

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220524

• 短篇论著 •

基于循环肿瘤细胞探讨四藤方对胃癌术后患者的解毒机制

毛竹君, 刘克娴, 沈克平*

上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科, 上海 200032

[摘要] **目的** 观察四藤方对胃癌根治术后患者循环肿瘤细胞 (CTC) 数量的影响, 探讨其解毒功效的现代细胞生物学机制。**方法** 选择 2020 年 9 月至 2021 年 9 月上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科具有明确病理诊断的 I ~ II 期胃癌根治术后患者 60 例, 按照随机数字表法分为四藤方组和对照组, 每组 30 例。四藤方组予以四藤方+中西医结合常规治疗, 对照组予以中西医结合常规治疗。采集两组患者外周血, 采用免疫磁珠阴性富集技术分离和富集 CTC, 结合荧光原位杂交法对 CTC 进行检测并计数, CTC \geq 1 个/3.2 mL 定义为阳性。**结果** 60 例患者 CTC 检测阳性率为 81.67% (49/60), 其中对照组阳性率为 90.00% (27/30), 四藤方组阳性率为 73.33% (22/30)。四藤方能降低早期胃癌根治术后患者 CTC 计数 ($P < 0.01$)。**结论** 四藤方能降低胃癌根治术后患者 CTC 数量, 提示四藤方可能通过抑制 CTC 从而达到抗胃癌转移的作用。

[关键词] 胃肿瘤; 循环肿瘤细胞; 四藤方; 解毒机制

[中图分类号] R 735.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-1338(2023)01-0129-04

Detoxification mechanism of *Siteng Fang* based on circulating tumor cells in postoperative gastric cancer patients

MAO Zhu-jun, LIU Ke-xian, SHEN Ke-ping*

Department of Oncology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of *Siteng Fang* on the count of circulating tumor cells (CTCs) in patients with gastric cancer, and to explore the modern cell biological mechanism of its detoxification effect. **Methods** From Sep. 2020 to Sep. 2021, 60 patients of stage I-II gastric cancer after radical surgery with clear pathological diagnosis in Department of Oncology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine were randomly divided into *Siteng Fang* group and control group according to the random number table method, with 30 cases in each group. The *Siteng Fang* group was treated by *Siteng Fang*+conventional treatment with traditional Chinese and Western medicine, and the control group was treated by conventional treatment with traditional Chinese and Western medicine. Peripheral blood was collected from both groups, and CTCs were isolated and enriched by immunomagnetic bead negative enrichment technique, combined with fluorescence *in situ* hybridization to detect and count CTCs, and CTCs \geq 1/3.2 mL was defined as positive. **Results** The positive rate of CTC detection was 81.67% (49/60), including 90.00% (27/30) in the control group and 73.33% (22/30) in the *Siteng Fang* group. *Siteng Fang* reduced the CTC counts in patients after radical surgery of early gastric cancer ($P < 0.01$). **Conclusion** *Siteng Fang* can reduce the number of CTCs in patients after radical surgery of gastric cancer, suggesting that *Siteng Fang* may have anti-metastasis effect on gastric cancer by inhibiting CTCs.

[Key words] stomach neoplasms; circulating tumor cells; *Siteng Fang*; detoxification mechanism

[Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(1): 129-132]

胃癌是亚洲人群中最常见的恶性肿瘤之一, 其发生率一直居高不下。早期胃癌缺乏有效检测手段, 淋巴结转移率非常高, 就诊后确诊的胃癌患者

淋巴结转移比例可达 50%~75%^[1-2]。循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTC) 是进入人体外周血的肿瘤细胞, 由于免疫系统的监视, 大部分 CTC

[收稿日期] 2022-06-21 [接受日期] 2022-12-04

[基金项目] 上海市临床重点专科建设项目(中医肿瘤)(SHSLCZDZK03701)。Supported by Shanghai Municipal Key Clinical Specialty Project (Traditional Chinese Medicine for Tumor) (SHSLCZDZK03701).

