

·针灸推拿·

本文引用: 黎秀秀, 刘 灿, 谢天乐, 吴雨笛, 谭莘巍, 谭 静, 常小荣. 艾灸对胃癌大鼠肿瘤血管正常化时间窗的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(2): 297-304.

艾灸对胃癌大鼠肿瘤血管正常化时间窗的影响

黎秀秀, 刘 灿, 谢天乐, 吴雨笛, 谭莘巍, 谭 静*, 常小荣*

湖南中医药大学针灸推拿与康复学院, 湖南 长沙 410208

[摘要] **目的** 观察艾灸对胃癌(GC)大鼠肿瘤血管正常化的促进作用及动态变化规律,为艾灸辅助胃癌治疗提供新参考。**方法** 采用 Walker256 瘤块胃部移植法构建 GC 大鼠模型,研究分两个阶段进行。第一阶段:将造模成功的 24 只大鼠随机分为模型组、艾灸组、贝伐单抗组,每组 8 只。模型组不干预;艾灸组隔天交替悬灸两组穴位(中脘、关元、足三里;脾俞、胃俞),每次 20 min,每天 1 次,连续 21 d;贝伐单抗组每 4 天尾静脉注射贝伐单抗 5 mg/kg,21 d 内共 5 次。期间密切观察各组大鼠的生存状态、不良反应,每隔 2 天利用光声成像检测肿瘤组织血氧饱和度(SO₂),明确血管正常化时间窗开始($t_{\text{始}}$)、高峰($t_{\text{峰}}$)、结束($t_{\text{末}}$)3 个时间节点。第二阶段:将造模成功的 140 只大鼠分为模型组、艾灸组、贝伐单抗组,每组再设 $t_{\text{始}}$ 、 $t_{\text{峰}}$ 、 $t_{\text{末}}$ 3 个亚组,每个亚组 14 只,造模及干预方法同第一阶段,各组在对应时间点处死动物取材,采用透射电镜、免疫荧光观测肿瘤组织血管内皮细胞形态、血小板内皮细胞黏附分子-1 (CD31)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)改变,同时采用伊文思蓝染色观测肿瘤组织血管渗透功能变化。**结果** 治疗期间,艾灸组大鼠 2 例发生皮肤意外烫伤,贝伐单抗组大鼠 3 例鼻牙龈出血、1 例肠道出血、1 例左后肢偏瘫。生存状态上,干预 15~21 d 时,艾灸组、贝伐单抗组生存状态积分均高于模型组($P<0.05$),同时艾灸组高于贝伐单抗组($P<0.05$)。光声成像检测 SO₂ 显示,艾灸组肿瘤血管正常化窗口期为干预 13~19 d(时间窗共计 7 d, $t_{\text{始}}$ 为 13 d, $t_{\text{峰}}$ 为 17 d, $t_{\text{末}}$ 为 19 d),贝伐单抗组为干预 13~17 d(时间窗共计 5 d, $t_{\text{始}}$ 为 13 d, $t_{\text{峰}}$ 为 15 d, $t_{\text{末}}$ 为 17 d),艾灸组 $t_{\text{峰}}$ (17 d)时 SO₂ 含量明显高于贝伐单抗组($P<0.01$)。与模型组比较,艾灸及贝伐单抗组在 $t_{\text{始}}$ 时各项指标比较差异无统计学意义($P>0.05$);在 $t_{\text{峰}}$ 、 $t_{\text{末}}$ 时,血管内皮细胞形态、基底膜厚度及连续性改善,CD31 表达、伊文思蓝浓度降低($P<0.01$), α -SMA 表达增高($P<0.05$, $P<0.01$)。与贝伐单抗组比较,艾灸组 α -SMA 表达水平稍低,CD31 表达、伊文思蓝浓度稍高,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 艾灸及贝伐单抗治疗均能有效促进胃癌大鼠肿瘤血管正常化,两组对血管结构与功能的改善未见明显差异,但艾灸作用的血管正常化时间窗更长,对生存状态的改善更佳。

[关键词] 胃癌;艾灸;贝伐单抗;肿瘤血管正常化;时间窗;肿瘤微环境

[中图分类号] R245

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.02.010

Effects of moxibustion on the normalization time window of tumor vessel in rats with gastric cancer

LI Xiuxiu, LIU Can, XIE Tianle, WU Yudi, TAN Shenwei, TAN Jing*, CHANG Xiaorong*

School of Acupuncture-Moxibustion, Tuina and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha,

Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To observe the promotive effects and dynamic patterns of moxibustion on the normalization of tumor blood vessels in rats with gastric cancer (GC), and to provide a novel reference for moxibustion as a complementary therapy for gastric cancer. **Methods** A GC rat model was established via gastric transplantation of Walker-256 tumor fragments. The study was conducted in two phases. Phase I: Twenty-four rats with successful modeling were randomized into the model group, moxibustion group, and bevacizumab groups ($n=8$ per group). The model group received no intervention. The moxibustion group received

