

• 实验研究 •

豆根管食通口服液对食管癌模型大鼠细胞凋亡及免疫逃逸的影响

王祥麒^{1*} 郑玉玲² 王璇³ 韩倩倩² 王俊涛¹

(1. 河南中医学院第三附属医院, 河南省郑州市东明路 63 号, 450008;

2. 河南中医学院; 3. 郑州市人民医院中医科)

基金项目: 河南省杰出人才创新基金项目(0521002600)

* 通讯作者: wangxiangqi777@163.com, (0371)65680126

[摘要] 目的 观察豆根管食通口服液对食管癌模型大鼠细胞凋亡及免疫逃逸的影响, 从分子生物学角度分析其作用机制。方法 健康 Wistar 大鼠随机选择 15 只为空白组, 其余大鼠均腹部皮下注射甲基戊基亚硝酸胺 5mg/kg 建立食管癌模型大鼠, 将造模成功的 75 只大鼠随机分为模型组、高剂量组、中剂量组、低剂量组、替加氟组各 15 只, 低、中、高剂量组分别按 5g/kg、10g/kg、15g/kg 给予豆根管食通口服液, 空白组、模型组给等予容积生理盐水, 替加氟组给予替加氟片 20mg/kg, 各组均于造模成功 24h 后灌胃给药, 每日 1 次, 连续 4 周。末次给药 24h 后取瘤检测, 原位末端标记法检测细胞凋亡, 免疫组织化学法检测 Fas、FasL 蛋白表达。结果 高、中、低剂量组及替加氟组食管癌细胞的凋亡指数与空白组、模型组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), 并且高剂量组明显优于替加氟组、低剂量组($P < 0.05$)。模型组 Fas 蛋白表达阳性率低于空白组、FasL 蛋白表达高于空白组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 各治疗组 Fas 蛋白表达阳性率均高于模型组($P < 0.05$), 高剂量组 Fas 蛋白表达阳性率高于替加氟组和低剂量组($P < 0.05$); 高、中、低剂量组 FasL 蛋白表达阳性率明显低于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 豆根管食通口服液能促进模型大鼠食管癌细胞凋亡, 其作用机制可能与其提高 Fas 表达、降低 FasL 表达有关, 并且存在一定的量效关系, 高剂量的豆根管食通口服液作用优于替加氟片。

[关键词] 豆根管食通口服液; 食管癌; 细胞凋亡; Fas; FasL

Effect of Dougen Guanshitong Oral Liquid on Apoptosis and Immune Evasion in Esophageal Cancer Model Rats

WANG Xiangqi¹, ZHENG Yuling², WANG Xuan³, HAN Qianqian², WANG Juntao¹

(1. The Third Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Henan Province 450008; 2. Henan University of Traditional Chinese Medicine; 3. The People's Hospital of Zhengzhou City)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Dougen Guanshitong Oral Liquid [oral liquid of Dougen (*Radix et Rhizoma Sophorae Tonkinensis*) for esophageal cancer] on apoptosis and immune evasion in rats with esophageal cancer and discuss its mechanism based on molecular biology. **Methods** Fifteen health Wistar rats were selected into the control group. The esophageal cancer model was established by abdominal subcutaneous injection of methyl-n-aminonitrosamine (5mg/kg). The model rats were randomized into the model group, large-dose group, middle-dose group, small-dose group and tegafur group, with 15 in each. The small-dose group, middle-dose group and large-dose group were given 5g/kg, 10g/kg and 15g/kg of Dougen Guanshitong Oral Liquid respectively. The control group and model group were given normal saline of equal amount. The tegafur group was given 20mg/kg of tegafur tablet. Administration began at the 24th after model establishment through gastric feeding, once a day, 4 weeks in all. Twenty-four hours after the last administration, the tumors were removed. The apoptosis was detected by terminal in situ nick end labeling. The immunohistochemistry method was used to detect the expression of Fas and FasL protein. **Results** Comparing with the control group and model group, the apoptotic index in the large-dose group, middle-dose group, small-dose group and tegafur group was statistically different ($P < 0.05$). The effect in the large-dose group was significantly superior to those in the tegafur group and small-dose group ($P < 0.05$). Comparing with the control group, the positive rate of Fas expression in the model group was significantly decreased, but the positive rate of FasL expression was significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The positive rate of Fas expression in all the treatment groups was significantly higher than that in the model group ($P < 0.05$). The positive rate of Fas expression in the large-dose group was significantly higher than those in the tegafur group and small-dose group ($P < 0.05$). Comparing with the model group, the positive rate of FasL expression in the large-dose group, middle-dose group and small-dose group was significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

