

扶正抗癌汤免疫调节及抑制大鼠卵巢癌移植瘤生长的作用

田璐, 张新, 张阳*

(辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

[摘要] 目的:探讨扶正抗癌汤(FZKAD)的免疫调节及抑制大鼠卵巢癌移植瘤生长的作用。方法:昆明种小鼠随机分为正常组,香菇多糖($0.05\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组及扶正抗癌汤高、中、低剂量($27.3, 13.65, 6.825\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,每组10只;测定血清半数溶血值(HC_{50}),抗体生成细胞水平及单核巨噬细胞吞噬功能等指标。Fischer 344大鼠右腋窝皮下接种卵巢癌NUTU-19细胞悬液,建立移植瘤模型,并随机分为模型组,顺铂组($0.002\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)及扶正抗癌汤高、中、低剂量($18.9, 9.45, 4.725\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,每组10只;另随机选择10只健康大鼠作为正常组。给药14 d后检测瘤质量,抑瘤率,T淋巴细胞亚群,血清细胞因子表达及肿瘤组织X盒结合蛋白1(XBP1),增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)表达。结果:与正常组比较,扶正抗癌汤高、中、低剂量组小鼠 HC_{50} ,抗体生成细胞水平,吞噬指数和吞噬活性均明显增加($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较,扶正抗癌汤高、中、低剂量组大鼠瘤质量及XBP1蛋白表达显著降低($P<0.01$),而抑瘤率, CD4^+ , CD8^+ T细胞比例, $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$,肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-2(IL-2), γ -干扰素(IFN- γ)表达及CHOP蛋白表达均明显增加($P<0.05, P<0.01$)。结论:扶正抗癌汤具有提高正常小鼠免疫功能的作用,同时,也具有较好抑制大鼠卵巢癌移植瘤生长作用;免疫调节作用是扶正抗癌汤发挥抗卵巢癌作用的主要机制。

[关键词] 扶正抗癌汤; 免疫调节; 卵巢癌; T细胞亚群; 细胞因子

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)10-0038-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202421

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200924.1102.004.html>

[网络出版日期] 2020-9-24 11:28

Effect of Fuzheng Kangai Decoction on Immune Regulation and Inhibition of Tumor Growth in Rats with Ovarian Carcinoma

TIAN Lu, ZHANG Xin, ZHANG Yang*

(Affiliated Hospital, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Fuzheng Kangai decoction (FZKAD) on the immune regulation and the inhibition of tumor growth in rats with ovarian carcinoma. **Method:** Kunming mice were randomly divided into normal group, lentinan ($0.05\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, and high ($27.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium ($13.65\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and low ($6.825\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) dose groups of FZKAD, with 10 mice in each group, serum hemolytic value (HC_{50}), antibody-forming cells and the phagocytosis of mononuclear macrophages were measured. Fischer 344 rat xenograft model was established through inoculation of NUTU-19 cell in the right axilla, and the model rats were randomly divided into model group, cisplatin group ($0.002\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and high ($18.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium ($9.45\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and low ($4.725\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) dose groups of FZKAD, with 10 rats in each group, in addition, 10 healthy rats were randomly selected as the normal group. Tumor quality, tumor inhibition rate, T lymphocyte subsets, and expressions of serum cytokines, enhancer binding protein homologous protein 1 (XBP1) and enhancer binding protein homologous protein (CHOP) protein in tumor tissues were detected after 14 days of administration. **Result:** Compared with normal group, HC_{50} , level of antibody-forming cells, phagocytic index

[收稿日期] 20200722(015)

[基金项目] 辽宁省教育厅科学技术研究项目(L201909)

[第一作者] 田璐,博士,副主任医师,硕士生导师,从事妇科肿瘤的诊疗与治疗研究,E-mail:ingrid_114@163.com

[通信作者] *张阳,博士,主任医师,硕士生导师,从事妇科肿瘤的诊疗与治疗研究,E-mail:zy172888@126.com

and phagocytic activity of mice in high, medium and low-dose groups of FZKAD were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Tumor quality and XBP1 protein expression in high, medium and low-dose groups of FZKAD were significantly decreased ($P < 0.01$) compared with the model group, while the tumor inhibition rate, $CD4^+$, $CD8^+$ T cell ratio, $CD4^+/CD8^+$ ratio, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-2 (IL-2), γ -interferon (IFN- γ) expression and CHOP protein expression were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$).

