

通莲 I 号方抑制小鼠食管癌移植瘤生长作用及其机制研究

张艳丽¹ 贾永森² 赵 刃³ 包巨太²

(1.迁安燕山医院,河北迁安 064400; 2.河北联合大学中医学院,河北唐山 063000;
3.唐山市中医医院,河北唐山 063000)

摘要 目的:研究通莲 I 号方对食管癌 Eca109 细胞荷瘤小鼠的抑瘤作用及其对肿瘤组织免疫因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的影响。方法:食管癌 Eca109 细胞接种于小鼠右前肢皮下。小鼠随机分为模型组和通莲 I 号方低、中、高剂量组,分别灌胃生理盐水和通莲 I 号方各剂量。各组连续给药 3 周,末次给药结束 3 周后分离小鼠瘤组织,计算抑瘤率,ELISA 法检测肿瘤组织上清液 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 含量。结果:通莲 I 号方高剂量组瘤重明显低于模型组($P<0.05$),抑瘤率明显高于通莲 I 号方低剂量组($P<0.05$)。HE 染色可见,通莲 I 号方高剂量组的肿瘤细胞淡染,核分裂较少,可见较多肿瘤细胞肿胀变性坏死。通莲 I 号方高剂量组肿瘤组织 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 表达明显低于模型组与通莲 I 号方中、低剂量组($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:通莲 I 号方可抑制小鼠食管癌 Eca109 细胞移植瘤生长,其抑瘤机制与下调肿瘤组织 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 等因子水平,增强免疫调节有关。

关键词 通莲 I 号方 食管癌 Eca109 细胞 荷瘤小鼠 肿瘤坏死因子- α 白介素-6 白介素-8 病理学
中图分类号 R735.1 **文献标识码** A **文章编号** 1672-397X(2015)04-0075-03

食管癌属于中医“噎膈”范畴,病机多为气滞、痰阻和血瘀阻滞食道,造成津伤血枯,食管干涩,饮食难下。有报道显示,中国男、女食管癌发病率和死亡率均居全球第 1 位^[1]。本研究组创制活血行气复方——“通莲 I 号方”治疗食管癌获得了较好的临床疗效,并已获得国家专利^[2]。前期研究表明,该方可调节细胞周期抑制食管癌细胞增殖^[3],其抑癌分子机制与下调核因子 kappa B(NF- κ B)信号通路蛋白表达有关^[4]。本研究通过荷瘤小鼠体内实验,进一步观察了通莲 I 号方对食管癌移植瘤的抑制作用以及对免疫因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 6(IL-6)和白介素 8(IL-8)的影响。

1 实验材料

1.1 动物 4~5 周龄昆明小鼠,雌、雄各半,体质量 20~25g,清洁级,购于中国食品药品检定研究院,合格证号:SCXK(京)2009-0017。

1.2 细胞株 食管癌 Eca109 细胞,购于中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。

1.3 药物 通莲 I 号方(桃仁、红花、升麻、槟榔、半枝莲、白花蛇舌草,剂量比为 2:1:1:1:3:3),各单味药物均购于唐山市中医医院中药房,由河北联合大学

中医学院中心实验室中药制剂室制备,提取液含生药材 1.8g/mL。按人与小鼠换算比计算出高、中、低剂量(生药量浓度分别为 1500、750、375mg/L),以生理盐水(NS)配成。

1.4 试剂 新生小牛血清(GIBCO 公司),DMEM 培养基(GIBCO 公司),胰蛋白酶(GIBCO 公司);噻唑蓝(MTT,Amresco 公司),二甲基亚砷(DMSO,Amresco 公司),IL-6、IL-8 和 TNF- α 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(YYES BIOTECH 公司),以上试剂均购自北京科海荣京生物科技公司。

1.5 仪器 1100 型无菌超净台(FORMA 公司),3336 型 CO₂ 培养箱(FORMA 公司),NOVAPATH 450 酶标光度计(Bio-Tek 公司),TMD-2 倒置式显微镜(NIKON 公司),3MK 型低温高速离心机(SIGMA 公司),JJ-2 型组织匀浆机(Waring 公司)。

