

寄生软化汤诱导骨肉瘤小鼠的免疫效应

李森 王健 古钦文 彭道琥

(西南医科大学附属中医医院骨伤科(脊柱组), 泸州, 646000)

摘要 目的:探讨寄生软化汤对骨肉瘤小鼠免疫功能的诱导作用,为肿瘤的中药辅助治疗提供参考。方法:选取昆明种小鼠,随机分为模型给药组、模型组、空白模型组、正常组,其中模型给药组腹腔注射给予 25 mg/kg 顺铂及给予 13 mg/kg 寄生软化汤灌胃,模型组给予相同剂量的顺铂和生理盐水,空白模型组和正常组分别给予相同剂量的生理盐水。疗程结束后统计分析小鼠体重、肿块近似体积、脏器指数及 T 细胞亚群。结果:与模型组比较,寄生软化汤可明显提高骨肉瘤小鼠的体重及 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞百分率及 CD4⁺/CD8⁺ 比值($P < 0.05$)。运用寄生软化汤的小鼠较模型组肿块体积减少,胸腺和脾脏指数增加,但变化并不显著。结论:寄生软化汤对骨肉瘤小鼠的免疫功能具有调节和诱导作用。中药与化疗联合治疗肿瘤可增强机体免疫功能,抑制肿瘤生长。

关键词 寄生软化汤;骨肉瘤;免疫功能;诱导作用;T 细胞亚群;中药;化疗;联合治疗

Immune Inducing Activity of Jisheng Ruanhua Decoction on Mice with Osteosarcoma

Li Sen, Wang Jian, Gu Qinwen, Peng Daohu

(Department of Orthopedics (Spine Group), Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

Abstract Objective:To investigate the immune inducing activity of Jisheng Ruanhua Decoction on mice with osteosarcoma and to provide references for synergetic treatment of tumor with traditional Chinese Medicine. **Methods:**Kunming mice were randomly divided into model administration group, model group, blank model group and normal group. The model administration group received intraperitoneal injection of 25mg/kg cisplatin and intragastric administration of 13mg/kg Jisheng Ruanhua Decoction, and the model group was administrated the same dosages of cisplatin and saline with the blank model group and the normal group being given the same dosage of saline respectively. After the end of the treatment course, the body weight, approximate volume of tumor, organs index and T cell subgroups were statistically analyzed. **Results:**Compared with the model group, Jisheng Ruanhua Decoction could significantly increase the body weight and the percentage of CD3⁺ T cell, CD4⁺ T cell, CD8⁺ T cell and CD4⁺/CD8⁺ ratio of the mice with osteosarcoma ($P < 0.05$). Furthermore, Jisheng Ruanhua Decoction reduced the volume of the tumor and improved the index of thymus or spleen with no remarkable changes. **Conclusion:**Jisheng Ruanhua Decoction could regulate and induce immune function of mice with osteosarcoma. The combination treatment of chemotherapy and traditional Chinese medicine enhanced the immune function and inhibited tumor growth.

Key Words Jisheng Ruanhua Decoction; Osteosarcoma; Immune function; Inducing activity; T cell subgroups; Traditional Chinese medicine; Chemotherapy; Combination treatment

中图分类号:R289.5;R738.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.06.050

骨肉瘤是儿童和青少年时期最常见的恶性肿瘤之一,伴有骨恶性度高、生长迅速、早期易转移且治疗后易复发等临床症状而成为医学上的一大难题^[1-2]。据统计,即使采用现有的化疗/放疗及西医辅助治疗方案,骨肉瘤患者 10 年总生存率也仅有 60%~70%,且在诊断时,约 20% 骨肉瘤患者已发生转移性疾病,严重影响人类的健康水平和生命质量,因此探寻延缓病程,改善疾病症状,提高生命质量的治疗方案迫在眉睫^[3-5]。中医药与西医相比在对调理患者的全身状况,降低化疗的不良反应,提高手术和化疗的效果,调整脏腑失调,提高患者的免疫力等

方面具有其独到之处^[6]。本研究旨在通过统计治疗疗程结束后骨肉瘤小鼠体重、肿块近似体积、脏器指数及 T 细胞亚群的变化,分析其免疫状态,进而探讨寄生软化汤对骨肉瘤小鼠免疫功能的影响,为中药辅助治疗肿瘤提供临床依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 昆明种小鼠 30 只,SPF 级,雄性,6~8 周龄,体重(20.0±2.1)g,购于广州中医药大学实验动物中心。