[作者简介] 毛竹君, 博士, 副主任医师. E-mail: 12603126@qq.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-64385700, E-mail: shen0313@163.com

可被清除,但未被清除的CTC如果到达远处器官则可形成转移灶,成为肿瘤转移的关键因素之一^[3-4]。CTC作为一种可检测的新型肿瘤标志物,具有早期诊断肿瘤、评估抗肿瘤药物疗效及预测肿瘤复发和转移等临床价值,可以应用于胃癌的早期诊断、治疗敏感性的预测、复发风险和预后的评估等方面^[5-10]。

上海市名老中医邱佳信提出“脾虚贯穿肿瘤始终,治瘤应从健脾着手”^[11]。上海中医药大学附属龙华医院在中医理论的指导下,根据邱老多年临床经验创建了胃肠安方,以胃肠安方为基础优化出清热解毒的四味中药形成小复方——四藤方。细胞和动物实验结果显示,四藤方能促进胃癌细胞凋亡,抑制小鼠皮下移植瘤生长^[12-13];临床研究显示四藤方联合化学治疗可减轻胃癌术后患者化学治疗的不良反应,提高患者生存质量,延长无进展生存期^[14-16]。本研究拟观察四藤方对胃癌患者CTC的影响,探讨其解毒功效的现代细胞生物学机制。

1 资料和方法

1.1 研究对象 选择2020年9月至2021年9月上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科收治的具有明确病理诊断且按照国际TNM分期确定为I期、II期的胃癌根治术后患者。纳入标准:(1)有明确病理诊断的胃癌患者;(2)TNM分期为I~II期,胃癌根治术后,术后病理切缘均为阴性;(3)年龄 ≥ 18 岁;(4)卡氏功能状态(Karnofsky performance status, KPS)评分 ≥ 60 分,功能状态(performance status, PS)评分 ≤ 2 分;(5)依从性良好,理解并自愿加入本研究。排除标准:

(1)伴有严重的并发症,或肝、肾功能不全;(2)妊娠期或哺乳期患者;(3)有精神异常或其他病史及不能配合者。共纳入60例患者,按照随机数字表法分为四藤方组和对照组,每组30例。本研究获得上海中医药大学附属龙华医院伦理委员会审批(2019LCSY205)。所有纳入的患者均签署知情同意书。

1.2 干预方法 四藤方组给予四藤方+中西医结合常规治疗。四藤方(红藤15g、野葡萄藤15g、藤梨根15g、菝葜15g,由上海中医药大学附属龙华医院中药房代煎)每日分2次口服,并根据兼症加减:胃脘胀痛加枳壳、香橼皮、佛手,胸胁胀痛

加川楝子、延胡索,便秘加枳实、瓜蒌仁,纳差食滞加乌梅、炒谷麦芽,恶心、呕吐加旋复花、姜半夏、姜竹茹等。对照组给予中西医结合常规治疗。两组均连续干预6个月。

1.3 CTC检测 统一采用柠檬酸葡萄糖溶液抗凝的5 mL真空采血管(成都瑞琦科技实业股份有限公司)采集患者外周血,采血完毕后立即颠倒混匀8次。采血后将采血管置于室温(15~30℃)保存,24 h内进行检测。采用免疫磁珠阴性富集技术分离和富集CTC,用8、17号染色体着丝粒探针标记细胞,进行荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)检测。结果判定:计数涂片上的细胞8、17号染色体着丝粒杂交信号,去除断裂、重叠、边界不清、背景不明确、信号不明确的细胞,杂交信号 > 2 个判断为拷贝数增多,视为超二倍体细胞^[17]。由2位经培训的实验员按照上述标准采集阳性细胞图像并计数,有分歧时由第三人或更多协助者共同判定。

1.4 统计学处理 运用R 4.1.1软件进行数据分析和处理。计数资料以频数和百分数表示;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验;等级资料采用桑基图进行分析。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 两组患者CTC阳性检出率 60例胃癌根治术后患者中,男30例、女30例,年龄18~86岁,病理类型为腺癌38例、腺癌+部分印戒细胞癌17例、印戒细胞癌5例,TNM分期I期32例、II期28例。60例患者中出现8、17号染色体拷贝数增多的共有49例,CTC检测阳性率为81.67%(49/60),其中对照组阳性率为90.00%(27/30),四藤方组阳性率为73.33%(22/30)。

