

化浊解毒和胃方对胃癌前病变大鼠血管生成机制的影响

高绍芳¹ 王彦刚² 李佃贵² 裴 林²

摘要 **目的** 探讨化浊解毒和胃方治疗胃癌前病变(precancerous lesions of gastric cancer, PLGC)在血管新生方面的可能机制。**方法** Wistar 大鼠 66 只随机分为 6 组:即正常对照组(空白组),模型组,维甲酸治疗组(维甲酸组),化浊解毒和胃方高、中、低剂量治疗组,每组 11 只。采用幽门弹簧插入复合复制慢性萎缩性胃炎 PLGC 模型,各组给予相应的药物每天灌胃 1 次,每次 2 mL,连续 12 周。采用免疫组织化学和 Western blot 方法,观察化浊解毒和胃方对慢性萎缩性胃炎 PLGC 大鼠胃黏膜组织缺氧诱导因子-1 α (hypoxia induced factor, HIF-1 α)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的影响。**结果** 与空白组比较,模型组 VEGF、HIF-1 α 的表达增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);各治疗组与模型组比较,VEGF、HIF-1 α 表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);且化浊解毒和胃方高剂量组与中剂量组降低 VEGF、HIF-1 α 的表达优于维甲酸组及化浊解毒和胃方低剂量组($P < 0.05$),低剂量组与维甲酸组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 化浊解毒和胃方可能是通过降低 PLGC 大鼠胃黏膜 HIF-1 α 、VEGF 的表达,从而抗血管生成达到防治慢性萎缩性胃炎 PLGC 的治疗效果,并且存在一定的量效关系。

关键词 胃癌前病变;化浊解毒和胃方;血管内皮生长因子;缺氧诱导因子 1 α

Effect of Huazhuo Jiedu Hewei Recipe on the Mechanism of Angiogenesis in Precancerous Lesions of Gastric Cancer Rats GAO Shao-fang¹, WANG Yan-gang², LI Dian-gui², and PEI Lin²
1 Division of Clinics, Hebei Medical University, Shijiazhuang (050020), China; 2 Department of Digestive Diseases, Hebei Provincial Hospital of Chinese Medicine, Shijiazhuang (050011), China

ABSTRACT **Objective** To explore the possible angiogenesis mechanism of Huazhuo Jiedu Hewei Recipe (HJHR) in preventing and treating precancerous lesions of gastric cancer (PLGC). **Methods** Totally 66 Wistar rats were randomly divided into 6 groups, i.e., the normal control group, the model group, the retinoic acid (RA) group, the high dose HJHR group, the middle dose HJHR group, the low dose HJHR group, 11 in each group. PLGC model was duplicated by inserting a spring with Helicobacter. Corresponding medicines were administered to rats in each medicated group once daily by gastrogavage, 2 mL each time for 12 successive weeks. The effect of HJHR on hypoxia induced factor (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) of PLGC in chronic atrophic gastritis (CAG) rats' gastric mucosa was observed by immunohistochemical assay and Western blot method. **Results** Compared with the normal control group, the expression of VEGF and HIF-1 α increased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of VEGF and HIF-1 α decreased in each medicated group ($P < 0.05$). Besides, they were lower in the high and middle dose HJHR groups than in the RA group and the low dose HJHR group ($P < 0.05$). There was no statistical difference between the low dose HJHR group and the RA group ($P > 0.05$). **Conclusion** HJHR could prevent and treat PLGC of CAG rats possibly through decreasing the expression of HIF-1 α and VEGF in a dose-dependent manner.

KEYWORDS precancerous lesions of gastric cancer; Huazhuo Jiedu Hewei Recipe; vascular endothelial growth factor; hypoxia-inducible factor 1 α

基金项目:河北省科技支撑项目:基于浊毒理论“三位一体”逆转胃癌前病变的临床前瞻性研究(No. 11276103D-36)

作者单位:1.河北医科大学西山校区临床部(石家庄 050020);2.河北省中医院消化科(石家庄 050011)

通讯作者:高绍芳, Tel:13932156380, E-mail:wggf@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2013.11.1515

