

玉屏风散对肝癌微环境中血管生成的调节机制

袁琴, 姚霏, 张露蓉, 刘敏

(南京中医药大学附属苏州市中医医院, 江苏 苏州 215009)

摘要:目的 阐明玉屏风散通过抑制胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)和信号转导因子(STAT3)的活化,调控肝癌微环境的免疫状态抑制微血管的形成从而发挥抗肝癌效应的机制。方法 采用 Hepa1-6 原位肝癌小鼠模型,灌胃给予玉屏风散药液(20、30、40 g/kg),给药 2 周后处死小鼠。剥离瘤体称质量并计算抑瘤率;ELISA 法检测肿瘤组织和癌旁组织血清液中 VEGF、TSLP、TSLPR 的表达水平;免疫组化法检测微血管密度 MVD 的表达情况;Western blot 法检测 STAT3 和 p-STAT3 的蛋白表达情况。结果 与模型组比较,不同浓度的玉屏风散(20、30、40 g/kg)可明显抑制肿瘤的生长($P < 0.05 \sim 0.01$),且呈剂量依赖,抑瘤率分别为 26.37%、35.89% 和 56.01%;玉屏风散组肿瘤组织和癌旁组织的 MVD 和 VEGF 水平明显降低($P < 0.05 \sim 0.01$);不同浓度的玉屏风散可降低 TSLP/TSLPR 和 p-STAT3/STAT3 的表达,并且呈剂量依赖性($P < 0.05 \sim 0.01$)。结论 玉屏风散可通过抑制 TSLP 表达,进而减弱 TSLP-STAT3 信号通路的激活,抑制肝癌微环境中血管的形成,发挥抗肝癌作用,该研究为延长肝癌患者生存和开发理想治疗药物靶点的新策略提供了实验依据。

关键词:玉屏风散;TSLP;STAT3;肝肿瘤;小鼠

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1672-0482(2020)02-0205-06

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2020.0205

引文格式:袁琴,姚霏,张露蓉,等.玉屏风散对肝癌微环境中血管生成的调节机制[J].南京中医药大学学报,2020,36(2):205-210.

Regulation Mechanism of Yupingfeng San on Angiogenesis in Liver Cancer Microenvironment

YUAN Qin, YAO Fei, ZHANG Lu-rong, LIU Min

(Suzhou TCM Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou, 215009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To clarify that Yupingfeng San (YPFS) can inhibit the formation of microvessels by inhibiting the activation of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) and signal transduction factor (STAT3), and exert its anti-liver effect. **METHODS** Hepa1-6 orthotopic liver cancer mouse model was used, and YPFS solution (20, 30, 40 g/kg) was intragastrically administered. The mice were sacrificed two weeks after administration. The tumors were weighed and the tumor inhibitory rate was calculated. The expression levels of VEGF, TSLP and TSLPR in tumor tissues and adjacent tissues were detected by ELISA. The expression of MVD in microvessel density was detected by immunohistochemistry. The protein expression of STAT3 and p-STAT3 was detected by Western blot. **RESULTS** Compared with the model group, different concentrations of YPFS (20, 30 and 40 g/kg) groups significantly inhibited tumor growth in a dose-dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the tumor inhibitory rate was 26.37%, 35.89% and 56.01%, respectively; the MVD and VEGF levels of tumor tissues and adjacent tissues in YPFS groups were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$); further studies showed that the expression of TSLP/TSLPR and p-STAT3/STAT3 in YPFS-treated groups could be reduced in dose-dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **CONCLUSION** YPFS attenuates the activation of TSLP-STAT3 signaling pathway by inhibiting the expression of TSLP, thereby inhibits the formation of blood vessels in the hepatic microenvironment and exerts anti-HCC effect. The study provides experimental basis for new strategies for prolonging the survival of liver cancer patients and developing ideal therapeutic drugs targets.

