

八珍汤对乳腺癌患者血管生成机制的影响

程旭锋^{1,3} 刘琦² 刘玲琳³ 黄建生⁴ 吴春宇³ 赵慧朵¹

(1. 河南中医学院第一附属医院普外科, 郑州市人民路 11 号, 450000; 2. 河南中医学院科研处;
3. 上海中医药大学附属龙华医院; 4. 浙江省临安乳腺病研究所)

[摘要] **目的** 探讨八珍汤对乳腺癌患者血管生成的抑制作用及机制。 **方法** 将 90 例乳腺癌患者分为 3 组, I 组术前给予化疗, II 组术前给予化疗和八珍汤, III 组术前不干预处理。观察患者的近期疗效情况, 检测治疗前后血清血管内皮细胞生长因子(s-VEGF)、治疗后肿瘤微血管密度(MVD)、肿瘤 VEGF 蛋白。 **结果** 与 III 组比较, I 组和 II 组均可显著提高近期总有效率($P < 0.05$), 降低进展率($P < 0.01$); II 组治疗后 s-VEGF 较治疗前有显著降低($P < 0.05$), 并且低于 III 组($P < 0.05$); 干预前所有患者 s-VEGF 浓度与肿瘤大小、淋巴转移、TNM 分期呈正相关; II 组 MVD 和肿瘤血管内皮细胞生长因子(VEGF)蛋白较 III 组均有显著降低($P < 0.05$); 干预后 s-VEGF 与癌组织 VEGF、MVD 存在正相关关系。 **结论** 八珍汤可抑制乳腺癌血管生成, 其机制可能与抑制肿瘤组织中 VEGF 的表达有关。

[关键词] 八珍汤; 乳腺癌; 血管内皮生长因子; 血管生成

Effect of Bazhen Decoction on the Angiogenesis of Breast Cancer Patients

CHENG Xufeng^{1,3}, LIU Qi², LIU Linglin³, HUANG Jiansheng⁴, WU Chunyu³, ZHAO Huiduo¹

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000; 2. Henan University of Chinese Medicine; 3. Longhua Hospital, Shanghai University of Chinese Medicine; 4. Zhejiang Lin'an Institute of Breast Diseases)

ABSTRACT **Objective** To discuss the inhibitory effect and mechanism of Bazhen Decoction (Eight Precious Ingredients Decoction) for the angiogenesis in breast cancer patients. **Methods** Ninety breast cancer patients were randomized into 3 groups: Group I (chemotherapy applied before operation), Group II (Bazhen Decoction and chemotherapy applied before operation), and Group III (control group, not treated before operation). Short term effect, serum vascular endothelia growth factor (s-VEGF) before and after treatment, tumor micro-vessel density (MVD) and VEGF protein after treatment were observed. **Results** Compared with group III, the short term total effective rate was significantly increased ($P < 0.05$), the progress rate decreased ($P < 0.01$) in group I and II. After treatment, s-VEGF in Group II was significantly decreased ($P < 0.05$) and lower than that of the Group III ($P < 0.05$). Before treatment the concentration of s-VEGF of all patients was in positive correlation with the size of tumor, lymphatic metastasis, and TNM staging. In Group II, the tumor MVD and VEGF protein were both significantly decreased in comparing with Group III ($P < 0.05$). After treatment there was a positive correlation between the s-VEGF and the tumor VEGF as well as MVD. **Conclusion** Bazhen Decoction can inhibit the angiogenesis in breast cancer, and the mechanism may be concerned with its inhibitory function on VEGF expression of breast cancer tissues.

Key Words Bazhen Decoction (Eight Precious Ingredients Decoction); Breast cancer; Vascular endothelia growth factor (VEGF); Angiogenesis

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤, 1993~2001 年全球平均每年新发乳腺癌 115 万例, 死亡 41 万例^[1], 我国 2004~2005 年乳腺癌居女性恶性肿瘤死亡率的第 6 位^[2]。血管内皮生长因子(VEGF)能通过多种途径促进乳腺癌肿瘤细胞的增殖、转移, 对乳腺癌血管生成的抑制近年来成为临床研究的重点领域。研究表明, 八珍汤具有抗肿瘤和免疫调节的双重治疗作用^[3], 临床可用于肿瘤的辅助治疗^[4-6]。本研究旨在对不同分组乳腺癌患者进行术前药物干预, 检测干预前后血清

