

# 复方斑蝥胶囊抑制血管新生的体内体外研究

许长青, 刘丹, 郭喆

武警北京总队第二医院, 北京 100037

**[摘要]** 目的: 通过体内和体外实验研究复方斑蝥胶囊对肿瘤血管新生相关因子的作用及可能机制。方法: 通过免疫印迹试验检测复方斑蝥胶囊对 HepG2 细胞中血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白表达的影响; 选择裸鼠移植性肝癌 (H-22) 荷瘤模型, 观察药物对荷瘤小鼠的抑癌作用, 并通过免疫印迹试验检测肿瘤组织中 VEGF 蛋白的表达情况。结果: 复方斑蝥胶囊对 HepG2 细胞中 VEGF 的表达呈浓度和时间依赖性; 复方斑蝥胶囊能够抑制 H-22 荷瘤小鼠肿瘤的生长, 并且肿瘤组织中 VEGF 的表达水平随着药物浓度升高而降低。结论: 复方斑蝥胶囊可能通过抑制肿瘤细胞 VEGF 的表达起到抑制肿瘤血管新生的作用。

**[关键词]** 复方斑蝥胶囊; 肿瘤; 血管新生; 血管内皮生长因子 (VEGF)

**[中图分类号]** R730.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 11-0211-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.11.093

复方斑蝥胶囊由斑蝥、人参、黄芪、刺五加、三棱、半枝莲、莪术、山茱萸、女贞子、熊胆粉和甘草组成<sup>[1]</sup>, 具有破血消瘀、攻毒蚀疮的功效, 临床上主要用于治疗原发性肝癌<sup>[2]</sup>、肺癌<sup>[3]</sup>、直肠癌<sup>[4]</sup>、恶性淋巴瘤和妇科恶性肿瘤<sup>[5]</sup>等。在恶性肿瘤研究中, 复方斑蝥胶囊可通过诱导细胞凋亡<sup>[6]</sup>、保护 DNA 损伤<sup>[7]</sup>等机制起到抗肿瘤作用。肿瘤的生长和转移依赖于血管新生, 通过抑制肿瘤组织血管的形成, 可以减缓肿瘤生长的速度, 并降低肿瘤浸润转移的发生率。但是, 复方斑蝥胶囊对肿瘤血管新生的作用目前尚未见报道, 因此本研究旨在探讨复方斑蝥胶囊抗肿瘤血管新生方面的作用及可能机制, 以期为临床应用提供更充分的理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 药品与试剂** 复方斑蝥胶囊; DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS) 购买于 Hyclone 公司; 血管内皮生长因子 (VEGF) 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

**1.2 细胞株和实验动物** HepG2 细胞株购买于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; 实验动物为昆明品系小鼠, 由北京实验动物研究中心提供, 体重 20~22 g; 移植性肝癌 (H-22) 荷瘤细胞株购买于中国医学科学院药物研究所。

**1.3 细胞培养与药物处理** HepG2 细胞培养于 FBS 体积分数为 0.1 的 DMEM 培养基中, 放置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、90% 相对湿度的培养箱中。待细胞密度生长至 70% 时, 将用培养基稀释过的复方斑蝥胶囊给药, 实验重复 3 次。

**1.4 动物实验** 将实验动物随机分为阳性对照组与复方斑蝥胶囊低、中、高 3 个剂量组, 每组 10 只昆明种小鼠。复方斑

蝥胶囊低、中、高剂量组灌胃剂量分别为 0.04 mg/g、0.2 mg/g、1.0 mg/g。阳性对照组同时以 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 灌胃。第 15 天, 在无菌条件下于小鼠右侧腋窝皮下接种 H-22 荷瘤细胞 5 × 10<sup>6</sup> 细胞 0.2 mL, 并继续灌胃 7 天。7 天后颈椎脱臼处死小鼠, 取出瘤体称重, 并测定各组瘤体组织中 VEGF 蛋白表达情况。