Conclusion: FZKAD can improve the immune function of normal mice and inhibit the tumor growth in rats with ovarian carcinoma, and the immunity regulation effect is the main mechanism.

[Key words] Fuzheng Kangai decoction (FZKAD); immunity regulation; ovarian carcinoma; T cell subset; cytokines

近年来,卵巢癌作为妇女健康杀手,患病率呈现持续增长趋势,其死亡率在妇科各类肿瘤中高居首位^[1]。目前,以紫杉醇、顺铂等为基础的肿瘤化疗仍然是治疗卵巢癌最为有效的方法^[2-3]。然而,伴随着治疗的持续与深入,常出现耐药问题,严重缩短卵巢癌患者生存年限,影响治疗进程^[4]。因此,寻找有效的、新的卵巢癌治疗策略具有重要意义。在卵巢癌的治疗领域,传统中药由于具有低毒副作用、疗效确切及多途径、多靶点等优势,逐渐引起了人们的关注^[5-6]。传统中医学理论认为“正气内虚”是肿瘤发生的潜在机制,而现代医学则认为肿瘤发生、发展与肿瘤微环境免疫被抑制密切相关^[7]。肿瘤免疫治疗是通过增强和激发机体的免疫功能,抑制肿瘤细胞增殖及生长,从而达到抗肿瘤目的;中医扶正法通过增强机体正气、提高免疫力而发挥治疗肿瘤作用^[8-9]。扶正抗癌汤是广东省中医院吴万垠教授总结多年的临床经验,运用中医的辨证用药并结合现代药理研究,采用培土生金、补益脾肺、化痰祛癖之法而来。扶正抗癌汤由红人参、甘草、白术、浙贝母、半夏、陈皮、枳壳、白花蛇舌草、半枝莲、茯苓、竹茹及生姜等药材组成,现已广泛应用于包括非小细胞肺癌在内的多种肿瘤的治疗,临床疗效较好^[10]。然而,关于扶正抗癌汤对卵巢癌的治疗作用及免疫调节机制的研究未见报道。因此,本研究将主要探讨扶正抗癌汤对大鼠卵巢癌移植瘤生长的抑制作用及免疫调节机制,为其用于卵巢癌的治疗提供实验基础与依据。

1 材料

1.1 细胞与动物 大鼠卵巢癌 NUTU-19 细胞株,购自上海宾穗生物公司,在本实验室传至第3代后使用;清洁级雌性昆明种小鼠,体质量18~22 g;清洁级雌性 Fischer 344 大鼠,体质量130~150 g,购自沈阳茂华生物公司,合格证号 SCXK(辽)2017-0001。本研究获辽宁中医药大学实验动物伦理委员会

审批,按照实验动物使用的3R原则给予人道关怀,批准号21000092018069。

1.2 药物及试剂 扶正抗癌汤(由红人参,甘草,白术,浙贝母,半夏,陈皮,枳壳,白花蛇舌草,半枝莲,茯苓,竹茹,生姜共12味药材组成,为辽宁中医药大学附属医院院内制剂,批号18112202);顺铂(山东齐鲁药业公司,批号180826);胎牛血清,RPMI 1640 培养液(美国 Mediatech 公司,批号分别为20181123,20180512);绵羊红细胞(SRBC,上海源叶生物公司,批号R21900);抗大鼠 $CD4^+$, $CD8^+$ 抗体(美国 eBioscience 公司,批号分别为12-0043-82,11-0081-81);肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-2 (IL-2)及 γ -干扰素 (IFN- γ) 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 试剂盒(北京博奥森生物公司,批号分别为20190102,20181217,20181024);抗大鼠 X 盒结合蛋白1(XBP1),增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab37152, ab11419);抗大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(重庆锐今生物公司,批号YKCP-303-01)。