VEGF 及癌组织 VEGF 蛋白表达、微血管密度的变化, 探讨其对乳腺癌血管生成的影响。

1 临床资料

1.1 诊断标准

所选病例均符合 2007 年中国抗癌协会乳腺癌专业委员会制定的诊断标准^[7]并符合《中药新药临床研究指导原则》^[8]中关于中医证候气虚、血虚的诊断标准: 面色淡白或萎黄, 神疲, 气短, 乏力, 腰膝酸软, 头晕眼花, 月经量少或闭经, 舌淡, 脉弱等。

1.2 纳入及排除标准

纳入标准: 符合中医气虚、血虚证诊断标准; 符合新辅助化疗入选标准即符合乳腺癌病理诊断标准, 且

肿瘤直径大于 3cm、单发、距离乳头较远有保乳要求者。不进行新辅助化疗者符合乳腺癌病理诊断标准即可;年龄 30~70 岁;术前无远处脏器转移患者;白细胞总数在 $3.5 \times 10^9/L$ 以上者;自愿接受治疗和观察,接受新辅助化疗者要签署新辅助化疗知情同意书。

排除标准:合并心、肝、肾和造血系统等严重疾病者;妊娠或哺乳期妇女,或精神障碍者;对本试验所采用的药物过敏者;正在参加其他临床药物试验者。

1.3 一般资料

所用病例均来自 2007 年 5 月~2009 年 7 月河南中医学院第一附属医院普外科、河南省肿瘤医院乳腺科乳腺癌患者 90 例,年龄 33~69 岁,中位年龄 47 岁;其中浸润性导管癌 63 例,浸润性小叶癌 12 例,腺癌 9 例,髓样癌 6 例。TNM 分期:Ⅰ期 4 例,Ⅱ期 31 例,Ⅲ期 46 例,Ⅳ期 9 例。接受新辅助化疗者运用 Excel 进行随机化分组^[9],分为化疗组(Ⅰ组)、八珍汤+化疗组(Ⅱ组);对照组(Ⅲ组)因为术前不进行化疗,可从纳入病例中随机选取;每组 30 例。

1.4 主要药物及试剂

八珍汤(方药组成为:人参 9g,白术 9g,茯苓 9g,当归 9g,川芎 9g,白芍 9g,熟地黄 9g,炙甘草 5g,生姜 3 片,大枣 5 枚),由河南中医学院第一附属医院煎药房提供,人 VEGF 定量 ELISA 试剂盒、鼠抗人内皮细胞标记(CD34⁺)单克隆抗体及鼠抗人 VEGF 单克隆抗体购自上海达为科生物技术有限公司。

2 方法

2.1 治疗方法

术前按照分组给予不同干预,共 3 个疗程,每个疗程 15 天,各疗程间隔 30 天。Ⅰ组即常规 CAF 方案,第 1 天,5-氟脲嘧啶(5-FU) 500mg/m²、阿霉素 500mg/m²、环磷酰胺 500mg/m²,第 8 天 5-FU 500mg/m²;Ⅱ组:常规 CAF 方案干预,同时给予八珍汤,每日 1 剂,早晚 2 次分服,每次 250ml,连续服用 105 天;Ⅲ组:术前不给予任何特殊处理。

2.2 疗效评价指标

2.2.1 近期疗效评价 采用世界卫生组织推荐的实体瘤的疗效评价标准^[10]。完全缓解(CR):所有目标病灶消失;部分缓解(PR):基线病灶长径总和缩小 $\geq 30\%$;稳定(SD):基线病灶长径总和未达 PR 或有增加但未达进展(PD);PD:基线病灶长径总和增加 $\geq 20\%$ 或出现新病灶。

总有效率=完全缓解率(CR%) + 部分缓解率(PR%)

2.2.2 血清 VEGF(s-VEGF) Ⅰ组和Ⅱ组于干预前后分别抽取静脉血,Ⅲ组两次抽静脉血之间间隔 3 天,均于术前清晨空腹进行,每次抽血 2ml。血标本在抽血后 30min 内低温离心分离血清(离心 10min,4℃),分装置于-80℃冰箱中保存待检,双抗体夹心 ELISA 法检测 s-VEGF 含量。

2.2.3 肿瘤微血管密度(MVD) 常规 SP 免疫组化法行乳腺癌组织 CD34 免疫组化染色。MVD 计数方法:每 1 个染成棕黄色的、可与周围组织区分的内皮细胞或内皮细胞簇,均作为 1 个可计数的微血管。肿瘤内的硬化区域、肿瘤细胞稀少区域内的微血管不进行计数^[11]。先在低倍镜下($\times 100$)观察 CD34⁺的血管,确定血管密度最高处,然后在高倍镜下($\times 200$)选择 4 个不重复视野计数,取其平均数作为该病例的 MVD,2 人计数相差 10%以上者重新计数。

