

华蟾素注射液对人肝癌 HepG-2 细胞增殖 及拓扑异构酶表达的影响

高山, 田莉莉, 陈华, 崔晓楠*

(大连医科大学第一附属医院肿瘤科, 辽宁 大连 116011)

[摘要] **目的:**探讨华蟾素注射液对人肝癌 HepG-2 细胞增殖及拓扑异构酶 I (Topo I) 和 II 的影响。**方法:**实验分为对照组(不加药)与实验组(华蟾素注射液 0.105, 0.21, 0.42 mg·L⁻¹);采用四甲基偶氮唑蓝还原法(MTT)观察对 HepG-2 细胞增殖的影响;采用流式细胞术(AnnexinV/PI)双染色法检测对 HepG-2 细胞凋亡的影响;采用流式细胞术法检测对 HepG-2 细胞周期的影响;采用逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)法检测对肝癌 HepG-2 细胞 Topo I, Topo II mRNA 水平表达的影响;采用蛋白免疫印迹法(Western-blot 法)观察对 HepG-2 细胞中 Topo I, Topo II 蛋白表达的影响。**结果:**华蟾素注射液抑制 HepG-2 细胞增殖($P < 0.05$),诱导细胞凋亡($P < 0.05$),呈时间和剂量依赖性;阻滞 HepG-2 细胞于 S 期($P < 0.05$),呈剂量依赖性;下调 Topo I, Topo II mRNA($P < 0.05$)及蛋白的表达($P < 0.05$),呈剂量依赖性。**结论:**华蟾素注射液能够抑制人肝癌 HepG-2 细胞增殖,诱导癌细胞凋亡,下调 Topo I, Topo II 表达可能是其机制之一。

[关键词] 华蟾素注射液; HepG-2 细胞; 增殖; 凋亡; 拓扑异构酶 I; 拓扑异构酶 II

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0250-06

[doi] 10.11653/syfy2013110250

Effects of Cinobufacini Injections on Proliferation and Expression of Topoisomerase of Hepatocarcinoma HepG-2 Cells

GAO Shan, TIAN Li-li, CHEN Hua, CUI Xiao-nan*

(Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of cinobufacini injections on the proliferation and expression of topoisomerase of hepatocarcinoma HepG-2 cells. **Method:** Experiment were divided into control group and experimental group (cinobufacini injections group 0.105, 0.21, 0.42 mg·L⁻¹). Cell proliferation was assessed by Methyl Thiazolyl Tetrazolium blue reduction (MTT) assay. Apoptosis was detected by Annexin V/PI staining. Cell cycles were shown through flow cytometry method (FCM). Topoisomerase I (Topo I), Topoisomerase II (Topo II) mRNA were analyzed by Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Expressions of Topo I, Topo II protein were analyzed by Western-blot. **Result:** Cinobufacini injection significantly inhibited HepG-2 cell proliferation ($P < 0.05$), induced apoptosis ($P < 0.05$) in a dose and time dependent manner, induced tumor cells arrested at the S-phase a dose dependent manner. Down regulated mRNA and protein expressions of Topo I, Topo II ($P < 0.05$) in a dose dependent manner. **Conclusion:** Cinobufacini injections can inhibit human hepatocellular carcinoma HepG-2 cells proliferation, induced apoptosis and induced tumor cells arrested at the S-phase. The down regulation of Topo I, Topo II expressions might be one of the anti-tumor mechanisms of cinobufacini injection.

[Key words] cinobufacini injection; HepG-2 cells; proliferation; apoptosis; Topo I; Topo II

[收稿日期] 20120907(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173615)

[第一作者] 高山, 硕士研究生, 从事肿瘤淋巴道转移及中药抗肿瘤药效基础研究, Tel: 13840967926, E-mail: gs_0304@126.com

[通讯作者] * 崔晓楠, 博士, 教授, 从事肿瘤淋巴道转移及中药抗肿瘤药效基础研究, Tel: 0411-83635963-3209, E-mail: cxn23@sina.com

