

益气健脾化癥方联合 5-FU 对 MFC 荷瘤小鼠皮下移植瘤的生长及免疫功能的影响

王敏, 刘沈林, 吴坚, 王海丹, 孙庆敏, 叶柏*

(南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

[摘要] **目的:**探讨益气健脾化癥方联合 5-氟尿嘧啶(5-FU)对 MFC 荷瘤 615 小鼠皮下移植瘤的生长及免疫功能的影响。**方法:**24 只 615 小鼠随机分为模型组, 益气健脾化癥方(20 g·kg⁻¹)组, 5-FU(25 mg·kg⁻¹)组, 联合(益气健脾化癥方 20 g·kg⁻¹ + 5-FU 25 mg·kg⁻¹)组, 每组 6 只, 皮下接种法建立小鼠胃癌移植瘤模型。于末次给药后完整剥离移植瘤、脾、胸腺, 计算抑瘤率、胸腺、脾指数。流式细胞仪测定外周血、肿瘤组织中髓源抑制性细胞(MDSC)水平及其亚型多形核细胞样(PMN-MDSC), 单核细胞样(M-MDSC)的水平及外周血中各免疫细胞的水平; 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测瘤组织中精氨酸酶-1(Arg-1), 诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA 表达水平。**结果:**与模型组比较, 益气健脾化癥方组小鼠体质量增加、瘤重减轻, 5-FU 组小鼠体质量、瘤重、胸腺、脾指数均下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 5-FU 组比较, 联合组体质量增加, 瘤重减轻, 胸腺、脾指数升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较, 联合组肿瘤组织及外周血中总 MDSCs 水平下降($P < 0.05$, $P < 0.01$), 益气健脾化癥方组, 5-FU 组及联合组 PMN-MDSC 水平均下降($P < 0.01$); 与 5-FU 组比较, 联合组 PMN-MDSC 水平下降($P < 0.05$), M-MDSC 水平下降($P < 0.05$)。与模型组比较, 益气健脾化癥方组巨噬细胞及其 M1 型水平增加($P < 0.05$), 各 T 细胞群水平均增加($P < 0.05$, $P < 0.01$), 5-FU 组巨噬细胞, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T 细胞群水平下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 5-FU 组比较, 联合组巨噬细胞, CD4⁺, CD8⁺ T 细胞群水平增高($P < 0.01$)。与模型组比较, 各组 iNOS, Arg-1 mRNA 表达均下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 5-FU 组比较, 联合组 iNOS, Arg-1 mRNA 表达均下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**益气健脾化癥方对肿瘤有一定的抑制作用, 且与 5-FU 联合使用能更好地抑制皮下移植瘤的生长, 并改善化疗后机体的免疫状态, 其机制可能与降低 MDSCs 的水平及增加 T 细胞、巨噬细胞的水平有关。

[关键词] 胃癌; 益气健脾化癥方; 5-氟尿嘧啶(5-FU); MFC 细胞; 皮下移植瘤; 髓源性抑制细胞; 免疫细胞

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5; R273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)06-0065-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190521

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181116.1432.001.html>

[网络出版时间] 2018-11-20 11:08

Effect of Yiqi Jianpi Huayu Recipe Combined with 5-FU on Growth and Immune Function of Subcutaneous Transplanted Tumor in MFC Bearing Mice

WANG Min, LIU Shen-lin, WU Jian, WANG Hai-dan, SUN Qing-min, YE Bai*

(Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the effect of Yiqi Jianpi Huayu recipe (YQJPHY) combined with 5-fluorouracil (5-FU) on the growth and immune function of subcutaneous transplanted tumor in MFC tumor bearing 615 mice. **Method:** Twenty-four mice were inoculated subcutaneously to establish the transplanted tumor model of gastric cancer in mice, and then randomly divided into model control group, YQJPHY (20 g·kg⁻¹) group, 5-FU (25 mg·kg⁻¹) group and (YQJPHY + 5-FU) combined group, with 6 rats in each group. After the

[收稿日期] 20180728(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473605, 81704031); 江苏省卫计委青年医学人才项目(QNRC2016641); 江苏省中医院高峰学术人才项目(Y2018RC33)

[第一作者] 王敏, 硕士, 从事脾胃病研究工作, E-mail: 970541512@qq.com

[通信作者] *叶柏, 硕士, 主任中医师, 从事脾胃病研究工作, E-mail: yeb1961@163.com

last administration, the transplanted tumor, spleen and thymus were stripped completely. The tumor inhibition rate, thymus and spleen index were calculated. Flow cytometry was used to determine the content of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and its subtype polykaryotype cells (PMN-MDSC), single karyotype cells (M-MDSC) in both peripheral blood and tumor tissue, and macrophages and their M1 type, M2 type, T lymphocyte, B lymphocyte, and natural killer cells (NK cells) in peripheral blood. Expressions of arginase-1 (Arg-1) and inducible nitric oxide synthesis (iNOS) gene in tumor tissues were detected by Real-time PCR.

