

引用:彭银花,龚辉,赵晔,彭巍,程晓燕,袁晓清,唐建清.抗癌消水散对人胃癌小鼠腹腔移植阳虚模型的干预作用[J].湖南中医杂志,2022,38(6):179-183,192.

抗癌消水散对人胃癌小鼠腹腔移植阳虚模型的干预作用

彭银花,龚辉,赵晔,彭巍,程晓燕,袁晓清,唐建清

(湖南省中医药研究院附属医院,湖南长沙,410006)

[摘要] 目的:研究抗癌消水散对人胃癌小鼠腹腔移植阳虚模型的影响。方法:采用腹腔注射人胃癌细胞 MGC803 及冰水建立人胃癌小鼠腹腔移植阳虚模型,将造模成功的 50 只小鼠分为模型组及抗癌消水散低、中、高剂量组,每组各 10 只,另取 10 只正常小鼠为对照组。干预 30 d 后评价阳虚症状积分,测定血清中促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质醇(CORT)、三碘甲状腺原氨酸(T_3)、甲状腺素(T_4)、促甲状腺激素(TSH)含量及 B7-1、B7-2、CD28、胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4(CTLA-4)含量,检测腹膜组织中 B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、CD28 mRNA、CTLA-4 mRNA 及转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、白细胞介素-10(IL-10)含量,观察腹水量、瘤体积、瘤重。结果:与正常组比较,模型组阳虚症状积分显著增加,血清 ACTH、CORT、 T_3 、 T_4 、TSH 水平显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。抗癌消水散低、中、高剂量组小鼠腹水量、瘤体积、瘤重,血清中 B7-1、B7-2、CD28、CTLA-4 含量,腹膜组织中 B7-1、B7-2、CD28 mRNA、CTLA-4 mRNA 及 TGF- $\beta 1$ 、IL-10 含量与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);上述指标低、中、高剂量组组间比较,差异亦有统计学意义($P < 0.05$),以高剂量组改善为最佳。结论:抗癌消水散具有抗人胃癌小鼠移植阳虚模型瘤恶性腹水的作用,这可能与抑制 CTLA-4 表达,促进 T 细胞激活,改善机体免疫抑制及腹腔免疫微环境有关。

[关键词] 人胃癌小鼠腹腔移植模型;阳虚证;抗癌消水散;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2022.06.042

Intervention effect of Kang'ai Xiaoshui powder on a mouse abdominal xenograft model of human gastric cancer with Yang deficiency

PENG Yinhua, GONG Hui, ZHAO Ye, PENG Wei, CHENG Xiaoyan, YUAN Xiaoqing, TANG Jianqing

(The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Kang'ai Xiaoshui powder on a mouse abdominal xenograft model of human gastric cancer with Yang deficiency. Methods: A mouse abdominal xenograft model of human gastric cancer with Yang deficiency was established by intraperitoneal injection of human gastric cancer MGC803 cells and ice water, and after successful modeling, 50 mice were divided into model group and low-, middle-, and high-dose Kang'ai Xiaoshui powder groups, with 10 mice in each group. In addition, 10 normal mice were selected as control group. Related indices were measured and assessed after intervention for 30 days, including the symptom score of Yang deficiency, the amount of ascites, tumor volume, and tumor weight, as well as the serum levels of adrenocorticotrophic hormone (ACTH), corticosterone (CORT), triiodothyronine (T_3), thyroxine (T_4), thyroid stimulating hormone (TSH), B7-1, B7-2, CD28, and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and the levels of B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD28 mRNA, CTLA-4 mRNA, transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta 1$), and interleukin-10 (IL-10) in peritoneal tissue. Results: Compared with the control group, the model group had a sig-

基金项目:湖南省中医药研究院附属医院院级课题(201813)

第一作者:彭银花,女,副主任医师,研究方向:肿瘤的临床研究

通信作者:程晓燕,女,副主任医师,研究方向:肿瘤的临床研究, E-mail: cxy-8201@163.com

nificant increase in the symptom score of Yang deficiency and significant reductions in the serum levels of ACTH, CORT, T_3 , T_4 , and TSH ($P < 0.01$). There were significant differences between the low-, middle-, and high-dose Kang'ai Xiaoshui powder groups and the model group in the amount of ascites, tumor volume, tumor weight, the serum levels of B7-1, B7-2, CD28, and CTLA-4, and the levels of B7-1, B7-2, CD28 mRNA, CTLA-4 mRNA, TGF- $\beta 1$, and IL-10 in peritoneal tissue ($P < 0.05$). There were also significant differences in the above indices between the low-, middle-, and high-dose Kang'ai Xiaoshui powder groups ($P < 0.05$), and the high-dose group showed the greatest improvement in these indices. Conclusion: Kang'ai Xiaoshui powder exerts a therapeutic effect on malignant ascites in the mouse abdominal xenograft model of human gastric cancer with Yang deficiency, possibly by inhibiting the expression of CTLA-4, promoting T cell activation, and improving immunosuppression and immune microenvironment in abdominal cavity.