华蟾素注射液是我国临床中应用较广的抗肿瘤中药制剂,临床广泛应用于原发性肝癌、胃癌、胰腺癌、食管癌^[1]、肺癌等的治疗,也可与常规化疗药物联合用药^[2],可干预多药耐药并起到增敏作用^[3-4]。基础研究表明,其主要的活性成分是蟾毒内酯类物质,包括蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基(又称华蟾毒精)等^[5]。肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,已知化疗药物有效率不足 20%^[6],包括靶向药物如索拉菲尼、舒尼替尼仍未能改善肝癌的治疗现状^[7-8]。华蟾素注射液在控制肝癌患者病情发展、改善症状体征及提高生存质量等方面的优势明显^[9],是一个有前途的抗肝癌药物,然而有效机制有待探讨。拓扑异构酶(Topo)是 1 种通过调节核酸空间动态变化从而控制核酸功能的关键酶,是目前重要抗肿瘤靶位^[10]。本实验以人肝癌 HepG-2 细胞为研究对象,初步观察了华蟾素注射液对肝癌 Topo 酶的影响。

1 材料

1.1 试剂 HepG-2 细胞株(由大连医科大学附属第一医院中心实验室提供);华蟾素注射液(安徽金蟾生化股份有限公司,批号 100207-1,含量以其主要成分吲哚生物碱为标量测定),MTT(Biosharp 公司),AnnexinV 试剂盒(批号 0909,美国 Molecular Probes 公司),RT-PCR 试剂盒(批号 BK1901,大连宝生物工程有限公司),PCR 扩增引物由大连宝生物工程有限公司合成;鼠抗人 Topo I 单克隆抗体(批号 SC-32736)、鼠抗人 Topo II 单克隆抗体(批号 SC-166934,美国 Santa Cruz 公司),辣根酶标记兔抗鼠 IgG(批号 111009,北京中山金桥生物有限公司)。

1.2 仪器 FACs 流式细胞仪(Becton Dickinson 公司),层流超净工作台(Forma Scientific 公司),三蒸水蒸馏器(上海本波仪器有限公司),GD8000 型凝胶成像分析系统(UVP 公司),Thermo 型高速低温离心机(Sigma 公司),稳压稳流型电泳仪(北京六一仪器厂),SP-2102UV 型紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司),HHW21600 型电热恒温水浴箱(上海)。

2 方法

2.1 细胞培养 将 HepG-2 细胞常规复苏后接种于含 10% 新生牛血清的低糖 IMDM 培养液于 37 °C,CO₂ 体积分数为 5% 的培养箱中培养。取对数生长期细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化,行细胞计数。

2.2 MTT 法检测肿瘤细胞增殖 取对数生长期细胞,每孔 100 μL,5 000 细胞接种 96 孔板中,设不同

质量浓度华蟾素注射液(0.42,0.21,0.105,0.053,0.026,0.013 mg·L⁻¹)为实验组,并设阴性对照组(未加药物),每个质量浓度设 6 个复孔。分别培养 24,48,72 h。每孔加入 5 g·L⁻¹ 的 MTT 液 20 μL,避光 37 °C 孵育 4 h,弃培养液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO)震荡 10 min,570 nm 波长处检测各孔吸光度(A),计算抑制率。以药物浓度为横轴,细胞抑制率为纵轴,根据量效曲线计算半数抑制浓度(IC₅₀)。实验重复 3 次。

$$\text{抑制率} = (1 - \text{试验组 } A / \text{对照组 } A) \times 100\%$$

2.3 AnnexinV/PI 双染色法检测肿瘤细胞的凋亡

取对数生长期细胞调整密度为 5 × 10⁸ 个/L 接种于培养瓶内,设立实验组华蟾素注射液(0.42,0.21,0.105 mg·L⁻¹)和对照组(未加药物),分别作用 24,48 h 收集细胞,用预冷的 PBS 洗 2 遍,1 × Binding buffer 调整细胞密度至 1 × 10⁹/L,余按试剂盒说明书操作,在流式细胞仪(FCM)上对细胞凋亡及死亡进行荧光检测和分析。实验重复 3 次。

