

泰山山慈菇对小鼠肝癌的治疗作用及相关免疫机制研究

修朋程,李 腾,李雅林,刘纪豪,李 栋,刘有旺

(泰山医学院,山东 泰安 271000)

摘要:目的 探讨泰山山慈菇对小鼠肝癌的免疫治疗作用。方法 本课题首先制备泰山山慈菇提取液,体外用山慈菇提取液对 H22 肝癌细胞进行干预,分为空白组、山慈菇提取液低、中、高剂量组和 5-氟尿嘧啶阳性对照组,干预 12 h 后,Annexin V 和 7-AAD 染色,流式细胞术检测细胞凋亡。体内制备小鼠 H22 实体瘤肝癌模型,将 50 只小鼠分为山慈菇低、中、高剂量组、5-Fu 阳性对照组、模型对照组,每组 10 只。山慈菇各剂量组均进行灌胃治疗,模型组灌胃等体积生理盐水,5-Fu 阳性对照组进行等体积腹腔注射。连续 10 d,停药后次日摘取小鼠眼球取血后颈椎脱臼处死小鼠,检测小鼠肿瘤大小分析对肿瘤的抑制作用。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-2(IL-2)和 γ -干扰素(IFN- γ)的含量。结果 泰山山慈菇提取液体外促进 H22 肿瘤细胞凋亡且具有剂量依赖性。体内抑制 H22 肿瘤的生长,增加血清中 TNF- α 、IL-2 和 IFN- γ 的含量且呈现剂量依赖性。结论 泰山山慈菇通过增加抗肿瘤细胞因子产生发挥抗肿瘤作用。

关键词:泰山山慈菇;肝癌;肿瘤坏死因子- α ;白细胞介素-2; γ -干扰素

中图分类号:R392.3

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2018.09.003

文章编号:1006-1959(2018)09-0008-04

Study on the Therapeutic Effect and Mechanism of Taishan Mountain Mushroom on Liver Cancer in Mice

XIU Peng-cheng,LI Teng,LI Ya-lin,LIU Ji-hao,LI Dong,LIU You-wang

(Taishan Medical College,Tai'an 271000,Shandong,China)

Abstract:Objective To investigate the immunotherapy effect of Taishan mountain mushroom on liver cancer in mice.Methods We first prepared the Taishan mountain mushroom extract.In vitro,the H22 hepatoma cells were treated with the extract of mushroom extract in vitro.It was divided into blank group,low,middle and high dose group and 5-fluorouracil positive control group.After 12 h intervention,Annexin V and 7-AAD were stained,and cell apoptosis was detected by flow cytometry.The mice model of H22 solid tumor was prepared in vivo,and 50 mice were divided into low,medium and high dose group,5-Fu positive control group and model control group,with 10 rats in each group.The rats in each dose group were treated by intragastric perfusion,and the model group was given iso-volume intraperitoneal injection of normal saline and 5-Fu positive control group.For 10 d,the mice were killed the next day after extirpation of eyeball and blood,and the inhibitory effect of tumor size analysis on the tumor was detected.Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)was used to detect the levels of TNF- α ,IL-2 and IFN- γ in serum.Results The extract of Taishan mountain mushroom promoted the apoptosis of H22 tumor cells in a dose-dependent manner.In vivo,the growth of H22 tumor was inhibited and the levels of TNF- α ,IL-2 and IFN- γ in serum increased.Conclusion Taishan mountain mushroom plays an anti-tumor role by increasing the production of anti-tumor cytokines.