Result: Compared with model control group, the weight of mice in YQJPHY group increased, whereas the weight of tumor, the weight of tumor, the index of thymus and spleen decreased in 5-FU group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with 5-FU group, combined group showed gained weight, decreased tumor weight, and increased thymus and spleen index ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with model control group, the total MDSCs content in tumor tissue and peripheral blood of the combined group was decreased, and the PMN-MDSC content in 5-FU group and the combined group were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with 5-FU group, the contents of total MDSCs, PMN-MDSC, M-MDSC in combined group were all decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with model control group, the number of macrophages and their M1 type in YQJPHY group were higher than those in 5-FU group, while the contents of $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ T cell group decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with model control group, gene expressions of iNOS, Arg-1 decreased in all groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with 5-FU group, gene expressions of iNOS, Arg-1 decreased in combined group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** YQJPHY can better inhibit the growth of subcutaneous transplanted tumor when combined with 5-FU, and improve immune status after chemotherapy. The mechanism may be related to the decrease of MDSCs content and the increase of T cell and macrophages content.

[Key words] gastric cancer; Yiqi Jianpi Huayu recipe; 5-fluorouracil (5-FU); MFC cells; subcutaneous transplanted tumor; myeloid-derived suppressor cells; immunocyte

胃癌是我国较常见的一种消化系统恶性肿瘤,也是全球第四大常见恶性肿瘤之一,其发病率在我国所有恶性肿瘤中高居第 2 位,病死率位居第 3 位^[1-2]。当机体免疫功能正常的情况下,肿瘤细胞会受到机体免疫细胞的攻击,如巨噬细胞, T 淋巴细胞, B 淋巴细胞, 自然杀伤细胞 (NK 细胞) 等的活化,可以改善机体免疫状态,从而抑制胃癌的进展,改善患者预后。而肿瘤细胞能通过免疫逃逸和免疫抑制机制来躲避机体的免疫反应。肿瘤患者外周血及肿瘤组织中,小鼠血液、肿瘤组织、脾脏中聚集大量的髓源抑制性细胞 (MDSCs),它是一种具有免疫抑制特性的细胞,能够协助肿瘤细胞实现免疫逃逸,促进肿瘤发生发展^[3]。

中医药对提高患者免疫力、改善生存质量、延长生存期有重要的作用。江苏省中医院著名中医刘沈林教授认为,“脾气虚损”“癥瘕积聚”是胃癌患者生存期的主要病机,运用“健脾益气、消癥散结”理论指导临床用药,并据此创立益气健脾化痰方作为胃癌患者的临床治疗。此方主要由黄芪、党参、三棱、莪术组成。现代药理学研究表明,黄芪及其化学成分可通过改善机体免疫功能、抑制肿瘤细胞的增殖

及转移、辅助抗癌和逆转耐药等发挥抗癌作用^[4]; 党参具有明显的免疫保护作用^[5]。而莪术具有抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移等作用^[6]。三棱及其提取物中具有抗肿瘤、抗血栓、镇痛和抑制血小板聚集等多种药理活性^[7]。5-氟尿嘧啶 (5-FU) 是临床上治疗肿瘤的基础化疗药物,在抑制肿瘤的生长有较肯定的疗效,但其毒副反应大,影响患者预后^[8-9]。有报道指出抗肿瘤中药与化疗药联合使用常常可以缓解临床症状、提高生活质量、提高化疗药物的疗效^[10-11]。前期课题组通过体外实验证实了益气健脾化痰方联合 5-FU 能显著抑制细胞生长。本实验通过体内研究,采用 MFC 荷瘤小鼠皮下移植瘤模型,观察益气健脾化痰方,5-FU 及 2 种联合使用后瘤体生长情况,肿瘤组织及外周血中 MDSCs, 外周血中各免疫细胞的水平比较,以期了解中西医结合治疗对胃癌患者机体免疫功能及预后的改善,为临床治疗肿瘤用药开发和联合用药提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞株与动物 鼠源胃癌 MFC 细胞购自凯基生物公司,编号 KGB5001。SPF 级 615 小鼠 24 只,

体质量(20 ± 2) g, 购自天津血液病研究所, 合格证号 SCXK(津)2015-0001。饲养于南京医科大学动物研究中心(峨嵋岭分部)屏障环境动物房。动物实验的开展取得了南京医科大学实验动物伦理委员会的同意, 伦理编号 IACUC-1703033。

1.2 药物 5-FU 注射液(天津金耀氨基酸有限公司, 批号 118010409); 益气健脾化痰方由炙黄芪 60 g, 炒党参 30 g, 三棱 30 g, 莪术 30 g 组成, 购自江苏省中医院, 所有药物经江苏省中医院曹圆药师鉴定, 均符合 2015 年版《中国药典》的标准, 中药加双蒸水 1 000 mL 文火煎煮 30 min, 再加双蒸水 1 000 mL 继续煎煮, 最后定容到 150 mL, 双层纱布过滤去渣, 生药含量为 1 g·mL⁻¹, 放于 4 °C 冰箱备用。