1.1.2 药物 寄生软化汤包括党参 12 g、黄芪 12

g、白术 9 g、木香 6 g、川续断 15 g、狗脊 12 g、桑寄生 12 g、丹参 15 g、当归 9 g 等多味中草药。上述中药水煎 2 次,浓缩至 100 mL,置于 -4 ℃ 冷藏储存。寄生软化汤中草药均购于广州市中医医院。顺铂购于南京制药厂有限公司。

1.1.3 试剂与仪器 LM8 骨肉瘤细胞株购自第四军医大学实验动物中心。新生牛血清 RPMI1640 培养液(含 10% 新生牛血清)为美国 GIBCO 产品。小鼠 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 单克隆抗体购自上海江莱生物科技有限公司。Elite E SP 型流式细胞仪购于美国 Coulter 公司。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 LM8 骨肉瘤细胞株置于 RPMI1640 培养液中培养生长至 90% 融合时采用胰酶消化后计数,离心后弃上清,加 PBS 缓冲液混匀调整骨肉瘤细胞浓度为 20 × 10⁶ 个/mL。

实验分为模型给药组、模型组、空白模型组、正常组。随机选取 24 只小鼠,剪去左前腋下毛发,并采用碘液进行消毒处理。取 LM8 骨肉瘤细胞悬液 0.25 mL,注入小鼠左前腋窝皮下。皮下注射后每天肉眼观察,具有明显肿瘤结节时为造模成功。

1.2.2 给药方法 造模成功后开始给药,其中模型给药组分别 2 次/d 腹腔注射给药 25 mg/kg 顺铂(w/w,2.5 mg/mL)及 1 次/d 灌胃给药 13 mg/kg 寄生软化汤(根据给药剂量换算,相当于临床成人用量的 9 倍)。模型组分别给予相同剂量的顺铂和生理盐水,空白模型组和正常组给予相同剂量的生理盐水。连续给药 28 d 为 1 个疗程。每只小鼠每日灌胃量不超过 1.0 mL。

1.2.3 检测指标与方法 治疗疗程结束后称取小鼠体重,测量肿瘤的最长径 a 和横径 b,并依据公式 $V = \pi ab^2/6$,计算肿块的近似体积。实验小鼠摘眼球取血,采用肝素钠震荡进行抗凝处理,采用流式细胞仪测定 T 细胞亚群 CD3⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞百分率。实验小鼠取血后脱臼处死,摘取完整的胸腺和脾脏,滤纸吸干残血后称取质量,依据脏器指数 = 脏器质量/体重 × 100%。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析,正态分布的计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 寄生软化汤对小鼠体重及肿块体积的影响

肿瘤对小鼠体重具有抑制作用,正常组小鼠体重与模型小鼠比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型给药组小鼠体重上升,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),且小鼠自主活动增加,皮毛具有一定的光泽,表明寄生软化汤对小鼠体重增长具有促进作用。肿块近似体积数据显示,模型给药组、模型组肿块体积与空白模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),但模型给药组与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 寄生软化汤对小鼠体重及肿块体积的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	体重(g)	肿块近似体积(cm ³)
模型给药组(n=8)	25.16 ± 1.01 * [△] ▲	2.72 ± 0.12 [△]
模型组(n=8)	23.24 ± 0.80 *	2.85 ± 0.15 [△]
空白模型组(n=8)	22.41 ± 1.06 *	3.17 ± 0.20▲
正常组(n=6)	27.01 ± 0.79 [△] ▲	-

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与空白模型组比较,[△] $P < 0.05$;与模型组比较,▲ $P < 0.05$; - 为无数据

2.2 寄生软化汤对小鼠免疫功能的影响

2.2.1 寄生软化汤对小鼠脏器指数的影响 模型小鼠胸腺指数和脾脏指数与正常小鼠相比均有下降。与空白模型组比较,模型组小鼠脏器指数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而模型给药组脏器指数显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 寄生软化汤对小鼠脏器指数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	胸腺指数	脾脏指数
模型给药组(n=8)	1.88 ± 0.14 * [△]	3.37 ± 0.10 [△]
模型组(n=8)	1.75 ± 0.10 *	3.13 ± 0.13 *
空白模型组(n=8)	1.69 ± 0.12 *	2.94 ± 0.14 *▲
正常组(n=6)	2.09 ± 0.15 [△] ▲	3.51 ± 0.15 [△] ▲

