

• 实验研究 •

扶正消癌方对 Lewis 肺癌模型小鼠的抑瘤作用

郭冬梅¹ 田 菲^{2*} 陈立伟² 冯 靖¹ 何 流¹ 王 兰¹

(1. 天津中医药大学, 天津市南开区鞍山西道 312 号, 300193; 2. 天津中医药大学第一附属医院肿瘤科)

* 通讯作者: tfei8@163.com, (022)27432506

[摘要] 目的 观察扶正消癌方对 Lewis 肺癌模型小鼠肿瘤生长的抑制作用及其机制。方法 选择 60 只 C57BL/6J 小鼠右前肢腋下接种 Lewis 肺癌细胞建立 Lewis 肺癌小鼠模型, 随机分为荷瘤模型组、环磷酰胺 (CTX) 组、中药预防组、综合组, 每组 15 只。CTX 组接种 72h 后一次性腹腔注射 CTX 溶液 0.2ml (4mg/ml), 中药预防组接种前 5 天开始灌胃扶正消癌方 0.4ml (2g/ml), 综合组在 CTX 组基础上灌胃扶正消癌方 0.4ml (2g/ml), 荷瘤模型组给予 0.4ml 生理盐水灌胃; 每天灌胃 1 次, 至造模后 12 天。观察各组小鼠生存状态及移植瘤生长情况, 称量瘤重、胸腺重, 计算抑瘤率、胸腺指数。免疫组化法检测瘤组织细胞黏附因子 CD44 的表达。结果 与荷瘤模型组比较, 各组瘤重均显著降低 ($P < 0.01$), 综合组瘤重显著低于 CTX 组 ($P < 0.01$), CTX 组、中药预防组、综合组抑瘤率分别为 83.97%、55.71%、87.23%。与荷瘤模型组比较, CTX 组和综合组胸腺重均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), CTX 组胸腺指数显著降低 ($P < 0.01$); 与 CTX 组比较, 中药预防组胸腺重量显著增加 ($P < 0.01$), 综合组胸腺指数显著增加 ($P < 0.05$)。综合组 CD44 表达程度最低, 与 CTX 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 扶正消癌方可以协同化疗药物, 提高肿瘤细胞对免疫系统及抗癌药物的敏感性, 下调或逆转 Lewis 肺癌模型小鼠黏附因子 CD44 表达, 发挥抑瘤和抗转移作用。

[关键词] 扶正消癌方; 肺癌; CD44; 抑瘤作用

Tumor Inhibitory Effect of Fuzheng Xiaoi Formula on Lewis Lung Cancer Model Mice

GUO Dongmei¹, TIAN Fei², CHEN Liwei², FENG Jing¹, HE Liu¹, WANG Lan¹

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193; 2. The First Affiliated Hospital, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the tumor inhibitory effect and its mechanism of Fuzheng Xiaoi Formula (formula for supporting the right-qi and resisting tumor) on Lewis lung cancer (LLC) mice. **Methods** Sixty C57BL/6J mice were used to establish LLC models and they were randomized into the cancer model group, cisplatin (CTX) group, Chinese medication group and combination group, with 15 in each. The CTX group was treated with intraperitoneal injection of 0.2ml (4mg/ml) CTX solution 72 hours after vaccination. The Chinese medication group was treated with intragastric administration of 0.4ml (2g/ml) Fuzheng Xiaoi Formula 5 days before modeling. The combination group was treated with both Fuzheng Xiaoi Formula and CTX. The cancer model group was given 0.4ml of normal saline intragastrically. The intragastric administration repeated once daily for 12 days. The survival status and the growth of transplanted tumors were observed. The weight of tumor and thymus was weighed. The tumor inhibitory rate and thymus index were calculated. The expression of CD44 was detected with immunohistochemical method. **Results** Comparing with the cancer model group, the tumor weight decreased significantly in other groups ($P < 0.01$). The tumor weight in the combination group was significantly lower than that in the CTX group ($P < 0.01$). The tumor inhibitory rate of the CTX group, Chinese medication group and combination group was 83.97%, 55.71% and 87.23% respectively. Comparing with the cancer model group, the thymus weight in the CTX group and combination group decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the thymus index decreased significantly in the CTX group ($P < 0.01$). Comparing with the CTX group, the thymus weight in the Chinese medication group increased significantly ($P < 0.01$), and the thymus index in the combination group increased significantly ($P < 0.05$). The degree of CD44 expression in the combination group was the lowest with statistical significance as compared with that in CTX group ($P < 0.05$). **Conclusion** Fuzheng Xiaoi Formula could increase the effectiveness of chemotherapy drugs, improve the sensitivity of tumor cells to the immune system and anti-cancer drugs, down-regulating or reversing the expression of CD44 and play a role in tumor inhibitory and anti-metastasis.