1.3 试剂 DMEM 培养基, 胎牛血清(以色列 Bioind 公司, 批号分别为 01-052-1ACS, 04-001-1ACS); 胰蛋白酶溶液(碧云天生物技术公司, 批号 C0201); 红细胞裂解液(10 ×, 南京福麦斯生物技术有限公司, 批号 FMS2017091701); PE anti-mouse F4/80, Alexa Fluor 488 anti-mouse CD86(M1 型巨噬细胞标记物 CD86⁺), PE/Cy7 anti-mouse I-A/I-E(MHC II), APC anti-mouse CD49d, APC/Cy7 anti-mouse Gr-1, APC anti-mouse CD49b, PE anti-mouse/human CD45R/B220, APC anti-mouse CD206, CD3-alexa fluor 488(美国 Bio-Legend 公司, 批号分别为 123110, 105017, 107630, 103621, 108424, 108909, 103207, 141708, 100321); CD8-PE-Vio770, CD11b-PerCP-Vio700, CD4-PE-Vio770, FcR blocking reagent(德国 Miltenyi 公司, 批号分别为 130-109-249, 130-109-289, 130-109-416, 130-092-575); 免疫球蛋白(Ig)G₁ Kisotype control(美国 eBioscience 公司, 批号 12-4714-41); CBA human inflammatory cytokine kit(美国 BD 公司, 批号 551811); 逆转录试剂盒(日本 Takara 公司, 批号 RR047A); SYBR green, trizol reagent(美国 ABI 公司, 批号分别为 436759, 15596018)。

1.4 仪器 HERAcell 1501 型 CO₂ 培养箱, 1300A2 型生物安全柜(美国 Thermo 公司); IX51 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司); C6 分析型流式细胞仪(美国 BD 公司); DS-11 型紫外光度仪(美国 DeNoVIX 公司); 7500Fast 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 造模方法^[12], 消化、收集

MFC 细胞, 离心去上清, 用无菌生理盐水洗涤 2 次, 将细胞重悬于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 中。进行细胞计数, 调整细胞密度为 1 × 10⁷ 个/mL, 对小鼠右侧腋下皮肤进行消毒, 皮下注射 MFC 细胞 100 μL。1 周后小鼠腋下可触及明显肿块, 说明荷瘤模型成功建立。随机分为模型组、益气健脾化痰方组, 5-FU 组, 联合(5-FU + 益气健脾化痰方)组, 每组 6 只。按照人和小鼠的换算系数^[13] 换算本实验用药剂量, 前期实验发现益气健脾化痰方给药剂量过大时小鼠生存率低, 剂量过低时抑瘤作用不足, 故本次实验选用 20 g·kg⁻¹。模型组每天 1 次灌胃生理盐水 0.2 mL, 益气健脾化痰方组每日 1 次灌胃 20 g·kg⁻¹ 益气健脾化痰方, 5-FU 组用生理盐水稀释 5-FU 至 25 mg·kg⁻¹, 每 2 d 腹腔注射, 联合组每天 1 次灌胃 20 g·kg⁻¹ 益气健脾化痰方, 隔日腹腔注射 25 mg·kg⁻¹ 5-FU。连续给药 15 d 后, 眼眶取血处死小鼠, 完整剥离皮下移植瘤、脾、胸腺。

2.2 观察指标

2.2.1 皮下移植瘤的生长抑制检测 皮下接种肿瘤细胞悬液后, 观察小鼠体质量变化。处死小鼠剥离肿瘤, 拍照并称质量, 计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = (1 - \text{实验组平均瘤重} / \text{模型组平均瘤重}) \times 100\%$$

2.2.2 脾指数、胸腺指数检测 完整剥离小鼠脾、胸腺, 去除表面血污、脂肪、筋膜等组织, 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗干净后, 分别称量小鼠脾脏、胸腺质量, 计算胸腺指数、脾指数。

$$\text{脾/胸腺指数} (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}) = \text{脾/胸腺质量} (\text{mg}) / \text{小鼠体质量} (\text{g})$$

2.3 流式细胞仪检测肿瘤组织中 MDSCs 水平 小鼠肿瘤剪取小块, 预冷 PBS 冲洗干净, 组织剪碎后过 200 目钢筛研磨, 收集研磨液, 洗 1 次, 重悬于 PBS 3 mL 中。用 Percoll 密度梯度离心法^[14], 先将 80% Percoll 2 mL 加入 15 mL 离心管, 在上面轻轻加 40% Percoll 2 mL, 最后在上面加入细胞悬液 2 mL, 使 3 层之间形成完整的分界面, 称重配平后, 500 × g 离心 25 min, 吸取白色细胞层至 15 mL 离心管中, PBS 洗 1 次, 后用 PBS 调整细胞密度至 1 × 10⁶ 个/mL, 37 °C 孵箱静置 1 h。取 100 μL 加入流式管中, 加相应抗体, 室温避光孵育 15 min, PBS 洗 1 次。用 PBS 300 μL 重悬, 1 h 内通过流式细胞仪检测肿瘤组织中 MDSCs 细胞的水平所占百分比。其中, Gr-1⁺, CD11b⁺ 为 MDSC 细胞群, Gr-1⁺, CD11b⁺, CD49⁺ 为单核细胞样(M-MDSC)群,

Gr-1⁺, CD11b⁺, CD49⁻ 为多形核细胞样 (PMN-MDSC) 群^[15]。

2.4 流式细胞仪检测外周血中免疫细胞水平 细胞外抗体染色,小鼠眼眶取血于抗凝管中。取抗凝血试剂 100 μL 加入每个流式管中,每管加入相应胞外抗体,避光孵育 30 min。每管加入红细胞裂解液裂解 1~2 min。加入 PBS 3 mL 混匀,洗 1 次。洗 2 次后,重悬于 PBS 500 μL 中,避光 4 ℃ 保存。1 h 内上流式细胞仪检测。

