

· 论著 ·

[文章编号] 1007-0893(2024)08-0001-05

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2024.08.001

# 温阳化痰散积法对肝癌血管生成及相关蛋白的影响

郭文海 谢和平 邹增城 李永伟

(中山大学附属第三医院, 广东 广州 510630)

**[摘要]** 目的: 阴阳攻积丸为温阳化痰散积法治疗癥瘕积聚的明朝古方, 本研究探讨其化裁后对肝癌细胞株体外肿瘤血管生成和相关蛋白的影响。方法: 制备新制攻积丸大鼠含药血清, 细胞计数试剂盒 (CCK) 8 检测含药血清对肝癌细胞株 HepG2SG 的抑制率。蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测细胞肿瘤血管生成相关蛋白血管内皮钙黏蛋白 (VE-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)、转化生长因子  $\beta 2$  (TGF $\beta 2$ )、Twist1 和 CD44 的蛋白表达。细胞划痕实验和 Transwell 法检测 HepG2SG 细胞迁移侵袭能力。含药血清干预后 HepG2SG 条件培养基培养人脐静脉内皮细胞 (HUVEC), 分别检测 HUVEC 和 HepG2SG 细胞的体外成管。结果: 新制攻积丸含药血清呈浓度依赖性抑制 HepG2SG 细胞增殖, 含药血清组与对照组和空白血清组比较, 各浓度抑制率均明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与对照组和空白血清组比较, 新制攻积丸含药血清组 VE-cadherin, Vimentin、TGF $\beta 2$ 、Twist1 和 CD44 蛋白表达均下调, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 含药血清组 HepG2SG 的迁移侵袭能力、HUVEC 管状结构生成和 HepG2SG 的血管生成拟态均较对照组和空白血清组显著减少 ( $P < 0.001$ )。结论: 以温阳化痰散积为主的新制攻积丸含药血清可抑制 HepG2SG 细胞, 降低肿瘤迁移侵袭能力, 显著下调肿瘤血管生成相关蛋白的表达, 可能抑制肿瘤血管生成。

**[关键词]** 原发性肝癌; 阴阳攻积丸; 丝甘蛋白聚糖; 肿瘤血管生成

**[中图分类号]** R 735.7 **[文献标识码]** A

## The Effect of Warming Yang, Resolving Phlegm, Dispersing Accumulation Method on Angiogenesis and Related Proteins in Primary Liver Cancer

GUO Wenhai, XIE Heping, ZOU Zengcheng, LI Yongwei

(The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong Guangzhou 510630)

**[Abstract]** **Objective** Yin Yang Gong Ji Pill is an ancient formula in Ming Dynasty, used to treat the mass and accumulation syndrome with warming Yang, resolving phlegm, and dispersing accumulation. This study explores the effects of the reducing prescription New Gong Ji Pill on tumor angiogenesis and related proteins in liver cancer cell lines in vitro. **Methods** The drug-containing serum of New Gong Ji Pill was prepared and the inhibition rate of HepG2SG by the drug-containing serum was detected by cell counting kit (CCK)8. Protein expressions of tumor angiogenesis related proteins such as VE-cadherin, Vimentin, transforming growth factor  $\beta 2$  (TGF $\beta 2$ ), Twist1 and CD44 were detected by Western blot. Cell scratch assay and Transwell assay were used to detect the migration and invasion ability of HepG2SG cells. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cultured with HepG2SG conditional medium and HepG2SG cells were used to detect angiogenesis in vitro, respectively. **Results** The proliferation of HepG2SG cells was inhibited by the drug-containing serum in a concentration-dependent way. Compared with the control group and the blank serum group, the inhibitory rates of all concentrations in the drug-containing serum group were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the control group and blank serum group, the protein expressions of VE-cadherin, Vimentin, TGF $\beta 2$ , Twist1 and CD44 in New Gong Ji pill containing serum group were down-regulated, and the differences were statistically significant ( $P < 0.01$ ). The migration and invasion ability of HepG2SG, angiogenesis of HUVEC and angiogenesis mimicry of HepG2SG in drug-containing serum group were significantly reduced compared with the control group and blank serum group ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** The containing serum of New Gong Ji Pill, which mainly contains drugs of expelling phlegm and eliminating accumulation, can inhibit HepG2SG cells, reduce tumor migration and invasion ability, significantly down-regulate the expression of tumor angiogenesis related proteins, and thus inhibit tumor angiogenesis and angiogenesis mimicry.

