

实验研究

加味良附丸联合 5-FU 对荷人胃癌裸鼠血清
TGF- β 1、IL-17 水平的影响赵林涛¹ 宋延平¹ 侯 丽² 陈信义² 吴晓勇³

(1 陕西省中医药研究院药理研究室,西安,710003; 2 北京中医药大学东直门医院肿瘤血液科,北京,100700;

3 贵阳中医学院第一附属医院苗医药科,贵阳,550001)

摘要 目的:观察加味良附丸联合 5-FU 对荷人胃癌裸鼠血清 TGF- β 1、IL-17 水平的影响。方法:60 只裸鼠造模成功后随机分为模型组、5-FU 组、加味良附丸中剂量 + 5-FU 组(联合给药组)及加味良附丸高、中、低剂量组。加味良附丸高、中、低剂量组给药剂量分别为 10 g/(d·kg)、5 g/(d·kg)、2.5 g/(d·kg);5-FU 组给药剂量为 17 mg/(d·kg);模型组给予等体积生理盐水,联合给药组剂量为加味良附丸中剂量 5 g/(d·kg)联合应用 5-FU(17 mg/(d·kg))。连续给药 10 d,眼球取血,ELISA 法检测血清 TGF- β 1、IL-17 含量。结果:联合给药组、5-FU 组、加味良附丸高、中、低剂量组裸鼠血清中 TGF- β 1、IL-17 含量明显低于模型组($P < 0.01$);联合给药组血清 TGF- β 1 含量与新加良附丸剂量组、5-FU 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),与加味良附丸中、小剂量组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);各给药干预组血清 IL-17 含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:炎性反应细胞因子 TGF- β 1、IL-17 可能参与了胃癌发生发展,加味良附丸联合 5-FU 具有抑制人胃癌细胞 SGC-7901 移植瘤裸鼠血清中炎性反应细胞因子 TGF- β 1、IL-17 的表达,其可能通过调节炎性反应细胞因子的表达来影响胃癌的发生与发展。

关键词 加味良附丸;胃肿瘤;SGC-7901;炎性反应细胞因子

**Effects of Modified Liang-Fu Pill Combined with 5-FU on TGF- β 1 Level in Serum
of SGC-7901 Tumor-bearing Nude Mice**

Zhao Lintao¹, Song Yanping¹, Hou Li², Chen Xinyi², Wu Xiaoyong³

(1 Pharmacology Laboratory, Shaanxi province Pharmacological Institute of Traditional Chinese medicine, Xi'an 710003, China; 2 Department of Hematology and Oncology, Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 3 Miao medicine Department, The First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China)

Abstract Objective: To observe the effects of Supplemented Liang-fu Pill(SLFP) combined with 5-FU on TGF- β 1、IL-17 level in serum of SGC-7901 tumor bearing nude mice. **Methods:** The tumor-bearing nude mice models with human gastric cancer cell line SGC-7901 were established and randomly divided into six groups: model group, 5-FU group, combination group and SLFP in high, medium, low dose groups. The dosage of SLFP in high, medium, low dose groups were 10 g·d⁻¹·kg⁻¹, 5 g·d⁻¹·kg⁻¹, 2.5 g·d⁻¹·kg⁻¹ respectively. The 5-FU group's dosage is 17 mg·d⁻¹·kg⁻¹, the model group were given equal normal saline and the combination group were given Supplemented Liang-Fu Pill (5 g·d⁻¹·kg⁻¹) and 5-FU (17 mg·d⁻¹·kg⁻¹). The mice were treated for 10 days and then detected for the level of TGF- β 1 and IL-17 in serum of SGC-7901 tumor bearing nude mice with the method of ELISA. **Results:** The levels of TGF- β 1 and IL-17 in 5-FU group, combination group, SLFP in high, medium, low dose groups were significantly lower than those in model group ($P < 0.01$). The levels of serum TGF- β 1 in the combination group was not significantly different compared with that of SLFP in high dose group and the 5-FU group ($P < 0.05$). But there was significant different compared with SLFP in high, medium and dose groups. There were no significant difference of the levels of serum IL-17 in each group($P > 0.05$). **Conclusion:** Inflammatory cytokine TGF- β 1, IL-17 may result in gastric cancer. The SLFP combined with 5-FU maybe inhibit the expression of TGF- β 1 and IL-17 in the serum of human gastric cancer cell SGC-

