

· 药理 ·

补肾方对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠 T 辅助细胞 1, 17 和调节性 T 细胞的影响

刘妍^{1,3}, 张平², 李明¹, 齐放¹, 尹琳琳³, 王义周¹, 寇爽¹, 郑琦¹, 赵晖^{1*}, 王蕾^{1*}

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院望京医院病理科, 北京 100102;
3. 首都医科大学宣武医院, 北京 100053)

[摘要] 目的: 观察六味地黄丸和金匱肾气丸对实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 小鼠脑组织中肿瘤坏死因子- (tumor necrosis factor, TNF-)、转化生长因子- (transforming growth factor, TGF) - 及白细胞介素(interleukin, IL-17) 的调节作用。方法: 小鼠皮下多点注射髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG)₃₅₋₅₅ 与完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA) 的混合抗原, 辅以 ip 百日咳毒素(pertussis toxin, PTX), 建立 EAE 模型。免疫后第 12, 25, 40 天取小鼠脑组织, 采用免疫组织化学染色法观察各组小鼠脑中 TNF- , TGF- , IL-17 的变化。结果: 免疫后第 25 天, 模型组小鼠脑中 TNF- 蛋白表达明显高于正常组($P < 0.01$), 而六味地黄丸和金匱肾气丸组则明显低于模型组($P < 0.01$)。模型组小鼠脑中 TGF- 蛋白表达在第 40 天时明显低于正常组($P < 0.01$), 而各治疗组明显高于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中六味地黄丸和金匱肾气丸组还显著高于激素组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。模型组小鼠脑中 IL-17 蛋白表达在第 25, 40 天时均高于正常组($P < 0.01$), 而六味地黄丸和金匱肾气丸组明显低于模型组($P < 0.01$), 并优于激素组($P < 0.05$)。模型组小鼠脑中 TNF- /TGF- 和 IL-17/TGF- 比值在第 40 天时明显高于正常组($P < 0.01$), 而各治疗组均低于模型组($P < 0.01$)。结论: 六味地黄丸和金匱肾气丸能够调节 EAE 小鼠中紊乱的 TNF- , TGF- , IL-17 细胞因子, 推测可能是其改善 EAE 病情的机制之一。二方在调节细胞因子的作用方面优于醋酸泼尼松。

[关键词] 六味地黄丸; 金匱肾气丸; 实验性自身免疫性脑脊髓炎; 肿瘤坏死因子- ; 白介素-17; 转化生长因子- ; 小鼠
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0116-05

Effect of Bushen Formulae on T Helper Cell 1, 17 and Regulatory T cell in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice

LIU Yan^{1,3}, ZHANG Ping², LI Ming¹, QI Fang¹, YIN Lin-lin³, WANG Yi-zhou¹, KOU Shuang¹, ZHENG Qi¹,
ZHAO Hui^{1*}, WANG Lei^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine of Capital Medical University, Beijing 100069, China;
2. Department of Pathology of Wangjing Hospital of China Academy Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China; 3. Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** To study the regulatory effect of Liuwei Dihuang Pill (LDP) and Jingui Shenqi Pill (JSP) on cytokines expression in the brain of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice. **Method:** The EAE model was induced by subcutaneous injection of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)₃₅₋₅₅ and

[收稿日期] 20100807(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873230); 北京市自然科学基金项目(7092014); 北京市教育委员会科技发展计划项目(KM2007100025015); 北京市属高等学校人才强教深化计划(PHR201008401)

[第一作者] 刘妍, 硕士, 住院医师, 研究方向: 中医药防治脑病, Tel: 010-83198327, E-mail: liuyan14789@126.com

[通讯作者] * 王蕾, 博士, 教授, 研究方向: 中医药防治脑病, Tel: 010-83911626, E-mail: tmwangl@ccmu.edu.cn