Key words:Taishan mountain mushroom;Liver cancer;Tumor necrosis factor - α ;Interleukin-2; γ -interferon

肝癌是死亡率较高、五年生存率较低、恶性程度极高的肿瘤疾病之一。肝癌的治疗主要有手术、放疗、化疗等治疗方法^[1]。放疗、化疗对机体毒副作用较大,探讨中药对肝癌的治疗作用是当前研究的热点。山慈菇是常用的抗肿瘤中药之一。泰山山慈菇资源丰富,而其药用价值远远没有得到开发。据记载,山慈菇为中国药典收录的常用中药,中医临床上常

基金项目:1. 教育部 2016 年大学生创新创业训练计划项目(编号:201610439237);2. 泰安市科技发展计划(编号:2016NS1086,2015NS2168)

作者简介:修朋程(1995.6-),男,山东威海人,本科在读,研究方向:中草药的抗肿瘤治疗

通讯作者:刘有旺(1974.5-),男,山东茌平人,硕士,实验师,研究方向:中草药的抗肿瘤治疗

用于治疗乳腺癌、食管癌、胃癌等恶性肿瘤等^[2,3],但其对于肝癌的作用效果鲜有研究,限制其在临床上的应用。其是否通过增强免疫作用抗肿瘤也不清楚。本研究首先采用醇提法制备泰山山慈菇提取液。体外观察泰山山慈菇提取液是否对 H22 细胞具有促凋亡作用,在此基础上制备小鼠 H22 实体瘤肝癌模型,体内检测其对 H22 荷瘤小鼠肿瘤生长的影响及对血清 TNF- α 、IL-2 和 IFN- γ 含量的影响,探讨其可能的抗肿瘤免疫作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

1.1.1 动物 健康雄性 C57BL/6 小鼠,鼠龄 8 周龄,体重 18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公

司。饲养于泰山医学院实验动物中心,所有动物实验均得到泰山医学院动物伦理委员会许可。

1.1.2 细胞及试剂 H22 肝癌细胞株购自上海索尔生物科技有限公司。5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)购自上海迈瑞尔化学技术有限公司。小鼠 TNF- α 、IL-2 和 IFN- γ ELISA 试剂盒均购自 eBioscience 公司。胎牛血清(杭州四季青生物工程材料公司), DMEM 液体培养基(Gibco 公司), AnnexinV/7-AAD 双染细胞凋亡检测试剂盒(Biolegend 公司),其他试剂均为国产分析纯。泰山山慈菇购自山东省泰安市金泰联药店。

1.2 方法

1.2.1 泰山山慈菇乙醇提取液 制备参照文献报道方法^[2],并加以改进。制备方法:将 150 g 泰山山慈菇粉碎,加入 500 ml 双蒸水煮沸后过滤,药渣再煮 2 次,合并 3 次滤液。将 3 次滤液煎熬浓缩成 500 ml,药液冷却后,边搅拌边缓慢加入无水乙醇至药液含醇量为 50%~60%,4℃密封 48 h 后过滤,然后用 95%乙醇洗涤沉淀,收集滤液。滤液经旋转蒸发仪回收得深棕色浸膏。用 DMEM 培养基溶解成 10 mg/ml 的溶液,0.22 μ m 的滤器过滤除菌后分装存于-20℃备用。

1.2.2 流式细胞术检测细胞凋亡 将 H22 细胞置于 5%CO₂、37℃培养箱中,用含 10%小牛血清的 DMEM 培养基培养,将传代后 2 d 处于对数生长期的细胞以 1×10^5 cells/ml 密度接种于 96 孔平底培养板中,每孔 100 μ l,培养 24 h 后,将细胞分成 5 组(空白对照组,5-Fu 阳性对照组,山慈菇低、中、高剂量组),每组 5 个复孔,对照组加入 5-Fu(终浓度 0.5 mg/ml),泰山山慈菇低、中、高剂量组(终浓度分别为 0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml),空白组加入等体积培养基。处理 12 h 后,按照 AnnexinV/7-AAD 试剂盒说明书操作,对细胞进行处理及染色,流式细胞仪(Aria II, BD 公司)检测细胞凋亡。

