

白花蛇舌草注射液对多发性骨髓瘤细胞株增殖的抑制作用

张翔 周郁鸿 叶宝东* 林圣云

浙江中医药大学附属第一医院, 浙江省杭州市上城区邮电路 54 号, 310006

基金项目: 浙江省高校重中之重学科建设资助项目(1506006)

* 通讯作者: yebaodong@yahoo.com.cn, (0571)86620325

[摘要] 目的 探讨白花蛇舌草注射液(HDI)对多发性骨髓瘤(MM)细胞株 RPMI 8226、U266 增殖抑制作用及机制。方法 将 RPMI 8226、U266 细胞以 1×10^6 /ml 的浓度接种于含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液中, 取对数生长期的细胞进行实验。检测 HDI 对 RPMI 8226、U266 抑制作用并筛选研究浓度; 观察不同浓度 HDI 对 RPMI 8226、U266 细胞凋亡、细胞周期、细胞因子及细胞株相关基因 mRNA 表达的影响。结果 筛选出 0、20、40、60 μ l/ml HDI 作用于 RPMI 8226、U266 细胞株, HDI 可抑制 RPMI 8226、U266 增殖, 诱导 RPMI 8226 凋亡, 且有 G1/S 期阻滞作用。HDI 可下调 RPMI 8226、U266 上清液血管内皮生长因子(VEGF)水平, 且呈浓度依赖, 同时上调 RPMI 8226 白细胞介素-6(IL-6)水平、下调 U266 IL-6 水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。经 40 μ l/ml HDI 处理后, RPMI 8226 及 U266 细胞株相关基因除 Bax、Caspase-3 外其余基因 mRNA 表达均有改变($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 HDI 可抑制 MM 细胞株 RPMI 8226、U266 增殖, 其作用机制可能促进细胞凋亡、阻滞细胞周期及改变细胞因子及细胞株相关基因 mRNA 表达有关, 但途径不尽相同。

[关键词] 白花蛇舌草注射液; 多发性骨髓瘤; 细胞株; 细胞增殖

Inhibitory Effect of Hedyotis Diffusa Injection on Multiple Myeloma Cell Proliferation

ZHANG Xiang, ZHOU Yuhong, YE Baodong, LIN Shengyun

(First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang Province 310006)

ABSTRACT Objective To observe the inhibitory effect of Hedyotis Diffusa Injection (HDI) on the proliferation of multiple myeloma (MM) cell lines RPMI 8226 and U266 and its mechanism. **Methods** The RPMI 8226 and U266 cells of 1×10^6 /ml concentration were seeded into the RPMI 1640 culture solution with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. The cells in logarithmic growth phase were selected to do the experiment. The inhibitory effect of HDI on RPMI 8226 and U266 was detected and the concentration was screened. The effect of HDI with different concentrations on the apoptosis, cell cycle, cytokines and cell lines related gene mRNA of RPMI 8226 and U266 was observed. **Results** There were 0, 20, 40 and 60 μ l/ml concentrations of HDI selected on RPMI 8226 and U266. HDI could inhibit the proliferation of RPMI 8226 and U266 and induce RPMI 8226 apoptosis with G1/S phase arrest. HDI could down-regulate the vascular endothelial growth factor (VEGF) level of RPMI 8226 and U266 supernatant with concentration dependence. HDI could up-regulate the interleukin-6 (IL-6) level of RPMI 8226 and down-regulate the IL-6 level of U266 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression of RPMI 8226 and U266 cell lines related genes was changed after processed by 40 μ l/ml HDI except Bax and Caspase-3 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** HDI can inhibit the proliferation of RPMI 8226 and U266 cells, which may be relevant to promoting apoptosis, arresting cell cycle and changing cytokines and expression of cells related gene mRNA with different way.

