

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2015.05.03

参灵合剂对原发性肝癌小鼠抗肿瘤免疫反应的实验研究

孙丽红¹, 王海颖²

(¹ 上海中医药大学公共健康学院, 上海 201203;

² 上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

摘要:[目的]探讨人参、灵芝、半枝莲和参灵合剂(三药合一)对原发性肝癌小鼠抗肿瘤及其作用机制。[方法]采用 H22 肝癌荷瘤小鼠模型,按体质量随机分为正常组、对照组、人参组、灵芝组、半枝莲组和参灵合剂组,每组 20 只。正常组和对照组每日均给予生理盐水 20 ml/kg,人参组每日灌胃人参皂苷 25 mg/kg,灵芝组每日灌胃灵芝多糖提取物 830 mg/kg,半枝莲组每日灌胃半枝莲多糖 200 mg/kg,参灵合剂组每日灌胃参灵合剂 10 g,各组均持续灌胃 10 d。检测药物对胸腺指数、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞计数和血管内皮生长因子(VEGF)等指标的影响。[结果]与对照组相比,参灵合剂组明显改变肝癌小鼠的脾脏指数、胸腺指数和外周血白细胞计数($P < 0.05$, $P < 0.01$);给药组对 TNF- α 和 VEGF 有显著影响($P < 0.05$)。[结论]人参皂甙、半枝莲多糖、灵芝多糖提取物和参灵合剂对原发性肝癌小鼠模型都有一定的抑瘤作用,其中参灵合剂抑瘤作用最强。

关键词:参灵合剂;原发性肝癌;抑瘤;免疫调节

中图分类号:R734.7

文献标志码:A

文章编号:1671-038X(2015)05-0311-04

The experimental research of antitumor immune responses of Shenling Mixture on mice with primary liver cancer

SUN Li-hong¹, WANG Hai-ying²

(¹ School of Public Health, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; ² Institute of Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Corresponding author: WANG Hai-ying, E-mail: wanghaiying_7@hotmail.com

Abstract:[Objective] To discuss the mechanism of action of antitumor effects of ginseng, ganoderma, barbed skullcap herb and Shenling Mixture (containing the above three drugs) on primary liver cancer in mice. [Methods] Mouse models of primary liver cancer were given saline, panaxoside, ganoderma lucidum polysaccharides extract, barbed skullcap herb polysaccharides and the mixture of three drugs, and the index of thymus, TNF- α , white blood cells and VEGF were detected. Mice were randomly divided into normal group(20 ml/kg NS, 10 d), control group(20 ml/kg NS, 10 d), ginseng group(25 mg/kg panaxoside, 10 d), ganoderma group(830 mg/kg Ganoderma lucidum polysaccharides extract, 10 d), barbed skullcap herb group(200 mg/kg barbed skullcap herb polysaccharides 10 d), and Shenling Mixture group(10 g of the panaxoside, ganoderma lucidum polysaccharides extract and barbed skullcap herb polysaccharides, 10 d), twenty mice in each group. [Results] Shenling Mixture significantly changed the index of thymus and spleen and also the number of white blood cells in peripheral blood compared with saline($P < 0.05$, $P < 0.01$). All the drugs had a significant influence on TNF- α and VEGF($P < 0.05$). [Conclusion] Ginsenosides, polysaccharide, ganoderma lucidum polysaccharide and Shenling Mixture had tumor-suppressing effect on tumor-bur-

收稿日期:2014-12-02

基金项目:国家社会科学基金重点项目(No:12AZD094);上海市教育委员会科研项目(No:09JW15);国家自然科学基金项目(No:81403345);上海市教育委员会科研创新项目(No:14YZ059)

作者简介:孙丽红,女,医学博士,副教授,主要从事肿瘤临床治疗和实验研究

通讯作者:王海颖, E-mail: wanghaiying_7@hotmail.com

dened primary liver cancer in mice, and the inhibitory action of Shenling Mixture was the strongest.