2.2 两组患者CTC计数 对两组患者治疗前的CTC计数进行独立样本 t 检验,结果显示差异无统计学意义($t=0.194, P=0.847$),见图1A。治疗后,四藤方组CTC计数低于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),见图1B。

CTC计数最大者为12个/3.2 mL,最小者为0个/3.2 mL。按照CTC计数将其分为0、1~3、4~6、7~9、10~12个/3.2 mL 5个等级,将组别、TNM分期与CTC计数等级相对应,运用R 4.1.1软件绘制桑基图(图2),结果显示I/II期胃癌根治术后患

者的 CTC 计数分布无明显差异; 对照组 CTC 计数主要分布在 7~9、4~6、10~12 个/3.2 mL, 而四藤方组的 CTC 计数主要分布在 1~3、4~6、0 个/3.2 mL, 提示四藤方可降低 CTC 数量。

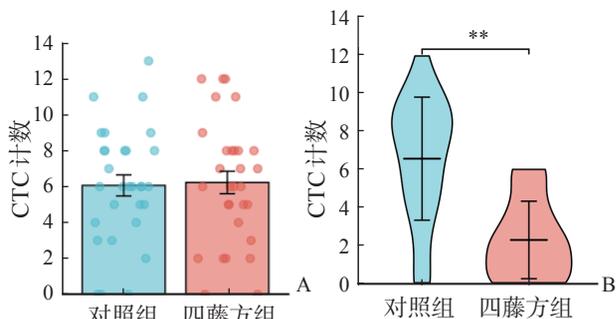


图 1 四藤方对早期胃癌根治术后患者 CTC 计数的影响 A: 治疗前; B: 治疗后. ** $P < 0.01$. $n = 30$. CTC: 循环肿瘤细胞.

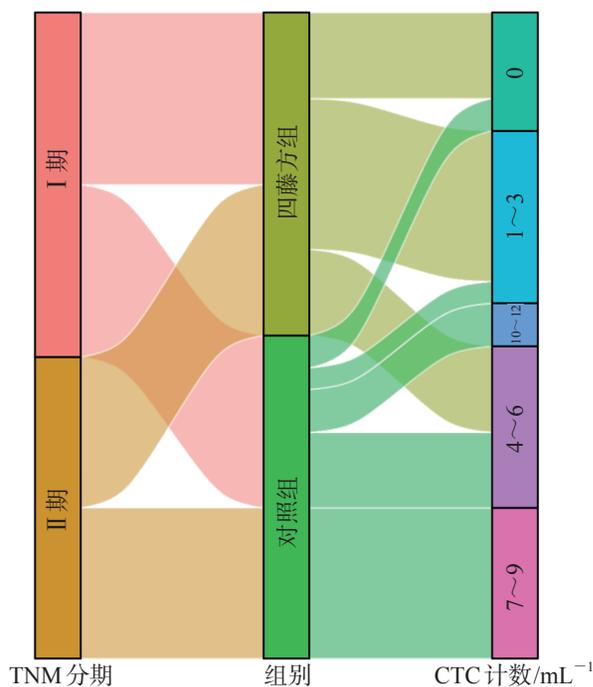


图 2 不同 TNM 分期、不同分组早期胃癌根治术后患者 CTC 计数桑基图
CTC: 循环肿瘤细胞.

3 讨论

胃癌是一种“正虚邪实”的病症, 我院名老中医邱佳信认为在胃癌中“正虚”以脾虚为主, 故脾虚贯穿于胃癌疾病发生发展的始末。运用胃肠安方加减临床治疗胃癌根治术后及复发转移患者效果显著^[18]。四藤方是胃肠安中的小复方, 由红藤、野葡萄藤、藤梨根、菝葜 4 味清热解毒之品构成。红藤又名“大活血”“大血藤”等, 具有解毒消痈、活血止痛、祛风除湿、杀虫等功效。野葡萄藤具有