1.3 仪器 U-T6型紫外-可见分光光度计(上海屹谱仪器公司);3111型 CO_2 培养箱(美国 Thermo 公司);SW-CJ1FD型超净工作台(苏州净化设备公司);DFC259型倒置相差显微镜(德国 Leica 公司);FACSCanto型流式细胞仪(美国 BD 公司);ELX808型多功能酶标仪(美国 BioTek 公司);DYCZ-24EN型蛋白电泳仪,DYCZ-40K型转膜仪(北京六一仪器厂);5200型图像分析仪(上海天能公司)。

2 方法

2.1 血清溶血素及抗体生成细胞产生测定 随机将小鼠分为正常组,香菇多糖($0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组及扶正抗癌汤高、中、低剂量组。依据人与小鼠剂量换算方法^[11],以标准质量/人的体质量 $\times 9.1$ 为扶正抗癌汤高剂量($27.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,在此基础上稀释1倍($13.65 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)为扶正抗癌汤中剂量组,稀释2倍为

扶正抗癌汤低剂量($6.825\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,10只/组。正常组灌胃等体积的生理盐水,其余各组灌胃相应剂量药物,1次/d。给药7 d,腹腔注射20% SRBC 0.2 mL;给药7 d,腹腔注射同样剂量的SRBC进而第2次免疫。在二次免疫后第5天,于末次给药24 h,各组小鼠通过摘眼球法采血, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,分离血清。用生理盐水稀释,加入补体1 mL和SRBC(10%)0.5 mL,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴下放置10 min,立即放入冰水浴中使反应终止, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min。分离上清液,并测定540 nm波长处吸光度 A ,计算血清半数溶血值(HC_{50})。 $\text{HC}_{50}=A_{\text{样品}}/A_{\text{SRBC 半数溶血}}\times\text{稀释倍数}$ 。

颈椎脱臼法处死小鼠,剖取脾脏,匀浆后,用预冷的Gey's液制备小鼠脾细胞悬液。加入1:10的豚鼠血清和20% SRBC各0.5 mL,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴下放置1 h, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min。分离上清液,并测定413 nm波长处 A 。

2.2 单核巨噬细胞吞噬功能测定 采用碳粒廓清实验测定小鼠单核巨噬细胞吞噬功能,分组方法同2.1项。给药周期为14 d,于末次给药24 h后,按 $0.01\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 体质量尾静脉注射用生理盐水稀释10倍的中华墨汁。分别在注射墨汁后的第5,25 min,于小鼠眶后静脉丛采血 $20\ \mu\text{L}$,立即放入 Na_2CO_3 (0.1%)溶液2 mL,充分混匀,测定600 nm波长处 A 。小鼠经颈椎脱臼法处死后,小心剖取脾脏及肝脏,计算吞噬指数(K)和吞噬活性(α), $K=(\lg A_{5\text{ min}}-\lg A_{25\text{ min}})/20$, $\alpha=\text{体质量}/(\text{肝质量}+\text{脾质量})\times\sqrt[3]{K}$,式中 $A_{5\text{ min}}$ 和 $A_{25\text{ min}}$ 分别表示在注射墨汁后的第5 min和第25 min时所取血样 A 。

2.3 体内抗肿瘤实验 卵巢癌NUTU-19细胞培养至对数生长期后调整细胞密度为 2×10^7 个/mL,无菌条件下在Fischer 344大鼠右腋窝皮下接种上述细胞悬液0.2 mL,接种10 d,接种位置处出现 $0.4\text{ cm}\times 0.4\text{ cm}$ 以上的瘤块视为建模成功^[12]。将建模成功的大鼠随机分为模型组,顺铂($0.002\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组及扶正抗癌汤高、中、低剂量组,依据人与大鼠剂量换算方法^[13],以标准质量/人的体质量 $\times 6.3$ 为扶正抗癌汤高剂量($18.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,在此基础上稀释1倍($9.45\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)为扶正抗癌汤中剂量组,稀释2倍为扶正抗癌汤低剂量($4.725\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,10只/组;另随机选择10只健康大鼠作为正常组。顺铂组腹腔注射给药,1次/2 d;扶正抗癌汤组灌胃给药,1次/d;正常组及模型组灌胃等体积的生理盐水,给药周期14 d。末次给药24 h后,腹主动脉采血,分离血清;无菌操