胞内抗体染色,小鼠眼眶取血于抗凝管中。取抗凝血 100 μL 加入每个流式管中,每管加入相应胞外抗体,避光孵育 30 min。每管加入 cell fixation & permeabilization kit 中的固定液 A 100 μL,室温避光 15 min。洗 1 次,加入 PBS 100 μL 重悬。每管加入破膜液 B 100 μL,及胞内抗体。吹打混匀后,室温避光 15 min。洗 2 次,加入 PBS 500 μL 重悬。1 h 内通过流式细胞仪检测外周血中各免疫细胞的水平所占百分比。

2.4.1 MDSCs 细胞 在前向散射光 (FSC),侧向散射光 (SSC) 中选中相应细胞群,去除黏细胞后,在该群细胞中,Gr-1⁺, CD11b⁺ 为 MDSC 细胞群。其中 CD49⁻ 为 PMN-MDSC 群,CD49⁺ 为 M-MDSC 群。

2.4.2 巨噬细胞 在 FSC,SSC 中选中单核淋巴细胞群。在该群细胞中,F4/80⁺, CD11b⁺, Gr-1⁻ 为巨噬细胞细胞群,其中 CD206⁺, MHC II⁻ 为 M2 型巨噬细胞,CD86⁺, MHC II⁺ 为 M1 型巨噬细胞。

2.4.3 T 淋巴细胞 在 FSC,SSC 中选中淋巴细胞群。在该群细胞中,CD3⁺ 为 T 淋巴细胞群,其中 CD4⁺ 为辅助性 T 细胞群,CD4⁻ 为细胞毒性 T 细胞群。

2.4.4 B 淋巴细胞 在 FSC,SSC 中选中淋巴细胞群。在该群细胞中,CD3⁻, CD45R (B220)⁺ 为 B 淋巴细胞群。

2.4.5 NK 细胞 在 FSC,SSC 中选中淋巴细胞群。在该群细胞中,CD3⁻, CD49b⁺ 为 NK 细胞群。

2.5 Real-time PCR 检测肿瘤组织中精氨酸酶-1 (Arg-1), 诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) mRNA 表达

于液氮中取冻存的皮下移植瘤瘤块,剪成 0.2 cm³, PBS 洗 2 次,研磨组织,加入 trizol 试剂 1 mL,研磨震荡,静置 5 min;加入三氯甲烷 0.2 mL,混匀,静置 3 min;4 ℃, 1 万 r·min⁻¹ 离心 15 min;取上清液,加入等体积异丙醇,混匀,静置 10 min;4 ℃, 1 万 r·min⁻¹ 离心 10 min;加入 75% 乙醇 1 mL,轻轻混匀,4 ℃, 7 500 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清,

室温晾干;取 RNA 样品 5 μL,加入无酶水 1.5 mL,于紫外分光光度计上测定 260, 280 nm 波长处的吸光度 A,计算纯度及浓度。逆转录合成 cDNA,进行 PCR 反应,PCR 反应条件:94 ℃ 预变性,1 个循环;94 ℃ 5 s,55 ℃ 15 s,72 ℃ 10 s,共 40 个循环;采用 2^{-ΔΔC_t} 计算各组瘤组织中 Arg-1 及 iNOS mRNA 的相对表达量。PCR 引物由 Invitrogen 公司设计合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primer

引物	序列 (5'-3')
iNOS	上游 TGGACCAGTATAAGGCAAGCA
	下游 GCGCAGAACTGAGGGTACAT
Arg1	上游 GCAGAGGTCCAGAAAGAATGG
	下游 GGAGAAAGGACACAGGTTGC
β-肌动蛋白(β-actin)	上游 GCTACAGCTTCACCACCACAG
	下游 GGTCTTTACGGATGTCAACGTC

注:长度均为 20 bp。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件分析,所有结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较运用 *t* 检验,多组间比较运用单因素方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 益气健脾化痰方联合 5-FU 对 MFC 荷瘤小鼠一般状态及体质量的影响 模型组、益气健脾化痰方组小鼠活动度较好,皮毛光泽,粪便正常,进食正常。5-FU 组小鼠活动度较差,皮毛无光泽,粪便稀,进食减少。联合组与 5-FU 组比较,活动度、进食、粪便均有所改善。连续给药 15 d 后称质量,与模型组比较,益气健脾化痰方组小鼠体质量增加,5-FU 组、联合组小鼠体质量下降显著 (*P* < 0.01)。与 5-FU 组比较,益气健脾化痰方组、联合组体质量显著增加 (*P* < 0.01)。见表 2。

3.2 益气健脾化痰方联合 5-FU 对 MFC 荷瘤小鼠瘤体的影响 与模型组比较,益气健脾化痰方组、5-FU 组,联合组瘤重显著降低 (*P* < 0.01)。与 5-FU 组比较,联合组瘤重显著降低 (*P* < 0.01)。见表 2,图 1。