**1.5 免疫印迹试验 (Western blot)** 不同浓度药物 (0.1、0.5、2.5 μg/mL) 处理后的细胞用 0.1% PMSF RIPA 裂解液裂解, 13000 g 4℃ 离心 15 min 后取上清液; 定量称取肿瘤组织 0.1 g, 剪碎加入裂解液混合匀浆, 20000 g 4℃ 离心 30 min 后取上清液, 用 BCA 蛋白定量法进行定量。取 40 μg 的蛋白与缓冲液合并于 100℃ 条件下变性 10 min。5% 浓缩胶电泳 15 min, 10% SDS-PAGE 分离胶电泳 45 min, 250 mA 恒流进行转膜, 脱脂牛奶封闭 1 h, 4℃ 分别过夜孵育 VEGF、GAPDH 一抗稀释液 (1: 1000), 然后 TBST 缓冲液清洗后室温孵育 VEGF、GAPDH 二抗稀释液 (1: 1000) 1 h。TBST 缓冲液稀释后发光液浸泡 3 min 后显影。

**1.6 统计学方法** 采用 SPSS 软件进行数据处理。结果以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 两组之间比较采用 *t* 检验, 多组之间比较采用 one-way ANOVA 检验, 组内两两比较采用 LSD 检验。

## 2 实验结果

**2.1 复方斑蝥胶囊与 HepG2 细胞孵育不同时间 VEGF 表达情况** 如图 1 所示, 随着复方斑蝥胶囊 (0.5 μg/mL) 与 HepG2 细胞孵育时间的延长, 细胞内 VEGF 蛋白表达不断下降, 在 24、28 h VEGF 蛋白表达水平与对照组相比, 差异均有统计学意义

[收稿日期] 2015-06-25

[作者简介] 许长青 (1973-), 男, 硕士, 主管药师, 主要从事医院药学工作。

( $P < 0.05$ )。结果提示复方斑蝥胶囊能够抑制细胞内 VEGF 的表达并呈时间依赖性。

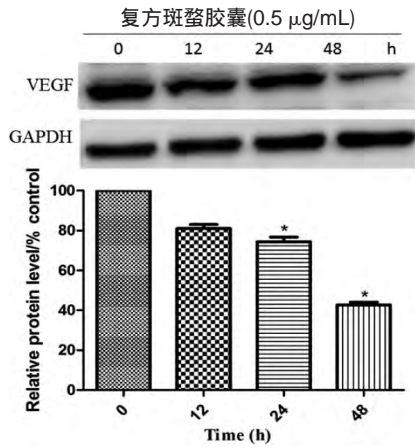


图 1 复方斑蝥胶囊与 HepG2 细胞孵育不同时间 VEGF 表达情况 (\* $P < 0.05$ )

2.2 不同浓度复方斑蝥胶囊与 HepG2 细胞孵育 48 h 后 VEGF 表达情况 结果如图 2 所示, 与对照组相比, 随着复方斑蝥胶囊剂量的增加, VEGF 蛋白表达明显降低并差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 说明复方斑蝥胶囊可以抑制细胞内 VEGF 的表达, 并呈剂量依赖性。

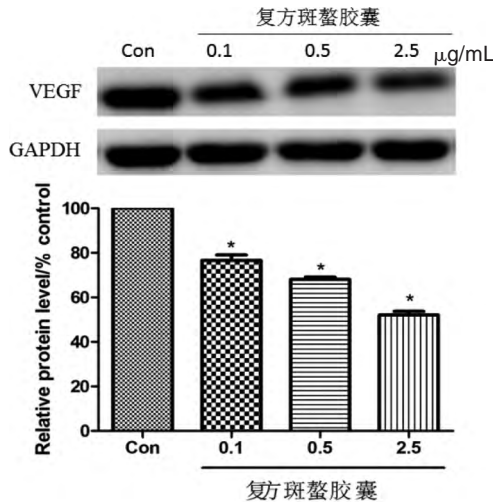


图 2 不同浓度复方斑蝥胶囊与 HepG2 细胞孵育 48 h 后 VEGF 表达情况 (\* $P < 0.05$ )