2 实验方法

2.1 分组与给药 小鼠随机分为 4 组,分别为模型组和通莲 I 号方高、中、低剂量组。将 Eca109 细胞以 1×10^7 /mL 的浓度接种于小鼠右前肢皮下,2 周后成模(剔除瘤体过大或过小者)。模型组灌胃 NS 10mL/kg;通莲 I 号方高、中、低剂量

基金项目:河北省自然科学基金(H2013209053);河北省中医药管理局科研计划项目(2014185)

组分别灌胃 1500、750、375mg/L 中药液,给药量均为 10mL/kg。各组均连续给药 3 周,再继续饲养 3 周后将小鼠颈椎脱臼处死,检测相关指标。

2.2 抑瘤率 各组小鼠处死后,取肿瘤组织于电子天平上称取瘤重,按照如下公式计算抑瘤率:

抑瘤率=(模型组平均瘤重-给药组平均瘤重)/模型组平均瘤重×100%

2.3 形态学观察 取部分剥离的瘤组织以 10%中性福尔马林固定,石蜡包埋,制成 4μm 厚的切片,HE 染色,光镜下观察瘤组织细胞形态。

2.4 ELISA 法检测移植瘤瘤体组织上清液中 TNF-α、IL-6 和 IL-8 蛋白表达 荷瘤小鼠瘤体组织取材,取样约 100mg,加入 1mL 生理盐水研磨,6000r/min 离心 15min,取上清液。在标准品孔及待测样本孔中分别加入 50μL 酶联亲和物,37℃温育 60min,反复冲洗,排除水分。分别加入显色液 A、B 各 50μL,室温下避光反应 15min。加入终止液 50μL,终止反应。检测不同浓度 TNF-α、IL-6 和 IL-8 标准品及各组瘤体组织上清液样本。记录上清液在 450nm 处的光密度值(OD),根据 OD 值计算各指标含量。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,组间差别显著性检验采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组平均瘤重及药物抑瘤率比较 通莲 I 号方高剂量组瘤重较小,与模型组比较有显著性差异($P<0.05$)。通莲 I 号方各剂量组抑瘤率比较,高剂量组抑瘤率明显高于低剂量组($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠平均瘤重及药物抑瘤率($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	瘤重(g)	抑瘤率(%)
模型组	10	3.57±1.05	
通莲 I 号方高剂量组	10	1.51±0.49 ^{##}	61.04±4.79 [#]
通莲 I 号方中剂量组	10	2.28±0.87	41.39±3.08
通莲 I 号方低剂量组	10	3.05±1.29	22.56±2.74

注:与模型组比较,* $P<0.05$;与通莲 I 号方低剂量组比较,# $P<0.05$ 。

3.2 各组小鼠皮下移植瘤组织形态学观察 模型组瘤组织内肿瘤细胞核仁深染,腺体拥挤,血窦丰富;通莲 I 号方高剂量组肿瘤细胞淡染,核分裂较少,可见较多肿瘤细胞肿胀变性坏死;通莲 I 号方中、低剂量组肿瘤细胞多数深染,可见少量坏死区,但整体结构与模型组相似。见图 1。

3.3 各组肿瘤组织上清液 TNF-α、IL-6 和 IL-8 含量比较 与模型组比较,通莲 I 号方高剂量组 TNF-α、IL-6 和 IL-8 明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。通莲 I 号方各剂量组组间比较,高剂量组各指标明显高于

中、低剂量组($P<0.05$)。见表 2。

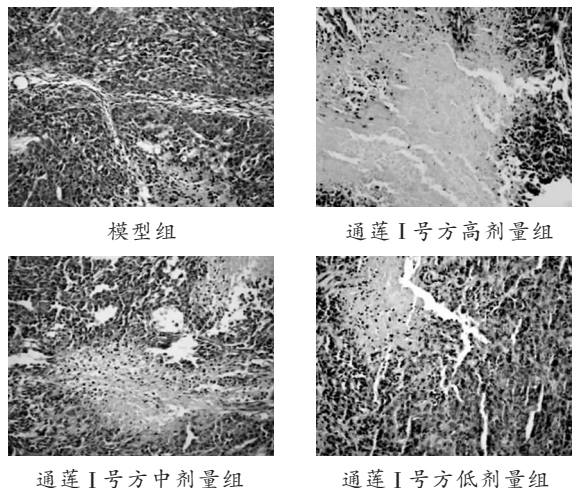


图 1 各组小鼠皮下移植瘤组织形态学病理切片(×200)