[**Keywords**] mouse abdominal xenograft model of human gastric cancer; Yang deficiency; Kang'ai Xiaoshui powder; experimental study

腹水是癌症常见的并发症,严重影响患者的生存质量^[1-2]。中医学理论认为,恶性腹水的治疗以温阳利水、散寒滞水为本,因肺主宣发肃降,脾主制水,肾主水,故治以宣肺实脾、温肾利水,肺脾肾同调^[3-4]。抗癌消水散以十枣汤为基础,具有泻下、逐水等功效,临床常用于治疗渗出性脑膜炎、肝硬化、结核性胸膜炎等所致的胸水、腹水或全身水肿等。本课题组前期已对抗癌消水散治疗胃癌及腹水展开了多年的研究,发现其具有抗恶性腹水、抑制瘤细胞增殖、增强T细胞增殖活性等作用^[5-6]。研究发现,肿瘤的形成、生长及转移与患者先天性免疫缺陷或后天免疫失调及免疫抑制状态等密切相关^[7-8]。而癌性恶性腹水是否与腹腔微环境中存在免疫抑制状态有关,其与免疫细胞的相关性及相应的分子机制是什么,均尚未可知。因此本研究拟研究抗癌消水散对人胃癌小鼠腹腔移植所致的阳虚型恶性腹水模型的治疗作用及其对腹水微环境的影响,以期揭示其作用机制,为腹水的治疗提供新的依据。

1 实验材料

1.1 动物 60只SPF级BALB/c雄性小鼠,近交系,6~8周龄,体质量(20 ± 2)g。购自湖南中医药大学实验室,动物合格证号:SYXK(湘)2019-0009,饲养于湖南省中医药研究院动物中心实验室,饲养温度20~25℃,湿度50%~70%。

1.2 药物 抗癌消水散:芫花(熬)1g,甘遂1g,大戟1g,大枣10g,蝼蛄6g,蟋蟀6g,蜣螂6g,腹水草6g。将生药方打粉,用双蒸水(使用量为1倍体积)浸泡2h,收集药液于70℃水浴中蒸发浓缩,定容为100ml,4000r/min离心15min,去掉大颗粒杂

质,取上清液浓缩至含生药1.0g/ml(50ml),过滤后留药液,高温高压灭菌,0.22 μ m微孔滤器过滤除菌后,用10ml离心管分装保存备用。

1.3 主要试剂与仪器 人胃癌细胞株MGC803,由湖南中医药大学实验室提供;胎牛血清(FBS),购自美国Gibco公司;DMEM培养液,购自美国HyClone公司;B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、CD28、细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4(CTLA-4)抗体及二抗同型对照IgG,均购自美国Invitrogen公司;PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)、TB Green® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus),均购自TaKaRa生物公司;淋巴细胞分离液,购自上海爱必信生物科技有限公司;小鼠转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、白细胞介素-10(IL-10)ELISA试剂盒,购自英国Abcam公司;引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。医用X线诊断系统,购自德国SIEMENS公司;CO₂培养箱,购自美国Thermo Fisher公司;荧光显微镜,购自日本奥林巴斯公司;FACS-Calibur流式细胞仪,购自美国Becton Dickinson公司。

2 实验方法

2.1 人胃癌荧光细胞株MGC803的复苏和传代培养 荧光标记的胃癌细胞系MGC803是从恶性腹水灶中分离的细胞,具有腹腔种植的特性。常规培养于含10%FBS和G-418(0.75mg/ml,用于筛选稳定表达荧光的细胞)的DMEM培养液中,置于CO₂体积分数为5%、37℃饱和湿度的培养箱中培养传代。取对数生长期的MGC803细胞株以0.25%胰酶消化,DMEM培养液终止消化后,制成细胞悬液,1000r/min离心4min后重悬于磷酸缓冲液(PBS)溶液中。用台盼蓝染色测定细胞存活率,