清热利湿、消肿解毒之功, 善治痲疾、疮疡肿毒之症。藤梨根具有清热解毒、祛风除湿、利尿止血之效, 常用于治疗风湿骨痛、黄疸等症。菝葜味甘、平温、无毒, 可以起到排毒、祛瘀、消炎的作用。四藤方由上述 4 种清热解毒的中药组成, 具有清热解毒、祛湿消肿、软坚化痰的功效, 为治疗胃癌的基本方, 已有多项临床研究证实, 该方既能降低进展期胃癌患者根治术后的转移、复发, 亦能提高患者生存率、改善生存质量、延长带瘤生存期, 并且几乎没有不良反应^[14-16,18]。因此, 我们将该方作为抗癌药物研究的重要筛选对象。

中医治癌在重视“正虚”的同时, 还应重视“癌毒”这一重要因素。华佗曾在《中藏经》中指出: “夫痲疮毒之所作也, 皆五脏六腑蓄毒不流则生矣, 非独荣卫壅塞而发者也”, 提出肿瘤由内在“脏腑蓄毒”所生。我们认为此处提到的“毒蓄”可以理解为毒邪, 古人对人体血液循环的认识尚较粗浅, 而以脏腑作为邪毒深伏的严重程度描述, 实际上和现代的血循环系统密切相关。从癌病的发病病机来看, 本虚标实是癌病的根本, “瘀滞、毒聚、痰凝”是肿瘤形成的主要病理因素, 癌病是人体在正虚的基础上, 由“瘀、毒、痰”等结聚而成。热毒壅阻于经络脏腑, 久而久之, 发为肿瘤; 《医宗金鉴·外科心法要诀》将舌疔的病理归于心脾毒火所致。同时, 阴毒之邪在癌的发病中同样有着重要作用, 脏腑功能衰弱, 气血津液停滞, 阳气虚寒复遭受寒邪侵犯, 日久则形成有形之癥积。

CTC 来源于肿瘤细胞, 具有高度的再生和分化性, 能够促进肿瘤的转移。虽然传统观念认为大多数肿瘤转移发生于肿瘤恶化或进展时, 但随着研究的逐步进展, 人们发现肿瘤在早期就可能发生转移, 远处转移甚至可能发生在原发肿瘤病灶产生之前^[19]。CTC 来源于肿瘤, 且具有转移性、侵袭性, 与中医的“癌毒”具有内在一致的属性。因此, 我们认为, CTC 具有“癌毒”的特征。

近年来, 精准医疗和 4P 医学 (predictive, preventive, personalized, participatory; 个性化、预防性、预见性和参与性) 逐渐兴起, CTC 作为液体活检的典型代表受到医学界关注。CTC 在肿瘤的早期诊断和筛查、评估分期、监测远处转移及复发、验证治疗效果及确定药物敏感性等方面均有应用, 有力地推动了肿瘤个体化治疗的发展。研究表

明, CTC 检出率与多种因素有关, 比如瘤块小、无淋巴结转移、无脉管侵犯、无远处转移的胃癌患者外周血 CTC 检出率低于瘤体大、有淋巴结转移、有脉管侵犯、有远处转移的胃癌患者, 这提示胃癌患者 CTC 检出率与胃癌组织病理学特征具有强相关性; 此外, 接受胃切除术的患者 CTC 计数与瘤体浸润程度、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期、血管浸润和淋巴浸润程度显著相关, CTC 阴性组患者整体生存率与 CTC 阳性组相比显著提高^[20]。

因此, 本课题组开展基于 CTC 的中医药研究, 一方面挖掘其代表的预后意义, 另一方面探讨四藤方治疗胃癌、预防其复发转移的细胞生物学机制。本研究结果表明, 四藤方可下调 CTC 的数量, 这可能是四藤方治疗胃癌、防治其复发转移的细胞生物学基础。本研究样本量小, 仅观察了四藤方对 CTC 的影响, 存在一定的局限性。未来还应结合无进展生存期和总生存期, 加大样本量展开深入研究, 为临床精准使用中药提供可靠依据, 促进中医药在胃癌精准治疗中的应用。

