

# 肠复康对人大肠癌 HT-29 细胞增殖的影响及作用机制研究

刘碧清<sup>1</sup>, 熊绍权<sup>2</sup>, 王柏丁<sup>3</sup>

**Influence and Mechanism of Changfukang on Human Large Intestine Cancer HT-29 Cell Proliferation**

LIUBi-qing, XIONGShao-quan, WANGBai-ding

1. Department of Tumor, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China; 2. Department of Internal Medicine, 8670 Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Force; 3. 2003 Grade of Doctoral Postgraduate, Clinical Medical College, Sichuan University

**Abstract: Objective** To investigate the influence of Chinese Compound Recipe Changfukang on human large intestine cancer cell proliferation and explore its mechanism. **Methods** Model nude mouse of transplantation tumor of human large intestine cancer HT-29 were established. The low, medium and high dose groups of Changfukang were set up. Eight weeks after medication, the tumor weight, inhibition rates and pathological changes of each group were compared. The number of positive Ki-67 cells and the integrated optical density of vascular endothelial growth factor (VEGF) were semi-quantitatively measured by immunohistochemical staining methods combined with a gene analysis system. **Results** The inhibition rate of 33.13%, 47.26% and 66.01% in the low, medium and high dose groups of Changfukang. The carcinon quantity of transplantation tumor was fewer, the cell and carcinon morphology was more regular in each Changfukang group. The number of positive Ki-67 cells and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in each Changfukang group were all lower than that in the blank group. **Conclusion** Changfukang has the function of anti-proliferation of transplantation tumor of human large intestine cancer HT-29, the mechanism may be correlated with its promotion of cancer cell differentiation and its inhibition of the expression of VEGF.

**Keywords:** Traditional Chinese medicine; Changfukang; Large intestine cancer; Nude mouse; Proliferation

**摘要:**目的 研究中药复方肠复康对人大肠癌细胞增殖的影响及探讨其作用机制。方法 建立人大肠癌 HT-29 裸鼠移植瘤模型。设立肠复康低、中、高剂量组和空白组。给药 8 周后比较瘤重、抑瘤率及病理变化。免疫组化染色结合图像分析系统半定量检测移植瘤 Ki-67 阳性细胞数和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的积分光密度。结果 肠复康低、中、高剂量组抑瘤率分别为 33.13%、47.26%、66.01%。肠复康各组移植瘤细胞核数量较少,细胞及细胞核形态更加规则。肠复康各组 Ki-67 阳性细胞数及 VEGF 表达均低于空白组。结论 肠复康具有抗人大肠癌 HT-29 裸鼠移植瘤细胞增殖的作用,其机理可能与促进癌细胞分化及抑制 VEGF 的表达有关。

**关键词:** 中药;肠复康;大肠癌;裸鼠;增殖

中图分类号:R735.3 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2004)12-0759-03

## 0 引言

肠复康系成都中医药大学附属医院自研的复方制剂,临床及实验研究表明,治疗大肠癌疗效确切<sup>[1,2]</sup>。本实验从细胞增殖方面初步探讨肠复康作用及机理,报告如下:

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型

BALB/c-nu/nu 裸小鼠(由四川省抗菌素研究所动物房提供,合格证:川实动管第 90 号),4~6 周龄,体重 18~22g,在 SPF 条件下饲养。采用人大肠癌 HT-29 细胞株(由四川大学华西医院移植免疫室提供)。裸鼠腹背侧部皮下注射含  $5 \times 10^6$  癌细胞的悬液 0.5 ml,成瘤后用组织块套管针皮下移植为实体瘤。

### 1.2 药物及试剂

肠复康由鸦胆子、喜树果、人参、莪术等组成,按

收稿日期:2003-11-10;修回日期:2004-04-07

基金项目:四川省科技厅基金资助项目(01SY051-35)

作者单位:1.610072 成都中医药大学附属医院肿瘤科; 2. 武警 8670 部队医院内科;3. 四川大学博研 2003 级

有关工艺流程制成稠浸膏, 放于 4℃ 冰箱保存备用。Kf67(克隆号 C-20)、VEGF(克隆号 A-20)一抗均购自 SANTACRUZ 公司, 二抗、试剂盒及阳性对照片购自北京中山生物技术有限公司。