© 2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

0.01)。 **Conclusion** Dougen Guanshitong Oral Liquid could promote the apoptosis of esophageal cancer in a dose-effect manner and its mechanism maybe relevant to increasing Fas expression and decreasing FasL expression. The effect of large-dose of Dougen Guanshitong Oral Liquid is superior to that of tegafur tablet.

Keywords Dougen Guanshitong Oral Liquid [oral liquid of Dougen (*Radix et Rhizoma Sophorae Tonkinensis*) for esophageal cancer]; esophageal cancer; apoptosis; Fas; FasL

食管癌晚期放疗的 5 年生存率低,单用化疗效果不佳,且放疗、化疗毒副作用大。豆根管食通口服液治疗食管癌疗效显著^[1-2],实验研究^[3-5]证实其具有促进食管癌细胞凋亡、调节细胞周期调控因子、调节癌基因表达等作用,本研究观察了其对食管癌模型大鼠细胞凋亡及免疫逃逸的影响,并从分子生物学角度分析其作用机制,现报告如下。

1 材料

1.1 药物与试剂

豆根管食通口服液:由山豆根、(制)天南星、急性子、黄药子、(姜)半夏、沉香、郁金、三七等制成,每支 10ml,含生药 1g/ml,每次 10ml,每日 3 次,由河南中医学院第一临床医学院制剂中心提供,批号:020425,实验时以此浓度供低剂量组使用,并以该药为基础分别浓缩含生药 2g/ml、3g/ml 的药液,供中、高剂量组用药;替加氟片:上海华联制药有限公司生产,批号:0108043;盐酸氯胺酮注射液:上海第二制药厂生产,批号:011006;兔抗鼠 Fas 抗体(批号:BA0484)、兔抗鼠 FasL 抗体(批号:BA0049)、细胞凋亡检测试剂盒(POD,批号:MK10201)、SABC 免疫组化染色试剂盒(批号:SA1025)、DAB 显色试剂盒(批号:AR1022),均购于武汉博士德生物工程有限公司;甲基戊基亚硝酸胺(MANA),华西医科大学提供。

1.2 动物

健康 Wistar 大鼠 93 只,雌性 47 只,雄性 46 只,体重(120±10)g,由郑州大学医学院动物实验中心提供,动物合格证书:医动字第 410116 号。

1.3 主要仪器

主要仪器 DT-30OA 型电子天平,上海医用激光仪器厂产品;双目光学显微镜,日本 Olympus 产品;显微照相机,日本 Olympus 产品;上海 DQP-9010 电脑切片机,上海医用仪器厂生产;透射电子显微镜(CTEM)H-7500,日本 Hitachi 公司;⁶⁰Co 照射治疗机,上海医疗设备厂生产。

2 方法

2.1 造模、分组及给药

除空白组 15 只大鼠外,其余大鼠均以 MA-

NA5mg/kg 腹腔注射^[6],每周 1 次,连续 18 周。末次注射 1 周后以简单随机法抽取 3 只处死,经病理学检查均证实为食管癌,然后采用随机数表法将剩余 75 只大鼠分为豆根管食通口服液低、中、高剂量组及模型组、替加氟组,每组 15 只。低、中、高剂量组分别按 5g/kg、10g/kg、15g/kg 给予豆根管食通口服液(相当于临床最大用量的 10、20、30 倍);空白组、模型组给予等容积生理盐水;替加氟组给予替加氟片 20mg/kg。各组均于造模成功 24h 后灌胃给药,临用前将药物以生理盐水配制成适当浓度,5ml/kg,每天 1 次,连续 4 周。末次给药 24h 后予盐酸氯胺酮 0.1g/kg 腹腔注射麻醉后脱颈椎处死,取瘤检测。