发现细胞存活率>98%。

2.2 模型制备 造模前1周将人胃癌细胞株MGC803进行复苏和传代培养,造模当天对培养瓶中贴壁生长的细胞用胰酶消化,收集细胞悬液,离心后将沉淀细胞用PBS液洗2遍后计数,配制成 2×10^7 个/ml的细胞悬液,造模前置于冰上备用。造模开始时,首先按200 mg/(kg·d)的剂量将腺嘌呤制成混悬液0.2 ml,定时、定量、定人给50只小鼠灌胃,每天1次,连续21 d。小鼠逐渐出现畏寒喜暖、反应迟钝、蜷缩、拱背、消瘦、多尿、大便溏稀、少食、少动萎靡等现象,类似阳虚状态。随机取10只阳虚模型小鼠,眼球取血检测相关实验室指标,水平低于正常小鼠则表示阳虚模型建立成功。阳虚小鼠麻醉后,前胸壁以75%乙醇消毒,用手触及心尖搏动最明显处,约于胸骨左旁3 mm第二肋间,瞄准正中垂直进针,深度约0.5 cm,进针角度与小鼠腹面正中中线呈45°,与皮肤呈30°。缓慢回抽,若有鲜红血液抽出,则表示针已进入左心室,将MGC803细胞悬液0.2 ml(0.4×10^6 个胃癌细胞)缓慢推入后,迅速拔针,用棉球稍压针孔少许,接种成功。建模后在X线片下观察腹水情况并行体表标记。

2.3 分组与给药 将60只小鼠分为5组,即对照组、模型组、抗癌消水散低剂量组(低剂量组)、抗癌消水散中剂量组(中剂量组)、抗癌消水散高剂量组(高剂量组),每组各10只。各治疗组以抗癌消水散临床剂量为低剂量,分别于造模后第2天给予抗癌消水散7.8、15.6、23.4 g/(kg·d),每天分2次灌胃。对照组不给药,模型组灌胃等体积0.9%氯化钠注射液。连续30 d。

2.4 指标观察与检测

2.4.1 阳虚症状积分 从阳虚造模第2周开始,采用阳虚证小鼠症状量化积分表评价各组小鼠的阳虚症状积分。主要症状有:畏寒肢冷、活动减少、精神萎靡、皮毛少光泽、饮食减少、大便清稀。每项症状按照无、轻、中、重度分别计为0、1、2、3分,最高分为18分。无症状,0分;轻度症状,1~6分;中度症状,7~12分;重度症状,13~18分^[9]。

2.4.2 血清激素水平 随机抽取10只阳虚小鼠,用5%水合氯醛100 μl进行腹腔麻醉后固定头部,并轻轻向下压迫颈部两侧造成头部静脉血液回流受阻,使眼球充分外突,摘眼球取血。采用电化学发光法检测促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质醇

(CORT)、三碘甲状腺原氨酸(T₃)、甲状腺素(T₄)、促甲状腺激素(TSH)水平,评估阳虚模型。

2.4.3 腹水 腹腔注射后第15、22、31天,以10%水合氯醛麻醉,在X线片下观察腹水生长情况。并于第31天统计腹水量。无菌条件下开腹,无菌吸管收集腹水于离心管中,计算腹水平均体积。

2.4.4 原位瘤体积及重量 用游标卡尺测量原位肿瘤的长宽径及高度,根据肿瘤体积计算公式 $[V=\pi abc/6(a:长径;b:宽径;c:高)]$ 计算原位瘤体积。给药结束后处死小鼠,剥取原位瘤称重。

2.4.5 血清中B7-1、B7-2、CD28及CTLA-4含量 摘小鼠眼球,取血抗凝,加淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(PBMC),PBS洗涤后分别加入纯化的单克隆抗体B7-1、B7-2、CD28、CTLA-4各10 μl,充分混匀后置于4℃冰箱孵育45 min,洗涤细胞后离心弃上清,分别加入各自FITC标记的荧光二抗20 μl,4℃冰箱避光孵育30 min,离心弃上清,添加200 μl稀释液,采用流式细胞仪检测B7-1、B7-2、CD28及CTLA-4表达水平。