KEYWORDS: Yupingfeng San; TSLP; STAT3; Liver cancer; mice

肝细胞肝癌(HCC)是富血供肿瘤之一,其发生发展及预后与血管生成密切相关,抑制肿瘤微血管的形成是防治肝癌发生发展的一个重要治疗策

略^[1]。然而,单独的抗血管生成疗法不足以提高临床治疗中患者的存活率,并且耐药性的发生在 HCC 临床反应中是一种常见现象^[2]。肝癌微环境中的细

收稿日期:2019-10-21

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81303276);苏州市科技发展计划项目(SYS2018092);苏州市“科教兴卫”青年科技项目(KJXW2016039)

第一作者:袁琴,女,硕士研究生,E-mail:15306206631@163.com

通信作者:张露蓉,女,主任中药师,主要从事肿瘤免疫与中药新药开发研究,E-mail:suzhouzlr2013@163.com

胞分泌大量细胞因子如血管内皮生长因子(VEGF),促进新血管生成;而肝癌血管分布畸形又会影响免疫细胞的功能,促进肝癌炎症和微环境的形成^[3]。肝癌炎症微环境中的抑制性免疫细胞能够进一步通过信号转导因子诱导肿瘤新血管的生成,促进肝癌的免疫逃逸。研究表明,改善肿瘤免疫抑制微环境对抑制肿瘤微血管形成具有重要作用,因此抗血管生成药物通常与免疫增强剂或化学治疗剂联合使用,可以预防 HCC 的发生和发展^[4]。

玉屏风散是中医扶正固表的名方,出自宋代《究原方》,由黄芪、白术、防风 3 味药材组方而成,其中君药黄芪和臣药白术以扶正为主,而佐使药防风则以祛邪为主,正是“扶正固本,标本兼治”的巧妙结合。玉屏风散已被证明具有广泛的免疫调节作用,可预防细菌和病毒感染;在癌症治疗中,玉屏风散治疗对原发性肝癌患者的抗肿瘤免疫反应有增强作用^[5]。最近的许多研究报道,玉屏风散可以增强免疫功能,抑制肿瘤的生长和转移^[6]。课题组前期的研究发现,肝癌荷瘤小鼠肿瘤和癌旁组织中均有 TSLP 表达,玉屏风散可明显降低肿瘤组织中 TSLP 的表达水平。因此,本实验研究玉屏风散对 TSLP-STAT3 信号通路和肝癌微血管的形成的关系,阐明玉屏风散抑制肝癌微血管形成的确切作用和关键靶点,为其防治肝癌提供实验和理论基础。

1 材料

1.1 药物与试剂

玉屏风散由黄芪、白术、防风组成。黄芪、白术购自于苏州市春晖堂药业有限公司,批号:100601;防风购自苏州市天灵中药饮片有限公司,批号:101115-2。DMEM 培养液(GIBCO 公司,批号:1320158);巴比妥钠(Sigma-Aldrich 公司,Merck KGaA);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号:100511);胰蛋白酶(闪晶生物公司,批号:2594141);二甲亚砜(AMRESCO 公司,批号:0231);四甲基偶氮唑盐(AMRESCO 公司,批号:0462B32)。单克隆抗兔 CD34 一抗(Abcam 公司,批号:ab81289);山羊抗兔免疫球蛋白二抗(Abcam 公司,批号:ab205718);兔特异性 HRP 辣根过氧化物酶(Sangon Biotech 公司,批号:D110117);VEGF ELISA 试剂盒(Thermo Fisher Scientific 公司,批号:110518007);TSLP ELISA 试剂盒(Thermo Fisher Scientific 公司,批号:117921642);STAT3 抗体(Cell Signaling Technology 公司,批号:9959),

p-STAT3 抗体(Cell Signaling Technology 公司,批号:9914)。

1.2 细胞株

小鼠肝癌细胞株 Hepa1-6 从上海中科院细胞生物所购买,批号:SCSP-512。

1.3 实验动物

SPF 级近交 C57BL/6 纯系雄性小鼠 40 只,体质量 18~22 g,购自苏州爱尔麦特科技有限公司实验动物中心。动物许可证号:SCXK(苏)2018-0006,用于制备 HCC 小鼠模型。

1.4 实验仪器

微量移液器,美国 eppendorf 公司;Leica DMIL 倒置显微镜,德国徕卡仪器有限公司;贺利氏二氧化碳培养箱,美国科峻仪器公司;Z320K 低温高速离心机,德国 HERMLE 公司;电子天平(千分之一),瑞士梅特勒-托利多公司;SHZ-22 水浴恒温振荡器,上海离心机械研究所;普通天平,美国双杰有限公司;超低温冰箱,日本 SANYO 公司。

