

综上所述, 旋复代赭汤通过益气健脾, 调理脾胃气机升降, 降低食管组织 AMPK 含量, 起到调节线粒体能量代谢的作用, 从而改善食管下括约肌的舒缩功能, 减少胃和十二指肠内容物反流的发生, 从而减少炎症因子刺激, 促进食管黏膜损伤的恢复。从线粒体能量代谢的科学角度揭示了旋复代赭汤对 RE 的作用机制之一, 为 RE 新的治疗策略提供理论指导。

[参考文献]

- [1] 中华医学会消化内镜学分会. RE 诊断及治疗指南(2003 年)[J]. 中华消内镜杂志, 2004, 21(4): 221- 222.
- [2] 邹方明. 慢性反流性食管炎大鼠模型的建立及 5-羟色胺 4 受体激动剂的抗食管黏膜炎症作用[D]. 福建: 福建医科大学, 2012.
- [3] 刘友章, 王昌俊, 周俊亮, 等. 长期脾虚模型大鼠细胞线粒体的研究[J]. 中医药学刊, 2006, 24(3): 391.
- [4] Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, et al. The AMP-activated protein kinase α 2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity[J]. J Clin Invest, 2003, 111: 91- 98.

(责任编辑: 刘淑婷)

莪芪抗瘤方对二乙基亚硝胺(DEN)诱导肝癌模型鼠肿瘤微环境调控机制的研究

申秀云¹, 陈曦¹, 赵雁力²

1. 福建中医药大学中医学院, 福建 福州 350122; 2. 福建中医药大学附属第三人民医院, 福建 福州 350122

[摘要] 目的: 研究莪芪抗瘤方对二乙基亚硝胺 (DEN) 诱导肝癌模型鼠肿瘤微环境的调控机制。方法: 建立 DEN 诱导大鼠肝癌模型, 造模 4 周后, 70 只大鼠随机分成 7 组, 空白组, 模型组, 顺铂治疗组, 单纯祛邪中药组, 莪芪抗瘤方组随机分为高、中、低剂量组。每组 10 只。空白组正常喂养, 模型组每日 12.5 mg/kg 体重维持 DEN 摄入量喂养, 莪芪抗瘤方中剂量组、单纯祛邪中药组、顺铂治疗组, 分别以 8 mL/kg 体重剂量灌药; 莪芪抗瘤方高、低剂量组分别以 12 mL/kg 体重、4 mL/kg 体重剂量灌药。16 周实验结束, 测定大鼠血清白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-2 (IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的表达。结果: 莪芪抗瘤方组 IL-1 β 与单纯祛邪中药组、空白组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与顺铂治疗组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 莪芪抗瘤方组 IL-2 与单纯祛邪中药组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 莪芪抗瘤方组 IL-2、TNF- α 与空白组、顺铂治疗组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 莪芪抗瘤方能抑制肝癌大鼠模型血清中 IL-1 β 表达, 抑制肿瘤组织血管的形成和浸润, 促进 IL-2 的分泌, 增强免疫力, 抑制肿瘤的形成, 在肝癌形成过程中具有一定的延缓和保护作用

[关键词] 莪芪抗瘤方; 肝癌; 白细胞介素-1 β (IL-1 β); 白细胞介素-2 (IL-2); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2016) 03-0234-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.03.091

原发性肝癌是危害人类健康的重要恶性肿瘤之一, 全球每年肝癌新发病例数约为 78.25 万人, 居所有恶性肿瘤发病率的第 6 位^[1]。全世界每年新发肝癌约 42% 出现在我国, 肝癌在我国每年发病和死亡人数分别约在 36 万和 35 万, 其发病率是仅次于肺癌排第 2 位的恶性肿瘤。由于肝癌发病率高, 治疗难度大, 死亡率高, 预后差, 故对其防治工作尤为重要。然而针对肝癌的治疗, 至今仍缺少确切有效的药物, 首选仍为手术治疗, 或局部消融治疗、经肝动脉介入治疗、分子靶向药物治

疗、系统化疗、生物治疗等^[2]。由于大部分病人确诊时已为晚期, 病人肝功能和体质较差, 上述方法毒副作用大, 患者很难耐受上述治疗, 故限制了其应用。

中医药在肝癌的药物防治中越来越受到重视。莪芪抗瘤方是临床效验方, 经多年临床实践验证疗效确切。综合前期的研究成果, 通过检测增殖细胞核抗原(PCNA)、抑癌基因(P53)等相关基因蛋白的阳性细胞数, 已揭示莪芪抗瘤方在大鼠诱癌过程中, 具有抑制或延缓肝癌形成的作用^[3]。为进一步探讨该方

[收稿日期] 2015-10-25

[基金项目] 福建省自然科学基金项目 (2012J01395)

