

# 转化生长因子 $\beta_1$ 刺激大鼠肺成纤维细胞增殖的体外研究

侯雅静<sup>1</sup>, 高永红<sup>3</sup>, 孙逸坤<sup>3</sup>, 黄娟<sup>2</sup>, 于会勇<sup>2</sup>, 黄文通<sup>2</sup>, 冯淬灵<sup>2\*</sup>

(1. 山西省中西医结合医院呼吸科, 太原 030013; 2. 北京中医药大学东直门医院呼吸科, 北京 100700;  
3. 北京中医药大学东直门医院重点实验室, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:**探讨转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 对大鼠肺成纤维细胞体外增殖的影响。**方法:**体外原代及传代培养 SD 大鼠肺成纤维细胞, 传至第 4 代, 进行细胞增殖实验。细胞随机分为 5 组, 即无血清细胞基础培养液 (DMEM) 组、分别含 10.0, 5.0, 2.5, 1.25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta_1$  DMEM 组。分别在 24, 48, 72 h 3 个不同刺激时间点应用四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT 法) 观察 SD 大鼠肺成纤维细胞增殖情况。进行统计学方差分析及多重比较, 探讨 TGF- $\beta_1$  刺激大鼠肺成纤维细胞增殖的最佳浓度和最佳时间点。**结果:**24 h 时间点各组数据经方差分析, 差异无统计学意义。48 h 时间点各组数据结果进行非参数检验,  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义。72 h 时间点各组数据结果进行方差分析,  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义; 进一步进行多重比较: 与空白组比较, TGF- $\beta_1$  10.0, 2.5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组 ( $P < 0.05$ ), TGF- $\beta_1$  1.25, 2.5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组 ( $P < 0.01$ ); 其余各组比较均无显著差异。**结论:**TGF- $\beta_1$  刺激质量浓度 2.5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 作用于大鼠肺成纤维细胞 72 h, 细胞增殖显著。

**[关键词]** 转化生长因子  $\beta_1$ ; 肺成纤维细胞; 增殖; 体外

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0204-05

**[doi]** 10.11653/syfy2013110204

## Transforming Growth Factor- $\beta_1$ Stimulates the Proliferation of Rat Lung Fibroblasts *in vitro*

HOU Ya-jing<sup>1</sup>, GAO Yong-hong<sup>3</sup>, SUN Yi-kun<sup>3</sup>, HUANG Juan<sup>2</sup>,  
YU Hui-yong<sup>2</sup>, HUANG Wen-tong<sup>2</sup>, FENG Cui-ling<sup>2\*</sup>

(1. Respiratory Department, Shanxi Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine Taiyuan 030013, China;  
2. Respiratory Department, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;  
3. The Key Laboratory, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore stimulates the proliferation of transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) *in vitro* rat lung fibroblasts. **Method:** The rat lung fibroblast were cultured *in vitro*, the 4th generation of cells in logarithmic growth phase were used to proliferation experiments. These cells were randomly divided into five groups: serum-free Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) group, 10.0, 5.0, 2.5, 1.25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of TGF- $\beta_1$  DMEM group. We selected the optimal stimulation point of TGF- $\beta_1$  in three different stimulation time points of application (24, 48, 72 h) by the tetrazolium salt colorimetric method (MTT method) to explore the TGF- $\beta_1$  stimulating rat lung fibroblast proliferation optimal concentration and the best time point by statistical analysis of variance and multiple comparison. **Result:** TGF- $\beta_1$  in 24 h time point directly stimulated the 5 different groups of SD rat lung fibroblast proliferation based on MTT results by analysis of variance, the five groups were no significant