Keywords Hedyotis Diffusa Injection; multiple myeloma; cell lines; cell proliferation

多发性骨髓瘤(Multiple Myeloma, MM)是浆细胞异常克隆增生的恶性肿瘤, 随着蛋白酶体抑制剂、血管新生抑制剂的运用, 临床疗效有所提高, 然 MM 起病隐匿、发病年龄偏大, 故往往患者常规难以耐受化疗, 且难治、复发病例屡见不鲜。我们以 MM 细胞株 RPMI 8226、U266 为研究对象, 探索白花蛇舌草注射液(HDI)抑制 MM 细胞株增殖的机制, 明确其作用靶点, 同时比较 HDI 作用于两细胞株之靶点异同, 为临床应用提供佐证。

1 材料与方法

1.1 药品及细胞株

HDI 为吉林省通化振国药业有限公司产品, 国药准字 Z22022101, 批号: 110702。RPMI 8226、U266 细胞株由浙江大学血液病研究所惠赠。

1.2 主要试剂

PBS(杭州吉诺生物医药技术有限公司, 批号 12041009)、RPMI 1640 培养液(杭州吉诺生物医药技术有限公司, 12041206)、胎牛血清(Gibco,

623311)、噻唑蓝(MTT, Amresco, 0490C086)、二甲基亚砜(DMSO, Sigma 进口分装)、细胞凋亡试剂盒(Annexin V-PI, Biouniquer, 0105)、细胞周期试剂盒(达文生物有限公司进口分装, 10C1008A)、CD44 流式抗体(FITC anti-human CD44, Biolegend, B136058)、CD49d 流式抗体(PE anti-human CD49d, Biolegend, B147138)、CD106 流式抗体(PE anti-human CD106, Biolegend, B144545)、CD11b 流式抗体(PE anti-human CD11b, Biolegend, B146213)、FITC 流式抗体同型对照(FITC Mouse IgG1, κ Isotype, Biolegend, B144171)、PE 流式抗体同型对照(PE Mouse IgG1, κ Isotype, Biolegend, B145755)、白细胞介素-6(IL-6, 达科为生物技术有限公司, E1060-12-01)、血管内皮生长因子(VEGF, 达科为生物技术有限公司, E1734-12-01)、白细胞介素-10(IL-10, Ebioscience, A895138)、干扰素- γ (IFN- γ , Ebioscience, A258902)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α , Ebioscience, A510236) ELISA 试剂盒、DEPC 水(达文生物有限公司进口分装, WD33209)、Trizol(Invitrogen, 1382739)、RNA 逆转录试剂盒(PrimeScript[®] RT reagent Kit, Takara, BK3801)、荧光定量 RT-PCR 试剂盒(SYBR[®] Premix Ex TaqTM II, Takara, BK5204)、RT-PCR 引物(上海生工生物有限公司)。

1.3 细胞培养

将 RPMI 8226、U266 细胞以 1×10^6 /ml 的浓度接种于含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液中, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 2~3 天换液 1 次。取对数生长期的细胞进行实验。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 细胞抑制率 取 HDI 原液, 使用 RPMI 1640 培养液进行稀释, 取 40 μ l 加入总体积 200 μ l 体系, 得各组 HDI 终浓度为 80、60、40、20、10、5 μ l/ml。每孔总体积 200 μ l, 其中含 10% 胎牛血清、20% HDI RPMI 1640 稀释液、70% 1640 培养液, 同时设阳性对照组(10% 胎牛血清 RPMI 1640 液加细胞)、阴性对照组(10% 胎牛血清 RPMI 1640 液不含细胞)。RPMI 8226、U266 细胞终浓度为 5×10^4 /ml, 每组 6 个复孔接种于 96 孔板中, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 3 天, 加入 MTT (5mg/ml) 20 μ l, 孵育 4 h, 1500 r/min 共 15 min 离心去上清, 每孔加入 150 μ l DMSO, 摇床上振荡 10 min, 于酶标仪上测定 490 nm 处吸光度(A)值, 取平均值, 计算细胞抑制率, 细胞抑制率 = $1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$

1.4.2 细胞凋亡 取对数期生长细胞, 细胞调整至 7.5×10^4 /ml, 分设药物浓度为 60 μ l/ml、40 μ l/ml、20 μ l/ml、0 μ l/ml 组接种于 6 孔板。培养 24 h 后, 按 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒步骤操作。各组细胞用 PBS 洗 2 遍, $1 \times$ Binding Buffer 调整细胞至 1×10^6 /ml, 吸取 300 μ l, 加 Annexin V-FITC 5 μ l、PI 5 μ l, 室温下避光孵育 15 min, 1 h 之内, 用流式细胞仪 FACSscan 检测凋亡率。

1.4.3 细胞周期 取对数期生长细胞, 细胞调整至 7.5×10^4 /ml, 分设药物浓度为 60、40、20、0 μ l/ml 组接种于 6 孔板。培养 24 h 后, 按细胞周期试剂盒步骤操作。各组细胞用 PBS 洗 2 遍, DNA Staining Solution 调整细胞至 1×10^6 /ml, 吸取 300 μ l, 加 PI 10 μ l, 室温下避光孵育 30 min, 1 h 之内, 用流式细胞仪 FACSscan 检测, 并用 ModFit LT 软件分析结果。