Keywords Fuzheng Xiaoi Formula (formula for supporting the right-qi and resisting tumor); lung cancer; CD44; tumor inhibitory

肺癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一。探讨抑瘤、促凋亡,从而减少转移,是目前中医药研究的重点^[1]。现代医学认为,恶性肿瘤逃脱机体免疫系统监视生存的原因之一就是癌细胞的分离脱落—细胞黏附力降低。细胞黏附因子 CD44 参与免疫逃逸机制从而促进肿瘤侵袭^[2]。本研究观察扶正消癌方对 Lewis 肺癌模型小鼠抑瘤率、胸腺指数以及 CD44 表达的影响,探讨扶正消癌方与肿瘤生长、转移的关系。

1 资料与方法

1.1 动物及瘤株

SPF 级 C57BL/6J 小鼠 60 只,雄性,体重 18~22g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心。合格证号:SCXK(军)2007-005。Lewis 肺癌瘤株,购自天津市医药科学研究所。

1.2 药物

扶正消癌方由黄芪、当归、冬虫夏草、白花蛇舌草、龟甲、鳖甲等组成,水煎醇沉法提取分离,制备合剂,浓缩为 2g/ml。注射用环磷酰胺(CTX,0.2g/支)购自上海第十二制药厂,批号:H21020217。

1.3 主要试剂及仪器

Rabbit Anti-CD44(BA2202)、DAB 显色试剂盒(CW0125)、即用型 SP 试剂盒(CW0118)均由武汉博士德生物工程有限公司提供,显微镜(日本 Olympus 公司,BX51)。

1.4 动物造模及给药^[3]

取对数生长期的 Lewis 肺癌细胞,200 目滤网过滤,制成单细胞悬液,生理盐水将悬液稀释成 6×10^6 /ml 细胞悬液,取 0.1ml 常规方法接种于小鼠右前肢腋下。

接种后小鼠按照随机数字表法分为荷瘤模型组、CTX 组、中药预防组、综合组,每组 15 只。CTX 组于接种 72h 后一次性腹腔注射 CTX 溶液 0.2ml (4mg/ml);中药预防组在接种前 5 天灌胃扶正消癌方药 0.4ml(2g/ml);综合组在 CTX 组基础上灌胃扶正消癌方药 0.4ml(2g/ml);荷瘤模型组在接种 24h 后灌胃 0.4ml 生理盐水;每天灌胃 1 次,至造模后 12 天。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 小鼠生存状态 每日观察各组小鼠体态、毛色、进食及死亡等情况。

1.5.2 抑瘤率、胸腺指数测定 接种 Lewis 肺癌细胞第 12 天,处死各组小鼠,取瘤称重,计算抑瘤

率^[4],并取 $1.5\text{cm} \times 1\text{cm} \times 0.5\text{cm}$ 生长良好瘤组织,10%多聚甲醛中固定;取小鼠胸腺称重,计算胸腺指数。抑制率(%)=(1-治疗组平均瘤重/对照组平均瘤重)×100%。胸腺指数(mg/g)=胸腺重量(mg)/小鼠重量(g)。

