

“肠胃清”对结肠癌皮下移植瘤奥沙利铂治疗的增敏作用及对肿瘤组织坏死凋亡的影响研究

余倩云¹ 许建华² 李朝衡¹ 梁芳² 张瑞娟³

(1.上海市黄浦区五里桥街道社区卫生服务中心中医科,上海200023;
2.上海中医药大学附属普陀医院中医肿瘤科,上海200062; 3.上海市普陀区人民医院中医科,上海200060)

摘要 目的:研究肠胃清对裸鼠结肠癌皮下移植瘤奥沙利铂(L-OHP)治疗的增敏作用及对肿瘤组织坏死凋亡的影响。方法:构建裸鼠结肠癌细胞HCT-116皮下移植瘤模型,将造模成功的裸鼠随机分为模型组、L-OHP组、肠胃清组和肠胃清联合L-OHP组(联合组),分别给药或生理盐水3周后,观察各组裸鼠肿瘤体积,计算抑瘤率,苏木精-伊红染色法(HE)观察肿瘤组织病理形态学变化,DNA断裂的原位末端标记法(TUNEL染色法)检测肿瘤组织细胞凋亡情况。结果:各给药组给药后瘤体体积明显小于模型组($P<0.01$),联合组瘤体体积明显小于L-OHP组和肠胃清组($P<0.01$)。各组抑瘤率比较,联合组明显高于L-OHP组和肠胃清组($P<0.01$)。各给药组肿瘤组织坏死面积百分比和肿瘤细胞凋亡指数均高于模型组($P<0.01$),联合组明显高于L-OHP组和肠胃清组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:肠胃清对裸鼠结肠癌皮下移植瘤L-OHP治疗有增敏作用,并可促进肿瘤细胞坏死及凋亡。

关键词 结肠癌 肠胃清 奥沙利铂 细胞坏死 细胞凋亡 肿瘤细胞 病理学 实验研究

中图分类号 R289.55 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2018)01-0075-04

基金项目 国家自然科学基金面上项目(81573940);上海市普陀区卫生系统自主创新科研基金资助项目(普KW15204)

结肠癌是一种高发的消化系统恶性肿瘤。2017年美国癌症预测数据显示结肠癌的发病率及死亡率在美国十大癌症中均位居第三位^[1],2015年中国结肠癌位居全国癌症发病及死亡的第五位^[2]。治疗结肠癌的主要方法之一是化疗,而化疗耐药限制了化疗疗效,因此如何提高化疗的敏感性是临床急需解

决的问题。近年来,中医药提高化疗敏感性的研究日趋增多,也在临床上得到广泛应用。肠胃清具有益气健脾、解毒理气之功效,长期临床应用于肠癌和胃癌的治疗,能够提高生活质量,改善临床症状及减少化疗引起的毒副作用^[3]。本实验室建立了皮下移植瘤模型,通过测量裸鼠皮下移植瘤的大小及计算

作为化痰药代表厚朴,一方面消胀除满,消积导滞,另一方面下肺气,助糟粕排出。心主血脉,水谷精微经心化赤为血,柏子仁不仅养心安神,还可润肠通便,常用于肠燥便秘,用量为10~25g。槟榔入胃肠经,尤善行胃肠之气,气行则助水运,从而缓泻通便,对于缓解便秘兼腹胀患者的证候颇有成效,常用剂量为10g。

分析使用频次排在前10的中药:白术(35)、当归(34)、黄芪(29)、火麻仁(29)、甘草(27)、肉苁蓉(27)、苦杏仁(25)、枳壳(24)、枳实(23)、生地(22),根据其功效分别属于补气药、补血药、润下药、补阳药、宣肺化痰药、理气药、清热凉血药,这与中医将本病归于“虚秘”,属于本虚标实之证的观点是相符合的。因此通过分析用药频次以药测证,根据中医学

审证求因理论,大致可以认为慢传输型便秘主要可以分为气血亏虚型、脾肾阳虚型、阴虚型、肺脾气虚型。

越来越多的临床研究表明,中药治疗慢传输型便秘在减轻患者证候、减少不良反应、降低复发率等方面有其独特优势。本文通过检索近7年内有关中医药治疗慢传输型便秘的各类文献,对其使用中药频次进行分析,对慢传输型便秘的用药规律有了更进一步了解。

第一作者:李超男(1989—),女,硕士研究生,研究方向为中医药治疗脾胃疾病。

通讯作者:龚雨萍,主任医师,硕士研究生导师。gongyuping2055@aliyun.com

收稿日期:2017-07-31

编辑:吕慰秋

抑制率,运用苏木精-伊红染色法(HE)及DNA断裂的原位末端标记法(TUNEL染色法)检测细胞坏死及凋亡程度,以观察肠胃清提高L-OHP敏感性的作用及对肿瘤细胞坏死凋亡的影响,现将结果报道如下。