* 赵晖, 博士, 副教授, 研究方向: 中医药防治脑病的研究, Tel: 010-83911635, E-mail: zhaohui8957@sina.com

complete Freund's adjuvant (CFA), supplemented with intraperitoneally pertussis toxin (PTX). The brain of mice was removed on day 12th, 25th and 40th post-immunization (PI), respectively. And the protein expression of TNF- α , TGF- β and IL-17 were assessed by immunohistochemistry method. **Result:** Compared with the normal control (NC), the protein expression of TNF- α significantly increased in model group on day 25th PI ($P < 0.01$). Compared with the model group, TNF- α expression decreased in LDP-treated and JSP-treated group significantly ($P < 0.01$). The protein expression of TGF- β in model group significantly decreased compared with NC mice on day 40th PI ($P < 0.01$). Compared with model group, TGF- β protein increased in prednisone acetates (PA), LDP and JSP-treated groups significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The protein expression of IL-17 in model group significantly increased compared with the NC group on day 25th and 40th PI ($P < 0.01$). Compared with model group, IL-17 protein reduced in LDP-treated and JSP-treated groups ($P < 0.01$). The ratio of TNF- α /TGF- β and IL-17/TGF- β significantly increased compared with the NC mice on day 40th PI ($P < 0.01$), but reduced in PA, LDP and JSP-treated groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** Both LDP and JSP treatment may suppress EAE through regulating the cytokines of TNF- α , TGF- β and IL-17.

[Key words] Liuwei Dihuang Pill; Jingui Shenqi Pill; experimental autoimmune encephalomyelitis; tumor necrosis factor- α ; interleukin-17; transforming growth factor- β ; mice

实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 是研究多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 较理想的动物模型。我们前期研究证实六味地黄丸和金匱肾气丸两方均能改善髓鞘少突胶质细胞糖蛋白₃₅₋₅₅ (myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG₃₅₋₅₅) 诱导 EAE 小鼠的临床症状和神经功能评分, 降低 EAE 的发病率, 缩短病程, 减轻中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 炎症反应和髓鞘脱失, 促进 EAE 小鼠的恢复, 并对其淋巴细胞亚群和自然杀伤细胞有明显的调节作用^[1]。本文则进一步从 CD4⁺ T 辅助细胞 (T helper cell, Th) 分化的 Th1, 调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 和 Th17 的相关细胞因子研究补肾方剂对 EAE 的免疫调节作用机制, 为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 体重 18 ~ 22 g, 6 ~ 8 周, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。动物许可证号 SCXK(京) 2007-0001。动物饲养在首都医科大学动物实验中心, 许可证号 SYXK(京) 2005-0022。实验方案由首都医科大学伦理委员会批准。

1.2 药品及试剂 六味地黄丸及金匱肾气丸 (又名桂附地黄丸) 均为北京同仁堂药厂生产, 批号分别为: 7011264, 8010939。醋酸泼尼松片由天津太平洋制药有限公司生产, 批号 061203。MOG₃₅₋₅₅

(MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK, 纯度 HPLC > 96%) 由北京中科亚光生物科技有限公司合成, 批号 C213405。完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 和百日咳毒素 (pertussis toxin, PTX) 由美国 Sigma 公司提供, 批号分别为 067K8614, 077K1023。转化生长因子 (transfer growth factor, TGF)- β 抗体 (SC-146) 和白细胞介素 (interleukin, IL)-17 抗体 (SC-7927) 由美国 Santa Cruz 公司生产, 购于北京燕南源科技有限公司。肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 抗体 (bs-0078R)、二抗 (GK400305) 和 DAB (K3468) 由北京博奥森生物科技有限公司提供。

2 方法

2.1 模型制备 将小鼠随机分为正常组和 EAE 实验组。EAE 实验组小鼠分别于背侧中线两侧皮下 4 点 sc MOG₃₅₋₅₅ 与 CFA 混合的乳化抗原 (50 μ g/只), 免疫当天及第 2 d 给小鼠 ip PTX 500 ng/只。正常组只 sc 生理盐水。

2.2 处理方法 将 EAE 实验组小鼠再分为模型组、激素组、六味地黄丸组及金匱肾气丸组。正常组、模型组、激素组发病前 ig 生理盐水, 激素组在发病后 (第 9 天) ig 醋酸泼尼松混悬液 (0.006 g·kg⁻¹, 按人体重量的 9 倍计算, 下同), 六味地黄丸组 ig 六味地黄丸混悬液 (2.31 g·kg⁻¹), 金匱肾气丸组 ig 金匱肾气丸混悬液 (2.31 g·kg⁻¹)。每天 1 次, 共 40 d。分别在小鼠免疫后发病初期 (第 12 d)、急性期