1.4.4 细胞因子 取对数期生长细胞, 细胞调整至 1.0×10^5 /ml, 分设药物浓度为 60、40、20、0 μ l/ml 组接种于 6 孔板。培养 72 h 后, 收集细胞, 1500 r/min 共 10 min 离心后收集上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书检测上清液细胞因子 IL-6、VEGF、IL-10、IFN- γ 、TNF- α 浓度。

1.4.5 细胞株相关基因 mRNA 表达 取对数期生长细胞, 细胞调整至 7.5×10^4 /ml, 分设药物浓度为 40 μ l/ml、0 μ l/ml 组接种于培养瓶。培养 6 h 后收集细胞进行总 RNA 提取, 所提取的总 RNA 经紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 吸光度(A)值及总 RNA 浓度, A260/A280 在 1.80~2.20 之间者用于 RT-PCR。参照 PrimeScript[®] RT reagent Kit 试剂盒说明, 使用条件 37℃ 15 min、85℃ 5s 进行逆转录反应, 随后在 4℃ 放置 15 min 后分装, -20℃ 保存备用。参照 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 试剂盒说明。将 50 μ l 体系分为 3 个复孔, 每孔含 10 μ l, 加入 384 孔板中, 使用 ABI PRISM[®] 7900HT 进行扩增, 95℃ 30s 预变性, 95℃ 5s、60℃ 30s 共计 40 个循环 PCR 反应。反应结束后得到扩增曲线和溶解曲线, 并进行结果分析。

1.5 统计学方法

使用 SPSS 19.0 进行统计分析, 数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 作单因素方差分析。

2 结果

2.1 不同浓度 HDI 对 MM 细胞株 RPMI 8226、U266 细胞抑制率的影响

表 1 示, HDI 对 RPMI 8226、U266 细胞株的抑

制作用呈浓度依赖,U266 较 RPMI 8226 对 HDI 敏感,RPMI 8226 在药物浓度 $10\mu\text{l/ml}$ 以下时生长抑制不明显($P>0.05$),而药物浓度提升到 $20\mu\text{l/ml}$ 时生长明显受抑制($P<0.01$),而 U266 在药物浓度为 $5\mu\text{l/ml}$ 时生长明显受抑制($P<0.01$)。据此结果,选取 0、20、40、60 $\mu\text{l/ml}$ 4 个浓度行进一步研究。

表 1 不同浓度 HDI 对 MM 细胞株 RPMI 8226、U266 细胞抑制率的比较(%, $\bar{x}\pm s$)

HDI 浓度($\mu\text{l/ml}$)	RPMI 8226 抑制率	U266 抑制率
80	95.10 $\pm$ 0.02* $\triangle$ ▲# $\blacklozenge$	94.50 $\pm$ 0.02* $\triangle$ ▲# $\blacklozenge$
60	56.87 $\pm$ 0.01* $\triangle$ ▲# $\bullet$	86.97 $\pm$ 0.01* $\triangle$ ▲# $\bullet$
40	38.90 $\pm$ 0.02* $\triangle$ ▲#	59.71 $\pm$ 0.01* $\triangle$ ▲#
20	5.32 $\pm$ 0.01* $\triangle$ ▲	10.32 $\pm$ 0.04* $\triangle$ ▲
10	1.60 $\pm$ 0.01	6.10 $\pm$ 0.01*
5	0.41 $\pm$ 0.001	3.98 $\pm$ 0.02*
0	0	0

注:与 0 $\mu\text{l/ml}$ 比较,* $P<0.01$;与 5 $\mu\text{l/ml}$ 比较, $\triangle P<0.01$;与 10 $\mu\text{l/ml}$ 比较,▲ $P<0.01$;与 20 $\mu\text{l/ml}$ 比较,# $P<0.01$;与 40 $\mu\text{l/ml}$ 比较,● $P<0.01$;与 60 $\mu\text{l/ml}$ 比较, $\blacklozenge P<0.01$