**[Keywords]** Primary liver cancer; Yin Yang Gong Ji pill; Serglycin; Tumor angiogenesis

**[收稿日期]** 2024 - 02 - 11

**[基金项目]** 全国名老中医药专家传承工作室建设项目 (140000020132); 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2022A1515011689, 2023A1515011937)

**[作者简介]** 郭文海, 男, 主治医师, 主要研究方向是中西医结合治疗肝脏疾病。

世界卫生组织发布的 2020 年全球肿瘤流行病学数据显示, 中国新发癌症病例和死亡病例数均位居全球第一, 分别为 457 万例和 300 万例。原发性肝癌(中医诊断肝癌)是全球第 6 大常见癌症和第 3 位癌症死亡原因<sup>[1]</sup>, 位于我国常见恶性肿瘤的第 5 位, 肿瘤致死病因的第 2 位<sup>[2]</sup>。中国占据亚洲肝癌发病率的 62.4%, 中国大陆肝癌的 5 年生存率明显低于韩国和日本<sup>[3]</sup>。目前原发性肝癌诊疗规范强调多学科参与的综合治疗。其中系统治疗包括靶向治疗、免疫治疗、化疗和中医中药治疗, 有效的系统治疗可减轻肿瘤负荷、改善症状、提高生活质量和延长生存时间<sup>[2]</sup>。本文作者前期研究了温阳化痰散积法为主的明朝古方阴阳攻积丸干预肝癌细胞的作用机制<sup>[4]</sup>, 该方以祛痰的皂角为最大剂量, 其他化痰祛湿药物包括洗半夏、橘红、茯苓、厚朴、枳实、桔梗、石菖蒲等, 其次是温阳药物吴茱萸、干姜、肉桂、制川乌等, 有“病痰饮者当以温药和之”之意。新制攻积丸减去了其中的巴豆霜、洗半夏、川乌、槟榔等, 主要因其毒性较大, 巴豆霜和洗半夏药源困难, 临床难以备齐; 而槟榔归胃和大肠经, 咀嚼槟榔被确认为一级致癌, 以致槟榔被某些国家禁售, 考虑该类药物影响长期用药安全。减去后全方仍具有“温中理气、化痰导滞、破癥散积”的功效。

肿瘤血管是肝癌赖以生存、增殖、侵袭转移的必要条件, 表现为经典的内皮细胞依赖的肿瘤新生血管(endothelial dependent vessels, EDV)或肿瘤细胞形成的血管生成拟态(vasculargenic mimicry, VM)<sup>[5]</sup>。活血类的药物可以改善肿瘤血管生成<sup>[6]</sup>。但以祛痰散积药为主的方剂(原方仅有延胡索和琥珀两味活血类药物)是否可以抑制肿瘤血管生成值得研究。因此本文作者对减方后的新制攻积丸进行了实验研究, 为下一步开展临床试验提供依据, 结果报道如下。

## 1 材料

### 1.1 细胞和动物

由人肝癌细胞 HepG2 (ATCC Number HB-8065) 构建的丝甘蛋白聚糖(serglycin)过表达细胞株 HepG2SG, 及人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)保存于本实验室, 复苏后加入 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 培养条件 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度、37℃。

清洁级健康 SD 成年大鼠体质量(200 ± 10)g, 雌雄各半, 广州中医药大学动物实验中心提供, 许可证号 SCXK(粤)2018-0034, SPF 级鼠料, 北京科澳协力饲料有限公司提供。适应性喂养 3 d, 按随机数字表随机分为空白血清组和含药血清组, 各 4 只。动物伦理经广州