2 方法

2.1 玉屏风散的制备

按黄芪:白术:防风为 3:1:1 的比例,加入 3 倍蒸馏水,浸泡 0.5 h,另外加入 5 倍水,回流提取 1.5 h,过滤,收集滤液。向药物残余物中再加入 6 倍水,并回流提取 1 h,将 2 次滤液合并。浓缩,在-20℃冷冻过夜,冻干成粉末备用。

2.2 移植性肝癌荷瘤小鼠的造模和给药

将 C57BL/6J 小鼠适应性饲养 3 d 后,随机选出 8 只正常小鼠作为对照组,剩余 32 只造模。根据之前的研究建立小鼠 HCC 的原位移植模型。在小鼠腹部麻醉后,取仰卧位并将四肢固定在实验板上。用 10% 硫化钠除去体毛。用碘酒消毒后,逐层打开腹部,将小鼠腹腔暴露,轻轻按压小鼠胸部,肝脏挑出腹部并选择最靠近体表的肝脏来种植肿瘤。用斜针制备 Hepa1-6 细胞悬液。将针尖与水平面约 20° 均匀地进入肝脏约 1 cm,缓慢注射细胞悬液 0.1 mL,约 2×10^5 个 Hepa1-6 细胞。慢慢取出针头,轻轻按压无菌棉签一段时间,然后轻轻将肝脏送回到腹腔并逐层闭合腹部。在模型制作后第 10 天检测造模有无成功,用高频超声观察肝脏接种部位有无异常回声区。采用分层随机分组,将携带肿瘤的小鼠根据其体质量随机分配到 8 个亚组。每个亚组包含 4 只相同的小鼠,然后从每个亚组中随机选择 1 只小鼠分配到实验组,包括模型组(给予生理盐

水喂养)和 YPFS 低、中、高 3 种剂量(分别合生药量 20、30、40 g/kg)。每个实验组包含 8 只小鼠。在分组当天开始给药。模型组每天给予生理盐水 1 次, YPFS 组每天给予 1 次药物。最后 1 次给药后,将小鼠禁食 12 h,然后通过腹膜内注射 50 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉,并通过 CO₂ 暴露处死麻醉的小鼠。称质量并收集肿瘤组织。肿瘤抑制率=(模型组的平均肿瘤质量-实验组的平均肿瘤质量)/模型组的平均肿瘤质量×100%。

2.3 抑瘤率的测定

解剖小鼠,称质量并收集肿瘤组织。肿瘤抑制率(%)=(模型组的平均肿瘤质量-实验组的平均肿瘤质量)/模型组的平均肿瘤质量×100%。

2.4 免疫组织化学测定和分析

将石蜡包埋的肝肿瘤组织切成 4 μm, 25 °C 下在 4% 福尔马林中固定 24 h, 脱蜡, 在二甲苯中洗涤 3 次, 100% 乙醇洗涤 2 次, 95% 乙醇洗涤 2 次, 然后 ddH₂O 洗涤 2 次。为了提取抗原, 将载玻片放入 10 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液中, 保持沸点 10 min, 然后冷却 30 min。孵化后用 3% 过氧化氢 10 min 以阻断内源性过氧化物酶, 用 ddH₂O 洗涤 2 次, 用 150 μL 封闭溶液(1% w/v BSA, TBS)在 25 °C 下封闭 2 h, 并用纯化的单克隆抗兔 CD34 一抗(稀释, 1:250)在 4 °C 孵育过夜。随后, 将生物素化的山羊抗兔免疫球蛋白二抗(稀释, 1:2 000); 在 25 °C 温育 1 h。接着用特异性 HRP 辣根过氧化物酶在 25 °C 孵育 15 min。然后将切片用苏木精在 25 °C 下复染 1~2 min, 用乙醇和二甲苯脱水。使用 Olympus DP72 软件和 Image-Pro Plus 6.0 分析软件定量免疫组织化学结果。在随机区域中选择 10 个不同的区域进行计算。如上所述测定微血管密度(MVD)。在 100× 显微镜下鉴定并检查具有最高血管化程度的区域, 并且在 200× 显微镜下计算 10 个血管化区域中的每一个区域。将 10 个区域的平均值记录为载玻片的 MVD 水平。将结果作为治疗组的百分比进行比较。所有切片均由 2 名双盲病理学家独立分析, 并在结果不一致时再次确认。

