

· 中医药复方及其有效成分抗肺癌作用研究专题 ·

[编者按] 肺癌目前仍是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,其治疗策略不仅包含对肿瘤细胞自身增殖代谢的干预,而且对肿瘤细胞进行自身增殖代谢和获得各种恶性表型的肿瘤微环境亦日趋重视。越来越多的研究表明中医药在调控肿瘤微环境方面具有独特优势。中医经方泽漆汤,由泽漆、紫参、半夏等9味中药组成,常用于咳嗽、哮喘、胸水、肺癌等病证的治疗,现代研究还显示泽漆汤具有较好的免疫调节作用。在肿瘤微环境中,髓源抑制细胞(MDSC)是一类未分化成熟并对T细胞具有免疫抑制特性的异质细胞群体,具有促进肿瘤发展的作用。此外,自然杀伤细胞(NK),既不依靠抗体和补体,也不需要预先致敏,就能够直接杀伤肿瘤细胞,属于机体天然免疫抗肿瘤的第一道防线。为了模拟肿瘤微环境,笔者还构建了更符合中医"有是故用是药"思维的小鼠肺癌原位模型,并发现泽漆汤可明显延长该模型小鼠生存期,可显著上调小鼠体内的NK细胞,以及明显抑制MDSC。由于本团队致力于探索中医药复方及其有效成分的抗肿瘤作用,故在本专题中除了研究泽漆汤对肺癌的抑瘤功效以外,还揭示了芦荟苦素、黄芪甲苷等中药单体在直接抑瘤或调控肿瘤微环境中M1型巨噬细胞的作用,以期用现代科学阐释中医药抗肺癌的有效性。

泽漆汤对肺癌原位模型小鼠的抑制作用

胥孜杭¹, 朱杨壮壮¹, 张飞², 韦璐瑶¹, 苏琳¹, 焦肖宁¹, 周芹¹, 张宁¹,
黄珍祯¹, 朱娴丹¹, 刘菲¹, 仲海荣¹, 朱诗国¹, 陈晓^{1*}, 邹纯朴^{1*}

(1. 上海中医药大学基础医学院, 经方理论应用研究中心, 中药与系统生物学中心, 科技实验中心, 上海 201203; 2. 上海交通大学医学院附属新华医院, 上海 200092)

[摘要] 目的:建立小鼠肺癌原位模型,用泽漆汤干预模型小鼠以观其抑瘤功效,并探索潜在作用机制。方法:通过肺内注射 1×10^5 个LLC-luc细胞建立非小细胞肺癌原位小鼠模型,用泽漆汤($0.171 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)或生理盐水对模型小鼠进行每日灌胃,连续35 d,观察小鼠的外观表现(精神、毛发、食欲等),生存期及泽漆汤抑瘤效果;每周活体成像检测小鼠肺内荧光信号强弱。流式细胞术检测模型小鼠脾脏中NK细胞数量,CD107 α 实验检测泽漆汤用药后小鼠脾脏中NK细胞脱颗粒情况。采用Kromasil 1005 C₁₈色谱柱,以0.025%磷酸-乙腈梯度洗脱,流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$,检测波长265 nm,建立泽漆汤指纹图谱并采用中国药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012版)对10批样品指纹图谱进行评价以完成对泽漆汤的质量控制。结果:泽漆汤能够明显抑制肺癌原位模型小鼠肺部荧光信号($P < 0.05$, $P < 0.01$),延长小鼠生存期($P < 0.01$);泽漆汤干预后小鼠体内肿瘤中NK细胞显著增多($P < 0.01$),CD107 α 脱颗粒也显著增加($P < 0.01$)。并且,对泽漆汤指纹图谱的相似度评价结果显示,10批泽漆汤水提液的指纹图谱相似度均 ≥ 0.9 ,表明不同批次间差异较小。结论:泽漆汤可能通过上调小鼠体内NK细胞数量,增强其脱颗粒能力,从而达到抑制小鼠体内肿瘤生长,延长其生存期的作用。泽漆汤HPLC指纹图谱相似度评价可反映泽漆汤质量的稳定性,为后续研究提供用药基础。

[关键词] 泽漆汤; 肺癌小鼠模型; NK细胞; 质量评价

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2019)14-0006-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191322

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190318.1644.009.html>

[网络出版时间] 2019-03-20 12:01

[收稿日期] 20190306(015)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81804017);中国博士后基金面上项目(2018M640416);上海市科学技术委员会科研计划项目(18YF1423500);经方理论应用研究中心(A1-Z183020110)

[第一作者] 胥孜杭,博士,上海中医药大学师资博士后,从事中医药抗肿瘤研究,E-mail: xuzihang19881021@126.com

[通信作者] * 邹纯朴,博士,副教授,从事中医药抗肿瘤研究,E-mail: chunpuzou@shutcm.edu.cn;