[作者简介] 申秀云 (1960-), 女, 教授, 主要从事《内经》病证理论及临床应用研究工作。

在肝癌形成过程中的作用机制,本实验在二乙基亚硝胺(DEN)诱导大鼠肝癌过程中,通过检测各组大鼠间的肿瘤相关细胞因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达,以揭示莪芪抗癌方对肝癌模型鼠肿瘤形成过程中的治疗作用机制。现报道如下。

1 材料与方

1.1 材料 SPF级Wistar大鼠,体重(160 \pm 10)g,共70只,雄性,鼠龄6周,由福建中医药大学实验动物中心提供。DEN 0.95 g/mL(美国sigma公司产品,产品货号:N0756-10 ML, Lot# 049K1613V, PCode:1001789545);顺铂冻干粉,(美国sigma公司产品,产品货号:P4394-25MG, Lot# MKBS6001V, PCode:1001875623);莪芪抗癌方中药颗粒,购自福建中医药大学附属第三人民医院;单纯祛邪中药颗粒,购买自福建中医药大学附属第三人民医院;IL-1 β 放射免疫分析药盒(批号:20150617);IL-2放射免疫分析药盒(批号:1507-0708-0806);TNF- α 放射免疫分析药盒(批号:150620);均购自北京北方生物技术研究所。

1.2 动物模型的制作 自行制作DEN诱导大鼠肝癌模型,取新鲜定量配制100 ppm浓度的DEN水溶液作为大鼠自由饮用水,避光存放,隔日更换,每日维持DEN摄入量约12.5 mg/kg,连续给药16周至实验结束,同时给予标准块状饲料喂养。

1.3 莪芪抗癌方药物的制备 莪芪抗癌方组成:莪术、黄芪各15 g,白术、白花蛇舌草、巴戟天、菟丝子、鳖甲各12 g,青皮9 g(成人量)等组成,制成中药颗粒,使用时蒸馏水溶解,每1 mL约含原生药1 g。

1.4 分组给药 造模4周后,70只大鼠随机分成7组,空白组,模型组,顺铂治疗组,单纯祛邪中药组(莪术15 g、白花蛇舌草12 g),莪芪抗癌方组随机分为高、中、低剂量组。每组10只。空白组正常喂养,模型组每日仍以12.5 mg/kg体重维持DEN摄入量继续喂养,莪芪抗癌方中剂量组、单纯祛邪中药组、顺铂治疗组,分别以8 mL/kg体重剂量灌药;莪芪抗癌方高、低剂量组分别以12 mL/kg体重、4 mL/kg体重剂量灌药,每周6次,直到16周实验结束。

1.5 免疫系统指标检测 造模第16周末,各组实验鼠均进行心脏采血3 mL,4 $^{\circ}$ C离心取血清,将分离后的血清放在-20 $^{\circ}$ C冰箱保存,统一采用放射免疫分析法测定各组IL-1 β 、IL-2、TNF- α 等,操作过程严格按照试剂盒说明进行。

1.6 统计学方法 运用SPSS20.0统计软件分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,行 t 检验;计数资料以率表示,行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 一般情况观察 造模4周后各组大鼠均出现不同程度的体重减轻,食欲不振,活动减少,精神萎靡,竖毛等表现。莪芪抗癌方高、中、低剂量组及单纯祛邪中药组于用药干预后大鼠体重有所回升;顺铂治疗组大鼠消瘦,活动极少,并出现大鼠死亡;模型组大鼠消瘦,活动情况尚可;正常组大鼠生长良

好,未见病态表现。造模10周后模型组、顺铂治疗组大鼠出现不同程度的恐惧,畏声,暴躁,攻击性增加等表现;莪芪抗癌方组、单纯祛邪中药组大鼠情绪相对稳定。造模15周后,由于气候变化,大鼠受到惊吓等因素,个别大鼠出现惊悸,怔忡,反应迟钝,耳部、爪部皮肤色淡白等表现,同时可见心动过速,偶见随心脏搏动出现的点头运动,考虑肝癌导致的血液动力学改变,有效循环血量下降引起大鼠死亡。实验第16周末将大鼠处死。

2.2 肝组织学检查 见图1~4。观察莪芪抗癌方对肝癌发生、肝组织形态改变及大鼠死亡的影响。实验第16周末,模型组10只大鼠除2只死于急性重症肝炎外,余下8只均形成肝癌,可见癌细胞向周围组织和血管大面积浸润,伴有癌灶内出血、坏死等。顺铂治疗组有6只大鼠均形成肝癌,伴有灶内出血、坏死。单纯祛邪中药组有5只大鼠均形成肝癌,病灶面积较大,可见癌细胞向周围组织和血管浸润。莪芪抗癌方组有22只大鼠全部形成肝癌,但癌结节较其余各组数量少,且病灶较小、坏死和出血程度较轻,莪芪抗癌方组给药剂量越大,癌结节就越少。正常组大鼠肝组织细胞形态及排列正常。实验16周末,顺铂治疗组10只大鼠死亡4只,死亡率40%,单纯祛邪中药组10只大鼠死亡5只,死亡率50%,模型组10只大鼠死亡10只,死亡率100%;莪芪抗癌方高、中、低剂量组共30只大鼠死亡8只,死亡率26.7%,正常组大鼠出现恐惧怔忡表现,未出现死亡。