表 2 各组小鼠移植瘤瘤体组织 TNF-α、IL-6 和 IL-8 含量($\bar{x}\pm s$) pg/mL

组别	动物数(只)	TNF-α	IL-6	IL-8
模型组	10	123.30±17.64	187.67±19.80	264.48±23.55
通莲 I 号方高剂量组	10	61.82±14.43 ^{##}	120.49±15.61 ^{##}	181.09±29.51 ^{##}
通莲 I 号方中剂量组	10	104.56±13.58	179.12±17.54	263.66±31.49
通莲 I 号方低剂量组	10	108.78±16.32	185.35±20.79	278.15±26.34

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与通莲 I 号方中剂量组比较,▲ $P<0.05$;与通莲 I 号方低剂量组比较,# $P<0.05$ 。

4 讨论

通莲 I 号方专为食管癌气滞血瘀、热毒内结而设。方中半枝莲和白花蛇舌草清热解毒,解除体内之瘀毒;升麻升清,槟榔下行,一升一降,胃气乃通;桃仁和红花活血行气。全方重在活血行气、解毒散结。本研究结果表明,通莲 I 号方高剂量组小鼠瘤体生长受到显著抑制,抑瘤率达到 60%左右,瘤重明显低于模型组和通莲 I 号方低剂量组($P<0.05$),可见高剂量组抑瘤作用显著;而通莲 I 号方中、低剂量组抑瘤率与模型组比较无统计学差异。

组织形态学 HE 染色结果显示,通莲 I 号方高剂量组与模型组比较,瘤体组织结构改变较明显,瘤组织内有大量坏死区;中、低剂量组瘤体切片中央虽然也有散在坏死区,但面积较小,深染部分占绝大多数视野,与模型组相似。表明高剂量的通莲 I 号方可促进瘤体组织坏死,对肿瘤生长有明显抑制作用。

免疫调节在肿瘤的发生、发展中发挥着重要作用。TNF-α 是由巨噬细胞/单核细胞活化产生的一种细胞因子,在炎症反应、细胞免疫和肿瘤免疫中发挥关键作用,局部高浓度的 TNF-α 具有抗肿瘤活性^[5]。IL-6 具有多种生物学活性,可以调节其他多种因子的作用,其主要通过调控细胞周期相关基因,促进肿瘤血管生成,促进肿瘤局部炎症反应和肿瘤肝细胞自我更新等多种机制促进肿瘤发生、发

展^[6]。IL-8 是由巨噬细胞和上皮细胞等分泌的白介素亚类细胞因子,它可以通过刺激血管生成直接促进肿瘤生长,较高水平的 IL-8 与肿瘤患者体重减轻、恶病质形成有直接关系^[7]。

本研究结果显示,模型组小鼠 TNF- α 水平最高,这和许多同类研究报道一致。本研究观察到较高浓度的 TNF- α 出现在核仁深染、腺体拥挤、血窦丰富的模型组,这提示食管癌的 TNF- α 表达水平与肿瘤细胞活性呈正相关。而经高剂量通连 I 号方干预的小鼠肿瘤组织中 TNF- α 水平显著降低,与模型组比较有极显著性差异($P<0.01$)。模型组小鼠 IL-6 和 IL-8 含量最高,而通连 I 号方高剂量组显著下降,与模型组比较有显著性差异($P<0.05$)。通连 I 号方中、低剂量组的上述三项指标变化甚微,与模型组比较无显著性差异;各剂量组间比较,高剂量组与中、低剂量组显示出显著性差异($P<0.05$)。本研究从免疫调节角度证明了高剂量的通连 I 号方抑制食管癌的部分机制。

综上,通连 I 号方有较好的抑制食管癌荷瘤小鼠瘤体生长作用,通过诱导肿瘤组织坏死,下调肿瘤组织 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 等免疫因子水平,发挥免疫调节作用。需要指出的是,多靶点作用是中药复方抗癌的优势,本研究仅从宏观瘤体变化、组织形态学和若干免疫因子差异等方面做了探讨,其是否涉及与免疫调节相关的分子信号通路或者基因表达的变化等,值得进一步深入探讨。