**[收稿日期]** 20121119(024)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81072769)

**[第一作者]** 侯雅静, 医学硕士, 住院医师, 从事中医药防治肺系疾病研究, Tel:15110427596, E-mail:hoyajing502@163.com

**[通讯作者]** \*冯淬灵, 医学博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主攻中医药防治慢性阻塞性肺疾病的临床与实验研究, Tel:010-84013136, E-mail:fengcuiling69@yahoo.com.cn

difference. In 48 h time point, by the non-parametric test,  $P < 0.05$ , these groups were significantly different. Seventy-two h time point, by analysis of variance,  $P < 0.05$ , these groups were significantly different; further two multiple comparisons: control group,  $10.0, 2.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  group,  $P < 0.05$ ,  $2.5, 1.25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  were  $P < 0.01$ , the rest of the group,  $P > 0.05$ . **Conclusion:** 48 h, 72 h time point were observed to promote the proliferation of TGF- $\beta_1$ , and the best proliferative activity of stimulate concentration and time point of TGF- $\beta_1$  were  $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 72 h. In this concentration and time point, rat lung fibroblast proliferated significantly.

[**Key words**] TGF- $\beta_1$ ; lung fibroblast; proliferation; *in vitro*

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD), 简称慢阻肺。COPD 是一种常见的可以预防和可以治疗的疾病, 其特征是持续存在的气流受限。气流受限呈进行性发展, 伴有气道和肺对有害颗粒或气体所致慢性炎症反应的增加。急性加重和并发症影响着疾急性加重和并发症影响着疾病的严重程度。在全球范围内, 慢性阻塞性肺疾病是致残和致死的主要原因, 其发病率和死亡率很高, 造成严重的经济和社会负担, 且这种负担还在不断增加<sup>[1]</sup>。在转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 等细胞因子作用下, 小气道周围的成纤维细胞增殖是 COPD 气流受限的主要不可逆因素。本实验通过 TGF- $\beta_1$  刺激 SD 大鼠体外肺成纤维细胞增殖, 采用四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT 法), 研究最佳的 TGF- $\beta_1$  刺激浓度及最佳时间点, 为进一步中药复方干预成纤维细胞增殖的研究奠定基础。

## 1 材料

**1.1 动物** 新生 2 d SD 红皮鼠 (动物许可证号 SCXK (京) 2006-0009), 北京维通利华实验动物技术有限公司。

**1.2 试剂** 细胞基础培养液 DMEM (Deulbecco's Modified Eagle Medium) (高糖型 CM15019, 北京迈晨科技有限公司); 胎牛血清 FBS (A15-101, 奥地利 PAA 公司); 细胞培养用 PBS (不含 Ca/Mg, 干粉, PBS2004Y-1, 天津 TBD 公司); 青霉素、链霉素 (华北制药股份有限公司); 四氮唑盐 (MTT, 0793-250)、二甲基亚砷 (DMSO, 批号 0231-100, Amresco 公司); TGF- $\beta_1$  (T7039-2, 美国 Sigma-aldrich 公司); 免疫组化用 (一抗) 波形蛋白 (vimentin)、二抗 (PV-6002) (东直门医院重点实验室赵明镜老师惠赠); DAB 显色试剂 (ZLI-9017, 北京中杉金桥生物技术有限公司); 其他试剂为国产分析纯。

**1.3 仪器** 倒置相差显微镜 (CKX  $\times 41$  Olympus); MCO-20AIC 培养箱 (Sanyo Electronic. Ltd. Japen), CJT-E-II 超净工作台 (北京昌平长城空气净化工程公司), Legaci 电热恒温水箱 (美国, Revco), 1/10 万

精密电子分析天平 (AEC-45SM 日本岛津); 高压消毒锅 (Autoclave MLS-3780, Sanyo Japen)。

## 2 方法

### 2.1 大鼠肺成纤维细胞的原代及传代培养

**2.1.1 培养液的配制** DMEM 中加入终浓度  $100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  胎牛血清 (FBS) 和  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  链霉素; 用 PBS 配制成 0.1% 胰蛋白酶, 加入终浓度 0.02% 乙二胺四乙酸 (EDTA), 过滤除菌。用 PBS 配制成 0.25% 胰蛋白酶, 加入终浓度 0.02% EDTA, 过滤除菌。将  $2 \mu\text{g}$  TGF- $\beta_1$  干粉溶于 2 mL Hank's 平衡盐溶液 (Hank's balanced salt solution, HBSS) 中分装备用。