作,剖取肿瘤组织及脾脏。精确称取瘤质量,计算抑瘤率,抑瘤率=(模型组瘤质量-药物组瘤质量)/模型组瘤质量 $\times 100\%$ 。

2.4 T淋巴细胞亚群测定 采用流式细胞术测定T淋巴细胞亚群。取2.3项中各组大鼠脾脏,常规方法制备脾细胞悬液^[14]。在1.5 mL离心管加入上述脾细胞悬液100 μL ,按照试剂盒说明书中的操作步骤,分别加入抗大鼠 CD4^+ 和 CD8^+ 抗体,混匀后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下放置0.5 h。加入磷酸盐缓冲液1 mL, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,弃上清;再加入磷酸盐缓冲液1 mL,上机进行测定,分析 CD4^+ , CD8^+ T细胞,并计算二者比值。

2.5 血清TNF- α , IL-2及IFN- γ 水平测定 采用ELISA测定血清TNF- α , IL-2及IFN- γ 水平。取2.3项中各组大鼠血清,按照试剂盒说明书中的操作步骤,测定血清TNF- α , IL-2及IFN- γ 水平。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定肿瘤组织XBP1, CHOP蛋白表达 取2.3项中各组大鼠肿瘤组织,经RIPA裂解液处理后, $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,分离上清液,二喹啉甲酸(BCA)法测蛋白浓度。经12%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳后,半干法电转至硝酸纤维素(NC)膜上,用5%牛血清白蛋白(BSA)常温封闭1 h。加入抗大鼠XBP1及CHOP抗体(1:1 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置过夜。NC膜经TBST漂洗3次,再加入相应的二抗(1:5 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置1 h。NC膜再经TBST漂洗3次,进行显色,目的蛋白相对表达量用Quantity One软件进行记录并分析。

2.7 统计学分析 采用SPSS 19.0进行数据统计分析,用 $\bar{x}\pm s$ 表示所得数据。单因素方差分析(One-way ANOVA)用于各组间数据比较,SNK- q 法用于两组间数据比较。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对血清溶血素及抗体生成细胞产生的影响 与正常组比较,香菇多糖组及扶正抗癌汤高、中、低剂量组小鼠 HC_{50} 及抗体生成细胞水平均增加($P<0.05$, $P<0.01$),且该作用具有剂量依赖性。见表1。

3.2 对单核巨噬细胞吞噬功能的影响 与正常组比较,香菇多糖及高、中、低剂量扶正抗癌汤均可剂量依赖性的增加吞噬指数和吞噬活性($P<0.05$, $P<0.01$)。见表2。

3.3 对卵巢癌移植瘤大鼠一般状态及肿瘤生长的影响 与正常组比较,卵巢癌NUTU-19细胞皮下注

表1 扶正抗癌汤对血清溶血素及抗体生成细胞产生的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Fuzheng Kangai decoction (FZKAD) on serum hemolysin and antibody-forming cells ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | HC ₅₀ | 抗体生成细胞A |
|-------|-----------------------|----------------------------|-------------------------|
| 正常 | | 155.92±21.79 | 0.24±0.03 |
| 香菇多糖 | 0.05 | 182.80±18.11 ²⁾ | 0.31±0.04 ²⁾ |
| 扶正抗癌汤 | 27.3 | 225.24±25.03 ²⁾ | 0.35±0.05 ²⁾ |
| | 13.65 | 196.12±23.56 ²⁾ | 0.30±0.03 ²⁾ |
| | 6.825 | 178.43±19.27 ¹⁾ | 0.27±0.04 ¹⁾ |

注:与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01(表2同)。

表2 扶正抗癌汤对单核巨噬细胞吞噬功能的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of FZKAD on phagocytosis of mononuclear macrophages ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 吞噬指数 | 吞噬活性 |
|-------|-----------------------|---------------------------|-------------------------|
| 正常 | | 0.012±0.003 | 3.98±0.54 |
| 香菇多糖 | 0.05 | 0.019±0.002 ²⁾ | 5.16±0.79 ²⁾ |
| 扶正抗癌汤 | 27.3 | 0.023±0.004 ²⁾ | 5.54±0.65 ²⁾ |
| | 13.65 | 0.020±0.003 ²⁾ | 4.83±0.53 ²⁾ |
| | 6.825 | 0.015±0.002 ²⁾ | 4.42±0.69 ¹⁾ |