2.2 不同浓度 HDI 对 MM 细胞株 RPMI 8226、U266 细胞凋亡的影响

分别以 0、20、40、60 $\mu\text{l/ml}$ 浓度 HDI 作用于 RPMI 8226、U266 细胞株 24 h 后,RPMI 8226 早期凋亡率分别为(3.2 $\pm$ 2.3)%、(4.4 $\pm$ 2.7)%、(11.3 $\pm$ 1.9)%、(23.1 $\pm$ 2.2)%,40、60 $\mu\text{l/ml}$ 浓度与 0、20 $\mu\text{l/ml}$ 比较差异有统计学意义($P<0.05$);而 U266 早期凋亡率分别为(2.2 $\pm$ 0.6)%、(3.1 $\pm$ 0.9)%、(7.7 $\pm$ 1.0)%、(11.4 $\pm$ 2.1)%,40、60 $\mu\text{l/ml}$ 浓度与 0、20 $\mu\text{l/ml}$ 浓度比较差异有统计学意义($P<0.05$)。提示 HDI 可诱导 RPMI 8226 凋亡,且

呈浓度依赖,而对 U266 诱导凋亡率在 10%左右,故认为诱导凋亡作用并不明显。

2.3 不同浓度 HDI 对 MM 细胞株 RPMI 8226、U266 细胞周期的影响

分别以 0、20、40、60 $\mu\text{l/ml}$ 浓度 HDI 作用于 RPMI 8226、U266 细胞株 24 h 后,RPMI 8226 G1 期细胞比例分别为 36.86%、44.40%、47.80%、52.66%,故 HDI 对 RPMI 8226 有 G1/S 期阻滞作用;U266 G2 期细胞比例分别为 15.18%、6.57%、4.19%、2.72%,故 HDI 对 U266 细胞有 S/G2 期阻滞作用。

2.4 不同浓度 HDI 对 MM 细胞株 RPMI 8226、U266 细胞因子水平的影响

表 2 示,经不同浓度 HDI 作用后,RPMI 8226 上清液 VEGF 含量降低,IL-6 含量升高,且呈浓度依赖($P<0.05$ 或 $P<0.01$);而 IL-10、IFN- γ 、TNF- α 含量无明显改变。表 3 示,U266 上清液 VEGF、IL-6 含量降低,且呈浓度依赖($P<0.01$);而 IL-10、IFN- γ 含量无明显改变。40 $\mu\text{l/ml}$ HDI 作用 U266 后 TNF- α 水平高于 0、20、60 $\mu\text{l/ml}$ 作用后($P<0.01$)。

2.5 40 $\mu\text{l/ml}$ HDI 对 RPMI 8226、U266 细胞株相关基因 mRNA 表达影响

表 4 示,荧光定量 RT-PCR 中 0 $\mu\text{l/ml}$ HDI 为对照,各基因值均为 1。40 $\mu\text{l/ml}$ HDI 作用后,RPMI 8226 Survivin mRNA 显著下调($P<0.01$),而 Bcl-2、VEGF-A、IL-6、RELA (P65)、STAT3、Notch1、ERK1 等基因的 mRNA 显著上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 Bax、Caspase-3、p38MAPK

表 2 不同浓度 HDI 对 RPMI 8226 细胞株细胞因子水平影响(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

HDI 浓度($\mu\text{l/ml}$)	IL-6	VEGF	IL-10	IFN- γ	TNF- α
60	52.26 $\pm$ 2.62* $\triangle$ ▲	414.24 $\pm$ 12.52* $\triangle$ ▲	8.19 $\pm$ 0.40	4.04 $\pm$ 0.20	44.63 $\pm$ 6.35
40	131.67 $\pm$ 0.11* $\triangle$ ▲	978.23 $\pm$ 29.35* $\triangle$	8.91 $\pm$ 2.19	4.23 $\pm$ 0.09	40.64 $\pm$ 6.41
20	67.58 $\pm$ 3.18*	1178.74 $\pm$ 74.11*	8.64 $\pm$ 0.75	4.08 $\pm$ 0.21	34.69 $\pm$ 7.57
0	26.03 $\pm$ 0.95	1315.79 $\pm$ 34.43	9.99 $\pm$ 3.47	4.82 $\pm$ 0.56	33.19 $\pm$ 2.82

注:与 0 $\mu\text{l/ml}$ 比较,* $P<0.01$;与 20 $\mu\text{l/ml}$ 比较, $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$;与 40 $\mu\text{l/ml}$ 比较,▲ $P<0.01$

表 3 不同浓度 HDI 对 U266 细胞株细胞因子水平影响(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