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与空白模型组比较,[△] $P < 0.05$;与模型组比较,▲ $P < 0.05$

表 3 小鼠 T 细胞亚群($\bar{x} \pm s$)

组别	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
模型给药组(n=8)	52.02 ± 3.22 * [△] ▲	37.76 ± 2.13 * [△] ▲	14.67 ± 1.94 * [△] ▲	2.68 ± 0.44 [△] ▲
模型组(n=8)	40.84 ± 2.12 * [△]	26.27 ± 1.84 * [△]	10.28 ± 1.67 *	2.51 ± 0.26 *
空白模型组(n=8)	35.77 ± 2.38 *▲	21.13 ± 1.54 *▲	8.55 ± 1.50 *	2.54 ± 0.23 *
正常组(n=6)	61.48 ± 4.13 [△] ▲	45.90 ± 3.28 [△] ▲	17.60 ± 1.24 [△] ▲	2.73 ± 0.42 [△] ▲

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与空白模型组比较,[△] $P < 0.05$;与模型组比较,▲ $P < 0.05$

2.2.2 寄生软化汤对小鼠 T 细胞亚群的影响 与正常组比较,模型小鼠 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞百分率均显著下降,表明肿瘤损伤机体免疫功能。与模型组比较,模型给药组 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞百分率及 CD4⁺/CD8⁺ 比值均显著增加,差异无统计学意义 ($P < 0.05$)。此外,模型组小鼠 CD8⁺T 细胞百分率、CD4⁺/CD8⁺ 比值与空白模型组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

骨肉瘤患者,尤其是中晚期的化疗患者,其自身的免疫功能紊乱低下,而传统化疗对机体免疫系统又具有明显的抑制作用,给疾病的预后及治疗带来诸多困难^[7-8]。中药辅助化疗可明显缓解肿瘤患者的临床症状,改善生命质量及治疗耐受性,并在一定程度上控制肿瘤大小,延长患者生存时间,为肿瘤治疗提供新的思路与方法^[9-11]。中药可通过激发、增强或恢复机体特异性或非特异性免疫效应机制,促进 T 细胞因子释放,诱导细胞凋亡,抑制血管生成,增加 T 细胞总数等途径达到抗肿瘤作用^[12-13]。

寄生软化汤作为治疗骨肉瘤的中药方剂,具有活血消肿,攻坚散结,减毒增效的疗效,其含有多味补益正气,增强机体免疫功能的中草药,如党参、黄芪、白术、丹参等。单味中草药夏枯草的提取物对肿瘤细胞具有抑制作用^[14]。Usami 等^[15]报道显示丹参提取物人参皂苷可以增加小鼠胸腺质量,抑制肿瘤细胞新生血管的形成和肿瘤细胞的转移,促进肿瘤细胞的凋亡。任杰红等^[16]和孙睿等^[17]研究人员发现人参皂苷可以提高正常小鼠胸腺和脾脏质量,提高机体免疫活性。本实验中,与模型组比较,寄生软化汤可以明显提高骨肉瘤模型小鼠的体重 ($P < 0.05$),使小鼠自主活动增加,皮毛具有一定的光泽。此外,口服寄生软化汤的模型小鼠肿瘤体积减小,胸腺和脾脏指数增加。同时接受寄生软化汤和化疗治疗的小鼠 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞百分率及 CD4⁺/CD8⁺ 比值与单一化疗的模型组比较均显著增加 ($P < 0.05$),这表明寄生软化汤对骨肉瘤小鼠的免疫功能具有诱导作用,寄生软化汤与化疗联合治疗与单一化疗比较,联合治疗的抗肿瘤效果更佳。

任一时期的患者,即使是晚期恶性程度比较高的肿瘤患者,中医治疗也能起到提高患者生命质量,延长生命的作用。其用在手术前后也能有很好的治疗效果,防止癌细胞转移及扩散,提高手术的成功

率,减少发生相应的并发症^[18-20]。用在放疗和化疗后可以减少其不良反应,提升患者自身的免疫力,帮助患者完成整个治疗过程,提高治愈的概率。中医治疗采用药的药物通常是纯天然的中草药,药性较温和且无刺激,可以贯穿于患者整个治疗的过程。