射 Fischer 344 大鼠 3 d, 开始出现饮食情况差、皮毛松散等状态, 且在接种部位出现大小不等的瘤块; 与模型组比较, 顺铂组大鼠饮食情况差、皮毛松散等状态进一步严重, 而扶正抗癌汤各剂量组大鼠饮

表4 扶正抗癌汤对卵巢癌移植瘤大鼠 T 细胞亚群的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of FZKAD on T-cells subset in rats with ovarian carcinoma ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | CD4 ⁺ /% | CD8 ⁺ /% | CD4 ⁺ /CD8 ⁺ |
|-------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| 正常 | | 39.52±4.18 | 20.66±2.75 | 1.91±0.22 |
| 模型 | | 22.30±2.06 ²⁾ | 15.76±2.47 ²⁾ | 1.41±0.12 ²⁾ |
| 顺铂 | 0.002 | 14.96±1.66 ⁴⁾ | 11.33±1.19 ⁴⁾ | 1.32±0.19 ³⁾ |
| 扶正抗癌汤 | 18.9 | 38.07±4.37 ⁴⁾ | 20.58±2.11 ⁴⁾ | 1.85±0.22 ⁴⁾ |
| | 9.45 | 35.48±4.06 ⁴⁾ | 19.36±2.42 ⁴⁾ | 1.83±0.21 ⁴⁾ |
| | 4.725 | 30.51±3.71 ⁴⁾ | 18.15±2.25 ⁴⁾ | 1.79±0.13 ⁴⁾ |

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(表5同)。

3.5 对卵巢癌移植瘤大鼠血清 TNF- α , IL-2 及 IFN- γ 水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血清 TNF- α , IL-2 及 IFN- γ 水平显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 顺铂组大鼠血清 TNF- α , IL-2 及 IFN- γ 水平显著降低 ($P<0.01$), 扶正抗癌汤高、中、低剂量组大鼠血清 TNF- α , IL-2 及 IFN- γ 表达明显增加 ($P<0.05, P<0.01$)。见表 5。

3.6 对卵巢癌移植瘤大鼠 XBP1/CHOP 信号通路的影响 与模型组比较, 顺铂组及扶正抗癌汤高、中、低剂量组大鼠肿瘤组织 XBP1 蛋白表达显著降低,

食情况差、皮毛松散等状态均有不同程度的缓解。与模型组比较, 顺铂组及扶正抗癌汤高、中、低剂量组大鼠瘤质量均显著降低 ($P<0.01$), 抑瘤率显著增加 ($P<0.01$)。见表 3。

表3 扶正抗癌汤对卵巢癌移植瘤大鼠肿瘤生长的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of FZKAD on tumor growth in rats with ovarian carcinoma ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 瘤质量/g | 抑瘤率/% |
|-------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|
| 模型 | | 0.89±0.11 | - |
| 顺铂 | 0.002 | 0.47±0.05 ²⁾ | 47.19±5.19 ²⁾ |
| 扶正抗癌汤 | 18.9 | 0.55±0.06 ²⁾ | 38.20±4.36 ²⁾ |
| | 9.45 | 0.61±0.06 ²⁾ | 31.46±4.52 ²⁾ |
| | 4.725 | 0.68±0.08 ²⁾ | 23.59±3.28 ²⁾ |

注:正常组瘤质量及抑瘤率均为 0;与模型组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01(表6同)。

3.4 对卵巢癌移植瘤大鼠 T 细胞亚群的影响 与正常组比较, 模型组大鼠 CD4⁺, CD8⁺T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺均显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 顺铂组大鼠 CD4⁺, CD8⁺T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺降低 ($P<0.05, P<0.01$), 扶正抗癌汤高、中、低剂量组大鼠 CD4⁺, CD8⁺T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺显著增加 ($P<0.01$)。见表 4。