2.4 流式细胞术分析细胞周期

取对数生长期细胞调整密度至 1 × 10⁶/mL,接种于 25 cm² 培养瓶中,将 HepG-2 细胞分组,分别为对照组(未加药物)和实验组华蟾素注射液(0.42,0.21,0.105 mg·L⁻¹)。置于 37 °C,5% CO₂ 的培养箱中培养 48 h,0.25% 胰蛋白酶消化,离心(560 × g)5 min,弃上清液,冷 PBS 洗 2 次,重悬于 70% 冷乙醇中,充分混匀,4 °C 固定过夜。加入 25 μL RNaseA,置于 37 °C 30 min,再加入 25 μL PI 染料,4 °C 避光静置 30 min,在流式细胞仪(FACS Vantage SE)上进行周期分析。实验重复 3 次。

2.5 RT-PCR 检测 Topo I,Topo II mRNA 表达

取对数生长期细胞 5 × 10⁵ 个/孔,接种于 24 孔板,分组及剂量同 2.3,培养 48 h 后收集各组细胞。采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,采用 RNA 反转录试剂盒将 RNA 反转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板,进行 PCR 反应。Topo I 上游引物:5'-CGCTATCTGAAG-GCATCAA-3';下游引物:5'-CTGGAGGAGGAGAAG-GAACC-3'。扩增产物为 565 bp。Topo II 上游引物:5'-CTTGTACTGCAGACCCACA-3';下游引物:5'-ATAATAGAATCAAGGGAATCCCAAGTC-3'。扩增引物为 233 bp。 β -actin 上游引物:5'-GGACT-TCCGCAAGAGATGG-3';下游引物:5'-ACATCT-GCTGGAAGGTGGAC-3',扩增产物 404 bp。Topo I,Topo II 按以下条件进行 PCR 反应:94 °C 预变性 5 min,变性 30 s,60 °C 退火 1 min,共 10 个循环;94 °C

变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共进行 25 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。β-actin 按以下条件进行 PCR 反应: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 最后 72 °C 终延伸 10 min。将 PCR 产物在 TBE 缓冲液中 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 30 min, 电压控制在 90 V, UVP 凝胶成像及分析系统观察、拍照、分析。实验重复 3 次。

2.6 Western blot 检测 Topo I, Topo II 蛋白的表达

处于对数生长期 HepG-2 细胞消化传代, 均匀接种于 4 个 25 cm² 培养瓶内, 设立对照组 (未加药物) 和实验组华蟾素注射液 (0.42, 0.21, 0.105 mg·L⁻¹) 培养 24 h 后, 收集细胞, 常规方法提取总蛋白, 蛋白样品采用 Bradford 法测定总蛋白含量。SDS-PAGE 电泳, 分离胶体积分数为 8%, 每孔上样 50 μg, 电泳完毕后经电转移至 PVDF 膜上, 室温封闭 1 h。按适当比例加入一抗 4 °C 摇床过夜, PBST 洗膜 3 次, 用辣根酶标记的抗体 (1:10 000) PBST 溶液 37 °C 孵育 1 h, PBST 溶液洗膜 3 次。ECL 试剂反应显色, X 射线胶片曝光 1~5 min 后显影, 胶片晾干、扫描、照相, 并用 Image-J 软件的图像分析仪分析, 实验重复 3 次。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 11.5 软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间分析采用单因素方差检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 HepG-2 细胞增殖的影响 结果表明, 随着药物浓度的增加、作用时间的延长, 药物对 HepG-2 细胞增殖抑制率增加, 其 24, 48, 72 h 的 IC₅₀ 分别是 (0.86 ± 0.03), (0.08 ± 0.01), (0.04 ± 0.06) mg·L⁻¹, 有剂量和时间依赖性 (图 1)。

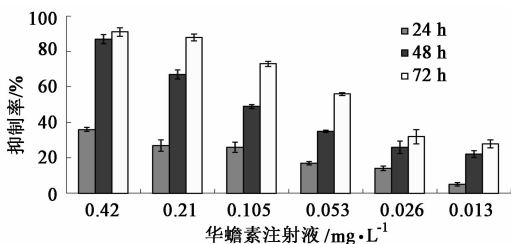


图 1 华蟾素注射液对 HepG-2 细胞增殖的影响

3.2 对 HepG-2 细胞凋亡的影响 华蟾素注射液 0.42, 0.21, 0.105 mg·L⁻¹ 分别作用于 HepG-2 细胞 24, 48 h, 应用 Annexin V 和 PI 染色后, FCM 分析细胞凋亡。24 h 凋亡率分别为 (35.35 ± 1.87)%, (27.52 ± 1.22)%, (17.51 ± 1.03)%, 显著高于对