实验研究表明,化疗与中药联合治疗在增强机体免疫功能,预防肿瘤转移与复发,改善患者临床症状和生命质量等诸多方面具有一定的疗效。李梅等^[21]在探讨中药汤剂辨证施治联合生长抑素类似物治疗晚期胃肠胰腺神经内分泌肿瘤的疗效及安全性实验中证实中药汤剂辨证施治与生长抑素类似物在治疗晚期胃肠胰腺神经内分泌肿瘤方面具有协同作用,可减轻用药不良反应,可能延长患者的疾病进展时间。张江华等^[22]研究表明环磷酰胺联合中药治疗具有抗癌、减轻骨髓抑制作用,拮抗环磷酰胺的不良反应及进一步延长荷瘤小鼠寿命的作用。此外,很多中药单体联合应用西药能调节 P53、Bcl-2 基因家族、c-myc 等细胞凋亡基因的表达,从而有效地诱导肿瘤细胞的凋亡^[23-25]。

综上所述,寄生软化汤对骨肉瘤小鼠的免疫功能具有调节和诱导的作用,采用中药与化疗联合的方法治疗肿瘤可改善患者的生命质量,抑制肿瘤的生长,增强患者的免疫功能,为肿瘤的中药辅助治疗提供了重要的临床参考。

参考文献

- [1] 李奕麟,常君丽,施杞,等.骨肉瘤免疫治疗的研究现状[J].癌症进展,2017,15(6):605-608.
- [2] Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, et al. Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(27):3029-3035.
- [3] Petrilli AS, de Camargo B, Filho VO, et al. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: prognostic factors and impact on survival[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(7):1161-1168.
- [4] Flores RJ, Kelly AJ, Li Y, et al. The prognostic significance of circulating serum amyloid A and CXC chemokine ligand 4 in osteosarcoma [J]. Pediatr Blood Cancer, 2017, 64(12):e26659.
- [5] 贾斌,李朝旭,孔祥芸,等.骨肉瘤的治疗进展[J].中国临床新医学,2016,9(10):941-944.
- [6] 丁少华,秦刚,易生辉,等.中西医结合治疗骨肉瘤的研究进展[J].湖南中医杂志,2017,33(9):175-178.
- [7] 苏海涛,黄永明,许少健,等.加味六味地黄汤对骨肉瘤化疗患者免疫功能的影响[J].南方医科大学学报,2010,30(6):1412-1414.
- [8] 刘怀毫,梁振,梁沛杰,等.骨肉瘤化学治疗的研究进展[J].中国临床新医学,2018,11(3):311-314.
- [9] 孙致保,夏黎明,张东伟.中药在胆道系统恶性肿瘤作用机制及应用研究进展[J].中医药临床杂志,2017,29(10):1760-1763.

(下接第 1524 页)

[12] 杨瑞, 玛依努尔, 刘小晴, 等. 两种促排卵方案对高龄多囊卵巢综合征患者疗效比较[J]. 中国医药, 2012, 7(8): 1019-1020.

[13] 周一辰, 殷岫绮. 补肾调经方治疗卵巢储备功能下降 30 例临床观察[J]. 上海中医药大学学报, 2014, 28(5): 38-41.

[14] 杨通宇, 胡建山, 李文忠, 等. 鹿角壮骨胶囊治疗绝经后骨质疏松症患者的临床疗效观察[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(5): 1034-1036.

[15] 董家军, 彭逸龙, 王海清, 等. 雌激素受体及多巴胺受体在泌乳素腺瘤的表达[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2016, 15(1): 9-11.

[16] 李增战, 陈捷, 苗文红, 等. 鹿仙散结汤治疗晚期乳腺癌 30 例[J]. 陕西中医, 2007, 28(5): 526-527.

[17] 林贺, 律广富, 田文婷, 等. 鹿角胶抗乳腺增生的作用研究[J]. 吉林中医药, 2013, 33(2): 169-171.

[18] 林丽琼. 鹿衔草对去卵巢大鼠钙调节激素的影响[D]. 福州: 福建中医药大学, 2012: 1-15.

[19] 韩蓉, 李仁廷, 王华. 乳腺宁片对乳腺增生大鼠及激素水平的影响[J]. 四川中医, 2015, 33(8): 40-42.

