

至生胶囊调节食管癌造模大鼠细胞凋亡及 Fas, FasL 蛋白表达的研究

王祥麒*, 韩倩倩, 王璇, 王俊涛, 王一博
(河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 观察至生胶囊对食管癌造模大鼠细胞凋亡及 Fas, FasL 蛋白表达的影响, 从分子生物学角度分析其作用机制。方法: 选用健康 Wistar 大鼠, 除空白组外, 其余大鼠均 ip 甲基亚硝胺(MANA) $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 1 次/周, 连续 18 周造模。末次注射后将造模大鼠随机分为模型组、至生胶囊高($0.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中($0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、低($0.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)剂量组、西药替加氟组($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), ig, 1 次/d, 连续 4 周。原位末端标记法(TUNEL)检测对食管癌细胞凋亡的促进作用; 免疫组化法检测大鼠食管细胞中 Fas, FasL 蛋白的表达。结果: 至生胶囊可明显促进食管癌细胞的凋亡, 高、中、低剂量组、化疗组均促进凋亡, 与模型组比较均有统计学意义($P < 0.05$), 高、中剂量组疗效明显优于化疗组、低剂量组($P < 0.05$), 且呈一定量效关系。各药物治疗组 Fas 表达阳性率均有不同程度的升高, FasL 表达阳性率均有不同程度的降低。结论: 至生胶囊能促进食管癌细胞凋亡, 其作用机制可能与其提高 Fas 表达、降低 FasL 表达有关; 至生胶囊促进食管癌细胞凋亡及调节 Fas, FasL 表达的作用存在一定的量效关系, 至生胶囊高剂量此种作用优于替加氟。

[关键词] 至生胶囊; 食管癌; 细胞凋亡; Fas; FasL

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0235-04

Effect of Zhisheng Capsule on Cell Apoptosis and Fas, FasL Protein Expression in Rats Model of Esophageal Cancer

WANG Xiang-qi*, HAN Qian-qian, WANG Xuan, WANG Jun-tao, WANG Yi-bo
(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Zhisheng Capsule on the rat model of esophageal cancer, inducing apoptosis and the impact on Fas, FasL protein expression. **Method:** Healthy Wistar rats were treated with MANA $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ for 18 weeks except normal group. After the last injection, the rats were randomly divided into the following groups: esophageal model group, Zhisheng Capsule high ($0.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), middle ($0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), low ($0.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) dose groups, tegafur group ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). TUNEL assay was used to examine the effect of Zhisheng Capsule on apoptosis of esophageal cancer cells. Immunohisto-chemistry (IHC) technique was used to measure the expression of Fas and FasL protein in cells. **Result:** Zhisheng Capsule of three doses could promote apoptosis of esophageal cancer cells according to the result of TUNEL assay. Comparison with model group was significant ($P < 0.05$). High dose group was significantly better than chemotherapy group and low dose group ($P < 0.05$). There showed some dose-effect relationship. Measured with IHC, the expression of Fas protein in the cells dealt with Zhisheng Capsule was increased, whereas the expression of FasL protein was decreased. **Conclusion:** Zhisheng Capsule could promote apoptosis of esophageal cancer cells. The molecular mechanism of Zhisheng Capsule may be related with up-regulating of Fas and down-regulating the expression of FasL. In addition, the

[收稿日期] 2011-07-11

[通讯作者] * 王祥麒, 副主任医师, 医学博士, 从事中医药治疗恶性肿瘤研究, Tel: 13592667227, E-mail: wangxiangqi777@163.com

effects of Zhisheng Capsule to promote apoptosis of esophageal cancer cells and Fas, FasL showed some dose-effect relationship. The effect of the capsule was better than tegafur.

