养肺控瘤方对 Lewis 晚期肺癌小鼠的抑瘤作用及对白介素-2 和肿瘤坏死因子-α 表达的影响

沈水杰 徐玲俊

（南京中医药大学南通附属医院肿瘤内科，南通，226000）

摘要 目的：观察养肺控瘤方对 Lewis 晚期肺癌小鼠模型的抑瘤作用及对血清白介素-2（IL-2）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）表达的影响。方法：选取 30 只 C57BL/6 雄性小鼠，采用胸腔注射 Lewis 肺癌细胞悬液制作 Lewis 晚期肺癌小鼠。造模后随机分为 6 组：空白对照组、顺铂组、等效剂量中药组、高剂量中药组、顺铂 + 等效剂量中药组、顺铂 + 高剂量中药组，每组 5 只。计算各组抑瘤率，并采用酶联免疫吸附试验检测血清中 IL-2、TNF-α 的表达。结果：顺铂组、等效剂量中药组、高剂量中药组、顺铂 + 等效剂量中药组、顺铂 + 高剂量中药组的抑瘤率分别为 57.52%，30.88%，51.15%，67.73%，82.75%。与空白对照组比较，各观察组血清 IL-2、TNF-α 水平均得到显著下降（$P<0.05$），顺铂 + 高剂量中药组与顺铂组比较，血清 IL-2、TNF-α 水平显著下降（$P<0.05$）。结论：养肺控瘤方能抑制肿瘤生长，并能与顺铂协同降低 Lewis 晚期肺癌小鼠模型血清 IL-2、TNF-α 的表达。

关键词 养肺控瘤方；Lewis 晚期肺癌；小鼠；抑瘤作用；白介素-2；肿瘤坏死因子-α

Tumor-inhibitory Effect of Yangfei Kongliu Fang on Mice with Advanced Lewis Lung Carcinoma and Its Effects on the Expression of IL-2 and TNF-α

Shen Shuijie, Xu Lingjun

(*Department of Medical Oncology, Nantong Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nantong* 226000, *China*)

Abstract **Objective**: To observe the tumor-inhibitory effect of Yangfei Kongliu Fang and its effect on the expression of serum IL-2 and TNF-α in mouse models with advanced Lewis lung carcinoma. **Methods**: By using Lewis lung carcinoma cell suspensions via intrapleural injection, 30 male C57BL/6 mice were prepared into mouse models with advanced Lewis lung carcinoma. After model establishment, the mice were randomly divided into 6 groups: normal saline group (group C/control group), cisplatin group (DDP group), group treated with an equivalent dose of Chinese medicinals (group L), group treated with a high dose of Chinese medicinals (group H), group treated with cisplatin + equivalent dose of Chinese medicinals (group L + DDP), and group treated with cisplatin + high dose of Chinese medicinals (group H + DDP). Each group contained 5 mice and underwent corresponding intervention. Then, the tumor inhibition rate in each group was calculated, and the ELISA method was used to measure the expression of serum IL-2 and TNF-α. **Results**: The tumor inhibition rates in the DDP group, group L, group H, group L + DDP and group H + DDP were 57.52%, 30.88%, 51.15%, 67.73% and 82.75%, respectively. Compared with the control group, each treatment group achieved significant decreases in the levels of serum IL-2 and TNF-α ($P<0.05$); and in group H + DDP as compared with DDP group, there were significant decreases in the levels of serum IL-2 and TNF-α ($P<0.01$). **Conclusion**: Yangfei Kongliu Fang can inhibit tumor growth and can cooperate with cisplatin to reduce the expression of serum IL-2 and TNF-α in mouse models with advanced Lewis lung carcinoma.

