

脾气虚证肺癌小鼠血清 IL-12, IL-10 的表达及 加味黄芪建中汤的影响*

魏自太¹, 王彩云¹, 包素珍², 吴忠勤¹, 姜涛²

(1. 衢州职业技术学院, 浙江 衢州 324000; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要: **目的** 研究脾气虚证肺癌小鼠血清 IL-12、IL-10 的表达及加味黄芪建中汤影响。**方法** 采用苦寒泻下, 劳倦, 节食的方法造模, 在建立小鼠脾气虚证 Lewis 肺癌模型后, 按实验设计方案处理各组小鼠。造模后加味黄芪建中汤灌胃, 脱颈椎处死小鼠, 取血清。分别称取每只小鼠瘤重, ELISA 方法检测肺癌小鼠血清 IL-12、IL-10。**结果** “脾气虚”可明显影响肺癌小鼠血清 IL-12、IL-10 的表达; 加味黄芪建中汤可下调肺癌小鼠血清 IL-10 ($P < 0.05$) 的表达, 上调肺癌小鼠血清 IL-12 ($P < 0.05$) 的表达。**结论** “脾气虚”可导致肺癌小鼠 Th 细胞的异常漂移, 可能是肺癌小鼠免疫调节紊乱的一种表现失调; 加味黄芪建中汤有助于恢复肺癌小鼠免疫调节。

关键词: 脾气虚; 加味黄芪建中汤; IL-12; IL-10

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)04-0010-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.04.003

加味黄芪建中汤是从临床实践总结的处方, 具有较好的抗肿瘤作用。本实验通过观察加味黄芪建中汤对肺癌小鼠血清 IL-12、IL-10 的影响, 初步探讨其对肿瘤的抑制效果及机制。

1 材料

1.1 动物

健康 C57BL/6 小鼠 50 只, 合格证号 0001462, 雌性, 体质量 18~22g, 小鼠 Lewis 肺癌瘤株, 浙江中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药物及试剂

IL-12, IL-10, 生工生物工程(上海)股份有限公司。(1)加味黄芪建中汤: 黄芪 9g, 白芍 18g, 桂枝 9g, 甘草 6g, 生姜 10g, 大枣 10g, 饴糖 30g, 浙贝母 10g, 白花蛇舌草 30g, 仙鹤草 12g, 经水煎、过滤、灭菌, 制成含生药 1.00g/mL 的药液; 共 144g 购自浙江中医药大学中医门诊部。加味黄芪建中汤灌胃, 每日 0.4mL/20g。按照《中药药理研究方法学》计算小鼠的等效剂量: $144 \div 60 \times 9.01 = 21.624\text{g/kg}$ 。(2)大黄浓缩液: 大黄 300g (药物购自浙江中医药大学中医门诊部), 打粉。按 1:6, 300g 大黄粉加水 1800mL, 50℃水浴箱里水浴

4h, 每小时搅拌 1 次, 得 1 200mL 大黄溶解液, 将大黄水溶液置于负压旋蒸仪中, 设定温度 50℃, 负压浓缩成 300mL 大黄液, 浓度为 1g/mL, 在 4℃冰箱保存备用。大黄液灌胃, 每日 1mL/20g。

1.3 仪器与设备

酶标仪

2 方法

2.1 分组

随机将实验小鼠分为 5 组: 正常组, 脾气虚组, 肿瘤组, 肿瘤脾虚组, 肿瘤黄芪组。依据文献资料, 采用大黄浓缩建立脾气虚模型。

2.2 模型建立

依据文献资料, 采用成熟模型方法, 采用大黄浓缩煎剂泻下败胃, 并结合劳则气耗, 损耗脾气的方法造模。50 只 C57BL/6 小鼠, 雌性, 体质量 (18 ± 2)g, 许可证号: scxK(黑)2006008。在动物实验中心常规适应饲养一周后, 随机取 20 只小鼠在正常环境下饲养, 其余 30 只小鼠采用苦寒泻下法造脾气虚模型 (大黄浓缩液灌胃, 每只小鼠每次 1mL/20g, 每日 1 次), 同时每日游泳、隔日节食 (下午 4:00-第 2 日早晨 8:

* 基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LY16H270014; LY13H270010); 衢州市指导性科技计划项目 (2016130)

收稿日期: 2017-07-05

作者简介: 魏自太 (1971-), 男, 甘肃平凉人, 博士, 副教授, 研究方向: 中医药治疗肿瘤疾病。E-mail: wztyang@163.com

30),连续 10d。在脾气虚模型建成后,给正常组 10 只和脾气虚模型组 20 只小鼠接种肿瘤,建立 Lewis 肺癌模型。取传代后第 13 天的 C57 荷瘤小鼠新鲜无坏死 Lewis 肿瘤组织,制成肿瘤细胞悬液;用生理盐水调整为 1×10^7 个/mL;取上述肿瘤细胞悬液 0.2mL,接种于小鼠右腋部皮下。