锐格生物科技有限公司实验动物伦理委员会审查同意(批准编号 20230201002)。

### 1.2 药物

药材来源于中山大学附属第三医院中药房, 由该院中药房主任药师鉴定为正品。药物组成按照明朝李中梓《医宗必读》中阴阳攻积丸的配方: 吴茱萸、炒干姜、肉桂各 30 g, 炒黄连、橘红、茯苓、炒厚朴、麸炒枳实、菖蒲、炒延胡索、人参(去芦)、沉香、琥珀(另研)等各 24 g。按前法, 以上各药为细末, 皂角 180 g、生姜 10 g, 分别于冷水中浸泡 30 min, 分别用武火煮沸后改文火煎煮 30 min, 煎煮 2 次的药液置于常温, 混合上述细末制成丸, 每丸含生药 4 g。动物给药剂量=临床常用量 × 动物等剂量系数, 分别采用成人量(60 kg)每日 4 g 和 8 g, 换算成大鼠的等效剂量为 0.42 g 和 0.84 g。纯水溶解, 含药血清组动物每次灌药 1 mL 和 2 mL, 每日灌胃 2 次, 持续 7 d, 于末次灌胃 2 h 后, 主动脉采血分离血清, 0.22 μm 滤膜过滤, 无菌分装冷藏备用<sup>[4]</sup>。

### 1.3 实验试剂

细胞培养试剂: 胎牛血清(Cat.No.SH30087.01), DMEM 培养基(Cat.No.SH30022.01B), 青链霉素(Cat.No.SH30010), 磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)(Cat.No.SH30256.01B), 以上均为美国 Hyclone 公司。细胞计数试剂盒(cell counting kit, CCK)-8 试剂盒(日本同仁化学研究所, Dojindo, Cat.No.CK04)。

### 1.4 实验耗材

6 孔板、24 孔板、48 孔板细胞培养板(美国 CORNING, Cat.No.040810004, Cat.No.3548, Cat.No.051010001 A), 9 孔板、12 孔板细胞培养板(中国无锡 NEST, Cat.No.PPP-001-030, Cat.No.3524), Transwell 细胞培养板和 matrigel 胶(美国 BD 公司, REF353097, 356234)。

### 1.5 仪器

苏州安泰洁净工作台(中国 SW-CJ-IFD), 低速离心机(中国中佳, SC3614), 倒置光学显微镜(日本 OLYMPUS CKX41, U-CTR30-2), 细胞恒温培养箱(美国 Thermo scientific, HERACELL150i)。分析天平(德国赛多利斯集团, BT125D), 控温磁力搅拌器(中国金坛市医疗仪器厂 85-2), 凝胶成像系统(美国 ProteinSimple 公司 Alpha), 高速冷冻离心机(德国 SIGMA 公司, SIGMA 3K15), 旋涡混合器(中国海门市其林贝尔仪器制造有限公司 VORTEX-5), 电热恒温水槽(中国上海一恒科技有限公司 DK-8D), 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司 Bio-Rad Power PAC 200), 酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific, 型号 multiscan MK3)。

### 1.6 实验方法

1.6.1 CCK-8 法检测细胞增殖 调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ，每孔 100  $\mu\text{L}$  加入 96 孔板，含药血清浓度分别为 2.5 %、5 %、10 %、15 %、20 %，空白血清浓度为 10 %，以及无干预的对照组共 3 组。干预 48 h 后收集细胞，加入 CCK-8 溶液，100  $\mu\text{L}$  培养液加入 10  $\mu\text{L}$  检测液，孵育 4 h 后酶标仪读取 OD450 数据。抑制率 =  $(1 - \text{实验组 OD 值均值} / \text{对照组 OD 值均值}) \times 100\%$  (同一时间)。

1.6.2 Western blot 检测 收集蛋白样品，使用 RIPA 裂解液裂解细胞，测定每个样品的蛋白浓度。在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 上电泳，转移到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜上，封闭，稀释比例为 1:1000 的一抗孵育 [波形蛋白 (Vimentin) (L52) Peptide 和 CD44 (abcam 公司，货号: ab229126, ab119335)；转化生长因子  $\beta 2$  (transforming growth factor- $\beta 2$ , TGF $\beta 2$ ) antibody (Santa Cruz 公司，货号: SC-90)；扭曲相关蛋白 1 (Twist 1) antibody (Abcam 公司，货号: ab50887)；血管内皮钙黏蛋白 (vascular endothelial cadherin, VE-cadherin) Rabbit pAb (abclonal 公司，货号: A0734)]，辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的二抗孵育，BeyoECL Plus 检测蛋白，显影拍片，凝胶图象处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。