Key words: Shenling Mixture; primary liver cancer; tumor-suppressing; immunoregulation

原发性肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,是肿瘤导致相关死亡的第三大原因。中医中药在治疗原发性肝癌的临床研究中取得了一定的进展。中医药治疗原发性肝癌是在整体观念的指导下,调整失调的脏腑功能,纠正气血阴阳的失衡状态,增强抗病能力,减轻消除临床症状,抗癌瘤以及治疗原发性肝癌并发症,配合放、化疗发挥减毒增效的作用。临床证实综合治疗,调整为先,顾护胃气,在补益的基础上,结合清热解毒活血之法,对原发性肝癌的临床疗效甚佳^[1-3]。人参、灵芝、半枝莲三种药物各有很好的代表性,分别可部分代表补益扶正、调整与祛邪药物的特点,本研究以 H22 肝癌小鼠为模型,进行人参、灵芝、半枝莲和参灵合剂(三药合一)对荷瘤小鼠肝癌的抑制和作用机制的比较研究,证实以参灵合剂为代表的扶正调理法对肝癌小鼠有良好的免疫调节作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 Balb/c 小鼠 120 只(雌性,6 周龄,SPF 级),一般体重达到 18~20 g,购自中科院上海实验动物中心,合格证号:SCXK(沪)2007-0005,清洁级条件下常规饲养。

1.1.2 瘤株 小鼠 H22 肝癌瘤株,由上海中医药大学基础医学院提供。

1.1.3 实验药物及制备 灵芝多糖、人参皂苷、半枝莲多糖分别由生药提取,购自上海养和堂中药饮片有限公司。人参皂苷、半枝莲多糖、灵芝多糖提取物、参灵合剂临用前均以蒸馏水配制,最终配成浓度为 10 mg/ml。各药剂量以人常规使用剂量按体表面积折算,人参皂苷 25 mg/(kg·d)、灵芝多糖提取物 830 mg/(kg·d)、半枝莲多糖 200 mg/(kg·d)、参灵合剂(三者按一定比例组成)(10 g/d)。

1.1.4 试剂和仪器 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和血管内皮生长因子(VEGF)(上海西唐生物科技有限公司)。离心机,Centrifuge5417 R、5810 R(eppendorf公司);安全柜,Class II,Type A2(Heal Force 公司);电子显微镜,XDS-1B(COIC 公司);全波长酶标仪,Power Wave XS2(BioTek 公司);721 可见光分光光度计(上海分析仪器总厂);电子天平(上海天平仪器厂 JA1003)。

1.2 实验方法

1.2.1 肿瘤造模方法 抽取腹腔传代小鼠腹水,1 000 r/min,离心 5 min,弃上清,收集细胞,用 PBS

液清洗两次后,取中上层细胞,以生理盐水调整细胞密度为 3×10^7 /ml,每鼠于右前腋下行无菌皮下接种 0.2 ml 细胞悬液,接种次日开始给药。

1.2.2 动物分组及给药方法 正常组:普通饲料喂养,每日灌胃生理盐水,用量 20 ml/kg,持续 10 d;对照组:荷瘤小鼠给予基础饲料喂养,每日灌胃生理盐水,用量 20 ml/kg,持续 10 d;人参组:荷瘤小鼠给予基础饲料喂养,每日人参皂苷(25 mg/kg)灌胃,持续用药 10 d;灵芝组:荷瘤小鼠给予基础饲料喂养,每日灵芝多糖提取物(830 mg/kg)灌胃,持续用药 10 d;半枝莲组:荷瘤小鼠给予基础饲料喂养,每日半枝莲多糖(200 mg/kg)灌胃,持续用药 10 d;参灵合剂组:荷瘤小鼠给予基础饲料喂养,每日参灵合剂(10 g/d)灌胃,持续用药 10 d。

1.2.3 标本采集 处死小鼠取样备检,摘眼球取血,滴入离心管内,离心取上清,置-20℃冰箱保存备用。颈椎脱臼处死,取脾脏、胸腺精密电子天平称重并记录,并剥取肿瘤,称重后,取肿瘤组织-80℃保存备用。