2.2.4 肿瘤 VEGF 蛋白 常规 SP 免疫组化法行乳腺癌组织 VEGF 免疫组化染色。VEGF 染色见于肿瘤细胞及细胞膜,呈棕黄色颗粒,临近的血管内皮细胞也可见染色,而周围黏膜及正常组织无染色或少见微弱染色。以 MIAS 200 图像分析系统读取其 IOD 值,对 VEGF 进行定量分析。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,治疗前后比较采用配对 t 检验,两组间均数比较用方差分析,指标间相关性用 Spearman 秩和相关分析。

3 结果

3.1 3 组患者近期疗效评价

表 1 示,与Ⅲ组比较,Ⅱ组和Ⅰ组总有效率均显著提高($P < 0.05$),进展率均显著降低($P < 0.01$);与Ⅰ组比较,Ⅱ组进展率显著降低($P < 0.05$)。

表 1 3 组患者近期疗效比较[例(%)]

组别	例数	CR	PR	SD	PD	总有效
Ⅰ组	30	7(23.3)	15(50.3)	6(20.0)	2(6.7)##	27(73.3)#
Ⅱ组	30	6(20.0)	18(60.0)	5(16.7)	1(3.3)###	24(80.0)#
Ⅲ组	30	2(6.7)	15(50.0)	6(20.0)	7(23.3)	17(56.7)

注:与Ⅲ组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与Ⅰ组比较, * $P < 0.05$

3.2 3 组患者治疗前后 s-VEGF 水平变化比较

表 2 示,与治疗前比较,Ⅱ组 s-VEGF 显著降低($P < 0.05$),Ⅰ组、Ⅲ组 s-VEGF 无统计学差异($P > 0.05$)。进一步组间比较,Ⅱ组治疗后 s-VEGF 低于Ⅲ组($P < 0.05$),Ⅰ组治疗后 s-VEGF 与Ⅲ组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 3 组患者治疗前后 s-VEGF 水平比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	例数	治疗前	治疗后
I 组	30	251.08 $\pm$ 34.19	239.92 $\pm$ 42.48
II 组	30	260.75 $\pm$ 35.02	209.19 $\pm$ 27.39 ^{#*}
III 组	30	247.94 $\pm$ 40.18	256.32 $\pm$ 33.47

注:与本组治疗前比较, [#] $P<0.05$;与 III 组比较, $*$ $P<0.05$

3.3 干预前 90 例患者 s-VEGF 与临床特征的关系

表 3 示,干预前 90 例患者 s-VEGF 浓度与肿瘤大小、淋巴转移、TNM 分期呈正相关,与年龄无关。

表 3 90 例患者干预前 s-VEGF 水平与临床特征的关系($\bar{x} \pm s$)			
临床特征		s-VEGF	P
年龄(岁)	≥ 50	254.83 $\pm$ 70.34	>0.05
	<50	261.59 $\pm$ 59.55	
肿瘤大小(cm)	≥ 3	279.92 $\pm$ 37.36	<0.05
	<3	212.49 $\pm$ 27.64	
淋巴转移	阳性	272.49 $\pm$ 52.51	<0.05
	阴性	197.87 $\pm$ 32.42	
TNM 分期	I/II	215.87 $\pm$ 24.61	<0.05
	III/IV	274.28 $\pm$ 29.57	

3.4 3 组患者干预后乳腺癌组织 MVD、VEGF 表达比较

表 4 示,II 组肿瘤 MVD 较低,显著低于 III 组($P<0.05$),I 组和 III 组无统计学差异($P>0.05$)。II 组 VEGF 积分光密度明显低于 III 组($P<0.05$),而 I 组与 III 组差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 4 3 组患者乳腺癌组织 MVD 及 VEGF 表达比较($\bar{x} \pm s$)				
组别	例数	癌组织阳性 VEGF 数	MVD(个/HP)	VEGF(IOD)
I 组	30	18	57.75 $\pm$ 11.35	11039.52 $\pm$ 1849.85
II 组	30	12	43.26 $\pm$ 6.68 *	9031.09 $\pm$ 664.61 *
III 组	30	15	60.14 $\pm$ 10.12	11685.72 $\pm$ 1027.58

注:与 III 组比较, $*$ $P<0.05$

3.5 3 组患者干预后 s-VEGF、VEGF 与 MVD 的关系

3 个指标在各组中的样本均数都是 I 组与 III 组较低,而 II 组较高。对各组干预后 s-VEGF、癌组织 VEGF 及 MVD 数值作相关分析,结果显示, $\chi^2_1=0.563$, $\chi^2_2=0.321$, $\chi^2_3=0.227$, χ^2 群值显示 $P_1<0.05$ 、 $P_2<0.05$ 、 $P_3>0.05$,因此,认为干预后 s-VEGF 与癌组织 VEGF、MVD 存在正相关关系;未发现干预后癌组织 VEGF 与 MVD 间存在相关性。

