

压^[6,7],目前认为 ENaC 基因可能与 EH 的发生也密切相关。

本研究临床资料显示, EH 组研究对象的 K^+ 、 Na^+ 水平均显著高于 NT 组,而 Na^+/K^+ 水平则较 NT 组显著降低,与以往研究显示的血压水平与 Na^+ 、 Na^+/K^+ 水平呈正相关,而与 K^+ 水平呈负相关的报道不一致^[8,9]。血压与电解质间的关系相当复杂,除与遗传、神经体液因素相关外,人及动物实验研究均表明 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等在其吸收与排泄、胞膜转运及细胞内浓度的稳定方面存在复合作用, K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 能拮抗 Na^+ 的升压作用;盐的摄取和排泄常因气温、出汗而不同;血压波动也受心理活动、姿势、气候等影响,故电解质与血压的真正关系常被掩盖。本研究采用 PCR-RFLP 技术,检测到 T3593C 多态的 TT、TC、CC 3 种基因型,证实哈萨克族人存在 T3593C 多态性,其中等位基因频率 T 为 0.94, C 为 0.06, 低于汉族人的 0.111。本研究结果显示,新疆哈萨克族人高血压组和正常对照组间 T3593C 多态基因型和等位基因的分布频率无显著性差异。比较不同基因型研究对象间的血压、血电解质,均未见统计学差异。提示 T3593C 多态性可能不是该民族高血压发生的遗传因素。分析本结果产生的原因认为:①本研究的 T3593C 位于内含子区域,其变异可能不会引起基因功能发生改变,从而不会影响其所编码的蛋白质的功能、表达和稳定性而使临床表型或中间表型发生改变;②我们只通过较少量的样本研究了 α ENaC 基因第 2 内含子区域 T3593C 多态性与新疆哈萨克族 EH 间的相关性;③在此单体型板块中与本

研究位点存在连锁不平衡关系的其他共同遗传的未知的变异位点可能与高血压的发生也无关联。

参考文献

- 1 Canessa CM, Schild L, Bueu G, *et al.* Amiloride-sensitive epithelial Na^+ channel is made of three homologous subunits[J]. *Nature*, 1994, 367:463-467
- 2 McDonald FJ, Price MP, Snyder PM, *et al.* Cloning and expression of the β - and γ -subunits of the human epithelial sodium channel[J]. *Am J Physiol*, 1995, 268: c1157-c1163
- 3 汪师贞, 马依彤, 程祖亨, 等. 限制哈萨克族高血压患者盐摄入量的降压效应观察[J]. *中国慢性病预防与控制*, 1994, 2:167-169
- 4 张月明, 徐臻荣, 贝仁礼. 新疆不同民族膳食特点与高血压的关系[J]. *营养学报*, 1982, 4:315-321
- 5 Strazzullo P, Galletti F, Barba G. Altered renal handling of sodium in human hypertension. Short review of the evidence[J]. *Hypertension*, 2003, 41:1000-1005
- 6 Furuhashi M, Kitamura K, Mdachi M, *et al.* Liddle's syndrome caused by a novel mutation in the proline-rich PY motif of the epithelial sodium channel beta-subunit[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90:340-344
- 7 Edelheit D, Hanukoglu I, Gizewska M, *et al.* Novel mutations in epithelial sodium channel (ENaC) subunit genes and phenotypic expression of multisystem pseudohypoaldosteronism[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2005, 62:547-553
- 8 赵光胜. 微量、常量元素和高血压的研究—多因子逐步分析[J]. *中华心血管病杂志*, 1980, 8(4):211-213
- 9 黄大显. 钠、钾、钙、镁与血压调节机制的流行病学[J]. *中国人民解放军军医进修学院学报*, 1987, 8(3):203-206

(收稿:2010-01-20)

(修回:2010-04-07)

中药水蛭素对荷瘤鼠 Ki-67 与 VEGF 表达的影响

任青华 牟忠祥 耿延君 张博 李焱 任海全

摘要 目的 分析 Ki-67 增生抗原与 VEGF 细胞因子在荷瘤鼠组织中的表达,探讨其与肿瘤的内在关系。**方法** 取小鼠 48 只,随机分成 4 组,左前腋下接种 H_{22} 肝癌瘤细胞 0.2 毫升/只。连续用药水蛭素,第 15 天处死动物,剥离肿块称重。同时取荷瘤鼠肿块组织固定、包埋、切片、染色、孵育、滴加抗体等,用免疫组化法检测 Ki-67 增生抗原与 VEGF 细胞因子的表达。Ki-67 阳性表达定位于细胞核,VEGF 阳性表达定位于细胞质。**结果** Ki-67 与 VEGF 模型对照组呈强阳性;水蛭素大剂量组呈弱阳性;水蛭素小剂量组呈阳性。**结论** 水蛭素能抑制荷瘤鼠肝癌实体瘤 Ki-67 增生抗原与 VEGF 细胞因子的高表达,具有明显的抗肿瘤作用,这与中药水蛭素活血化瘀及强大的抗凝血功效有密切关系。