1.3 检测指标

1.3.1 小鼠体重、脾脏、胸腺重量测定 处死小鼠后,小鼠称体重;取脾脏、胸腺精密电子天平称重并记录。

1.3.2 胸腺指数与脾脏指数的测定 胸腺指数=胸腺平均重量(mg)/平均体重(g),脾脏指数=脾脏平均重量(mg)/平均体重(g)。

1.3.3 白细胞计数 采尾血 10 μ l,光学显微镜下用计数板进行白细胞计数。

1.3.4 TNF- α 和 VEGF 采用酶联免疫吸附法(ELISA)法检测,试剂盒均购自上海西唐生物科技有限公司,严格按照试剂盒说明操作。

1.4 统计学处理

所有结果数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,全部数据在 SPSS 11.5 统计软件包上进行。

2 结果

2.1 对胸腺指数的影响

与对照组相比,参灵合剂组明显改变肝癌小鼠的胸腺重量和胸腺指数($P < 0.01$),灵芝组也明显改善肝癌小鼠的胸腺重量和胸腺指数($P < 0.05$, $P < 0.01$),人参组和半枝莲组与对照组相比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组小鼠胸腺指数比较

| 组别 | 例数 | 胸腺重量/g | 胸腺指数 |
|-------|----|---------------------------|---------------------------|
| 正常组 | 20 | 0.049±0.014 | 0.164±0.040 |
| 对照组 | 20 | 0.036±0.011 | 0.161±0.047 |
| 人参组 | 20 | 0.043±0.012 ¹⁾ | 0.177±0.052 ¹⁾ |
| 灵芝组 | 20 | 0.052±0.014 ¹⁾ | 0.186±0.075 ²⁾ |
| 半枝莲组 | 20 | 0.051±0.014 ¹⁾ | 0.175±0.068 ¹⁾ |
| 参灵合剂组 | 20 | 0.063±0.042 ²⁾ | 0.196±0.083 ²⁾ |

与对照组比较,¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01。

2.2 对脾脏指数的影响

与对照组相比,参灵合剂组、人参组和灵芝组改变肝癌小鼠脾脏重量的效果较显著(P<0.05),灵芝组明显改善肝癌小鼠的脾脏指数(P<0.01),参灵合剂组也有较显著的改善脾脏指数的作用(P<0.05),见表 2。

2.3 对小鼠白细胞计数、TNF-α 和 VEGF 的影响

对照组和给药组对外周血白细胞均有影响,且

参灵合剂组对外周血白细胞有显著性影响(P<0.01);参灵合剂组、人参组和灵芝组有降低肝癌小鼠血清中 TNF-α 浓度的作用(P<0.05),半枝莲组和对照组比较差异无统计学意义(P>0.05);人参组、灵芝组和半枝莲组可降低肝癌小鼠的血清 VEGF 的含量,差异有统计学意义(P<0.05),但参灵合剂组与对照组比较差异无统计学意义(P>0.05);见表 3。

表 2 各组小鼠脾脏指数比较

| 组别 | 例数 | 胸腺重量/g | 胸腺指数 |
|-------|----|---------------------------|---------------------------|
| 正常组 | 20 | 0.105±0.013 | 0.335±0.059 |
| 对照组 | 20 | 0.216±0.077 | 0.674±0.057 |
| 人参组 | 20 | 0.214±0.083 ¹⁾ | 0.679±0.062 |
| 灵芝组 | 20 | 0.229±0.058 ¹⁾ | 0.737±0.068 ²⁾ |
| 半枝莲组 | 20 | 0.211±0.086 | 0.610±0.057 |
| 参灵合剂组 | 20 | 0.213±0.097 ¹⁾ | 0.635±0.066 ¹⁾ |