**2.1.2 原代培养** 将新生 2 d 的 SD 红皮鼠, 用 75% 乙醇浸泡消毒 5 min, 窒息处死, 剪开胸腔, 取出肺组织, 将其在 HBSS 中冲洗, 洗去血液; 后用组织剪去除其表面的胸膜, 在 HBSS 中轻轻混悬, 待组织块自然沉降后吸弃上清, 重复 3~4 次至上清清亮, 后剪成  $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$  大小的组织块, 用 0.1% 胰酶 (37  $^{\circ}\text{C}$  预温) 将组织块洗 1 遍。按照每只幼鼠 1 mL 加入 0.1% 胰酶, 37  $^{\circ}\text{C}$  消化 15~20 min, 直至大部分组织块被消化为细胞悬液, 用含 10% FBS 培养基等量加入细胞悬液终止消化。用吸管充分吹打均匀, 用 200 目细胞筛过滤细胞悬液, 将滤液置于离心机  $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心 5 min, 弃除上清。将沉淀物重悬于 2 mL DMEM 完全培养基中, 用吸管充分吹打均匀等分为 3 等份接种于 25 mL 培养瓶中, 再各加入 6 mL 完全培养基, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  养箱中 1 h 左右进行差速贴壁。1 h 后将培养瓶取出, 弃除未贴壁细胞的培养液, 更换新鲜完全培养基继续培养<sup>[2-4]</sup>。

**2.1.3 传代培养** 成纤维细胞的原代细胞培养 5~7 d 后, 细胞汇合成单层, 生长至 70%~80%, 弃除旧培养基, 用 PBS 洗 2 遍。后加  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  37  $^{\circ}\text{C}$  胰蛋白酶 1.5 mL 消化, 置于显微镜下观察, 当细胞连接松弛、回缩变圆时, 拍打培养瓶, 以便贴壁细胞脱落, 此时迅速加入等体积含 10% FBS 的培养基终止

消化,吸管轻轻吹打使细胞脱落并混匀。将上述悬液置于离心管中,于  $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 6 min,弃上清。加入 2 mL 新的培养液,轻轻吹打混匀,显微镜下计数,以  $(2\sim 3)\times 10^7/\text{L}$  接种到 25 mL 塑料瓶中  $37\ ^\circ\text{C}$ ,  $5\%\ \text{CO}_2$  孵箱培养,每 3~4 d 换液 1 次,如细胞纯度不够,采用差速贴壁法,经过 2~3 次贴壁选择后,贴附的即是纯的肺成纤维细胞<sup>[2-4]</sup>。