1.5.3 免疫组化法检测小鼠 CD44 表达 瘤组织常规石蜡包埋、切片,采用免疫组织化学染色,DAB 显色,镜下观察,用 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照。CD44 阳性物质为棕黄色颗粒,主要定位于肿瘤细胞膜和细胞浆中。每张切片光镜(200×)下随机取 5 个不同视野^[5],显微镜图像采集系统采集图像,测量 CD44 阳性表达面积百分比。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计学软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析及 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组 Lewis 肺癌小鼠生存状态观察

接种 Lewis 肺癌瘤株后第 5 天,各组小鼠右前肢腋下可触及黄豆大小瘤块,第 7 天瘤体生长明显加快,各组均逐渐出现脱毛、毛发缺少光泽、喜聚集、行动迟缓和进食量减少等现象。中药预防组活力较好,一般情况优于其他各组,荷瘤模型组及综合组一般情况较差,CTX 组一般情况最差。荷瘤模型组、CTX 组在给药期间各死亡 1 只。

2.2 各组 Lewis 肺癌小鼠瘤重及抑瘤率比较

表 1 示,与荷瘤模型比较,其他各组瘤重均显著降低($P < 0.01$),综合组瘤重显著低于 CTX 组($P < 0.01$)。CTX 组、中药预防组、综合组抑瘤率分别为 83.97%、55.71%、87.23%,综合组抑瘤率高于 CTX 组和中药预防组。

表 1 各组 Lewis 肺癌小鼠瘤重及抑瘤率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	瘤重(g)	抑瘤率(%)
荷瘤模型组	14	3.68 ± 0.06	—
CTX 组	14	$0.59 \pm 0.05^*$	83.97
中药预防组	15	$1.63 \pm 0.08^*$	55.71
综合组	15	$0.47 \pm 0.05^{*\Delta}$	87.23

注:与荷瘤模型组比较,* $P < 0.01$;与 CTX 组比较, $\Delta P < 0.01$

2.3 各组 Lewis 肺癌小鼠胸腺重及胸腺指数比较

表 2 示,与荷瘤模型比较,CTX 组和综合组胸腺重均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),CTX 组胸腺指数显著降低($P < 0.01$);与 CTX 组比较,中药预防组胸腺重量显著增加($P < 0.01$),综合组胸腺指数显著增加($P < 0.05$)。

表 2 各组 Lewis 肺癌小鼠胸腺重及胸腺指数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	胸腺重(mg)	胸腺指数(mg/g)
荷瘤模型组	14	35.14±1.01	1.34±0.07
CTX 组	14	32.74±1.54**	1.21±0.13*
中药预防组	15	37.55±1.49△△	1.46±0.07
综合组	15	34.04±1.98*	1.63±0.09△

注:与荷瘤模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 CTX 组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

2.4 各组 Lewis 肺癌小鼠瘤组织 CD44 表达比较

表 3 示,与荷瘤模型组比较,各组 Lewis 肺癌小鼠瘤组织 CD44 阳性表达面积百分比均显著降低($P<0.01$);与 CTX 组比较,综合组瘤组织 CD44 阳性表达面积百分比显著降低($P<0.05$)。

表 3 各组 Lewis 肺癌小鼠瘤组织 CD44 表达比较($\%,\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CD44 阳性表达面积
荷瘤模型组	14	70.59±4.02
CTX 组	14	43.64±2.64*
中药预防组	15	63.14±2.64*
综合组	15	39.78±2.51*△