照组 (1.25 ± 0.53)% ($P < 0.05$); 48 h 凋亡率分别为 (67.87 ± 1.49)%, (59.22 ± 2.65)%, (37.02 ± 1.58)%, 显著高于对照组 (1.25 ± 0.53)% ($P < 0.05$)。结果表明, 随着药物质量浓度的增高, 作用时间的延长, 凋亡细胞比例增高, 表现为时间和剂量依赖性 (图 2)。

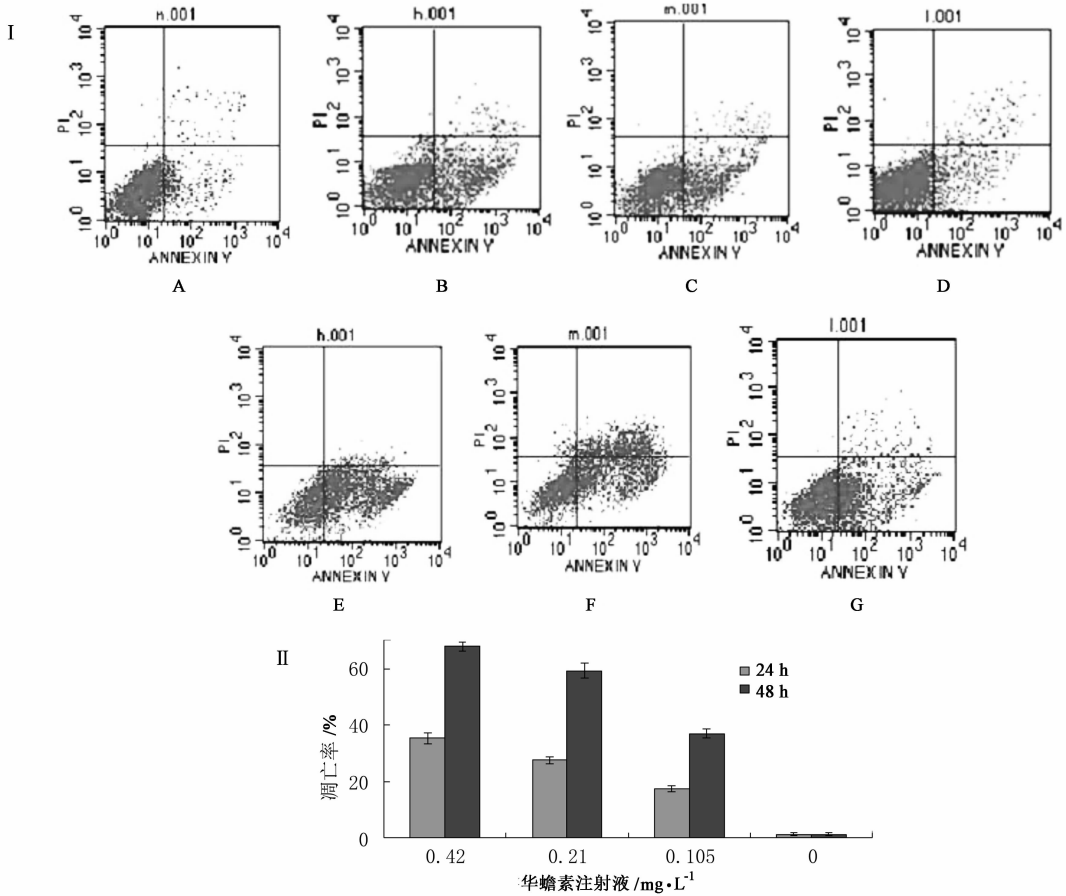
3.3 对 HepG-2 细胞周期的影响 华蟾素注射液将不同质量浓度 (0.105, 0.21, 0.42 mg·L⁻¹) 分别作用 24 h 的 HepG-2 细胞及对照组细胞, 流式细胞仪结果显示肿瘤细胞 S 期分布比例分别为 (24.85 ± 0.85)%, (31.46 ± 0.98)%, (42.66 ± 1.12)%, 显著高于对照组 (19.16 ± 0.76)% ($P < 0.05$), 表明华蟾素注射液能将 HepG-2 细胞阻滞在 S 期, 表现为剂量依赖性 (图 3)。