1.2.3 小鼠 H22 肝癌模型的建立 参照文献方法^[4],用 DMEM 培养基培养 H22 肝癌细胞,于细胞对数期收集细胞,用生理盐水将细胞浓度调整为 1×10^7 cells/ml 制成细胞悬液,接种 200 μ l 于小鼠右腋窝皮下,接种后出现米粒大的鼓包视为接种成功。

1.2.4 动物分组及处理 将小鼠分为模型组,山慈菇多糖低、中、高剂量组,5-Fu 阳性对照组,每组 10 只。模型组接种 H22 肝癌细胞 24 h 后,灌胃 0.2 ml 生理盐水,泰山山慈菇低、中、高剂量组分别灌胃

300 mg/kg、600 mg/kg 和 900 mg/kg 山慈菇提取液 0.2 ml,阳性对照组灌胃 5-Fu 25 mg/kg 溶液 0.2 ml。1 次/d,连续给药 10 d。

1.2.5 抑瘤率的检测 停药后次日,摘眼球取血后,颈椎脱臼处死小鼠,立即完整剥离瘤块,称量瘤块重量,计算各组平均瘤块重量及抑瘤率,抑瘤率(%)=[1-(给药组平均瘤重/模型对照组平均瘤重)] \times 100%。

1.2.6 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清细胞因子含量 停药次日摘除眼球法取血,常规方法分离血清,按照小鼠 TNF- α 、IL-2 和 IFN- γ ELISA 试剂盒说明操作,酶标仪(Tecan, Infinite M200 Pro)测定小鼠血清中 TNF- α 、IL-2 和 IFN- γ 的含量。

1.3 统计学分析 采用 SPSS18.0 软件系统进行分析,实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 为统计学意义显著。

2 结果

2.1 泰山山慈菇对 H22 肝癌细胞早期凋亡作用的影响 为了探讨泰山山慈菇是否具有抗肝癌的作用,我们首先培养肝癌细胞株 H22 细胞,然后用泰山山慈菇处理 H22 肝癌细胞,Annexin V、7-AAD 染色,流式细胞仪检测对细胞凋亡的影响,发现药物处理细胞 12 h 后,5-Fu 阳性对照组细胞早期凋亡率为 27.00%,高于空白对照组,统计学意义显著($P < 0.01$)。泰山山慈菇低、中、高剂量组细胞早期凋亡率分别为 15.80%、20.20%和 25.40%,均高于空白对照组自发凋亡率,差异有统计学意义($P < 0.05$),且呈现明显的剂量依赖性。其中高剂量组细胞早期凋亡率与阳性对照组相当。结果见图 1。本研究结果提示,泰山山慈菇体外可以通过促进 H22 肝癌细胞的凋亡而发挥抗肿瘤作用。

2.2 泰山山慈菇对 H22 荷瘤小鼠抑瘤率的影响 为了探讨泰山山慈菇体内是否对肝癌有治疗作用,我们首先建立了 H22 荷瘤小鼠模型,然后灌胃不同剂量的泰山山慈菇进行治疗。结果发现,5-Fu 阳性对照组抑瘤率达 50.63%,与模型组相比,统计学意义显著($P < 0.01$)。山慈菇低、中、高剂量组对小鼠肝癌的抑瘤率分为 30.95%、38.67%、45.53%。与模型组比较,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),且随着剂量的增加,抑瘤率增加,呈现明显的剂量-效应依赖关系,其中高剂量组抑瘤率稍低于阳性对照组。结果见表 1。本研究提示泰山山慈菇对 H22 荷瘤小鼠肿瘤