**2.1.4 免疫组化法鉴定** 将第 3 代细胞用 0.1% 胰酶液消化后,用完全培养基重悬。显微镜下计数,按  $1\times 10^5/\text{mL}$  接种于事先放有玻璃圆片培养板内,加入完全培养基 1 mL,并将培养板置于  $37\ ^\circ\text{C}$ ,  $5\%\ \text{CO}_2$  培养箱中培养备用。待细胞贴附于圆片后取出培养皿,用 PBS 漂洗  $2\times 2\ \text{min}$ ,之后每孔加 0.5 mL 4% 多聚甲醛,放入  $4\ ^\circ\text{C}$  冰箱 15 min;吸出多聚甲醛, PBS 漂洗  $3\times 2\ \text{min}$ ;加入枸橼酸盐溶液进行抗原修复吸出液体, PBS 冲洗 2 遍。3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  去离子水处理( $4\ ^\circ\text{C}$  冰箱)5~10 min,以阻断内源性过氧化物酶。PBS 漂洗  $3\times 2\ \text{min}$ 。组化滴加波形蛋白(vimentin)(一抗)(1:200)(1:300)(含 Txiton X-100 PBS 稀释),阴性对照用 PBS 代替一抗,于  $37\ ^\circ\text{C}$  2 h 或  $4\ ^\circ\text{C}$  过夜。PBS 漂洗,  $3\times 2\ \text{min}$ ;二抗孵育:滴加试剂盒中 PV-6002(二抗) $37\ ^\circ\text{C}$ , 30 min; PBS 漂洗,  $3\times 2\ \text{min}$ ; DAB 显色: DAB 试剂盒中的 A、B, (按大瓶加  $167\ \mu\text{L}\times 3$  次,小瓶  $25\ \mu\text{L}\times 3$  次配制 1:20) 注意避光保存。在镜下观察显色情况(阴性对照组不应有染色)。自来水充分冲洗;乙醇脱水 70% (1 次, 1 min), 75% (1 次, 1 min), 80% (1 次, 1 min), 85% (1 次, 1 min), 90% (1 次, 1 min), 95% (1 次, 1 min), 无水乙醇 ( $2\times 3\ \text{min}$ )。二甲苯 ( $2\times 1\ \text{min}$ ), 观察是否彻底脱水, 彻底脱水后滴加树脂一滴进行封片处理<sup>[2-4]</sup>。

## 2.2 TGF- $\beta_1$ 刺激大鼠肺成纤维细胞增殖

**2.2.1 种板** 将第 4 代成纤维细胞按上述细胞传代方法消化、离心后,弃上清,加入 2 mL 含 10% FBS 培养液,轻轻吹打混匀,显微镜下计数,以  $5\times 10^3/\text{孔}$  接种到 96 孔板中,每孔加入细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ ,按照 24, 48, 72 h 时间点种 3 块板。每块板均设 5 组:无血清 DMEM 组、分别含 10.0, 5.0, 2.5, 1.25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta_1$  DMEM 组,每组设 7 个复孔。后置于  $37\ ^\circ\text{C}$   $5\%\ \text{CO}_2$  孵箱培养,每 1~2 d 换液 1 次<sup>[5-6]</sup>。

**2.2.2 同步** 2~3 d 后将旧培养基轻轻吸出,换无血清 DMEM,每孔加 100  $\mu\text{L}$ ,继续培养 24 h,使其同步于  $G_0$  期。

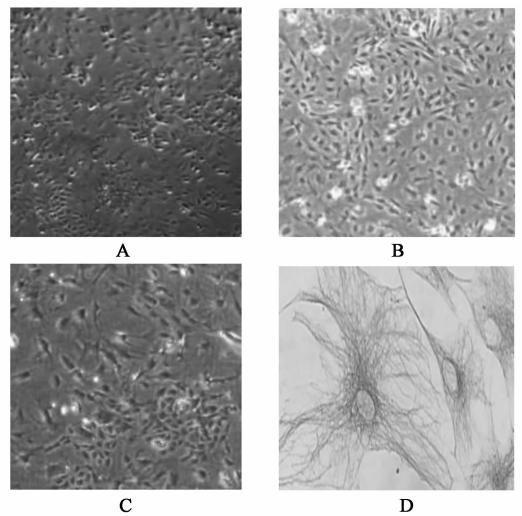
**2.2.3 加药处理** 各组分别加入含 10.0, 5.0, 2.5, 1.25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta_1$  的 DMEM 100  $\mu\text{L}$ 。分别于  $37\ ^\circ\text{C}$   $5\%\ \text{CO}_2$  孵箱培养 24, 48, 72 h<sup>[5-6]</sup>。