基金项目:贵州省科技厅基金项目(编号:黔科合 J 字[2011]2296 号);贵州省科学技术厅、贵阳中医学院科学技术联合基金(编号:黔科合中药字[2010]LKZ7034);2010 年贵阳中医学院博士启动基金;北京中医药大学科学科研基地建设项目,北京市重点实验室(中医内科学)(编号:2011-JDJS-02)

作者简介:赵林涛(1983.08—),男,硕士,助理研究员,研究方向:中药抗肿瘤新药研究,E-mail:75959634@qq.com

通信作者:吴晓勇(1979.02—),男,医学博士,副教授,研究方向:中医药防治肿瘤临床及实验研究,E-mail:xyongwu79@163.com

7901 tumor bearing nude mice, which may affect the growth of gastric cancer by regulating the expression of inflammatory cytokines.

Key Words Supplemented Liang-Fu Pill; Gastric cancer; SGC-7901; Inflammatory cytokines

中图分类号:R289.3 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.07.040

胃癌(Gastric Cancer,GC)是全球最常见的恶性肿瘤之一^[1],在国内其发病率居第2位、死亡率居第3位,而农村地区胃癌发病率与死亡率均居前2位^[2],严重危害人民健康。长期临床实践表明“寒凝气滞血瘀”是胃癌发生以及发展过程中的重要病机,本团队针对性拟定的加味良附丸在胃癌的治疗中疗效明确。既往临床和基础研究结果,表明该方具有抗肿瘤作用,其具体机制包括诱导胃癌细胞凋亡、抗胃癌新生血管生成等多种机制^[3-5]。有研究表明肿瘤微环境中存在大量炎症反应细胞因子,TGF-β、IL-17是其中之一,其在肿瘤发生发展、侵袭转移过程中发挥重要作用^[6-7],但其在胃癌中的发病尚不完全清楚。本研究通过动物实验,运用ELISA方法检测人胃癌细胞SGC-7901移植瘤裸鼠血清炎症反应细胞因子TGF-β1、IL-17的表达,旨在探讨TGF-β1、IL-17在胃癌发生发展过程中的作用及加味良附丸治疗胃癌的作用机制。

1 资料与方法

1.1 实验材料 1)细胞株:人胃癌细胞SGC-7901株购于第四军医大学。2)实验动物:Balb/C裸鼠,4~5周,60只,雌雄各半,购于第四军医大学实验动物中心,许可证号:SCXK(沪)2012-0002,合格证号:20070005441312,在第四军医大学动物实验中心饲养。3)实验药物:加味良附丸(浸膏或干燥原粉):陕西星华制药有限公司提供(按照中药新药制备工艺制备);5-FU,上海旭东海普药业有限公司,批号:110608。4)仪器:超净工作台SW-CJ-IF(BIOLOGICAL公司);CO₂恒温培养箱(SHELDON公司);TDZ4AWS台式低速自动平衡离心机;低温冰箱(SANYO公司)。酶标仪(美国伯乐)。5)试剂:1640培养液(Gibco公司);小牛血清(杭州四季青公司)。TGF-B1、IL-17 ELISA试剂盒(苏州卡尔文生物科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型建立及分组 液氮中取出SGC-7901细胞,37℃水浴,加入10%小牛血清的RP-MI1640培养液,37℃、5% CO₂条件下培养传代,待细胞长满单层后0.25%胰酶消化,1 000 r/min离心5 min,去上清收集细胞,PBS稀释后镜下调整细胞

悬液浓度至1×10⁷个/mL,取0.2 mL接种于裸鼠颈背部,待肿瘤长至1 000 mm³时移植。接种裸鼠肿瘤体积约在100~300 mm³之间时,据瘤体体积、性别按照随机数字表法随机分为模型组、5-FU组、加味良附大、中、小剂量组、加味良附中剂量+5-FU组(联合给药组)6组,10只/组。

1.2.2 给药方法 模型组:0.9% NS 0.2 mL/10 g灌胃;5-FU组:17 mg/(d·kg)灌胃,2次/周。加味良附丸大、中、小剂量组分别按10 g/(d·kg)、5 g/(d·kg)、2.5 g/(d·kg)灌胃,分别相当于成人用药剂量的20倍、10倍、5倍。联合给药组:加味良附中剂量与5-FU剂量同上。给药10 d。