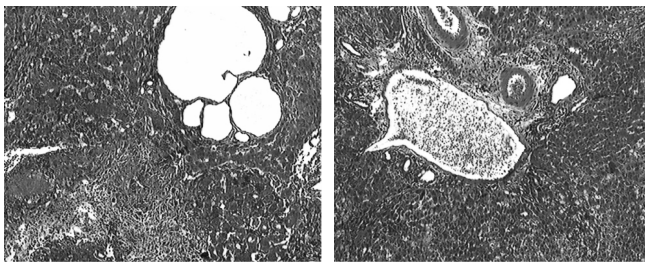


图1 莪芪抗癌方组(光镜 $\times 10$)



图2 顺铂治疗组(光镜 $\times 10$)

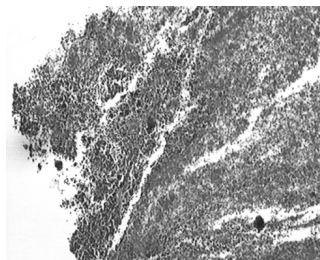


图3 单纯祛邪中药组(光镜 $\times 10$)

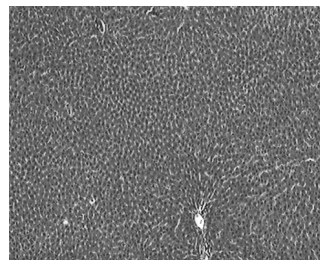


图4 空白组(光镜 $\times 10$)

2.3 各组大鼠血清IL-1 β 、IL-2、TNF- α 变化比较 见表1。莪芪抗癌方组IL-1 β 与单纯祛邪中药组、空白组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);与顺铂治疗组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);莪芪抗癌方组IL-2与单纯祛邪中药组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);莪芪抗癌方组IL-2、TNF- α 与空白组、顺铂治疗组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表1 各组大鼠血清IL-1 β 、IL-2、TNF- α 变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-1 β (ng/mL)	IL-2(ng/mL)	TNF- α (fmol/mL)
顺铂治疗组	6	0.25 \pm 0.01	3.62 \pm 0.56	35.93 \pm 1.09
单纯祛邪中药组	5	0.36 \pm 0.09	1.89 \pm 0.27	34.36 \pm 9.94
莪芪抗癌方组	22	0.23 \pm 0.01 ^{①②③}	4.24 \pm 0.596 ^{①②}	34.99 \pm 6.97 ^②
空白组	6	0.34 \pm 0.08	3.38 \pm 0.34	46.50 \pm 21.64

与单纯祛邪中药组比较, ① $P < 0.05$, 顺铂治疗组比较, ② $P > 0.05$; 与空白组比较, ③ $P < 0.05$

3 讨论

莪芪抗癌方针对原发性肝癌具有虚、瘀、毒的基本病机特点研创, 具有补虚扶正、祛瘀解毒之功。主药莪术活血化瘀, 以消癥瘕癌肿; 黄芪益气健脾, 补虚扶正。经多年临床验证, 防治肝癌疗效确切。在 DEN 诱导大鼠肝癌实验过程中, 中药治疗组大鼠一般情况及精神状态明显好于其余各组, 死亡率明显低于各对照组。在诱癌过程中, 肝癌大鼠模型血清中 IL-1 β 、IL-2、TNF- α 的水平变化提示, 莪芪抗癌方能明显抑制大鼠血清中 IL-1 β 的分泌, 促进 IL-2 的分泌, 能抑制大鼠的诱癌过程, 在大鼠肝癌形成过程中确有一定延缓和保护作用。

