模型的建立 [J]. 实验动物科学, 2009, 26 (4): 1-3.
- [10] 周忠信, 吕明德, 殷晓煜, 等. C57BL/6j 小鼠接种 Hepa1-6 细胞诱导皮下肝癌模型的建立 [J]. 广东医学, 2007, 15 (2): 178-180.
- [11] NING T, JIANG M, PENG Q, et al. Low-dose endostatin normalizes the structure and function of tumor vasculature and improves the delivery and anti-tumor efficacy of cytotoxic drugs in a lung cancer xenograft murine model [J]. Thoracic Cancer, 2012, 3 (3): 229-238.
- [12] 孙海涛, 贺松其, 文彬, 等. 鳖甲煎丸对肝癌细胞中 Wnt 信号分子 β -catenin、GSK-3 β 及靶基因 CD44v6、VEGF 的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2014, 34 (10): 1454-1458.
- [13] 黄鸿娜, 黄晶晶, 毛德文, 等. 鳖甲煎丸对大鼠肝癌癌前病变血管生成和微环境的机制探讨 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27 (11): 2570-2572.
- [14] JAIN RK. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers [J]. J Clin Oncol, 2013, 31 (17): 2205-2218.
- [15] SCHRIMPF C, TEEBKEN OE, WILHELM M, et al. The role of pericyte detachment in vascular rarefaction [J]. J Vasc Res, 2014, 51 (4): 247-258.
- [16] BALUK P, MORIKAWA S, HASKELL A, et al. Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors [J]. Am J Pathol, 2003, 163 (5): 1801-1815.
- [17] JAIN RK. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers [J]. J Clin Oncol, 2013, 31 (17): 2205-2218.
- [18] LI G, SHAN C, LIU L, et al. Tanshinone IIA inhibits HIF-1 α and VEGF expression in breast cancer cells via mTOR/p70S6K/RPS6/4E-BP1 signaling pathway [J]. PLoS One, 2015, 10 (2): e117440.
- [19] 黄晶晶, 黄鸿娜, 毛德文, 等. 鳖甲煎丸对二乙基亚硝胺诱导大鼠肝癌癌前病变的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43 (7): 1489-1491.

Effect of *Biejiajian Pills* (鳖甲煎丸) on Tumor Angiogenesis and Microenvironment in Subcutaneous Metastatic Tumor of Liver Cancer in Mice

TIE Minghui^{1,2}, ZHANG Ying¹, WANG Ke¹

(1. West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, 610041; 2. Kunming Municipal Hospital of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the effects of *Biejiajian Pills* (鳖甲煎丸, BP) on structure and function of tumor angiogenesis and tumor microenvironment. **Methods** Hepa1-6 mice model of subcutaneous tumor of liver cancer was established, and then the mice with successful models were randomized into a BP group, a bevacizumab group and a control group, with 15 mice in each group. The BP group was treated with BP suspension [p. o., 6 g/(kg · d)], the bevacizumab group was given bevacizumab injection [i. p., 5 mg/(kg · d)], while the control group was given the same amount of normal saline. All groups were treated for 14 days. The tumor tissue was stripped 14 days later. The tumor microvessel density, the pericyte coverage and the basal membrane area were detected by immunohistochemical staining. The vascular permeability was detected by Evans blue. The hypoxic area was detected by immunofluorescence. **Results** Compared with those in the control group, the microvessel density, the content of Evans blue dye and the hypoxia area decreased, while the pericyte coverage and the basement membrane area increased in the bevacizumab group and the BP group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The Evans blue dye content and the hypoxic area in the BP group were higher than those in the bevacizumab group ($P < 0.01$). There was no significant difference in the microvessel density, the pericyte coverage and the basement membrane area between the bevacizumab group and the BP group ($P > 0.05$). **Conclusion** BP seems to have the function of normalizing the structure and the function of blood vessel in subcutaneous metastasis of Hepa1-6 liver cancer in mice, which can improve the hypoxia state of tumor tissue.

Keywords liver cancer; metastasis; *Biejiajian Pills* (鳖甲煎丸); microvessel density; tumor microenvironment

(收稿日期: 2017-08-09; 修回日期: 2017-11-08)

[编辑: 邓媛]