1.3 ELISA法检测血清TGF-β1、IL-17 给药第10天后,裸鼠眼球取血1 mL,3 000 r/min离心10 min后取血清冻存,ELISA检测血清TGF-β1、IL-17的表达水平,严格按照试剂盒说明书由专人操作。

1.4 统计学方法 实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

联合给药组、5-FU组、加味良附丸高、中、低剂量组裸鼠血清中TGF-β1、IL-17含量明显低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.01$);联合给药组血清TGF-β1含量与加味良附丸高剂量组、5-FU组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),与加良附丸中、小剂量组比,差异有统计学意义($P < 0.05$);各给药干预组血清IL-17含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 各组裸鼠血清TGF-β1、IL-17含量($\bar{x} \pm s$)		
组别	TGF-β1 (ng/mL)	IL-17 (ng/mL)
模型组	9.35 ± 1.02	6.44 ± 0.85
联合给药组	7.63 ± 0.54 ^{△▲}	2.51 ± 0.47 [*]
5-FU组	7.70 ± 0.89 ^{△▲}	2.46 ± 0.83 [*]
加味良附高剂量组	8.02 ± 1.88	2.64 ± 0.54 [*]
加味良附中剂量组	8.93 ± 0.51	2.46 ± 0.40 [*]
加味良附低剂量组	8.86 ± 0.53	2.95 ± 0.73 [*]

注:与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,[△] $P < 0.05$;与加良附丸中、小剂量组比,[▲] $P < 0.05$ 。

3 讨论

TGF-β是一个具有免疫抑制功能的多功能细胞

因子,在肿瘤微环境中,TGF- β 主要由肿瘤细胞和间质细胞分泌,TGF- β 与受体 T β RII 结合后启动经典 Smad 和非 Smad 信号通路,参与肿瘤的生长、血管生成、转移和侵袭等多个进程^[8]。TGF- β 对肿瘤的作用具有双向性,在肿瘤发生早期阶段,TGF- β 是一种有效的肿瘤抑制剂,而对于已形成的肿瘤,TGF- β 则促进肿瘤的生长和转移^[6-7]。TGF- β 1 是 TGF- β 超家族主要成员之一,是目前已知和肿瘤关系最为密切的细胞因子之一^[6]。彭素芳等^[9]研究提示胃癌患者血浆中 TGF- β 水平明显高于健康对照组,中晚期胃癌血浆中 TGF- β 水平明显高于早期胃癌,提示监测胃癌患者外周血相关细胞因子水平,有助于对病程的判断。孟欣颖等^[10]研究发现胃癌组织中 IL-17、IL-6 和 TGF- β 1 阳性表达明显高于对照组,且与临床分期、淋巴结转移相关。沈卫东等^[11]的研究中,胃癌组织中 TGF- β 1 蛋白表达的阳性率为 77.8%,mRNA 表达的阳性率为 88.9%,均明显高于正常对照组,并发现其与与肿瘤病理分级、淋巴结转移、浸润深度、脉管浸润有相关性,已发生淋巴结转移或浸润已达到浆膜层的组织、有脉浸润的组织 TGF- β 1 表达高。Yuan 等^[12]研究发现胃癌患者血清中 TGF- β 1 水平明显上调,且胃癌晚期患者血清中 TGF- β 1 水平高于早期胃癌患者,并且胃癌淋巴结转移时,血清中 TGF- β 1 水平与病情严重程度呈正相关关系。以上研究均提示 TGF- β 1 在胃癌的发生发展中可能起促进作用。

Th17 细胞是不同于 Th1 和 Th2 细胞的 CD + 4T 细胞亚群,其分化发育过程中受到包括自身分泌的细胞因子在内的多种细胞因子的调节。TGF- β 和 IL-6 是 Th17 的分化的启动因子,IL-6 通过活化 STAT3 抑制 Foxp3 的表达并阻止其与 ROR γ t 的相互作用,促进 Th17 分化^[13]。Th17 细胞可特异地产生 IL-17 效应因子^[14],是一种促炎性细胞因子。IL-17 可以通过促进血管形成、促进肿瘤细胞增殖、抑制凋亡促进肿瘤生长以及调控肿瘤的免疫应答等多种途径促进肿瘤发生与发展^[15],其在乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、胃癌、肺癌等多种肿瘤组织中表达均显著升高。有研究发现 Th17 细胞及其功能性细胞因子 IL-17 在胃癌组织及血清中的浓度也明显增高,且与胃癌的进展相关^[16-19]。Zeng 等^[20]对实体瘤中 IL-17 表达进行 meta 分析显示,实体瘤组织中 IL-17 的高表达与较低的无病生存率 (DFS) 密切相关,高表达 IL-17 的胃癌患者总生存率 (OS) 和 DFS 较差。Jiang 等^[21]研究发现在胃癌患者肿瘤组织中 IL-