2.4.6 腹膜组织中B7-1、B7-2、CD28及CTLA-4 mRNA含量 实验结束后,无菌环境下抽取腹水,并剥离小鼠皮肤,分离周围组织,然后将小鼠腹膜游离后去除附着肌肉组织,置于液氮保存备用。提取腹膜组织总RNA后进行反转录合成cDNA,采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)扩增B7-1、B7-2、CD28及CTLA-4 mRNA目的片段。20 μl反应体系:TB Green Premix Ex Taq II (2×)10 μl、ROX Reference Dye II (50×)0.4 μl、cDNA (50 ng/μl)2 μl、上下游引物(10 μm)各0.8 μl、ddH₂O 6.0 μl。反应条件为:95℃ 30 s;95℃ 5 s,61℃ 31 s,40个循环。B7-1、B7-2、CD28及CTLA-4及内参GAPDH引物序列见表1。采用2-ΔΔCT法定量分析腹膜组织中B7-1、B7-2、CD28及CTLA-4 mRNA相对表达水平。

表1 RT-qPCR引物

因子	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
B7-1	GAGTGCCTATCCCTGGAAGA	AGGCACACTGTGCCAGAAGGAT
B7-2	ACGTATTGGAAGGAGATTACAGCT	TCTGTCACGGTTACTACTCCGC
CD28	CGCCTTACCTAGACAACGAGAG	AAACAGGACTCCAGCAACCAGG
CTLA-4	GTACCTCTGCAAGGTGGAATC	GTACCTCTGCAAGGTGGAATC
GAPDH	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTACG

2.4.7 腹膜组织中 TGF-β1、IL-10 表达水平 以 1:10 制备腹膜组织匀浆液。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测腹膜组织中 TGF-β1、IL-10 表达水平,具体步骤严格按照试剂盒说明书进行。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2 组比较采用 *t* 检验,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验。*P*<0.05 表示差异

表 2 各组小鼠阳虚症状积分及血清 ACTH、CORT、T₃、T₄、TSH 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	阳虚症状积分(分)	ACTH(ng/L)	CORT(g/L)	T ₃ (ng/L)	T ₄ (μg/L)	TSH(mIU/ml)
正常组	10	0	103.46±10.13	81.34±9.21	178.52±15.86	213.59±16.97	10.84±1.15
模型组	10	7.84±1.59 ^a	71.09±6.42 ^a	43.42±7.14 ^a	103.77±13.24 ^a	127.64±13.25 ^a	8.14±1.02 ^a

注:与正常组比较,^a*P*<0.01。

3.2 各组小鼠腹水量、瘤体积及瘤重比较 与模型组比较,抗癌消水散低、中、高剂量组小鼠腹水量、瘤体积、瘤重均降低,差异有统计学意义(*P*<0.05);上述指标低、中、高剂量组组间比较,差异亦有统计学意义(*P*<0.05)。(见表 3)

表 3 各组小鼠腹水量、瘤体积及瘤重比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	腹水量(ml)	瘤体积(cm ³)	瘤重(g)
模型组	10	5.18±0.46	1.23±0.12	1.73±0.15
低剂量组	10	4.03±0.41 ^a	0.93±0.09 ^a	1.42±0.13 ^a
中剂量组	10	3.24±0.25 ^{ab}	0.49±0.05 ^{ab}	1.19±0.11 ^{ab}
高剂量组	10	2.33±0.27 ^{abc}	0.16±0.02 ^{abc}	0.76±0.08 ^{abc}

注:与模型组比较,^a*P*<0.05;与低剂量组比较,^b*P*<0.05;与中剂量组比较,^c*P*<0.05。

3.3 各组小鼠血清中 B7-1、B7-2、CD28 及 CTLA-4 含量比较 与模型组比较,抗癌消水散低、中、高剂量组小鼠血清中 B7-1、B7-2、CD28 含量增加,CTLA-4 含量降低,差异均有统计学意义(*P*<0.05);上述指标低、中、高剂量组组间比较,差异亦有统计学意义(*P*<0.05)。(见表 4)

表 4 各组小鼠血清中 B7-1、B7-2、CD28 及 CTLA-4 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	B7-1	B7-2	CD28	CTLA-4
模型组	10	8.86±1.17	16.14±2.28	27.23±2.16	6.23±0.56
低剂量组	10	11.03±1.26 ^a	19.93±2.43 ^a	32.08±2.75 ^a	5.11±0.51 ^a
中剂量组	10	14.16±1.25 ^{ab}	24.24±2.26 ^{ab}	41.24±2.69 ^{ab}	4.32±0.45 ^{ab}
高剂量组	10	22.33±1.29 ^{abc}	27.68±2.37 ^{abc}	53.33±2.87 ^{abc}	3.15±0.37 ^{abc}