2.5 ELISA 法测定肝癌组织和癌旁组织匀浆上清液中 TSLP/TSLPR 和 VEGF 的表达情况

将模型组和玉屏风散处理的肝癌小鼠的肝癌组织和癌旁组织用 RIPA 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 120 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1% 脱氧胆酸钠和 0.1% SDS)进行匀浆, 在 4 °C 下以

2 000×g 离心 5 min 后, 取上清液(100 μL)进行分析。根据 VEGF ELISA 试剂盒测定组织匀浆中的 VEGF 水平。根据 TSLP/TSLPR ELISA 试剂盒测定组织匀浆中的 TSLP/TSLPR 浓度。使用软件作图画出标准曲线, 根据样品计算出相应的含量。

2.6 Western blot 分析

肝癌和癌旁组织标本用 RIPA 缓冲液处理, 然后将等量的蛋白质(50 μg)上样到 10% SDS-PAGE 上并转移到聚偏二氟乙烯膜上。用在 5 °C 下缓冲 2 h 的 5% 脱脂奶粉封闭膜, 并与针对 STAT3 兔 mAb 的一抗孵育(稀释, 1:1 000), p-STAT3 抗体(稀释度, 1:1 000)。在 4 °C 过夜。洗涤膜并与辣根过氧化物酶结合的二抗在 25 °C 温育 2 h。将膜用 Tris-20 的 Tris 缓冲液洗涤 4 次, 并通过荧光可见成像系统 BIO-RAD 成像系统(BIO-RAD, Hercules, CA, USA)检测。使用 Image Pro Plus 4.5 软件(4.5, Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD, USA)通过光密度测定法测试每个条带的强度。将定量标准化为 GAPDH 表达的可比较值。

2.7 统计学处理

所有实验重复至少 3 次, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差分析后进行 Dunnett 多重比较后测试(Graph-Pad Prism 5 Software, San Diego, CA, USA)评估不同治疗组之间的差异。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

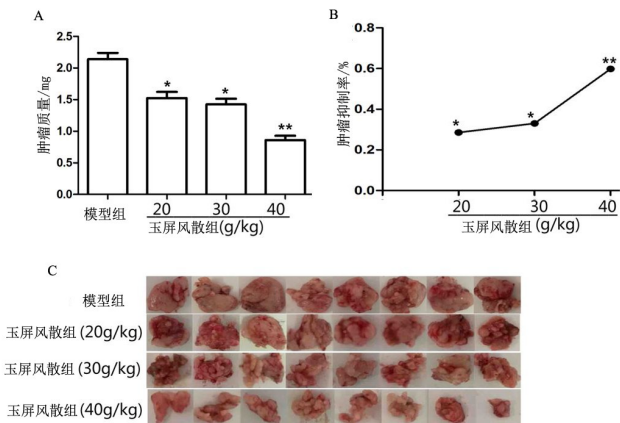
3.1 玉屏风散抑制 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠肿瘤的生长

与模型组比较, 不同剂量的玉屏风散(20、30、40 g/kg)可明显抑制肿瘤的生长($P < 0.05 \sim 0.01$), 且肿瘤质量的下降趋势具有明显的剂量依赖性; 玉屏风散组(20、30、40 g/kg)的抑瘤率分别为 26.37%、35.89% 和 56.01%。切除后肿瘤呈椭圆形, 表面光滑, 边界清晰, 毛细血管网丰富, 玉屏风散组(20、30、40 g/kg)小鼠的肿瘤质量呈下降趋势。结果表明玉屏风散对 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠的肿瘤生长具有明显地抑制作用。见图 1。

