

黄芪多糖联合放疗对小鼠 H22 肝癌移植瘤的放射增敏及免疫功能的影响*

吕心明, 徐金芬, 闫呈新[△], 薛递新, 孙瑶瑶

(泰山医学院附属莱钢医院, 山东 莱芜 271126)

摘要: **目的** 探讨黄芪多糖联合放疗对小鼠 H22 肝癌皮下移植瘤的放射增敏作用及免疫功能的影响。**方法** 建立小鼠 H22 移植瘤模型, 将 50 只小鼠分为 A 组(对照组)、B 组(化疗组)、C 组(低剂量黄芪多糖联合化疗组)、D 组(中剂量联合化疗组)、E 组(高剂量联合化疗组), 观察各组小鼠肿瘤生长情况及免疫功能变化。**结果** 随着联合黄芪多糖药物浓度的增加, 肿瘤 3 倍增时间(TGT₃)、肿瘤生长延迟时间(TGD)以及增敏系数(EF)值均有所增加; 治疗 14d, 各治疗组小鼠瘤体重量均显著低于 A 组, 且 E 组小鼠瘤体重量明显低于其他各组($P < 0.05$), 随着黄芪多糖药物浓度的增加, 抑瘤率越高; 各治疗组小鼠平均生存期均显著长于 A 组($P < 0.05$), 且随着联合运用黄芪多糖药物浓度的增加, 小鼠平均生存期和生命延长率显著增加($P < 0.05$); 各治疗组小鼠免疫功能各指标均较 A 组显著降低($P < 0.05$)。**结论** 黄芪多糖联合放疗有增敏作用, 能够抑制肿瘤生长, 延长移植瘤小鼠生存期, 提高小鼠的免疫功能, 有一定的剂量依赖。

关键词: 黄芪多糖; 放射增敏; 肝癌; 免疫功能; 小鼠

中图分类号: R735.7

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)06-0009-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.06.003

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种常见的恶性消化道肿瘤, 据相关报道显示^[1-3], 放疗对肝癌的控制有着显著的疗效^[4-5]。但是由于放射性肝损伤以及患者肝脏对放射性的耐受性问题, 目前仍然不能够达到良好的治疗剂量^[6]。研究表明^[7-9], 黄芪多糖(APS)能够有效增强细胞免疫功能、抑制肿瘤的生长以及减少机体不良反应, 但是对于黄芪多糖对放疗的增敏作用尚无相关研究。本研究分析黄芪多糖联合放疗对小鼠 H22 移植瘤的增敏作用及对小鼠免疫功能的影响, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 SPF 级昆明小鼠, 6 周龄, 体质量(20 ± 5)g, 小鼠的许可证号: SCXK(渝)2012-0001, 购于重庆医科大学实验动物中心, 自由饮水和进食, 定期更换小鼠垫料。H22 腹水型肝癌细胞株由本实验室保种。

1.2 仪器材料

黄芪多糖(APS): 上海丰寿实业公司, 批号:

161015; DMEM 培养基: 美国 Gibco; 胎牛血清(FBS): 美国 Hyclone; EDTA: 美国 sigma 公司。

全自动血细胞分析仪: 日本光电工业株式会社; 游标卡尺: 日本三丰公司; 台式离心机: 北京医用离心机厂; 电子分析天平 JA5003: 上海精密科学仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠 H22 肝癌移植瘤模型建立

使用无菌生理盐水将 H22 细胞配制成浓度为 5×10^7 个/mL 的悬液, 取 3 只小鼠, 将此细胞悬液以 0.5mL/只接种小鼠腹腔, 8d 后抽取小鼠腹水并稀释至细胞浓度为 5×10^6 个/mL, 接种至第 3 次传代后收集小鼠腹水。使用生理盐水将细胞浓度稀释至 2×10^6 个/mL, 然后取 60 只小鼠, 皮肤消毒处理后将含有肿瘤细胞的混悬液注射到小鼠的右前肢腋后皮下, 剂量为 0.2mL, 此时可见皮丘隆起, 未出现瘤液漏出时将小鼠至于笼中继续饲养。接种 3d 后局部可见肿瘤结节, 当 1 周后结节体积在 0.8cm^3 表明造模成功。