**2.2.4 MTT 测试** 将孔内液体轻轻吸出,每孔加入 MTT 溶液( $1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )100  $\mu\text{L}$ ,注意避光。继续培养 4 h,镜下可见蓝紫色结晶物(formazan)。小心吸出孔内液体,每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO,震荡混匀。于酶标仪 492 nm 处测定吸光度(A)。

**2.3 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 统计学软件,各组数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,若数据符合正态分布,则进行方差分析及多重比较;不符合则进行非参数检验。 $P<0.05$  为有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 细胞原代培养及传代培养** 24 h 后倒置相差显微镜下观察,可见细胞贴壁生长,呈长梭型或星形纤维状,48 h 后生长迅速,3 d 接近融合。在原代培养过程中,成纤维细胞还混有少量的圆形 II 型肺泡上皮(AEC II)等杂细胞,因为 AEC II 等杂细胞不能传代培养,故 1 代后杂细胞已基本消失。传代后的成纤维细胞几乎长满整个培养瓶,偶见其他非纤维细胞,成纤维细胞增殖能力强,连续传 4~5 代以后,成纤维细胞增殖能力方逐渐下降。传代后杂细胞基本去除。见图 1。



A~C. 分别为第 1, 2, 3 代肺成纤维细胞(倒置显微镜,  $\times 50$ )  
D. 第三代肺成纤维细胞(免疫组化,  $\times 400$ )

图 1 原代培养 72 h 肺成纤维细胞形态观察

**3.2 细胞免疫组化鉴定** 第 3 代成纤维细胞免疫组化鉴定如图 2 所示:波形蛋白(vimentin)染色阳性,呈棕黄色,符合成纤维细胞特性,且纯度高于 95%。

**3.3 不同时间点不同浓度 TGF- $\beta_1$  刺激 SD 大鼠肺**

成纤维细胞增殖作用 TGF- $\beta_1$  在 48,72 h 时间点均具有促肺成纤维细胞增殖作用,在  $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  TGF- $\beta_1$  浓度刺激下 72 h 肺成纤维细胞增殖最显著。见表 1。

表 1 各时间点不同质量浓度 TGF- $\beta_1$  对大鼠肺成纤维细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

组别	质量浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	肺成纤维细胞增殖/A		
		24 h	48 h	72 h
空白组	-	$0.54 \pm 0.05$	$0.57 \pm 0.04$	$0.58 \pm 0.03$
TGF- $\beta_1$	10.0	$0.60 \pm 0.04^{1)}$	$0.59 \pm 0.06$	$0.58 \pm 0.01^{3)}$
	5.0	$0.59 \pm 0.05$	$0.63 \pm 0.04^{2)}$	$0.63 \pm 0.06$
	2.5	$0.56 \pm 0.05$	$0.63 \pm 0.07$	$0.68 \pm 0.09^{1)}$
	1.25	$0.56 \pm 0.05$	$0.57 \pm 0.06$	$0.56 \pm 0.10^{4)}$

注:与空白对照组同一时间点比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与 TGF- $\beta_1$   $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

气道重塑、肺实质破坏和气道黏液高分泌是导致 COPD 气流受限的重要原因。其中气道重塑是导致气流受限不可逆的重要因素,气道重塑主要表现为平滑肌细胞增殖及细胞外基质沉积,前者包括平滑肌细胞增生与肥大,后者包括成纤维细胞增生、胶原及氨基多糖沉积、杯状细胞增生及黏液腺增生肥大且分泌旺盛<sup>[7]</sup>。生长因子是促进细胞增殖和调节细胞外基质的活性多肽。TGF- $\beta$  有 5 种异构体,TGF- $\beta_1$  对纤维化作用比较明确<sup>[8]</sup>。TGF- $\beta_1$  是一种含有同源双链的 25 000 多肽,具有广泛调节细胞分化增殖的作用,是迄今发现的最强的细胞外基质沉积促进剂,不但可以促进成纤维细胞增殖和聚集,还可促使成纤维细胞表型向成肌纤维细胞表型转,而成肌纤维细胞参与 ECM 沉积。在香烟等有害颗粒刺激下,内皮细胞分泌 TGF- $\beta_1$ ,作用于成纤维细胞,促进 COPD 小气道周围纤维化的发生发展<sup>[9]</sup>。Vignola 等<sup>[10]</sup> 发现,哮喘及慢性支气管炎患者支气管黏膜的 TGF- $\beta_1$  表达较健康人显著增多,且与成纤维细胞数呈显著相关。笔者的前期工作证实益气活血化痰法中药复方可以干预 COPD 模型大鼠气道重塑<sup>[11]</sup>,改善肺功能<sup>[12]</sup>,下调 TGF- $\beta_1$  表达,因此,建立 TGF- $\beta_1$  刺激大鼠肺成纤维细胞增殖的体外模型,以期体内和体外实验相结合,深入研究中医药防治 COPD 的作用机制。