2.2 指标检测

2.2.1 原位末端标记法(TUNEL 法)检测细胞凋亡情况 ①石蜡切片脱蜡;②3%过氧化氢室温处理 10min,蒸馏水洗涤 3 次;③PBS 1:20 稀释 Proteinase K 37℃ 消化 15min,PBS 洗 3 次;④加标记缓冲液 20μl/片保持切片湿润,每张切片取 TDT 和 DIG-dUTP 各 1μl,加入 18μl 标记缓冲液中混匀,置湿盒中 37℃ 标记 2h,PBS 洗 3 次;⑤加封闭液 5μl/片,室温 30min,去掉封闭液,不洗;⑥封闭液 1:1000 稀释生物素抗地高辛抗体 50μl/片,置湿盒中 37℃ 30min,PBS 洗 3 次;⑦PBS 1:100 稀释 SABC 加至切片,37℃ 反应 60min,PBS 洗 4 次;⑧DAB 显色,苏木素轻度复染,封片。显微镜观察。凋亡细胞核呈棕黄色,在每张切片中央处观察 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞核,计数细胞凋亡的比例均数为凋亡指数(%)。

2.2.2 免疫组织化学法(SABC 法)检测 Fas、FasL 蛋白表达 ①载玻片在 Poly-Lysine 液中浸 5min,捞片后置烤箱中 50~60℃ 30min;②脱蜡、水化组织切片;③3%过氧化氢室温下孵育 10min,蒸馏水洗涤 3 次;④切片进入 0.01mol/L 柠檬酸缓冲液微波修复 10min,反复 2 次,冷却后 PBS 冲洗 2 次;⑤加 1 滴非免疫动物山羊血清,室温下孵育 5min,甩去血清;⑥滴加一抗 Fas(稀释度 1:100),FasL(稀释度 1:100),4℃ 冰箱过夜,PBS 冲洗 3 次;⑦滴加

通用型 IgG 抗体(Fab 段)－HPR 多聚体,室温孵育 10min,PBS 冲洗 3 次;⑧甩去 PBS 液,加 50 μ l 链亲和素－过氧化物酶溶液;⑨加 2 滴新鲜配制的 DAB 溶液染色,显微镜下观察 5~10min,蒸馏水冲洗,苏木素复染,中性树胶封固,显微镜观察。判断标准: Fas、FasL 阳性反应均为黄到棕黄色颗粒,定位于胞浆和(或)胞膜,在 400 倍视野下,无阳性细胞或阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为阴性(-);阳性细胞数 $\geq 10\%$ 为阳性(+);阳性细胞数 $\geq 25\%$ 为中度阳性(++);阳性细胞数 $\geq 50\%$ 为强阳性(+++)。

2.3 统计学方法

应用 SPSS 15.0 统计软件分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 t 检验,计数资料采用秩和检验,方差不齐时进行变量转换。

3 结果

实验各组停药时,大鼠存活数如下:空白组 15 只,模型组 13 只,替加氟组 10 只,低、中、高剂量组均 15 只。

3.1 各组大鼠细胞凋亡指数比较

表 1 示,与空白组比较,其余各组大鼠细胞凋亡指数差异均有统计学意义($P<0.05$);各治疗组均能促进食管癌模型大鼠肿瘤细胞凋亡,高、中、低剂量组及替加氟组与模型组比较差异均有统计学意义($P<0.05$),高剂量组与替加氟组、低剂量组比较差异有统计学意义($P<0.05$),说明高剂量组疗效优于替加氟组,且呈一定量效关系。