1.6.3 细胞迁移实验 (划痕检测) 加入 6 孔板每孔浓度为 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的纤维连接蛋白 50  $\mu\text{L}$ ，置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜，将处于对数生长期的  $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$  细胞接种于 6 孔培养板中，置于 37  $^{\circ}\text{C}$  5 %  $\text{CO}_2$  培养箱中常规培养。倒置显微镜下观察细胞长成单层后，对照组用无血清培养基培养，实验组分别用含药血清和空白血清培养基进行干预，换液后用丝裂霉素处理 1 h，抑制细胞的分裂。用 10  $\mu\text{L}$  无菌微量移液枪头比着直尺，尽量垂直于背后的横线在细胞板上划痕，置入 37  $^{\circ}\text{C}$  5 %  $\text{CO}_2$  培养箱中继续培养，分别于划痕后 0、24、48、72 h 取样，拍照。在倒置显微镜下观察划痕愈合情况。Image Pro-Plus 6.0 软件测量各组细胞相同时间点任意 8 个部位划痕宽度，计算各组细胞运动迁移能力：迁移率 =  $(1 - \text{其他时间点距离} / \text{0 h 距离}) \times 100\%$  (同一样品)。

1.6.4 Transwell 检测细胞侵袭能力 4  $^{\circ}\text{C}$  溶解 Matrigel 过夜，取 40  $\mu\text{L}$  加入预冷的 Transwell 小室中，37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h 使 Matrigel 凝固。在上室、下室分别加入 100  $\mu\text{L}$ 、600  $\mu\text{L}$  无血清培养基，37  $^{\circ}\text{C}$  平衡过夜。 $1 \times 10^5$  个细胞加入 Transwell 小室上室，在 37  $^{\circ}\text{C}$ ，5 %  $\text{CO}_2$  孵育 48 h 后，取出小室，用棉签擦去上室的细胞，4 % 多聚

甲醛固定 15 min，PBS 洗涤 1 次，结晶紫染色 10 min，PBS 洗涤 1 次，拍照统计，后用酶标仪测定 OD 570 吸光值。

1.6.5 血管形成实验 Matrigel 从 -20  $^{\circ}\text{C}$  取出，4  $^{\circ}\text{C}$  溶解过夜，加入 48 孔板每孔 150  $\mu\text{L}$  Matrigel，使其均匀铺满板底，观察无气泡后，放入 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱 2 h 以上，使 Matrigel 凝固。消化 HUVEC，分别用对照组、空白血清组和含药血清组条件培养基重悬，每孔加入 200  $\mu\text{L}$   $2 \times 10^4$  个细胞，4 ~ 6 h 后观察血管形成情况。

1.6.6 拟态血管形成实验 Matrigel 处理同上，采用 48 孔板每孔加入 Matrigel 并凝固。每孔加入 200  $\mu\text{L}$  即  $2 \times 10^4$  个 HepG2SG 细胞，分组为对照组、空白血清组和含药血清组，处理同前，4 ~ 6 h 后观察血管形成情况，可延长培养时间至 3 ~ 5 d。

### 1.7 统计学方法

采用 SPSS 24.0 软件进行数据处理，计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示，采用  $t$  检验，计数资料用百分比表示，采用  $\chi^2$  检验， $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 新制攻积丸含药血清对 HepG2SG 细胞增殖抑制的影响

空白血清组与对照组比较，差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )；含药血清各浓度组较对照组和空白血清组抑制率均显著升高，差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；同浓度含药血清大小剂量组间比较，差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，见表 1。其余实验结果均为  $0.42 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  含药血清干预。

表 1 新制攻积丸含药血清对 HepG2SG 的抑制作用 ( $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	浓度 %	OD 450 吸光值	增殖抑制率 / %
对照组		2.12 $\pm$ 0.02	0.00 $\pm$ 0.01
空白血清组	10.0	2.00 $\pm$ 0.13	0.06 $\pm$ 0.06
0.42 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 含药血清组	2.5	1.81 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
	5.0	1.68 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
	10.0	1.47 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
	15.0	1.08 $\pm$ 0.06	0.49 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
	20.0	0.74 $\pm$ 0.04	0.65 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
0.84 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 含药血清组	2.5	1.79 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01 <sup>bd</sup>
	5.0	1.56 $\pm$ 0.06	0.26 $\pm$ 0.03 <sup>bd</sup>
	10.0	1.25 $\pm$ 0.06	0.41 $\pm$ 0.03 <sup>bc</sup>
	15.0	0.98 $\pm$ 0.05	0.54 $\pm$ 0.02 <sup>bd</sup>
	20.0	0.62 $\pm$ 0.02	0.71 $\pm$ 0.01 <sup>bc</sup>