3.2 玉屏风散对 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠肝癌组织和癌旁组织血管形成的影响

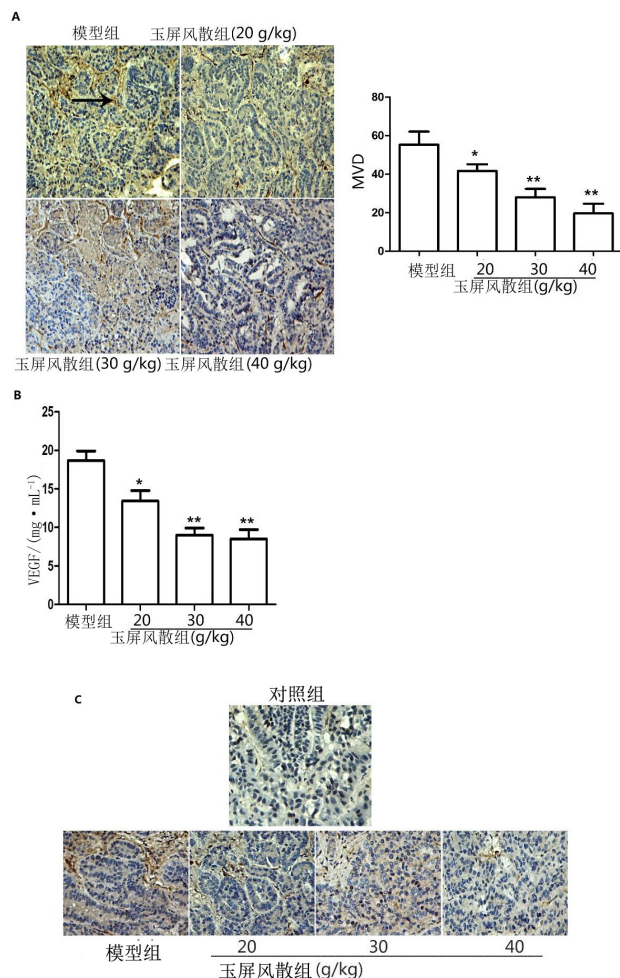
与模型组相比, 玉屏风散组肿瘤组织和癌旁组织中的 MVD 显著降低($P < 0.05 \sim 0.01$), 玉屏风散组肿瘤组织和癌旁组织中的 VEGF 以剂量依赖性方式显著降低($P < 0.05 \sim 0.01$)。结果表明玉屏风

散在体内抑制 HCC 的血管生成。见图 2。

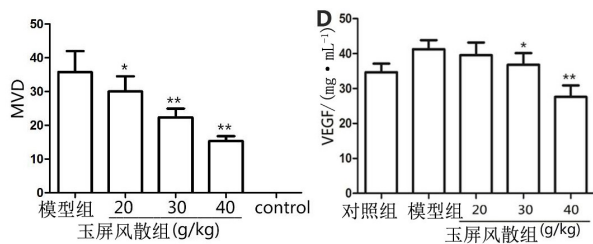


A.不同剂量玉屏风散对 Hepa1-6 肝癌小鼠瘤质量的影响;B.不同剂量玉屏风散对 Hepa1-6 肝癌小鼠的抑瘤率;C.模型组和玉屏风散组中解剖出来的肿瘤组织的情况。与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 玉屏风散抑制 Hepa1-6 肝癌小鼠肿瘤的生长



A.不同浓度玉屏风散(20、30、40 g/kg)对 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠肝癌组织的影响,尖头指示阳性结果(免疫组化,×200);B.Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠肝癌组织中 VEGF 的表达水平;C.不同浓度玉屏风散(20、30、40 g/kg)对 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠癌旁组织的影响,尖头指示阳性结果(免疫组化,×200);D.ELISA 法检测 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠癌旁组织中 VEGF 的表达水平。与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。



A.不同浓度玉屏风散(20、30、40 g/kg)对 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠肝癌组织的影响,尖头指示阳性结果(免疫组化,×200);B.Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠肝癌组织中 VEGF 的表达水平;C.不同浓度玉屏风散(20、30、40 g/kg)对 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠癌旁组织的影响,尖头指示阳性结果(免疫组化,×200);D.ELISA 法检测 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠癌旁组织中 VEGF 的表达水平。与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

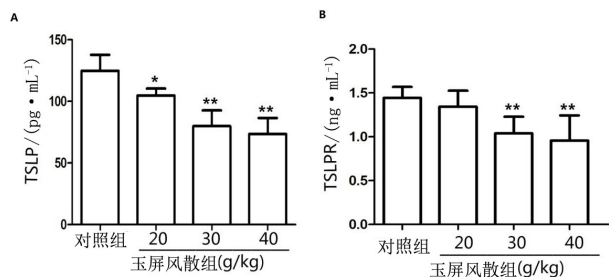
图 2 玉屏风散对 HCC 血管生成的影响

3.3 玉屏风散对 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠肝癌组织和癌旁组织中 TSLP/TSLPR 表达的影响