HDI 浓度($\mu\text{l/ml}$)	IL-6	VEGF	IL-10	IFN- γ	TNF- α
60	5.86 $\pm$ 1.03* $\triangle$ ▲	30.57 $\pm$ 8.57* $\triangle$ ▲	10.56 $\pm$ 2.34	4.33 $\pm$ 0.09	56.93 $\pm$ 7.30▲
40	16.51 $\pm$ 1.56* $\triangle$	104.15 $\pm$ 6.32* $\triangle$	11.38 $\pm$ 3.37	4.18 $\pm$ 0.14	214.88 $\pm$ 15.86* $\triangle$
20	60.18 $\pm$ 1.46*	1252.94 $\pm$ 23.39*	8.18 $\pm$ 0.75	4.22 $\pm$ 0.10	51.46 $\pm$ 1.93
0	165.37 $\pm$ 9.66	1876.19 $\pm$ 91.00	10.93 $\pm$ 3.47	4.54 $\pm$ 0.08	48.26 $\pm$ 5.00

注:与 0 $\mu\text{l/ml}$ 比较,* $P<0.01$;与 20 $\mu\text{l/ml}$ 比较, $\triangle P<0.01$;与 40 $\mu\text{l/ml}$ 比较,▲ $P<0.01$

mRNA 变化不明显($P>0.05$)。U266 Survivin、IL-6、RELA(P65)、Notch1、STAT3、p38MAPK 等基因 mRNA 显著下调($P<0.01$), VEGF-A、Bcl-2 mRNA 显著上调($P<0.01$), Bax、Caspase-3、ERK1 mRNA 变化不明显($P>0.05$)。

表 4 40 $\mu\text{l/ml}$ HDI 对 RPMI 8226、U266 细胞株相关基因 mRNA 表达影响($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, $\bar{x}\pm s$)

基因	RPMI 8226	U266
Bcl-2	1.37 $\pm$ 0.06	1.19 $\pm$ 0.06
Bax	1.09 $\pm$ 0.14	0.98 $\pm$ 0.02
Caspase-3	1.13 $\pm$ 0.11	0.99 $\pm$ 0.01
Survivin	0.72 $\pm$ 0.05	0.67 $\pm$ 0.05
VEGF-A	4.53 $\pm$ 0.38	3.85 $\pm$ 0.14
IL-6	2.26 $\pm$ 0.32	0.27 $\pm$ 0.06
RELA(P65)	1.34 $\pm$ 0.10	0.80 $\pm$ 0.03
STAT3	1.16 $\pm$ 0.06	0.76 $\pm$ 0.03
Notch1	1.83 $\pm$ 0.12	0.77 $\pm$ 0.04
p38MAPK	1.01 $\pm$ 0.03	0.78 $\pm$ 0.08
ERK1	1.83 $\pm$ 0.12	0.91 $\pm$ 0.03

3 讨论

MM 属中医“骨痹”、“肾痹”、“血证”等范畴,病位在骨髓,为本虚标实证,以肾脾肝三脏亏损为本,毒蕴血瘀痰湿为标,肾虚毒蕴血瘀贯穿疾病始终,临床证型变化较为复杂,以肾虚血瘀型最为多见,治疗以补肾解毒、化痰逐瘀为大法。白花蛇舌草具清热解毒、消痈散结、利水消肿功效,近年来其被用于的治疗,现代研究发现其通过调控 Ras、C-myc、Bcl-2 等癌基因表达、抑制 eEGFR-Ras-MEK-ERK 通路活性、增强免疫、使细胞内钙超载等途径发挥抗肿瘤作用^[1]。目前对该药的药理研究主要采用水提物或醇提物、有效成分单体、注射液等几种形式,然不同剂型有效成分的差异导致作用机制不尽相同,本研究选取 HDI 为研究对象,前期研究发现其并不能诱导白血病细胞株 HL-60、K562、NB4 早期凋亡^[2-3],可能与该药水提或醇提物作用机制有一定差别相关。

MM 细胞株较多,RPMI 8226 及 U266 细胞株最为常用,其中 RPMI 8226 属 IgG 型 MM^[4],U266 属 IgE 型 MM 且可自分泌 IL-6,两者轻链均为 λ 型。本研究发现,HDI 可抑制两细胞株的增殖,然而其作用机制不尽相同,HDI 可以诱导 RPMI 8226 细胞早期凋亡,且有一定 G1/S 期阻滞作用;而 HDI 作用于 U266 后,并不能诱导其早期凋亡,60 $\mu\text{l/ml}$