* 基金项目: 山东省保健科技协会课题(2016BJ0014)

收稿日期: 2017-11-13

作者简介: 吕心明(1972-), 男, 山东莱芜人, 主管技师, 研究方向: 肿瘤放疗的研究。

[△]通信作者: 闫呈新, E-mail: petct001@163.com

1.3.2 放疗方法

小鼠腹腔麻醉后固定在泡沫板上, 头部偏向左侧, 右前肢固定于右上位, 肿瘤结节部位尽可能多的暴露在照射野区域, 并注意将小鼠的头部、肺部等置于照射野外, 整个肿瘤部位则应全部包含在照射野内, 放射治疗采用直线加速器 6 MV-X 线进行照射。

1.3.3 给药方法

50 只小鼠随机分为对照组 (A 组)、单纯放疗组 (B 组)、放疗联合小剂量黄芪多糖组 (C 组)、放疗联合中剂量黄芪多糖组 (D 组)、放疗联合高剂量黄芪多糖组 (E 组), 每组 10 只。A 组: 接种第 7d 起给予 15mg/kg/d 生理盐水腹腔注射; B 组: 接种第 7d 起给予 15mg/kg/d 生理盐水腹腔注射, 同时给予小鼠 5GyX 线放疗, 隔天 1 次; C 组: 接种第 7d 起给予 50mg/kg/d APS 腹腔注射, 同时给予小鼠 5GyX 线放疗, 隔天 1 次; D 组: 接种第 7d 起, 以 100mg/kg/d APS 腹腔注射, 给予小鼠 5GyX 线放疗, 隔天 1 次; E 组: 接种第 7d 起以 200mg/kg/d APS 腹腔注射, 给予小鼠 5GyX 线放疗, 隔天 1 次。

1.4 评价方法

1.4.1 肿瘤生长变化情况

每日观察各组小鼠瘤体的形态、质地、小鼠的活动情况, 记录各组小鼠肿瘤的最长径 (LD) 以及最短径 (SD), 直至治疗 14d。并计算小鼠肿瘤的体积 (V) $\text{mm}^3 = \text{LD} \times \text{SD}^2 / 2$ 。

1.4.2 肿瘤生长延缓时间及增敏系数

参照文献[10], 计算肿瘤体积达到放射治疗前 3 倍体积的时间, 即为肿瘤 3 倍倍增时间 (TGT₃); 计算小鼠肿瘤生长延迟时间 TGD = (实验组 - 对照组) TGT₃; 计算黄芪多糖不同剂量的增敏系数 (EF) = 各剂量联合放疗组 TGD / 单纯放疗组 TGD, EF > 1 该药物有放射增敏作用。

1.4.3 肿瘤生长抑制率

14d 后每组随机选取 4 只小鼠处死, 分别称量各组小鼠瘤体重, 计算抑瘤率 = (对照组 - 化疗组平均瘤体重量) / 对照组平均瘤体重量 × 100%。

1.4.4 小鼠生存期

14d 后各组剩余的 6 只小鼠等待其无干预死亡, 观察各组小鼠的生存期和生命延长率 = (治疗组平均生存天数 - 对照组平均生存天数) ÷ 对照组平均生存天数 × 100%, 绘制生存曲线。

1.4.5 免疫器官指数

14d 处死的小鼠体重、脾脏以及胸腺重量, 计算胸腺指数与脾指数。胸腺 (脾) 指数 (mg/g) = 胸腺 (脾) 质量 (mg) / 体质量 (g)。

1.4.6 小鼠吞噬功能

参照文献[11-12], 处死前 3d 使用 5% 淀粉肉汤激活小鼠巨噬细胞, 检测小鼠巨噬细胞的吞噬功能, 以 100 个巨噬细胞吞噬鸡红细胞的数量为吞噬率。

1.5 统计学分析

以采用 SPSS 22.0 进行数据处理, 计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用 F 检验, 生存分析采用 Kaplan-Meier 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肿瘤生长情况