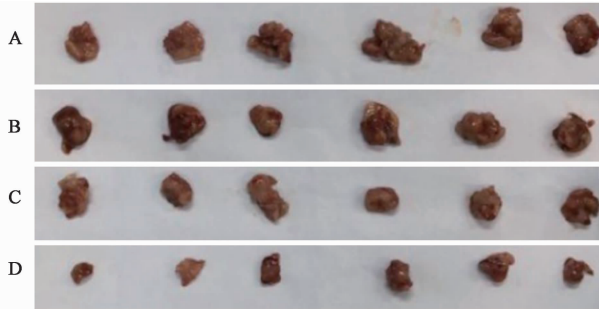
3.3 益气健脾化痰方联合 5-FU 对 MFC 荷瘤小鼠胸腺、脾的影响 与模型组比较,5-FU 组胸腺指数、脾指数均明显下降 (*P* < 0.05, *P* < 0.01);益气健脾化痰方组胸腺指数、脾指数无明显差异。与 5-FU 组比较,益气健脾化痰方组胸腺指数、脾指数均明显

表 2 益气健脾化痰方联合 5-FU 对移植瘤小鼠体重、瘤重、抑瘤率的影响

Table 2 Effect of Yiqi Jianpi Huayu recipe combined with 5-FU on body weight, tumor weight, inhibitory rate of transplanted tumor in mice

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	体质量($\bar{x} \pm s, n=6$)/g		瘤重($\bar{x} \pm s, n=6$)/g	抑瘤率/%
		给药前	给药后		
模型	-	20.00 ± 1.31	23.15 ± 1.68	1.54 ± 0.58	-
益气健脾化痰方	20 000	20.36 ± 1.14	26.13 ± 0.91 ^{1,3)}	1.06 ± 0.52 ^{1,3)}	31.46
5-FU	25	20.59 ± 1.20	16.60 ± 2.19 ¹⁾	0.53 ± 0.61 ¹⁾	65.37
联合	20 000 + 25	21.05 ± 1.37	20.50 ± 1.87 ^{1,3)}	0.33 ± 0.65 ^{1,3)}	78.35

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 5-FU 组比较³⁾ $P < 0.01$ 。



A. 模型组; B. 益气健脾化痰方组; C. 5-FU 组; D. 联合组

图 1 益气健脾化痰方联合 5-FU 对荷瘤小鼠皮下移植瘤生长情况的影响

Fig. 1 Effect of Yiqi Jianpi Huayu recipe combined with 5-FU on growth of subcutaneous transplanted tumor in tumor-bearing mice

升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 联合组胸腺指数、脾指数均明显升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.4 益气健脾化痰方联合 5-FU 对小鼠肿瘤组织中 MDSCs 细胞水平的影响 与模型组比较, 联合组总 MDSCs 水平下降 ($P < 0.05$), 益气健脾化痰方组, 5-FU 组及联合组 PMN-MDSC 水平均显著下降 ($P < 0.01$), 各组 M-MDSC 水平无明显下降; 与 5-FU 组比较, 联合组总 MDSCs 水平下降 ($P < 0.05$), 益气健脾化痰方组、联合组 PMN-MDSC, M-MDSC 水平均

表 4 益气健脾化痰方联合 5-FU 对小鼠肿瘤组织中 MDSC 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Yiqi Jianpi Huayu recipe combined with 5-FU on MDSC content in mice tumor tissue ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	MDSCs	PMN-MDSC	M-MDSC
模型	-	28.90 ± 10.54	6.97 ± 1.44	2.87 ± 1.12
益气健脾化痰方	20 000	15.10 ± 3.22	1.63 ± 0.10 ^{2,4)}	2.39 ± 1.06 ³⁾
5-FU	25	14.73 ± 1.96	0.79 ± 0.17 ²⁾	4.46 ± 0.50
联合	20 000 + 25	9.57 ± 2.55 ^{1,3)}	1.60 ± 0.46 ^{2,3)}	2.13 ± 0.84 ³⁾

3.5.2 巨噬细胞水平 与模型组比较, 益气健脾化痰方组数量巨噬细胞数增加 ($P < 0.05$), 5-FU 组、联合组巨噬细胞数量下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与 5-FU 组比较, 益气健脾化痰方组、联合组巨噬细胞水平显著增高 ($P < 0.01$)。在巨噬细胞中, 分别以

表 3 益气健脾化痰方联合 5-FU 对小鼠胸腺指数、脾指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Yiqi Jianpi Huayu recipe combined with 5-FU on thymus index and spleen index in mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	胸腺指数	脾指数
模型	-	0.11 ± 0.05	0.40 ± 0.08
益气健脾化痰方	20 000	0.08 ± 0.03 ⁴⁾	0.40 ± 0.12 ³⁾
5-FU	25	0.03 ± 0.01 ²⁾	0.19 ± 0.15 ¹⁾
联合	20 000 + 25	0.06 ± 0.03 ³⁾	0.51 ± 0.07 ³⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与 5-FU 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 4~9 同)。

下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

3.5 益气健脾化痰方联合 5-FU 对 MFC 荷瘤小鼠外周血中免疫细胞水平的影响

3.5.1 MDSCs 细胞水平 与模型组比较, 5-FU 组及联合组总 MDSCs 水平均下降 ($P < 0.01$), 益气健脾化痰方组, 5-FU 组及联合组 PMN-MDSC 水平均下降 ($P < 0.01$), 各组 M-MDSC 水平差异无统计学意义; 与 5-FU 组比较, 联合组 PMN-MDSC, M-MDSC 水平下降 ($P < 0.05$)。见表 5。