注:与模型组比较,^a*P*<0.05;与低剂量组比较,^b*P*<0.05;与中剂量组比较,^c*P*<0.05。

3.4 各组小鼠腹膜组织中 B7-1、B7-2、CD28 及 CTLA-4 mRNA 水平比较 与模型组比较,抗癌消水

有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组小鼠阳虚症状积分及血清 ACTH、CORT、T₃、T₄、TSH 水平比较 与正常组比较,模型组阳虚症状积分显著增加,血清 ACTH、CORT、T₃、T₄、TSH 水平显著降低,差异均有统计学意义(*P*<0.01)。(见表 2)

散低、中、高剂量组小鼠腹膜组织中 B7-1、B7-2、CD28 mRNA 增加,CTLA-4 mRNA 降低,差异均有统计学意义(*P*<0.05);上述指标低、中、高剂量组组间比较,差异亦有统计学意义(*P*<0.05)。(见表 5)

表 5 各组小鼠腹膜组织中 B7-1、B7-2、CD28 及 CTLA-4 mRNA 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	B7-1 mRNA	B7-2 mRNA	CD28 mRNA	CTLA-4 mRNA
模型组	10	1.06±0.10	1.04±0.11	0.97±0.08	1.03±0.09
低剂量组	10	2.13±0.22 ^a	1.95±0.14 ^a	2.02±0.15 ^a	0.83±0.07 ^a
中剂量组	10	4.56±0.51 ^{ab}	4.32±0.41 ^{ab}	3.94±0.28 ^{ab}	0.42±0.05 ^{ab}
高剂量组	10	7.29±0.68 ^{abc}	6.83±0.63 ^{abc}	7.11±0.84 ^{abc}	0.16±0.02 ^{abc}

注:与模型组比较,^a*P*<0.05;与低剂量组比较,^b*P*<0.05;与中剂量组比较,^c*P*<0.05。

3.5 各组小鼠腹膜组织中 TGF-β1、IL-10 水平比较 与模型组比较,抗癌消水散低、中、高剂量组小鼠腹膜组织中 TGF-β1、IL-10 水平均降低,差异均有统计学意义(*P*<0.05);上述指标低、中、高剂量组组间比较,差异亦有统计学意义(*P*<0.05)。(见表 6)

表 6 各组小鼠腹膜组织中 TGF-β1、IL-10 水平比较($\bar{x}\pm s$,pg/ml)

组别	只数	TGF-β1	IL-10
模型组	10	181.73±15.26	68.74±6.03
低剂量组	10	152.69±12.39 ^a	51.65±5.38 ^a
中剂量组	10	131.45±11.68 ^{ab}	34.28±2.73 ^{ab}
高剂量组	10	107.26±10.52 ^{abc}	27.13±2.64 ^{abc}

注:与模型组比较,^a*P*<0.05;与低剂量组比较,^b*P*<0.05;与中剂量组比较,^c*P*<0.05。

4 讨论

肿瘤的基本病因病机是阳气失于敷布,阴寒得

以凝聚^[10-11]。腹水属中医学“臌胀”范畴,其病位在气血,根本病机为肝脾肾失调,气滞血结水停腹中。本研究首先通过给小鼠灌胃腺嘌呤制备阳虚模型,结果显示,阳虚症状积分显著增加,血清 ACTH、CORT、 T_3 、 T_4 、TSH 含量显著降低,提示阳虚小鼠制备成功。进一步对阳虚小鼠进行人胃癌细胞株 MGC803 腹腔注射制备阳虚胃癌性恶性腹水模型,造模 31 d 后发现,模型组小鼠腹围增大,腹水量显著增加,提示胃癌性腹水模型制备成功,可用于后续实验。

临床治疗癌性腹水主要以扶正为本,即通过扶正温阳,达到驱邪散寒之功,通过改善腹腔免疫微环境的失常状态,以提高肿瘤浸润淋巴细胞(TILs),调节患者免疫功能,达到抗癌消水的目的。抗癌消水散以十枣汤为基础,具有攻逐水饮、消肿、利尿之功,主治悬饮、咳唾胸胁引痛、心下痞硬、干呕短气、头痛目眩、胸背掣痛不得息、舌苔白滑、脉沉弦。有文献报道,温阳消水方外敷后可缓解癌性腹水,与西药利尿剂临床疗效相当,同时可减少因反复利尿造成患者耐药及电解质紊乱,能提高患者生活质量^[12]。本课题组前期研究发现,阳虚寒凝为恶性腹水常见证候之一,抗癌消水散可抗恶性腹水。本研究结果显示,与模型组比较,抗癌消水散可呈剂量依赖性降低小鼠腹水量、移植瘤体积及重量,与文献报道及前期结果一致,提示抗癌消水散可有效治疗移植性恶性腹水,抑制移植瘤生长。