* 陈晓,博士,教授,从事中医药抗肿瘤研究,E-mail: chenxiao2121@126.com

Inhibitory Effect of Zeqi Tang on Mouse Model of Lung Cancer

XU Zi-hang¹, ZHU Yang-zhuang-zhuang¹, ZHANG Fei², WEI Lu-yao¹, SU Lin¹, JIAO Xiao-ning¹,
ZHOU Qin¹, ZHANG Ning¹, HUANG Zhen-zhen¹, ZHU Xian-dan¹, LIU Fei¹,
ZHONG Hai-rong¹, ZHU Shi-guo¹, CHEN Xiao^{1*}, ZOU Chun-pu^{1*}

(1. Application and Research Center of Classical Prescription, School of Basic Medical Science,
Center for Traditional Chinese Medicine (TCM) and Systems Biology, Science and Technology
Experiment Center, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China;

2. Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

[Abstract] Objective: To observe effect of Zeqi Tang in intervening mice with orthotopic lung cancer model, in order to observe its anti-tumor mechanism. **Method:** An in situ mouse model of non-small cell lung cancer was established through intrapulmonary injection with 1×10^5 LLC-luc cells. The model mice were intragastrically administered with Zeqi Tang ($0.171 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) or normal saline for 35 days. Appearance (spirit, hair, appetite, sleep), survival period and Zeqi Tang anti-tumor effect were observed, weekly vital imaging was performed to detect the fluorescence signal in the lungs of mice. Flow cytometry was used to detect the NK cell content in the spleen of the model mice. CD107 α was used to detect the degranulation of NK cells in the spleen of mice after administration of Zeqi Tang. Kromasil 100 5 C₁₈ column was used and eluted with acetonitrile-0.025% phosphoric acid in a gradient mode, with flow rate at $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, column temperature at $35 \text{ }^\circ\text{C}$ and detection wavelength of 265 nm, as to establish the fingerprint of Zeqi Tang. The fingerprints of 10 batches of samples was evaluated by using the Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System Software (2012 Edition) recommended by the Chinese Pharmacopoeia Commission, in order to complete the quality control of Zeqi Tang. **Result:** Zeqi Tang could significantly inhibit the lung fluorescence signal of lung cancer in situ model mice and prolong the survival of mice ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After the intervention with Zeqi Tang, the NK cells in the tumors increased significantly ($P < 0.01$), and the degranulation of CD107 α also increased significantly ($P < 0.01$). Moreover, the HPLC-DAD fingerprint of Zeqi Tang showed a significant increase in the fingerprint similarity of 10 batches of lacquer soup aqueous extract. Moreover, the HPLC-DAD fingerprint of Zeqi Tang showed that the fingerprint similarity of 10 batches of lacquer soup aqueous extract was ≥ 0.9 , indicating that small differences between the batches. **Conclusion:** Zeqi Tang may enhance the tumor growth and prolong the survival period of mice by up-regulating the number of NK cells in mice and enhancing their degranulation function. The evaluation of similarity of HPLC fingerprint of Zeqi Tang reflects the quality of lacquer soup to a certain extent, and can provide reference for further study.

[Key words] Zeqi Tang; pulmonary mouse model; NK cells; quality evaluation

泽漆汤来源于汉代张仲景《金匱要略》，主要由泽漆、紫参、制半夏、白前、黄芩片、生姜、人参片、桂枝、甘草片等 9 味中药组成，全方共奏逐水通阳，化痰散结，健脾扶正，清化郁热之功，临床上主要治疗咳嗽、哮喘、胸水、肺癌等肺系病证的治疗^[1-4]。随着近些年对中医药治疗肿瘤的越来越重视，关于泽漆汤的报道亦日渐增多^[5]。张永为等^[6]通过实验表明，泽漆汤在 Lewis 肺癌皮下模型小鼠体内具有明显的抗肿瘤作用，这一作用可能与其能下调肿瘤

细胞的凋亡抑制蛋白 Survivin 的表达相关。吴红洁等^[7]在 C57BL/6 小鼠皮下建立 Lewis 肺癌移植瘤模型，发现复方泽漆散的各个剂量组均能够明显抑制小鼠肿瘤生长；中剂量组能诱导肿瘤细胞凋亡，并且能够明显改变线粒体的形态学（或肿胀、或空泡变、或消失）。桑希生等^[8]在此研究的基础上，发现泽漆散可通过显著下调转化生长因子转化生长因子 (TGF)- β 的表达来抑制肺癌细胞生长。以上可见泽漆汤对肺癌皮下小鼠模型具有较好的抑制作用，