见图 1, A 组小鼠肿瘤体积增加最快, 采用化疗的各组小鼠瘤体体积增加减慢, E 组肿瘤体积增长速度最慢。

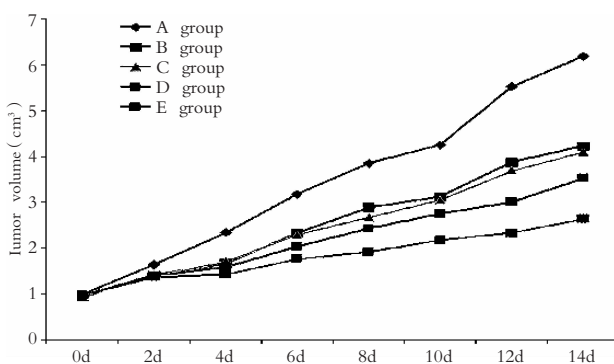


图 1 各组小鼠肿瘤生长情况

2.2 小鼠肿瘤生长延缓时间与增敏系数

与 A 组比较, 各组小鼠 TGT₃ 值明显延长, 联合黄芪多糖组小鼠 TGT₃ 值明显较 B 组延长, 且黄芪多糖浓度增加, TGT₃ 值延长越明显, 见表 1。

表 1 各组小鼠肿瘤 TGT₃、TGD 与 EF

组别	TGT ₃ /d	TGD/d	EF
A	5.48 ± 0.72	—	—
B	9.63 ± 0.94*	4.15	—
C	9.86 ± 1.02*	4.38	1.05
D	11.94 ± 1.48* [#] △	6.46	1.56
E	12.69 ± 1.64* [#] △	7.21	1.73

注: 与 A 组比较, * $P < 0.05$; 与 B 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 C 组比较, △ $P < 0.05$; 与 D 组比较, □ $P < 0.05$

2.3 小鼠瘤体重量及抑瘤率

治疗 14d 各组小鼠瘤体重量均低于 A 组, E 组小鼠瘤体重量低于其他各组, 在抑瘤率上, 随着黄芪多糖药物浓度的增加, 抑瘤率越高, 见表 2。

表 2 各组小鼠治疗 14d 瘤体重量及抑瘤率($\bar{x} \pm s$)

组别	瘤体重量/g	抑瘤率/%
A	2.36 $\pm$ 0.31	0.00
B	1.87 $\pm$ 0.21*	20.76
C	1.82 $\pm$ 0.19*	22.89
D	1.61 $\pm$ 0.24*	31.78
E	1.33 $\pm$ 0.12* Δ $\square$	43.64

注: 与 A 组比较, * P <0.05; 与 B 组比较, # P <0.05; 与 C 组比较, Δ P <0.05; 与 D 组比较, $\square$ P <0.05

2.4 生存期比较

治疗组小鼠平均生存期均长于 A 组, 随着联合运用黄芪多糖药物浓度的增加, 小鼠平均生存期和生命延长率显著增加, 见表 3。

表 3 各组小鼠生存期及生命延长率($\bar{x} \pm s$)

组别	平均生存期/d	生命延长率/%
A	17.64 $\pm$ 1.28	0.00
B	23.52 $\pm$ 1.83*	33.33
C	23.23 $\pm$ 2.12*	31.69
D	29.09 $\pm$ 2.85* Δ	64.91
E	37.25 $\pm$ 2.28* Δ $\square$	111.16

注: 与 A 组比较, * P <0.05; 与 B 组比较, # P <0.05; 与 C 组比较, Δ P <0.05; 与 D 组比较, $\square$ P <0.05

2.5 免疫功能比较

化疗后各组小鼠免疫功能各指标均显著降低, 而联合运用黄芪多糖后, 则可增加小鼠免疫功能各指标, 且随着黄芪多糖药物浓度的增加, 见表 4。

表 4 各组小鼠免疫功能比较($\bar{x} \pm s$)