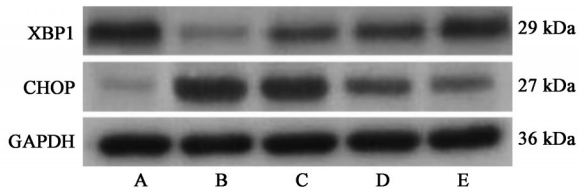
CHOP 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$)。见图 1, 表 6。

4 讨论

扶正抗癌汤中红参、白术、健脾益气扶正培本; 浙贝母、竹茹清热化痰, 散结消肿; 白花蛇舌草、陈皮、枳壳消肿散结理气化痰; 茯苓、半枝莲利水化浊抑癌, 配以生姜化痰散结, 清热解毒; 甘草滋阴生津清热和中, 全方共奏健脾和胃, 益气养阴, 清热解毒, 化痰消瘤之功。血清溶血素和抗体生成细胞水平是反映机体体液免疫功能强弱的重要指标, 单核巨噬细胞能吞噬和消灭自身死亡细胞和外来异物,

表 5 扶正抗癌汤对卵巢癌移植瘤大鼠血清 TNF- α , IL-2 及 IFN- γ 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | TNF- α | IL-2 | IFN- γ |
|-------|-----------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 正常 | | 125.03±14.69 | 142.82±17.70 | 20.38±2.35 |
| 模型 | | 49.22±5.38 ²⁾ | 83.13±8.58 ²⁾ | 13.62±1.66 ²⁾ |
| 顺铂 | 0.002 | 33.16±3.14 ⁴⁾ | 67.31±7.82 ⁴⁾ | 7.16±0.75 ⁴⁾ |
| 扶正抗癌汤 | 18.9 | 102.81±9.07 ⁴⁾ | 113.94±10.49 ⁴⁾ | 18.41±2.63 ⁴⁾ |
| | 9.45 | 78.73±8.15 ⁴⁾ | 96.09±11.62 ⁴⁾ | 17.31±1.82 ⁴⁾ |
| | 4.725 | 65.26±7.52 ⁴⁾ | 92.48±10.70 ³⁾ | 15.34±1.61 ³⁾ |



A. 模型组; B. 顺铂组; C~E. 扶正抗癌汤高、中、低剂量组

图 1 扶正抗癌汤对卵巢癌移植瘤大鼠 XBP1/CHOP 信号通路蛋白电泳

Fig. 1 Electrophoresis of FZKAD on XBP1/CHOP signaling pathway in rats with ovarian carcinoma

表 6 扶正抗癌汤对卵巢癌移植瘤大鼠 XBP1/CHOP 信号通路的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 6 Effect of FZKAD on XBP1/CHOP signaling pathway in rats with ovarian carcinoma ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | XBP1/GAPDH | CHOP/GAPDH |
|-------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| 模型 | | 0.93±0.10 | 0.09±0.02 |
| 顺铂 | 0.002 | 0.12±0.02 ²⁾ | 1.03±0.14 ²⁾ |
| 扶正抗癌汤 | 18.9 | 0.26±0.03 ²⁾ | 0.86±0.08 ²⁾ |
| | 9.45 | 0.49±0.04 ²⁾ | 0.35±0.04 ²⁾ |
| | 4.725 | 0.76±0.08 ²⁾ | 0.27±0.03 ²⁾ |

是一种非特异性免疫细胞^[15]。本研究结果发现,扶正抗癌汤可以增加健康小鼠 HC₅₀, 抗体生成细胞水平、单核巨噬细胞吞噬指数及吞噬活性,表明扶正抗癌汤具有调节正常小鼠免疫功能的作用。通过给予卵巢癌移植瘤大鼠不同剂量的扶正抗癌汤后,发现高、中、低剂量扶正抗癌汤组大鼠瘤质量均显著降低,抑瘤率明显增加,提示扶正抗癌汤具有抑制大鼠卵巢癌移植瘤生长的作用。

T 细胞介导的细胞免疫为机体抗肿瘤免疫的主要机制,成熟的 T 细胞由 CD4⁺和 CD8⁺细胞亚群构成^[16]。CD4⁺T 细胞主要为辅助性 T 细胞,通过分泌 TNF- α , IL-2 和 IFN- γ 等细胞免疫因子发挥抗肿瘤作用; CD8⁺T 细胞受主要组织相容性复合体-I (MHC-I)限制,主要分化为细胞毒性 T 细胞(CTL),