《素问·刺法论》记载:“正气存内,邪不可干”,正虚(阳虚)是肿瘤发生发展之根本,癌毒侵袭为病邪之本,正邪相互抗争而导致肿瘤。邪毒不断增加,又加重正气亏虚,为肿瘤的转移提供条件^[13-14]。西医学的“种子与土壤”学说与中医学的“正虚”理论不谋而合,即作为种子的恶性肿瘤细胞侵袭机体是发病外因,造成阳虚及腹腔微环境中形成的免疫抑制状态加重疾病进展^[15]。研究表明,改善患者免疫功能抑制状态、唤醒 T 细胞免疫活性对改善肿瘤患者预后及增强疗效至关重要^[16]。T 细胞激活需要 MHC-抗原复合物与 T 细胞表面受体(TCR)结合提供第一信号,B 细胞或其他抗原递呈细胞(APC)表面共刺激分子和 TCR 结合提供第二信号,共刺激信号分子是 T 细胞进行增殖、分泌细胞因子及抗体的必需分子。B7 分子是免疫球蛋白超家族成员,以 B7-1(CD80)、B7-2(CD86)2 种单体形式表达于巨

噬细胞、树突状细胞及角化细胞等活化的 APC 表面^[17]。CD28 和 CTLA-4 是 B7 分子的特异性受体,但二者存在拮抗关系,B7 只有与 CD28 或 CTLA-4 结合才能发挥刺激效应^[18]。CTLA-4 与 B7 分子具有高度的亲合力,与 CD28 竞争结合 B7 家族分子,阻断 CD28 与 B7 的信号传导通路,防止 CD28 分子促进 T 细胞激活。近年来随着对 B7/CD28/CTLA-4 共刺激途径研究的不断深入,大量学者发现,抗 CTLA-4 可有效用于肿瘤的靶向治疗^[19]。

本研究结果发现,抗癌消水散可呈剂量依赖性增加 B7-1、B7-2 及 CD28 表达,降低 CTLA-4 表达,提示抗癌消水散可能通过抑制 CTLA-4 表达,缓解免疫抑制状态,改善人胃癌腹腔移植小鼠恶性腹水,抑制移植瘤生长。另有研究显示,免疫逃逸是通过促进 Treg 细胞及其分泌细胞因子 TGF- β 1、IL-10 表达发挥免疫抑制作用,促进恶性肿瘤进展^[20-21]。为探究抗癌消水散对腹腔免疫微环境的作用,本研究进一步检测腹膜组织中 TGF- β 1、IL-10 表达,结果发现,抗癌消水散可呈剂量依赖性降低恶性腹水小鼠腹膜组织中 TGF- β 1、IL-10 表达,提示抗癌消水散可能通过抑制 CTLA-4 表达,抑制其对 Treg 细胞的趋化作用,对抗恶性腹水,改善机体免疫微环境,从而发挥抗肿瘤作用。

综上所述,抗癌消水散具有抗人胃癌移植瘤恶性腹水的作用,这可能与抑制 CTLA-4 表达,促进 T 细胞激活,改善机体免疫抑制及腹腔免疫微环境有关。但是否还涉及其他信号通路参与共同发挥作用有待进一步研究。

参考文献

- [1] VIRGILIO E,GIARNIERI E,GIOVAGNOLI MR,et al. Gastric cancer cells in peritoneal lavage fluid:A systematic review comparing cytological with molecular detection for diagnosis of peritoneal metastases and prediction of peritoneal recurrences[J]. Anticancer Res,2018,38(3): 1255-1262.
- [2] 严宝剑. 复方苦参注射液对晚期肿瘤恶性腹腔积液患者生活质量的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2018,25(5):538-541.
- [3] 张锋利,李平,张梅. 龙蝎消水膏外敷联合腹腔热灌注化疗治疗恶性腹水的临床研究[J]. 辽宁中医杂志,2017,44(10): 2090-2093.
- [4] 黄莎,杨建伟,黄俊山,等. 消胀抑瘤方联合化疗治疗胃癌所致恶性腹腔积液 35 例临床观察[J]. 中医杂志,2017,58(11): 936-940.