IL-1 β 是一种重要的免疫调节因子, 研究发现 IL-1 β 是肿瘤组织血管形成和浸润的重要因素。同时 IL-1 β 基因多态性与乙型肝炎病毒感染导致的肝细胞癌有关 IL-2 通过增加细胞毒 T 细胞活性、促进 NK 细胞增殖并产生干扰素、促进 B 细胞产生免疫球蛋白而发挥抗肿瘤作用。研究显示肝癌及肝硬化患者血清 IL-2 水平较慢性乙型肝炎患者及正常人明显降低, 因而了解肝癌患者 IL-2 水平对判断病情及预后是非常重要的。TNF- α 是一种具有直接抗肿瘤作用的细胞因子, 主要参与抗感染、免疫调节与直接调节单核细胞的成熟及增强其活性, 在机体的免疫防御系统中起重要作用^[4]。顾星等^[5]研究表明, 肝细胞恶性转化于 TNF- α 和 NF- κ B 具有明显相关性。研究结果显示, 莪芪抗癌方在 DEN 诱导大鼠肝癌形成和发展的过程中, IL-1 β 水平明显低于各对照组, IL-2 水平明显高于其余各对照组, TNF- α 水平与其余各组未见明显差异, 说明莪芪抗癌方在 DEN 诱导的大鼠肝癌形成和发展过程中的延缓和保护作用, 可能与其抑制 IL-1 β 的表达, 抑制肿瘤组织血管的形成和浸润, 同时促进 IL-2 分泌, 增强免疫功能, 直接杀伤肿瘤细胞, 抑制肿瘤的形成和转移有密切关系。

大量实践证明, 肝癌是中医药治疗效果较好的肿瘤之一。中药及其复方能促进多种细胞分泌细胞因子, 进而促进免疫活性细胞的生长、分化、活化, 发挥免疫监视效应。随着对肝癌认识的不断深入, 中医药治疗肝癌的作用越发突显, 在肝癌治疗过程中, 中医药学在中医理论的指导下, 采用辨证论治、扶正祛邪兼顾的方法治疗肝癌, 扶正可提升机体的免疫力, 祛邪可杀灭肿瘤细胞; 与此同时, 亦减轻了各种治疗手段如化疗药物的毒副作用, 从而减轻了患者的痛苦, 提高了患者的生存质

量和时间。另据文献记载, 中医不同治法对癌基因表达水平存在差异, 活血化瘀类中药, 能够抑制血管内皮生长因子, 同时造成抑制肿瘤细胞凋亡的 Bcl-2 表达下降, 从而降低了肿瘤的生长时间与其发生转移的概率^[6]。益气活血化瘀法通过对 TGF- β ₁^[7]及 Smad4 的表达水平的调节^[8], 可对肝癌的生成产生抑制作用, 同时对癌前病变具有一定的修复作用。健脾益气法对肝癌的治疗是多方位的, 其可以下调 TGF- β ₁ 诱导的肿瘤的上皮-间质转化过程, 抑制肝癌细胞的快速生长、浸润和转移, 同时可以下调 Gq 蛋白激活的花生四烯酸-HETEs 代谢通路, 促进肝癌细胞凋亡, 对肝癌的生成和凋亡具有重要作用^[9]。实验表明, 不同中医治法干预治疗肝癌的靶点不同, 这可能成为揭示中医辨证论治的一个途径。由此可见, 中医学的整体观与现代综合治疗肿瘤的观点相一致, 今后应在不同中药处方之间进行比较研究, 从中找出差异, 筛选出治疗肝癌的最佳中药组方, 为今后重要的研究方向之一。

[参考文献]

- [1] 陈建国, 朱健, 张永辉, 等. 肝癌流行趋势的改变: 基于启东 40 年癌症登记资料的分析[J]. 中国肿瘤, 2014, 23(8): 621-628.
- [2] 陈建国, 陈万青, 张思维. 中国 2003-2007 年肝癌发病率与死亡率分析[J]. 中华流行病学杂志, 2012, 33(6): 547-553.
- [3] 申秀云, 吴童, 赵雁力. 莪芪抗癌方对二乙基亚硝胺诱导大鼠肝癌过程中相关蛋白的影响[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(4): 523-526.
- [4] 阿地里江·阿布力米提, 雅森·米吉提, 热孜万古丽·艾合买提, 等. 白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 在肝癌大鼠模型肝硬化期的变化[J]. 新疆医科大学学报, 2011, 34(12): 1359-1361, 1365.
- [5] 顾星, 姚敏, 王司晔, 等. 肿瘤坏死因子 α / 核因子- κ B 信号通路活化干预对肝癌细胞增殖的抑制作用[J]. 中华肝脏病杂志, 2014, 22(6): 434-439.
- [6] 冯兵, 朱莹, 贺嵩敏, 等. 中药罗勒胶囊对大鼠移植性肝癌 TACE 后 VEGF 和 Bcl-2 表达的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(2): 146-150.
- [7] 王海强, 谢晶日, 刘朝霞, 等. 益气活血化瘀法对肝癌前病变大鼠 TGF- β ₁ 影响的实验研究[J]. 中医药学报, 2013, 41(1): 18-19.
- [8] 谢晶日, 王海强, 刘朝霞, 等. 益气活血化瘀法对肝癌前病变大鼠 Smad4 影响的实验研究[J]. 中医药学报, 2013, 41(2): 20-21.
- [9] 卓少元, 方肇勤, 管冬元, 等. 健脾益气法对 DEN 大鼠肝癌后基因组转录调控的生物信息学分析[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(7): 1765-1768.

(责任编辑: 马力)