

- 黄芪甲苷和芍药苷的含量[J]. 湖南中医药大学学报, 2012, 32(5): 39-42.
- [2] 王宗权, 贾继明, 裴彩云. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器法测定不同产地黄芪中黄芪甲苷含量[J]. 中国药业, 2013, 22(19): 10-12.
- [3] 聂颖兰, 范斌, 郭娜, 等. HPLC-ELSD 法测定健脾益肾胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17): 130-132.
- [4] 何德云, 钟元高, 廖海燕, 等. 蒸发光散射测定扶正益胃口服液黄芪甲苷的含量[J]. 解放军药学报, 2013, 29(4): 367-368, 371.
- [5] 游维丽, 张玲. 高效液相色谱法测定芪芍安胃胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 成都中医药大学学报, 2013, 36(2): 32-33.
- [6] 张宗保, 张霄岳, 柳新, 等. 阳春肾舒胶囊制备及淫羊藿苷和黄芪甲苷含量测定[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(9): 61-63.
- [7] 姜辉, 高家荣, 张家富, 等. 超高效液相色谱-蒸发光散射法测定新风胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 安徽中医药大学学报, 2013, 32(5): 75-77.
- [8] 李焕丹, 朱颖虹, 陈晓颖, 等. 玉屏风颗粒剂中黄芪甲苷的含量测定[J]. 广东药学院学报, 1998, 14(1): 7-9.
- (责任编辑: 刘淑婷, 吴凌)

补中益气汤对 A549 荷瘤小鼠脾组织 Fas 蛋白表达的影响

孙志彬¹, 井欢², 李璐璐¹, 王哲², 刘春英²

1. 辽宁中医药大学研究生院, 辽宁 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学基础医学院, 辽宁 沈阳 110847

[摘要] 目的: 研究补中益气汤对 A549 荷瘤小鼠脾组织中 Fas 蛋白表达的影响。方法: 建立 A549 荷瘤小鼠模型进行体内抗肿瘤实验, 采用随机对照法将 30 只 BALB/c 小鼠分为正常组、空白对照组、中药高剂量组、中药低剂量组、西药组, 除正常组外, 余组荷瘤, 成功后, 每天灌胃相应药物 1 次, 连续 10 天后取材。采用免疫组织化学检测脾组织中 Fas 蛋白的表达; 逆转录-多聚酶链式反应 (RT-PCR) 法检测脾组织中 Fas 的 mRNA 表达。结果: 正常组中 Fas 蛋白在细胞膜有表达, 空白对照组出现较多棕黄色颗粒, 与正常组比较, Fas 表达明显升高 ($P < 0.01$); 补中益气汤及顺铂作用后, Fas 蛋白表达减少, 与空白对照组比较, 中药低剂量组、西药组 Fas 表达明显下降 ($P < 0.05$), 中药高剂量组下降最显著 ($P < 0.01$)。中药高剂量组、中药低剂量组、西药组比较, Fas 表达无明显变化 ($P > 0.05$)。与正常组比较, 空白对照组 Fas 的 mRNA 的表达量明显增加 ($P < 0.01$); 经补中益气汤及顺铂作用后, Fas mRNA 的表达减少, 中药高剂量组、中药低剂量组及西药组与空白对照组的差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 而该 3 组的 Fas mRNA 的表达与正常组无明显差异。结论: 补中益气汤可下调 A549 荷瘤小鼠脾脏中 Fas 蛋白的表达, 从而促进机体免疫系统对肺癌细胞的杀伤。

[关键词] 补中益气汤; Fas 蛋白; A549 细胞株; 脾组织

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 02-0227-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.02.106

Effect of *Buzhong Yiqi* Decoction on Fas Protein Expression in Splenic Tissue of A549 Tumor Bearing Mice