但小鼠皮下肺癌模型代替不了原发性肺癌,并且中医讲究“药证相对”,强调“有是故而用是药”,故根据本课题组前期工作基础,成功建立了小鼠肺癌原位模型,并首次探索泽漆汤对于更符合临床实际的肺癌原位模型小鼠的抑制作用。此外,由于泽漆汤是复方,并由 9 味中药组成,故制作了泽漆汤冻干粉。为了确保泽漆汤质量稳定,研究中对其指纹图谱进行了不同批次的相似度评价,并以此为基础开展其对肺癌原位模型小鼠抑瘤功效的研究。

1 材料

1.1 细胞株 Lewis 肺癌细胞株 (Lewis lung carcinoma, LLC), 源于 C57BL/6 小鼠, 购于中国科学院细胞库, 细胞编号 TCM 7, 稳定传至 4~5 代。

1.2 动物 C57BL/6 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 雄性, 5~6 周龄, 体质量 18~20 g。所有小鼠均在上海中医药大学 SPF 级屏障系统中饲养, 许可证号 SYXK(沪)2014-0008。动物实验的开展已获上海中医药大学伦理委员会的同意, 伦理编号为 PZSHUTCM18120703。

1.3 药物制备 结合《金匱要略》原方和临床中的药物用量比例, 本研究选用的泽漆汤组成和剂量为泽漆 30 g, 紫参 10 g, 制半夏 15 g, 白前 10 g, 黄芩片 6 g, 生姜 10 g, 人参片 6 g, 桂枝 6 g, 甘草片 6 g, 以上药材均购自上海康桥中药饮片有限公司, 由上海中医药大学基础医学院内经教研室邹纯朴副教授鉴定均为正品。取生药 7 付, 按照《金匱要略》原方的中药煎煮法制备药液。第 1 煎以药物总量 10 倍水浸泡 1 h, 武火烧开后文火煎煮 2 h, 滤出药液, 第 2 煎与第 3 煎同上。将 3 次所得药液混合, 3 000 r·min⁻¹ 离心 30 min 祛除杂质, 得最终生药质量浓度 0.144 g·mL⁻¹, 放置于 -80 °C 冷冻过夜。用 CHRIST 1-2 LD plus 冷冻干燥机将冷冻过夜的泽漆汤药液进行冷冻干燥, 得泽漆汤冻干粉, 放置于 -20 °C 保存备用。得粉率为 13.4%, 得粉率 = (冻干后药物质量/冻干前药物质量) × 100%。

1.4 试剂 乙腈、甲醇 (默克公司, 色谱纯); 超纯水 (Millipore 公司), 其他试剂均为分析纯。PE-Cy7-anti-mouse CD3, PE-anti-mouse CD107 α , 纯化的 FITC-anti-mouse NK 1.1 和同型对照 PE-Cy 7 IgG₁, PE-IgG₁, BD MatrigelTM basement membrane matirx 基质膜 (Biologend 公司, 批号分别为 100219, 121611, 108705, 400125, 400111, 356234); 红细胞裂解液 (Biosharp 公司, 批号 68027757); Lipofectamine2000TM, OPTI-MEMI, 青霉素-链霉素,

10% 胎牛血清, DMEM 培养基, 含 0.25% EDTA 的胰蛋白酶 (Thermo Fisher Scientific 公司, 批号分别为 11668030, 31985062, 15140122, 10091148, 11995065, 25200072)。

1.5 仪器 1260 型高效液相色谱仪 (四元泵, 自动进样器, 柱温箱和 DAD 检测器, 美国 Agilent 公司), Sartorius CP225D 型电子天平 (美国 Sartorius 公司), JY2002 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司), BD AccuriTM C6 型流式细胞仪 (美国 Biologend 公司), Lumina XR 型 Caliper 精诺真生物发光/荧光活体分子成像系统 (IVIS Lumina XR Imaging System, 德国 Perkin Elmer 公司), CHRIST 1-2 LD plus 型冷冻干燥机 (德国 Christ 公司)。

2 方法

2.1 动物模型的建立 表达荧光素酶 (luciferase, luc) 的肺腺癌 LLC 稳转细胞系构建方法同文献 [9], 将携带荧光素酶 (luciferase) 的肺腺癌 LLC-luc 细胞培养于含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养液中, 贴壁的 LLC-luc 细胞用 0.25% 的胰酶消化 5 min, 然后使用 PBS 重悬并与 matrigel 胶 1:1 混合用于原位注射。将准备好的细胞悬液计数为 1 × 10⁵ 个/mL, 并抽吸到 1 mL 胰岛素注射器中 (100 μ L/只)。C57 小鼠胸前剃毛后, 自小鼠腋下 1 cm 处切开皮肤, 定位心脏和肺组织, 并将细胞悬液直接打入肺中。

