

# 中药复方双术油抗肿瘤机制的研究

蒋媛媛<sup>1</sup>, 徐扬<sup>2</sup>, 李媛媛<sup>1</sup>, 李先荣<sup>\*</sup>

(1. 山西省中医药研究院, 太原 030012; 2. 海南碧凯药物研究所, 海口 570100)

**[摘要]** **目的:**探讨复方双术油(BELY)体内外抗肿瘤作用及其机制。**方法:**设置空白组、阴性对照组、分别采用 CCK-8 法检测 BELY(100, 80, 60, 40, 20, 10, 5 mg·L<sup>-1</sup>)对肿瘤细胞株 K562, 乳腺癌细胞系 MDA-MB-231, 人结肠腺癌细胞 LOVO 和人肝癌细胞 HepG2 的抗增殖作用;建立小鼠 S180 及 H22 皮下肿瘤模型,设空白组(NS)、溶媒对照组(1% DMSO)和顺铂组(DDP, 1 mg·kg<sup>-1</sup>)、BELY 低、中、高剂量组(100, 200, 400 mg·kg<sup>-1</sup>)。DDP ip 给药,其余 ig 给药。末次给药 24 h 后颈椎脱臼处死小鼠,剥取瘤块、胸腺和脾脏并称量,计算抑瘤率、胸腺指数和脾指数;ELISA 法测定移植瘤血清白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-12(IL-12)及肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的水平,探讨 BELY 对荷瘤小鼠免疫功能的影响;流式细胞仪测定 BELY 对荷瘤小鼠外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>的影响。**结果:**BELY 对 HepG2, K562, Lovo, MDA231 均有一定的生长抑制作用,并有良好的量效关系。BELY 显著抑制 S180 和 H22 的生长,提高荷瘤小鼠的胸腺指数、脾指数和体重。与空白组比较, BELY 可明显升高小鼠血清中 IL-2, IL-6, IL-12 和 TNF-α 的水平,外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>明显升高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。**结论:** BELY 既可以抑制肿瘤细胞生长,又可通过增强免疫从而达到双相抗肿瘤的作用。

**[关键词]** 胸腺指数; 抗肿瘤活性; 荷瘤小鼠; 免疫功能

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0258-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013080258

## Anti-tumor Mechanism of Chinese Herbal Compound Shuang-zhu

JIANG Yuan-yuan<sup>1</sup>, XU Yang<sup>2</sup>, LI Yuan-yuan<sup>1</sup>, LI Xian-rong<sup>\*</sup>

(1. Traditional Chinese Medicine Institute of Shanxi Province, Taiyuan 030012, China;

2. Bikai Medicine Insititute of Hainan Province, Haikou 570100, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the anti-tumor mechanism of compound Shuang-zhu (BELY) anti-tumor effect *in vitro* and *in vivo*. **Method:** In experimental evaluation, eight groups were setup: control group, negative control group, six different concentrations of BELY groups (100, 80, 60, 40, 20, 10, 5 μg·mL<sup>-1</sup>). CCK-8 kit was used to detect the proliferative effect of BELY on K562, MDA-MB-231, LoVo and HepG2 cells. Sixty health kunming mice was used to establish transplant tumor models of murine sarcoma S180 and of H22. Then they were randomly divided into six groups, including control group (NS), DMSO (1%) group, cisplatin group (1 mg·kg<sup>-1</sup>), three different concentration (100, 200, 400 mg·kg<sup>-1</sup>) of BELY groups to observe the effect of BELY on tumor-bearing mice. ELISA was employed to detect of cytokines interleukin-2 (IL-2), interleukin-12 (IL-6), interleukin-12 (IL-12) and TNF-alpha to reflect the effect of BELY on immune function of tumor-bearing mice. T cell subsets of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> in peripheral blood of tumor-bearing mice were measured by flow cytometry. **Result:** BELY showed a certain degree of inhibition on HepG2 and K562, LoVo, MDA231 cells in dose-effect relationship. BELY could significantly inhibit the growth of the murine sarcoma S180 and of H22, and improve the thymus index, spleen index and body weight of the tumor-bearing mice, BELY could significantly increase serum CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Compared with the blank control group,  $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ . **Conclusion:** BELY

**[收稿日期]** 20120712(010)

**[第一作者]** 蒋媛媛, 在读研究生, Tel: 18668285845, E-mail: luoyinaniceday@163.com

**[通讯作者]** \* 李先荣, 教授, 从事抗肿瘤药物研究, Tel: 13503512929, E-mail: XRLi-01@163.com

can not only directly inhibit tumor cells, but also enhance immune to achieve the anti-tumor action bidirectionally.