HDI 作用以晚期或坏死为主,早期凋亡率始终不超过 10%,且细胞周期以 S/G2 期阻滞为主。经 RT-PCR 分析,Survivin mRNA 表达下调可能是两者共同生长抑制的机制,Bcl-2 转录水平提高可能是共同代偿性促生存途径,然而对 Bax、Caspase-3 分析发现,U266 经 HDI 作用后几乎没有转录水平的改变,而 RPMI 8226 两者表达水平有一定上调趋势,倾向于支持 HDI 抑制 RPMI 8226 增殖是通过诱导凋亡实现的。HDI 可以下调 U266RELA、Notch1、ERK1、p38MAPK、STAT3 mRNA 水平,MM 患者瘤细胞存在 Notch、ERK、p38MAPK、JAK/STAT3 等促增殖生存、抗凋亡通路的异常激活,故 HDI 可能通过抑制此类信号通路激活进而抑制 U266 细胞增殖;而在 RPMI 8226 中得到相反的结果,RELA、Notch1、ERK1、p38MAPK、STAT3 mRNA 水平均不同程度上调,可能成为另一代偿性促生存途径。

MM 患者存在着细胞因子网络的异常,其中 IL-6 是促 MM 细胞增殖最为关键的细胞因子,而 VEGF 具有促血管新生及肿瘤细胞增殖的双重作用,两者均可以通过自分泌、旁分泌途径发挥作用,MM 患者均高表达^[5-6]。IL-10 可通过 IL-6 非依赖途径促进 MM 细胞增殖;IFN- γ 则是抑增殖因子,然并不影响 IL-6 分泌;TNF- α 亦是促增殖因子,三者 MM 发病中亦起部分作用,其表达存在异常^[6]。本研究发现经不同浓度 HDI 作用后,RPMI 8226、U266 细胞株上清 VEGF 水平均降低,且呈浓度依赖,然 VEGF mRNA 水平表达增高,故 HDI 对下调 VEGF 表达并不在通过转录水平,可能通过降低分泌、提高降解等途径实现;HDI 对于 IL-6 作用具有相反的结果,HDI 可通过下调 U266IL-6 mRNA 表达降低上清 IL-6 水平,且呈浓度依赖,然而可上调 RPMI 8226 IL-6 基因的转录,进而提高上清 IL-6 水平,且以 40 $\mu\text{l/ml}$ 组最为显著,成为该细胞株另一条代偿性促生存途径。HDI 对两细胞株上清 IL-10、IFN- γ 、TNF- α 表达水平无影响,尤其是 IL-10、IFN- γ 水平均在检测低限,可能和两者不存在自分泌作用途径有关,而 40 $\mu\text{l/ml}$ HDI 作用于 U266 后出现 TNF- α 的上调,其机制尚不明确。

由此可见,MM 的不同亚型存在较大的异质性,对于同一药物的治疗反应及其机制亦有许多不

(下转第 1326 页)

肿瘤坏死,肿瘤体积缩小以至减退,与机体免疫调节系统变化有关^[20]。IL-6 是一种多效应细胞因子,及其受体系统在机体抗肿瘤中起重要作用,是反映机体免疫功能的重要指标,它与恶性肿瘤的增殖、自身免疫性疾病密切相关^[21]。本研究表明,灵芝合剂可提高荷瘤小鼠血清的 TNF- α 、IL-6 含量,提示其可能通过促进 TNF- α 和 IL-6 分泌调节机体的免疫功能,从而起到抗肿瘤作用。