Key Words Yangfei Kongliu Fang, Mouse with advanced Lewis lung carcinoma, Tumor-inhibitory effect, IL-2, TNF-α

中图分类号：R289.5 **文献标识码**：A **doi**：10.3969/j.issn.1673-7202.2018.02.043

原发性支气管癌起源于支气管黏膜或腺体，简称肺癌，是临床最为常见的恶性肿瘤，近年来其发病率、死亡率呈逐渐上升趋势[1]，肺癌在城市肿瘤死亡顺序中已经由原来的第 4 位上升至第 1 位。70%～80%肺癌患者初诊即为晚期，丧失了手术根治的机会[2]。目前临床将肺癌概括为小细胞肺癌和非小细胞肺癌两大类[3]。晚期非小细胞肺癌目前治疗多采取综合性治疗，其中涵盖放疗、化疗、分子靶向治疗、免疫治疗、中医中药治疗、最佳支持治疗等[4]。近年来临床医生更多的开始追求患者生命质量而不仅仅是杀灭和缩小肿瘤[5]。在长期的晚期非小细胞肺癌的中西医结合临床实践中，我科制定了养肺控瘤协

基金项目：2015 年南通市卫生局青年医学人才科研基金项目（WQ2015066）

作者简介：沈水杰（1982.02—），男，博士研究生，副主任中医师，研究方向：中医肿瘤学，E-mail：a001145017@163.com

定方，临床疗效确切，本研究通过制作晚期 Lewis 肺癌小鼠模型，探讨养肺控瘤方治疗晚期非小细胞肺癌的作用机制。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　动物　C57BL/6 小鼠，雄性，体质量平均（20 ±3）g，购自常州卡文斯生物技术有限公司，饲养于室温 25 ℃，SPF 级环境。

1.1.2　药物　本研究使用中药来自南京中医药大学南通附属医院中药房，购自南通三越中药饮片有限公司。养肺控瘤方组成如下：黄芪 45 g、生晒参 15 g、北沙参 30 g、薏苡仁 30 g、白花蛇舌草 30 g、仙鹤草 30 g。药物煎煮成等效剂量（按人鼠体表面积换算为 2.43 g/kg，含生药 121.5 mg/mL），高剂量组（人等效剂量 10 倍为 24.3 g/kg，含生药 1 215 mg/mL），药液放置于 4 ℃保存备用。顺铂（20 g/瓶，齐鲁制药有限公司生产，批号：2WA2A1308054A，加 0.9% 生理盐水溶解并稀释至 0.2 mg/mL。

1.1.3　试剂与仪器　10% 小牛血清、1640 培养基、0.25% 胰蛋白酶购自 Gibco 公司，24 孔板（含 Transwell 小室），购自美国 Coming 公司，相关 ELISA 试剂盒购自 eBioscience 公司。低温冰箱（THERMO Heto ULtra Freeze，美国）；低速台式离心机（TDL-50B，上海安亭科学仪器厂）；D-37520 高速冷冻离心机（Thermo，Germany）；LX-100 手掌型离心机（LX100 Bio-rad USA）；RF5301PC 荧光分光光度仪（Shimadzu，Japan）。

1.2　方法

1.2.1　分组与模型制备　将 30 只小鼠以随机数字表的方法随机分为以下 6 组：空白对照组；顺铂组；等效剂量中药组；高剂量中药组；顺铂 + 等效剂量中药组；顺铂 + 高剂量中药组。将制备的 Lewis 肺癌细胞株细胞悬液（1×10^7 细胞/mL），在每只小鼠腋后线第 6 肋间胸腔接种 0.1 mL。接种细胞 10 d，微型超声提示胸腔种植和胸腔转移，晚期肺癌模型建立成功。

1.2.2　给药方法　空白对照组给予生理盐水灌胃；顺铂组给予顺铂腹腔注射，2 mg/kg，隔天给药；等效剂量中药组给予人等效剂量的养肺控瘤方灌胃（按人鼠体表面积换算为 2.43 g/kg）；高等剂量中药组给予人等效剂量 10 倍的养肺控瘤方灌胃（按人鼠体表面积换算为 24.3 g/kg）；顺铂 + 等效剂量中药组给予顺铂腹腔注射联合人等效剂量的养肺控瘤方灌胃；顺铂 + 高等剂量中药组给予顺铂腹腔注射联合人等效剂量 10 倍的养肺控瘤方灌胃。

1.2.3　检测指标与方法　药物干预 15 d。接种 lewis 细胞后 25 d，采用摘眼球法取血 0.4 mL，离心分离出血清，用酶联免疫吸附试验检测血清的 IL-2、TNF-α。IL-2、TNF-α 标准品的稀释、加样、加酶、终止和吸光度（A）计算参考文献[6-7]。第 25 天脱颈处死各组小鼠，剥取肿瘤称取质量。抑瘤率 =（1 − 实验组肿瘤平均质量/空白对照组肿瘤平均质量）×100%。