**[Key words]** Compound Shuang-zhu; immune function; anti-tumor activity; tumor-bearing mice

自1963年发现白术挥发油对动物肿瘤生长有抑制作用以来,对白术挥发油化学成分及抗肿瘤作用机制研究越来越受到人们的关注<sup>[1]</sup>;莪术功能行气破血、消积止痛。主要用于疮痍痞块、瘀血经闭、食积胀痛、早期宫颈癌,是临床上较为常用的活血化瘀药。近年来研究发现,莪术挥发油具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗炎、抗早孕、降酶等功用,本课题组研究发现白术、莪术油具较强的抗肿瘤作用,而连翘对抗肿瘤有一定的辅助作用,将此3味药按一定比例组成复方(BELY),其抗肿瘤效果明显优于各单味药的抑瘤效果<sup>[2]</sup>。课题组从免疫功能方面探讨BELY胶囊抗肿瘤机制,证明复方双术胶囊可调节机体的免疫功能<sup>[3]</sup>。笔者在此基础上,对BELY胶囊的体内外抗肿瘤作用及其机制进行了研究。

## 1 材料

**1.1 肿瘤细胞株与瘤株** 人肝癌细胞株 HepG2、人红白血病细胞株 K562、人结肠癌细胞株 Lovo、人乳腺癌细胞株 MDA231;小鼠肝癌细胞株 H22 和小鼠肉瘤细胞株 S180,购自山西医科大学。

**1.2 动物** 昆明种小鼠 60 只,雌雄各半,体重(20±2)g,北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号 SCXK(京)2009-0008。

**1.3 药物** BELY 白术-莪术-连翘(10:4:1)环糊精包合<sup>[2]</sup>,由山西省中医药研究院倪艳教授鉴定及提供,BELY 先用二甲基亚砷 DMSO 溶解后用生理盐水稀释。顺铂注射液(顺铂组,DDP),江苏省豪森药业股份有限公司,批号 111205。

**1.4 试剂与仪器** CCK-8 试剂盒(cell counting kit-8,碧云天生物技术研究,批号 111102),小鼠 IL-2, IL-6, IL-12 及 TNF-α ELISA 试剂盒(武汉博士德生物科技股份有限公司,批号 1111209),小鼠 CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> 单克隆抗体(美国 BD 公司,批号 111008)。2406-2CO<sub>2</sub> 型细胞培养箱(美国 Shellab 有限公司), SW-CJ-2F 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司), AT-858 型自动酶标分析仪(上海安泰分析仪器有限公司), FC500 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

## 2 方法

**2.1 CCK8 法检测肿瘤细胞增殖抑制率** HepG2, K562, Lovo, MDA231 瘤株用含 10% RPMI 1640 培养基,于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,每 2~3 d 换 1

次液,常规胰蛋白酶消化传代。取对数生长期的肿瘤细胞,制成 5×10<sup>5</sup>/mL 单细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 100 μL,37℃,5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。实验共设 8 个组,每组设 6 个平行孔,除空白孔外,24 h 后每孔分别加入加药 10 μL(阴性对照组加入等体积培养液,溶媒对照加入 1% DMSO),BELY 组设 6 个质量浓度(100,80,60,40,20,10,5 mg·L<sup>-1</sup>)。加药继续培养 48 h 后,弃上清液,每孔加入 RPMI 1640 培养液 100 μL 后再加 CCK8 10 μL 继续培养 1 h,酶标仪 450 nm 波长下检测各孔吸光度(A),按下列公式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = [1 - (\text{用药组 } A - \text{空白组 } A) / (\text{阴性对照组 } A - \text{空白组 } A)] \times 100\%$$