(第 25 d)、缓解期(第 40 d)时, 10% 水合氯醛 ip 麻醉, 多聚甲醛灌注后取小鼠脑组织, 放入多聚甲醛固定液中固定。常规脱水、石蜡包埋, 用石蜡切片机对小鼠脑组织面连续切片。

2.3 指标检测 TNF- α , TGF- β 和 IL-17 免疫组化染色。石蜡切片脱蜡至水, PBS 冲洗 5 min, 入柠檬酸, 高火 3 min, 低火 15 min, 室温下冷却 20 min, 抗原修复。PBS 冲洗 5 min, 共 3 次。3% H₂O₂ 室温孵育 10 min, PBS 冲洗 5 min, 共 3 次。滴加适当比例稀释的 TNF- α , TGF- β 和 IL-17 抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, PBS 冲洗 5 min, 共 3 次。入二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 冲洗 5 min, 共 3 次。DAB 显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 中性树胶封片, 光学显微镜(Nikon Eclipse 80i)下观察。应用 NIS-Elements BR 3.0 软件对图像进行分析, 对目的蛋白的积分吸光度 A(以数值/10³表示)进行统计。

2.4 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 11.5 版统计软件进行统计分析, 首先做正态性检验, 若符合正态性应用 ANOVA, 否则用秩和检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 不同时期各组小鼠脑组织中 TNF- α 的变化
免疫后第 12 d, 各组小鼠脑中 TNF- α 蛋白表达无明显差异。第 25 d, 模型组 TNF- α 明显高于正常组 ($P < 0.01$), 而六味地黄丸和金匱肾气丸组则明显低于模型组 ($P < 0.01$), 和激素组相比, 也有明显差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。第 40 天各组 TNF- α 无明显差异(表 1)。

表 1 各组小鼠不同时期脑中 TNF- α 免疫组化积分
吸光度 A 的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$) 10³

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	第 12 天	第 25 天	第 40 天
正常	-	46.54 \pm 12.82	47.55 \pm 12.62	49.54 \pm 12.41
模型	-	47.44 \pm 20.65	87.84 \pm 32.82 ²⁾	65.07 \pm 13.41
醋酸泼尼松	0.006	42.50 \pm 14.28	83.24 \pm 30.51 ²⁾	50.16 \pm 29.76
六味地黄丸	2.31	57.31 \pm 20.67	60.35 \pm 10.89 ^{4,5)}	63.29 \pm 15.55
金匱肾气丸	2.31	52.61 \pm 24.60	46.60 \pm 11.17 ^{4,6)}	56.41 \pm 25.17

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与激素组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2~5 同)。

3.2 不同时期各组小鼠脑组织中 TGF- β 的变化
免疫后第 12 d, 六味地黄丸组小鼠脑中 TGF- β 蛋白表达明显低于正常组 ($P < 0.05$), 其他各组无明显变化。第 25 d, 各组 TGF- β 无明显差异。第 40 d, 模型组 TGF- β 明显低于正常组 ($P < 0.01$), 激素组、六

味地黄丸和金匱肾气丸组明显高于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中六味地黄丸和金匱肾气丸组还显著高于激素组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (表 2)。

表 2 各组小鼠不同时期脑中 TGF- β 免疫组化积分 A 的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$) 10³

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	第 12 天	第 25 天	第 40 天
正常	-	36.16 \pm 18.21	44.71 \pm 25.46	41.75 \pm 18.12
模型	-	31.67 \pm 13.20	50.65 \pm 19.16	20.60 \pm 3.97 ²⁾
醋酸泼尼松	0.006	27.70 \pm 7.83	48.27 \pm 10.74	34.07 \pm 2.20 ³⁾
六味地黄丸	2.31	20.34 \pm 5.12 ¹⁾	47.59 \pm 25.32	47.59 \pm 15.08 ^{4,5)}
金匱肾气丸	2.31	29.95 \pm 9.85	53.64 \pm 14.65	53.46 \pm 2.65 ^{4,6)}