[**Key words**] Zhisheng Capsule; esophageal carcinoma; apoptosis; fas; fasL

食管癌晚期放疗的 5 年生存率低, 单用化疗效果不佳, 且放、化疗毒副作用大。至生胶囊治疗中晚期食管癌^[1]、肝癌^[2]有良好疗效, 其对于环磷酰胺引起的白细胞降低有一定的抑制作用, 并且可以提高机体的体液免疫及非特异性免疫功能, 可以明显增强小鼠耐缺氧能力, 延长小鼠在常压缺氧条件下的生存时间, 中剂量明显延长小鼠的游泳时间, 提示其可以提高小鼠的应激能力, 具有增强体能及抗疲劳能力^[3]; 其在体内外均对食管癌细胞 Eca-109 有较强的抑制作用^[4], 能抑制食管癌细胞 Eca-109 侵袭^[5]。为了进一步研究其治疗食管癌的作用机制, 我们观察了该制剂对食管癌造模大鼠细胞凋亡及 Fas, FasL 蛋白表达的影响。

1 材料

1.1 药物与试剂 至生胶囊: 由麝香、莪术、冰片、牛黄、虫草、西洋参等名贵中药组成, 0.25 g × 60 粒/瓶, 2 粒/次, 2 ~ 3 次/d, 最大用量 6 粒/d, 口服。由河南中医学院肿瘤研究所提供生药粉, 浅土黄色, 芳辛气味; 替加氟片: 口服片剂, 上海华联制药有限公司生产, 批号 0108043。盐酸氯胺酮注射液: 上海第二制药厂生产, 批号 011006; 兔抗鼠 Fas 抗体 (Lot BA0484)、兔抗鼠 FasL 抗体 Lot BA0049, 细胞凋亡检测试剂盒 (POD, Lot MK10201); SABC 免疫组化染色试剂盒 (Lot SA1025), DAB 显色试剂盒 (Lot AR1022), 均为武汉博士德生物工程有限公司产品; 甲基戊基亚硝胺 (MANA), 华西医科大学提供。

1.2 动物 健康 Wistar 大鼠 93 只, 雌雄各半, 体重 (120 ± 10)g, 由郑州大学医学院动物实验中心提供 (合格证号医动字第 410116 号)。

1.3 仪器 DT-300A 型电子天平 (上海医用激光仪器厂), 双目光学显微镜 (日本 Olympus), 显微照相机 (日本 Olympus 系列), 日立 H-7500 透射电镜 (CTEM, 日本日立公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 大鼠常规饲养, 除随机选取的空白组 15 只外, 其余大鼠背部 sc 甲基戊基亚硝胺 (MANA) 溶液 5 mg · kg⁻¹, 每周 1 次, 共 18 周, 末次注射后 1 周随机取 3 只处死, 经病理学检查均

证实为食管癌, 然后随机分为至生胶囊低、中、高剂量组及模型组、化疗组, 每组 15 只。低、中、高剂量组分别给至生胶囊 0.25, 0.5, 0.75 g · kg⁻¹ (相当于临床最大用量的 10, 20, 30 倍); 空白组、模型组给等容积生理盐水; 化疗组给替加氟 20 mg · kg⁻¹。各组均于造模成功后 24 h 后 ig, 临用前将药物以生理盐水配制成适当浓度, 均 5 mL · kg⁻¹, 1 次/d, 连续 4 周。末次给药 24 h 后盐酸氯胺酮 (0.1 g · kg⁻¹, 2 mL · kg⁻¹) ip 麻醉后处死, 取瘤检测。

2.2 观察指标

2.2.1 原位末端标记法 (TUNEL) 检测细胞凋亡 石蜡切片脱蜡; 3% 双氧水室温处理 10 min, 蒸馏水洗涤 3 次; PBS1:20 稀释 Proteinase K 37 °C 消化 15 min, PBS 洗 3 次; 加标记缓冲液 20 μL/片保持切片湿润, 每张切片取 TDT 和 DIG-dUTP 各 1 μL, 加入 18 μL 标记缓冲液中混匀, 置湿盒中 37 °C 标记 2 h, PBS 洗 3 次; 加封闭液 5 μL/片, 室温 30 min, 去掉封闭液, 不洗; 封闭液 1:1 000 稀释生物素抗地高辛抗体 50 μL/片, 置湿盒中 37 °C 30 min, PBS 洗 3 次; PBS 1:100 稀释 SABC 加至切片, 37 °C 反应 60 min, PBS 洗 4 次; DAB 显色, 苏木轻度复染, 封片。显微镜观察。结果判定标准: 凋亡细胞核呈棕黄色, 每张切片观察 5 个视野, 每个视野计数 100 个细胞核, 计数细胞凋亡并计算凋亡指数 (%)。