17RA 的表达显著高于正常组织,并且与肿瘤的进展、淋巴结的侵袭、肿瘤远处转移、临床肿瘤分期等密切相关,认为可以作为判断预后的一个独立因素。动物实验研究表明,IL-17R 敲除小鼠和 IL-17/IFN- γ 双敲小鼠抑制肿瘤生长,而在 IL-17 敲除小鼠中肿瘤的生长速度显著加快,提示 IL-17 具有促进或抑制肿瘤的效应^[22-23]。

本实验研究发现人胃癌细胞 SGC-7901 移植瘤裸鼠血清中 TGF- β 1、IL-17 的含量明显高于各给药组,经药物干预后,联合给药组、5-FU 组、加味良附丸高、中、低剂量组裸鼠血清中 TGF- β 1、IL-17 含量明显低于模型组,推测炎症反应细胞因子 TGF- β 1、IL-17 可能参与了胃癌发生与发展。联合给药组移植瘤裸鼠血清 TGF- β 1 含量与加味良附丸高剂量组、5-FU 组比差异不显著无统计学意义,但加味良附丸和 5-FU 联合用药对 TGF- β 1 的抑制优于单独用药,与加味良附丸中、小剂量组比,差异显著;各给药干预组移植瘤裸鼠血清中 IL-17 含量无显著性差异。本研究显示,加味良附丸联合 5-FU 具有协同作用,具有抑制人胃癌细胞 SGC-7901 移植瘤裸鼠血清中炎症反应细胞因子 TGF- β 1、IL-17 的表达,其可能通过调节炎症反应细胞因子的表达来影响胃癌的发生与发展。尽管炎症反应细胞因子在胃癌发生发展中起一定的作用,但细胞因子一个复杂的网络系统,仅依赖于 TGF- β 1、IL-17 这个细胞因子来评价加味良附丸治疗胃癌的效应机制是不够的,有待进一步深入研究炎症反应细胞因子在胃癌中作用机制,为胃癌的防治策略提供帮助。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (1): 5-29.
- [2] 陈万青, 张思维, 郑荣寿, 等. 中国 2009 年恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中国肿瘤, 2013, 22 (1): 2-12.
- [3] 侯丽, 许晶, 王婧, 等. 新加良附方联合 5-FU 对荷人胃癌裸鼠血清 VEGF、bFGF 水平的影响 [J]. 世界中医药, 2014, 9 (12): 1636-1639.
- [4] 许晶, 侯丽, 武苗, 等. 新加良附方联合 5-FU 对裸鼠胃癌移植瘤 Bax/Bcl-2 表达的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2013, 8 (7): 675-678.
- [5] 侯丽, 许晶, 赵林涛, 等. 新加良附方联合 5-FU 对裸鼠胃癌移植瘤 Fas/FasL 表达的影 [A]. 第一届青年中西医结合肿瘤学术论坛论文集 [C]. 重庆, 2015: 40-49.
- [6] 尚颖, 赵立元, 陆景坤. 炎症细胞因子与胃癌的关系 [J]. 中国药科大学学报, 2015, 46 (1): 123-128.
- [7] 马守宝, 林丹丹, 刘海燕. 炎症细胞因子在肿瘤微环境中的作用及其作为治疗靶点的研究进展 [J]. 生命科学, 2016, 28 (2): 182-191.

(下接第 1310 页)

示,大剂量稳心汤对实验研究的小鼠肝脏和肾脏没有显著影响。综上可知,稳心汤具有较好的安全性,这进一步为临床运用稳心汤治疗冠心病介入术后阳虚血瘀证提供了重要的临床与实验研究基础,为揭示中医学方证对应的科学内涵提供依据^[15]。

参考文献

- [1]段练,熊兴江,王阶. 冠心病的治疗性血管新生与活血化瘀[J]. 中国中西医结合杂志,2013,33(11):1561-1566.
- [2]王阶,李敏,刘咏梅,等. miRNA 在冠心病治疗中的作用及与中药的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(22):1-5.
- [3]褚福永,王阶,孙晓伟,等. 血府逐瘀胶囊改善不稳定型心绞痛介入术后血瘀证患者近期生活质量的随机双盲对照试验[J]. 中西医结合学报,2009,7(8):729-735.
- [4]褚福永,王阶,邢雁伟,等. 论证候动态演变规律的复杂性及研究思路[J]. 中医杂志,2009,50(10):936-938.
- [5]褚福永,王阶,姚魁武,等. 冠心病不稳定型心绞痛中医辨证分型与血脂及冠脉造影结果的相关性研究[J]. 北京中医药,2009,28(12):918-921.
- [6]褚福永,刘巍,刘红旭. 益气逐瘀方对心肌梗死大鼠心肌损伤标志物及 miR-24 基因表达的影响[J]. 北京中医药,2015,34(3):187-189.