组别	胸腺指数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	脾脏指数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	吞噬率/ %	吞噬指数
A	6.14 $\pm$ 0.27	2.09 $\pm$ 0.18	25.28 $\pm$ 3.10	1.77 $\pm$ 0.23
B	5.15 $\pm$ 0.53*	1.78 $\pm$ 0.12*	19.64 $\pm$ 2.68*	1.32 $\pm$ 0.19*
C	5.23 $\pm$ 0.45*#	1.94 $\pm$ 0.21	23.19 $\pm$ 3.06	1.56 $\pm$ 0.25
D	6.08 $\pm$ 0.54#	2.13 $\pm$ 0.14#	26.03 $\pm$ 2.97#	1.80 $\pm$ 0.21#
E	6.41 $\pm$ 0.31# Δ	2.43 $\pm$ 0.22*# Δ $\square$	28.74 $\pm$ 2.66# Δ	1.97 $\pm$ 0.24#

注: 与 A 组比较, * P <0.05; 与 B 组比较, # P <0.05; 与 C 组比较, Δ P <0.05; 与 D 组比较, $\square$ P <0.05

3 讨论

放射治疗是一种有效控制肿瘤的局部治疗方案, 但部分肿瘤对辐射不敏感, 如何增加肿瘤细胞对放疗的敏感性, 并降低放疗的毒副作用, 是目前临床研究的重点方向^[13-15]。黄芪是中医学传统的扶正固本类中药, 在临床中有广泛的运用价值, 其成分主要以黄芪多糖类以及黄芪皂苷类物质为主, 有增强机体免疫功能的作用^[16]。

对照组小鼠肿瘤体积增加最快, 采用化疗的各组小鼠瘤体体积增加减慢, 其中高剂量黄芪多糖联合化疗组小鼠肿瘤体积增长速度最慢, 表明采取化疗能够显著抑制肿瘤体积的增长, 而黄芪多糖能够辅助化疗, 进一步提高对肿瘤体积的抑制作用^[17], 且药物浓度增大, 其作用更为显著。随着联合黄芪多糖药物浓度的增加, 小鼠肿瘤 TGT₃、TGD、EF 均有所增加, 并且低剂量黄芪多糖联合化疗组 EF 值为 1.05、中剂量黄芪多糖联合化疗组 EF 值为 1.56、高剂量黄芪多糖联合化疗组 EF 值为 1.73, 表明放疗联合黄芪多糖, 能够有效延缓肿瘤的生长, 三组 EF 值均大于 1, 表明黄芪多糖有放射增敏作用, 而高剂量黄芪多糖联合化疗组 EF 值大于 1.6, 表明高剂量黄芪多糖有良好的放射增敏作用^[18]。从各组小鼠抑瘤率上看, 仍然表明随着黄芪多糖药物浓度的增加, 其抑瘤率显著增加。各组治疗组小鼠平均生存期均显著长于对照组, 且随着联合运用黄芪多糖药物浓度的增加, 小鼠平均生存期和生命延长率显著增加, 表明放射治疗能够有效延长移植瘤小鼠的生存期, 而联合运用黄芪多糖后, 其作用更加显著。在对移植瘤小鼠免疫功能的观察中, 化疗治疗后, 各组小鼠免疫功能各指标均显著降低, 而联合运用黄芪多糖后, 则可增加小鼠免疫功能各指标, 且随着黄芪多糖药物浓度的增加, 小鼠免疫功能提高状况越佳^[19], 表明化疗可对小鼠的机体免疫功能造成一定的影响, 而联合运用黄芪多糖后, 则可有效提高化疗小鼠的免疫功能, 且黄芪多糖药物浓度增加, 其免疫功能改善情况更加, 黄芪多糖对机体免疫功能的改善, 与大部分研究结果相似, 同时其对免疫功能的影响可能是其辅助抑制肿瘤生长、延长生存期的机制之一^[20]。

综上所述, 黄芪多糖联合放疗能够有效有放射增敏作用, 能够有效抑制肿瘤生长、延长移植瘤小鼠生存期、提高小鼠的免疫功能, 且疗效有一定的剂量依赖。

参考文献:

- [1] 龚敏, 任庆兰. β -榄香烯对小鼠乳腺癌移植瘤放疗的增敏效果及对血管形成的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 23(18): 1859-1862.
- [2] Borena W, Strohmaier S, Lukanova A, et al. Metabolic risk factors and primary liver cancer in a prospective study of 578,700 adults[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(1): 193-200.
- [3] 刘伟, 徐鑫, 王英芳, 等. 光敏剂喜泊分对 H22 肝癌小鼠移植瘤的放射增敏效果 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(23): 5841-5844.
- [4] Law AL, Ng WT, Lee MC, et al. Treatment of primary liver cancer using highly-conformal radiotherapy with kV-image guidance and respiratory control [J]. *Radiother Oncol*, 2012, 102(1): 56-61.
- [5] Jung SH, Yoon SM, Park SH, et al. Four-dimensional dose evaluation using deformable image registration in radiotherapy for liver cancer [J]. *Med phys*, 2013, 40(1): 011706.
- [6] 王维, 段碧霞, 曾丽. PARP 抑制剂对 Lewis 肺癌细胞及移植瘤放疗增敏作用及其机制 [J]. 中国肺癌杂志, 2016, 19(1): 16-23.
- [7] Guo L, Bai SP, Zhao L, et al. Astragalus polysaccharide injection integrated with vinorelbine and cisplatin for patients with advanced non-small cell lung cancer: effects on quality of life and survival [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(3): 1656-1662.
- [8] Zhao M, Zhang ZF, Ding Y, et al. Astragalus polysaccharide improves palmitate-induced insulin resistance by inhibiting PTP1B and NF- κ B in C2C12 myotubes [J]. *Molecules*, 2012, 17(6): 7083-7092.
- [9] 刘淑珍, 张卿. 选择性 COX-2 抑制剂尼美舒利对肺癌放射治疗增敏作用及其机制研究 [J]. 国际呼吸杂志, 2016, 36(11): 823-828.
- [10] Zan R, Selivan G, Christen CL, et al. PRIMA-1Met/APR-246 induces apoptosis and tumor growth delay in small cell lung cancer expressing mutant p53 [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(9): 2830-2841.
- [11] Jambo KC, Banda DH, Kankwatira AM, et al. Small alveolar macrophages are infected preferentially by HIV and exhibit impaired phagocytic function [J]. *Mucosal Immunol*, 2014, 7(5): 1116-1126.
- [12] Fossat L, Ling GS, Cortini A, et al. Phagocytosis is the main CR3-mediated function affected by the lupus-associated variant of CD11b in human myeloid cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57082.
- [13] 林秀欣, 李春鸣, 饶建, 等. 顺铂与紫杉醇同期联合放疗治疗局部晚期鼻咽癌临床疗效比较 [J]. 海南医学, 2016, 27(16): 2693-2695.
- [14] Kunz M, Thon N, Eigenbrod S, et al. Hot spots in dynamic (18)FET-PET delineate malignant tumor parts within suspected WHO grade II gliomas [J]. *Neuro Oncol*, 2011, 13(3): 307-316.
- [15] 王正安, 刘燕青, 黄飞, 等. 不同增敏药物联合放疗治疗恶性肿瘤的临床效果分析 [J]. 肿瘤药学, 2017(3): 364-369.
- [16] 向元伟, 刘卫红, 吴娟, 等. 汉黄芩苷对鼻咽癌裸鼠移植瘤模型的放疗增敏作用及其机制研究 [J]. 中国耳鼻喉咽喉底外科杂志, 2016, 22(5): 383-387.
- [17] 和劲光. 增敏药剂联合放疗在肿瘤治疗中的效果分析 [J]. 中外医学研究, 2016, 14(12): 57-58.
- [18] 蔡亮, 李光. 埃克替尼联合放疗对鼻咽高分化鳞癌细胞系的增敏效应 [J]. 中国新药与临床杂志, 2015, 32(8): 626-629.
- [19] Li Z, Tuteja G, Schug J, et al. Foxa1 and Foxa2 are essential for sexual dimorphism in liver cancer [J]. *Cell*, 2012, 148(1): 72-83.
- [20] 唐心宇, 曹远东, 孙新臣. CXCL12 受体抑制剂调控三阴性乳腺癌放射治疗的敏感性 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2017, 23(11): 973-977.