胃癌是发病率和病死率最高的恶性肿瘤之一。它是一个多步骤癌变的过程,即慢性浅表性胃炎→慢性萎缩性胃炎→肠上皮化生→不典型增生→胃癌。早在 1978 年 WHO 将慢性萎缩性胃炎列为胃癌的癌前状态,在此基础上伴发的肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)和异型上皮增生(atypical epithelial hyperplasia, ATP),被认为是胃癌前病变(precancerous lesions of gastric cancer, PLGC)^[1],阻断和逆转 PLGC 的发展,是降低胃癌发生率的有效措施之一。

肿瘤的快速生长、浸润与转移依赖于血管生成,丰富的血管可持续不断地向肿瘤提供营养和排出代谢产物,为其生长提供物质条件^[2]。已陆续发现多种血管生成因子,其中缺氧诱导因子-1 α ^[3](hypoxia induced factor, HIF-1 α)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在许多肿瘤中过度表达,与肿瘤血管生成、肿瘤细胞的增殖、凋亡等过程密切相关。肿瘤细胞高表达 HIF-1 α ^[3],肿瘤细胞在长期缺氧微环境刺激下,通过 HIF-1 α 表达增高调控血管新生[如 VEGF、转化生成因子(transforming growth factor, TGF)等],促进细胞发生上皮间质转化[如 TWIST 蛋白、上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)]等途径适应缺氧微环境而促进肿瘤生长和转移^[4]。故此目前,抗肿瘤血管治疗已经成为肿瘤治疗的新方向。

目前西医尚无公认的特效药物和方法,而中药具有良好的疗效和前景。李佃贵教授根据多年的临床经验,认为“浊毒”是其病理变化基础,研制成化浊解毒和胃方治疗 PLGC,取得较为满意的临床效果^[5,6]。

本研究采用免疫组织化学和 Western blot 的方法,观察化浊解毒和胃方对慢性萎缩性胃炎 PLGC 大鼠胃黏膜组织 VEGF、HIF-1 α 的影响,探讨化浊解毒和胃方对慢性萎缩性胃炎 PLGC 可能的抗血管生成治疗机制。

材料与方法

1 动物 健康 Wistar 大鼠 66 只,雄性,体重(160 $\pm$ 10)g。购买自河北医科大学实验动物中心。实验动物质量合格证号:809100。常规喂养标准饲料。

2 药品与试剂 化浊解毒和胃方:由茵陈、藿香、佩兰、茯苓、黄连、半枝莲、半边莲、全蝎、白花蛇舌草等中药组成。购自河北省中医院中药房,由河

北医科大学中医学院制剂室水煎浓缩成含量为 2.35 g 生药/mL 的混悬液,并由河北医科大学中医学院制剂室进行质量控制;维甲酸片,重庆华邦制药有限公司,10 mg/片,批号:20040607;脱氧胆酸钠,山东鲁北药业有限公司,批号:010401;盐酸雷尼替丁胶囊,杭州民生药厂生产,0.15 g/粒,批号:950775;兔抗鼠 VEGF、HIF-1 α 多克隆抗体试剂盒、DAB 显色试剂盒:武汉博士德生物工程有限公司。

3 动物造模及分组给药 Wistar 雄性大鼠 66 只,适应性喂养 1 周后,随机分为 6 组,即正常对照组(空白组),模型组,维甲酸治疗组(维甲酸组),化浊解毒和胃方高、中、低剂量治疗组,每组 11 只。除空白组外,其余各组均进行大鼠慢性萎缩性胃炎 PLGC 模型的建立,模型的制备参照文献^[7]的方法并加以改进,将雄性 Wistar 大鼠禁食不禁水 16 h 后,以 1.0% 戊巴比妥 5 mL/kg 腹腔注射麻醉,称其质量,固定大鼠四肢,在无菌条件下开腹,暴露胃,在胃前壁距幽门环 0.2 cm 无或少血管处切一小口,将一长约 2 cm、直径约 0.2~0.3 cm 的金属弹簧前 1/3 插过幽门环进入十二指肠,用缝线将弹簧两端及中央固定,按手术常规逐层缝合胃及腹壁切口。手术后禁食不禁水 24 h,恢复性饲养 1 周后,开始灌胃 60~70℃ 高盐热淀粉糊(含 15% NaCl),每次 2 mL/只,2 次/周,连续 24 周。每组取 1 只大鼠确认造模成功后,空白组及模型组给予等量生理盐水,其余各组给予相应的药物灌胃治疗。维甲酸组予 40 mg/kg 灌胃;化浊解毒和胃方高、中、低剂量组分别予化浊解毒和胃方 20、10、5 g/kg 灌胃(相当于成人每日用量的 2、1、1/2 倍)。每天上午灌胃 1 次,每次 2 mL,连续 16 周,于第 16 周末处死各组大鼠,剖腹取胃,沿胃大弯剪开,肉眼观察,使用 200℃ 干烤的器械于手术台上于胃窦部剪取组织 100 mg,迅速将组织置于 4℃ DEPC 水中洗去血液后,置冻存管中保存于液氮中。另在胃窦部小弯侧切取 1.5 $\times$ 1.0 cm 胃组织,10% 中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,HE 染色。为免疫组织化学法的检测备用。