[收稿日期] 2025-10-15

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(82205296)。

[通信作者] * 常小荣,女,硕士,二级教授,博士研究生导师,E-mail: xrchang1956@163.com;谭 静,女,博士,副教授,硕士研究生导师,E-mail: hugotan0101@163.com。

suspended moxibustion at two alternating sets of acupoints [Zhongwan (CV 12), Guanyuan (CV 4), Zusanli (ST 36); Pishu (BL 20), Weishu (BL 21)] for 20 min once daily for 21 consecutive days. The bevacizumab group received tail vein injections of bevacizumab (5 mg/kg) every 4 days for a total of 5 times within 21 days. During this period, survival status and adverse reactions of rats were observed. Oxygen saturation (SO_2) within the tumor was monitored every two days using photoacoustic imaging to identify three time points: the onset (t_{start}), peak (t_{peak}), and end (t_{end}) of the vascular normalization window. Phase II: the 140 successful modeled rats were divided into model group, moxibustion group, and bevacizumab group. Each group was further subdivided into t_{start} , t_{peak} , and t_{end} subgroups ($n=14$ per subgroup). The modeling and intervention methods were the same as those in the first phase. Rats in each group were sacrificed at the corresponding time points for sample collection. The morphology of vascular endothelial cells in tumor tissues, the changes of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) and α -smooth muscle actin (α -SMA) were observed by transmission electron microscopy and immunofluorescence. Meanwhile, Evans blue staining was used to observe the changes of vascular permeation function in tumor tissues. **Results** During the treatment period, two rats in moxibustion group had accidental skin burns, while three rats in bevacizumab group had epistaxis and gingival bleeding, and one had intestinal bleeding, and one had hemiplegia of the left hind limb. In terms of survival status, at 15–21 days of intervention, survival scores in both the moxibustion group and bevacizumab groups were significantly higher than those in the model group ($P<0.05$), and moxibustion group outperformed the bevacizumab group ($P<0.05$). Photoacoustic imaging showed that the normalization window for moxibustion group lasted 7 days (day 13–19; $t_{start}=13$ d, $t_{peak}=17$ d, $t_{end}=19$ d), while the bevacizumab group lasted 5 days (day 13–17; $t_{start}=13$ d, $t_{peak}=15$ d, $t_{end}=17$ d). The SO_2 level at t_{peak} (17 d) was significantly higher in moxibustion group than in the bevacizumab group ($P<0.01$). Compared with the model group, there was no statistically significant difference in each index at t_{start} between the moxibustion and bevacizumab groups ($P>0.05$). At t_{peak} and t_{end} both interventions improved endothelial morphology and basement membrane integrity, decreased CD31 expression and Evans blue concentration ($P<0.01$), and increased α -SMA expression ($P<0.05$, $P<0.01$) compared to model group. Compared with the bevacizumab group, moxibustion group showed slightly lower α -SMA expression and slightly higher CD31 expression and Evans blue concentration, though these differences were not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion** Both moxibustion and bevacizumab treatment effectively promote tumor vascular normalization in rats with GC. While the two interventions show no significant difference in improving vascular structure and function, moxibustion induces a longer normalization window and provides superior benefits in improving survival status.

[**Keywords**] gastric cancer; moxibustion; bevacizumab; tumor vascular normalization; time window; tumor microenvironment

胃癌(gastric cancer, GC)作为全球高发恶性肿瘤,其发病率与死亡率分别位列全球恶性肿瘤的第五位和第四位^[1]。不仅给患者带来沉重的身心及经济负担,更对中晚期 GC 的临床诊疗构成重大挑战。肿瘤血管异常增生是实体瘤发生发展及治疗抵抗的核心病理环节,通过诱导肿瘤血管正常化(降低瘤体血管密度、修复血管结构完整性),既可直接抑制瘤体进展,又能为肿瘤综合治疗增效提供条件^[2]。然而,临床常用的抗血管生成药物(如贝伐单抗、舒尼替尼等)普遍存在血管正常化时间窗短、不良反应显著、医疗成本昂贵等局限^[3]。为此,探寻安全有效、经济可行的替代方式具有重要意义。

本课题组长期聚焦艾灸抗肿瘤效应研究,前期实验证实,艾灸可有效抑制 GC 大鼠瘤体增殖、激活肿瘤免疫微环境,同时能下调瘤体内血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor, VEGF-A)的表达,降低血管密度^[4-9]。但艾灸诱导的肿瘤血管改变是否达到正常化状态?其是否存在明确的血管正常化时间窗?与抗血管生成药物相比,艾灸的调控效应是否具备优势?这些关键问题尚未明确。基于

此,本研究以 GC 大鼠为研究对象,以艾灸为干预手段、贝伐单抗为阳性对照,采用活体光声成像结合离体组织免疫荧光、透射电镜等技术,系统探究艾灸对 GC 瘤体血管正常化的促进作用及时间窗特征,通过阐明艾灸诱导 GC 血管正常化的动态规律,为 GC 综合治疗提供新的思路与实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

健康 SD 大鼠 12 只,雌性,100~120 g,用于皮下瘤体制备;健康 SD 大鼠 164 只,雄性,220~240 g,用于 GC 大鼠模型制备及分组实验。所有大鼠购自湖南斯莱克景达实验有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)20240019,分笼饲养于湖南中医药大学实验动物中心(实验设施使用号:SYXK20240014),饲养温度 20~25 ℃,湿度 50%~70%,12 h/12 h 明暗交替,自由摄食饮水。所有实验方案经湖南中医药大学伦理委员会审批通过(伦理编号:LL2023060706)。

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 主要试剂 艾条(湖香艾生物科技有限公

司,规格:0.7 cm×12 cm);贝伐单抗(上海强耀生物科技有限公司,批号:2025112001);DAPI染色液(长沙艾碧维生物科技有限公司,批号:AWC0293a);血小板内皮细胞黏附分子-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1/CD31)小鼠单克隆抗体、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)重组兔单克隆抗体、山羊抗小鼠 IgG(H+L) Alexa Fluor 488 标记二抗、山羊抗兔 IgG(H+L) Alexa Fluor 488 标记二抗(长沙艾碧维生物科技有限公司,货号:AWA00516、AWA10574、AWS0003、AWS0005);伊文思蓝溶液(中国国药集团化学试剂有限公司,批号:DK0001)。