表 1 各组大鼠细胞凋亡指数比较(% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	凋亡指数
空白组	15	6.40 $\pm$ 3.17
模型组	13	2.44 $\pm$ 1.45*
替加氟组	10	10.58 $\pm$ 0.49* Δ
高剂量组	15	15.12 $\pm$ 0.71* Δ ▲#
中剂量组	15	13.44 $\pm$ 0.30* Δ
低剂量组	15	11.05 $\pm$ 0.65* Δ

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$;与替加氟组比较,▲ $P<0.05$;与低剂量组比较,# $P<0.05$

3.2 各组大鼠 Fas 蛋白表达比较

表 2 示,模型组 Fas 蛋白表达阳性率低于空白组($P<0.05$),各治疗组 Fas 蛋白表达阳性率均高于模型组($P<0.05$),高剂量组 Fas 蛋白表达阳性率高于替加氟组和低剂量组($P<0.05$),说明食管癌组织中存在 Fas 蛋白低表达的情况,而替加氟及豆根管食通口服液各剂量组均能提高食管癌组织中 Fas 蛋白表达,以高剂量组效果最为明显,呈一定的

量效关系。

表 2 各组大鼠 Fas 蛋白表达比较

组别	鼠数	Fas(只)				阳性数(只)	阳性率(%)
		-	+	++	+++		
空白组	15	8	5	2	0	7	46.7
模型组	13	12	0	0	1	1	7.7*
替加氟组	10	5	2	2	1	5	50.0 Δ
高剂量组	15	6	4	3	2	9	60.0 Δ ▲#
中剂量组	15	7	4	2	2	8	53.3 Δ
低剂量组	15	8	5	1	1	7	46.7 Δ

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$;与替加氟组比较,▲ $P<0.05$;与低剂量组比较,# $P<0.05$

3.3 各组大鼠 FasL 蛋白表达比较

表 3 示,模型组 FasL 蛋白表达阳性率明显高于空白组($P<0.01$),高、中、低剂量组 FasL 蛋白表达阳性率明显低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明食管癌组织中存在 FasL 蛋白高表达的情况,豆根管食通口服液高、中、低剂量组能降低食管癌组织中 FasL 蛋白表达,以高剂量组效果最佳,呈一定的量效关系。

表 3 各组大鼠 FasL 蛋白表达比较

组别	鼠数	FasL(只)				阳性数(只)	阳性率(%)
		-	+	++	+++		
空白组	15	15	0	0	0	0	0
模型组	13	3	5	3	2	10	76.9*
替加氟组	10	7	2	1	0	3	30.0
高剂量组	15	12	2	1	0	3	20.0 Δ Δ
中剂量组	15	12	1	2	0	3	20.0 Δ Δ
低剂量组	15	11	2	2	0	4	26.7 Δ

注:与空白组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

4 讨论

根据“邪郁蕴毒、痰瘀互结”的学术思想,以祛瘀化痰,攻逐癌毒为基本治法并结合现代药理研究,我们在临床中总结出了治疗食管癌的经验方豆根管食通口服液,方中山豆根散结消肿为君,(制)天南星温化痰涎,急性子软坚消痞,黄药子解毒散结消痞,(姜)半夏化痰散结降逆,沉香行气降逆,郁金活血止痛共为臣药,三七化痰理气为佐使。诸药相合,共成解毒散结、化痰祛瘀之功效。全方以祛邪为主,方简意赅,用于痰气交阻、瘀血内结或痰瘀互结等证型的食管癌患者。关于治痰治瘀,必先治气,气顺则痰消,气畅则瘀祛。肿瘤的形成过程中存在着“Fas 阴性选择和 FasL 阳性选择”过程:Fas 阳性的肿瘤细胞容易被活化的淋巴细胞识别并借助 FasL 与 Fas 的配接将其清除,即所谓“谋杀(murder)”,肿瘤细