2.2 模型小鼠给药 于造模当天, 将所有造模后小鼠随机分为泽漆汤组与模型组。每日下午给予泽漆汤组泽漆汤 200 μ L 灌胃; 模型组给予等量生理盐水灌胃, 每组均每日给药 1 次, 连续 35 d。泽漆汤用量及方法同前所述^[10], 根据临床治疗 70 kg 体质量患者, 每日服泽漆汤生药质量为 99 g, 按照“人和动物体表面积折算的等效剂量比值表”计算小鼠等效剂量并配制泽漆汤冻干粉溶液, 小鼠每日生药用量为 0.254 7 g, 所需泽漆汤冻干粉质量浓度为 0.171 g·mL⁻¹。小鼠每日生药用量 = 成人每日生药用量 × 人鼠体表面积系数; 冻干粉浓度 = (小鼠每日生药用量 × 得粉率) / 小鼠每日灌胃体积。

2.3 动物活体成像监测小鼠体内肿瘤生长 将造模的小鼠于手术后的第 4 天进行第 1 次活体成像, 随后每周 1 次, 连续 4 周, 以监测肿瘤生长情况。给予小鼠腹腔注射 Luciferase 底物, 质量浓度为 15 g·L⁻¹, 剂量为 150 μ L/只, 5~8 min 后予以异氟烷吸入麻醉, 放入机箱曝光, 最后用 Lumina II living Image 4.3 软件分析统计荧光信号强度。同时每日

观察小鼠外观表现(精神、毛发、食欲、睡眠等),并观测计算小鼠生存率,生存率 = 动物存活数/实验组动物数 $\times 100\%$ 。

2.4 流式细胞术检测小鼠 NK 细胞 肺癌原位模型 小鼠泽漆汤或生理盐水灌胃处理 35 d 后给予安乐死,取出脾脏并研磨,加入 3 倍体积的红细胞裂解液,避光孵育 8 min, $1\ 000\ r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min,磷酸盐缓冲液(PBS)重悬,PBS 洗涤 2 次后用 PBS 300 μL 重悬,并按照 1:200 加入 NK 1.1 以及 CD3 抗体,避光孵育 30 min,PBS 洗涤 2 次,最后使用流式仪收集小鼠脾脏内 NK 细胞。

2.5 CD107 α 脱颗粒 NK 细胞的细胞毒性作用 通过其脱颗粒的程度来反映,CD107 α 为其脱颗粒的指标,故可通过流式细胞仪检测 CD107 α 的表达情况来推测 NK 细胞的细胞毒性作用强弱^[11]。将脾细胞与 LLC 肿瘤细胞 1:1 共孵育,同时加入 CD107 α 抗体及其同型对照,放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 及 5% CO_2 的环境中孵育 5 h,然后再加入 CD56 以明确 CD107 α 在 NK 细胞上的表达。最后将染好的细胞用 1% 甲醛固定,使用流式仪收集细胞。

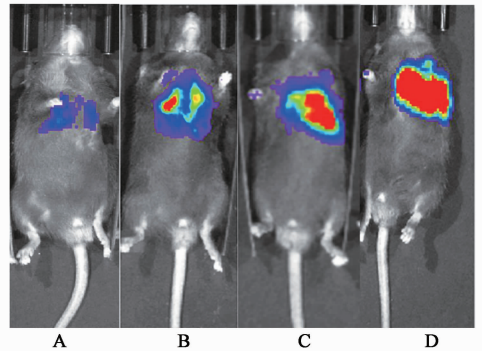
2.6 泽漆汤冻干粉指纹图谱质量分析 色谱条件: Kromasile C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);流速 1.0 mL \cdot min $^{-1}$;检测波长 265 nm;柱温 35 $^{\circ}\text{C}$;进样体积 20 μL ;流动相 0.025% 磷酸水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 15 min, 0.5% ~ 1% B; 15 ~ 30 min, 1% ~ 2% B; 30 ~ 50 min, 2% ~ 10% B; 50 ~ 150 min, 10% ~ 25% B; 150 ~ 176 min, 25% ~ 64% B)。再根据样本摸索色谱条件中的各个具体条件,最后采用国家药典委员会提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 版)对指纹图谱干预。

2.7 统计学处理 流式细胞术分析在 Flowjo 10 软件中进行,所有数据的分析在 GraphPad Prism 5.00 版本 Windows 中进行,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内差异采用单因素方差分析,组间差异采用 t 检验,生存期取中位数并绘制生存曲线, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 肺癌原位模型建立 使用肺内注射法在小鼠左侧胸部接种 LLC-luciferase 细胞 1×10^5 个/只,造模 7 d 后对小鼠进行活体成像,活体成像每周 1 次连续 4 周以监测小鼠体内肿瘤生长情况(图 1),分别于造模后第 2 ~ 4 周时取小鼠肺部组织拍照,发现左肺上均有明显结节,且质地坚硬(图 2)。病理学检测后,在显微镜下观察,可见左肺中有毛线团样致