3.3 供试品溶液制备方式的选择 针对直立百部中所含有的生物碱类成分,分别选择水、50%甲醇、甲醇、55%乙醇以及乙醇作为回流提取溶媒对供试品溶液中有效成分含量的提取效果进行比较^[12-13],结果表明在采用55%乙醇回流提取后测定的色谱峰效果最佳。

本次研究以直立百部为试验对象,建立了药材总生物碱中对叶百部烯酮和脱氢对叶百部碱的高效液相含量测定方法,同时对选择的3类批次直立百部药材进行了含量测定。结果表明以高效液相色谱法对直立百部中的生物碱类成分进行测定,方法简便易行,测定结果准确性高,测定的生物碱类成分在直立百部中的质量分数较高,对直立百部的质量控制具有数据参考价值,同时可以有效控制药材的质量,为其长远的有效开发利用提供了依据。

参考文献

- [1] 张彤,张亚中,陶建生,等. 中药百部中原百部碱的分离及含量测定[J]. 中国药理学杂志,2015,42(11):811-813.
- [2] 孙冬梅,董玉娟,江洁仪,等. 百部配方颗粒的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 时珍国医国药,2014,25(9):2157-2159.
- [3] 王文,司文涛,杨萍,等. 消胀利水散外敷联合艾灸治疗脾肾阳虚证胃脘腹水40例临床观察[J]. 中医杂志,2019,60(16):1389-1394.
- [4] 王维,李枋甯,肖彩芝,等. 攻瘤利水散外敷联合重组人5型腺病毒注射液胸腔内灌注治疗肺癌恶性胸水的临床疗效[J]. 中国老年学杂志,2018,38(21):5184-5186.
- [5] KING R, TUTHILL C. Immune modulation with thymosin alpha 1 treatment[J]. Vitam Horm, 2016, 102(1):151-178.
- [6] WANG CJ, SPARANO J, PALEFSKY JM. Human immunodeficiency virus/AIDS, human papillomavirus, and anal cancer[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2017, 26(1):17-31.
- [7] 何佩珊,杨公博,姜敏,等. 阳虚证肺腺癌骨转移活体荧光成像模型的建立与评价[J]. 中华中医药杂志,2019,34(3):1220-1223.
- [8] 李延玲,翟玉峰,张怀宏,等. 中医综合疗法治疗脾肾阳虚水停证肝硬化腹水60例临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(16):179-182.
- [9] 苏洪佳,陈国忠,谢君艳. 从中医脾虚“不能散精”论治肝硬化腹水[J]. 辽宁中医杂志,2019,46(1):61-62.
- [10] 宋凤丽,朱旭,高辰,等. 温阳消水方治疗癌性腹水的临床观察及机制研究[J]. 中华中医药杂志,2016,31(4):1513-1516.
- [11] 唐振豪,兰聪颖,林丽珠. 从肿瘤免疫编辑假说探讨肿瘤“正虚邪实”及其治疗[J]. 中医杂志,2019,60(13):1113-1117.
- [12] 王红玲,康斐,黄兴. 基于“阳化气,阴成形”理论探讨温阳法

- [3] 王昶,陈丽艳,张树明,等. 不同产地对叶百部中新对叶百部碱含量比较研究[J]. 中华中医药学刊,2014,30(10):2295-2297.
- [4] 李昕,王月茹,马利,等. 中药色谱指纹图谱在中药质量评价中的应用[J]. 生物医学工程学杂志,2015,29(1):192.
- [5] 吴旖,赵斌,江仁望. 百部总生物碱缓释片的质量标准研究[J]. 中国现代中药,2016,18(4):497-499.
- [6] LIAO JF, SHI CC, CHEN SY, et al. Spasmolytic effect of water extract of stemonae radix on the guinea-pig tracheal smooth muscle in vitro[J]. Journal of Ethnopharmacology, 1997, 57(1):57-62.
- [7] 王红,孙磊,韦云川,等. 蔓生百部总生物碱的含量测定[J]. 中国中医药咨讯,2014,1(3):36-38.
- [8] 张永太,冯年平,修彦凤,等. 百部蜜炙前后总生物碱含量比较[J]. 中成药,2015,32(2):451-453.
- [9] 高卫东,高英,李卫民. 百部总生物碱含量测定方法的研究[J]. 天然产物研究与开发,2015,19(15):124-126.
- [10] 王珺,高羽,张朝凤,等. 对叶百部中的非生物碱类成分[J]. 药学与临床研究,2015,20(3):193-195.
- [11] 陶冶,张亚中. 电感耦合等离子质谱法测定百部药材中砷、镉、汞、铅的含量[J]. 安徽医药,2015,19(5):858-860.
- [12] 吕丽华,叶文才,赵守训,等. 直立百部的化学成分[J]. 中国药科大学学报,2015,36(5):408-410.
- [13] 胡君萍,张囡,毛一卿. 《中国药典》3种百部的止咳作用比较[J]. 中国中药杂志,2009,34(23):10-14.