3.3 不同时期各组小鼠脑组织中 IL-17 的变化
免疫后第 12 d, 各组小鼠脑中 IL-17 蛋白表达无明显差异。第 25 d, 模型组 IL-17 明显高于正常组 ($P < 0.01$); 金匱肾气丸组则低于模型组和激素组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 六味地黄丸组也低于模型组和激素组, 但无统计学意义。第 40 d, 模型组 IL-17 仍高于正常组 ($P < 0.01$), 而六味地黄丸和金匱肾气丸组明显低于模型组 ($P < 0.01$) 和激素组 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 3 各组小鼠不同时期脑中 IL-17 免疫组化积分 A 的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$) 10³

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	第 12 天	第 25 天	第 40 天
正常	-	8.96 \pm 4.36	8.72 \pm 2.65	9.13 \pm 4.17
模型	-	10.12 \pm 5.22	17.34 \pm 7.61 ²⁾	16.92 \pm 4.34 ²⁾
醋酸泼尼松	0.006	10.48 \pm 2.66	15.74 \pm 7.02 ¹⁾	14.51 \pm 2.27 ²⁾
六味地黄丸	2.31	10.43 \pm 3.76	13.99 \pm 5.57	10.82 \pm 2.97 ^{4,5)}
金匱肾气丸	2.31	9.77 \pm 4.69	10.10 \pm 2.31 ^{4,5)}	10.33 \pm 2.81 ^{4,5)}

3.4 不同时期各组小鼠脑组织中 TNF- α / TGF- β 比值的变化
各组小鼠脑中 TNF- α / TGF- β 比值在免疫后第 12 d 无明显差异。第 25 d, 模型组比值升高, 但无统计学意义; 金匱肾气丸组明显低于模型组 ($P < 0.01$), 六味地黄丸组和激素组虽有降低, 但无明显差异。第 40 d, 模型组比值明显高于正常组 ($P < 0.01$), 各治疗组均明显低于模型组 ($P < 0.01$) (表 4)。

表 4 各组小鼠不同时期脑中 TNF- α 与 TGF- β 免疫组化积分 A 比值的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	第 12 天	第 25 天	第 40 天
正常	-	1.55 \pm 0.47	1.35 \pm 0.43	1.40 \pm 0.36
模型	-	1.73 \pm 0.89	1.91 \pm 0.87	3.28 \pm 0.95 ²⁾
醋酸泼尼松	0.006	1.66 \pm 0.59	1.62 \pm 0.46	1.47 \pm 0.77 ⁴⁾
六味地黄丸	2.31	1.85 \pm 0.81	1.44 \pm 0.69	1.32 \pm 0.18 ⁴⁾
金匱肾气丸	2.31	1.74 \pm 0.88	1.04 \pm 0.28 ⁴⁾	1.09 \pm 0.47 ⁴⁾

3.5 不同时期各组小鼠脑组织中 IL-17/TGF- β 比值的变化 各组小鼠脑中 IL-17/TGF- β 比值在免疫后第 12 d 无明显差异。第 25 d, 模型组比值高于正常组, 但无统计学意义; 金匱肾气丸组明显低于模型组 ($P < 0.01$)。第 40 d, 模型组比值明显高于正常组 ($P < 0.01$), 各治疗组均明显低于模型组 ($P < 0.01$), 其中六味地黄丸和金匱肾气丸组还低于激素组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (表 5)。

表 5 各组小鼠不同时期脑中 IL-17 与 TGF- β 免疫组化积分吸光度 A 比值的变化 (柳 \pm s, $n=5$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	第 12 天	第 25 天	第 40 天
正常	-	0.31 \pm 0.12	0.25 \pm 0.12	0.25 \pm 0.11
模型	-	0.40 \pm 0.24	0.37 \pm 0.15	0.87 \pm 0.19 ²⁾
醋酸泼尼松	0.006	0.39 \pm 0.11	0.34 \pm 0.08	0.47 \pm 0.18 ^{1,4)}
六味地黄丸	2.31	0.51 \pm 0.08	0.35 \pm 0.17	0.28 \pm 0.18 ^{4,5)}
金匱肾气丸	2.31	0.34 \pm 0.17	0.21 \pm 0.10 ⁴⁾	0.20 \pm 0.07 ^{4,6)}