3.4 对 HepG-2 细胞 Topo I, Topo II mRNA 表达的影响 采用 RT-PCR 半定量分析的方法华蟾素注射液 0.105, 0.21, 0.42 mg·L⁻¹ 作用 HepG-2 细胞 48 h 后, Topo I mRNA 与 β-actin mRNA 条带灰度比值分别为 (0.73 ± 0.04), (0.55 ± 0.02), (0.46 ± 0.03), 明显低于对照组 (0.91 ± 0.04) ($P < 0.05$); Topo II mRNA 与 β-actin mRNA 条带灰度比值分别为 0.94 ± 0.05, 0.79 ± 0.03, 0.44 ± 0.02, 明显低于对照组 1.041 ± 0.06 ($P < 0.05$)。提示华蟾素注射液能抑制 Topo I, Topo II 转录, 并呈剂量依赖性 (图 4)。

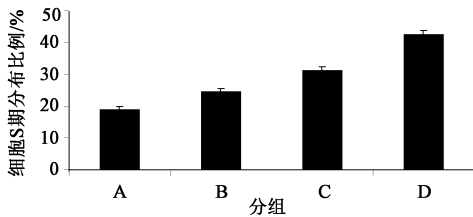
3.5 对 HepG-2 细胞 Topo I, Topo II 蛋白表达的影响 华蟾素注射液 0.105, 0.21, 0.42 mg·L⁻¹ 作用 HepG-2 细胞 24 h 后, Topo I 蛋白与 β-actin 蛋白条带吸光度比分别为 0.954 ± 0.047, 0.816 ± 0.031, 0.592 ± 0.036, 明显低于对照组 1.157 ± 0.045 ($P < 0.05$); Topo II 蛋白与 β-actin 蛋白条带的吸光度比值为 0.967 ± 0.017, 0.897 ± 0.027, 0.667 ± 0.015, 明显低于对照组 (1.047 ± 0.043, $P < 0.05$)。随着华蟾素注射液质量浓度的增高, Topo I, Topo II 蛋白表达降低, 呈剂量依赖性 (图 5)。

4 讨论

临床应用表明, 华蟾素注射液具有良好的抗肿瘤作用, 使用安全, 已广泛应用于恶性肿瘤临床治疗中。在原发性肝癌中, 有效率为 44.4%^[11], 与化疗和放疗具有协同作用, 并表现出多靶位的抗肿瘤功效^[12]。目前已于美国权威机构 MD. Anderson 进行 II 期临床试验^[13]。基础研究表明, 华蟾素注射液能够诱导肿瘤细胞凋亡, 调控肿瘤相关基因表达, 抑制肿瘤血管生成^[14], 然而有关华蟾素注射液对肿瘤细胞 Topo 酶的影响少见报道。