4 观察指标及方法

4.1 用 Western blot 法检测 HIF-1 α 首先取大约 500~600 mg 组织匀浆加 1 mL 提取液匀浆提取,4℃,12 000 r/min 离心 5 min,取上清,提取细胞总蛋白,然后取洁净的玻璃板,将玻璃板下端用 Tris-甘氨酸 1% 琼脂糖封口,将分离胶倒入准备好的玻璃板间隙,在顶层加入数毫升覆盖物,聚合后(大约 15 min),吸干水,倒成层胶,插入梳子。待成层胶凝

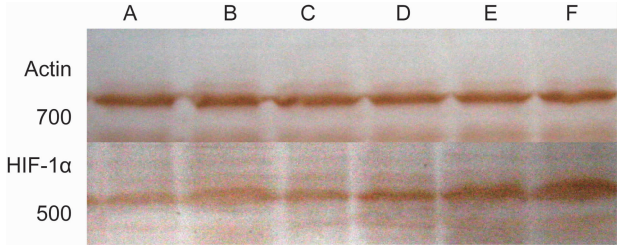
聚后,小心拔出梳子,加样本 8 μL 。加入电泳缓冲液,定容至 5 L 后,加 5 g SDS 溶解其中,再进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳;随后进行膜转移操作,转移膜在正极,胶在负极,170 ~ 200 mV 1.5 ~ 6 h,后在封闭液(5%牛血清白蛋白 BSA)中室温摇动 4 ~ 5 h 或静止过夜;加兔抗鼠 HIF-1 α 抗体稀释 1 : 250,室温摇动 1 ~ 3 h;PBS 清洗,10 min $\times$ 3 $\rightarrow$ 加稀释的生物素标记鼠抗兔 IgG $\rightarrow$ PBS 清洗 10 min $\times$ 3 $\rightarrow$ 显色,Western blot 图像存入计算机,经 IBAS 2.0 全自动图像分析系统进行光密度指数分析。

4.2 免疫组织化学法测定 VEGF 所有标本均经 10% 中性福尔马林固定 24 h,石蜡包埋,经 HE 常规染色,进行免疫组织化学 SP 法染色,方法按试剂盒严格操作,用生物公司提供的已知阳性切片作为阳性对照,阴性对照为 PBS 液代替一抗的空白对照。本实验研究结果的评判标准^[8]如下:镜下以胃黏膜细胞胞浆和(或)胞膜染成棕黄色细颗粒者为 VEGF 表达阳性,对每张切片随机选取 5 个视野,高倍镜下(10 $\times$ 40)每个视野计数 200 个细胞,共计 1 000 个,以胞质表达颗粒的着色深浅及着色的阳性细胞数进行评分:0 分为无色,1 分为浅黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色,染色强度需与背景色相对比;再按阳性细胞所占百分比打分:阳性细胞 < 5% 为 0 分,阳性细胞 5% ~ 25% 为 1 分,阳性细胞 26% ~ 50% 为 2 分,阳性细胞 51% ~ 75% 为 3 分,阳性细胞 > 75% 为 4 分,染色强度分值与阳性细胞百分比分值的乘积为 0 ~ 1 分为 -, 2 ~ 3 分为 +, 4 ~ 6 分为 ++, > 6 分为 +++。