1.2.2 主要仪器 多通道可编程超声成像平台(美国 Verasonics 公司,型号:Vantage256);脉冲延时发生器(美国 SRS 公司,型号:DG645);线性阵列超声换能器(美国 Verasonics 公司,型号:L11-5v);小动物麻醉机(中国RWD公司,型号:R500系列);高速离心机(美国 SCILOGEX 公司,型号:CF1524R);包埋机(常州中威电子仪器公司,型号:ZW-BM-VI);光学显微镜(中国麦克奥迪公司,型号:AE2000);数码相机(德国 EMSISGMBH 公司,型号:VHX-7000);透射电子显微镜(日本电子公司,型号:JEM-1400Plus);切片机(德国 Leica 公司,型号:RM2245)。

1.3 模型制备

参考相关文献并结合前期实验^[7,10],本研究采用 Walker256 瘤块胃部移植法构建 GC 大鼠模型,模型构建流程主要包括细胞悬液制备与接种、皮下瘤诱导、瘤块胃部移植 3 步,具体操作如下:将 Walker256 细胞浓度调整为 3×10^7 个的单细胞悬液,腹腔注射 0.5 mL 细胞悬液于体质量为 100~120 g 雌性 SD 大鼠,待诱发明显腹水后,收集腹水,与生理盐水以 1:1 混合后,皮下注射于 100~120 g 的 SD 雌性大鼠右前、右后肢,每部位 1 mL。每天观察注射部位瘤体生长情况,待皮下形成大小约 1.5 cm×1.5 cm×1 cm 的皮下瘤,无菌条件下剖取瘤体切成 0.2 cm×0.2 cm×0.2 cm 的瘤块,用组织生物胶黏合在雄性大鼠胃大弯侧前胃、腺胃交界处。模型验证按照剖腹探查+组织学 HE 染色的方法进行,具体方法如下:移植术 7 d 后,随机抽取 10 只剖腹探查,若原移植处形成直径 1 cm 以上呈鱼肉样的瘤体,表面光滑边界清晰,组织学 HE 染色证实与皮下实体瘤同源,提示造模成功。

1.4 实验分组

将造模成功的大鼠分两个阶段开展实验。第一阶段:取造模成功大鼠 24 只,采用随机数字表法分

为模型组、艾灸组、贝伐单抗组,每组 8 只,通过光声成像技术探索干预后肿瘤血管正常化的 $t_{\text{始}}$ 、 $t_{\text{峰}}$ 及 $t_{\text{末}}$;第二阶段,取造模成功大鼠 140 只,依据第一阶段确定的 $t_{\text{始}}$ 、 $t_{\text{峰}}$ 、 $t_{\text{末}}$ 时间点,采用随机数字表法分为模型组、艾灸组、贝伐单抗组及各时间亚组,具体如下:模型 13 d 组、模型 15 d 组、模型 17 d 组、模型 19 d 组;艾灸 13 d 组、艾灸 17 d 组、艾灸 19 d 组;贝伐单抗 13 d 组、贝伐单抗 15 d 组、贝伐单抗 17 d 组。共 10 组,每组 14 只。每组中 8 只用于瘤体组织血管内部结构观察,6 只用于血管渗透功能检测。

1.5 干预方法

艾灸组:施灸穴位分为两组。I组:中脘、关元、足三里(双侧);II组:脾俞(双侧)、胃俞(双侧)。穴位参照《实验针灸学》^[11]常用动物穴位定位结合拟人法选取。施灸时,采用直径 7 mm 艾条在穴位悬灸,利用表面测温仪监测表皮温度,适时除去艾灰、调整施灸高度,确保表皮温度在 $(42 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。每次施灸 20 min,每天 1 次,两组穴位隔天交替操作,连续 21 d。贝伐单抗组:从入组的第 1 天起,每隔 4 天尾静脉注射贝伐单抗 5 mg/kg,21 天内共注射 5 次。此外,艾灸组、模型组在贝伐单抗组注射时陪同注射等量生理盐水,模型组、贝伐单抗组在艾灸治疗期间陪同抓取固定。

1.6 观察指标及检测方法

1.6.1 大鼠生存状态积分及不良反应观察 每天观察大鼠的一般情况,进行生存状态积分评分并记录不良反应。评分标准参考文献^[9],具体如下:正常大鼠,行为活动无异常,被毛顺滑有光泽(5分);呼吸平稳,对外界刺激反应灵敏,能够站立和行走,但步态略缓,被毛光泽度稍减(4分);神志清楚,无法以四肢协调站立及行走,但仍可自主爬行,部分区域脱毛,被毛质地偏硬、颜色发黄(3分);呈现嗜睡状态,反应迟缓,呼吸加快、幅度浅,呼吸运动尚存在,脱毛范围较大,被毛粗糙,背部毛发竖立显著(2分);处于昏迷状态,静止不动,仅存在微弱的腹式呼吸(浅而慢),或呼吸节律明显异常,对外界刺激几乎无反应,或反应极度迟缓,全身被毛耸立(1分);死亡(0分)。

1.6.2 光声成像检测肿瘤组织内血氧饱和度(oxygen saturation, SO_2) 由于肿瘤血管血氧变化为渐进性生理过程,每天检测难以体现动态变化差异,同时为减少大鼠应激,故自干预第 1 天开始,每隔 2 天利用光声断层成像系统检测肿瘤组织内血红蛋白(Hb)浓度及含氧血红蛋白(HbO_2)浓度。检测前,大鼠