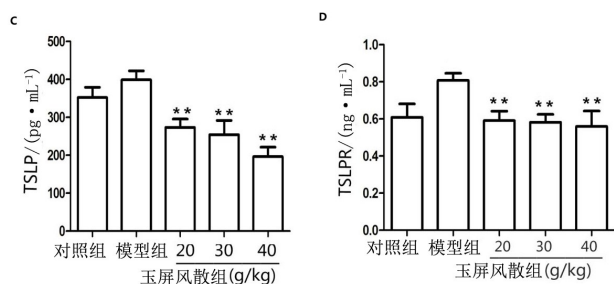
与模型组相比,玉屏风散组的 TSLP 和 TSLPR 的表达明显降低并且呈剂量依赖性 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。用同样的方法检测了癌旁组织中 TSLP 和 TSLPR 的表达,得到了与肿瘤组中相似的结果 ($P < 0.01$)。见图 3。

3.4 玉屏风散对 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠肝癌组织和癌旁组织中 STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的影响

在肝癌组织中,与模型组相比,玉屏风散组的 STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达呈剂量依赖性显著降低 ($P < 0.05 \sim 0.01$);在癌旁组织中也发现了类似的结果 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。结果显示玉屏风散抑制 HCC 的血管生成与 STAT3 的磷酸化相关,并且提示玉屏风散可通过 TSLP 调节 STAT3 的磷酸化而发挥其对肝癌血管生成的抑制作用。见图 4。

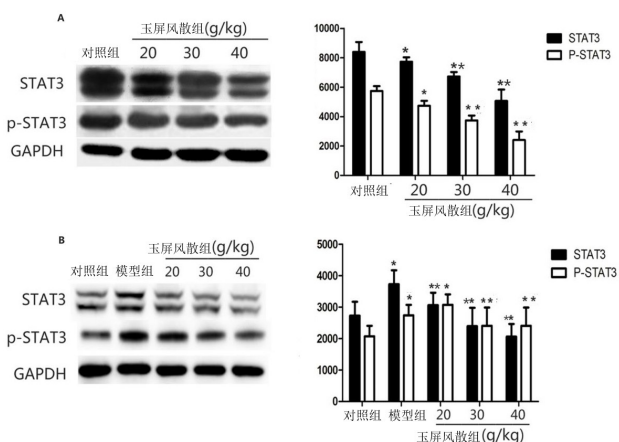


A.不同浓度玉屏风散(20、30、40 g/kg)对 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠肝癌组织中 TSLP 表达的影响;B.不同浓度玉屏风散(20、30、40 g/kg)对 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠肝癌组织中 TSLPR 表达的影响。与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。



A.玉屏风散对肝癌小鼠肿瘤组织中 TSLP 表达的影响;B.玉屏风散对肝癌小鼠肿瘤组织中 TSLPR 表达的影响;C.玉屏风散对肝癌小鼠癌旁组织中 TSLP 表达的影响;D.玉屏风散对肝癌小鼠肿瘤旁组织中 TSLPR 表达的影响。与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图3 玉屏风散对 Hepal-6 肝癌荷瘤小鼠肝癌组织和癌旁组织中 TSLP/TSLPR 表达的影响



A.玉屏风散对肝癌小鼠肿瘤组织中 STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的影响;B.玉屏风散对肝癌小鼠癌旁组织中 STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的影响。与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图4 玉屏风散对 Hepal-6 肝癌荷瘤小鼠肝癌组织和癌旁组织中 STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的影响

4 讨论

玉屏风散是中医扶正固表的名方,现代药理学研究表明,玉屏风散可通过提高吞噬细胞的功能和促进细胞因子的分泌,从而增强机体的免疫功能,达到抑制肿瘤生长的作用。玉屏风散作为免疫调节中药广泛用于治疗免疫系统疾病。研究表明,玉屏风散可以抑制 IFN- γ 和 IL-4 的分泌,并影响 T 细胞的总数,通过降低 Th1 和 Th2 细胞因子水平来介导免疫缺陷疾病。与 Th2 细胞极化相关的慢性炎症可以刺激癌症进展^[7]。前期研究表明,玉屏风散通过改善肝癌微环境的免疫抑制状态,对 Hepal-6 移植的肝癌小鼠具有一定的抗肿瘤作用。本研究发现玉屏风散可以抑制 Hepal-6 荷瘤小鼠肿瘤组织和癌旁组织中的 MVD 和 VEGF 表达,进一步的实验