注：与对照组和空白血清组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与对照组、空白血清组比较，<sup>b</sup> $P < 0.01$ ；与 0.083  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  含药血清组同浓度比较，<sup>c</sup> $P < 0.001$ ，<sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.2 Western blot 检测新制攻积丸含药血清对血管形成相关蛋白的影响

结果显示 10 % 含药血清可显著下调 CD44、VE-cadherin、Twist1、TGF $\beta 2$  和 Vimentin 的表达，分别较

对照组和空白血清组显著降低，差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )，见表 2。

表 2 新制攻积丸含药血清对血管形成相关蛋白的影响 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别	CD44/GAPDH	VE-cadherin/GAPDH	Twist1/GAPDH	TGFβ2/GAPDH	Vimentin/GAPDH
对照组	0.69 ± 0.03	0.55 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.48 ± 0.02	0.61 ± 0.01
空白血清组	0.72 ± 0.03	0.55 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.52 ± 0.02	0.63 ± 0.01
含药血清组	0.36 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.46 ± 0.01 <sup>e</sup>	0.34 ± 0.01 <sup>e</sup>	0.38 ± 0.01 <sup>e</sup>	0.21 ± 0.03 <sup>e</sup>

注：VE-cadherin — 血管内皮钙黏蛋白；Vimentin — 波形蛋白；TGFβ2 — 转化生长因子 β2；Twist1 — 扭曲相关蛋白 1。与对照组和空白血清组比较，<sup>e</sup> $P < 0.01$ 。

### 2.3 Transwell 检测新制攻积丸含药血清对 HepG2SG 细胞侵袭能力的的影响

结果显示 10 % 新制攻积丸含药血清可显著减少 HepG2SG 细胞的侵袭，其侵袭细胞数较对照组和空白血清组显著减少，差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ )，见表 3。

表 3 新制攻积丸含药血清对 HepG2SG 细胞侵袭的影响 ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

组别	HepG2SG 细胞侵袭
对照组	210.99 ± 4.68
空白血清组	206.70 ± 6.62
含药血清组	151.27 ± 4.56 <sup>f</sup>

注：与对照组和空白血清组比较，<sup>f</sup> $P < 0.001$ 。

### 2.4 划痕实验检测新制攻积丸含药血清对 HepG2SG 细胞迁移的影响

10 % 新制攻积丸含药血清可抑制 HepG2SG 细胞迁移，其迁移率较对照组和空白血清组显著降低，差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ )，见表 4。

表 4 新制攻积丸含药血清对 HepG2SG 细胞迁移率的影响 ( $n = 4, \bar{x} \pm s, \%$ )

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0 ± 0.03	0.40 ± 0.01	0.54 ± 0.03	1.00 ± 0.00
空白血清组	0 ± 0.04	0.42 ± 0.01	0.58 ± 0.00	1.00 ± 0.00
含药血清组	0 ± 0.02	0.29 ± 0.01 <sup>g</sup>	0.37 ± 0.02 <sup>g</sup>	0.49 ± 0.02 <sup>g</sup>

注：与对照组和空白血清组比较，<sup>g</sup> $P < 0.001$ 。

### 2.5 新制攻积丸含药血清对 HUVEC 和 HepG2SG 细胞成管的影响

10 % 新制攻积丸含药血清可显著抑制 HUVEC 血管形成，并抑制 HepG2SG 细胞的血管生成拟态，其成管数分别较对照组和空白血清组明显减少，差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ )，见表 5。

表 5 新制攻积丸含药血清对 HUVEC 血管生成和 HepG2SG 血管生成拟态的影响 ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

组别	HUVEC 血管生成	HepG2SG 血管生成
对照组	17.25 ± 0.63	24.00 ± 1.15
空白血清组	14.82 ± 0.87	29.00 ± 2.94
含药血清组	5.90 ± 0.86 <sup>h</sup>	10.50 ± 1.73 <sup>h</sup>