2.3 复方斑蝥胶囊对 H-22 荷瘤小鼠肿瘤组织 VEGF 表达的影响 复方斑蝥胶囊能够抑制肿瘤的生长, 如表 1 所示, 复方斑蝥胶囊各剂量组小鼠的肿瘤重量均低于对照组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。如图 3 所示, 小鼠肿瘤组织 VEGF 表达与对照组相比显著下降, 并呈浓度依赖性, 复方斑蝥胶囊浓度越高, VEGF 表达水平越低。

组别	剂量(mg/g)	n	瘤重
对照组	-	10	3.56 ± 0.43
复方斑蝥胶囊低剂量组	0.04	10	2.03 ± 0.46
复方斑蝥胶囊中剂量组	0.20	10	1.65 ± 0.57
复方斑蝥胶囊高剂量组	1.00	10	1.16 ± 0.52

与对照组比较, ① $P < 0.05$

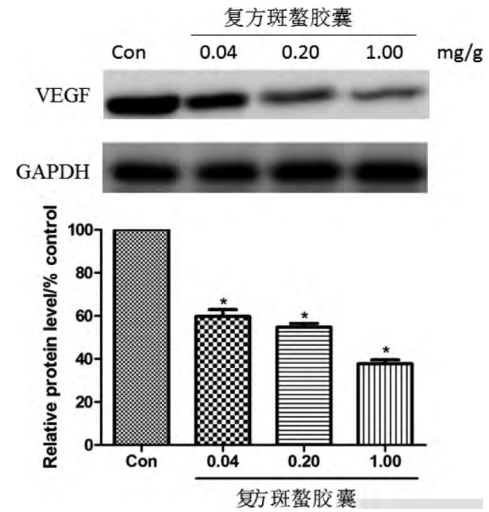


图 3 复方斑蝥胶囊对 H-22 荷瘤小鼠肿瘤组织 VEGF 表达的影响 (\* $P < 0.05$ )

### 3 讨论

血管新生在机体的多种生理、病理过程中有着重要的作用, 它是指从已有的毛细血管或毛细血管后静脉发展而形成新的血管, 主要包括: 激活期血管基底膜降解; 血管内皮细胞的激活、增殖、迁移; 重建形成新的血管和血管网, 是一个涉及多种细胞的多种分子的复杂过程<sup>[7]</sup>。癌细胞的生长、转移依赖新生血管的形成, VEGF 是最有效的促血管生长因子<sup>[8]</sup>, 也是研究的热点。

复方斑蝥胶囊以斑蝥为君药, 三棱、莪术为臣药, 半枝莲、熊胆粉为佐药, 具有破血消癥、攻毒蚀疮的功效, 临床上用于各种肿瘤的治疗<sup>[9]</sup>。研究也已经证实, 复方斑蝥胶囊对不同肿瘤的发生发展都有一定的治疗作用, 但是其抗肿瘤机制未得到深入研究。本研究发现复方斑蝥胶囊可有效抑制肿瘤血管新生, 药物通过抑制 VEGF 的表达起到抗肿瘤作用。但是众所周知, 同一药物在不同疾病或不同剂量时发挥的作用也不尽相同。本研究就复方斑蝥胶囊作用于血管新生的调控因子展开研究, 但是具体是哪一种或者哪几种成分的作用, 需要展开深入研究。此外, 中药影响血管新生的机制十分复杂, 并非通过单一途径发挥作用, 而是多个环节、多个因素、多个靶点协同作用的结果, 本研究针对的是研究相对成熟的调控因子和通路进行的实验, 全面系统地说明复方斑蝥胶囊抗肿瘤机制也是今后