5 统计学方法 用 SPSS 13.0 统计软件进行统计处理,计数资料用四格表 χ^2 检验,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对各组数据均进行方差齐性检验,方差齐时不同组间用单因素方差分析,两两比较用 SNK-*q* 检验;方差不齐用 K-W *H* 检验,两两比较用 Neminy 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠胃黏膜 HIF-1 α 的表达比较(图 1,表 1) 与空白组比较,模型组 HIF-1 α 的表达增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,各治疗组 HIF-1 α 的表达下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);化浊解毒和胃方高剂量组与中剂量组 HIF-1 α 的表达均低于维甲酸组及化浊解毒和胃方低剂量组($P < 0.05$),低剂量组与维甲酸组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注: A 为空白组;B 为模型组;C 为维甲酸组;D 为化浊解毒和胃方低剂量组;E 化浊解毒和胃方中剂量组;F 为化浊解毒和胃方高剂量组

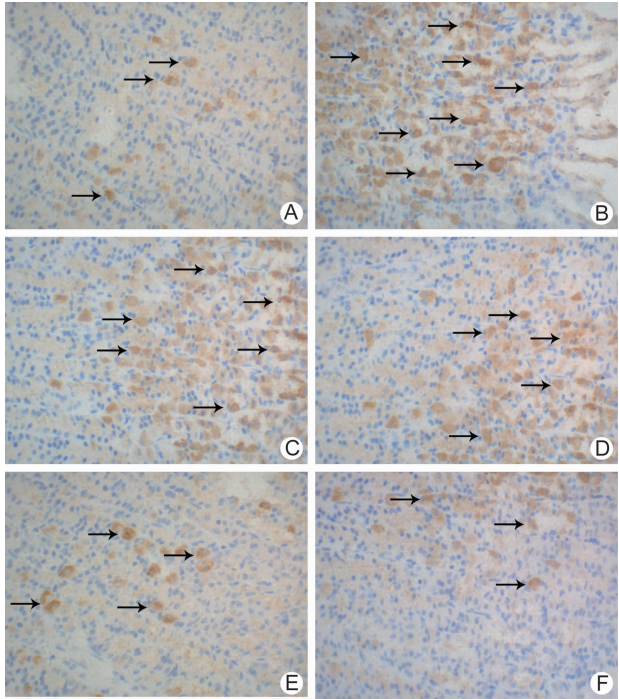
图 1 各组大鼠胃黏膜 HIF-1 α 的表达比较

表 1 各组大鼠胃黏膜 HIF-1 α 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	HIF-1 α
空白	10	0.189 1 $\pm$ 0.005 1
模型	10	0.595 0 $\pm$ 0.007 1 *
维甲酸	10	0.386 4 $\pm$ 0.006 2 Δ
化浊解毒方低剂量	10	0.377 1 $\pm$ 0.005 3 Δ
化浊解毒方中剂量	10	0.222 8 $\pm$ 0.005 8 $\Delta\Delta\bigcirc$
化浊解毒方高剂量	10	0.214 2 $\pm$ 0.006 1 $\Delta\Delta\bigcirc$

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与化浊解毒和胃方低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$;与维甲酸组比较, $\bigcirc P < 0.05$

2 各组大鼠胃黏膜 VEGF 的表达比较(图 2,表 2) VEGF 的免疫性反应物呈棕褐色,细颗粒状,背景



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为维甲酸组;D 为化浊解毒和胃方低剂量组;E 为化浊解毒和胃方中剂量组;F 为化浊解毒和胃方高剂量组;箭头所示为 VEGF 的阳性表达

图 2 各组大鼠胃黏膜 VEGF 的表达比较 (SP 法, $\times 400$)