**2.2 小鼠体内抗肿瘤实验** 将 H22, S180 瘤株复苏,每只小鼠腹腔注射 0.5 mL 体内传代,无菌条件下抽取传至第 3 代的 H22, S180 瘤源肿瘤接种(小鼠的腹水黄色清亮液体),离心后弃去上清液,无菌生理盐水调至细胞密度 1×10<sup>7</sup>/mL,小鼠右腋部皮下接种 0.2 mL/只。次日将荷瘤小鼠随机分为 BELY 低、中、高剂量组(100,200,400 mg·kg<sup>-1</sup>)用药剂量根据前期预实验确定。生理盐水组(NS)、溶媒对照组(1% DMSO)和阳性对照组(DDP 1 mg·kg<sup>-1</sup>)。接种次日分组给药,1次/d,连续 10 d。DDP ip 给药,其余 ig 给药。末次给药 24 h 后颈椎脱臼处死小鼠,剥取瘤块、胸腺和脾脏并称量,计算抑瘤率、胸腺指数和脾指数。

$$\text{肿瘤抑制率} = (\text{对照组瘤重} - \text{实验组瘤重}) / \text{对照组瘤重} \times 100\%$$

$$\text{胸腺(脾)指数} = \text{胸腺(脾)质量(mg)} / \text{体重(g)} \times 10$$

**2.3 ELISA 法测定细胞因子水平** 按照 2.2 制备荷瘤小鼠、分组和给药,连续给药 10 d,末次给药 24 h 后眼球后静脉丛取血,收集血液,放置 4 h 后离心,取血清放于 -20℃ 备用。临用前平衡至室温,按 ELISA 试剂盒说明书,测定细胞因子 IL-2, IL-6, IL-12 及 TNF-α 水平。

**2.4 流式细胞仪测定荷瘤小鼠外周血 T 细胞亚群** 按照 2.2 制备荷瘤小鼠、分组和给药,连续给药 10 d,末次给药前称重,给药后 2 h,眼眶后静脉丛取血 200 μL 置抗凝管中,立即检测外周血 T 细胞亚群 CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 的表达。

**2.5 统计学分析** 采用 SPSS 统计学软件进行处

理,所有定量数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为有显著性差异。

### 3 结果

**3.1 对肿瘤细胞株增殖的抑制作用** BELY 对 HepG2, K562, Lovo, MDA231 细胞均有一定的细胞生长抑制作用,并具有良好的量效关系,见表 1。

**3.2 对小鼠移植性肿瘤生长的作用** BELY 的中

剂量组和高剂量组显著抑制小鼠肉瘤 S180 和小鼠肝癌 H22 的生长,提高荷瘤小鼠的胸腺指数和脾指数( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。BELY 各剂量组给药后动物体重均有不同程度增加,与生理盐水组及溶媒对照组比较差异均无显著性。阳性对照 DDP ( $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 明显抑制小鼠移植性肿瘤的生长,但动物体重、胸腺和脾指数明显降低。见表 2,3。

表 1 BELY 对肿瘤细胞株增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率/%			
	Lovo	K562	HepG2	MDA-231
5	0.18 ± 0.19	0.26 ± 0.09	0.18 ± 0.05	0.63 ± 0.43
10	5.54 ± 0.78	7.06 ± 2.01	12.34 ± 8.51	11.57 ± 3.52
20	30.19 ± 9.09	18.33 ± 4.73	15.17 ± 9.22	28.48 ± 10.04
40	49.21 ± 10.24	31.18 ± 9.43	39.21 ± 11.41	34.40 ± 10.53
60	61.11 ± 12.35	40.23 ± 11.52	50.02 ± 15.25	60.18 ± 18.64
80	62.33 ± 15.65	53.22 ± 13.29	59.78 ± 18.13	63.11 ± 15.56
100	80.42 ± 12.44	65.48 ± 15.87	70.28 ± 19.52	71.09 ± 16.43