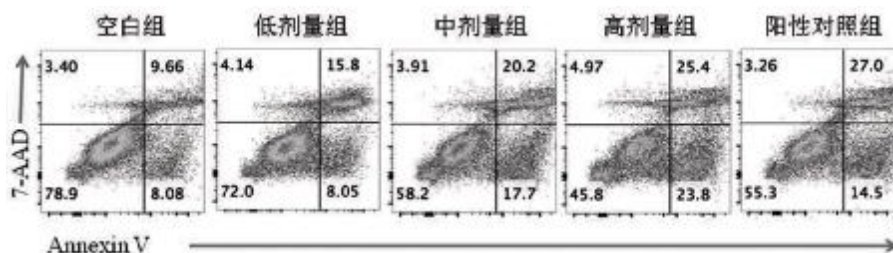


图1 泰山山慈菇对 H22 肝癌细胞凋亡作用的影响

的生长具有明显的抑制作用。

表1 泰山山慈菇对 H22 荷瘤小鼠抑瘤率的影响

组别	动物数(只)	剂量(mg/kg)	抑瘤率(%)
模型组	10	/	/
阳性组	10	25	50.63**
山慈菇低剂量组	10	300	30.95*
山慈菇中剂量组	10	600	38.67*
山慈菇高剂量组	10	900	45.53**

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 模型组

2.3 泰山山慈菇对 H22 荷瘤小鼠血清 TNF- α 、IL-2 和 IFN- γ 含量的影响 为了探讨泰山山慈菇抗肝癌的免疫相关机制,我们采用 ELISA 方法检测了小鼠血清中可能与抗肿瘤有关的几种细胞因子的含量。结果发现,与模型组小鼠相比,5-Fu 阳性对照组可增加荷瘤小鼠 TNF- α 、IL-2 和 IFN- γ 的含量,统计学意义显著($P < 0.01$);泰山山慈菇低、中、高剂量均可提高荷瘤小鼠的血清 TNF- α 、IL-2 和 IFN- γ 含量,与模型组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),且均呈现一定的剂量依赖性,结果见表 2。本研究提示,泰山山慈菇可能通过增加抗肿瘤细胞因子的分泌而发挥抗肝癌作用。

表2 泰山山慈菇对 H22 荷瘤小鼠血清 TNF- α 、IL-2 和 IFN- γ 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	TNF- α (pg/ml)	IL-2(pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
模型组	133 \pm 36.17	107 \pm 23.45	232 \pm 36.41
阳性组	282 \pm 20.16**	283 \pm 19.63**	467 \pm 22.46**
山慈菇低剂量组	175 \pm 41.21*	171 \pm 38.35*	296 \pm 48.78*
山慈菇中剂量组	203 \pm 48.38**	243 \pm 45.09**	367 \pm 49.65**
山慈菇高剂量组	251 \pm 57.37**	269 \pm 38.64**	453 \pm 64.93**

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 模型组

3 讨论

肝癌是死亡率较高的肿瘤疾病之一,其恶性程度极高,五年生存率仅 10.1%,是我国人群主要癌症中最低的^[1]。目前,肝癌的治疗主要有手术、放疗、化疗等治疗方法。放疗、化疗对机体毒副作用较大,探讨中药对肝癌的治疗作用是一个有前景的研究方向。山慈菇是常用的抗肿瘤中药之一。山慈菇在临床上以复方的形式广泛应用于口腔癌、食管癌、胃癌、

甲状腺癌、乳腺癌等恶性肿瘤的治疗^[2],其是否对肝癌有治疗作用及作用的免疫机制并不十分清楚。

诱导细胞凋亡是目前研究最为热门的中药抗肿瘤机制之一,而凋亡也是中药抑制肿瘤细胞增殖的一条很重要的途径^[3]。本研究发现,泰山山慈菇提液体外可诱导 H22 肝癌细胞早期凋亡,且具有剂量依赖性,其中高剂量组与 5-Fu 阳性对照组作用相当,提示泰山山慈菇体外可以通过促进 H22 肝癌细胞的凋亡而发挥抗肿瘤作用。

我们进一步探讨了泰山山慈菇体内是否对肝癌有治疗作用,通过建立了 H22 荷瘤小鼠模型,然后灌胃不同剂量的泰山山慈菇进行治疗,结果发现,泰山山慈菇可有效抑制肿瘤的生长,且具有剂量依赖性,其中高剂量组抑瘤率与 5-Fu 阳性对照组相当。提示泰山山慈菇对 H22 荷瘤小鼠肿瘤的生长具有明显的抑制作用。