1.3　统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，比较采用 t 检验，计数资料以率表示，比较用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　6 组抑瘤率比较　与养肺控瘤方组和顺铂组均显示了明显的肿瘤抑制作用。空白对照组与顺铂组、等效剂量中药组、高剂量中药组、顺铂 + 等效剂量中药组、顺铂 + 高剂量中药组比较，差异有统计学意义（$P < 0.05$）。顺铂 + 等效剂量中药组、顺铂 + 高剂量中药组与顺铂组比较，差异有统计学意义（$P < 0.05$）。中西联合组在肿瘤抑制方面优于顺铂组（$P < 0.05$）。顺铂 + 高剂量中药组与顺铂 + 等效剂量组比较，差异有统计学意义（$P < 0.05$）。中药各剂量组差异无统计学意义（$P > 0.05$）。顺铂组的抑瘤作用明显强于单纯中药组（$P < 0.05$）。见表 1。

表 1　肿瘤质量和肿瘤控制率（$\bar{x} \pm s$）

组别	质量（g）	肿瘤控制率（%）
空白对照组（$n = 5$）	4.44 ± 0.17	
顺铂组（$n = 5$）	1.76 ± 0.05	57.52 ± 1.11 *
等效剂量中药组（$n = 5$）	2.86 ± 0.16	30.88 ± 4.42 *△
高剂量中药组（$n = 5$）	2.02 ± 0.04	51.15 ± 0.97 *
顺铂 + 等效剂量中药组（$n = 5$）	1.33 ± 0.07	67.73 ± 1.94 *△▲
顺铂 + 高剂量中药组（$n = 5$）	0.71 ± 0.16	82.74 ± 4.57 *△▲□■

注：与空白对照组比较，* $P < 0.05$；与顺铂组比较，△ $P < 0.05$；与等效剂量中药组比较，▲ $P < 0.05$；与高剂量中药组比较，□ $P < 0.05$；与顺铂 + 等效剂量组比较，■ $P < 0.05$

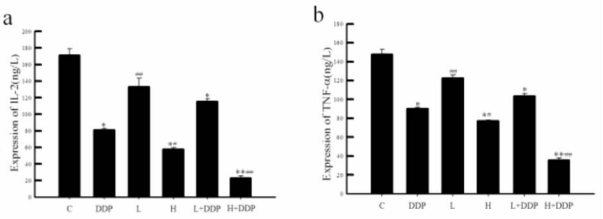

图 1　养肺控瘤方和顺铂对血清 IL-2、TNF-α 水平的影响

注：与空白对照组比较，* $P < 0.05$；与顺铂组比较，△ $P < 0.05$；空白对照组（C）；顺铂组（DDP）；等效剂量中药组（L）；高剂量中药组（H）；顺铂 + 等效剂量中药组（L + DDP）；顺铂 + 高剂量中药组（H + DDP）

2.2 6 组 IL-2、TNF-α 检测结果比较 除空白对照组外，其余 5 组 IL-2、TNF-α 水平均明显下降，与空白对照组比较，差异有统计学意义（$P < 0.05$）。养肺控瘤方与顺铂联合观察组中，血清 IL-2、TNF-α 水平与顺铂组比较，也明显下降（$P < 0.05$）。

3 讨论

研究发现，在肺癌细胞周围的微环境和肺癌周围的间叶组织中都发现了大量的细胞因子和炎性细胞[8]，之后的研究也已证明细胞因子介导的慢性炎性反应是肿瘤发生、发展过程中的重要的因素[9]。活化 T 淋巴细胞产生的 IL-2 能调节免疫系统，发挥抗肿瘤作用，是人体免疫调节功能的主要细胞因子之一[10]。肿瘤坏死因子（TNF）是一类具有广泛生物学活性的细胞因子，主要由活化的 T 淋巴细胞和巨噬细胞产生的 TNF-α 组成[11]。它具有杀灭肿瘤细胞的强大作用，与其他生物因子具有重要的协同作用，是人体质量要的免疫保护递质。在长期的晚期非小细胞肺癌的中西医结合临床实践中，晚晚期非小细胞肺癌的基本证型以肺气亏虚及气阴两虚两型为主，根据“养正积自除”的治疗原则，我科制定了养肺控瘤协定方。治疗当根据“养正积自除”的治疗原则[12]。养肺控瘤方，以生黄芪、生晒参补益肺脾、益气固本，北沙参养阴润肺，薏苡仁、仙鹤草健脾补虚，白花蛇舌草清热解毒散瘤。全方益气养阴，消瘤散结[13]。