MHC II 代表 M1 型, CD206 代表 M2 型, 与模型组比较, 益气健脾化痰方组小鼠 M1 细胞水平增高 ($P < 0.05$); 与 5-FU 组比较, 益气健脾化痰方组小鼠 M1 细胞水平增高 ($P < 0.01$)。其余各组小鼠外周血中 M1, M2 型巨噬细胞均无统计学差异。见表 6。

表 5 益气健脾化痰方联合 5-FU 对小鼠外周血中 MDSC 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	MSDCs	PMN-MDSC	M-MDSC
模型	-	22.13 ± 6.88	6.01 ± 2.69	2.96 ± 1.99
益气健脾化痰方	20 000	9.35 ± 4.79	1.50 ± 0.64 ²⁾	1.28 ± 0.66
5-FU	25	5.92 ± 1.92 ²⁾	0.86 ± 0.40 ²⁾	1.98 ± 0.84
联合	20 000 + 25	3.64 ± 3.79 ²⁾	0.10 ± 0.09 ^{2,3)}	0.35 ± 0.25 ³⁾

表 6 益气健脾化痰方联合 5-FU 对小鼠外周血中巨噬细胞及其 M1/M2 型水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	巨噬细胞	M1	M2
模型	-	6.69 ± 1.21	0.78 ± 0.41	0.17 ± 0.15
益气健脾化痰方	20 000	8.22 ± 0.83 ^{1,4)}	1.81 ± 0.10 ^{1,4)}	0.06 ± 0.02
5-FU	25	2.30 ± 0.17 ²⁾	0.38 ± 0.15	0.05 ± 0.06
联合	20 000 + 25	4.97 ± 0.23 ^{1,4)}	0.65 ± 0.24	0.08 ± 0.05

3.5.3 T 细胞, B 细胞, NK 细胞水平 与模型组比较, 5-FU 组 CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T 细胞群均明显下降 ($P < 0.05$), 益气健脾化痰方组 CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T 细胞群数量均明显增高 ($P < 0.05$,

$P < 0.01$)。与 5-FU 组比较, 联合组 CD4⁺, CD8⁺ T 细胞水平均显著增高 ($P < 0.01$)。各组 B 细胞, NK 细胞数量有下降趋势, 但差异均无统计学意义。见表 7, 8。

表 7 益气健脾化痰方联合 5-FU 对小鼠外周血中各 T 细胞水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
模型	-	30.93 ± 2.47	17.13 ± 2.21	14.27 ± 1.24
益气健脾化痰方	20 000	40.50 ± 1.40 ¹⁾	29.17 ± 2.30 ¹⁾	19.07 ± 1.43 ¹⁾
5-FU	25	22.37 ± 2.93 ²⁾	11.75 ± 1.14 ¹⁾	10.47 ± 1.04 ¹⁾
联合	20 000 + 25	29.80 ± 3.61	25.50 ± 2.21 ⁴⁾	19.27 ± 0.68 ⁴⁾

表 8 益气健脾化痰方联合 5-FU 对小鼠外周血中 B 细胞, NK 细胞水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	B 细胞	NK 细胞
模型	-	6.81 ± 1.56	11.97 ± 5.70
益气健脾化痰方	20 000	4.11 ± 1.76	9.54 ± 3.43
5-FU	25	4.39 ± 1.96	8.22 ± 3.74
联合	20 000 + 25	5.42 ± 2.32	10.28 ± 1.87

3.6 益气健脾化痰方联合 5-FU 对 MFC 荷瘤小鼠肿瘤组织中 iNOS, Arg-1 mRNA 表达水平的影响 与模型组比较, 益气健脾化痰方组, 5-FU 组, 联合组的 iNOS, Arg-1 mRNA 表达均显著下降 ($P < 0.01$); 与 5-FU 组比较, 益气健脾化痰方组 Arg-1, 联合组 iNOS, Arg-1 mRNA 表达均显著下降 ($P < 0.01$)。见表 9。

表 9 益气健脾化痰方联合 5-FU 对小鼠肿瘤组织中 iNOS, Arg-1 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	iNOS	Arg-1
模型	-	1	1
益气健脾化痰方	20 000	0.52 ± 0.05 ²⁾	0.43 ± 0.11 ^{2,4)}
5-FU	25	0.42 ± 0.49 ²⁾	0.05 ± 0.01 ²⁾
联合	20 000 + 25	0.18 ± 0.04 ^{2,4)}	0.02 ± 0.00 ^{2,4)}

4 讨论

胃癌属于中医学“癥瘕”“积聚”范畴,《中藏经》记载:“癥瘕由五脏六腑真气失而邪气并逐乃生焉。久之不除也,变为癥瘕。癥者系于气也,瘕者系于血也。”胃癌患者多以气虚、血瘀、癌毒为主,故以健脾益气、消癥散结为治疗胃癌的主要治则。益气健脾化痰方是江苏省中医院刘沈林教授的经验方。

该方以炙黄芪、炒党参益气健脾,补益中焦,以恢复其运化受纳之功;三棱、莪术解毒抗癌,消癥化积。正如张锡纯《医学衷中参西录》所载:“用三棱、莪术以消冲中瘀血,而即用参、芪诸药,以保护气血,则瘀血去而气血不至伤损。且党参、黄芪能补气,得三棱、莪术以流通之,则补而不滞,而元气愈旺。元气既旺,愈能鼓舞三棱、莪术之力以消癥瘕,此其所以效也。”^[16]诸药合用,补中气,养营气,解癌毒,消癥瘕,恢复脾胃受纳与健运之职,共奏健脾益气,消癥散结之功。本实验结果表明,益气健脾化痰方对胃癌有一定的抑制作用,而与 5-FU 联合使用有最佳的抑瘤作用,体现了较好的协同作用。