SUN Zhibin, JING Huan, LI Lulu, et al

Abstract: **Objective:** To investigate the effect of *Buzhong Yiqi* Decoction on the protein expression of Fas in splenic tissue of A549 tumor bearing mice. **Methods:** Lung cancer A549 mouse model was established for anti-lung cancer experiment. Thirty BALB/c mice were randomly divided into normal group, blank control group and high-dose Chinese medicine (CM) group,

[收稿日期] 2014-10-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81072743); 辽宁省教育厅项目 (L2010355)

[作者简介] 孙志彬 (1981-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药抗肿瘤。

[通讯作者] 井欢, E-mail: huanj99@163.com。

low-dose CM group, and western medicine group. Mice were given corresponding drug by intragastric administration for ten continuous days. Fas protein expression analyzed by immunohistochemistry (IHC), and Fas mRNA content was analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** The protein and expression the content of mRNA of Fas were significantly increased in blank control group ($P < 0.01$ compared with the normal group). Compared with the blank control group, the protein expression of Fas was decreased in low-dose CM group, CM high-dose group and western medicine group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). No statistical significant differences of Fas mRNA expression were found among the medication groups ($P > 0.05$). **Conclusion:** *Buzhong Yiqi* Decoction can promote the immune system to attack the lung cancer cell by decreasing Fas protein expression in splenic tissue of A549 tumor bearing mice.

Keywords: *Buzhong Yiqi* Decoction; Fas protein; A549 cell lines; Spleen

Fas 是体内介导细胞凋亡的糖蛋白分子, 除维持正常生理功能与生存繁殖外, 在恶性肿瘤的发生发展中也有显著意义^[1]。补中益气汤可用于晚期肺癌的患者, 现代药理实验研究表明, 其中成分非常复杂, 可调节免疫功能^[2], 有改善肺部通气, 治疗癌性发热, 缓解癌性疼痛, 调节精神状态等作用^[3]。本实验旨在研究补中益气汤对荷瘤小鼠脾组织免疫分子 Fas 水平的影响, 从分子水平探讨补中益气汤调节机体免疫功能从而达到抗肿瘤效果的机制。

1 材料与方法

1.1 动物与细胞 SPF 级 BALB/c 小鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证编号: scxk(京)2011-0011; 人肺腺癌 A549 细胞株由中国医科院肿瘤医院研究中心细胞库提供。

1.2 仪器与试剂 Fas 抗体购于武汉博士德(批号: 08G02); RIPA 裂解液购于北京鼎国(批号: WB-0071); 荧光定量 PCR 仪购于 ABI 公司。

1.3 药物 顺铂注射液(DDP, 生产批号 2030132DB 山东齐鲁医药公司); 补中益气汤方(黄芪、白术、陈皮、升麻、柴胡、人参、甘草、当归)购于辽宁省中医院。

1.4 制备补中益气汤煎剂 根据《中华人民共和国药典》中规定补中益气汤的用药剂量(处方: 黄芪 18 g, 白术、甘草各 9 g, 陈皮、升麻、柴胡、人参各 6 g, 当归 3 g), 并通过《人和动物之间按体表面积折算的等效剂量比值表》, 计算出小鼠等效剂量, 分设高、低剂量, 即 5.82 g/kg(生药)、1.46 g/kg(生药)常规煎煮, 煎至终浓度为每毫升含生药 2.33 g, 常规煎煮 3 次, 浓缩成 1 kg/L 的补中益气汤煎液, 4℃冰箱保存备用。

1.5 动物分组与处理 BALB/c 小鼠 30 只, 随机分成 5 组, 每组 6 只(雌雄各半)。除正常组外, 其余小鼠均于腋下注射 A549 细胞悬液 0.2 mL(密度为 2×10^8 /L), 5 天后, 观察小鼠腋下有米粒状突起, 开始用药。具体用量为: 正常组: 生理盐水灌胃, 0.5 mL/只, 每天 2 次, 连续 10 天; 空白对照组: 生理盐水灌胃, 0.5 mL/只, 每天 2 次, 连续 10 天; 中药低剂量组: 低剂量补中益气汤灌胃, 0.5 mL/只, 每天 2 次, 连续 10 天; 中药高剂量组: 高剂量补中益气汤灌胃, 0.5 mL/只,