2.3 给药方法

①正常组:生理盐水灌胃,1次/d,每次 0.4mL/d;②脾气虚组:生理盐水灌胃,每次 0.4mL/d;③肺癌组:生理盐水灌胃,1次/d,每次 0.4mL/d;④脾气虚肺癌组:生理盐水灌胃,1次/d,每次 0.4mL/d;⑤脾气虚肺癌黄芪组:中药加味黄芪建中汤灌胃,1次/d,每次 0.4mL/d;脾气虚证肺癌模型建立后,各组按以上方法给药,连续 9d 后,进食不禁水 12h,第 10 天脱颈椎处死小鼠。

2.4 指标检测

酶标仪检各组小鼠血清 IL-10、IL-12,各组小鼠在第 10 天处死后,眼球取血,用双抗体夹心法测定标本中小鼠血清 IL-10、IL-12 水平,用纯化的小鼠 IL-10、IL-12 抗体包被微孔板,制成固相抗体,用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度(OD 值),通过标准曲线计算样品中 IL-10、IL-12 浓度。

2.5 统计学方法

采用统计软件包 SPSS21.0 版统计,计量资料两组间比较用 *t* 检验,多组间比较用方差分析;计量资料数值用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

3 结果

3.1 加味黄芪建中汤对 Lewis 肺癌小鼠瘤重的影响

本实验结果显示:各组小鼠移植瘤瘤重。统计学分析,脾气虚肺癌黄芪组瘤重轻于脾气虚肺癌组($P < 0.01$);与肺癌组相比,脾气虚肺癌组瘤重较大($P < 0.05$),脾气虚肺癌黄芪组瘤重与肺癌组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 不同组别小鼠肺癌瘤体质量($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量/ <i>n</i>	瘤重/g	瘤抑制率/%
肺癌组	8	2.27 ± 0.91	
脾气虚肺癌组	8	$3.02 \pm 0.48^{\Delta}$	
脾气虚肺癌黄芪组	8	$1.69 \pm 0.37^{**}$	25.62

注:与肺癌组相比, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{*}P > 0.05$;与脾气虚肺癌组相比, $^{*}P < 0.01$

3.2 黄芪建中汤对各组 Lewis 肺癌小鼠血清 IL-10、IL-12 水平表达的影响

实验结果显示:脾气虚肺癌组血清 IL-10 表达水平最高,肺癌组次之,脾气虚肺癌黄芪组,脾虚组逐渐降低,接近正常组。脾气虚肺癌组与肺癌组相比, $P < 0.05$;肺癌组与脾气虚肺癌黄芪组相比 $P < 0.05$,脾气虚肺癌组与脾气虚肺癌黄芪组相比 $P < 0.01$ 。脾气虚肺癌组血清 IL-12 表达水平最低,肺癌组,脾气虚肺癌黄芪组,脾虚组逐渐升高,接近正常组。脾气虚肺癌组与肺癌组相比, $P < 0.05$;肺癌组与脾气虚肺癌黄芪组相比 $P < 0.05$,脾气虚肺癌组与脾气虚肺癌黄芪组相比 $P < 0.01$ 。见表 2。

表 2 不同组别小鼠血清 IL-10、IL-12 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数/ <i>n</i>	IL-10/pg·mL ⁻¹	IL-12/ng·L ⁻¹
正常组	8	402.80 ± 18.84	5.92 ± 0.09
脾虚组	8	$527.14 \pm 26.32^{\Delta*}$	$5.57 \pm 0.17^{\Delta*}$
脾气虚肺癌组	8	$679.83 \pm 14.66^{\Delta*}$	$3.85 \pm 0.19^{\Delta*}$
肺癌组	8	$641.92 \pm 21.03^{\Delta*}$	$4.25 \pm 0.20^{\Delta*}$
脾气虚肺癌黄芪组	8	$564.27 \pm 14.05^{\Delta*}$	$4.79 \pm 0.50^{\Delta*}$

注:和正常组相比, $^{\Delta}P < 0.05$;和脾气虚肺癌组相比, $^{*}P < 0.05$;和脾气虚肺癌黄芪组相比, $^{*}P < 0.01$

4 讨论

在肿瘤的免疫反应中,细胞因子具有重要作用,Th0、Th1 和 Th2 是辅助 T 淋巴细胞的 3 个亚群。其产生的细胞因子不同,具有不同的作用,一般情况下,Th1 与 Th2 细胞互为拮抗,共同维持机体生理平衡,如果这种平衡被打破,会出现偏向 Th1 或 Th2 优势的漂移状态。Th1/Th2 漂移与肿瘤的发生、发展和恶性程度相关^[1]。