### 1.3 分组及给药

接种后第 6 天, 将裸鼠随机分为 4 组, 即: 空白对照组, 生理盐水 0.2 ml 灌胃。肠复康低、中、高剂量组, 分别配成 0.2 ml 灌胃。每组 8 只, 雌雄各半。

### 1.4 检测指标

1.4.1 瘤重、抑瘤率 移植分组后第 60 天(即末次给药后第 2 天), 处死裸鼠, 剥离瘤体后称重(W), 计算抑瘤率(I):  $I = (\text{对照组 } W - \text{治疗组 } W) / \text{对照组 } W \times 100\%$ 。

1.4.2 病理形态观察 瘤体经 10% 中性福尔马林固定 48h, 梯度酒精系列脱水, 石蜡包埋, 常规切片 3~5 $\mu$ m, HE 染色, 光镜下观察。

1.4.3 免疫组化检测 瘤体经包埋、切片后, 分别行免疫组化 Kf67、VEGF 染色, 具体步骤按试剂盒说明进行。

200 倍光镜下计数 5 个视野 Kf67 表达阳性的细胞总数, 求取每个视野平均数为 Kf67 值。选取每张切片中 VEGF 着色最明显的 10 个视野, 以 Mias-2000 图象系统采集图像并半定量检测染色阳性物质的积分光密度, 求取每视野的平均值, 表示该物质的含量。

### 1.5 统计方法

计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示。所有指标分析经 SPSS 11.0 统计软件包处理。

## 2 结果

2.1 各用药组抑瘤作用比较 见表 1。

表 1 各用药组抑瘤作用比较

| 组别      | 鼠数<br>(初/末) | 瘤重<br>(g)           | 抑瘤率<br>(%) |
|---------|-------------|---------------------|------------|
| 空白对照组   | 8/8         | 1.0213 $\pm$ 0.2339 |            |
| 肠复康高剂量组 | 8/7         | 0.3471 $\pm$ 0.0699 | 66.01      |
| 肠复康中剂量组 | 8/7         | 0.5386 $\pm$ 0.1107 | 47.26      |
| 肠复康低剂量组 | 8/7         | 0.6829 $\pm$ 0.2326 | 33.13      |

注: 与空白组比较  $P < 0.01$

实验过程中, 除空白组外, 各组均有 1 只裸鼠确因灌胃不当死亡。由表 1 可见, 肠复康抑瘤作用与剂量呈正相关趋势, 其中高剂量组抑瘤率达 66.01%。

2.2 各组移植瘤病理形态比较 见图 1、2。

镜下见空白组移植瘤中心有不同程度的坏死,

癌细胞丰富, 中等大小, 呈卵圆形、梭形、三角形及不规则形, 胞浆较少, 呈淡蓝色, 大多数细胞内有一个核, 部分细胞内有两个及以上核, 核中等, 核膜厚, 染色质丰富, 染色深, 核仁明显且大, 有 1~3 个, 核分裂多见; 肠复康组癌组织中心坏死程度减轻, 高剂量组更为明显, 癌细胞较大, 呈圆形、卵圆形, 少许呈梭形, 胞浆较丰富, 呈淡红色, 细胞内几乎只有一个核, 核偏大, 核膜变薄, 染色质少, 染色浅, 几乎呈空泡状, 核仁较明显、较大, 大多数只有 1 核仁, 核分裂可见。

2.3 各组移植瘤 Kf67、VEGF 表达比较, 见表 2 及图 3~6。

表 2 各组移植瘤 Kf67、VEGF 表达比较

| 组别      | 鼠数<br>(初/末) | Kf67 阳性细胞数           | VEGF 积分光密度                |
|---------|-------------|----------------------|---------------------------|
| 空白对照组   | 8/8         | 15.4750 $\pm$ 2.3002 | 11278482 $\pm$ 169235915  |
| 肠复康高剂量组 | 8/7         | 7.6714 $\pm$ 1.9500  | 75690716 $\pm$ 316513524  |
| 肠复康中剂量组 | 8/7         | 12.1714 $\pm$ 1.9268 | 855017090 $\pm$ 226158200 |
| 肠复康低剂量组 | 8/7         | 14.9714 $\pm$ 4.4112 | 93114153 $\pm$ 265739163  |