不着色或略显淡黄色,主要位于 IM 和 ATP 细胞膜和(或)胞浆,一些内皮细胞上也可见弱的 VEGF 染色(具体见各图示箭头所指)。空白组 VEGF 表达甚微,与空白组比较,模型组及各治疗组 VEGF 的表达增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);各治疗组与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);高剂量组与中剂量组降低 HIF-1 α 的表达优于维甲酸组、低剂量组($P < 0.05$),低剂量组与维甲酸组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠胃黏膜 VEGF 阳性表达的比较 (只)					
组别	n	-	+	++	+++
空白	10	1	6	3	0
模型	10	0	1	2	7
维甲酸	10	0	1	7	2
低剂量	10	0	2	7	1
中剂量	10	1	3	5	1
高剂量	10	1	2	6	1

讨 论

中医学并无胃癌前病变的病名,根据辨证可将其归于胃脘痛、痞满、呃逆、癥瘕等范畴。本课题组经过多年的临床实践,认为本病病位在脾胃,涉及肝,病机关键在于脾胃虚弱、浊毒之邪壅滞中焦。其演变多由肝郁气滞,木旺克土,脾虚湿盛,继而积湿成浊,浊郁化热,热蕴成毒,浊毒之邪深伏胃脉血分,最终形成慢性萎缩性胃炎这一病理改变。治疗上以化浊解毒为主,和胃健脾为辅。化浊解毒和胃方中茵陈、藿香、佩兰芳香祛湿化浊;茯苓健脾利湿,以绝生痰之源;黄连、白花蛇舌草、半枝莲、半边莲、全蝎等药物解毒通络,诸药相互配伍,化浊解毒通络,标本同治。现代药理学研究表明,白花蛇舌草具有抗肿瘤作用^[9];半枝莲的水提取物和醇提取物均有明显的抗肺癌、消化系统癌、乳腺癌、绒膜上皮癌的活性^[10,11];全蝎有效抗癌成分对人对胃癌细胞株 MGC-803 有明显的细胞毒性和生长抑制作用^[12]。以往研究显示化浊解毒和胃方可通过抑制癌基因的激活和抑癌基因的失活,促进胃癌前细胞凋亡,从而逆转 PLGC,防止其向胃癌发展^[13]。

现代医学认为,肿瘤的快速生长、浸润与转移是导致患者死亡的主要原因,肿瘤生长依赖于血管生成,丰富的血管可持续不断地向肿瘤提供营养和排出代谢产物,为其生长提供物质条件。肿瘤的血管生成是一个多因素、级联、整体、动态的过程,包括内皮细胞的增殖、迁移、分化,最后成为管状结构,它受多种因子的调节。

自从 Folkman J^[14]于 1971 年提出肿瘤血管生

成因子(TAF)概念以来,已陆续发现多种血管生成因子。如:HIF-1 α ,酸性成纤维细胞生长因子(acid fibroblast growth factor, aFGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、VEGF、血小板源生长因子(platelet derived growth-factor, PDGF)等。其中 HIF-1 α 、VEGF 在许多肿瘤中过度表达,与肿瘤血管生成、肿瘤细胞的增殖、凋亡等过程密切相关。血管内皮生长因子作为诱导剂的一种,能刺激新的血管生成,在绝大多数肿瘤均呈现其高表达。VEGF 可增加血管通透性,促进肿瘤生长转移,并直接作用于肿瘤细胞,刺激肿瘤细胞生长。HIF-1 α 是相对较新的促血管生长因子的上游调控因子,当肿瘤细胞增长较快,必然导致局部缺氧。此时,HIF-1 α 可通过调控编码 VEGF 的基因使 VEGF 呈现高表达,并进一步促使血管生成。

黄莉等^[15]研究表明在 PLGC 的进展过程中 VEGF 的阳性表达率呈递增现象,认为随着胃癌的恶性程度的提高而 VEGF 的表达也增强,从而认为 VEGF 可能参与了肿瘤的发生与发展过程,证实了 HIF-1 α 通过 VEGF 对肿瘤的转移潜能产生影响,表现出良好的相关性。首先:HIF-1 α 介导 VEGF 表达的转录激活,HIF-1 α 过表达可增加 VEGF mRNA 的稳定性。其次:VEGF mRNA 稳定性增加对 VEGF 表达的上调也有促进作用。

本研究结果显示化浊解毒和胃方能降低胃黏膜病变组织 HIF-1 α 、VEGF 的表达,一方面提示化浊解毒和胃方药可能通过降低 HIF-1 α 和 VEGF 的表达而达到抑制新生血管生成的作用;另一方面以方测证,表明胃黏膜病变组织中血管相关因子 HIF-1 α 、VEGF 可能是浊毒在 PLGC 进程中的物质基础。对于化浊解毒和胃方药防治 PLGC 的作用机制仍有待于我们进行深入研究。

参 考 文 献

[1] 戴自英.实用内科学[M].第10版.北京:人民卫生出版社,1997:1585.