2.2.2 免疫组化检测 Fas, FasL 蛋白 载玻片在 Poly-Lysine 液中浸 5 min, 捞片后置烤箱中 50 ~ 60 °C 30 min; 脱蜡、水化组织切片; 3% H₂O₂ 室温下孵育 10 min, 蒸馏水洗涤 3 次; 切片进入 0.01 mol · L⁻¹ 柠檬酸缓冲液微波修复 10 min, 反复 2 次, 冷却后 PBS 冲洗 2 次; 加 1 滴非免疫动物山羊血清, 室温下孵育 5 min, 甩去血清; 滴加一抗 Fas (稀释度 1:100), FasL (稀释度 1:100), 4 °C 冰箱过夜; PBS 冲洗 3 次; 滴加通用型 IgG 抗体 (Fab 段)-HPR 多聚体, 室温孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次; 甩去 PBS 液, 加 50 μL 链亲和素-过氧化物酶溶液; 加 2 滴新鲜配制的 DAB 溶液染色, 显微镜下观察 5 ~ 10 min, 蒸馏水冲洗, 苏木素复染, 中性树胶封固, 显微镜下观察。判断标准: Fas, FasL 阳性反应均为黄到棕黄色颗粒, 定位于

胞浆和(或)胞膜,在400倍视野下,无阳性细胞或阳性细胞数<10%为阴性(-);阳性细胞数≥10%为阳性(+);阳性细胞数≥25%,中度阳性(++);阳性细胞数≥50%为强阳性(+++).

2.3 统计学处理 应用SPSS 15.0统计软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用t检验,计数资料采用秩和检验,方差不齐时进行变量转换。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

3 结果

3.1 细胞凋亡 各治疗组均能促进食管癌模型大鼠肿瘤细胞凋亡,至生胶囊高、中、低剂量组及化疗组与模型组比均有统计学意义($P < 0.01$),高、中剂量组与化疗组、低剂量组比差异有统计学意义($P < 0.05$),说明高、中剂量组疗效优于化疗组,且呈一定量效关系。见表1。

表1 至生胶囊对细胞凋亡指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	凋亡指数/%
空白	-	5.9 ± 3.26 ¹⁾
模型	-	2.36 ± 1.50
替加氟	0.02	11.21 ± 0.32 ¹⁾
至生胶囊	0.75	19.36 ± 1.24 ^{1,2,3)}
	0.5	15.41 ± 0.92 ^{1,2,3)}
	0.25	12.17 ± 0.86 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与替加氟组比较²⁾ $P < 0.05$;与低剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ (表2~3同)。

3.2 Fas 蛋白表达 模型组 Fas 蛋白表达阳性率低于空白组($P < 0.01$),各治疗组 Fas 蛋白表达阳性率均高于模型组($P < 0.01$),至生胶囊高剂量组 Fas 蛋白表达阳性率高于化疗组和低剂量组($P < 0.05$),说明食管癌组织中存在 Fas 蛋白低表达,而替加氟及至生胶囊各剂量组均能提高食管癌组织中 Fas 蛋白表达,以高剂量组效果最为明显,呈一定的量效关系。见表2。

表2 至生胶囊对 Fas 基因蛋白表达水平的影响($n = 15$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Fas				阳性数/n	阳性率/%
		-	+	++	+++		
空白	-	9	4	2	0	6	40.0 ¹⁾
模型	-	13	1	0	1	2	13.3
替加氟	0.02	8	3	3	1	7	46.7 ¹⁾
至生胶囊	0.75	4	2	3	6	11	73.3 ^{1,2,3)}
	0.5	7	2	3	4	8	53.3 ¹⁾
	0.25	8	2	3	2	7	46.7 ¹⁾