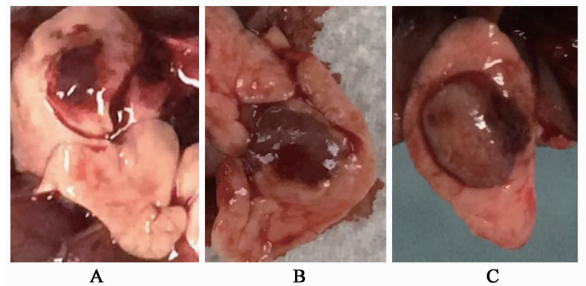
密的肿瘤组织病灶,明显区别于周围正常的肺组织结构,证实了小鼠胸部的荧光信号部位正是肺部肿瘤,说明肺癌原位模型构建成功(图 3)。



A ~ D. 造模第 1, 2, 3, 4 周

图 1 小鼠肺癌原位模型活体成像

Fig. 1 In situ model of mouse lung cancer *in vivo* imaging



A ~ C. 造模第 2, 3, 4 周(图 3 同)

图 2 小鼠原位模型肺部解剖

Fig. 2 Mouse in situ model lung anatomy

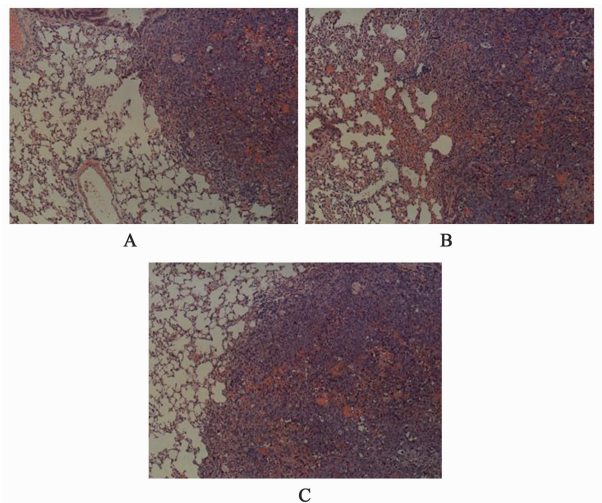


图 3 小鼠原位模型肺部病理学检测(HE, $\times 100$)

Fig. 3 Mouse in situ model lung pathology test(HE, $\times 100$)

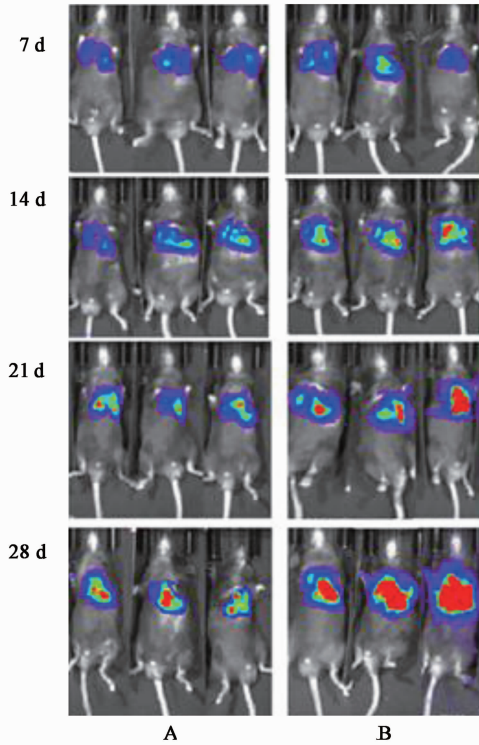
3.2 泽漆汤对模型小鼠肿瘤生长及生存期的影响 与模型组相比,泽漆汤组可明显抑制小鼠胸部荧光信号($P < 0.05$, $P < 0.01$)(表 1, 图 4),并且泽漆汤还可显著延长小鼠生存期($P < 0.01$)(表 2)。

表 1 泽漆汤对小鼠肿瘤荧光信号强度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of Zeqi Tang on mice tumor fluorescence signal intensity ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度/g·mL ⁻¹	给药 7 d	给药 14 d	给药 21 d	给药 28 d	给药 35 d
模型	-	3.1 ± 0.35	7.2 ± 0.42	8.5 ± 0.32	8.3 ± 0.45	-
泽漆汤	0.171	3.0 ± 0.41	6.3 ± 0.37 ²⁾	7.1 ± 0.40 ²⁾	7.6 ± 0.33 ¹⁾	8.4 ± 0.46