- [7]王阶,熊兴江,何庆勇,等. 方证对应内涵及原则探讨[J]. 中医杂志,2009,50(3):197-199.
- [8]马晓昌,尹太英,陈可冀,等. 冠心病中医辨证分型与冠状动脉造影所见相关性比较研究[J]. 中国中西医结合杂志,2001,21(9):654-656.
- [9]高嘉良,李军,王阶. “扶阳活血法”在冠心病不稳定型心绞痛治疗中的运用[J]. 中国中药杂志,2016,41(3):59-62.
- [10]沈金玲. 温法治疗老年冠心病探析[J]. 中医研究,2008,21(6):6-8.
- [11]李柳骥,严季澜. 试论扶阳在心绞痛治疗中的地位及含义[J]. 中华中医药杂志,2009,24(7):840-842.
- [12]李军,张振鹏,熊兴江,等. 稳心汤治疗不稳定型心绞痛的随机对照研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(4):154-158.
- [13]宋祥和,李军,李长生. 稳心汤对不稳定型心绞痛病人高敏 C 反应蛋白及 D-二聚体的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2008,6(6):635-637.
- [14]李军,程广清,李长生. 稳心汤对不稳定型心绞痛患者血浆 Fib、IL-6、IL-8 的影响[J]. 山东中医杂志,2005,24(11):650-651.
- [15]王阶,熊兴江. 方证对应特征探讨[J]. 中医杂志,2010,51(3):200-203.

(2016-03-10 收稿 责任编辑:张文婷)

(上接第 1307 页)

- [8]Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, et al. Targeting the TGF β pathway for cancer therapy[J]. Pharmacol Ther, 2015, 147:22-31.
- [9]彭素芳,王胜军,陈建国,等. 胃癌患者外周血 Th17 和 Treg 细胞的特异性转录因子与相关细胞因子的检测及临床意义[J]. 中华肿瘤杂志,2010,32(3):185-189.
- [10]孟欣颖,马健,江晨,等. 胃癌组织中 IL-17、IL-6 和 TGF- β 1 的表达及其临床意义[J]. 胃肠病学,2011,16(10):593-596.
- [11]沈卫东,刘鹏飞,刘兵团,等. TGF- β 1 和 Smad2 在胃癌中的表达及意义[J]. 世界华人消化杂志,2012,20(14):1238-1241.
- [12]Yuan XL, Chen L, Zhang TT, et al. Gastric cancer cells induce human CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells through the production of TGF- β 1[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(15):2019-2027.
- [13]陈颖,陈曲波. Th17 细胞在炎症疾病中的作用[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(12):1176-1177,1180.
- [14]Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 cells[J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27:485-517.
- [15]李必一,王若雨,赵勇. IL-17 在肿瘤发生发展中的作用及其临床意义[J]. 中国医药生物技术,2016,11(1):64-68.
- [16]Zhang B, Rong G, Wei H, et al. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374(3):533-537.
- [17]Su Z, Sun Y, Zhu H, et al. Th17 cell expansion in gastric cancer may

contribute to cancer development and metastasis[J]. Immunol Res, 2014, 58(1):118-124.

- [18]Meng XY, Zhou CH, Ma J, et al. Expression of interleukin-17 and its clinical significance in gastric cancer patients[J]. Med Oncol, 2012, 29(5):3024-3028.
- [19]Saito H, Yamada Y, Takaya S, et al. Clinical relevance of the number of interleukin-17-producing CD8⁺ T cells in patients with gastric cancer[J]. Surg Today, 2015, 45(11):1429-1435.
- [20]Zeng Y, Zhang Q, Wang H, et al. Prognostic significance of interleukin-17 in solid tumors: a meta-analysis[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(7):10515-10536.
- [21]Jiang YX, Li PA, Yang SW, et al. Increased chemokine receptor IL-17RA expression is associated with poor survival in gastric cancer patients[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(6):7002-7008.
- [22]He D, Li H, Yusuf N, et al. IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells[J]. J Immunol, 2010, 184(5):2281-2288.
- [23]Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, et al. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity[J]. Immunity, 2009, 31(5):787-798.

(2016-01-15 收稿 责任编辑:王明)