3.3 FasL 蛋白表达 模型组 FasL 蛋白表达阳性率明显高于空白组($P < 0.01$),至生胶囊高、中剂量组 FasL 蛋白表达阳性率低于模型组($P < 0.01, P < 0.05$),高剂量组表达阳性率低于化疗组及中剂量组($P < 0.05$),说明食管癌组织中存在 FasL 蛋白高表达,至生胶囊高、中剂量组能降低食管癌组织中 FasL 蛋白表达,以至生胶囊高剂量组效果更为明显,呈一定的量效关系。见表3。

表3 至生胶囊对 FasL 基因蛋白表达水平的影响

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FasL				阳性数/n	阳性率/%
		-	+	++	+++		
空白	-	15	0	1	0	1	6.70 ¹⁾
模型	-	4	3	5	3	11	73.3
替加氟	0.02	8	1	4	2	7	46.7 ¹⁾
至生胶囊	0.75	13	2	0	0	2	13.3 ^{1,2,3)}
	0.5	11	1	2	1	4	26.7 ¹⁾
	0.25	8	4	3	1	8	53.3

4 讨论

食管癌属中医“噎膈”范畴。临床多见吞咽梗阻,咽食不顺,甚则不能进食,伴胸痛、消瘦、呕吐痰涎等,多属痰瘀交阻、气阴亏虚证。徐灵胎评《临证指南医案·噎膈反胃》曰:“噎膈之证,必有瘀血、顽痰、逆气阻膈胃气”。因此,气、火、痰、瘀为本病基本病机,治疗当以活血化瘀、开郁通噎为主,辅以益气养阴、培本扶正。至生胶囊由麝香、莪术、冰片、牛黄、冬虫夏草、西洋参等名贵中药组成。方中麝香活血通经、消肿止痛;莪术行气破血、消积止痛;冰片清热止痛;牛黄清心解毒、豁痰开窍,凉肝息风;冬虫夏草补虚损、益精气;西洋参补气养阴、清热生津。诸药合用,共奏理气化痰、活瘀散结、消肿止痛、扶正固本之功,能对食管癌等肿瘤产生消散回缩、缓解症状的效果。肿瘤的形成过程中存在着“Fas 阴性选择和 FasL 阳性选择”过程: Fas 阳性的肿瘤细胞容易被活化的淋巴细胞识别并借助 FasL 与 Fas 的配接将其清除,即所谓“谋杀(murder)”,肿瘤细胞 FasL 阳性表达亦可能将毗邻的 Fas 阳性瘤细胞清除,即所谓“兄弟相杀(fraticide)”,只有 Fas 阴性表达或 Fas 分子功能障碍的瘤细胞才能得以继续生存^[6],此即 Fas 阴性选择;FasL 阳性的瘤细胞能够反杀伤淋巴细胞,使肿瘤成为免疫特赦部位,为肿瘤发展创造相对稳适宜的环境,此即 FasL 阳性选择。FasL 高度表达而 Fas 表达下调或功能缺失的肿瘤细

K-CoxB-JN 复方水提物对注射阿霉素小鼠心肌损伤的治疗作用

董晓鹏¹, 赵刃², 韩淑英³, 郑彩慧¹, 吴范武¹, 吕力勋³, 王敏¹, 王国权¹, 包巨大^{1*}

(1. 河北联合大学中医学院, 河北 唐山 063000; 2. 唐山中医医院, 河北 唐山 063000;
3. 河北联合大学基础医学院药理教研室, 河北 唐山 063000)

