

新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物对CT-26.WT原位移植瘤模型小鼠的抑瘤作用及机制研究[△]

郭萍萍^{1*},李伟²,张海英^{1,2#}(1.新疆医科大学中医学院,乌鲁木齐 830000;2.新疆医科大学附属中医医院药学部,乌鲁木齐 830000)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)23-3221-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.23.12

摘要 目的:研究新疆阿魏乙酸乙酯部位对CT-26.WT原位移植瘤模型小鼠的抑瘤作用,并探讨其作用机制。方法:将小鼠随机分为假手术组[溶剂(聚山梨酯80和食用油)]、模型组(溶剂)、顺铂对照组(5 mg/kg)和新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物低、中、高剂量组(0.375、0.75、1.5 g/kg,以新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物计),每组12只。除假手术组外其余各组小鼠建立CT-26.WT原位移植瘤模型,手术1周后灌胃给予相应药物,每隔2 d给药1次,连续给药10 d后,观察各组小鼠的体质量、瘤质量、肿瘤病理切片、脾指数,计算抑瘤率。采用流式细胞磁珠微阵列法(CBA)检测小鼠血清中白细胞介素12p70(IL-12p70)、干扰素 γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-6、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、IL-10的水平。结果:与假手术组比较,其余各组小鼠成功建立原位移植瘤模型,体质量均明显降低($P < 0.05$),模型组小鼠血清中TNF- α 、MCP-1、IL-6水平明显增加($P < 0.05$),IFN- γ 和IL-10水平明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较,顺铂对照组和新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物低、中、高剂量组小鼠瘤质量明显降低($P < 0.05$),其抑瘤率分别为(62.96 ± 12.54)%、(40.74 ± 17.34)%、(45.93 ± 16.74)%、(57.05 ± 14.28)%,且肿瘤细胞排列松散,有丝分裂现象及肿瘤细胞的浸润减少,顺铂对照组和新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物中、高剂量组小鼠的脾指数明显增加($P < 0.05$),所有给药组小鼠血清中IL-12p70、TNF- α 、MCP-1、IL-10因子水平均明显增加($P < 0.05$),IL-6因子水平明显降低($P < 0.05$),仅新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物高剂量组小鼠血清中IFN- γ 因子水平明显增加($P < 0.05$)。结论:新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物对CT-26.WT原位移植瘤模型小鼠具有抑瘤作用,其机制可能与增加IL-12p70、TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1、IL-10水平和降低IL-6水平有关。

关键词 新疆阿魏;乙酸乙酯部位;结肠癌;原位移植瘤;流式细胞磁珠微阵列法;小鼠;细胞因子;抑瘤率

Anti-tumor Effects of Ethyl Acetate Extract in *Ferula sinkiangensis* on CT-26.WT Orthotopic Transplantation Tumor Model Mice and Its Mechanism Study

GUO Pingping¹, LI Wei², ZHANG Haiying^{1,2}(1.College of TCM, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China;2.Dept. of Pharmacy, the Affiliated TCM Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the anti-tumor effects of ethyl acetate extract of *Ferula sinkiangensis* on CT-26.WT orthotopic transplanted tumor model mice and investigate its related mechanism. METHODS: The mice were randomly divided

hyperalgesia; the contribution of tumour necrosis factor alpha[J]. *Brit J Pharmacol*, 1997, 121(3):417-424.

[11] JOHANSSON AC, HANSSON AS, NANDAKUMAR KS, et al. IL-10-deficient B10.Q mice develop more severe collagen-induced arthritis, but are protected from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies[J]. *J Immunol*, 2001, 167(6):3505-3512.

[12] 郭坤坤.鼠妇镇痛抗炎作用、物质基础及质量控制的实验

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81660657);全国中药特色技术传承人才培训项目(No.国中医药人教函[2015]168号)

*硕士研究生。研究方向:中药民族药药理学。电话:0991-5853365。E-mail:2363986515@qq.com

#通信作者:主任中药师,副教授,博士。研究方向:中药民族药药理学。电话:0991-5853365。E-mail:1030737878@qq.com

研究[D].广州:南方医科大学,2013.

[13] 张俊艳.一种新的茶酚类衍生物1-羟基-2-萘甲酸甲酯的抗炎作用及其作用机制的研究[D].广州:南方医科大学,2012.

[14] TALREJA D, SINGH P K, KUMAR A. In vivo role of TLR2 and MyD88 signaling in eliciting innate immune responses in staphylococcal endophthalmitis[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(3):1719-1732.

[15] KOLACZKOWSKA E. Shedding light on vascular permeability during peritonitis: role of mast cell histamine versus macrophage cysteinyl leukotrienes[J]. *Inflamm Res*, 2002, 51(11):519-521.