1 实验材料

1.1 实验动物 SPF级BALB/C雄性裸小鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(沪)2008-0016,体重(20±2)g,饲养于上海中医药大学附属普陀医院动物实验室,动物实验室许可证号:SYXK(沪)2008-0055,温度18~20℃,适应饲养1周后进行实验。

1.2 肠胃清 药物组成:生黄芪30g,生白术15g,薏苡仁30g,党参30g,猪苓24g,八月札24g,野葡萄藤30g,红藤30g。由上海中医药大学附属普陀医院制剂室煎,1mL含生药2.66g。

1.3 细胞 实验所用细胞为人结肠癌HCT-116细胞,从南京凯基生物公司购入。在37℃、5%CO₂条件下,使用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基于恒温培养箱中培养。

1.4 试剂及仪器 RPMI Medium1640干粉及胎牛血清(Gibico公司);硫酸链霉素(华北制药公司);奥沙利铂(L-OHP,江苏恒瑞医药股份有限公司);苯甲基磺酰氟(上海生工生物工程技术有限公司);磷酸二氢钠(上海新华化工厂);0.22μm微孔滤膜(上海申安医疗器械厂);电子游标卡尺(广陆数测);DHG-907AH型电热恒温鼓风干燥箱(上海华连医疗器械有限公司);Cell240型CO₂恒温培养箱(德国贺利氏公司);MDF-F71V型超低温冰箱(Sanyo公司);日本OLYMPUS光学显微镜(OLYMPUS-BX51);德国Leica轮转式病理切片机(RM2145);电热恒温水浴锅(上海医疗器械五厂);眼科剪(上海器材厂)。

2 实验方法

2.1 皮下移植瘤的建立 将处于对数生长期的结肠癌细胞HCT-116细胞消化后收集到离心管中,用PBS制成浓度为1×10⁷/mL的细胞悬液,注意应放在冰上操作。取4~6周龄BALB/c雄性裸鼠5只,体重大约(20±2)g,常规消毒裸鼠右前肢腋下,用1mL微量注射器及23号针头吸取HCT-116单细胞悬液,以0.2mL/只接种,恒温恒湿饲养。大约经过15~20d,皮下肿瘤生长至直径约1~1.5cm左右,选择瘤生长旺盛且无破溃的裸鼠,作为供瘤鼠。脱颈处死,酒精消毒皮肤,用眼科剪剪开皮肤,小心剥离皮下肿瘤组织,将剥离的移植瘤块用生理盐水冲洗净,去除坏死组织和纤维组织放置于4℃培养液中,

剪碎成1mm³大小的组织块。制作裸鼠皮下移植瘤模型:选裸鼠的右前肢腋下,酒精消毒皮肤,剪一个大约2mm的小口,用镊子扩张周围,再将切好的瘤块送入皮下,按压大约30s后将裸鼠放至笼中如前饲养。

2.2 动物分组及药物干预 当裸鼠皮下移植瘤生长至150~300mm³左右时随机分为模型组、L-OHP组、肠胃清组和肠胃清联合L-OHP组(联合组),每组10只。模型组腹腔注射生理盐水(0.2mL/次,每周一、三、五各1次),灌胃生理盐水(每周一、二、三、四、五各1次),连续3周;L-OHP组腹腔注射L-OHP(5mg/kg,每周一、三、五各1次),灌胃生理盐水同模型组,连续3周;肠胃清组灌胃肠胃清(10g/kg,每周一、二、三、四、五各1次),腹腔注射生理盐水同模型组,连续3周;联合组灌胃肠胃清(方法同胃肠清组),腹腔注射L-OHP(方法同L-OHP组),连续3周。肠胃清体内给药根据人与小鼠等效剂量换算公式计算^[5]。L-OHP剂量的确定:参照Mathieu等^[5]建模方法来原因动物能够耐受的且不引起动物死亡的最高剂量(Maximal tolerance dose, MTD),前期实验确定L-OHP的MTD为10mg/kg,并以1/2MTD(5mg/kg)作为实验剂量,与前期发表文献一致^[6-7]。

2.3 肿瘤体积的测量及抑瘤率的计算 肿瘤体积的变化反映药物的疗效。从给药第1天即用电子游标卡尺测量肿瘤最大直径(A)、最短径(B),每日测量1次,观察4周,根据测量结果描绘肿瘤生长曲线,并在第29天计算抑瘤率。肿瘤体积以公式V=1/2AB²计算,抑瘤率%=[(模型组平均瘤体体积-给药组平均瘤体体积)/模型组平均瘤体体积]×100%。