需禁食 12 h 后用生理盐水灌胃,异氟烷吸入麻醉并将胃腔部待检测区域脱毛。检测时,将超声凝胶均匀涂抹在大鼠暴露部位并紧密贴合在光声断层成像系统水槽的底部。参考文献[12]分别使用 650 nm、830 nm 的激发波长测定 Hb 浓度和 HbO₂ 浓度,并按照以下公式计算 SO₂。其中:C 是 HbO₂ 和 Hb 的浓度, ϵ 是 HbO₂ 和 Hb 在 650 nm 和 830 nm 下的摩尔消光系数,PA 是对应波长下的光声幅值,F 为光通量^[13]。

$$\begin{bmatrix} C_{\text{HbO}_2} \\ C_{\text{Hb}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \epsilon_{\text{HbO}_2}^{650} & \epsilon_{\text{Hb}}^{650} \\ \epsilon_{\text{HbO}_2}^{830} & \epsilon_{\text{Hb}}^{830} \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} PA_{650}/F_{650} \\ PA_{830}/F_{830} \end{bmatrix}$$

$$SO_2 = \frac{C_{\text{HbO}_2}}{C_{\text{Hb}} + C_{\text{HbO}_2}}$$

1.6.3 透射电镜观察肿瘤组织内血管结构 处死大鼠,取约 2 mm×2 mm×2 mm 大小肿瘤组织样本,依次进行固定、脱水、浸透、包埋、烘烤、切片、电子染色(铅、铀染色)。用透射电镜观察,用数码相机记录图像。

1.6.4 免疫荧光检测肿瘤组织内 CD31、 α -SMA 的表达 采用免疫荧光对各组大鼠肿瘤组织 CD31 和 α -SMA 表达进行检测。取部分肿瘤组织进行包埋并切片;将切片浸入 Tris-EDTA 抗原修复液(pH 9.0),电炉加热至沸腾后断电,连续煮 20 min 后,冷却 20 min 至室温;PBS(pH 7.2~7.6)洗涤 3 min×3 次;室温下置于硼氢化钠溶液中 30 min,水冲洗 5 min;室温下置于 75%乙醇水溶液中 10 s;室温下置于苏丹黑溶液中 10 min,水冲洗 5 min;室温下置于 75%乙醇水溶液中 5 min,5% BSA 封闭 60 min;孵育一抗,滴加适当稀释的一抗(1:100),4 ℃过夜;PBS洗涤 3 min×3 次,滴加适当二抗标记荧光抗体,37 ℃孵育 90 min;DAPI 工作液 37 ℃染核 10 min,PBS 冲洗 5 min×3 次;缓冲甘油封片。采用荧光显微镜电脑采集图像,使用 ImageJ 软件对视野下的阳性表达部位的累积光密度(IOD)进行分析。

1.6.5 伊文思蓝染色观察肿瘤组织内血管渗透 按照 2 mL/kg 剂量尾静脉注射 5%伊文思蓝溶液。注射 1 h 后,对大鼠进行麻醉。在肿瘤切除前,立即经左心室高压灌注生理盐水,以彻底清除全身血液及血管内残留的伊文思蓝,随后灌注 4%多聚甲醛溶液进行血管灌注及组织预固定。接着完整剥离肿瘤组织并称量分割为约 100 mg 的组织块,将其分别置于含 2 mL N,N-二甲基甲酰胺的离心管中。使用组织破碎机充分破碎组织后,于 37 ℃条件下避光萃取 24 h。

萃取完成后,在半径 5.5 cm、转速 15 000 r/min 的条件下离心 10 min,收集上清液。采用紫外分光光度计在 620 nm 波长处测定上清液中伊文思蓝的吸光度,进而计算其浓度。

1.7 统计学分析

所有数据使用 SPSS 25.0 软件处理。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,先进行正态性检验和方差齐性检验:满足正态性和方差齐性,两组间比较采用 t 检验;不满足正态性时,采用秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不良反应情况及生存状态积分比较

治疗期间,艾灸组大鼠 2 例发生皮肤意外烫伤;贝伐单抗组大鼠出现 1 例胃肠道出血,1 例左后肢偏瘫,3 例大鼠鼻牙龈出血。与模型组比较,艾灸组及贝伐单抗组在干预 15~21 d 生存状态积分增高($P<0.05$);与贝伐单抗组相比,艾灸组在干预 15~21 d 生存状态积分更高($P<0.05$)。详见图 1。

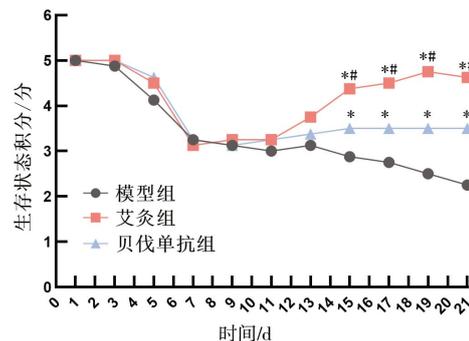


图 1 各组大鼠干预期间生存状态积分比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig.1 Comparison of survival status scores of rats among groups during the intervention period ($\bar{x}\pm s, n=8$)

注:与模型组相比,* $P<0.05$,与贝伐单抗组相比,# $P<0.05$ 。

2.2 各组大鼠肿瘤组织 SO₂ 比较

与模型组比较,艾灸组在干预 13~19 d SO₂ 增高($P<0.01$),其中干预 13 d 起 SO₂ 开始出现增高差异,干预 17 d 增高差异最明显,干预 19 d 后无差异,故认为艾灸组肿瘤血管正常化 $t_{\text{始}}$ 为 13 d、 $t_{\text{峰}}$ 为 17 d、 $t_{\text{末}}$ 为 19 d,时间窗共计 7 d;与模型组比较,贝伐单抗组在干预 13~17 d SO₂ 增高 ($P<0.05, P<0.01$),其中干预 13 d 起 SO₂ 开始出现增高差异,干预 15 d 增高差异最明显,干预 17 d 后无差异,故认为贝伐单抗组肿瘤血管正常化 $t_{\text{始}}$ 为 13 d、 $t_{\text{峰}}$ 为 15 d、 $t_{\text{末}}$ 为 17 d,时间窗共计 5 d。与贝伐单抗组比较,艾灸组 $t_{\text{峰}}$ (干预 17 d)SO₂ 含量增高($P<0.01$)。详见图 2。