[参 考 文 献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, JEMAL A. Cancer statistics, 2021[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71: 7-33.
- [2] FENG R M, ZONG Y N, CAO S M, XU R H. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 global cancer statistics?[J/OL]. *Cancer Commun (Lond)*, 2019, 39: 22. DOI: 10.1186/s40880-019-0368-6.
- [3] ZHANG Z Y, GE H Y. Micrometastasis in gastric cancer[J]. *Cancer Lett*, 2013, 336: 34-45.
- [4] ZENG C D D, JIN C C, GAO C, XIAO A T, TONG Y X, ZHANG S. Preoperative folate receptor-positive circulating tumor cells are associated with occult peritoneal metastasis and early recurrence in gastric cancer patients: a prospective cohort study[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 769203. DOI: 10.3389/fonc.2022.769203.
- [5] KANG H M, KIM G H, JEON H K, KIM D H, JEON T Y, PARK D Y, et al. Circulating tumor cells detected by lab-on-a-disc: role in early diagnosis of gastric cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12: e0180251. DOI: 10.1371/journal.pone.0180251.
- [6] ZHANG Q Y, SHAN F, LI Z Y, GAO J, LI Y L, SHEN L, et al. A prospective study on the changes and clinical significance of pre-operative and post-operative circulating tumor cells in resectable gastric cancer[J/OL]. *J Transl Med*, 2018, 16: 171. DOI: 10.1186/s12967-018-1544-1.
- [7] LEE S J, LEE J, KIM S T, PARK S H, PARK J O, PARK Y S, et al. Circulating tumor cells are predictive of poor response to chemotherapy in metastatic gastric cancer[J/OL]. *Int J Biol Markers*, 2015, 30: e382-e386. DOI: 10.5301/ijbm.5000151.
- [8] LI Y, ZHANG X, GONG J, ZHANG Q, GAO J, CAO Y, et al. Aneuploidy of chromosome 8 in circulating tumor cells correlates with prognosis in patients with advanced gastric cancer[J]. *Chin J Cancer Res*, 2016, 28: 579-588.
- [9] ITO H, SATO J, TSUJINO Y, YAMAGUCHI N, KIMURA S, GOHDA K, et al. Long-term prognostic impact of circulating tumour cells in gastric cancer patients[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22: 10232-10241.
- [10] MISHIMA Y, MATSUSAKA S, CHIN K, MIKUNIYA M, MINOWA S, TAKAYAMA T, et al. Detection of HER2 amplification in circulating tumor cells of HER2-negative gastric cancer patients[J]. *Target Oncol*, 2017, 12: 341-351.
- [11] 赵爱光, 邱佳信治疗胃癌学术思想初探[J]. *江苏中医药*, 2004, 36: 12-15.
- [12] 沈克平, 刘威, 胡兵, 潘传芳. 四藤方对人胃癌SGC-7901细胞抗失巢凋亡的影响[J]. *世界中西医结合杂志*, 2010, 5: 1025-1028.
- [13] 王菁雯, 何萍, 胡兵, 沈克平. 四藤方对MGC-803胃癌细胞生长的影响及机制研究[J]. *中医学报*, 2020, 35: 2207-2211.
- [14] 陈琴. 化疗联合中药四藤方加减治疗对胃癌术后患者生存质量的影响分析[J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2020, 8: 177-178.
- [15] 毛竹君, 沈克平, 祝利民, 姚琼, 郑嘉露. 化疗联合中药四藤方加减治疗对胃癌术后患者生存质量的影响[J]. *结直肠肛门外科*, 2016, 22: 156-157.
- [16] 汪莉, 李铁, 周正国. 四藤方加减联合化疗对胃癌术后无进展生存期的影响[J]. *四川中医*, 2021, 39: 96-99.
- [17] MALY V, MALY O, KOLOSTOVA K, BOBEK V. Circulating tumor cells in diagnosis and treatment of lung cancer[J]. *In Vivo*, 2019, 33: 1027-1037.
- [18] 杨金坤, 郑坚, 沈克平, 韩颖盈, 顾纓, 朱莹杰, 等. 中药胃肠安防治进展期胃癌根治术后转移的临床研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2003, 23: 580-582.
- [19] KANG Y, PANTEL K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients[J]. *Cancer Cell*, 2013, 23: 573-581.
- [20] UENOSONO Y, ARIGAMI T, KOZONO T, YANAGITA S, HAGIHARA T, HARAGUCHI N, et al. Clinical significance of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer[J]. *Cancer*, 2013, 119: 3984-3991.

[本文编辑] 孙岩