(编辑:徐建平)

Effect of Astragalus Polysaccharide Combined with Radiotherapy on Radiosensitivity and Immune Function of Transplanted Tumor in Mice

LYU Xinming, XU Jinfen, YAN Chengxin, XUE Dixin, SUN Yaoyao
(Lai-Gang Hospital Affiliated to Taishan Medical College, Laiwu 271126, China)

ABSTRACT: Objective To explore the effects of astragalus polysaccharide combined with radiotherapy on radiosensitization of H22 transplanted hepatocarcinoma and immunologic function in mice. **Methods** Establishment of mouse H22 transplanted tumor model, 50 mice were divided into A group (control group), B group (chemotherapy group), group C (low dose of Astragalus Polysaccharides combined with chemotherapy group), group D (middle dose chemotherapy group), E group (Gao Jiliang chemotherapy group), the growth situation and change observation on the immune function of tumor mice. **Results** With the increase of drug concentration combined with astragalus polysaccharide, TGT₃, TGD and EF values were increased; treatment of 14d, the tumor weight of mice in treatment group were lower than A group and E group, and lower than the other groups, with the increase of drug concentration of Astragalus, the inhibition rate is higher; the average survival period of all treatment groups were longer than that of group A, and with the increase of drug combined with astragalus; the index of immune function in mice in each treatment group were lower than those in A group, and the combined use of Astragalus polysaccharide. **Conclusion** Astragalus polysaccharide combined with radiotherapy has radiosensitizing effect, can inhibit tumor growth, prolong the survival time of mice with transplanted tumor and increase the immunological function of mice.

KEY WORDS: astragalus polysaccharide; radiosensitivity; hepatocellular carcinoma; immunological function; mouse

(原文见第 1 页)

Influences of Yiqi Huoxue Decotion and Bushen Shengsui Decotion on Related Proteins in Rats with Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion

XU Wei¹, WANG Lina², WANG Jian², HU Jianpeng², HE Ling², TAN Hui², WANG Yuanmao¹
(1. Medical Information Engineering Institute, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China;
2. Key Laboratory of Xin'an Medicine Jointly Developed by Ministry of Education and Anhui Province, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the influences of Yiqi Huoxue Decotion and Bushen Shengsui Decotion on protein expressions of Jagged1、Notch4 and Hes1 in hippocampus and frontal cortex of rats with cerebral ischemia reperfusion injury. **Methods** The rat model of focal cerebral ischemia/reperfusion was established by using suture method for inducing middle cerebral artery occlusion (MCAO), the rats were randomly divided into sham group, model group, Yiqi Huoxue Decotion group (Y group) and Bushen Shengsui Decotion group (B group). After ischemia for 2h and reperfusion, The hippocampus and frontal cortex of ischemic side were taken tissue samples in 7d and 14d. The protein expressions of Jagged1、Notch4 and Hes1 in hippocampus and frontal cortex were detected by using Western Blot. **Results** The value of Jagged1、Notch4 and Hes1 protein expressions in model group were higher than that in sham group in 7d and 14d ($P<0.05$), the value of Jagged1、Notch4 and Hes1 protein expressions in Y group and B group were lower than that in model group in 7d and 14d ($P<0.05$), the value of Jagged1、Notch4 protein expressions are significant difference between Y group and B group in 7d and 14d ($P<0.05$). **Conclusion** Yiqi Huoxue Decotion and Bushen Shengsui Decotion can regulate the Notch signaling pathway, affect the proliferation and differentiation of endogenous neural stem cells after cerebral ischemia, make them differentiated into neurons more through reducing protein expressions of Jagged1、Notch4 and Hes1 in hippocampus and frontal cortex.

KEY WORDS: Yiqi Huoxue Decotion; Bushen Shengsui Decotion; Cerebral ischemia/reperfusion; Jagged1; Notch4; Hes1