注: 与空白组比较  $P < 0.05$ , 与空白组比较  $P < 0.01$

镜下可见 Kf67 阳性物质着色于癌细胞核内, 并主要存在于有核分裂的细胞内, VEGF 主要表达在肿瘤细胞胞浆, 内皮细胞有部分表达。由图 3~6 及表 2 可知, 2 种物质的表达均以空白组最多, 肠复康各组表达明显较少。

## 3 讨论

目前认为, 恶性肿瘤是一种以分化障碍为特征的遗传性细胞过度、自律性增殖性疾病。抑制或降低肿瘤细胞的增殖活性, 是肿瘤治疗的基本策略之一。

本实验研究显示, 肠复康具有良好的抑制裸鼠移植瘤生长的作用, 各组瘤重均小于空白组, 其高剂量抑瘤率达 66.01%。病理观察发现, 肠复康可改善肿瘤细胞及细胞核的形态, 使其更加规则, 并使核仁数目及核内染色质减少, 这种形态变化符合国内外有关肿瘤细胞在部分化合物或生物活性物质的诱导下重新分化逆转的报道<sup>[3,4]</sup>。提示促进癌细胞分化逆转, 可能是肠复康的抑瘤机制之一。

Kf67 是一种细胞周期特异性抗原, 仅在增殖细胞周期的 G<sub>1</sub> 中期到晚期出现表达, 在 S 期和 G<sub>2</sub> 期逐渐增加, 在 M 期达到最高值, 其半衰期为 1h 或更短<sup>[5]</sup>。因此, Kf67 只在增殖细胞中表达, 其表达水平反映细胞的实际增殖程度。本实验显示, Kf67 表达以空白组最多, 而用药组明显减少, 再次提示肠复康具有降低大肠癌细胞增殖活性的作用。

文献报道<sup>[6-8]</sup>,多数恶性肿瘤细胞中不仅能检测到高水平的血管内皮生长因子 VEGF,而且抑制 VEGF 的表达后能显著抑制肿瘤细胞的生长,VEGF 不仅通过调节血管形成促进肿瘤生长,还可能通过自分泌促进肿瘤细胞自身的生长。本实验观察到肠复康可明显降低 VEGF 的含量,提示肠复康抑制移植瘤增殖的机制之一可能也通过减少癌细胞 VEGF 的生成而发挥作用。

综上,肠复康具有抑制人大肠癌 HT-29 裸鼠移植瘤细胞增殖的作用,其机制可能与抑制细胞增殖相关 Kf67 基因表达,及抑制癌细胞 VEGF 的表达有关。

(本文图见封 3)

参考文献:

[1] 吴雪梅,姚德蛟. 肠复康胶囊治疗原发性中晚期大肠癌近期疗效观察[J]. 成都中医药大学学报,2001,24 (2):12-13.  
 [2] 熊绍权,刘碧清,王柏丁,等. 肠复康胶囊治疗大肠癌临床疗效

探析[J]. 中药药理与临床,2003,19 (1):45-46.  
 [3] 艾兆伟,查锡良,陈惠黎. 视黄酸对人肿瘤细胞一些表型的逆转作用[J]. 中华肿瘤杂志,1991,13 (6):9-11.  
 [4] AiZW,ZhaXL,ChenHL.Effectofretinacidonhe pato-carcinoma cell line[J]. JTumorMarkerOncol,1990,26 (5):59-64.  
 [5] BrunoS,Darz ynkieviczZ.Celle cycle dependence of tyrosine phosphorylation of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in human cell lines[J]. CellProlif,1992,25 (1):31-40.  
 [6] MasoodR,CaiJ,Zheng T,etal.Vascularendothelial growth factor/vascular permeability factor is an autocrine growth factor for AIDS-Kaposi sarcoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1997,94 (3):979-984.  
 [7] ZhangW,RanS,SambadeM,etal.A monoclonal antibody that blocks VEGF binding to VEGFR2 (KDR/FLK-1) inhibits vascular expression of FLK-1 and tumor growth in an orthotopic human breast cancer model[J]. Angiogenesis,2002,5 (1-2):35-44.  
 [8] EmaM,FaloonP,Zhang WJ,etal.Combinatorial effects of Flk1 and Tumor necrosis factor- $\alpha$  on hematopoietic development in the mouse[J]. Genes Dev,2003,17 (3):380-393.