每天 2 次, 连续 10 天; 西药组: 顺铂腹腔注射, 1.38 mg/m², 每天 1 次, 连续 3 天。于第 10 天, 灌胃后 2 h 取材。

1.6 免疫组化测定各组脾组织 Fas 蛋白的表达 组织块石蜡包埋后切片, 常规脱蜡至水, EDTA 抗原热修复(95℃水浴 30 min), 3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶 20 min, 10%山羊血清封闭 20 min, 滴加一抗, 4℃冰箱过夜, 取出后恢复至室温, 二抗作用 30 min, DAB 显色, 自来水冲洗, 苏木素复染, 盐酸酒精分化, 自来水冲洗返蓝, 脱水, 中性树脂封片。结果判定: 以细胞核周围出现棕黄色颗粒为阳性。应用图像分析系统记录各自的平均光密度值, 作为蛋白表达的量化指标。

1.7 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 法测定各组脾组织 Fas 的 mRNA 表达 按照试剂盒说明书采用 Trizol 一步法, 提取总 RNA, 逆转录成 cDNA。Fas 引物序列: 上游引物 5'-GAATG CAAGGGACTGATAGC-3', 下游引物 5'-TGGTTCGTGTGCA AGGCTC-3'; 内参序列: 上游引物 5'-CCAACCGTGAAAAG ATGACC-3', 下游引物 5'-CAGGAGGAGCAATGATCTTG-3'; 25 μL 反应体系, 预变性 94℃ 1 min, 退火 60℃ 1 min, 延伸 72℃ 2 min, 循环 35 次。余按试剂盒说明进行操作, 用反应产物的吸光度与内参的吸光度比值表示该基因表达强度。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 统计学软件进行统计分析, 计量资料采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组 Fas 蛋白表达比较 见表 1。正常组中 Fas 蛋白在细胞膜有表达, 空白对照组出现较多棕黄色颗粒, 与正常组比较, Fas 表达明显升高 ($P < 0.01$); 补中益气汤及顺铂作用后, Fas 蛋白表达减少, 与空白对照组比较, 中药低剂量组、西药组 Fas 表达明显下降 ($P < 0.05$), 中药高剂量组下降最显著 ($P < 0.01$)。中药高剂量组、中药低剂量组、西药组比较, Fas 表达无明显变化 ($P > 0.05$)。

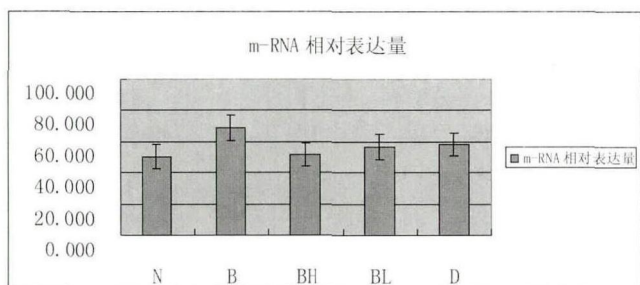
2.2 各组 Fas mRNA 表达比较 见图 1。与正常组比较, 空白对照组 Fas 的 mRNA 的表达量明显增加 ($P < 0.01$); 经补中益气汤及顺铂作用后, Fas mRNA 的表达减少; 中药高剂量组、中药低剂量组及西药组与空白对照组的差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 而该 3 组的 Fas mRNA 的表达与正常组

无明显差异。

表1 各组 Fas 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Fas 蛋白表达(平均光密度值)
正常组	6	0.10±0.039
空白对照组	6	0.20±0.047 ¹
中药高剂量组	6	0.11±0.048 ²
中药低剂量组	6	0.13±0.042 ³
西药组	6	0.14±0.043 ³