4 讨论

中医认为 MS 和“痿证”中的“骨痿”相似, 中医古籍中对于骨痿的认识大多与肾有关, 如《素问·痿论》曰:“阳气内伐则热舍于肾, 肾者水藏也, 今水不胜火, 则骨枯而髓虚, 故足不任身, 发为骨痿”, 《三因极一病证方论·五痿证例》曰:“病者肾热, 腰脊不举, 骨枯而髓减, 其色黑而齿槁, 名曰骨痿。”肾主骨生髓, 故本病的发生与肾的关系密切。据临床观察, MS 早期以肝肾阴虚为主, 晚期以脾肾阳虚或阴阳两虚为主。临床治疗以补肾为本。在中药复方治疗 MS 和 EAE 的研究中, 补肾方剂研究的颇多, 如补肾固髓片、地黄合剂、一贯煎、二黄方、左归丸和右归丸等^[2], 可能与其有调节免疫功能有关。前期研究发现, 本文所选用的六味地黄丸和金匱肾气丸也对 CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ 和自然杀伤细胞有调节作用^[1]。

近年来研究表明, 在 EAE 的免疫发病机制中, 存在着 Th1/Th2/Treg/Th17 细胞及其相关细胞因子构成的复杂的因子网络系统之间的失衡^[3]。如 EAE 小鼠的脑和脊髓中 TNF- β 表达增高^[4], TNF- β 缺乏或应用抗 TNF- β 抗体可缓解 EAE^[5]。而 TGF- β 能够抑制初始 T 细胞和 Th1 类细胞因子的增殖和分化, 抑制 IL-2 和 IL-12 受体表达, 拮抗 IFN- γ 和 TNF- β 的活性等^[6], 本病发生时, T 淋巴细胞被激活, Th1 及 Th17 类细胞活性增强, 其产生的细胞因子透过血脑屏障又激活小胶质细胞和星形胶质细胞, 产生一系列免疫反应和病理学改变^[7]。

本实验结果表明六味地黄丸和金匱肾气丸均可

降低小鼠脑中 TNF- β 及调节 TNF- β /TGF- β 的比值接近正常, 减轻炎症反应。研究还表明, TGF- β 还可以在 EAE 的恢复期促进少突胶质细胞前体细胞的分化, 促进神经元存活和轴突生长和髓鞘再生^[8]。本实验模型组小鼠脑中 TGF- β 含量在恢复期降低, 而各治疗组均能够提高小鼠脑中 TGF- β 含量, 并且六味地黄丸和金匱肾气丸优于激素组, 这表明中药对于 EAE 小鼠恢复期髓鞘和轴突的修复作用明显。

而 TGF- β 在 EAE 小鼠急性期的变化不明显, 这可能和 TGF- β 的双重作用有关。TGF- β 不仅是一种抑炎因子, 它还可能加剧炎症反应, 其机制可能与促进 Th17 细胞分化有关^[9]。Th17 细胞是最新发现的细胞亚群, 分泌 IL-17, IL-6, TNF- β 等^[10], 在 MS 患者急性期外周血和脑脊液中 IL-17 显著升高^[11]。以 PTX 为佐剂诱导的 EAE 小鼠, 可优先激发 IL-23, 产生大量 IL-6, 使 TGF- β 优先激发信号转导及转录活化因子 3 的通路, 为 Th17 细胞的扩增提供了条件, 从而促进 EAE 发病^[12]。本实验结果显示 IL-17 在模型组小鼠脑中呈现高表达, 且急性期升高的较为明显, 各治疗组均可降低 EAE 小鼠 IL-17 的水平, 恢复 IL-17/TGF- β 的比值, 其中六味地黄丸和金匱肾气丸组的作用与激素组相比较为突出。

本实验研究发现醋酸泼尼松、六味地黄丸和金匱肾气丸均可以降低 TNF- β 及 IL-17 水平, 恢复 TNF- β /TGF- β 和 IL-17/TGF- β 的比值, 提高恢复期小鼠脑中 TGF- β 的水平, 促进髓鞘修复, 从而达到防治 EAE 的作用。六味地黄丸和金匱肾气丸对于 TNF- β , TGF- β 及 IL-17 的调节作用表现在不同的时间点, 且二方在降低炎症反应, 促进髓鞘修复等方面的作用与醋酸泼尼松相比较为突出, 而此二方对 Th1/Th2 及 Treg/Th17 细胞网络的研究还有待深入探讨。