注:与模型组同时点比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2,3 同)。



A. 泽漆汤组; B. 模型组

图 4 泽漆汤抑制模型小鼠的活体成像肺部荧光

Fig. 4 Lung fluorescein of *in vivo* imaging of mice

每日观察小鼠外观表现可见模型组小鼠逐渐出现精神萎靡、反应迟钝、爪甲口鼻苍白,毛发黯淡无光泽,而泽漆汤组小鼠症状出现延迟且相比较轻。

3.3 泽漆汤对小鼠中 NK 细胞及 CD107 α 脱颗粒的影响 泽漆汤对原位模型小鼠的肺部肿瘤具有明显抑制作用。NK 细胞在肿瘤的免疫监视中发挥着举足轻重的作用,此作用主要是与其介导的细胞杀伤功能密切相关,在此过程中 NK 细胞的脱颗粒水平又是其发挥杀伤功能的前提条件。当细胞发生脱颗粒的时候,其分泌型的溶酶体将被释放,此时与溶酶体相关的膜蛋白-1 (CD107 α) 就会被转运到细胞膜表面,使其可以与抗体结合,故 CD107 α 可被作为 NK 细胞在活化后发生脱颗粒的指标^[12-13]。与模型组比较,泽漆汤可显著增加肿瘤中 NK 细胞的比重 ($P < 0.01$),说明泽漆汤对 NK 细胞有明显的正调控作用。小鼠在经过泽漆汤治疗后可以显著增加

表 2 泽漆汤对小鼠生存期的影响

Table 2 Effect of Zeqi Tang on survival of model mice

组别	质量浓度/g·mL ⁻¹	生存时间 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)/d	生存率 /%
模型	-	25 ± 5.1	-
泽漆汤	0.171	37 ± 3.5	42 ²⁾

NK 细胞的脱颗粒表达情况 ($P < 0.01$) (表 3)。

表 3 泽漆汤对小鼠 NK 细胞及 CD107 α 脱颗粒的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of Zeqi Tang on NK cell and CD107 α degranulation

组别	质量浓度/g·mL ⁻¹	NK 细胞	CD107 α 脱颗粒 %
模型组	-	2.21 ± 0.32	6.3 ± 0.40
泽漆汤组	0.171	3.82 ± 0.21 ²⁾	14.1 ± 1.25 ²⁾

3.4 泽漆汤指纹图谱的相似度评价 根据 10 批泽漆汤样品 (S1 ~ S10) 测定结果,采用中国药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2012 版) 对 10 批样品指纹图谱进行评价。分析结果表明,10 批泽漆汤样品相似度在 0.9 ~ 1.0,各批样品之间相似度值高,均在 0.990 以上,表明泽漆汤的制备工艺比较稳定 (表 4)。

4 讨论

4.1 小鼠肺癌原位模型的优越性 本研究用稳定表达荧光素酶的小鼠 Lewis 肺腺癌 LLC-luc 细胞结合基质胶所建立的小鼠肺癌原位模型不仅制造出了肺部原位的肿瘤病变,还模拟了肿瘤产生的肺损伤,更符合临床肺癌患者的病理变化。并且,该模型所需细胞量少,成瘤率高且操作简便,出血量少,无手术死亡风险,还可通过荧光活体成像实时监测肿瘤生长,能够为肺癌研究提供良好的模型^[14]。同时,从中医用药的角度出发,中医临证中有辨病与辨证相结合,不同的中药对于相应的脏腑位置具有指向作用,即药物的“归经”。泽漆汤中除紫参外的其余 8 味药均归于肺经,故对于肺脏的病变具有更好的治疗效果。皮下等异位移植模型难以满足中医用药的辨病需求,与临床实际不符,而小鼠肺癌原位模型则很好地解决了这一问题^[14],能够做到“药证相

表 4 10 批泽漆汤样品相似度

Table 4 Similarity of 10 batches of Zeqi Tang sample (S1-S10)

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1	0.997	0.997	0.999	0.998	0.999	0.996	0.998	0.996	0.999	0.999
S2	0.997	1	0.994	0.996	1	0.998	0.997	0.995	0.991	0.995	0.998
S3	0.997	0.994	1	0.994	0.995	0.995	0.993	0.999	0.999	0.998	0.998
S4	0.999	0.996	0.994	1	0.997	0.998	0.997	0.997	0.993	0.998	0.998
S5	0.998	1	0.995	0.997	1	0.999	0.997	0.996	0.992	0.996	0.999
S6	0.999	0.998	0.995	0.998	0.999	1	0.996	0.997	0.992	0.997	0.999
S7	0.996	0.997	0.993	0.997	0.997	0.996	1	0.995	0.992	0.996	0.997
S8	0.998	0.995	0.999	0.997	0.996	0.997	0.995	1	0.998	0.999	0.999
S9	0.996	0.991	0.999	0.993	0.992	0.992	0.992	0.998	1	0.998	0.997
S10	0.999	0.995	0.998	0.998	0.996	0.997	0.996	0.999	0.998	1	0.999
对照指纹图谱	0.999	0.998	0.998	0.998	0.999	0.999	0.997	0.999	0.997	0.999	1