4 讨论

中医认为,肿瘤的发生是内因和外因共同作用的结果,外因强调邪实(邪毒蕴聚),内因强调正虚。《黄帝内经》云:“正气存内,邪不可干。邪之所凑,其气必虚”。

《诸病源候论》也认为“瘤之义,留滞而不去也,气血流行不循其常,致郁结壅塞,邪则乘虚投隙,瘤所以生”。故中医认为乳腺癌病机为正虚邪实,其中正气内虚、气血两虚、冲任失调为肿瘤发生的主要原因^[12]。所以本研究以扶正祛邪为基本思路,祛邪采用化疗、手术等方法以直接杀伤肿瘤组织,扶正选用八珍汤补益气血以提高人体正气。根据乳腺癌的病机特点,术前即开始使用。八珍汤来自《正体类要》,方用人参、白术、茯苓、甘草补脾益气;当归、白芍、熟地黄滋养心肝,加川芎入血分而理气,则当归、熟地黄补而不滞,加生姜、大枣助人参、白术入气分以调和脾胃,全方配合,共奏气血双补之功。本研究显示,化疗及化疗联合八珍汤均可提高乳腺癌治疗的总有效率并降低进展率,且八珍汤可进一步降低化疗组的进展程度。

乳腺癌的生长及存活与新生血管形成有密切的关系。VEGF 可诱导肿瘤血管新生,促进肿瘤细胞的增殖与转移,同时还可能通过自分泌作用刺激肿瘤生长。有研究表明,VEGF 在恶性肿瘤的血管生成及转移扩散中起着重要作用^[13],是导致乳腺癌血行转移、淋巴转移的重要原因,是乳腺癌临床治疗的关键因素^[14]。本实验结果显示,II 组治疗后 s-VEGF 低于 III 组,I 组治疗后 s-VEGF 与 III 组无统计学差异。说明单独化疗对乳腺癌患者 s-VEGF 水平无影响,而联合八珍汤后能降低乳腺癌患者 s-VEGF 水平。从药物干预前 s-VEGF 水平与临床特征的关系表中可以发现,s-VEGF 浓度与肿瘤大小、淋巴转移、TNM 分期呈正相关,说明癌组织 VEGF 蛋白来源于肿瘤细胞,肿瘤体积越大,VEGF 表达越强。提示 VEGF 可诱导肿瘤血管和淋巴管新生,从而促进肿瘤细胞转移的发生;这与国内外的有关报道的结果一致^[15-17]。

VEGF 是重要的促血管生成因子,可以直接调控血管内皮细胞,而 MVD 被公认为能反映肿瘤血管生成活性或强度的指标,对观察肿瘤的生长、转移具有重要意义^[18]。本研究显示,II 组 MVD 明显低于 III 组,I 组与 III 组无统计学意义,说明八珍汤能降低乳腺癌组织微血管密度、抑制肿瘤血管生长;使用八珍汤的 II 组 VEGF 蛋白表达明显低于 III 组,而单用传统化疗的 I 组与 III 组差异无统计学意义,说明八珍汤能抑制乳腺癌组织 VEGF 蛋白表达,即八珍汤造成的 VEGF 抑制是 MVD 减少即抑制肿瘤组织微血管再生的主要原因。这与以往研究的结果^[19]一致。

综上所述,八珍汤可以提高乳腺癌化疗的总有效率并降低其进展率其抑制肿瘤组织微血管再生可能与降低 s-VEGF、抑制肿瘤 VEGF 蛋白表达有关。但是乳

腺癌发生机制复杂,本研究仅从血管生成机制进行探讨,其相关机制和远期疗效有待进一步研究。

参考文献

[1]Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(14):2137-2150.

[2]张伟东, 苗树军. 我国恶性肿瘤死亡率流行病学特征分析[J]. 中国健康教育, 2009, 25(4):246-248.

[3]张颖, 张瑞菊. 八珍汤抗肿瘤及补气血的药理临床研究进展[J]. 河北中西医结合杂志, 1998, 7(12):1876-1877.

[4]王蕾. 八珍汤加减治疗结直肠癌术后 30 例[J]. 河北中医, 2004, 26(9):692-693.

[5]刘华, 曾柏荣, 许利纯. 加味八珍汤配合化疗治疗晚期胃癌疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(24):3366.