参考文献

- [1] Wang L,Tang W,Chen S,et al.N-acetyltransferase 2 Polymorphisms and Risk of Esophageal Cancer in a Chinese Population. PloS One,2014,9(2):877
- [2] 河北联合大学. 治疗食管癌的活血行气中药制剂及其制备方法:中国,ZL201110308544.0[P].2013-4-10[2014-11-15]
- [3] 贾永森,李继安,韩炳生,等.通连 I 号方及其拆方对食管癌 Eca109 细胞增殖及细胞周期的影响.中国实验方剂学杂志,2012,18(12):191
- [4] 贾永森,李继安,杜宁,等.通连 I 号方对食管癌 Eca109 细胞 NF- κ B 信号通路影响的研究.时珍国医国药,2012,23(10):2534
- [5] 纪勇,陈静瑜,郑明峰,等.茶树菇多糖联合化疗对食管癌大鼠 TNF- α 和 IFN- γ 的影响.肠外与肠内营养,2012,19(5):293
- [6] 陈德玉,金丽艳,朱龙萍,等.Iet-7a 和 IL-6 在食管鳞状细胞癌组织中的表达及两者的相关性.细胞与分子免疫学杂志,2013,29(11):1181
- [7] 陈瀚文,王健.IL-8/R 在胃癌中的作用及机制研究进展.免疫学杂志,2013,29(5):447

第一作者:张艳丽(1980-),女,医学硕士,主治医师,从事中医内科临床研究工作。

通讯作者:贾永森,医学博士,副教授。jysen@163.com

收稿日期:2014-11-15

编辑:吴宁

(上接第 74 页)

参考文献

- [1] 沈维增,吕红梅,谢峥伟,等.大柴胡汤合保和丸治疗非酒精性脂肪性肝病的临床研究.中华中医药学刊,2012,30(12):2612
- [2] 黄碧纯,许世波.加味大柴胡汤治疗阻塞性黄疸术后对照观察.实用中医内科杂志,2012,26(12):34
- [3] 姜笃信,艾力·艾合买提.大柴胡汤治疗急性胆道感染 45 例疗效观察.新疆中医药,2012,30(3):30
- [4] 叶浩然.大柴胡汤加减治疗慢性胆囊炎合并胆结石疗效观察.北方药学,2012,9(8):30
- [5] 刘玲玲,金小晶.大柴胡颗粒治疗慢性胆囊炎胆腑郁热证 30 例疗效观察.实用临床医药杂志,2011,15(19):126
- [6] 张振中,李美.大柴胡颗粒治疗老年慢性胆囊炎的临床观察.国际消化病杂志,2011,31(3):183
- [7] 郭子光,冯显逊.伤寒论汤证新编.上海:上海科学技术出版社,1983:232
- [8] 任小宇,徐惠波.胆囊炎的形成原理及动物模型的建立.淮海医药,2009,27(3):276
- [9] 杨维建,李娟,汪佳明,等.慢性胆囊炎中医治疗研究进展.西部中医药,2011,24(12):95

- [10] 余成浩.清胆颗粒剂治疗胆囊炎的主要药效学实验研究.四川:成都中医药大学,2003
- [11] Rastogi A,Krishnani N,Pandey RDubin-Johnson syndrome: a clinicopathologic study of twenty cases.Indian J Pathol Microbiol,2006,49(4):500
- [12] Padda MS,Singh S,Tang SJ,et al.Liver test patterns in patients with acute calculous cholecystitis and/or choledocholithiasis. Aliment Pharmacol Ther,2009,29(9):1011
- [13] 郭凌超,吴瑶华,徐义仁,等.结石性胆囊炎合并肝功能损害 600 例分析.腹腔镜外科杂志,2000,5(1):50

第一作者:卢金福(1964-),男,博士,副教授,主要从事中药药理学的研究。

通讯作者:杜萍,本科学历,主管药师。184662719@qq.com

收稿日期:2015-01-18

编辑:吴宁