增强机体的免疫功能是目前抗肿瘤治疗的主要方法之一,进一步我们探讨了泰山山慈菇抗肝癌的可能的免疫作用机制。我们采用 ELISA 方法检测了小鼠血清中可能与抗肿瘤有关的几种细胞因子包括 TNF- α 、IL-2 和 IFN- γ 的含量。IL-2 参与细胞免疫,能够通过促进 T 细胞增殖和分化等作用提高机体的免疫功能^[4]。本研究结果表明,泰山山慈菇提取液可增加荷瘤鼠血清中的 IL-2 水平,效果与 5-Fu 相当,表明其可能增强 H22 荷瘤小鼠的细胞免疫。TNF- α 具有抑制肿瘤细胞增殖、促进其溶解、增强机体抗肿瘤免疫反应等作用,是迄今为止发现的抗肿瘤作用最强的细胞因子。本研究结果表明,泰山山慈菇提取液能明显提高 H22 荷瘤鼠血清 TNF- α 水平,由此可能促进肿瘤细胞凋亡、阻止肿瘤生长。IFN- γ 是一种糖蛋白,主要由辅助性 T 细胞(Th1)和自然杀伤(NK)细胞产生,具有较强的免疫调节功能,能增强细胞功能^[7,8]。本研究发现,泰山山慈菇提取液能明显提高 H22 荷瘤鼠血清 IFN- γ 水平,通过增强细胞免疫功能发挥抗肿瘤作用。本研究结果表

明泰山山慈菇提液可通过提高 H22 荷瘤鼠的血清 IL-2、TNF- α 和 IFN- γ 水平,增强机体细胞免疫力,达到抑制肿瘤生长的作用,但其具体机理尚有待于进一步研究。本研究结果与文献报道较一致且更加完善^[6,8]。

综上所述,本研究为临床使用山慈菇抗肝癌提供了理论依据。山慈菇的药理作用及抗癌机制目前研究得还不够充分,还有待进一步深入的研究。

参考文献:

- [1]林增榕.阿司匹林对小鼠腹水型肝癌 H22 的作用研究[J].海峡药学,2015,27(11):20-22.
- [2]吴俊林,卢德成,罗佐杰,等.中药山慈姑对甲状腺癌细胞的促凋亡作用[J].时珍国医国药,2014,25(1):71-74.
- [3]林如辉,李钻芳,曾建伟,等.山慈姑醇提取液对 SGC-7901 细胞的抗肿瘤机制[J].福建中医药大学学报,2012,22(5):22-24.
- [4]徐小娟,蔡懿鑫,毛宇,等.山慈菇多糖对荷 H22 肝癌小鼠的

抗肿瘤机制研究[J].食品研究与开发,2015,36(7):23-25.

[5]Higgs JT,Lee JH,Wang H,et al.Mesenchymal stem cells expressing osteoprotegerin variants inhibit osteolysis in a murine model of multiple myeloma[J].Blood Adv,2017,1(25):2375-2385.

[6]黄展,辛华,江旭东,等.独角莲醇提液对 H22 肝癌荷瘤小鼠血清 IL-2 和 TNF- α 水平的影响[J].肿瘤药学,2013,3(6):432-435.

[7]Naimi A,Movassaghpour AA,Hagh MF,et al.Tnf-related apoptosis-inducing ligand(trail)as the potential therapeutic target in hematological malignancies[J].Biomed Pharmacother,2017(98):566-576.

[8]薛瑞,曹军华,李瑞生,等.参芪扶正注射液对肝癌细胞株 H22 的抑制作用及机制研究[J].实用药物与临床,2014,17(5):544-546.

收稿日期:2018-1-8;修回日期:2018-3-9

编辑/杨倩