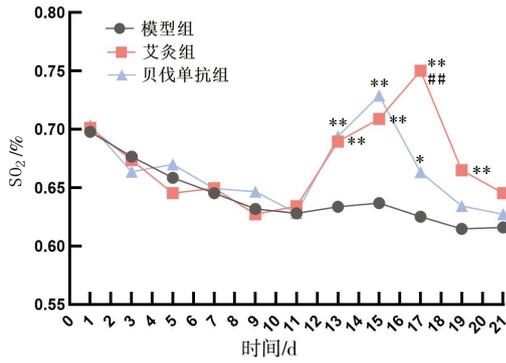


图2 各组大鼠干预期间肿瘤组织 SO₂ 比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig.2 Comparison of tumor tissue blood oxygen saturation (SO₂) of rats among groups during the intervention period ($\bar{x}\pm s, n=8$)

注:与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与贝伐单抗组相比,## $P<0.01$ 。

2.3 各组大鼠肿瘤组织血管形态比较

模型组肿瘤组织血管结构呈进行性异常改变,具体表现为血管内皮细胞形态扭曲,血管管腔形态不规则、管腔大小异质性显著,基底膜厚度分布不均、连续性缺损,甚则基底膜边界模糊消失。艾灸组在干预 13 d 时,肿瘤组织内血管基底膜仍厚度不均、不连续;但至干预 17、19 d 时,基底膜厚度显著增加,连续性基本恢复完整,血管结构呈现向正常化重塑的趋势。贝伐单抗组在干预 13 d 时,肿瘤组织内血管内皮细胞形态已相对规则,部分呈椭圆饱

满状,细胞间连接紧密;干预 15 d 后,血管基底膜明显增厚,连续性得到显著改善,厚度开始趋于均一;至干预 17 d 时,呈现出成熟、稳定的正常血管形态学特征。详见图 3。

2.4 各组大鼠肿瘤组织 CD31 表达比较

与模型组比较,艾灸组及贝伐单抗组在 $t_{\text{始}}$ (13 d) 时肿瘤组织内 CD31 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$);但在 $t_{\text{峰}}$ (艾灸组 17 d,贝伐单抗组 15 d)、 $t_{\text{末}}$ (艾灸组 19 d,贝伐单抗组 17 d) 时 CD31 表达均降低 ($P<0.01$)。在上述 $t_{\text{峰}}$ 、 $t_{\text{末}}$ 时,贝伐单抗组 CD31 表达与艾灸组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。详见图 4。

2.5 各组大鼠肿瘤组织 α -SMA 表达比较

与模型组比较,艾灸组及贝伐单抗组在 $t_{\text{始}}$ (13 d) 时肿瘤组织内 α -SMA 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$);但在 $t_{\text{峰}}$ (艾灸组 17 d,贝伐单抗组 15 d)、 $t_{\text{末}}$ (艾灸组 19 d,贝伐单抗组 17 d) 时 α -SMA 表达均增高 ($P<0.05, P<0.01$)。在上述 $t_{\text{峰}}$ 、 $t_{\text{末}}$ 时,贝伐单抗组 α -SMA 表达与艾灸组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。详见图 5。

2.6 各组大鼠肿瘤组织血管渗透性比较

与模型组比较,艾灸组及贝伐单抗组在 $t_{\text{始}}$ (13 d)

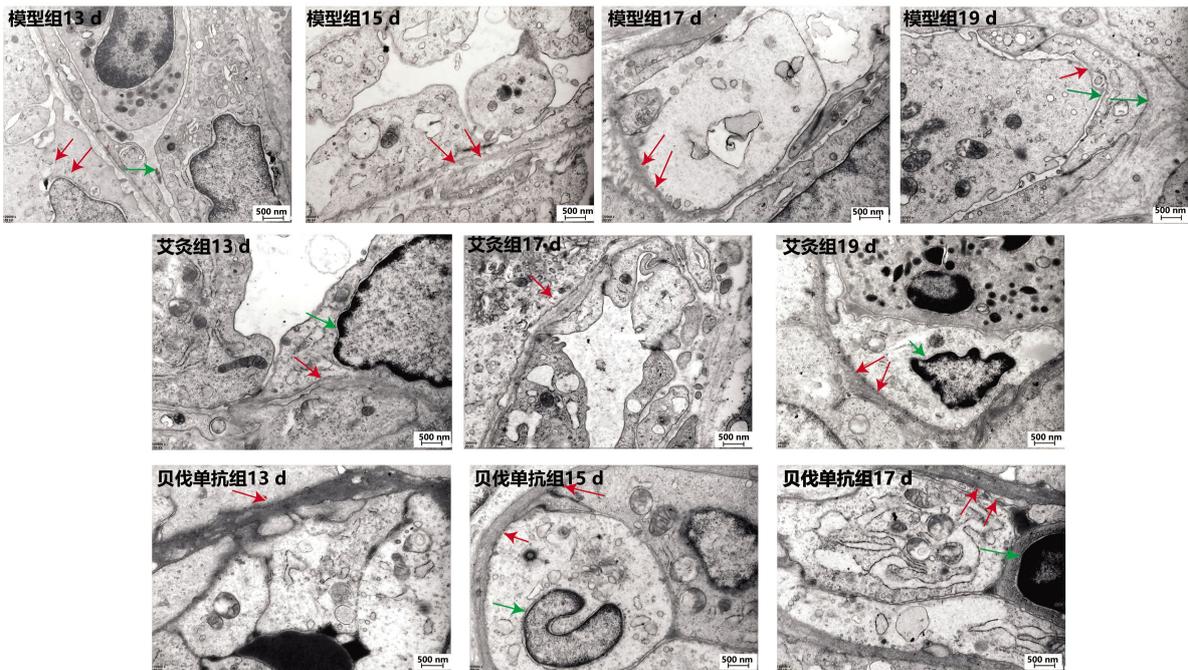


图3 各组大鼠 $t_{\text{始}}$ 、 $t_{\text{峰}}$ 、 $t_{\text{末}}$ 肿瘤组织微血管电镜图 ($\times 20\ 000$)