2.4 HE染色测定肿瘤坏死程度 4周后实验结束处死裸鼠,迅速剥离瘤体,取肿瘤组织经福尔马林固定1周,病理科石蜡包埋,切片厚度大约4μm。切片放于70℃温箱烘烤融蜡1~2h,常规二甲苯脱蜡,乙醇脱蜡,苏木素染色10min,流水冲洗,去除余色,0.7%盐酸乙醇分化数秒,自来水冲洗,切片变蓝大约15min,95%乙醇30s,酒精性伊红染色30s,常规脱水透明,中性树胶封片,电镜下观察结果,并进行图像分析。选择每个标本最大断面切片计算肿瘤坏死面积占瘤体面积的百分率,测定肿瘤坏死程度如下:轻度坏死(≤30%);中度坏死(>30%);重度坏死(>70%)。

2.5 TUNEL染色测定肿瘤细胞凋亡情况 流程根据merck试剂盒说明书操作。4μm厚度的瘤组织切片,常规二甲苯脱蜡,经各级乙醇脱水后,蒸馏水冲洗2min,滴加20g/mL不含DNase的蛋白酶K,37℃作用20min,PBS洗涤3次。在样品上加适量的TUNEL

检测液, 37℃避光孵育60min。PBS洗涤3次, 加入DAPI液进行核染色3min, PBS洗涤3次, 避光在荧光显微镜下观察、读片。镜下观察块状棕黄色为阳性表达, 阴性对照无结果, 阳性定位为细胞核。Tunel凋亡检测: 细胞核中有棕色颗粒, 核固缩, 为阳性细胞。细胞凋亡指数(AI)的计算, 选取的片子细胞数大约要在500个以上, 随机选取100个左右细胞区域, 选择核固缩的为阳性凋亡细胞, 以百分数作为凋亡指数。

2.6 统计学方法 采用SPSS 18.0统计软件进行统计分析。实验数据采用($\bar{x} \pm s$)表示, 多样本比较采用单因素方差分析, 用Levene检测方差齐。若方差齐, 则各组之间两两比较采用LSD检验; 若方差不齐, 采用近似F检验Welch检验, 各组间比较采用Dunnnett方法。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组裸鼠给药前后肿瘤体积及抑瘤率比较 各组皮下移植瘤生长曲线表明, 随着时间延长, 各组肿瘤体积逐渐增大, 但各组增长幅度不同, 以模型组增长幅度最大, 而联合组最小, 见图1。各组裸鼠给药前后肿瘤体积和抑瘤率比较见表1。

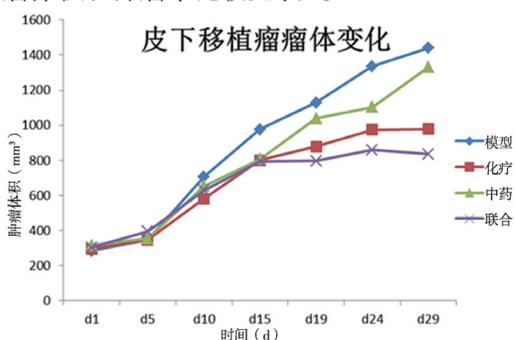


图1 各组裸鼠皮下移植瘤体积变化曲线

表1 各组裸鼠给药前后瘤体体积以及抑瘤率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	给药前(mm³)	给药后(mm³)	抑瘤率(%)
模型组	10	284.73±18.22	1439.08±139.89	
肠胃清组	10	297.03±21.23	1335.31±92.44**	7.21
L-OHP组	10	315.02±23.19	1130.28±103.59**	21.46
联合组	10	304.55±17.64	835.52±79.76***△△	41.94**△△

注: **与模型组比较, $P < 0.01$; ##与L-OHP组比较, $P < 0.01$; △△与肠胃清组比较, $P < 0.01$ 。

3.2 各组裸鼠皮下移植瘤组织病理学形态与坏死程度比较 电子显微镜观察发现结肠癌HCT-116细胞裸鼠异位移植瘤体组织切片呈低分化腺癌。200倍显微镜下观察各组肿瘤组织坏死程度, 并统计坏死比例, 结果见表2。400倍显微镜下显示: 模型组癌细