MTT 染色法自 1983 年 Mosmann 首次介绍以来,已广泛应用于细胞因子的生物检定、肿瘤细胞的化学与放射敏感性测定和细胞增殖率的测定<sup>[13]</sup>。

MTT 为一种四氮唑蓝盐,可在活细胞线粒体中分解成甲瓖(formazan),并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。formazan 溶解后很容易用酶标仪定量。细胞活性越强,产生的 formazan 越多,因此是一种较好的反映细胞增殖代谢活力的指标<sup>[14]</sup>。该法可在 96 孔培养板上进行,呈色反应可作自动测定分析,具有快速、简便和半自动化测定等优点。其测定结果与细胞生长和 DNA 合成有较好的线性关系。通过 MTT 法检测,48,72 h 时间点均观察到 TGF- $\beta_1$  的促增殖作用,经统计学分析,显著的 TGF- $\beta_1$  刺激浓度及时间点分别为  $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  72 h。 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 TGF- $\beta_1$  在 72 h 时间点体外刺激 SD 大鼠肺成纤维细胞,成功观察到 SD 大鼠肺成纤维细胞体外增殖。下一步研究相关药物血清对肺成纤维细胞增殖的影响,从体外实验进一步研究益气活血化痰法中药复方干预气道重塑的作用机制。

#### [参考文献]

- [1] Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstruction pulmonary disease (revised 2011) [EB/OL]. (2011-11) [2012-01-02]. <http://www.goldcopd.org/guidelines-pocket-guide-to-copd-diagnosis.html>.
- [2] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版公司,1996:7.
- [3] 严玉兰,刘洋,步雪峰,等.鼠肺细胞的分离纯化及原代培养[J].江苏大学学报:医学版,2008,18(1):11.
- [4] 鹿燕敏,李兰芳,霍海如,等.大鼠血管外膜成纤维细胞的原代培养及生物学行为研究[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(10):61.
- [5] 杨珺,王世岭,付桂英,等.千金子提取液对大鼠肺成纤维细胞增殖的影响及细胞毒性作用[J].中国临床康复,2005,7,27(9):101.
- [6] 朱星,杨长福.莪术醇对人胚肺成纤维细胞增殖的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1):226.
- [7] Finkestein J N, Johnston C T, Baggs R, et al. Early alteration in extracellular matrix and transforming growth factor $\beta$  gene expression in mouse lung indicative of late radiation fibrosis[J]. Int J Rad Oncol Biol Phys,1994,28:621.
- [8] Coker R K, Laurent G J, Shahzeidi S, et al. Transforming growth factors-beta 1,-beta 2, and-beta 3 stimulate fibroblast procollagen production *in vitro* but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis [J]. Am J Pathol, 1997, 150(3):981.