Fig.3 Electron micrographs of tumor tissue microvessels of rats in each group at t_{start} , t_{peak} , and t_{end} ($\times 20\ 000$)

注:绿色箭头是内皮细胞,红色箭头是基底膜。

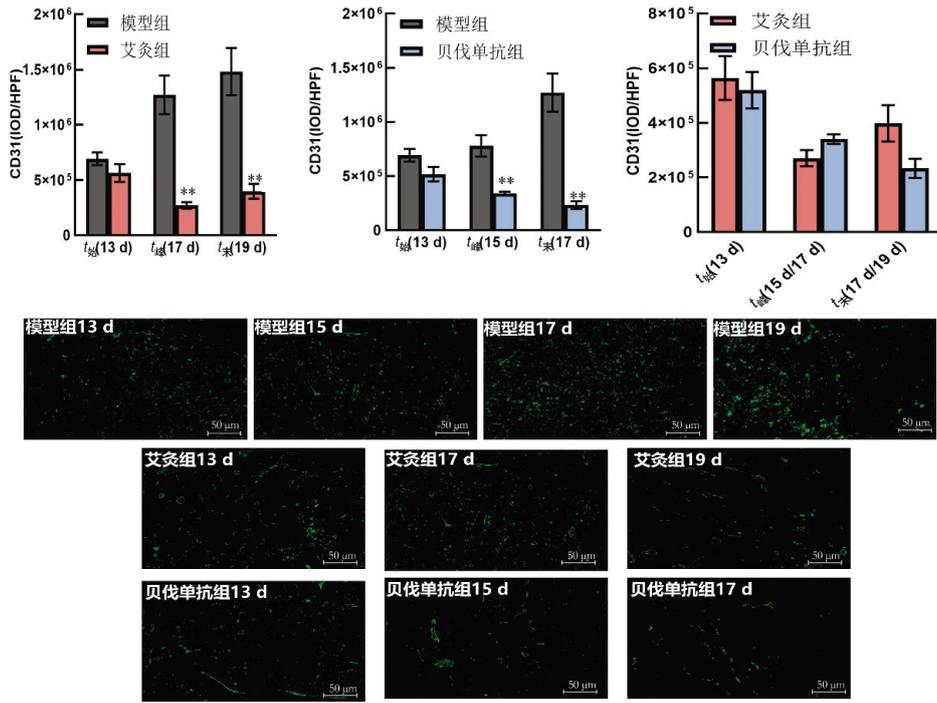


图 4 各组大鼠 t_{start} 、 t_{peak} 、 t_{end} 肿瘤组织 CD31 表达比较与免疫荧光图 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig.4 Comparison of CD31 expression and representative immunofluorescence images in tumor tissues of rats among groups at t_{start} , t_{peak} , and t_{end} ($\bar{x} \pm s, n=8$)

注:与模型组相比,** $P < 0.01$ 。

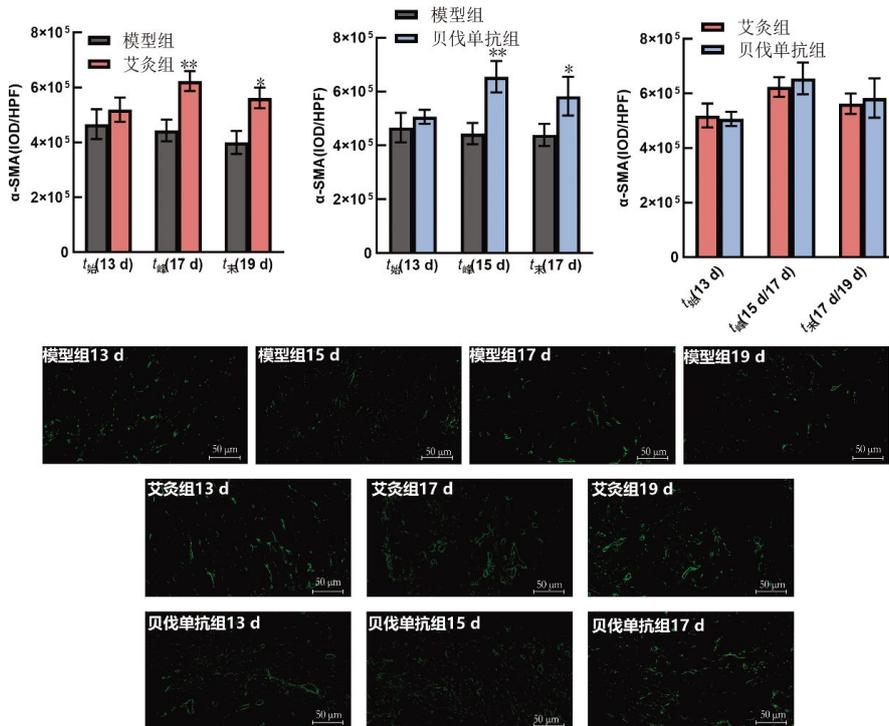


图 5 各组大鼠 t_{start} 、 t_{peak} 、 t_{end} 肿瘤组织 α -SMA 表达比较与免疫荧光图 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig.5 Comparison of α -SMA expression and representative immunofluorescence images in tumor tissues of rats among groups at t_{start} , t_{peak} , and t_{end} ($\bar{x} \pm s, n=8$)

注:与模型组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

时肿瘤组织内伊文思蓝浓度差异无统计学意义 ($P > 0.05$);但在 t_{peak} (艾灸组 17 d,贝伐单抗组 15 d)、 t_{end} (艾灸组 19 d,贝伐单抗组 17 d)时伊文思蓝浓度均