[20] 米热古丽·艾乃都, 阿依先木·他西, 哈里旦木·吾加不都, 等. 维药异常黑胆质成熟剂对乳腺增生模型大鼠乳腺组织病理形态及血清性激素水平的影响[J]. 科技导报, 2014, 32(26): 79-84.

[21] 郁琳, 石燕, 庄梦斐, 等. 定坤丹治疗子宫内位异位症的药理作用与机制[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2016, 36(12): 963-970.

[22] 徐英宏, 张娴. 治疗乳腺增生的中药复方研究进展[J]. 实用药物与临床, 2013, 16(12): 1210-1213.

[23] 王伟志, 夏春阳, 朱忠才. 海珠消癖丸治疗乳腺增生的临床疗效观察[J]. 黑龙江中医药, 2012, 41(1): 18-19.

[24] 李瑞. 岩鹿乳康胶囊治疗乳腺增生症兼月经不调 168 例临床观察[J]. 中国医药指南, 2015, 13(2): 220-221.

[25] 胡克菲, 李永华, 裴晓华, 等. 乳腺增生病的中医药治疗研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 353-356.

[26] 郭宇飞, 周海军, 赵素贞, 等. 岩鹿乳康胶囊联合逍遥丸治疗肝郁气滞型乳腺增生症 60 例疗效观察[J]. 光明中医, 2015, 30(10): 2139-2140.

(2017-05-04 收稿 责任编辑: 杨觉雄)

(上接第 1520 页)

[10] 张桂林, 王佳. 自然杀伤细胞抗肿瘤免疫疗法的研究进展[J]. 中国医药, 2016, 11(8): 1256-1260.

[11] 安德兴. 抗肿瘤中药在癌症治疗与预防中的应用[J]. 中国医药指南, 2017, 15(9): 16-17.

[12] 袁野, 申春梯, 蒋敬庭. 中药对 T 细胞免疫干预的抗肿瘤作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(2): 189-193.

[13] 邱淑敏, 陈涛, 刘美玲, 等. 中药诱导肿瘤细胞凋亡机制研究进展[J]. 动物医学进展, 2015, 36(1): 83-86.

[14] 严冬, 谢文剑, 李春, 等. 夏枯草化学成分及其体外抗肿瘤活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(11): 49-54.

[15] Usami Y, Ishida K, Sato S, et al. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression correlates with oral cancer progression and induces macrophage/cancer cell adhesion[J]. Int J Cancer, 2013, 133(3): 568-578.

[16] 任杰红, 陈林芳, 张路晗, 等. 人参皂苷 Rg1 的免疫促进作用[J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(2): 92-93.

[17] 孙睿, 张健文, 梁辉, 等. 人参皂苷 Rg1 对大鼠Ⅲ型前列腺炎血清细胞免疫因子的影响[J]. 四川中医, 2017, 35(2): 54-56.

[18] 李帅, 刘云霞. 中医药防治骨肉瘤肺转移的研究进展[J]. 新中医, 2017, 49(11): 137-141.

[19] 邵建立, 李志忠, 焦根龙, 等. 灵芝酸 A 对骨肉瘤细胞增殖、凋亡和迁移的影响[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(5): 619-624.

[20] 任婷婷, 郭卫, 卢新昌, 等. 三氧化二砷抑制骨肉瘤转移和侵袭的体外研究[J]. 肿瘤研究与临床, 2009, 21(12): 796-798.

[21] 李梅, 窦迪, 罗杰, 等. 中药联合生长抑素类似物治疗晚期胃胰腺神经内分泌肿瘤的疗效分析[J]. 临床肿瘤学杂志, 2017, 22(3): 238-242.

[22] 张江华, 李恩, 李彬. 补肾健脾、扶正祛邪中药在荷瘤小鼠化疗过程中的减毒增效作用[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(13): 3548-3549, 3550.

[23] 文洁, 徐立春. 中药单体联合西药对肿瘤细胞凋亡的影响[J]. 中国医药导报, 2013, 10(3): 40-42.

[24] 代国, 郑迪, 胡庆柱, 等. 汉黄芩素抗骨肉瘤 143B 细胞的实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(36): 7008-7012.

[25] Li-Weber M. Targeting apoptosis pathways in cancer by Chinese medicine[J]. Cancer Lett, 2013, 332(2): 304-312.

(2017-12-21 收稿 责任编辑: 杨觉雄)