基金项目:山东省中医药现代化重大科技专项基金(2008GG2NS02023)、山东省自然科学基金(Y2006C62)

作者单位:200062 济南,山东省医学科学院(任青华、张博、李焱、任海全);山东省中医院(牟忠祥);山东省平原县第一人民医院(耿延君)

关键词 中药水蛭素 H₂₂肝癌实体瘤 Ki-67 增生抗原 VEGF 细胞因子

The Effect of CMH on the Expression of Ki-67 Gene and VEGF in Mice. Ren Qinghua, Mu Zhongxiang, Geng Yanjun, Zhang Bo, Li Yan, Ren Haiquan. Shandong Medical College, Shandong 200062, China

Abstract Objective To analyze the expression of Ki-67 proliferation antigen and the VEGF in the tumor-bearing mice organization, and to explore its intrinsic relationship with the tumor. **Methods** 48 mice were randomly divided into four groups. 0.2ml of H₂₂ liver tumor cell was transplanted into the left armpit of every mice. CMH was used continuously, and animals were killed at the 15th days. Then tumour was stripped and weighed. The tumor-bearing mice's tumour organization was simultaneously taken to be fixed, embedded, sliced, dyed, fostered, added by antibody. The expression of Ki-67 gene and VEGF was detected by immunohistochemistry. The positive expression of Ki-67 was located in the nucleus, and VEGF expression in the cytoplasm. **Results** Ki-67 and VEGF showed strong positive relation in model control group, showed weak positive in high-dose hirudin group, and showed positive in low-dose group of hirudin. **Conclusion** Hirudin can inhibit the high expression of Ki-67 proliferation antigen and VEGF of the tumor-bearing mice liver cancer solid tumor. CMH has obvious inhibition of tumor, which has the direct relation with CMH's Huoxuehuayu and powerful anti-clotting effect.

Key words CMH; H22 liver cancer solid tumor; Ki-67 proliferation antigen; VEGF

水蛭为环节动物水蛭科蚂蟥宽体金线蛭 (*whitmania pagra whitman*) 的全体, 其味辛咸, 归肝经, 具有抗血栓、抗 DIC、抗血小板聚集的作用, 广泛用于临床治疗各种疑难病症, 且无明显的不良反应。水蛭素是中药水蛭的活性成分, 一种多肽类蛋白。现代医学研究表明, 水蛭素是一种强有力的抗凝素^[1], 含有凝血酶抑制剂, 能显著地降低血液黏度, 中和凝血酶元, 促进血液循环。本研究证实, 中药水蛭素能抑制荷瘤鼠 H₂₂ 肝癌实体瘤 Ki-67 增生抗原与 VEGF 细胞因子的高表达, 具有明显的抗肿瘤作用。

材料与方法

1. 材料: (1) 动物: 昆明种健康小白鼠, 雄性、体重 22 ± 0.5g, 山东省实验动物中心提供。合格证书: 动管质字 (2006) 第 0179 号。(2) 瘤株: H₂₂ 肝癌瘤细胞, 山东省医学科学院药物研究所提供。(3) 药品: FU, 50 毫克/片, 上海第一药厂生产, 批号: 050826。水蛭素, 山东省医学科学院基础医学研究所提供。(4) 试剂: Ki-67 抗体及 VEGF 抗体, 美国 R&D Systems 公司提供。(5) 仪器: HK-II 型扭力天平, 江苏无锡科技材料公司生产。进口冷冻切片机, 日本麻省 BDD 公司生产。

2. 方法: (1) 水蛭素对 H₂₂ 肝癌实体瘤的影响: ① 动物分组: 取小鼠 48 只, 随机法分成 4 组, 每组 12 只; 模型对照组 (阴性对照组)、阳性对照组、水蛭素大剂量组、水蛭素小剂量组; ② 动物用药: 取传代 6~9 天、生长良好的 H₂₂ 肝癌小鼠, 置超净工作台无菌打开小鼠腹腔, 抽取乳白色瘤液, 用生理盐水配制成细胞悬液, 含瘤细胞 2 × 10⁶/ml。各组小鼠皮肤消毒后, 左前腋下接种 H₂₂ 肝癌瘤细胞 0.2 毫升/只, 次日开始给药。模型对照组 (阴性对照组) 给予同体积的生理盐水; 阳性对照组给予 5-FU 0.15g/kg; 中药大剂量组给予水蛭素 2.60g/kg; 中药小剂量组给予水蛭素 1.30g/kg。每日灌胃 1 次, 每次 0.50ml, 连续给药 14 天, 于第 15 天处死动物, 剥离肿