# 仙慈丹有效部位对小鼠 Lewis 肺癌的抑制作用及机制

李婧<sup>1</sup>, 王培培<sup>1</sup>, 黄松<sup>1,2\*</sup>, 陈玲玲<sup>1</sup>, 冯泓瑞<sup>1</sup>, 杜先华<sup>1</sup>

(1. 广州中医药大学, 广州 510006;

2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

**[摘要]** 目的:探讨仙慈丹对小鼠 Lewis 肺癌的生长抑制,免疫调节,细胞周期及凋亡的影响,并对其抗癌作用机制进行探讨。方法:选择 C57BL/6 小鼠移植性 Lewis 肺癌为实验模型进行试验,造模 5 d 后,分为模型对照组、顺铂给药组、仙慈丹高、中、低剂量组、联合用药组,给药 13 d,给药剂量( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )分别为 0,2.0(ip),0.648(ig),0.324(ig),0.162(ig),0.162(ig)+2.0(ip);观察仙慈丹有效部位对小鼠肺癌的抑制、免疫调节的影响,同时采用流式细胞仪检测肿瘤组织的细胞周期、凋亡率,应用免疫蛋白印记法(Western blot 法)观察仙慈丹有效部位对 p53, Bcl-2 表达的影响。结果:①抑瘤率:阳性药物顺铂组、仙慈丹高、中、低各给药组、联合给药组分别为(63.02±3.21)%, (46.59±2.60)%, (42.48±2.77)%, (15.74±1.94)%, (64.56±1.62)%;②脾脏指数:仙慈丹高、中、低各给药组指数较高,与阳性药物组比较具有显著性差异( $P<0.01$ );③荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡率:模型对照组、阳性药物组、仙慈丹高、中、低各给药组、联合给药组分别为 0.04%, 30.40%, 14.80%, 17.98%, 16.04%, 20.34%;④阳性药物组、仙慈丹高、中给药组、联合用药组的  $G_0/G_1$  细胞所占百分比与模型组比较具有显著性差异( $P<0.01$ );⑤p53 及 Bcl-2 表达量:仙慈丹高、中、低给药组及顺铂仙慈丹联合用药组表达量均降低,与模型组比较具有显著性差异( $P<0.01$ )。结论:仙慈丹有效部位可以抑制 Lewis 肺癌生长,其抗癌作用与诱导细胞凋亡,调节细胞周期有关。

**[关键词]** 仙慈丹有效部位; Lewis 肺癌; 细胞周期; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0208-05

**[doi]** 10.11653/syjf2013110208

## Inhibition Effect and Mechanism of Xiancidan on Lewis Lung Cancer in Mice

LI Jing<sup>1</sup>, WANG Pei-pei<sup>1</sup>, HUANG Song<sup>1,2\*</sup>, CHEN Ling-ling<sup>1</sup>, FENG Hong-rui<sup>1</sup>, DU Xian-hua<sup>1</sup>

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Dongguan Institution for Mathematics and Theoretics Engineering Research, Dongguan 523808, China)

**[收稿日期]** 20121031(011)

**[基金项目]** 广东省科学技术厅社会发展项目(2010B030700001)

**[第一作者]** 李婧,实验技术员,从事中药新药开发研究,E-mail:wangpeipei8201@163.com

**[通讯作者]** \*黄松,博士,副教授,硕士生导师,从事中药新药开发研究,Tel:020-32503212,E-mail:hsl318@yahoo.com.cn

[9] Peter J Barnes. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Clin Invest, 2008, 118(11):3546.

[10] Vignola A M, Chanez P, Chiappara G, et al. Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 156(2 Pt 1):59.

[11] 冯淬灵,金焱,武红莉,等.益气活血化痰方对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺组织病理学的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(12):34.

[12] 冯淬灵,金焱,武维屏,等.益气活血化痰方对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺功能的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2005, 28(6):39.

[13] Mosmann T. Rapid colouration assay for cellular growth and cytotoxicity assay [J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1):55.

[14] Specks U, Nerlich A, Colby T V. Increased expression of type VI collagen in lung fibrosis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1995, 151:1956.

[责任编辑 聂淑琴]