表 2 BELY 对 S180 荷瘤小鼠瘤重的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	体重增加 /g	肿瘤质量 /g	抑制率 /%	脾指数 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	胸腺指数 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
空白对照	-	3.42 ± 2.51	1.12 ± 0.30	-	60.12 ± 18.40	27.14 ± 9.01
% DMSO	-	3.56 ± 2.03	1.09 ± 0.42	2.68	58.65 ± 17.24	28.84 ± 6.79
顺铂	1	-3.54 ± 1.09 <sup>2)</sup>	0.39 ± 0.09 <sup>2)</sup>	65.18	20.08 ± 7.49 <sup>2)</sup>	9.14 ± 2.17 <sup>2)</sup>
BELY	100	3.14 ± 1.51	0.89 ± 0.16	20.54	61.91 ± 17.15	27.24 ± 4.77
	200	3.50 ± 1.18	0.71 ± 0.15 <sup>2)</sup>	36.61	55.11 ± 20.16	30.76 ± 10.51
	400	3.42 ± 1.08	0.66 ± 0.23 <sup>1)</sup>	41.07	60.51 ± 15.64	32.03 ± 4.19

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 3 ~ 6 同)。

表 3 BELY 对 H22 荷瘤小鼠瘤重的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	体重增加 /g	肿瘤质量 /g	抑制率 /%	脾指数 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	胸腺指数 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
空白对照	-	3.12 ± 2.19	1.08 ± 0.28	-	53.19 ± 11.05	38.21 ± 6.65
1% DMSO	-	3.45 ± 1.24	0.99 ± 0.51	8.33	49.81 ± 9.44	38.11 ± 7.45
顺铂	1	-4.14 ± 1.44 <sup>2)</sup>	0.22 ± 0.18 <sup>2)</sup>	79.63	18.21 ± 3.05 <sup>2)</sup>	9.44 ± 1.51 <sup>2)</sup>
BELY	100	3.40 ± 1.48	0.86 ± 0.32	20.37	48.41 ± 6.35	40.11 ± 7.34
	200	3.16 ± 1.16	0.81 ± 0.25	25.00	62.10 ± 11.61	40.02 ± 9.89
	400	3.11 ± 1.25	0.64 ± 0.29 <sup>1)</sup>	40.74	69.18 ± 15.08 <sup>1)</sup>	45.09 ± 10.21 <sup>1)</sup>

**3.3 对细胞因子的影响** BELY 可明显升高小鼠血清中 IL-2, IL-6, IL-12 和 TNF- $\alpha$  的水平,与生理盐水组比较, $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ 。阳性对照药 DDP 则降低小鼠血清中 IL-2 的水平( $P < 0.05$ ),但对 IL-6 无明显影响。见表 4。

**3.4 对 S180 荷瘤小鼠外周血 T 细胞亚群的影响** 灌胃给予 BELY 400  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  10 d 后,明显升高小鼠外周血 CD4<sup>+</sup>,降低 CD8<sup>+</sup> 的水平,CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 明显升高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。阳性对照药 DDP 则降低小鼠外周血 CD4<sup>+</sup>,升高 CD8<sup>+</sup> 的水平,CD4<sup>+</sup>/

表4 BELY对荷瘤小鼠血清中细胞因子水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	荷瘤小鼠细胞因子水平			
		IL-2	IL-6	IL-12	TNF- $\alpha$
空白对照	-	10.01 ± 2.44 <sup>1)</sup>	50.79 ± 12.65 <sup>2)</sup>	38.14 ± 9.61 <sup>1)</sup>	8.07 ± 3.02 <sup>1)</sup>
1% DMSO	-	8.71 ± 2.19	30.19 ± 10.01	28.92 ± 15.29	6.25 ± 2.13
顺铂	1	8.25 ± 2.64	29.66 ± 9.06	29.77 ± 10.26	6.90 ± 1.91
BELY	100	4.49 ± 2.64 <sup>1)</sup>	20.88 ± 11.02	18.55 ± 9.22 <sup>1)</sup>	4.51 ± 1.01
	200	8.68 ± 2.87	28.41 ± 7.87	28.15 ± 7.32	6.85 ± 2.31
	400	7.88 ± 1.55	41.63 ± 15.12 <sup>1)</sup>	30.15 ± 10.88	6.53 ± 2.71