[编辑:贺文;校对:杨卉]

(上接第 755 页)

本研究的免疫组化结果显示,所有的 T24 细胞胞浆中均呈现不同程度的染色,而且随着 UTI 量的增多,T24 细胞胞浆染色明显减弱,说明 UTI 能抑制 T24 细胞 uPA 蛋白的分泌。同时半定量 RT-PCR 的检测结果表明,T24 细胞中 uPA mRNA 的水平在经过 UTI 处理后有显著的降低,进一步表明 UTI 能拮抗人移行细胞膀胱癌 T24 细胞 uPA 的表达并呈负的剂量效应关系,这与其他学者的研究结果是相符的<sup>[5]</sup>。Kobayashi 等<sup>[6]</sup>研究了 UTI 对人卵巢癌细胞 uPA mRNA 表达的影响,他发现 UTI 是通过阻断人卵巢癌细胞 PKC 及 MEK/ERK/c-Jun 依赖性信号传导途径从而达到抑制人卵巢癌细胞 uPA mRNA 表达的作用。这些研究都说明 UTI 在抑制肿瘤侵袭和转移过程起着重要的作用,同时也为膀胱肿瘤的治疗提供了新的参考方法和途径。当然,对 UTI 抑制膀胱肿瘤 uPA 表达的具体机制还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Kobayashi H, Sugino D, She MY, et al. A bifunctional hybrid

molecule of the amino-terminal fragment of urokinase and domain II of fibronectin inhibits tumor cell invasion and metastasis[J]. Eur J Biochem,1998,253 (3):817-826.  
 [2] Higazi A, Cohen RL, Henkin J, et al. Enhancement of the enzymatic activity of fibrinolytic chain urokinase plasminogen activator by soluble urokinase receptor[J]. J Biol Chem,1995,270 (29):17375-17380.  
 [3] 杨进益,李韶,周荣祥,等. 尿激酶型纤溶酶原激活物及其受体在膀胱移行细胞癌中表达的临床意义[J]. 中华泌尿外科杂志,2000,21 (8):465-466.  
 [4] Wei Y, Lukashev M, Simon DI, et al. Regulation of integrin function by the urokinase receptor[J]. Science,1996,273 (5281):1551-1555.  
 [5] Kobayashi H, Suzuki M, Sun GW, et al. Suppression of urokinase-type plasminogen activator expression from human ovarian cancer cells by urokinase-type plasminogen activator inhibitor[J]. Biochim Biophys Acta,2000,1481 (2):310-316.  
 [6] Kobayashi H, Suzuki M, Tanaka Y, et al. Suppression of urokinase-type plasminogen activator expression and invasiveness by urokinase-type plasminogen activator inhibitor mediated through inhibition of protein kinase C- $\alpha$  and MEK/ERK/c-Jun-dependent signaling pathways[J]. J Biol Chem,2001,276 (3):2015-2022.

[编辑:刘红武;校对:杨卉]

# PTEN 在肝细胞癌中的表达及其与 AKT 磷酸化的相关性研究

(正文见 748 页)