参考文献

- [1] Chen Y, Xie MY, Gong XF. DPPH radical scavenging effect of ganoderma atrum[J]. Nat Prod Res Devel, 2006, 18(6):28-32.
- [2] 张伟,曾园山. 灵芝孢子的研究进展[J]. 中西医结合学报, 2004, 2(6):463-465.
- [3] 吴培楠,段宏泉,姚智,等. 蛇毒中具有抗癌活性的三萜类成分[J]. 中草药, 2007, 38(9):1311-1313.
- [4] Zhou S, Dr. Huang Zhenqao's experience in treating acute leukemia; a summary for the survivors over five years [J]. J Tradit Chin Med, 2007, 27(3):199-204.
- [5] 张俊峰,刘加军,陆敏强,等. 冬凌草甲素抑制人肝癌 BEL-7402 细胞生长及诱导细胞凋亡的机制研究[J]. 中草药, 2006, 37(10):1517-1521.
- [6] 周丽,周建伟,梁振宇,等. 冬凌草治疗老年晚期食管癌临床观察[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2011, 25(8):795-796.
- [7] 左海军,李丹,吴斌,等. 冬凌草的化学成分及其抗肿瘤活性[J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(4):258-262.
- [8] Mantovani A, Allavena P, Sica A. et al. Cancer-related inflammation[J]. Nature, 2008, 454(7203):436-444.
- [9] 冯鹏,赵丽,赵卿,等. 灵芝孢子多糖对荷瘤小鼠的免疫调节作用[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(2):166-167.
- [10] 张葛,花宝金. 从炎性微环境探究中医肿瘤病机与治则治法[J]. 中医杂志, 2012, 53(13):1101-1105.
- [11] 陆海,范忠泽. 肿瘤多药耐药机制及中医药逆转作用研究概况[J]. 中医杂志, 2011, 52(12):1068-1071.
- [12] 李晔,肖志勇,黄宗锈. 灵芝孢子油对化学性肝损伤保护作用的研究[J]. 广西中医药, 2006, 29(3):50-51.
- [13] 戴军,石玉娥,褚兆萃,等. 灵芝代谢产物抗肿瘤作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9):2194-2195.
- [14] 马志红,吴淑慧,石红,等. 富硒灵芝对环磷酰胺的增效减毒作用研究[J]. 河北中医药学报, 2011, 26(1):34-35.
- [15] 王鹏云,王赛贞,林树钱,等. 灵芝孢子和破壁孢子多糖对体外培养的小鼠脾淋巴细胞及腹腔巨噬细胞免疫调节活性的比较[J]. 北京大学学报(医学版), 2005, 37(6):569-574.
- [16] 高延宏. 蛇莓的药理作用研究进展[J]. 黑龙江医药, 2009, 22(3):365-366.
- [17] 彭博,胡秦,王立为,等. 蛇莓总酚的抗肿瘤作用及免疫学机制的初步探讨[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(8):1007-1010.
- [18] 朱国臣,肖大江,张亚男,等. 冬凌草甲素对人鼻咽癌细胞 CNE-2 的抑制作用[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(4):804-805.
- [19] 樊青霞,王瑞,王瑞林. 冬凌草单药及与化疗合用治疗食管癌 205 例[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(23):2534-2537.
- [20] 胡彦武. 灵芝孢子抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中国药房, 2009, 20(15):1196-1197.
- [21] 吴家明. 肺癌患者血清 IL-6, IL-8 和 TNF 活性测定的临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2004, 17(5):354-355.

(收稿日期:2012-12-13;修回日期:2013-04-15)

[编辑:邓媛]

(上接第 1322 页)

同之处,故临床应重视个体化的治疗。HDI 可以通过多靶点抑制 MM 细胞株 RPMI8226 及 U266 的增殖,然而同时也存在代偿性促生存途径激活,可能导致耐药形成,疾病难治或复发,故临床主张联合用药,使用可以靶向于 HDI 作用后代偿性促生存途径的药物,起协同作用,发挥更好的疗效。

参考文献

- [1] 沈楚云,林圣云. 白花蛇舌草的抗肿瘤机制及临床应用[J]. 河南中医, 2011, 31(11):1304-1306.
- [2] 陈小红,高瑞兰,钱煦岱,等. 白花蛇舌草注射液抑制 HL-60 细胞增殖及作用机理研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2008, 16(5):1035-1038.
- [3] 陈小红,黄斌,高瑞兰,等. 白花蛇舌草注射液抑制白血病细胞增殖及对线粒体跨膜电位的影响[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(9):1920-1924.
- [4] 周健,吴远彬,蒋东霞,等. 人骨髓瘤细胞 RPMI8226 的生物学特性[J]. 肿瘤基础与临床, 2010, 23(3):185-189.
- [5] 张蕾,陈世伦,陈文明,等. 多发性骨髓瘤血管内皮生长因子和白细胞介素-6 相互作用的研究[J]. 中华内科杂志, 2005, 44(2):85-88.
- [6] 杨柳,颜强. 细胞因子与多发性骨髓瘤的关系[J]. 国外医学输血及血液学分册, 1996, 19(6):338-341.

(收稿日期:2012-07-30;修回日期:2012-09-28)

[编辑:邓媛]