胞 FasL 阳性表达亦可能将毗邻的 Fas 阳性瘤细胞清除,即所谓“兄弟相杀(fratricide)”,只有 Fas 阴性表达或 Fas 分子功能障碍的瘤细胞才能得以继续生存^[7],此即 Fas 阴性选择;FasL 阳性的瘤细胞能够反杀伤淋巴细胞,使肿瘤成为免疫特赦部位,为肿瘤发展创造相对稳定适宜的环境,此即 FasL 阳性选择。FasL 高度表达而 Fas 表达下调或功能缺失的肿瘤细胞容易获得更多的生存机会,这些细胞因不易死亡而积累癌变因素,最终成为永生的癌细胞。本研究结果显示,豆根管食通口服液可明显促进食管癌细胞的凋亡,且呈一定量效关系;食管癌组织中存在 Fas 蛋白低表达及 FasL 蛋白高表达的情况,豆根管食通口服液能提高食管癌组织中 Fas 蛋白表达,并降低食管癌组织中 FasL 蛋白表达,以高剂量组效果最为明显,呈一定的量效关系。本研究结果进一步验证了上述学说,同时提示豆根管食通口服液促进食管癌细胞凋亡的作用机制可能与其提高 Fas 表达,并降低 FasL 表达有关;此外,豆根管食通口服液促进食管癌细胞凋亡及调节 Fas、FasL 表达的作用存在一定的量效关系,并且高剂量的豆根管食通口服液此种作用优于替加氟片。

参考文献

- [1]王新杰,郑玉玲,张明智,等.豆根管食通口服液治疗食管癌近期疗效观察[J].郑州大学学报(医学版),2006,41(3):494-496.
- [2]郑玉玲,王祥麒,张明智,等.豆根管食通口服液治疗食管癌临床观察与研究[J].中医药学刊,2005,23(7):1175-1177.
- [3]马纯政,郑玉玲.豆根管食通口服液对人食管癌细胞多药耐药基因糖蛋白 P-170 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(6):237-239.
- [4]王玲玲,孙宏新.豆根管食通口服液对人食管癌细胞端粒酶活性影响的实验研究[J].时珍国医国药,2010,21(9):2387-2389.
- [5]郑玉玲,王祥麒,杨曦.豆根管食通口服液对大鼠食管癌病理变化影响的实验研究[J].中医杂志,2004,45(3):217-219.
- [6]洪永贵,黄涛,郑玉玲.地黄管食通口服液对食管癌大鼠放疗后端粒酶逆转录酶活性表达的影响[J].中医杂志,2011,52(11):952-954.
- [7]Schroter M, Peli J, Hahne M, et al. Fas-dependent tissue turnover is implicated in tumor cell clearance[J]. Oncogene, 2000, 19(14):1794-1800.

(收稿日期:2011-06-30;修回日期:2011-11-24)

[编辑:邓媛]



东华原医疗
DONGHUAYUAN MEDICAL

多快好省 煎好药





十功能自动煎药机



自动两煎煎药机



均分包装机



常压1+1煎药包装一体机



常压循环1+1一体机



双循环1+1煎药包装一体机

专业品牌
煎药包装设备行业领军品牌,拥有多项国家专利(ZL02 2 53232.3 ZL03 2 66107.X等) 6000多家医院、40000多家终端客户共同见证。

专业资质
9大系列、30多个型号产品,覆盖了中药煎药包装行业全部领域,充分满足医院、药店、诊所等不同机构的不同需求。

专业品质
通过ISO9001、ISO13485质量管理体系认证,德国CE安全认证,产品质量、服务及安全均已达到欧盟标准。

专业服务
全国30多家分公司和办事处,100多位维修工程师,450多位服务人员,为您提供及时周到的“一站式”服务。

北京东华原医疗设备有限责任公司

传 真: 010-89718021
网 址: www.donghuagroup.com
地 址: 北京市中关村科技园区昌平园振超路1号

400-888-0258
800-810-0359