与对照组比较,¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01。

表 3 各组小鼠白细胞计数、TNF-α 和 VEGF 比较

| 组别 | 例数 | 白细胞/(×10 ⁹ · L ⁻¹) | TNF-α | VEGF |
|-------|----|---|-----------------------------|----------------------------|
| 正常组 | 20 | 3.590±1.191 | 33.821±14.425 | 15.192±5.349 |
| 对照组 | 20 | 7.626±2.197 ¹⁾ | 33.214±10.227 | 13.988±4.634 |
| 人参组 | 20 | 7.744±1.723 ¹⁾ | 24.3323±5.133 ¹⁾ | 11.499±1.939 ¹⁾ |
| 灵芝组 | 20 | 7.894±2.383 ¹⁾ | 26.618±7.056 ¹⁾ | 11.745±1.549 ¹⁾ |
| 半枝莲组 | 20 | 8.433±1.894 ¹⁾ | 37.917±9.401 | 12.04±1.924 ¹⁾ |
| 参灵合剂组 | 20 | 9.052±2.619 ²⁾ | 25.049±7.075 ¹⁾ | 12.275±2.773 |

与对照组比较,¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01。

3 讨论

现代医学研究表明,机体的免疫功能与肿瘤的发生发展有密切关系。免疫与肿瘤间的作用是相互的,一方面免疫能影响肿瘤的发展,另一方面肿瘤也能改变机体的免疫功能状态。因此,如何增强机体免疫功能,更好地发挥机体的抗肿瘤免疫机制,是历来肿瘤免疫学研究的重要内容。

胸腺和脾脏均为体内重要的免疫器官。脾脏是合成吞噬细胞增强激素(tuftsins)的主要场所,能合成干扰素、补体、细胞因子等生物活性物质。胸腺是 T 细胞分化成熟的场所,其生成的胸腺激素,如胸腺素、胸腺生成素、胸腺体液因子、淋巴细胞刺激因子、血清胸腺因子等,在 T 细胞分化和调节中起重要作用。

在 TNF-α 对鼠肝癌细胞的研究中发现 TNF-α

能损害肝细胞的 DNA,可能在肝细胞向肝癌细胞转变的早期阶段起一定作用,提示了 TNF-α 与肝癌的发生有关。肿瘤组织所以能迅速无控生长,其原因之一是肿瘤血管生长速度是正常组织的 50-200 倍。肝癌肿瘤组织细胞的生长与肝癌肿瘤血管内皮细胞的生长是相辅相成的,肿瘤组织在其生长过程中不断分泌多种促血管内皮细胞生长的细胞因子,促使肿瘤血管的生长,使其迅速形成肿瘤血管。

本实验表明,人参组对肝癌小鼠胸腺指数、外周血白细胞、TNF-α 和 VEGF 均有影响(P<0.05);半枝莲组对肝癌小鼠胸腺指数、外周血白细胞和 VEGF 的影响也较为显著(P<0.05);灵芝组对肝癌小鼠外周血白细胞、TNF-α 和 VEGF 均有影响(P<0.05),而且灵芝组明显改善肝癌小鼠胸腺指数和脾脏指数(P<0.01)。

人参性温大补元气,是公认的扶正补益类代表药物。现代研究发现人参皂甙一 Rh₂,具有较强的抗肿瘤活性,并能使癌细胞再分化诱导逆转为非癌细胞。在黑素瘤(B₁₆)和人类红细胞的培养中,将人参皂甙一 Rh₂掺入细胞膜后,测定细胞膜偏振度的改变,发现细胞膜的流动性得到了改善。这种效应也许与癌细胞的逆转作用有关。Sato 等^[4]在两只小鼠的背部皮内移植 B16-BL6 黑毒瘤细胞。移植后的第 1 天,一只小鼠静脉注射 ginsenoside R_{b-2} 100 μg,另一只口服 2 000 μg。移植后第 4 天,静注 10% Evan's blue,测定肿瘤块的血管数及大小,证明无论何种给药法都能显著抑制血管生成。