与正常组比较, ① $P < 0.05$; 与空白对照组比较, ② $P < 0.01$, ③ $P < 0.05$



N.正常组; B.空白对照组; BH.中药高剂量组; BL.中药低剂量组; D.西药组

图1 各组 Fas mRNA 表达比较

3 讨论

中医学理论认为, 正气内虚, 脏腑失调是肺癌发病的基础。由于正气不足, 邪气趁虚而入, 阻滞胸中, 肺失宣降, 气机不调, 血瘀于络, 且津液疏布不利, 凝结成痰, 痰瘀互结成块。至于晚期, 患者均有不同程度的咳嗽咳痰, 气短乏力, 消瘦, 面色无华等症状, 中医辨证属肺脾气虚, 病位在肺, 治疗当“虚则补其母”, 培土生金, 健脾益气。目前, 临床治疗多以放化疗为主, 取得一定疗效的同时也会对机体的免疫功能造成损伤, 因此提高机体的免疫能力也是治疗过程的关键。有研究证明, 补中益气汤可以上调脾虚小鼠的免疫功能, 主要表现为 T 淋巴细胞增殖能力有明显提高^[4]。

Fas 也称 CD95, Apo-1, 为 I 型跨膜糖蛋白, 属于肿瘤坏死因子(TNF)受体和神经生长因子(NGF)受体超家族成员。在不同组织中表达不同, 具有明显差异性。在机体内, Fas 可以与其配体 FasL 结合, 启动 caspase 的级联反应, 最终使表达

Fas 的细胞内的结构和蛋白降解, 并最终使其凋亡。而恶性肿瘤细胞可以通过上调 Fas 的配体 FasL 的表达, 与肿瘤浸润淋巴细胞(Tumor Infiltrating Lymphocytes, CTL)表面的 Fas 结合进而导致 CTL 凋亡, 该现象被认为是肿瘤细胞进行免疫反攻击从而逃避免疫监视的重要机制。研究发现, 把高表达 FasL 的肿瘤细胞与人 T 细胞共同培养 24 h 后, 发现 T 细胞的凋亡比例明显上升, 证实了上述现象^[5]。而使用 FasL 中和抗体, 通过封闭肿瘤细胞表面的 FasL, 可以使免疫系统得到有效保护^[6]。

基于上述, 笔者对补中益气汤影响 A549 荷瘤小鼠脾组织的 Fas 表达进行了实验观察, 结果发现, 与正常组比较, 对照组小鼠脾组织中的 Fas 表达明显升高, 而高剂量补中益气汤可明显下调荷瘤小鼠脾组织的 Fas 表达; 在基因检测方面, 高剂量补中益气汤下调 Fas mRNA 的作用明显。该研究提示, 补中益气汤有一定的抗肿瘤作用, 该作用可能与下调 T 细胞 Fas 表达, 减少其凋亡有关, 可推广用于晚期肺癌的辅助用药。对于补中益气汤抗肿瘤、提高免疫功能的机制值得进一步进行研究。

[参考文献]

- [1] Le Deist F, Emile JF, Rienx-Lancat F, et al. Clinical, immunological and pathological consequences of Fas deficient conditions [J]. Lancet, 1996, 348: 719.
- [2] 季宇彬. 中药复方化学与药理[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 315-322.
- [3] 李瑞池. 补中益气汤治疗晚期肺癌的体会[J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(3): 343-344.
- [4] 罗晶, 顾红缨, 徐国宪. 补中益气汤对脾虚小鼠免疫功能的调节[J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(17): 2613-2615.
- [5] Zhang W, Ding EX, Wang Q, et al. Fas ligand expression in colon cancer: A possible mechanism of tumor immune privilege [J]. World Journal of Gastroenterology, 2005, 11(23): 3632-3635.
- [6] 向青, 徐波, 徐梅. Fas/FasL 途径介导的人肺癌细胞免疫逃逸[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(1): 168-171.

(责任编辑: 骆欢欢)