注：HUVEC — 人脐静脉内皮细胞。与对照组和空白血清组比较，<sup>h</sup> $P < 0.001$ 。

## 3 讨论

在血管生成拟态阳性的肝癌组织，Vimentin 和 VE-cadherin 上调，而上皮钙粘蛋白 (E-cadherin) 下调，肝癌细胞间质化<sup>[7]</sup>，移行并与基质结合成为管状结构的 VM，其中肝癌细胞的上皮间质转换 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是血管生成拟态的前提之一。本文作者前期研究显示阴阳攻积丸可抑制肝癌细胞株的迁移侵袭，可能与抑制 Vimentin 表达，上调 E-cadherin 等 EMT 相关蛋白有关。本结果显示新制攻积丸同样具有类似作用，Vimentin 下调，HepG2SG 的迁移侵袭能力也较对照组和空白血清组显著下降，从而可能减少血管生成拟态。VE-cadherin 和 E-cadherin 属于钙黏蛋白家族，前者表达于正常内皮细胞，分布于内皮细胞连接处。在肝癌组织，VE-cadherin 与 E-cadherin 表达意义相反，VE-cadherin 阳性较 E-cadherin 阳性患者发生肝癌血管侵犯、肝癌 TNM 分期和 Edmondson 分级差的比例增加<sup>[8]</sup>。沉默 VE-cadherin 基因可显著抑制人 HCCLM3 高转移肝癌细胞株的增殖及迁移<sup>[9]</sup>。高侵袭性肿瘤细胞表达 VE-cadherin，通过磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) 信号通路促进血管生成拟态<sup>[10]</sup>。Twist1 是编码碱性螺旋-环-螺旋脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 结构域的转录因子，可诱导上皮间质转换，促进血管生成或 HepG2 细胞的血管生成拟态，维持肿瘤细胞干性<sup>[11]</sup>。Twist1 与 VE-cadherin 启动子结合上调后者表达，其后调节 β-catenin/TCF-4 通路促进黑色素瘤细胞的血管生成拟态<sup>[12]</sup>。新制攻积丸可同时降低 Twist1 与 VE-cadherin，从而减少肝癌相关的血管生成。

血管生成拟态多由高侵袭性的肿瘤细胞如肿瘤干细胞变形和基质重塑生成血管样通道。Serglycin 可上调 CD44 的表达，在三阴性乳腺癌细胞中，CD44 相关信号通路的激活可上调 TGFβ2 的表达和分泌，而 TGFβ2 又呈正反馈促进 SRGN 基因和蛋白表达，从而促进乳腺癌的转移<sup>[13]</sup>。Serglycin 和 CD44 都可促成肿瘤细胞干性，CD44 更是肝癌干细胞的重要标志物<sup>[14]</sup>。两者还可促进肿瘤细胞的上皮间质转换，从而有助于肿瘤细胞形成血管生成拟态。本研究显示新制攻积丸含药血清可下调

CD44 这一肝癌干细胞标志物和 TGF $\beta$ 2, 可能对抑制肝癌具有重要意义。

原发性肝癌诊疗规范所纳入的中医中药治疗部分主要包括五个中医证型: 肝郁脾虚、肝胆湿热、肝脾血瘀、肝肾阴虚和脾虚湿困; 中成药包括槐耳颗粒(证据等级 1) 和证据等级 4 的榄香烯、华蟾素、康莱特、康艾、肝复乐、金龙胶囊、艾迪、鸦胆子油和复方斑蝥胶囊<sup>[2]</sup>, 主要为扶正、活血两大类药物。惠友谊等分析了文献报道的 10 304 例患者, 气滞血瘀是原发性肝癌的基本病机, 肝、脾、气滞、瘀、气虚、湿、热为常见证素, 认为湿、热是本病的病机关键, 属寒证的脾肾阳虚仅占 0.36%<sup>[15]</sup>。但肿瘤本就阴阳交错、寒热错杂, 肝癌因有阴黄一症, 古代医家更是强调肝积的寒证属性。李中梓积聚的理论基础来源于《黄帝内经·灵枢·百病始生》: “积之所生, 得寒乃成, 厥乃成积”, 并受《难经》启发: “肝之积名曰肥气, 在左肋下, 如覆杯, 令人呕逆, 或两胁痛引小腹, 足寒转筋”, 表明寒邪是肝积的一大病理因素。