降低 ($P < 0.01$)。在上述 t_{peak} 及 t_{end} 时,贝伐单抗组伊文思蓝浓度与艾灸组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见图 6。

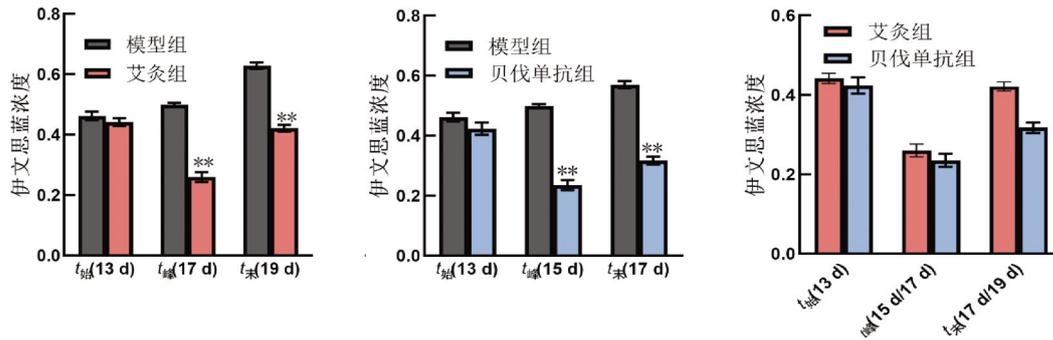


图6 各组大鼠 $t_{\text{始}}$ 、 $t_{\text{峰}}$ 、 $t_{\text{末}}$ 肿瘤组织伊文思蓝浓度比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig.6 Comparison of Evans blue concentrations in tumor tissues of rats among groups at t_{start} ,

t_{peak} , and t_{end} ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

注:与模型组相比,** $P < 0.01$ 。

3 讨论

肿瘤血管正常化是指通过特定治疗手段,使异常肿瘤血管在结构和功能上部分恢复至正常状态,这一概念由 Rakesh K. Jain 教授团队率先提出,区别于传统抗血管生成治疗以“饿死肿瘤”为目标的策略,血管正常化更侧重于改善血管功能,优化肿瘤微环境^[4]。研究表明,肿瘤血管正常化可通过改善血流灌注和缺氧微环境,显著增强化疗药物的输送效率,提升肿瘤的抑制效果^[15]。同时,促进肿瘤血管正常化可逆转肿瘤免疫抑制微环境,有利于细胞毒性 T 细胞浸润并与免疫检查点抑制剂产生协同效应^[16]。但血管正常化窗口具有瞬时性,早期通过抑制血管生成、促进周细胞招募及基底膜修复,可有效降低渗漏并稳定血流灌注,进入血管功能优化的“黄金期”^[17]。但后期肿瘤细胞可代偿性上调 VEGF、血管生成素-2 等因子,诱导内皮增殖或周细胞脱落,导致血管结构再次紊乱,最终逆转正常化状态^[18]。另外,窗口期的持续时长也存在显著异质性,受肿瘤类型、病理分期、治疗方案及个体差异等多重因素影响。例如,血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)抑制剂在胶质母细胞瘤模型中诱导的血管正常化窗口期为 7~10 d,而结直肠癌、乳腺癌模型中窗口期可能缩短至 3~5 d,其他癌症晚期的窗口期往往更短、稳定性更差^[19-21]。同时,主流抗血管生成制剂(如 VEGFR 抗体、酪氨酸激酶抑制剂)也存在耐药性高、毒副作用明显及价格昂贵等局限,难以满足长期治疗需求^[22-23]。

近年来,艾灸作为传统外治手段,在抗肿瘤治疗中表现出良好潜力。中医学认为,艾灸功擅温阳散寒、

活血化瘀、大补元气,作为“纯阳温热”外治法的代表,其治疗特性与 GC“阴寒凝滞,瘀血内阻”的核心病机高度契合,符合《素问·至真要大论篇》“寒者热之”“劳者温之”的经典治则。临床实践表明,艾灸在缓解肿瘤患者疲乏、疼痛症状,提升机体免疫功能,改善化疗所致骨髓抑制,减轻恶心、呕吐等消化道毒副反应方面疗效确切,可显著优化患者的生存质量^[24-26]。现代研究证实,艾灸产生的温和温热效应可特异性刺激局部感受器,激活热敏感免疫细胞,启动“温通气血”的生物学效应,这为血管结构及功能的修复与正常化创造了有利条件^[7]。艾灸也可通过多系统、多靶点的整体调节重塑肿瘤微环境信号网络,形成肿瘤微环境内免疫激活与肿瘤血管正常化之间的交互正反馈,实现“抑瘤”与“护正”的有机统一^[8]。

本研究通过综合评估 SO_2 、周细胞覆盖率、血管结构及渗透性等指标,能较好地形态结构、功能代谢、分子表型 3 个维度量化血管正常化的程度与动态变化过程。伊文思蓝灌注实验可通过检测染料渗漏程度,反映血管内皮屏障功能的完整性^[27]。 SO_2 作为组织氧供状态的直接表征,可同步反映血管正常化后微循环灌注改善对肿瘤缺氧微环境的缓解效果^[28]。分子层面,CD31 作为血管内皮细胞特异性标志物,可用于定量分析血管密度及内皮细胞完整性,评估血管新生与重塑水平^[29]。 α -SMA 作为周细胞标志性蛋白,其表达水平可反映周细胞对血管的包裹程度,直接关联血管结构稳定性与成熟度^[30]。本研究通过观察艾灸后这些指标的变化并与贝伐单抗对照,发现艾灸与贝伐单抗均能有效诱导肿瘤血管正常化,但二者的调控呈现出明显的时间特征差异:贝伐单抗表现为快速起效、中期达峰的特点,艾灸则呈