半枝莲辛、苦、寒,归肺、肝、肾经。可清热解毒、化痰利尿清泻,属祛邪类药物,有研究显示^[5]半枝莲可以诱导 HSP70 表达,提高 CD4⁺、CD8⁺ 细胞对肿瘤细胞的免疫杀伤能力,导致小鼠腹水肝癌细胞 H22 细胞大量坏死和凋亡。Yin 等^[6]研究证实半枝莲的乙醇提取物通过诱导细胞凋亡和产生细胞毒性作用抑制人肺癌细胞 A549 的生长。此外半枝莲对肝癌细胞 Bel-7402 增殖的抑制作用,随着浓度增加抑制作用增强,具有明显的量效关系,在 100 mg/ml 的浓度下,其抑制效果与 100 μg/ml 的 5-FU 相近^[7]。

灵芝,可以药食两用。现代科学研究表明,灵芝是最佳的免疫功能调节和激活剂,它可显著提高机体的免疫功能,增强患者自身的抗癌能力。灵芝可以通过促进白细胞介素-2 的生成,通过促进单核巨噬细胞的吞噬功能,通过提升人体的造血能力尤其是白细胞的指标水平,以及通过其中某些有效成分对癌细胞的抑制作用,成为抗肿瘤、防癌以及癌症辅助治疗的优选药物。灵芝子实体水提物或灵芝多糖能提高体内外巨噬细胞的吞噬作用^[8]。灵芝对人体几乎没有任何不良反应。这种无毒性的免疫活化剂的优点,恰恰是许多肿瘤化疗药物和其它免疫促进剂都不具有的。

参灵合剂以灵芝多糖提取物为主,配以人参皂甙、半枝莲多糖。本课题结果表明参灵合剂组明显改变肝癌小鼠的胸腺指数($P < 0.01$);参灵合剂组对改善脾脏指数和 TNF-α 有显著影响($P < 0.05$),参灵合剂组对外周血白细胞有显著性影响($P < 0.01$)。表明以参灵合剂组为代表的扶正调理法能抑制小鼠肝癌细胞的生长,并提高肝癌小鼠的抗肿瘤免疫反应。

由于人体是个复杂的系统,免疫影响只是众多影响因素之一,而肿瘤的发生、发展、康复与预后亦存在着诸多影响因素,如机体的遗传、基因、环境、医疗等。我们今后将从更宽更广的范围进行讨论,深入分析参灵合剂对原发性肝癌作用的相关机制。

参考文献

- [1] 于尔辛. 肝癌的健脾理气方治疗[J]. 中医肿瘤, 2000, 9(8):344-344.
- [2] 吴建新. 健脾理气法在晚期肝癌中的应用[J]. 浙江中西医结合杂志, 2007, 17(6):355-356.
- [3] 叶 蕾, 吴良村. 治疗原发性肝癌临床经验拾贝[J]. 四川中医, 2002, 20(4):7-8.
- [4] SATO K, MOCHIZNKI M, SAIKI L. Inhibition of tumor angiogenesis and metastasis by a saponin of Panax ginseng, ginsenoside R_{b-2} [J]. Biol Pharm Bull, 1994, 17:635-639.
- [5] 王洪琦, 崔娜娟, 胡 玲, 等. 清热解毒和补益中药对小鼠肝癌 H22 细胞的作用及免疫学机制[J]. 广州中医药大学学报, 2006, 23(2):156-158.
- [6] YIN X L, ZHOU J B, JIE C F, et al. Anticancer activities and mechanism of Scutellaria barbata extract on human lung cancer cell line A549 [J]. Life Sci, 2004, 75:2233-2244.
- [7] 胡旭东, 吴小江, 邱 宏, 等. 六种常用抗癌中药对肝癌细胞株 Bel-7402 的作用[J]. 江西中医学院学报, 2005, 17(4):47-48.
- [8] JIANG Z Y, LIN C. Study of Ganderm lucidumpolysaccharide on effects of cellular immune function in mice [J]. Microbiology, 2003, 23:51-54.