《东垣试效方》卷二的肥气丸专治肝积, 药物组成包括皂角、炮川乌、干姜、巴豆霜、茯苓等, 也是阴阳攻积丸中的药味<sup>[16]</sup>。如果肝癌经长期清热解毒, 仍有病情反复甚至加重, 应酌情考虑“大方复治, 反激逆从”之法, 阴阳攻积丸即属于此类疗法<sup>[17]</sup>, 且李中梓强调阴阳攻积丸治疗可以“不论阴阳”。本实验的结果也显示西医肿瘤血管生成的病理与中医血瘀证以及活血类药物并非一一对应, 以化痰散积为主的药物亦可干预肿瘤血管生成, 中药的作用机制需要实验和临床的不断验证。

两种剂量的新制攻积丸给予大鼠灌胃获得的干预结果显示, 该方含药血清呈浓度依赖性抑制 HepG2SG 生长。由于经费有限, 本研究未能将阴阳攻积丸作为对照组纳入随后的实验步骤, 亦未能研究新制攻积丸是否可干预体内肿瘤血管生成, 这是本文的不足之处。

#### [参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209-249.
- [2] 中华人民共和国国家卫生健康委医政司. 原发性肝癌诊疗指南(2024年版) [J]. 中国临床医学, 2024, 31 (2): 277-334.
- [3] ZHANG C H, CHENG Y, ZHANG S, et al. Changing epidemiology of hepatocellular carcinoma in Asia [J]. Liver International, 2022, 42 (9): 2029-2041.
- [4] 李永伟, 谢和平, 陈鸿杰, 等. 阴阳攻积丸含药血清抑制 HepG2 细胞增殖、侵袭及促进其凋亡的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (2): 28-34.
- [5] 刘秋雨, 连增林. 中药干预乳腺癌血管生成双途径研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24 (2): 120-126.
- [6] 李怡帆, 李娟, 卢雯平. 益气活血解毒方对小鼠卵巢癌 ID-8 细胞株增殖及血管生成过程的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24 (4): 154-159.
- [7] ZHANG J G, ZHOU H M, ZHANG X, et al. Hypoxic induction of vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma: role of HIF-1 $\alpha$ , RhoA/ROCK and Rac1/PAK signaling [J]. BMC Cancer, 2020, 20 (1): 32.
- [8] 王修军, 荚卫东, 许戈良, 等. 肝细胞癌组织中 E-cadherin、VE-cadherin 的表达变化及意义 [J]. 山东医药, 2012, 52 (2): 65-66.
- [9] 陈贝, 井申荣, 王玲, 等. 沉默血管内皮钙黏蛋白基因对人高转移肝癌 HCCLM3 细胞增殖及迁移的影响 [J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30 (10): 1028-1032.
- [10] HENDRIX M J, SEFTOR E A, SEFTOR R E, et al. Tumor cell vascular mimicry: novel targeting opportunity in melanoma [J]. Pharmacol Ther, 2016, 159 (1): 83-92.
- [11] 陈立伟, 张雨晨, 王子秋, 等. TWIST1 蛋白与肿瘤 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 33 (12): 1221-1228.
- [12] DELGADO-BELLIDO D, ZAMUDIO-MARTÍNEZ E, FERNÁNDEZ-CORTÉS M, et al. VE-Cadherin modulates  $\beta$ -catenin/TCF-4 to enhance Vasculogenic Mimicry [J]. Cell Death Dis, 2023, 14 (2): 135.
- [13] ZHANG Z, DENG Y, ZHENG G, et al. SRGN-TGF $\beta$ 2 regulatory loop confers invasion and metastasis in triple-negative breast cancer [J]. Oncogenesis, 2017, 6 (7): e360.
- [14] GUO J C, YANG Y J, ZHANG J Q, et al. microRNA-448 inhibits stemness maintenance and self-renewal of hepatocellular carcinoma stem cells through the MAGEA6-mediated AMPK signaling pathway [J]. J Cell Physiol, 2019, 234 (12): 23461-23474.
- [15] 惠友谊, 薛敬东, 高改娅, 等. 原发性肝癌中医证型及证素的文献研究 [J]. 世界中医药, 2023, 18 (3): 401-405.
- [16] 邹增城, 李永伟. 试从古方阴阳攻积丸的研究探讨从痰论治原发性肝癌 [J]. 内蒙古中医药, 2023, 42 (3): 91-94.
- [17] 曹璐畅, 许博文, 李杰. 基于“反激逆从”探讨肿瘤病证治思路 [J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48 (9): 67-70.