对”“有是故,用是药”。

4.2 泽漆汤通过增强 NK 细胞杀伤作用从而延长荷瘤小鼠生存期 中药通常药性较缓,起效较慢。故在中药药效的研究中,模型小鼠通常需要提前给药一段时间,然后才开始肿瘤接种,但是本课题欲模拟临床实际情况,因病而服药,故不做任何提前给药处理,即在小鼠肿瘤接种的同天才开始给予泽漆汤灌胃处理。经过泽漆汤处理后发现,不仅延长了小鼠生存期而且明显改善小鼠的大体状况。在小鼠肺癌原位模型中,小鼠经过泽漆汤口服灌胃治疗后明显增加了肿瘤组织中 NK 细胞的数量及其脱颗粒效应。NK 细胞具有很强的细胞毒性效应,其在先天性免疫中通过肿瘤的免疫监视机制以防止肿瘤新生物的形成和发展从而发挥着重要的抗肿瘤作用^[15-16]。但是在肿瘤微环境中,NK 细胞的活性会因其激活通路以及介导其杀伤活性的受体被影响而受到抑制^[17],此外,NK 细胞的数量在肿瘤患者中所占比重也十分低下^[18],所以提高 NK 细胞的数量及其介导的杀伤功能,一直是肿瘤免疫疗法的热点^[19-21]。根据本课题的实验结果,泽漆汤可以提高肺转移模型小鼠中 NK 细胞所介导的细胞毒性作用从而达到抑制肿瘤肺转移的效果。

4.3 泽漆汤 HPLC 相似度评价结果分析 指纹图谱在中药质量控制中有着极高的价值和广泛的应用^[22-23]。目前,关于人参片^[24-26]、桂枝^[27]、甘草片^[28-29]、黄芩片^[30]、泽漆^[31]、生姜^[32-33]、制半夏^[34]单味药材指纹图谱有大量文献,但未见泽漆汤的指纹图谱相关研究。本研究对同来源的 10 次泽漆汤药材相似度进行分析,建立了泽漆汤药材 HPLC 指

纹图谱共用模式,通过相似度评价,说明药材在化学成分上几乎是没有差别的,药材按照一样步骤方法煎煮提,其质量稳定,可为后续实验提供药品基础。此外,关于泽漆汤 HPLC-DAD 指纹图谱的具体建立方法,精密性、稳定性、重复性等方法学考察结果,以及共有峰指认和具体成分定量分析等,可见本课题组的后续报道。

本研究建立了更符合临床实际的原位肺癌小鼠模型,并首次报道了中医经典复方泽漆汤可显著延长非小细胞肺癌原位模型小鼠的生存期,其抑瘤作用机制可能与增加 NK 细胞浸润和增强其脱颗粒有关。同时,本研究采用 HPLC 指纹图谱的相似度分析系统对泽漆汤冻干粉进行质量控制,为本研究以及后续相关研究提供用药质量参考。

[参考文献]

[1] 张炜,高元喜. 泽漆汤加减治疗肺癌并胸腔积液[J]. 湖北中医杂志,2015,37(3):49.

[2] 雷坤朋,朱永忠,吴洁. 泽漆汤治疗痰饮咳喘探析[J]. 南京中医药大学学报,2016,32(5):413-415.

[3] 王霞,许瑶,许尤琪,等. 泽漆汤联合顺铂胸腔灌注治疗恶性胸腔积液临床研究[J]. 陕西中医,2018,39(3):286-288.

[4] 雷坤朋. 泽漆汤化痰治疗悬饮的理论探讨与临床运用[D]. 南京:南京中医药大学,2017.

[5] 杨万里,袁宇,丁井永. 泽漆抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2016,24(22):3680-3688.

[6] 张永为,夏华峰,范丽萍,等. 泽漆汤对小鼠 Lewis 肺癌抑制作用及 survivin 蛋白表达的影响[J]. 中华中医药学刊,2012,30(11):2489-2491,2620.