表明,玉屏风散可以降低 TSLP/TSLPR 和 STAT3/p-STAT3 的表达,结果表明玉屏风散通过 TSLP/STAT3 信号传导途径发挥抗血管生成作用从而抑制肿瘤生长。

血管生成是侵袭性肿瘤生长和转移的必要条件,也是控制肿瘤进展的重要环节。异常血管生成,特别是实体瘤,在肿瘤生长和转移中起关键作用。增殖性肿瘤细胞分泌大量促血管生成因子,激活肿瘤血管生成,为肿瘤细胞提供氧气和营养^[8]。VEGF 是血管生成的决定性因子,促进内皮细胞增殖,迁移和管腔形成;阻断 VEGF 导致血管降解,最终抑制肿瘤生长和转移。许多中草药成分对 VEGF 诱导的血管生成具有抑制作用^[9]。本研究发现,VEGF 在肿瘤组织和癌旁组织中的表达都有明显的增高,但是通过玉屏风散的治疗会显著降低。MVD 为肿瘤微血管密度,代表肿瘤组织诱导血管生成的能力,CD34 被认为是肝微血管的敏感和明确的标志物。在该研究中,CD34 在微血管中的表达被用作标记物以检测组织中 MVD 的表达。结果表明,玉屏风散处理后肿瘤组织和癌旁组织中 MVD 明显降低,呈剂量依赖性。表明玉屏风散可降低肝癌肿瘤中 VEGF 的水平和血管生成。

TSLP 是一种类 IL-7 炎性细胞因子,通常与诱导 Th2 型过敏反应有关,并且与多种癌症的发生发展相关,如乳腺癌和黑色素瘤等。基于 Th2 炎症反应和癌症之间的相互作用,最近的一项研究表明,Th2 分化的 CD4⁺ T 细胞通过 TSLP 促进肿瘤进展^[10]。研究表明,TSLP 在癌细胞中发挥重要作用,TSLP 的失活几乎完全消除了癌症进展和肺转移。TSLP 主要通过 CD4⁺ T 细胞上的 TSLPR 传递信号,以促进 Th2 免疫反应异常,并产生免疫抑制因子,如 IL-10 和 IL-13^[11]。TSLP 在促进 VEGF 生长和血管生成方面也具有重要作用,研究表明 TSLP 可通过影响血管生成促进宫颈癌的发生发展。TSLP 主要通过 JAK/STAT 信号通路调节靶基因表达,包括 STAT3,STAT5 和 STAT1 信号转导因子^[12]。通过 STAT3 的信号传导增加了参与癌细胞增殖、存活、迁移、侵袭和血管生成等基因的表达。STAT3 转录因子诱导 MMP-2, MMP-9 和上皮间充质转换相关基因在促进癌细胞侵袭和转移中的表达。在 Tyr705 磷酸化后发生 STAT3 激活,导致二聚化和从细胞质向细胞核的转运^[13]。STAT3 的持续激活,除肿瘤细胞增殖、分化及转移外,还促

进相关免疫抑制因子的表达,从而引起肿瘤微环境的免疫抑制^[14]。STAT3 的激活在血管形成过程中同样发挥重要作用,阻断 STAT3 的活性可以抑制肿瘤血管内皮细胞的迁移和微血管生成。该研究表明 STAT3 是 VEGF 基因的直接转录激活因子。STAT3 的持续激活可诱导肿瘤细胞大量分泌 VEGF,然后与内皮细胞表面受体结合,诱导内皮细胞增殖和活化,从而促进肿瘤血管生成和侵袭转移;STAT3 的阴性突变体对 STAT3 活化的体内抑制可显著抑制 VEGF 表达和血管生成,从而限制肿瘤生长和转移。Surraramian 等^[15]还发现 STAT3 对 VEGF 表达的调节在 HCC 血管内皮细胞的增殖、迁移和微血管生成中起关键作用,并提示 STAT3 和 VEGF 之间存在“恶性循环”机制。研究表明,VEGF 的下调表达与 STAT3 的表达一致,这表明 STAT3 在血管生成中起重要作用。但是,需要进行进一步的研究以确定当前研究中的结果。玉屏风散通过降低 TSLP/STAT3 的表达来抑制血管生成,这与肿瘤微环境的免疫抑制的改善一致。故推测,玉屏风散诱导的 TSLP 减少可能至少部分地有助于抑制 STAT3 的表达。