[参考文献]

- [1] 刘妍, 王蕾, 赵晖, 等. 六味地黄和金匱肾气丸对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠淋巴细胞亚群和 NK 细胞的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(4): 42.
- [2] 刘妍, 王蕾, 王义周. 中医药治疗实验性自身免疫性脑脊髓炎研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2009, 43(4): 83.
- [3] Murphy, A C, Lalor, S J, Lynch, M A, et al. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Brain Behav Immun, 2010, 24(4): 641.

四藤方对 Bel-7402 细胞增殖和凋亡作用研究

沈克平, 胡兵*, 刘威

(上海中医药大学附属龙华医院肿瘤五科, 上海 200032)

[摘要] 目的: 观察清热解毒中药-四藤方对肝癌细胞 Bel-7402 增殖和凋亡的影响。方法: 不同浓度四藤方处理人肝癌细胞 Bel-7402、人肝细胞 HL-7702, WST-8 法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡, Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡形态变化, Western Blot 法检测半胱天冬酶-3(caspase-3) 活化。结果: 与对照组比较, 四藤方对人肝细胞 HL-7702 增殖无明显影响; 100 ~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 四藤方作用 24 h 可显著抑制肝癌 Bel-7402 细胞增殖, 促使细胞 Bel-7402 凋亡, 呈现细胞凋亡形态, 并可活化 Bel-7402 细胞 caspase-3。结论: 四藤方可以抑制 Bel-7402 细胞增殖, 促 Bel-7402 细胞凋亡, 并可能与活化 caspase-3 相关。

[关键词] 肝癌细胞; 四藤方; 增殖; 凋亡; 半胱天冬酶-3

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0120-04

Effects of Siteng Fang on Proliferation and Apoptosis in Bel-7402 Cells *in vitro*

SHEN Ke-ping, HU Bing*, LIU Wei

(The 5th Department of Oncology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 20032, China)

[收稿日期] 20100823(008)

[基金项目] 国家自然科学基金(30873258); 上海市基础研究重点项目(09JC1413600); 上海市浦东新区中医领军型人才项目(PWZ2008-20-104); 上海市级医院临床科研资源共享平台(SHDC12007206)

[第一作者] 沈克平, 学士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 中医药治疗消化道肿瘤临床与基础, Tel: 021-58835753, E-mail: sher0313@163.com

[通讯作者] * 胡兵, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤生物学、功能基因组与抗癌中药作用及配伍, Tel: 021-58835753, E-mail: beearhu@hotmail.com

- [4] Zaheer A, Sahu S K, Wu Y H, et al. Diminished cytokine and chemokine expression in the central nervous system of GMF-deficient mice with experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Brain Res, 2007, 1144: 239.
- [5] Ghezzi P, Mennini T. Tumor necrosis factor and motoneuronal degeneration: An open problem [J]. Neuroimmunomodulation, 2001, 9(4): 178.
- [6] Tan Y V, Abad C, Lopez R, et al. Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide is an intrinsic regulator of Treg abundance and protects against experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(6): 2012.
- [7] Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Immunol, 2006, 177(1): 566.
- [8] Lalive P H, Paglinawan R, Biollaz G, et al. TGF-beta-treated microglia induce oligodendrocyte precursor cell chemotaxis through the HGF-c-Met pathway [J]. Eur J Immunol, 2005, 35(3): 727.
- [9] Bettelli E, Carrier Y J, Gao W D, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells [J]. Nature, 2006, 441(7090): 235.
- [10] Harrington L E, Hatton R D, Mangan P R, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages [J]. Nat Immunol, 2005, 6(11): 1123.
- [11] Graber J J, Allie S R, Mullen K M, et al. Interleukin-17 in transverse myelitis and multiple sclerosis [J]. J Neuroimmunol, 2008, 196(1/2): 124.
- [12] Zhao C B, Coons S W, Cui M, et al. A new EAE model of brain demyelination induced by intracerebroventricular pertussis toxin [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 370(1): 16.

[责任编辑 聂淑琴]