[2] 李建波,李新民,詹惟.胃癌及癌前病变组织中 VEGF 和 iNOS 蛋白的表达[J].细胞与分子免疫学杂志,2011,27(5):560-562.

[3] Arjumand W, Sultana S. Role of VHL gene mutation in human renal cell carcinoma[J]. Tumor Biol, 2012, 33(1):9-16.

[4] Noman MZ, Messai Y, Carré T, et al. Microenvironmental hypoxia orchestrating the cell stroma cross talk, tumor progression and anti-tumor re-

- sponse [J]. Crit Rev Immunol, 2011, 31 (5): 357-377.
- [5] 王彦刚,李佃贵. 基于浊毒学说治疗慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生临床疗效观察[J]. 中华中医药杂志, 2009,24(3): 353-355.
- [6] 高绍芳,李佃贵,崔建从,等. 化浊解毒和胃方对慢性萎缩性胃炎胃癌前病变患者的治疗作用[J]. 中国老年学杂志, 2010,4(30): 460-462.
- [7] 张玉禄,李军祥,鲁香凤,等. 综合法复制大鼠慢性萎缩性胃炎癌前病变模型形态学观察及早期细胞凋亡分析[J]. 北京中医药, 2008,27(4): 296-299.
- [8] 王旭霞,赵曙光,张超,等. VEGF 和 MMP-9 在胃癌表达及其与预后的相关性[J]. 山西医科大学学报, 2010,41(8): 677-679.
- [9] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1986: 754-755.
- [10] 王刚,董枚. 半枝莲醇提物抗肿瘤活性的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2004,13(9): 1141-1143.
- [11] Lee TK, Lee DK, Kim DI. Inhibitory effects of *Scutellaria barbata*. Don on human uterine leiomyoma smooth muscle cell proliferation through cell cycle analysis[J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(3): 447-454.
- [12] 董伟华,孔天翰,韩雪飞,等. 蝎毒抗癌多肽对 4 种人肿瘤细胞系的作用[J]. 河南医科大学学报, 1999, 34(1): 52.
- [13] 高绍芳,李佃贵,郭敏,等. 化浊解毒和胃方对胃癌前病变大鼠胃癌相关基因的影响[J]. 中华中医药杂志, 2010,1(25): 34-37.
- [14] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication[J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [15] 黄莉,卿笃信. Survivin 与 VEGF 在胃癌、胃黏膜表达及相关性研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2006,15(5): 451-455.

(收稿:2012-12-24 修回:2013-08-20)

中国中西医结合学会生殖医学专业委员会(筹委会)成立大会暨 “生殖疾病及辅助生殖技术中西结合研究进展”学习班征文通知

中国中西医结合学会生殖医学专业委员会(筹委会)成立大会暨 2013 年度国家级中医药继续教育项目“生殖疾病及辅助生殖技术中西结合研究进展”学习班定于 2013 年 12 月 6—8 日在浙江省温州市举行。

会议将邀请国内外的中、西医生殖医学专家进行专题讲座,就生殖医学中西医新技术、新理论和新进展以及相关热点、难点问题探讨,与会代表可获得国家级继续教育 I 类学分 10 分(No. 2013110302040),现征文如下。

征文内容为中西生殖医学(妇产科、男科及边缘学科)相关研究,要求撰写 500 字以内的论文摘要(包括研究目的、方法、结果、结论和重要数据)或 1 000 字以内的综述,请于 2013 年 10 月 31 日前发电子邮件至 zsyy007@163.com,联系人:单青青(浙江省温州中山医院、中国中西医结合学会生殖医学不孕不育研究所),联系电话:0577-86726120。希望生殖医学同道积极参加本次会议并踊跃投稿。