实验研究显示，养肺控瘤方具有抑制肿瘤生长作用，其与顺铂联合有协同增效抑瘤作用[14]。抑瘤率方面，各观察组均显示了一定的肿瘤抑制作用。养肺控瘤方与顺铂联合在肿瘤抑制方面优于单纯顺铂组。各观察组对 Lewis 晚期肺癌小鼠血清 IL-2、TNF-α 均有不同的降低作用，养肺控瘤与顺铂联合显示了显著的降低炎性反应因子水平的作用。

综上所述，养肺控瘤方能抑制 Lewis 晚期肺癌小鼠肿瘤生长，并能与顺铂协同降低 Lewis 晚期肺癌小鼠模型血清 IL-2、TNF-α 的表达水平，其抑制肿瘤作用机制可能与免疫因素相关。

参考文献

[1] Follis AV, Chipuk JE, Fisher JC, et al. PUMA binding induces partial unfolding within BCL-xL to disrupt p53 binding and promote apoptosis [J]. Nat Chem Biol, 2013, 9(3): 163-168.

[2] 黎伟文，黄代鸿，罗叶松，等. 参一胶囊对非小细胞肺癌术后生活质量影响的临床研究[J]. 世界中医药，2016，11(12)：2711-2713.

[3] 付正丰，余成玲，岳秀永. 肺癌中西医结合辨治思考[J]. 实用中医药杂志，2013，29(2)：132-133.

[4] Socinski MA, Bondarenko I, Karaseva NA, et al. Weekly nab-paclitaxel in combination with carboplatin versus solvent-based paclitaxel plus carboplatin as first-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: final results of a phase III trial [J]. J Clin Oncol, 2012, 30(17): 2055-2062.

[5] 姚晓军，刘伦旭. 肺癌的流行病学及治疗现状[J]. 现代肿瘤医学，2014，22(8)：1982-1986.

[6] 王郁金. 基于 VIP-cAMP-PKA-AQP3 通路的硝菔通结方治疗功能性便秘的作用机制研究[D]. 成都：成都中医药大学，2015.

[7] 陈君君. MicroRNA-21 在 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞中的功能及丹皮酚的干预作用[D]. 合肥：安徽中医药大学，2013.

[8] 戴春. 血清中炎症相关细胞因子与非小细胞肺癌关系的研究[D]. 昆明：昆明医科大学，2015.

[9] 闫红娟，陈涛. C 反应蛋白、肿瘤坏死因子、白细胞介素及胰岛素样生长因子检测在 2 型糖尿病患者中的意义[J]. 国际检验医学杂志，2017，38(3)：344-346.

[10] 黄建敏，阚全程，张震，等. 抗人胸腺免疫球蛋白联合干扰素 γ 和白介素 2 诱导培养细胞因子诱导的杀伤细胞的效果[J]. 郑州大学学报：医学版，2016，51(2)：149-152.

[11] 郑中华，李蕴潜，郭敏，等. 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体对非小细胞肺癌细胞凋亡的诱导作用及其机制[J]. 吉林大学学报：医学版，2013，39(1)：16-18.

[12] 彭艳，黎静，凌桂晨，等. “养正积自除”思想的历史源流[J]. 中医药导报，2017，23(4)：9-11.

[13] 沈水杰，章永红. 养肺控瘤方联合康莱特及生物制剂治疗恶性胸腔积液观察[J]. 实用中医药杂志，2015，31(10)：918-919.

[14] 沈水杰. 养肺控瘤方治疗晚期非小细胞肺癌的临床疗效及其作用机制研究[D]. 南京：南京中医药大学，2017.

（2017 - 03 - 27 收稿 责任编辑：杨觉雄）