[摘要] 目的: 观察抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊(K-CoxB-JN)复方水提物对注射阿霉素致小鼠心肌的治疗作用。方法: 以阿霉素 3 mg·kg⁻¹ ip, 隔日 1 次, 共 7 次致小鼠心肌损伤, 造模同时开始 ig K-CoxB-JN 复方水提物高、中、低剂量(10, 5, 2.5 g·kg⁻¹)连续 3 周, 并设模型组(生理盐水)和正常对照组。称量小鼠心脏指数, 计算存活率, 测定血清肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)活性, 光镜下观察心室肌组织形态学变化。结果: K-CoxB-JN 复方水提取物能减轻阿霉素致心肌损伤小鼠的心肌间质水肿、充血, 减轻心肌的坏死程度, 减少心肌细胞坏死范围。结论: K-CoxB-JN 复方水提取物对阿霉素致心肌损伤小鼠有一定的治疗作用。

[关键词] K-CoxB-JN 复方水提取物; 阿霉素; 心肌损伤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0238-03

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110809.1704.003 **[网络出版时间]** 2011-08-09 17:04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110809.1704.003.html>

病毒性心肌炎是临床常见、多发病, 其中柯萨奇 B₃ 病毒性心肌炎最为常见^[1]。近年来, 国内病毒性心肌炎发病率有所提高, 在儿童和青壮年中的发病率呈上升趋势, 严重危害了人类的健康^[2]。且可并发严重的心律失常、心力衰竭、心源性休克、猝死,

亦可演变成扩张型心肌病, 目前尚无公认有效的治疗药物^[3]。抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊(K-CoxB-JN)由西洋参、麦冬、五味子、黄芪、牡丹皮、莱菔子、王不留行组成, 经临床应用证明“K-CoxB-JN”对病毒性心肌炎有较好的治疗作用, 其缺点是临床应用剂量较大, 本研究拟用该药的全方水提物, 观察其对注射阿霉素模型小鼠心肌的治疗作用, 为该方进一步研究提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 雄性, SPF 级, 昆明种小鼠 150 只, 体重 16~18 g, 由北京华卓康生物科技股份有限公司提供, 合格证号 SCXK(京)2009-0004。

[收稿日期] 2011-03-17

[基金项目] 国家科技重大专项课题(2009ZX09103-442)

[第一作者] 董晓鹏, 医师, 中药防治心血管疾病, Tel: 15830511245, E-mail: ytdxp@yahoo.cn.

[通讯作者] *包巨大, 硕士生导师, 教授, 中药防治心血管疾病, Tel: 0315-3725030, E-mail: baojutai@sohu.com

胞容易获得更多的生存机会, 这些细胞因不易死亡而积累癌变因素, 最终成为永生的癌细胞。本研究结果进一步验证了上述学说, 同时提示至生胶囊能促进食管癌细胞凋亡, 其作用机制可能与其提高 Fas 表达、降低 FasL 表达有关。此外, 至生胶囊促进食管癌细胞凋亡及调节 Fas, FasL 表达的作用存在一定的量效关系, 至生胶囊高剂量作用优于替加氟。

[参考文献]

- [1] 秦善文, 王一博, 李佺. 至生胶囊治疗肝癌临床研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2008(10): 1182.
- [2] 王祥麒, 杨峰. 至生胶囊联合化疗治疗中晚期食管癌

24 例临床观察[J]. 现代药物与临床, 2010(4): 297.

- [3] 杨海燕, 张黎莉. 至生胶囊对小鼠免疫功能的影响及其升白作用和抗应激能力的研究[J]. 中成药, 2010(2): 293.
- [4] 王祥麒, 杨峰, 蒋士卿, 等. 至生胶囊对食管癌 Eca-109 细胞作用的体内外实验研究[J]. 中医杂志, 2011(3): 231.
- [5] 王祥麒, 蒋士卿. 至生胶囊对人食管癌细胞 Eca-109 侵袭作用的影响[J]. 中医学报, 2010(3): 387.
- [6] Schroter M, Peli J, Hahne M, et al. Fas-dependent tissue turnover is implicated in tumor cell clearance [J]. Oncogene, 2000, 19(14): 1794.

[责任编辑 何伟]