块置扭力天平上称重, 比较各组肿瘤生长情况, 并计算抑瘤率 ($\frac{C-T}{C} \times 100$)。同时取荷瘤鼠肿块组织检测 Ki-67 增生抗原以及 VEGF 细胞因子的表达。(2) 水蛭素对 Ki-67 表达的影响: ① 免疫组化: 将剥离的肿瘤组织固定于甲醛溶液中, 石蜡包埋、切片, 分别 HE 及免疫组化。二甲苯脱蜡, 乙醇水化, 微波抗原修复, 非特异性着色, 室温下孵育, 漂洗, 分别滴加 Ki-67 抗体, 孵育, 漂洗, 滴加 DAB 显色, 流水冲洗, 苏木精复染, 乙醇脱水透明并封片。每例标本均用 PBS 代替一抗做阴性对照; ② 阳性细胞观察: Ki-67 阳性表达定位于细胞核, 其阳性细胞染色呈棕褐色。高倍镜下随机观察 5 个视野, 每个视野计数 200 个细胞, 阳性细胞占肿瘤细胞数的多少分为: 细胞核内未见染色颗粒为阴性 (-); 细胞核内棕褐色细胞所占百分数在 11%~30% 之间为弱阳性 (+); 细胞核内棕褐色细胞所占百分数在 31%~50% 之间为阳性 (++) ; 细胞核内棕褐色细胞所占百分数平均大于 50% 为强阳性 (+++)。(3) 水蛭素对 VEGF 细胞因子表达的影响: ① 免疫组化: 将剥离的肿瘤组织固定于甲醛溶液中, 石蜡包埋、切片, 分别 HE 及免疫组化。二甲苯脱蜡, 乙醇水化, 微波抗原修复, 非特异性着色, 室温下孵育, 漂洗, 分别滴加 VEGF 抗体、Ki-67 抗体孵育, 漂洗, 滴加 DAB 显色, 流水冲洗, 苏木精复染, 乙醇脱水透明并封片。每例标本均用 PBS 代替一抗做阴性对照; ② 阳性细胞观察: VEGF 阳性表达定位于细胞质, 其阳性细胞染色呈棕褐色。高倍镜下随机观察 5 个视野, 每个视野计数 200 个细胞, 阳性细胞占肿瘤细胞数的多少分为: 细胞质内未见染色颗粒为阴性 (-); 细胞质内棕褐色细胞所占百分数在 11%~30% 之间为弱阳性 (+); 细胞质内棕褐色细胞所占百分数在 31%~50% 之间为阳性 (++) ; 细胞质内棕褐色细胞所占百分数平均大于 50% 为强阳性 (+++)。

结 果

1. 统计学分析: 采用 SPSS12.0 软件进行统计学

方差分析 t 检验,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2. 肝癌实体瘤实验:结果表明,水蛭素对荷瘤鼠 H_{22} 肝癌实体瘤具有明显的抑制作用,各用药组与模型对照组相比较,差异显著。其中 5-FU 组 $P < 0.01$,抑瘤率为 58.73%;水蛭素大剂量组 $P < 0.02$,抑瘤率为 47.62%;水蛭素小剂量组 $P < 0.05$,抑瘤率为 39.15%。实验发现,5-FU 组的抑瘤率虽然高于水蛭素用药组,但在给药的第 9 天小鼠出现掉毛、蜷缩、食欲不振、萎靡不振,中药水蛭素组的小鼠未发生此现象(表 1)。

表 1 水蛭素对肝癌实体瘤的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物(n)	剂量 (g/kg)	瘤重(g)	抑瘤率 (%)
模型组	12	—	1.89 ± 0.87	
5-FU 组	12	0.15	$0.78 \pm 0.41^{***}$	58.73
水蛭素组(大剂量)	12	2.60	$0.99 \pm 0.48^{**}$	47.62
水蛭素组(小剂量)	12	1.30	$1.15 \pm 0.50^*$	39.15