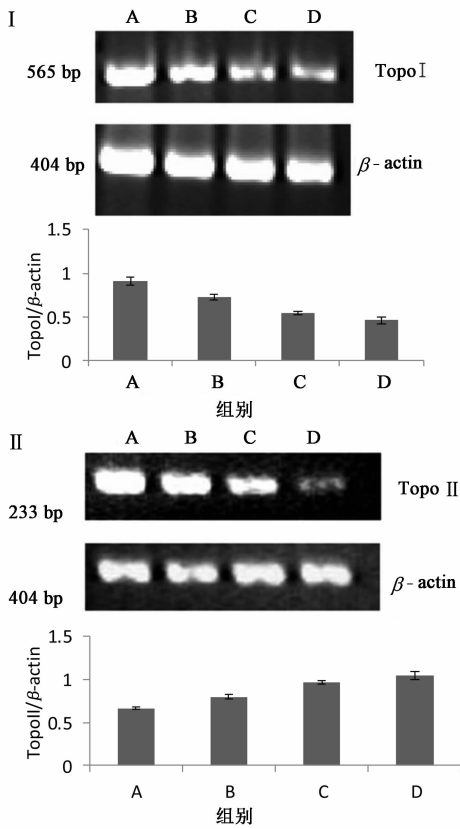
A. 对照组;B. 华蟾素注射液 0.105 mg·L⁻¹组,24 h;C. 华蟾素注射液 0.21 mg·L⁻¹组,24 h;D. 华蟾素注射液 0.42 mg·L⁻¹组,24 h; E. 华蟾素注射液 0.105 mg·L⁻¹组,48 h;F. 华蟾素注射液 0.21 mg·L⁻¹组,48 h;G. 华蟾素注射液 0.42 mg·L⁻¹组,48 h
图 2 I. 华蟾素注射液作用 HepG-2 细胞 24,48 h 凋亡结果; II. 华蟾素注射液对 HepG-2 细胞凋亡的影响



A. 对照组;B. 华蟾素注射液 0.105 mg·L⁻¹组;
C. 华蟾素注射液 0.21 mg·L⁻¹组;
D. 华蟾素注射液 0.42 mg·L⁻¹组
图 3 华蟾素注射液作用 HepG-2 细胞 24 h 对 HepG-2 细胞周期的影响

Topo 酶是真核细胞和原核细胞中的基本酶,广泛存在于细胞核内,是一种通过调节核酸空间动态变化从而控制核酸生理功能的关键酶。该酶分为 Topo I 和 Topo II 两种类型。Topo I 广泛存在于原核和真核生物^[15],能引起 DNA 单链断裂,在 DNA 复制、转录过程中起重要作用。Topo II 是真核生物所必需,在 DNA 复制、转录、重组及在形成正确的染色体结构、染色体分离、浓缩中发挥重要作用^[16]。

研究发现,肿瘤细胞中 Topo 酶的含量及活性远高于正常体细胞,临床研究表明,Topo I 在白血病、结肠癌、宫颈癌及卵巢癌中的含量显著高于正常组织^[17-19],Topo II 在喉鳞状细胞癌、霍奇金淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞性淋巴瘤、乳腺癌等肿瘤中高表达^[20],抑制 Topo 酶的活性可能抑制肿瘤细胞的快速增殖,诱导细胞凋亡进而杀死肿瘤细胞,DNA 拓扑异构酶已经成为公认的抗癌药物的作用靶点。以 Topo 酶为治疗靶位的抗癌药物羟基喜树碱(HCPT)、拓扑替康、伊立替康、依托泊苷和替尼泊苷等是临床应用广泛的抗肿瘤药物。本研究以人肝癌 HepG-2 细胞为研究对象,探讨了华蟾素注射液对肿瘤细胞 Topo I,Topo II 的影响。结果显示华蟾素注射液能够显著抑制人肝癌 HepG-2 细胞增殖,诱导其凋亡并阻滞于细胞周期的 S 期,下调 Topo I,Topo II 表达,呈剂量依赖性。Topo I,Topo II 在核酸代谢中起重要作用,参与了 S 期细胞生化活动。Topo I,Topo II 表达或活性改变可能影响 S 期细胞