(收稿日期:2021-11-08)

(上接第183页)

- [5] 王文,司文涛,杨萍,等. 消胀利水散外敷联合艾灸治疗脾肾阳虚证胃脘腹水40例临床观察[J]. 中医杂志,2019,60(16):1389-1394.
- [6] 王维,李枋甯,肖彩芝,等. 攻瘤利水散外敷联合重组人5型腺病毒注射液胸腔内灌注治疗肺癌恶性胸水的临床疗效[J]. 中国老年学杂志,2018,38(21):5184-5186.
- [7] KING R, TUTHILL C. Immune modulation with thymosin alpha 1 treatment[J]. Vitam Horm, 2016, 102(1):151-178.
- [8] WANG CJ, SPARANO J, PALEFSKY JM. Human immunodeficiency virus/AIDS, human papillomavirus, and anal cancer[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2017, 26(1):17-31.
- [9] 何佩珊,杨公博,姜敏,等. 阳虚证肺腺癌骨转移活体荧光成像模型的建立与评价[J]. 中华中医药杂志,2019,34(3):1220-1223.
- [10] 李延玲,翟玉峰,张怀宏,等. 中医综合疗法治疗脾肾阳虚水停证肝硬化腹水60例临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(16):179-182.
- [11] 苏洪佳,陈国忠,谢君艳. 从中医脾虚“不能散精”论治肝硬化腹水[J]. 辽宁中医杂志,2019,46(1):61-62.
- [12] 宋凤丽,朱旭,高辰,等. 温阳消水方治疗癌性腹水的临床观察及机制研究[J]. 中华中医药杂志,2016,31(4):1513-1516.
- [13] 唐振豪,兰聪颖,林丽珠. 从肿瘤免疫编辑假说探讨肿瘤“正虚邪实”及其治疗[J]. 中医杂志,2019,60(13):1113-1117.
- [14] 王红玲,康斐,黄兴. 基于“阳化气,阴成形”理论探讨温阳法在恶性肿瘤中的应用[J]. 中医基础医学杂志,2019,25(7):999-1002.
- [15] 马齐襄,朱晓丹,胡凯文,等. 肿瘤转移的种子与土壤学说新认识[J]. 肿瘤防治研究,2015,42(10):1049-1053.
- [16] FOSSATI M, BUZZONETTI A, MONEGO G, et al. Immunological changes in the ascites of cancer patients after intraperitoneal administration of the bispecific antibody catumaxomab (anti-Ep-CAMxanti-CD3)[J]. Gynecol Oncol, 2015, 138(2):343-351.
- [17] POURMALEKI M, Young JH, SOCCI ND, et al. Extramammary paget disease shows differential expression of B7 family members B7-H3, B7-H4, PD-L1, PD-L2 and cancer/testis antigens NY-ESO-1 and MAGE-A[J]. Oncotarget, 2019, 10(58):6152-6167.
- [18] MITSUIKI N, SCHWAB C, GRIMBACHER B. What did we learn from CTLA-4 insufficiency on the human immune system[J]. Immunol Rev, 2019, 287(1):33-49.
- [19] ROWSHANRAVAN B, HALLIDAY N, SANSOM DM. CTLA-4: A moving target in immunotherapy[J]. Blood, 2018, 131(1):58-67.
- [20] ZHOU X, MAO Y, ZHU J, et al. TGF-beta1 promotes colorectal cancer immune escape by elevating B7-H3 and B7-H4 via the miR-155/miR-143 axis[J]. Oncotarget, 2016, 7(41):67196-67211.
- [21] INGRAM JR, BLOMBERG OS, RASHIDIAN M, et al. Anti-CTLA-4 therapy requires an Fc domain for efficacy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(15):3912-3917.

(收稿日期:2021-11-18)