进而直接对肿瘤细胞进行杀伤^[17]。CD4⁺T 细胞与 CD8⁺T 细胞二者数量平衡的稳态,有助于机体维持正常的免疫功能,因而 CD4⁺/CD8⁺是评估免疫功能的重要指标^[18]。本研究结果发现,扶正抗癌汤可以增加卵巢癌移植瘤大鼠 CD4⁺, CD8⁺T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺, 表明扶正抗癌汤能调节 T 淋巴细胞亚群的比例,改善卵巢癌移植瘤大鼠免疫功能,进而发挥抗卵巢癌作用。

TNF- α , IL-2 和 IFN- γ 等具有免疫调节作用的细胞因子,与肿瘤的发生及进展密切相关,除了可以直接参与肿瘤相关的免疫调节活动外,还可以间接反映肿瘤的生长情况^[19]。TNF- α 可以直接杀伤肿瘤细胞,是目前已知的抗肿瘤活性最强的细胞因子^[20]。IL-2 一方面可以调节机体免疫功能,另一方面也具有抑制肿瘤生长的作用^[21]。IFN- γ 也是调节免疫系统的主要细胞因子,具有促进 MHC-I 表达及激活巨噬细胞功能等作用^[22]。本研究结果证实,给予卵巢癌移植瘤大鼠不同剂量的扶正抗癌汤后,血清 TNF- α , IL-2 及 IFN- γ 水平均增加,进一步表明增加细胞免疫因子 TNF- α , IL-2, IFN- γ 水平,改善卵巢癌移植瘤大鼠免疫功能,也是扶正抗癌汤发挥抗卵巢癌作用的潜在机制。

研究证实,肿瘤微环境中存在的多种代谢性应激物可使肿瘤细胞发生内质网应激(ERs),进而调节宿主免疫能力^[23]。因此,影响肿瘤细胞 ERs 为调控肿瘤免疫的重要分子机制。XBP1 是 ERs 的应答因子,能够通过调节脂质代谢影响抗原递呈和树突状细胞功能,抑制 T 细胞抗肿瘤免疫,加快肿瘤进展^[24]。CHOP 为 ERs 凋亡途径被激活的重要标志,其高表达可以影响内质网对蛋白质折叠的修饰功能,导致 DNA 损伤及细胞分裂周期停滞,进而起到抗肿瘤作用^[25]。本研究结果发现,给予卵巢癌移植瘤大鼠不同剂量的扶正抗癌汤后,各组大鼠肿瘤组织 XBP1 表达下降,而 CHOP 表达升高,提示扶正抗

癌汤调节免疫及抑制肿瘤生长的机制可能与调控 XBP1/CHOP 信号通路有关。

综上所述,扶正抗癌汤具有提高正常小鼠免疫功能作用,同时,也具有较好的抑制大鼠卵巢癌移植瘤生长作用;免疫调节作用是扶正抗癌汤发挥抗卵巢癌作用的主要机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] MALLEEN A R, TOWNSEND M K, TWOROGER S. Risk factors for ovarian carcinoma [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2018, 32(6):891-902.

[2] LIU Z, XIAO Y U, NING S, et al. Effect of taxol on the expression of FoxM1 ovarian cancer-associated gene [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(6):4035-4039.

[3] CUI Y, QIN L, TIAN D, et al. ZEB1 promotes chemoresistance to cisplatin in ovarian cancer cells by suppressing SLC3A2 [J]. *Chemotherapy*, 2018, 63(5):262-271.

[4] SANTOS-GUIMARÃES I, LADISLAU-MAGESCKY T, TESSAROLLO N G, et al. Chemosensitizing effects of metformin on cisplatin- and paclitaxel-resistant ovarian cancer cell lines [J]. *Pharmacol Rep*, 2018, 70(3):409-417.

[5] 李梦皎,夏雷. 中药治疗卵巢癌的作用机制研究现状 [J]. *国际中医中药杂志*, 2020, 42(5):501-503.