与模型对照组相比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.02$,*** $P < 0.01$

3. Ki-67 与 VEGF 表达:免疫组化表明,水蛭素能抑制荷瘤鼠肝癌实体瘤 Ki-67 与 VEGF 的高表达,模型对照组为强阳性(136 页彩图 3A,136 页彩图 4A);水蛭素大剂量组为弱阳性(136 页彩图 3B,136 页彩图 4B);水蛭素小剂量组为阳性(136 页彩图 3C,136 页彩图 4C)。实验发现,中药水蛭素大剂量组抑制荷瘤鼠 Ki-67 与 VEGF 的表达优于小剂量组,具有明显的量效关系,见 136 页彩图 3、彩图 4。

讨 论

现代医学研究表明,肿瘤患者的血液多呈高凝状态,从而影响了抗癌药物的进入和吸收^[2]。水蛭素强大的抗凝血作用,非常有利于药物进入组织杀灭肿瘤细胞,因此,对水蛭素抗癌作用的研究已经引起国内外学者的广泛关注^[3]。Ki-67 是一种在增生细胞中表达的核抗原,反映肿瘤细胞的增生速率。Ki-67 抗原存在于肿瘤细胞周期中除 G_0 期以外的所有阶段,在多种恶性肿瘤如胃癌、肺癌、食管癌、乳腺癌及直肠癌中呈现高表达,已成为检测肿瘤细胞增生活性最可靠的指标。国内外的研究证实,Ki-67 的高表达与肿瘤的发生、发展、转移及预后有密切关系^[4]。血管为肿瘤提供营养和转移途径,多种细胞因子参与了血管形成的调控,其中 VEGF 是一种重要的促血管生长刺激因子。VEGF 能诱导血管内皮细胞迅速增生,促进肿瘤新生血管的形成,使肿瘤细胞进入血液

发生远处转移并向邻近组织进行侵袭^[5]。本实验发现,水蛭素能明显抑制荷瘤鼠肝癌实体瘤 Ki-67 增殖抗原与 VEGF 细胞因子的高表达,具有明显的抗肿瘤作用,这与中药水蛭素活血化瘀及强大的抗凝血功效有密切关系。

传统医学认为,气滞血瘀、寒凝内阻是癌症发生和转移的重要因素。现代医学研究表明,活血化瘀中药能显著改善血液的高黏状态,使肿瘤病灶纤维蛋白原溶解,血液黏度降低,血小板解聚,同时还具有阻止癌细胞黏着、诱导肿瘤细胞凋亡、提高免疫细胞识别能力的作用^[6]。近年来,有关活血化瘀中药抗肿瘤的作用,已有大量的实验和临床报道证实。血瘀证是恶性肿瘤发生和转移的主要病理基础,同时也是血瘀证的继续^[7]。《医林改错》云:“结块者,必有形之血也,血受寒则凝结成块,血受热则煎熬成块”。有学者探讨了微循环障碍与肿瘤及其转移的关系,发现 88% 的肿瘤患者血循环中存在微血栓,其数量与疾病进展程度呈正相关,活血化瘀药能改善血液的高凝状态和恶性肿瘤存在的内环境^[7]。临床药理研究表明,活血化瘀药是治疗癌症复发和转移的主要药物,能使肿瘤转移病灶内新生的毛细血管退化和提高其免疫识别能力^[7]。众多的研究证实,活血化瘀法在肿瘤治疗的过程中具有举足轻重的地位,贯穿肿瘤治疗的始终,更重要的是它降低了肿瘤转移的风险,改善了肿瘤患者的预后,提高了肿瘤患者的生存率^[8]。

参考文献

- 魏里平,姜海量,王来界.水蛭素的药理作用[J].中国中医基础 Research 杂志,2004,15(8):236-239
- 刘杰,吴齐名,冯进波.微循环障碍与肿瘤转移的临床意义[J].中华肿瘤学杂志,2005,20(6):107-109
- 柳正理,任历历,张海虹.中药水蛭抗肿瘤作用的探讨[J].实用中西医结合杂志,2005,11(6):199-201
- 杨莉,何奇,王晓. Ki-67、P₅₃ 蛋白在乳腺癌中的表达及其临床意义[J].医学诊断与实践杂志,2009,8(2):87-91
- 刘建民,薛晓彤,赵宪春.胆管癌组织中 Ki-67 与 VEGF 的表达的临床意义[J].中国中西医结合杂志,2007,22(11):325-328
- 钱长江,温晓亮,张渤海.活血化瘀与恶性肿瘤的关系[J].中华肿瘤防治杂志,2008,15(21):1639-1642
- 钱彦方.活血化瘀中药对肿瘤形成和转移的影响[J].中医杂志,2009,50(12):942-945
- 崔永安,左小东,毛承飞.活血化瘀法在“肿瘤辨证论治”中的应用[J].中医杂志,2008,48(8):749-750

(收稿:2010-01-18)

(修回:2010-04-05)