胸腺和脾脏是机体主要的免疫器官,脾脏和胸腺质量与其功能以及其中免疫细胞数量有关,在一定程度上可以反映机体免疫功能的强弱。因此,可以用胸腺指数、脾指数评价机体免疫功能的强弱^[17]。实验结果表明,5-FU 组在抑瘤效果明显的同时,也有较严重的抑制免疫的作用,而配合益气健脾化痰方则可减轻化疗对小鼠免疫功能的损伤。

肿瘤的发生、发展与肿瘤患者的免疫状况密切相关,细胞免疫在机体的抗肿瘤免疫中起着主导作用^[18]。免疫抑制的肿瘤微环境是肿瘤发生发展的重要促进因素。MDSCs 是一种髓性免疫抑制细胞,肿瘤组织中存在大量的 MDSCs^[19]。MDSCs 在多种肿瘤病理条件下发生增殖,其增殖率与肿瘤恶性程度密切相关^[20]。肿瘤部位被激活的 MDSCs 通过高表达 Arg-1, iNOS 途径抑制 T 淋巴细胞和 NK 细胞的抗肿瘤作用,从而使机体对肿瘤细胞低应答、无应答,促进肿瘤的发生发展^[21]。在人类与小鼠的研究中均发现,MDSCs 有多形核细胞样(PMN-MDSC)和单核细胞样(M-MDSC)2 种类型。MDSCs 在小鼠的表面标志多认为是 Gr-1⁺CD11b⁺,根据抗原表达的不同,可将 MDSC 分为 CD49d⁺MDSC(PMN-MDSC)和 CD49d⁻MDSC(M-MDSC)2 种亚型^[11]。PMN-MDSCs 是一种浸润到肿瘤转移前微环境中的主要细胞类型^[22],M-MDSCs 则是在原发灶中被大量的聚集^[23]。越来越多的研究证实中医药能降低 MDSCs 的免疫抑制,从而达到降低肿瘤免疫逃逸的目的^[24]。本实验结果表明,在外周血中及肿瘤组织中,5-FU,益气健脾化痰方均可降低 MDSCs 的水平,尤其以 PMN-MDSCs 为主,而两者联合使用有更好的降低效果。进一步通过 PCR 检测 Arg-1, iNOS mRNA 表达水平表明,5-FU,益气健脾化痰方能很好地降低 MDSCs 分泌的 Arg-1, iNOS,从而减少其对

T 细胞,NK 细胞抗肿瘤作用的影响,达到提高机体免疫能力的作用。

巨噬细胞是免疫应答过程中重要的免疫细胞,可大致分为两类:抗肿瘤的 M1 型巨噬细胞和促肿瘤的 M2 型巨噬细胞^[25]。本实验结果说明,5-FU 组有减少巨噬细胞的作用,益气健脾化痰方有较好的增加巨噬细胞及 M1 型巨噬细胞的作用,与 5-FU 联合使用,可减轻 5-FU 对巨噬细胞的损伤。

T 淋巴细胞亚群是人体内细胞免疫的重要部分。T 淋巴细胞的数量与功能变化与肿瘤的发生发展高度相关^[26-27]。在对各组小鼠的外周血 T 细胞及 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞进行抗体标记后,检测结果表明,益气健脾化痰方能够提高各类 T 细胞的水平,5-FU 则降低各类 T 细胞水平,而 5-FU 与益气健脾化痰方联合使用后,各类 T 细胞数量均升高。提示 5-FU 与益气健脾化痰方联合使用能够更好地通过增加各类 T 细胞水平而增强机体免疫功能。本次实验检测 NK 细胞,B 淋巴细胞在外周血中的水平均无明显统计学差异。提示益气健脾化痰方可能不是通过升高 NK 细胞,B 淋巴细胞的方式改善机体的免疫能力。

综上所述,益气健脾化痰方能抑制瘤体生长,降低荷瘤小鼠外周血和肿瘤组织中的 MDSCs 水平,增加外周血中巨噬细胞,M1 型巨噬细胞,T 细胞水平。5-FU 能显著缩小肿瘤体积,对瘤体巨噬细胞表型有一定的改善作用,但对外周免疫细胞及脾(胸腺)指数免疫状态无显著改善,甚至有抑制作用。这与临床治疗情况也相吻合。临床使用化疗药物时,在抑制肿瘤细胞生长的同时也杀伤正常细胞,引起各种不良反应,在一定程度上抑制机体免疫,影响患者预后。中药是治疗临床肿瘤患者的重要辅助手段,可通过调节机体免疫功能,有效缓解放化疗过程中产生的免疫抑制等副作用,从而提高疗效、改善患者预后、延长患者生存期,具有肿瘤免疫效应^[28-29]。本实验将 5-FU 与益气健脾化痰方联合使用,充分发挥二者的协同作用,一方面更显著地抑制肿瘤的生长,一方面更好地改善化疗后机体的免疫状态,这与中医学中“扶正祛邪”的思想不谋而合。