[6] 杨苏钰,唐德才,曹子丰,等. 黄芪甲苷配伍姜黄素对人卵巢癌 HO-8910 原位移植瘤转移的抑瘤作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(6):155-160.

[7] 杨冰,于桂红,李明雨,等. 基于“补气固表”探究黄芪黄酮组分抑制 C57BL/6 荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫调节机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(23):5184-5190.

[8] 林晓洁,关若丹,司徒红林,等. 中医扶正法预防恶性肿瘤转移的免疫治疗机制 [J]. *中医临床研究*, 2015, 7(24):22-24.

[9] 段腾,田菲,彭馨乐,等. 扶正散结方对非小细胞肺癌的抑瘤作用及对血清 VEGF、TSGF 的调控机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(9):164-168.

[10] 吴姗姗,王柏山,严峰,等. 服用扶正抗癌方前后非小细胞肺癌患者 CD8⁺ T 细胞表达 NKG2D 与其细胞毒活性的相关性分析 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(5):549-554.

[11] 王佳艺,何俊劲,郝静超,等. 多肽 AP25 与多西他赛联合用药对人乳腺癌裸鼠移植瘤的抑制活性研究 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(9):1233-1238.

[12] 李航,杨蝶,刘慧芝. 复方丹参滴丸靶向调节 JAK2/STAT3 途径抑制卵巢癌大鼠的机制研究 [J]. *中华中*

医药学刊, 2019, 37(9):2269-2271, 2319.

[13] 邵乐,夏相宜,王宇红,等. 补阳还五汤精简方对氧化应激损伤血管内皮细胞的保护作用研究 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2019, 39(2):163-167.

[14] 安方玉,颜春鲁,刘永琦,等. 黄芪多糖对镉染毒大鼠免疫功能损伤及氧化应激损伤的保护作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(2):400-403.

[15] 李燕妹,吕峰,许雅楠,等. 石菖功能性低聚糖对小鼠免疫调节与抗氧化活性的影响 [J]. *中国食品学报*, 2018, 18(12):32-38.

[16] OSTROUMOV D, FEKETE-DRIMUSZ N, SABOROWSKI M, et al. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(4):689-713.

[17] 李月雅,张翠翠,魏熙胤,等. 肺癌患者外周血 T-淋巴细胞亚群 NK 细胞的基线数值及其与预后的关系 [J]. *中国肿瘤临床*, 2016, 43(5):204-210.

[18] 姜爽,徐婧瑶,苏鑫,等. 山慈菇多糖的免疫调节作用及对小鼠骨肉瘤细胞 S₁₈₀ 体内生长抑制作用 [J]. *食品科学*, 2018, 39(13):216-221.

[19] 黄争荣,王泳,王榕平,等. 参苓白术散对荷瘤小鼠血清 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 的影响 [J]. *光明中医*, 2010, 25(9):1584-1586.

[20] 李朵,彭耀金,陈阿,等. 白杨素对 TNF- α 诱导慢性暴露 TGF- β 卵巢癌 OVCAR-3 细胞系球形成的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(8):1133-1137.

[21] HU J Q, LEI B W, WEN D, et al. IL-2 enhanced MHC class I expression in papillary thyroid cancer with Hashimoto's thyroiditis overcomes immune escape *in vitro* [J]. *J Cancer*, 2020, 11(14):4250-4260.

[22] 吕品田,孙颖光,刘斌. 败酱草多糖的免疫调节作用及对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠的影响研究 [J]. *中药材*, 2017, 40(1):212-215.

[23] SONG M, CUBILLOS-RUIZ J R. Endoplasmic reticulum stress responses in intratumoral immune cells: implications for cancer immunotherapy [J]. *Trends Immunol*, 2019, 40(2):128-141.

[24] SONG M, SANDOVAL T A, CHAE C S, et al. IRE1 α -XBP1 controls T cell function in ovarian cancer by regulating mitochondrial activity [J]. *Nature*, 2018, 562(7727):423-428.

[25] ZHENG Y Z, CAO Z G, HU X, et al. The endoplasmic reticulum stress markers GRP78 and CHOP predict disease-free survival and responsiveness to chemotherapy in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 145(2):349-358.

[责任编辑 张丰丰]