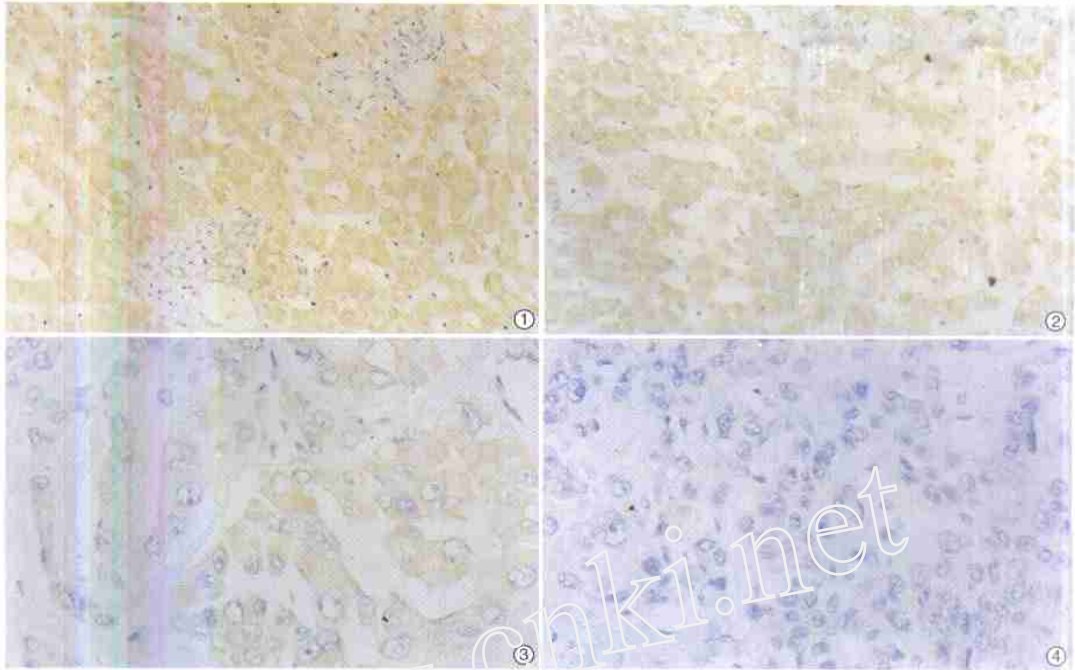


图1 PTEN 在肝硬变组织中的表达(SP, × 133)

图2 PTEN 在正常肝组织中的表达(SP, × 133)

图3 PTEN 在肝细胞癌组织中的表达(SP, × 267)

图4 PTEN 在肝细胞癌组织中的表达(SP, × 267)

# 肠复康对人大肠癌 HT-29 细胞增殖的影响及作用机制研究

(正文见 759 页)

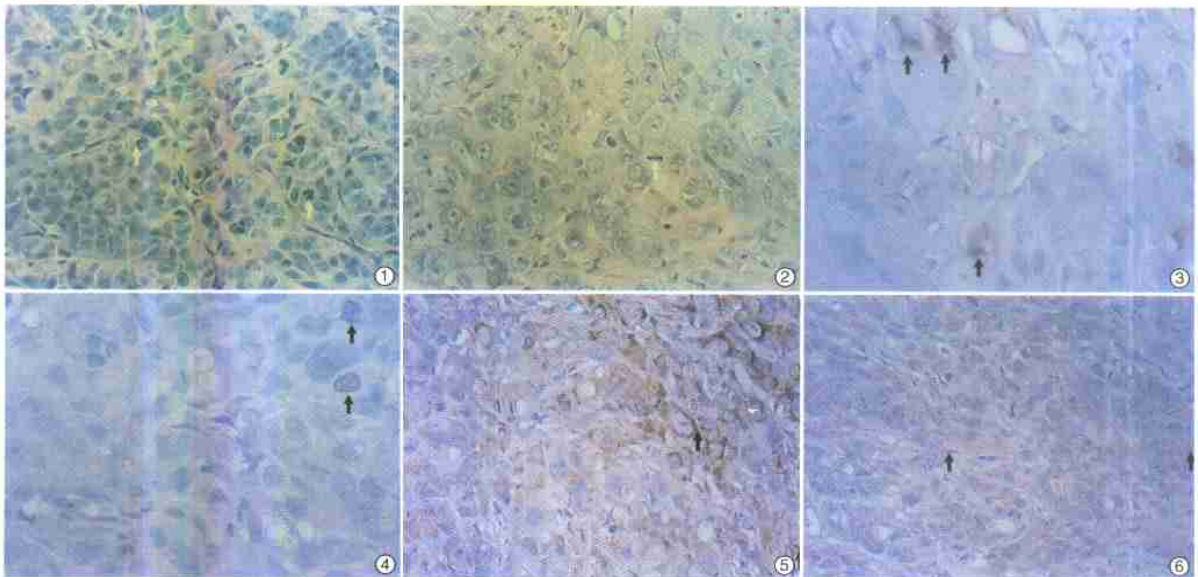


图1 空白组移植瘤 HE 染色 (× 200)

图2 肠复康高量组移植瘤 HE 染色 (× 200)

图3 空白组移植瘤 Ki-67 表达 (× 400)

图4 肠复康高量组移植瘤 Ki-67 表达 (× 400)

图5 空白组移植瘤 VEGF 表达 (× 200)

图6 肠复康高量组移植瘤 VEGF 表达 (× 200)