注:与荷瘤模型组比较,* $P<0.01$;与 CTX 组比较,△ $P<0.05$

3 讨论

肺癌患者由于“邪毒”的存在,而表现为正虚邪实,特别是手术、放疗、化疗后出现的一系列虚弱证候,多属中医的“虚劳”范畴^[6]。肺癌中医病机以“毒、瘀、积”为主,“毒”既包含了各种致癌因素,也包含了癌本身;“瘀”包含了气血不畅之理;“积”包含了有形之肿瘤,所以治疗主张“解毒散结祛瘀”^[7]。针对肺癌病机自拟扶正消癌方,君以白花蛇舌草清热解毒,活血祛瘀,臣以龟甲滋阴潜阳、补肾健骨、养血补心,鳖甲散结消痞,滋阴潜阳,共奏解毒祛瘀之功;佐以黄芪甘温益气补脾胃,冬虫夏草补肺益肾以使正气充足,邪气自消,诸药合用共达祛邪不伤正,扶正不留邪之功。

肺癌因其恶性程度高,转移早,其转移受多种因素的影响,其中黏附分子的异常表达与肿瘤的浸润、转移的关系倍受关注。CD44 是黏附因子家族的跨膜糖蛋白,能与细胞内骨架蛋白结合,参与细胞运动,这种结合有利于癌细胞的扩散与转移^[8]。

本研究通过动物移植性肿瘤实验法探讨扶正消

癌方对 Lewis 肺癌模型小鼠细胞黏附因子 CD44 表达的影响及抑制肿瘤生长的作用。研究发现,中药预防组小鼠出现脱毛,毛发缺少光泽、聚集、不活泼、行动迟缓和进食量减少的现象较其他组明显较少;同荷瘤模型组比较,各给药组对移植瘤均有抑制作用,CD44 阳性表达面积百分比显著降低;综合组抑瘤作用明显优于 CTX 组,并且综合组 CD44 阳性表达面积百分比比较 CTX 组显著降低,表明扶正消癌方与化疗药物 CTX 具有协同增效作用。与 CTX 组胸腺重、胸腺指数相比,中药预防组小鼠胸腺重量增加,综合组胸腺指数升高,表明扶正消癌方可以减轻 Lewis 肺癌模型小鼠免疫功能抑制。综上所述,扶正消癌方能够改善肺癌模型小鼠的生存质量,增加小鼠的胸腺重和胸腺指数,提高肿瘤细胞对免疫系统及抗癌药物的敏感性,抑制瘤细胞生长和转移,其机制可能与下调 CD44 因子表达有关。

参考文献

[1]田菲,陈军,贾英杰,等.五海丸对体外培养肺癌细胞生长及诱导细胞凋亡的影响[J].中国中医急症,2004,13(10):681-682.

[2]Harigaya K. Role of CD44 and MT1-MMP in colorectal cancer invasion and metastasis[J]. Nihon Rinsho, 2003, 61(Suppl 7):111-115.

[3]田菲,贾英杰,陈军,等.肺一丸对肺癌血管生成及转移影响的实验研究[J].天津中医药,2003,20(5):56-58.

[4]田菲,贾英杰,陈军,等.肺一丸对小鼠移植瘤 VEGF 的表达及肺转移相关性研究[J].肿瘤防治杂志,2004,11(11):1141-1143.

[5]Takigawa N, Segawa Y, Mandai K, et al. Serum CD44 levels in patients with non-small cell lung cancer and their relationship with clinicopathological features [J]. Lung Cancer, 1997, 18(2):147-157.

[6]田菲,贾英杰,陈军,等.扶正液对于肺癌患者的肿瘤标志物 CYFRA 及免疫功能的影响[J].肿瘤研究与临床,2004,16(6):378-379.

[7]田菲,贾英杰,陈军,等.五海丸抗 LA795 小鼠肺腺癌细胞转移的研究[J].中医药学刊,2002,20(7):37.

[8]Tanabe KK, Ellis LM, Saya H. Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases [J]. Lancet, 1993, 341(8847):725-725.

(收稿日期:2012-03-26;修回日期:2012-05-20)

[编辑:洪 涛]

欢 迎 投 稿

欢 迎 订 阅