现渐进式增强、长效稳控的规律。虽然早期艾灸诱导血管正常化的效应弱于贝伐单抗,但艾灸的时间窗更长,同时具有操作简便、安全、经济等特征,在抗肿瘤综合治疗中具有潜在优势。

参考文献

- [1] HE F F, WANG S M, ZHENG R S, et al. Trends of gastric cancer burdens attributable to risk factors in China from 2000 to 2050[J]. *The Lancet Regional Health-Western Pacific*, 2024, 44: 101003.
- [2] QIAN C, LIU C Q, LIU W W, et al. Targeting vascular normalization: A promising strategy to improve immune-vascular crosstalk in cancer immunotherapy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1291530.
- [3] LIU Z L, CHEN H H, ZHENG L L, et al. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8: 198.
- [4] 陈欲攀. 艾灸对荷瘤胃癌大鼠肿瘤生长的抑制作用及营养代谢的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2019.
- [5] 彭卓隽, 林亚平, 谭静, 等. 艾灸对胃荷瘤大鼠生存状态及骨骼肌代谢的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2019, 39(12): 1488-1492.
- [6] 赵欢. 艾灸对荷瘤胃癌大鼠骨骼肌消耗的治疗作用与机制探讨[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2019.
- [7] 谭静. 艾灸诱导 HSP70 对胃癌大鼠肿瘤生长及免疫功能的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2019.
- [8] 谢天乐. 艾灸调节 VEGF-A 表达对胃癌大鼠肿瘤血管正常化及免疫微环境的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2025.
- [9] 谭静, 林亚平, 赵欢, 等. 艾灸对胃荷瘤大鼠瘤体内 Th1、Th2 类细胞因子表达的影响[J]. *免疫学杂志*, 2019, 35(12): 1061-1066.
- [10] 隋英忠, 夏玉军, 王晓静, 等. 构建 SD 大鼠移植性胃癌模型及不同方法诱癌率的比较[J]. *中国临床研究*, 2014, 27(2): 135-137.
- [11] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 125.
- [12] LAUFER J, DELPY D, ELWELL C, et al. Quantitative spatially resolved measurement of tissue chromophore concentrations using photoacoustic spectroscopy: Application to the measurement of blood oxygenation and haemoglobin concentration[J]. *Physics in Medicine & Biology*, 2007, 52(1): 141.
- [13] KOCSIS L, HERMAN P, EKE A. The modified Beer-Lambert law revisited[J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2006, 51(5): N91-N98.
- [14] JAIN R K. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: A new paradigm for combination therapy[J]. *Nature Medicine*, 2001, 7(9): 987-989.
- [15] JAIN R K. Antiangiogenesis strategies revisited: From starving tumors to alleviating hypoxia[J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(5): 605-622.
- [16] TIAN L, GOLDSTEIN A, WANG H, et al. Mutual regulation of tumour vessel normalization and immunostimulatory reprogramming[J]. *Nature*, 2017, 544(7649): 250-254.
- [17] ZHENG R Q, LI F F, LI F C, et al. Targeting tumor vascularization: Promising strategies for vascular normalization[J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2021, 147(9): 2489-2505.
- [18] BIEL N M, SIEMANN D W. Targeting the Angiopoietin-2/Tie-2 axis in conjunction with VEGF signal interference[J]. *Cancer Letters*, 2016, 380(2): 525-533.
- [19] MPEKRIS F, BAISH J W, STYLIANOPOULOS T, et al. Role of vascular normalization in benefit from metronomic chemotherapy[J]. *PNAS*, 2017, 114(8): 1994-1999.
- [20] WINKLER F, KOZIN S V, TONG R T, et al. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: Role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases[J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(6): 553-563.
- [21] KLOEPPER J, RIEDEMANN L, AMOOZGAR Z, et al. Ang-2/VEGF bispecific antibody reprograms macrophages and resident microglia to anti-tumor phenotype and prolongs glioblastoma survival[J]. *PNAS*, 2016, 113(16): 4476-4481.
- [22] WANG Y F, CUI C J, REN X Y, et al. Cardiovascular toxicity associated with angiogenesis inhibitors: A comprehensive pharmacovigilance analysis based on the FDA Adverse Event Reporting System database from 2014 to 2021[J]. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2022, 9: 988013.
- [23] KUO H Y, KHAN K A, KERBEL R S. Antiangiogenic-immune-checkpoint inhibitor combinations: Lessons from phase III clinical trials[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2024, 21(6): 468-482.
- [24] 海霞, 赵中亭, 王小霞, 等. 基于双向良性调节的艾灸缓解癌性疼痛研究进展[J]. *甘肃中医药大学学报*, 2025, 42(3): 63-68.
- [25] 王莹, 张明, 李湘奇. 艾灸对三阴性乳腺癌新辅助化疗患者 T 细胞亚群及生活质量的影响[J]. *中国中医药科技*, 2025, 32(4): 626-629.
- [26] 余婷. 艾灸得气辅助肿瘤治疗提高生活质量的临床研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2024.
- [27] 侯瑞青. 伊文氏蓝血管显影方法及其在脊髓损伤中的应用[D]. 上海: 上海交通大学, 2009.
- [28] FANG Z G, WANG C L, YANG J R, et al. Oxyhaemoglobin saturation NIR-IIb imaging for assessing cancer metabolism and predicting the response to immunotherapy[J]. *Nature Nanotechnology*, 2024, 19(1): 124-130.
- [29] CHEUNG K, MA L, WANG G S, et al. CD31 signals confer immune privilege to the vascular endothelium[J]. *PNAS*, 2015, 112(43): E5815-E5824.
- [30] TONINO P, ABREU C. Microvessel density is associated with VEGF and α -SMA expression in different regions of human gastrointestinal carcinomas[J]. *Cancers*, 2011, 3(3): 3405-3418.