A. 对照组; B. 华蟾素注射液 0.105 mg·L⁻¹ 组;
C. 华蟾素注射液 0.21 mg·L⁻¹ 组;
D. 华蟾素注射液 0.42 mg·L⁻¹ 组; β-actin 为内参(图 5 同)

图 4 华蟾素注射液作用 HepG-2 细胞 48 h 后
Topo I mRNA (I); Topo II mRNA (II) 水平表达

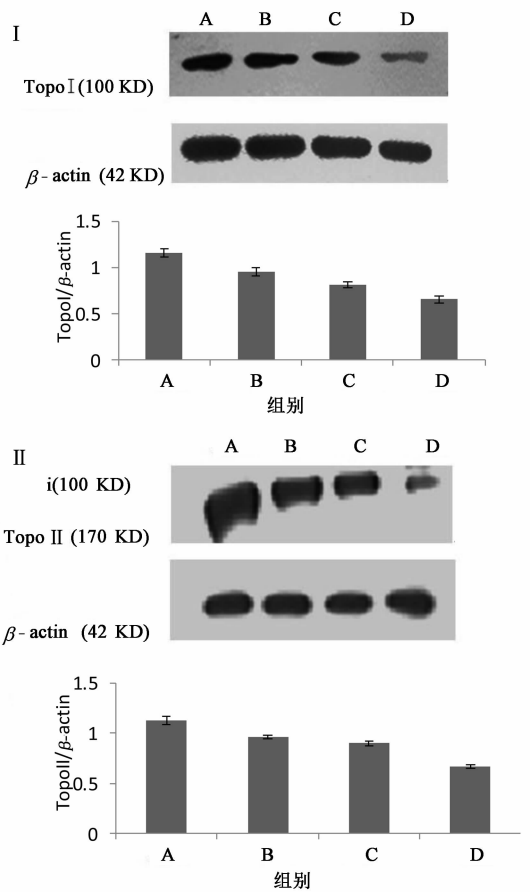


图 5 华蟾素注射液作用 HepG-2 细胞 24 h 后
Topo I 蛋白 (I); Topo II 蛋白 (II)
水平表达 (Western blot)

生长活动,进而导致 S 期阻滞。华蟾素注射液可能通过下调 Topo I, Topo II 实现 S 期阻滞的药效机制。提示 Topo 酶可能是华蟾素注射液抗肿瘤作用的靶点之一,华蟾素注射液是有前途的抗肝癌药物。

[参考文献]

[1] 巩仔鹏,陈涛. 华蟾素注射液基于阿片受体的镇痛机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 (15):120.
[2] 刘怀民,郑玉玲,刘晓莉. 华蟾素联合化疗治疗中晚期食管癌 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (5):235.
[3] 任立新,王亚红,哈敏文. 华蟾素治疗晚期胃癌的临床疗效研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(12):1474.
[4] 金镔. 华蟾素注射液联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究 [J]. 中国药物与临床, 2007, 7 (5):380.
[5] 苏永华,尹西才,谢觉民,等. 三种蟾毒单体对 SMMC-7721、BEL-7402 人肝癌细胞生长的抑制作用 [J]. 第二军医大学学报, 2004, 24(4):393.

[6] 孙燕,石远凯. 原发性肝癌. 临床肿瘤内科手册 [M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2007:539.
[7] 周立新,郭剑. 肝癌靶向药物治疗的研究进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2009, 15(2):156.
[8] Cheng A L, Kang Y K, Chen Z, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo controlled trial [J]. Lancet Oncol, 2009, 10(1):25.
[9] 巩仔鹏,陈涛,邓李蓉. 华蟾素注射液对 H22 荷瘤鼠体内 β-内啡肽的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(9):180.
[10] 崔兴,张会平,侯仰韶. DNA 拓扑异构酶 II 与抗肿瘤药物靶点的研究进展 [J]. 青岛医药卫生, 2004, 36 (6):434.
[11] 左小东,崔永安. 华蟾素抗肿瘤作用的临床研究进展 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2003, 8(3):232.
[12] 孙宇,善路娟,刘越坚,等. 华蟾素注射液对人肝癌 HepG-2 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 中国肿瘤, 2010, 19(6):410.