本研究中,玉屏风散给药浓度为 20、30、40 g/kg,是依据临床常用剂量折算成小鼠剂量后,结合药理学相关研究文献,进行了适当放大。其中玉屏风散 20 g/kg 组相当于人体剂量折算的 3.8 倍;30 g/kg 组相当于人体剂量折算的 5.7 倍;40 g/kg 组相当于人体剂量折算的 7.5 倍。本研究证实该 3 个剂量的 YPFS 可抑制 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠的血管生成和肿瘤生长,可能与 TSLP/STAT3 信号传导途径的减弱有关。本研究为玉屏风散在治疗 HCC 中的应用提供了证据,也为在中医药理论指导下,结合现代药理研究成果,对中药复方研究提供基础。

参考文献:

[1] BAI L, YANG JC, OK JH, et al. Simultaneous targeting of Src kinase and receptor tyrosine kinase results in synergistic inhibi-

- tion of renal cell carcinoma proliferation and migration[J]. *Int J Cancer*, 2011, 130(1): 253-262.
- [2] LI C, LIU T, BAZHIN AV, et al. The sabotaging role of myeloid cells in anti-angiogenic therapy: Coordination of angiogenesis and immune suppression by hypoxia[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232: 2312-2322.
- [3] SHERMAN M. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, surveillance, and diagnosis[J]. *Semin Liver Dis*, 2010, 30(1): 3-16.
- [4] PRENDERGAST GC, JAFFEE EM. Cancer immunologists and cancer biologists: Why we didn't talk then but need to now[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8): 3500-3504.
- [5] 张露蓉,姚霏,江国荣. 玉屏风散对 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠免疫调节的影响[J]. *东南大学学报*, 2014, 33(1): 34.
- [6] 张露蓉,姚霏,江国荣,等. 玉屏风散直接抑制和免疫调节抗肝癌细胞癌作用的实验研究[J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32(5): 1046-1050.
- [7] ZHANG HJ, TANG XY, JU BL, et al. Effect of Yu Ping Feng San on the growth of tumor and immunological function in tumor bearing nude mice[J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2008, 24: 683-685.
- [8] FEURINO LW, ZHANG Y, BHARADWAJ U, et al. IL-6 stimulates Th2 type cytokine secretion and upregulates VEGF and NRP-1 expression in pancreatic cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(7): 1096-1100.
- [9] ZHANG H, YANG R. Resveratrol inhibits VEGF gene expression and proliferation of hepatocarcinoma cells[J]. *Hepatogastroenterology*, 2014; 61(130): 410-412.
- [10] YING SO, CONNOR B, RATOFF J, et al. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity[J]. *J Immunol*, 2005, 174: 8183-8190.
- [11] OLKHANUD PB, ROCHMAN Y, BODOGAI M, et al. Thymic stromal lymphopoietin is a key mediator of breast cancer progression[J]. *Immunol*, 2011, 186: 5656-5662.
- [12] DOURLAT J, LIU WQ, SANCIER F, et al. A novel non-phosphorylated potential antitumoral peptide inhibits STAT3 biological activity[J]. *Biochimie*, 2009, 91(8): 996-1002.
- [13] XIE TX, WEI D, LIU M, et al. STAT3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis[J]. *Oncogene*, 2004, 23(20): 3550-3560.
- [14] CHEN Z, HAN ZC. STAT3: A critical transcription activator in angiogenesis[J]. *Med Res Rev*, 2008, 28: 185-200.
- [15] SURRAMANIAM A, SHANMUGAM MK, PERUMAL E, et al. Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma[J]. *Biochim Biophys Acta-Rev Cancer*, 2013, 1835: 46-60.

(编辑:董宇)