其中 Th2 分泌 IL-10 等细胞因子,IL-10 是细胞因子合成抑制因子,它能抑制 Th1 型细胞产生细胞因子 IL-2,IFN- γ ,从而抑制了细胞免疫应答^[2],机体免疫功能的紊乱及某些疾病的病理损伤就是由其水平异常所引起的,其在抗肿瘤治疗中起重要作用^[3]。

IL-12 由巨噬细胞、树突状细胞等合成,具有促进 Th0 细胞向 Th1 细胞转化,能启动 Th1 细胞免疫反应,在抗肿瘤免疫中发挥正向调节作用。Th2 分泌 IL-10,IL-10 是一种负调控因子,其抑制 IL-12 的合成,从而对 Th1 介导的细胞免疫起到抑制作用,因此选择 Th1 型细胞因子 IL-12 和 Th2 型细胞因子 IL-

10 作为检测指标,来判断 Th1/Th2 的平衡。

从试验结果分析,脾气虚肺癌组血清 IL-10 表达水平最高,肺癌组次之,脾气虚肺癌黄芪组,脾虚组逐渐降低,接近正常组。说明在移植肿瘤基础上的脾气虚肺癌组血清 IL-10 发挥负调控作用,其抑制 IL-12 的合成,所以脾气虚肺癌组 IL-12 含量最低,抑制小鼠的免疫功能,Th1/Th2 平衡紊乱,Th2 占优势地位;而加味黄芪建中汤干预后,血清 IL-12 含量增加,同时促进 Th1 细胞免疫,同时血清 IL-10 含量降低,说明 Th2 被抑制,机体免疫反应向 Th1 方向漂移,小鼠肿瘤生长受到抑制。

因此,加味黄芪建中汤具有益气温中,调和阴阳之效,中医药作用靶点多,不易耐药,现代医学研究也发现黄芪建中汤及其组成药物的提取物具有广泛的抗癌作用,孙文^[4]发现中药桂枝的水提取物是一种天然的基质金属蛋白酶抑制剂;可以多药物、多靶点抑制大肠癌移植瘤的增殖和转移,抑制新生血管的形成,并可在体外显著抑制肿瘤细胞的粘附、侵袭和转移,促进大肠癌细胞凋亡;抑制大肠癌的复发和扩散。张文^[5]发现贝母素甲及贝母素乙对乳腺癌细胞具有显著抑制作用,并可有效降低炎性相关因子分泌及其 mRNA 相对表达量,能够对乳腺癌细胞炎性微环境起到调控作用。吴文^[6]发现白花蛇舌草含有白花蛇舌草素、多糖类、黄酮、三萜类、甾醇类等多种抗肿瘤活性成分,其主要通过诱导肿瘤细胞凋亡、产生超氧化物、影响癌基因表达、增强免疫功能、干扰肿瘤细胞能量代谢等多种途径起到抗肿瘤的作用。巴文^[7]发现仙鹤草水提液可干扰肿瘤细胞周期进程,阻滞肿瘤细胞由 G1+G0 期向 G2+M 期转化,抑制瘤体增殖,提高机体免疫功能。李文^[8]发现黄芪注射液各组可不同程度地提高荷瘤小鼠血清中 IL-2 和 TNF- α 的水平,其对小鼠移植瘤具有明显的抑瘤作用,其作用可能与增强机体的免疫功能有关。尹文^[9]发现黄芪提取物可抑制人胃癌 SGC-7901 细胞体外增殖且通过线粒体途径诱导其凋亡。

加味黄芪建中汤可能是通过提高血清 IL-12,降低血清 IL-10 的含量,从而起到调节细胞免疫功能抑制荷瘤小鼠肿瘤生长的作用。当然,中药复方成分复杂,多从多靶点、多途径抑制肿瘤的生长而发挥作用,其中黄芪多糖能抑制荷瘤小鼠皮下黑色素瘤的生长,进而增强小鼠 T 淋巴细胞抗肿瘤免疫活性^[10]。

健脾解毒方能够抑制湿热证结肠癌小鼠肿瘤的生长、延长荷瘤鼠生存时间^[11]。苏文研究也发现中晚期非小细胞肺癌患者以气虚为主^[12]。这与临床发现肺癌患者脾气虚最为多见是切合的,而健脾是中医药防治肺癌转移的基本治则之一^[13]。从中医角度分析晚期肿瘤患者易于耗伤正气,易致痰凝、血瘀等^[14]。丛文^[15]采用“饮食不节+疲劳过度”复合方法造模后,研究脾气虚模型小鼠造血干细胞因子对红系造血系统的作用,为脾为气血生化之源提供了科学依据。段文^[16]观察脾虚证进程中小鼠特异性/非特异性免疫功能低下,小鼠腹腔巨噬细胞吞噬率和吞噬指数,T、B 淋巴细胞增殖反应及 NK 细胞活性的功能低下。这些研究都从不同的角度说明了中药对脾气虚模型小鼠免疫功能的影响,我们的研究进一步说明了此问题。