清营解表合剂对流感病毒感染小鼠外周血 Th1, Th2 型细胞因子动态表达的影响

任亮, 宋素花, 姜璐, 姜政驰, 宋荣强, 刘永, 吕翠霞*
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 探讨清营解表合剂对流感病毒感染小鼠免疫功能的影响。方法: 以流感病毒亚洲甲型鼠肺适应株(A/PR/8/H1N1)感染小鼠为模型, 灌服清营解表合剂 $16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0.4 mL/只), 1 次/d, 连续 ig 给药 12 d, 应用流式细胞仪分析药后 3, 6, 9, 12 d 特异性细胞因子 γ -干扰素, 肿瘤坏死因子- α , 白细胞介素 3, 4, 6, 10 的动态表达水平及 Th1 (IFN- γ)/Th2 (IL-4) 值。结果: 流感病毒感染小鼠后 3 d, 细胞因子 IFN- γ 升高显著 ($P < 0.05$), 6, 9, 12 d 无显著改变, 6, 9 d 较 3 d 均降低显著 ($P < 0.05$); 3, 6, 9, 12 d 细胞因子 TNF- α 均升高显著 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 3, 6, 9, 12 d 细胞因子 IL-3 均升高, 3, 6 d 差异显著 ($P < 0.05$); 3, 6, 9, 12 d 细胞因子 IL-4, IL-6, IL-10 均显著升高 ($P < 0.01$), 在早期 3 d 达到峰值; 3, 6, 9, 12 d 外周血 Th1 (IFN- γ)/Th2 (IL-4) 明显降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 且 6 d 降到最低点, 12 d 较 6 d 升高显著 ($P < 0.05$)。经清营解表合剂治疗后, 3 d 细胞因子 IFN- γ 水平升高, 较模型组无显著差异, 6, 9, 12 d 较模型组升高显著 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 3, 6, 9, 12 d 细胞因子 TNF- α 水平表达较模型组均明显下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 3, 6, 9, 12 d 细胞因子 IL-3 较模型组均有所下降, 但差异无统计学意义; 3, 6, 9, 12 d 细胞因子 IL-4, IL-6, IL-10 水平较模型组均显著降低; 3, 6, 9, 12 d 外周血 Th1 (IFN- γ)/Th2 (IL-4) 均升高, 差异显著 ($P < 0.01$), 12 d 清营解表组较 3 d 升高显著 ($P < 0.01$)。结论: 清营解表合剂通过调节流感病毒感染小鼠外周血 Th 型细胞因子的表达水平, 恢复机体的抗感染免疫平衡, 提高机体免疫功能, 以防治流感病毒感染。

[关键词] 清营解表合剂; 流感病毒; 细胞因子; 流式细胞术

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0255-06

[doi] 10.11653/syfy2013110255

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130329.1403.005.html>

[网络出版时间] 2013-03-29 14:03

[收稿日期] 20120525(376)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30672589)

[第一作者] 任亮, 硕士, 从事教学工作, Tel: 13375319611, E-mail: rlyj2005@163.com

[通讯作者] * 吕翠霞, 教授, 硕士生导师, 从事仲景杂病证治规律研究及中医体质规律的基础与临床研究, Tel: 13153033759, E-mail: 13153033759@126.com

- [13] Meng Zhiqiang, Yang Peiyong, Shen Yehua, et al. Pilot study of huachansu in patients with hepatocellular carcinoma, nonsmall-cell lung cancer, or pancreatic cancer[J]. *Cancer*, 2009, 115(22): 5309.
- [14] 程文宁, 肖家全. 华蟾素抗肿瘤作用及其机制研究进展[J]. *医学综述*, 2009, 15(8): 1193.
- [15] Liu L F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs [J]. *Annu Rev Biochem*, 1989, 11(58): 351.
- [16] Wang J C. DNA topoisomerases [J]. *Annu Rev Biochem*, 1985, 54(1): 665.
- [17] Giovanella B C, Stehlin J S, Wall M E, et al. DNA topoisomerase I -targeted chemotherapy of human colon cancer in xenografts [J]. *Science*, 1989, 246(4933): 1046.
- [18] Potmesil M, Hsiang Y H, Liu L F, et al. Resistance of human leukemic and normal lymphocytes to drug-induced DNA cleavage and low levels of DNA topoisomerase II [J]. *Cancer Res*, 1988, 15(48): 3537.
- [19] Rho Y H, Lee B W, Park K H, et al. Cudraflavanone A purified from *Cudrania tricuspidata* induces apoptotic cell death of human leukemia U937 cells, at least in part, through the inhibition of DNA topoisomerase I and protein kinase C activity [J]. *Anti-Cancer Drugs*, 2007, 18(9): 1023.
- [20] 潘亚奇, 袁公, 杨艳维. DNA 拓扑异构酶 II α 与肿瘤 [J]. *医学信息*, 2011, 2(3): 415.

[责任编辑 李玉洁]