胞呈现椭圆形、圆形或不规则形, 细胞分化较差, 胞浆丰富, 细胞核深染, 核仁胞浆比增大, 分裂相增多, 排列紊乱, 间质可见少许结缔组织; 肠胃清组癌细胞可见细胞核呈蓝紫色, 细胞浆呈现粉红色, 细胞整体排列较紊乱; L-OHP组癌细胞数目减少, 细胞核质比减小, 核固缩多见, 排列疏松, 间质结缔组织增多, 细胞散在分布, 肿瘤坏死区呈片状, 组织间隙渗出; 联合组癌细胞组织间隙渗出明显, 细胞破裂坏死, 细胞散在分布, 排列疏松, 并伴有大片状坏死, 大量的结缔组织增生, 可见大部分核固缩, 细胞呈碎裂状。见图2。

表2 各组肿瘤组织坏死程度(等级)及百分比比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	坏死组织百分比(%)	坏死程度等级
模型组	10	23.17±2.24	轻度
肠胃清组	10	31.48±3.01**	中度, 偏向于轻度
L-OHP组	10	66.46±4.63**	中度, 偏向于重度
联合组	10	76.83±5.39***△△	重度

注: **与模型组比较, $P < 0.01$; #与L-OHP组比较, $P < 0.05$; △△与肠胃清组比较, $P < 0.01$ 。

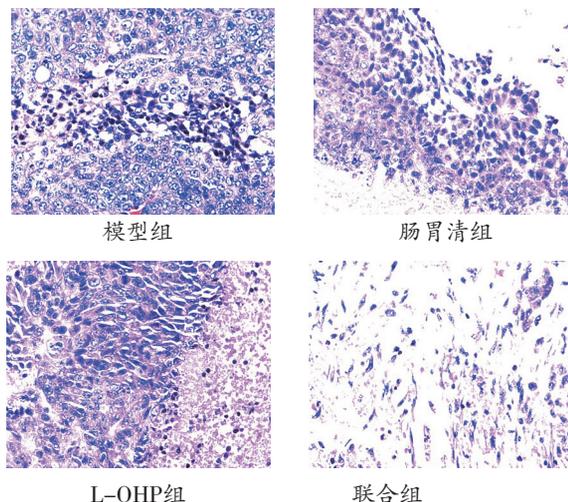


图2 各组裸鼠肿瘤组织病理形态学比较($\times 400$)

3.3 各组裸鼠皮下移植瘤组织细胞凋亡情况比较 见表3。肿瘤组织凋亡细胞呈现细胞核着棕黄色, 核固缩, 染色质浓缩, 实验表明模型组凋亡细胞数量最少, 而联合组凋亡细胞数量最多, 明显高于L-OHP组和肠胃清组, 见图3。

表3 各组肿瘤细胞凋亡指数比较($\bar{x} \pm s$) %

组别	动物数(只)	凋亡指数(AI)
模型组	10	4.42±1.62
肠胃清组	10	11.54±2.65**
L-OHP组	10	38.83±5.38**
联合组	10	59.35±7.95***△△

注: **与模型组比较, $P < 0.01$; ##与L-OHP组比较, $P < 0.01$; △△与肠胃清组比较, $P < 0.01$ 。

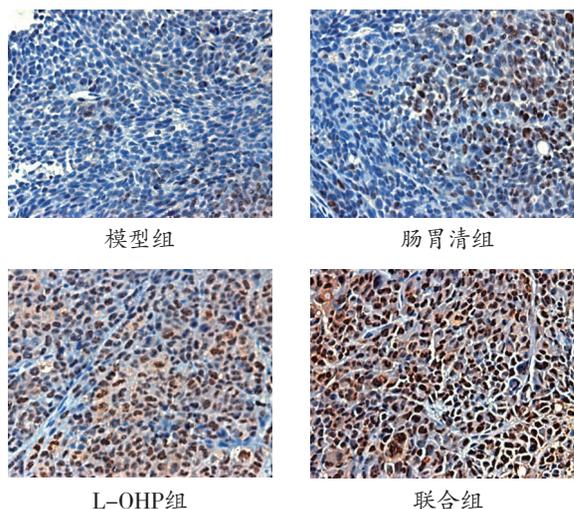


图3 TUNEL染色各组裸鼠肿瘤细胞凋亡情况(×200)

4 讨论

结肠癌的发病率及死亡率呈逐年上升趋势,严重危害着人类的健康。外科手术是治疗结肠癌的主要方法,但部分晚期患者无手术指征,则首选化疗,含有L-OHP的化疗方案仍是治疗结肠癌的重要手段。但是随着L-OHP的运用,患者对L-OHP的敏感性逐渐降低,因此提高肿瘤细胞对化疗敏感性尤为重要。本病属于中医学“锁肛痔”“瘰疬”“肠覃”“肠风”“下利”“脏毒”等范畴^[8],其发生发展是由于正气不足,机体阴阳失调,脏腑经络气血功能失司,引起气滞血瘀、痰凝湿聚等发于结肠,久而发展成瘰疬积聚。