[6]黄智芬, 施智严, 黎汉忠, 等. 八珍汤加味配合化疗治疗晚期大肠癌 31 例临床观察[J]. 河北中医, 2008, 30(12):1283-1285.

[7]中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2007 版)[J]. 中国癌症杂志, 2007, 17(5):6-12.

[8]郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2002:378-383.

[9]顾晓鸣, 陆群, 沈伟. 运用 Excel“随机数发生器”进行随机化分组[J]. 中国医院统计, 2007, 14(3):287-288.

[10]Duffaud F, Therasse P. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors [J]. Bull Cancer, 2000, 87(12):881-886.

[11]Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma

and other solid tumor[J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36(2):169-180.

[12]阙华发, 高尚璞, 陈红凤, 等. 乳宁 II 号对人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞株生长转移的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(7):32-34.

[13]Sipos B, Klapper W, Kruse ML, et al. Expression of lymphangiogenic factors and evidence of intratumoral lymphangiogenesis in pancreatic endocrine tumors[J]. Am J Pathol, 2004, 165(4):1187-1197.

[14]汪蕊, 陈睿, 杨婉华, 等. VEGF-C 和 VEGF-R³ 在乳腺癌中的表达及与淋巴结转移的关系[J]. 肿瘤防治研究, 2006, 33(6):385-387.

[15]Ryden L, Linderholm B, Nielsen NH, et al. Tumor specific VEGF-A and VEGFR²/KDR protein are co-expressed in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2003, 82(3):147-154.

[16]Celen O, Kahraman I, Yildirim E, et al. Correlation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and CEA with clinicopathological variables in colorectal cancer patients [J]. Neoplasma, 2004, 51(4):293-299.

[17]栗连秀, 陈红秋, 杨达平, 等. 血管内皮生长因子和 p⁵³ 在乳腺癌中的表达及其临床意义[J]. 广西医科大学学报, 2006, 23(4):602-603.

[18]丁杰, 廖国庆, 王万川, 等. 艾迪对结直肠癌血管生成抑制的临床研究[J]. 肿瘤, 2007, 27(2):142-146.

[19]孙立新, 武燕, 连润生, 等. 血管内皮生长因子、p⁵³ 在卵巢上皮癌中表达的临床意义[J]. 肿瘤研究与临床, 2004, 16(5):306.

(收稿日期:2009-11-16;修回日期:2010-07-06)
[编辑:行之]

全国院内制剂的名方、验方的开发应用及申报路径高峰论坛通知

为充分发挥中医药在维护人民健康、促进经济社会发展和弘扬我国优秀传统文化等方面的重要地位和作用,中华中医药学会拟举办全国院内制剂的名方、验方的开发应用及申报路径高峰论坛,同时将在全国重点开展扶持名方、验方的发掘和整理,开发院内制剂的科学规范应用试点工作。现展开全国各医疗机构院内制剂的全面调查工作,请给予支持和配合。

一、项目支持内容

1. 对经专家评审通过的院内名方制剂提供资金支持。2. 定期提供技术人员跟踪项目实施情况。3. 协助医疗机构完成院内制剂批文申报。4. 降低研发风险和开发成本,缩短院内制剂的开发周期。5. 协助医疗机构对已取得制剂批文的院内制剂进行技术改良、委托配制等相关事项。6. 提供“名院、名科、名医、名药”规划方案。7. 优秀论文将推荐到《世界中西医结合杂志》等国家级核心期刊发表。8. 协助科学技术进步奖、自然科学奖、技术发明奖的推荐工作。

二、项目的意义

本项目支持医院把临床有效方剂转化成符合 GMP 标准的院内制剂,是“名医、名科、名院”工程的具体措施之一,能最大限度地促使中医药制剂科技成果转化,从而扩大医院的社会效益和经济效益。

三、申报条件

持有《医疗机构执业许可证》并取得相应业务范围的《医疗机构诊疗科目核定表》的医疗机构。1. 制剂名称及命名依据。2. 立题目的以及该品种的市场供应情况。3. 证明性文件。4. 标签及说明书设计样稿。5. 处方组成、来源、理论依据以及使用背景情况。

四、组织机构

主办单位:中华中医药学会 协办单位:中华中医药学会药房管理分会

五、联系方式

地址:中国广州市沿江中路 298 号江湾商业中心 1307 室, 邮编:510110。1. 中华中医药学会:王奕(010-64274797) 2. 组委会:何辉园(020-83283661, 13798118960, 传真:020-83283667, E-mail:hehuatcm@yahoo.cn) 会议具体事项请访问 <http://www.hehuatcm.com>。