- [7] 吴红洁, 桑希生. 复方泽漆散对小鼠 Lewis 肺癌形态学影响 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27 (10): 2142-2144.
- [8] 桑希生, 吴红洁, 曲永彬, 等. 复方泽漆散对肿瘤组织转化生长因子- β_1 瘤表达的影响 [J]. 中医药信息, 2004, 21(3): 68-70.
- [9] 胥孜杭, 刘菲, 邹纯朴, 等. 小鼠肺癌原位模型的建立 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(1): 15-18, 169.
- [10] XU Z, ZHANG F, ZHU Y, et al. Traditional Chinese medicine Ze-Qi-Tang formula inhibit growth of non-small-cell lung cancer cells through the p53 pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 234: 180-188.
- [11] Subhashis S, Wilfred T V G, Kasper M A R, et al. Hypoxia induced impairment of NK cell cytotoxicity against multiple myeloma can be overcome by IL-2 activation of the NK cells [J]. PLoS One, 2017, 8(5): e64835.
- [12] Lovelace P, Maecker H T. Multiparameter intracellular cytokine staining [J]. Methods Mol Biol, 2018, doi: 10.1007/978-1-4939-7346-0_9.
- [13] Krzewski K, Gil-Krzewska A, Nguyen V, et al. LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity [J]. Blood, 2013, 121(23): 4672-4683.
- [14] 胥孜杭, 胡洁森, 陈晓, 等. 小鼠肺癌模型研究进展 [J]. 中国医药导报, 2016, 13(9): 63-67.
- [15] Cantoni C, Huergo-Zapico L, Parodi M, et al. NK cells, tumor cell transition, and tumor progression in solid malignancies: new hints for NK-based immunotherapy? [J]. Immunol Res, 2016, doi: 10.1155/2016/4684268.
- [16] Bigley A B, Simpson R J. NK cells and exercise: implications for cancer immunotherapy and survivorship [J]. Discov Med, 2015, 19(107): 433-445.
- [17] Paul S, Lal G. The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy [J]. Front Immunol, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.01124
- [18] BI J, TIAN Z. NK cell exhaustion [J]. Front Immunol, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.00760.
- [19] ZHU L, Oh J M, Gangadaran P, et al. Targeting and therapy of glioblastoma in a mouse model using exosomes derived from natural killer cells [J]. Front Immunol, 2018, 23(9): 824.
- [20] DUAN H. Novel therapeutic strategies for solid tumor based on body's intrinsic antitumor immune system [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(2): 441-457.
- [21] FANG F, XIAO W, TIAN Z. NK cell-based immunotherapy for cancer [J]. Semin Immunol, 2017, doi: 10.1016/j.smim.2017.07.009.
- [22] 张健. 色谱指纹图谱在中药质量控制中的应用价值分析 [J]. 临床研究, 2018, 26(8): 112-113.
- [23] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.
- [24] LIU P, YU H, ZHANG L, et al. A rapid method for chemical fingerprint analysis of Panaxnoto-ginseng powders by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Chin J Nat Med, 2015, 13(6): 0471-0480.
- [25] XIA P, BAI Z, LIANG T, et al. High-performance liquid chromatography based chemical fingerprint analysis and chemometric approaches for the identification and distinction of three endangered Panax plants in Southeast Asia [J]. J Sep Sci, 2016, 39(20): 3880-3888.
- [26] 张鹏, 邹兰, 李西文, 等. 人参饮片标准汤剂的评价及应用探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7): 2-11.
- [27] 王元清, 韩彬, 陈婷, 等. 桂枝指纹图谱的建立及识别模式研究 [J]. 中药材, 2017, 40(7): 1622-1627.
- [28] 谢佳颖, 杨立国, 夏伟军, 等. 甘草药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 云南中医学院学报, 2015, 38(5): 32-36.
- [29] 柯昌虎, 严慧, 郑芳, 等. 甘草指纹图谱的研究进展 [J]. 实用药物与临床, 2018, 21(1): 98-103.
- [30] 王立娟. 黄芩药材的高效液相色谱指纹图谱及黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素含量的同时测定 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(18): 1665-1668.
- [31] 李晓强, 张德莉, 何荣霞, 等. 甘肃南部地区泽漆高效液相指纹图谱研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(24): 2183-2187.
- [32] Soparat Y, Kanet W, Natchanun L. Characteristic fingerprint based on gingerol derivative analysis for discrimination of ginger (*Zingiber officinale*) according to geographical origin using HPLC-DAD combined with chemometrics [J]. Food Chem, 2014, 158(1): 101-111.
- [33] 马开, 田萍, 张迪文, 等. 生姜 HPLC-DAD 指纹图谱的优化研究 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(9): 2051-2054.
- [34] 王朋展, 杜宝香, 付业佩, 等. 基于多波长指纹图谱分析不同产地半夏水溶性成分 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 911-914.

[责任编辑 张丰丰]