表5 BELY对S180荷瘤小鼠血清CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	CD4 <sup>+</sup> /%	CD8 <sup>+</sup> /%	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
空白对照	-	45.27 ± 4.96	26.11 ± 2.91	1.46 ± 0.53
1% DMSO	-	45.12 ± 3.77	27.21 ± 1.84	1.59 ± 0.17
顺铂	1	35.32 ± 3.59 <sup>2)</sup>	31.39 ± 3.21 <sup>1)</sup>	1.14 ± 0.13 <sup>1)</sup>
BELY	100	35.22 ± 3.43	25.62 ± 2.79	1.34 ± 1.98
	200	45.19 ± 2.65	29.12 ± 2.54	1.54 ± 0.11
	400	49.30 ± 5.46 <sup>1)</sup>	30.31 ± 2.08	1.85 ± 0.74 <sup>1)</sup>

CD8<sup>+</sup>明显降低( $P < 0.05$ ),见表5。

#### 4 讨论

本实验表明 BELY 对 HepG2, K562, Lovo, MDA231 细胞均有一定的细胞生长抑制作用,并有良好的量效关系。BELY 与生理盐水组相比显著抑制小鼠肉瘤 S180 和小鼠肝癌 H22 的生长。实验发现 BELY 组荷瘤小鼠的胸腺指数、脾指数和体重与空白对照组相比都明显提高,该方可通过影响机体免疫功能达到抗肿瘤目的。

细胞因子参与免疫反应存在于相互依存的复杂网络之中。它可以直接调节癌细胞的生长,抑制癌细胞增殖或促使癌细胞分化,也可以通过诱导细胞因子网络的其他成员发挥作用。BELY 可明显升高小鼠血清中 IL-2, IL-6, IL-12 和 TNF- $\alpha$  的水平,从而发挥抗肿瘤作用。

T 细胞亚群的细胞免疫是机体抗肿瘤应答中的主要免疫应答形式。CD4<sup>+</sup>辅助性亚群作为 T 细胞 2 个亚群中的 1 个亚群,具有调节免疫反应的作用,能够辅助 B 细胞形成抗体,分泌细胞因子;而 CD8<sup>+</sup>抑制性亚群作为 T 细胞 2 个亚群中的 1 个亚群,具有免疫抑制和细胞毒性活性。在正常情况下,CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>的比值会维持在 1.5 ~ 2.0<sup>[4]</sup>。当机体出现恶性肿瘤时,CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>的平衡状态被破坏,机体的正常免疫反应被严重影响<sup>[5]</sup>,BELY 使外周

血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>明显升高,通过提高 T 细胞亚群细胞免疫功能抑制肿瘤细胞。由此可看出双术油可抑制肿瘤细胞生长,也可通过调节免疫的起到抗肿瘤作用。但实验过程中并未对小鼠的脾脏和胸腺等器官做病理切片,对于其毒性与耐受性还有待进一步的研究。

#### [参考文献]

- [1] 莫宁辉.白术炮制后挥发油变化研究[J].广西医药,1999,2(1):217.
- [2] 赵东洋,倪艳,李先荣,等.白术、莪术、连翘混合油  $\beta$ -环糊精包合前后性质研究[J].中成药,2010,32(7):1243.
- [3] 李林,李先荣,岳永花,等.复方双术油胶囊对小鼠免疫功能的影响[J].山西中医,2009,25(8):39.
- [4] 刘茜,刘向国,武松.肺气肿肺气虚证模型大鼠脾脏指数、胸腺指数变化的实验研究[J].甘肃中医学院学报,2006,23(1):20.
- [5] 邵明海,王建华,丁维军,等.恶性肿瘤患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞的检测及其临床意义[J].现代实用医学,2009,21(2):142.
- [6] 师越.恶性肿瘤患者外周血 T 细胞亚群检测结果回顾性分析[J].中国医学检验杂志,2009,10(4):228.

[责任编辑 李玉洁]