研究的一个重要方向。

#### [参考文献]

- [1] 李碧青, 邹燕, 张晓娟, 等. 复方斑蝥胶囊药效学研究[J]. 现代医院, 2008, 8(3): 58-59.
- [2] 陈军, 陈典. 复方斑蝥胶囊联合三维适形放疗治疗中晚期原发性肝癌临床观察[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(1): 114-116.
- [3] 龙谦, 刘迪, 唐维娟. 肺癌术后化疗联合服用复方斑蝥胶囊的临床观察[J]. 内蒙古中医药, 2013, 32(19): 10-11.
- [4] 白燕, 胡丽. 复方斑蝥胶囊联合化学治疗转移性结肠癌的临床观察[J]. 西部医学, 2013, 25(7): 1017-1019.
- [5] 董毅. 复方斑蝥胶囊联合化疗治疗中晚期恶性肿瘤的疗效观察[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2012, 19(4): 367-368.
- [6] 杨军, 丁敏, 张太君, 等. 复方斑蝥胶囊抑制人肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖和诱导凋亡的实验研究[J]. 中成药, 2007, 29(5): 772-774.
- [7] 陈荣荣, 郭浩, 徐砚通, 等. 中药复方和有效成分对血管新生促进或抑制作用的研究进展[J]. 中草药, 2013, 44(23): 3413-3421.
- [8] 曹亚, 朱小立, 赵婧, 等. 肿瘤标志蛋白的电化学分析[J]. 化学进展, 2015, 27(1): 1-10.

(责任编辑: 吴凌)

## ◆文献研究论著◆

# 温阳法治疗中风概述

陈海峰<sup>1</sup>, 胡跃强<sup>2</sup>, 甘业贤<sup>1</sup>, 毛丹凤<sup>1</sup>

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001; 2. 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁 530001

[关键词] 中风; 温阳法; 扶阳学派

[中图分类号] R255.2 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2015) 11-0213-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.11.094

中风又名卒中, 是古代文献中记载的四大疑难病证风、劳、鼓、膈之一, 是由于阴阳失调, 气血逆乱, 上犯于脑所引起的, 以卒然昏仆, 不省人事, 半身不遂, 口眼歪斜, 语言不利, 偏身麻木为主要表现的一种病症。中风的发生主要与风、火、痰、瘀、虚等因素有关。临床治疗多以平肝熄风、益气活血、醒脑开窍、化痰通腑、化痰通络等为法, 近年来, 随着扶阳学派的兴起, 运用温阳法治疗中风病获得大多数医家的关注, 其疗效亦经临床检验而获得肯定。

### 1 温阳法治疗中风的理论探源

1.1 阴阳为纲, 阳主阴从 《素问·生气通天论》曰: “阳气

者, 若天与日, 失其所, 则折寿而不彰。” “阴阳之要, 阳密乃固”, 无不强调强调了阳气的重要性。后世医家张仲景由《内经》思想启发, 明确提出“阳非有余”的观点, 并指出: “天之大宝, 只此一丸红日; 人之大宝, 只此一息真阳”, 并重视阳气在疾病发展过程中的支配作用。直至清代四川著名火神派医家郑钦安及包括嫡传弟子卢氏一门(卢铸之、卢永定、卢崇汉)等, 发展并形成鲜明的扶阳思想, 其言: “人身立命, 在于以火立极; 治病立法, 在于以火消阴”, 认为“病在阳者, 扶阳抑阴; 病在阴者, 用阳化阴”。郑氏的扶阳思想为后世扶阳派的发展奠定了基础。

[收稿日期] 2015-04-20

[基金项目] 广西高等学校优秀中青年骨干教师培养工程资助成果 (JS13069)

[作者简介] 陈海峰 (1989-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合脑血管病。

[通讯作者] 胡跃强, E-mail: 137463195@qq.com。