本实验通过建立 MFC 荷瘤 615 小鼠皮下移植瘤模型,观察益气健脾化痰方,5-FU 在体内对肿瘤生长、外周血免疫细胞与肿瘤组织中 MDSCs 及相关基因表达的影响,以及两者联合使用对肿瘤生长及机体免疫状态的影响,以期深入了解中药、化疗药及两种联合使用时胃癌患者免疫功能的变化,并为

监测病情发展和治疗提供线索。

[参考文献]

- [1] Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes[J]. *Nat Med*, 2015, 21(5):449-456.
- [2] LI Z, LEI H, LUO M, et al. DNA methylation downregulated mir-10b acts as a tumor suppressor in gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2015, 18(1):43-54.
- [3] Ko J S, Bukowski R M, Fincke J H. Myeloid-derived suppressor cells: a novel therapeutic target [J]. *Curr Oncol Rep*, 2009, 11(2):87-93.
- [4] 邓晓霞,李清宋,陈中,等. 黄芪抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. *中药新药与临床药理*, 2016, 27(2):307-312.
- [5] 孙政华,邵晶,郭玫. 党参化学成分及药理作用研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2015, 43(33):174-176.
- [6] 黄臣虎,陆茵,孙志广,等. 莪术抗癌作用机制研究进展[J]. *中草药*, 2010, 41(10):1745-1747.
- [7] 冯娅茹,张文婷,李二文,等. 三棱化学成分及药理作用研究进展[J]. *中草药*, 2017, 48(22):4804-4818.
- [8] Louvet C, Andre T, Tiguaud J M, et al. Phase II study of oxaliplatin, fluorouracil and folinic acid in locally advanced or metastatic gastric cancer patients [J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(23):4543-4548.
- [9] Frickhofen N, Beck F J, Jung B, et al. Capecitabine can induce acute coronary syndrome similar to 5-fluorouracil [J]. *Ann Oncol*, 2002, 13(5):797-801.
- [10] 李雪青,乔钦增,焦建民,等. 中西医结合治疗中晚期原发性肝癌的临床疗效分析[J]. *中国药物与临床*, 2011, 11(7):820-821.
- [11] 丁照黎. 中西医结合对肿瘤放化疗患者的临床影响观察与分析 [J]. *中国实用医药*, 2011, 6(7):185-186.
- [12] 李惠,沈凯凯. 中药抗肿瘤联合用药研究进展[J]. *上海中医药大学学报*, 2017, 31(3):90-94.
- [13] ZHANG X, DING J, GOU C, et al. Qingchangligan formula attenuates the inflammatory response to protect the liver from acute failure induced by d-galactosamine/lipopolysaccharide in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 201(6):108-116.
- [14] 杨芳,伍非凡,王晓燕,等. Ficoll 和 Percoll 法分离结肠癌相关巨噬细胞的比较[J]. *实用医学杂志*, 2015, 31(9):1394-1398.
- [15] Serafini P, Mgebroff S, Noonan K et al. Myeloid-derived suppressor cells promote cross tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(13):5439-5449.
- [16] 张锡纯. 医学衷中参西录[M]. 太原:山西科学技术出版社, 2009:168.
- [17] 付海尔,李建民,刘玉红. 左归丸对肾虚模型大鼠神经-内分泌-免疫功能的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(22):155-159.
- [18] 俞琦,蔡琨,田维毅. 合欢皮总皂苷对 H22 荷瘤小鼠细胞免疫功能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(15):143-148.
- [19] Ueha S, Shand F, Matsushima K, et al. Myeloid cell population dynamics in healthy and tumor-bearing mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(7):783-788.
- [20] Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment [J]. *Cell*, 2014, 159(6):1312-1326.
- [21] Solito S, Marigo I, Pinton L, et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2014, 1319(1):47-65.
- [22] Sceney J, Chow M T, Chen A, et al. Primary tumor hypoxia recruits CD11b⁺/Ly6C^{med}/Ly6G⁺ immune suppressor cells and compromises NK cell cytotoxicity in the premetastatic niche [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(16):3906-3911.
- [23] Kitamura T, Qian B Z, Soong D, et al. CCL₂-induced chemokine cascade promotes breast cancer metastasis by enhancing retention of metastasis-associated macrophages [J]. *J Cell Biol*, 2015, 209(6):2096-117.
- [24] 郝文斌,相芬芬,刘巧丽,等. 髓源抑制细胞在肿瘤微环境中的研究进展[J]. *免疫学杂志*, 2017, 33(8):729-732.
- [25] 杨继乐,张莉,王莉. 单核-巨噬细胞的分化和功能研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(11):1213-1216.
- [26] CAO Z X, CHEN X P, WU Z D. Changes of immune function in patients with liver cirrhosis after splenectomy combined with resection of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2003, 2(4):562-565.
- [27] Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo V F, et al. Regulatory T cells and human disease [J]. *Clin Dev Immunol*, 2007, doi:10.1155/2007/89195.
- [28] 赵冬耕,孙佳,王明艳,等. 抗癌扶正方对人肝癌细胞 SMMC-7721 PI3K/Akt 信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(11):136-139.
- [29] 谢淮冰,王瑞平,胡守友,等. 健脾疏肝抗毒汤对裸鼠 MDA-MB-231-pAcGFP 异种移植瘤生长及转移能力的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(8):149-153.

[责任编辑 张丰丰]