参考文献:

- [1] 张圣林,邱法波,吴力群. Th1/Th2 偏移与恶性肿瘤关系的研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志,2005,21 (Suppl): 113-114.
- [2] 陶义训. 免疫学和免疫学检验 [J]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,1997: 50-59.
- [3] Huang M, Wang J, Lee P, et al. Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern [J]. Cancer Research, 1995, 55 (17): 3847-3853.
- [4] 孙鹏达. 桂枝抑制基质金属蛋白酶活性及抗大肠癌机制研究 [D]. 长春:吉林大学,2010.
- [5] 张玉人,林洪生,张英. 贝母素甲、贝母素乙对 4T1 乳腺癌细胞炎性微环境的干预调节作用 [J]. 中国中医基础医学杂志,2014,20 (11): 1504-1506.
- [6] 吴逢选,周郁鸿,叶宝东. 白花蛇舌草抗肿瘤机制研究进展及其在血液病中的应用 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30 (1): 167-169.
- [7] 王莲,张荣泉. 仙鹤草不同提取物对肿瘤细胞作用的研究概况 [J]. 天津药学,2016,28 (4): 46-48.
- [8] 李连琨,匡文娟,黄云峰,等. 黄芪注射液对 H22 肝癌小鼠的抑瘤作用及免疫功能的影响 [J]. 四川生理科学杂志,2011,33 (1): 14-16.
- [9] 尹波,侯续伟,李迪诺,等. 黄芪提取物诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30 (6): 112-114.
- [10] 王洁茹,王金英,张婷婷,等. 黄芪多糖调节黑色素瘤小鼠 PD-1 /PD-Ls 分子表达的研究 [J]. 上海中医药大学学报,2014,28 (5): 74-79.

- [11] 丁宁, 杨宇飞, 刘羿男, 等. 健脾活血解毒法拆方含药血清对人大肠癌细胞 HCT-116 细胞的增殖抑制作用及其机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (11): 272-275.
- [12] 苏梅, 崔涛, 徐芳, 等. 扶正固本胶囊对小鼠免疫功能和抗应激作用的影响 [J]. 云南中医中药杂志, 2011, 32 (2): 58-60.
- [13] 唐武军, 王笑民. 郁仁存治疗肿瘤“内虚学说”初探 [J]. 北京中医药, 2011, 30 (3): 186-188.
- [14] 徐希宇. 中医药防治恶性肿瘤转移的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [15] 丛培玮, 尚冰, 史冰洁, 等. 脾气虚证模型小鼠骨髓 CD34+ 与血清 SCF 含量变化的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31 (4): 808-810.
- [16] 段永强, 成映霞, 程容, 等. 脾虚证进程中小鼠特异性/非特异性免疫功能变化及中药的干预作用 [J]. 中国老年学杂志, 2011, 31 (15): 2874-2876.
- (编辑: 徐建平)

The Expression of Serum IL-12 and IL-10 in Lung Cancer Mice with Spleen Qi Deficiency Syndrome and the Effect of Modified Huangqi Jianzhong Decoction

WEI Zitai¹, WANG Caiyun¹, BAO Suzhen², WU Zhongqin¹, JIANG Tao²

(1. Quzhou College of Technology, Quzhou 324000, China;

2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: **Objective** To study the expression of serum IL-12 and IL-10 in lung cancer mice with spleen Qi deficiency syndrome and the effect of modified Huangqi Jianzhong decoction. **Methods** Using bitter and cold, diarrhea, weary, dieting methods of modeling, after the establishment of mice spleen Qi deficiency syndrome and Lewis lung cancer model, according to the experimental design to process mice of each group. After modeling modified Huangqi Jianzhong decoction gavage, the mice were killed by taken off the cervical spine, and serum was collected. Tumor weight per mouse was noted, ELISA method was used to detect serum IL-12 and IL-10 in lung cancer mice. **Results** “Spleen Qi Deficiency” can significantly affect the expression of IL-12 and IL-10 in serum of lung cancer mice; Modified Huangqi Jianzhong decoction can down regulate the expression of IL-10, and increase the expression of IL-12 ($P < 0.05$) in serum of lung cancer mice. **Conclusion** “Spleen Qi Deficiency” can lead to abnormal drift of Th cells in lung cancer mice, which may be a expression disorder of immune regulation disorder of lung cancer mice, and Modified Huangqi Jianzhong decoction can help to restore immune regulation of lung cancer mice.

KEY WORDS: Spleen Qi Deficiency; modified Huangqi Jianzhong decoction; IL-12; IL-10