肠胃清为上海名中医范忠泽教授的经验方。范忠泽教授认为结肠癌的发生是由于机体内环境失调,同时邪浊瘀滞,即“内虚邪实”,治疗时应以扶正祛邪相结合。脾胃是后天之本,气血生化之源,主要以益气健脾来达到扶正补虚。故肠胃清方中采用生黄芪、党参益气健脾,生白术、猪苓、薏苡仁健脾燥湿,八月札、野葡萄藤、红藤理气解毒。前期研究显示临床观察组经肠胃清口服液联合化疗治疗后患者的生存质量、化疗引起的毒副作用、临床症状得到改善,生存期延长,且患者外周血中MDR1 mRNA和CK20 mRNA表达均低于对照组,提示其作用机制可能与逆转肿瘤耐药有关^[3]。张瑞娟等^[9]研究表明肠胃清联合L-OHP能够抑制裸鼠皮下移植瘤的生长,增加L-OHP的疗效,其增效的机制可能与上调促细胞凋亡蛋白Caspase3的表达有关。余文燕等^[10-12]研究发现肠胃清能有效地逆转HCT-116/L-OHP耐药株对奥沙利铂、顺铂及卡铂的耐药,诱导细胞凋亡,改变细胞周期的分布。前期研究结果提示,肠胃清不仅可以改善患者生存质量,还能够增加结肠癌对化疗药的敏感性,逆转肿瘤细胞对化疗药的耐药现象。

本实验通过建立裸鼠HCT-116细胞皮下移植瘤

模型,经分组干预观察,肠胃清联合L-OHP组对瘤体生长抑制最明显,肿瘤组织坏死面积比例最大,程度最重,肿瘤细胞凋亡指数最高,与L-OHP组和肠胃清组比较差异均有统计学意义,表明肠胃清可增强结肠癌细胞对L-OHP的敏感性从而促进肿瘤细胞坏死及凋亡,其可能的作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer Statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67 (1): 7.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66 (2): 115.
- [3] 许建华, 范忠泽, 孙珏, 等. 肠胃清治疗晚期胃癌及对外周血MDR1 mRNA的影响[J]. 上海中医药杂志, 2007, 41 (5): 40.
- [4] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9 (9): 1069.
- [5] MATHIEU A, REMMELINK M, D'HAENE N, et al. Development of a chemoresistant orthotopic human non-small cell lung carcinoma model in nude mice: analyses of tumor heterogeneity in relation to the immunohistochemical levels of expression of cyclooxygenase-2, ornithine decarboxylase, lung-related resistance protein, prostaglandin E synthetase, and glutathione-S-transferase-alpha (GST)-alpha, GST-mu, and GST-pi[J]. Cancer, 2004, 101 (8): 1908.
- [6] 王国娟, 李琦, 余文燕, 等. 肠胃清对奥沙利铂治疗结肠癌的影响[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31 (6): 1367.
- [7] 张勇, 陆海, 孙晓文, 等. 肠胃清逆转结肠癌HCT116/L-OHP细胞草酸铂耐药作用及对Pt-DNA加合物的影响[J]. 中成药, 2012, 34 (10): 1843.
- [8] 李晶, 侯俊明, 罗璐, 等. 基于“治未病”思想的直肠癌防治探讨[J]. 现代中医药, 2017, 37 (2): 68.
- [9] 张瑞娟, 余倩云, 许建华, 等. 健脾解毒方对人结肠癌HCT116/L-OHP裸鼠皮下移植瘤的作用及Caspase3表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22 (3): 364.
- [10] 余文燕, 孙珏, 许建华, 等. 肠胃清药物血清协同奥沙利铂对人结肠癌耐药细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (10): 182.
- [11] 余文燕, 王国娟, 许建华, 等. 肠胃清协同顺铂对人结肠癌耐药细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2013, 29 (11): 840.
- [12] 余文燕, 王国娟, 许建华, 等. 肠胃清颗粒协同卡铂对人结肠癌耐药细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中医杂志, 2013, 54 (21): 1854.

第一作者: 余倩云(1988—), 女, 医学硕士, 主治医师, 从事中医药治疗肿瘤的基础与临床工作。

通讯作者: 张瑞娟, 医学博士. zhangruijuan2010@136.com

收稿日期: 2017-08-29

编辑: 吴宁