(收稿日期:2018-06-14 修回日期:2018-10-15)

(编辑:邹丽娟)

into sham operation group [solvent (tween 80 and edible oil)], model group (solvent), cisplatin control group (5 mg/kg), low-dose, middle-dose and high-dose groups of ethyl acetate extract from *F. sinkiangensis* (0.375, 0.75, 1.5 g/kg calculated, by ethyl acetate extract from *F. sinkiangensis*), with 12 mice in each group. The mice model of CT-26.WT orthotopic transplantation tumor was established in each group except for sham operation group. They were given relevant medicine intragastrically, once every 2 days, for consecutive 10 d a week after surgery. The body weight, tumor weight, tumor pathological section and spleen index were observed in mice; inhibitory rate of tumor was calculated. The serum levels of IL-12p70, IFN- γ , TNF- α , IL-6, MCP-1 and IL-10 in rats were determined by flow cytometry microarray method (CBA). RESULTS: Compared with sham operation group, orthotopic transplantation tumor model was established successfully in other groups, and body weight of mice was decreased significantly ($P < 0.05$). Serum levels of TNF- α , MCP-1 and IL-6 were increased significantly in model group, while IFN- γ and IL-10 levels were decreased significantly ($P < 0.05$). Inhibitory rate of tumor were (62.96 \pm 12.54)%, (40.74 \pm 17.34)%, (45.93 \pm 16.74)%, (57.05 \pm 14.28)%, respectively. Compared with model group, tumor weight of mice were decreased significantly ($P < 0.05$), cells were loosely arranged, as well as mitotic and infiltration of tumor cells decreased in cisplatin control group, low-dose, middle-dose and high-dose groups of ethyl acetate extract from *F. sinkiangensis*. Spleen indexes of mice were increased significantly in cisplatin control group, middle-dose and high-dose groups of ethyl acetate extract from *F. sinkiangensis* ($P < 0.05$). Serum levels of IL-12p70, TNF- α , MCP-1 and IL-10 were increased significantly in all administration groups ($P < 0.05$), while serum level of IL-6 was decreased significantly ($P < 0.05$). The serum level of IFN- γ was increased significantly only in high-dose group of ethyl acetate extract from *F. sinkiangensis* ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Ethyl acetate extract of *F. sinkiangensis* has the effect of inhibiting CT-26.WT orthotopic transplantation tumor model mice, the mechanism of which may be associated with up-regulation of IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL-10 level and down-regulation of IL-6 level.

KEYWORDS *Ferula sinkiangensis*; Ethyl acetate fraction; Colon cancer; Orthotopic transplantation tumor; Flow cytometry microarray method; Mice; Cytokine; Inhibitory rate of tumor

阿魏为伞形科植物新疆阿魏(*Ferula sinkiangensis* K.M.Shen)和阜康阿魏(*Ferula fukanensis* K.M.Shen)的树脂,为新疆特色植物药。阿魏具有消积、散痞、杀虫之功,常用于肉食积滞、瘀血癥瘕、腹中痞块、虫积腹痛等消化系统疾病的治疗^[1]。目前,现代药理学研究发现,新疆阿魏具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、抗过敏、抑菌等多种药理作用^[2]。新疆阿魏因其具有抗癌、抗肿瘤活性而倍受人们关注,新疆少数民族常用其治疗胃肠道肿瘤^[3]。

目前,结肠癌发病率呈逐年上升趋势,为常见消化系统恶性肿瘤之一,其病死率极高^[4]。根据本课题组前期研究发现,新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物对小鼠S180实体瘤及CT-26.WT异位移植瘤的生长具有一定的抑制作用^[5-7]。原位移植瘤实验是最接近于特定肿瘤真实生长环境的方法,在肿瘤生长过程中仍保留其原有的组织结构特点,在形态及生物学特征上能高度模拟特定肿瘤的生长情况^[8]。有研究表明,脾脏与肿瘤免疫应答有着密切关系^[9],干扰素 γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)等因子也与肿瘤的发生发展有密切关联^[10-12]。为此本文通过建立CT-26.WT原位移植瘤小鼠模型,研究新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物对模型小鼠移植瘤和血清中IL-6、TNF- α 、IFN- γ 等因子水平的影响,进一步明确新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物的抑瘤作用。

1 材料

1.1 仪器

HERACELL 1501 CO₂细胞培养箱(美国 Thermo 公司);IX71-T2FL/TH倒置荧光显微镜(上海赖氏电子科技有限公司);xMark™酶标仪(美国 Thermo 公司);GUA-VAEASYCYTE 8HT流式细胞仪(美国 Millipore 公司);TDL-40B离心机(上海安亭科学仪器厂);ZHJH-C1112B超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司);AL-204实验用电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);SK250LHC超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

新疆阿魏药材(新疆伊犁哈萨克自治州药检所,批号:2016061);胎牛血清(FBS,批号:F120122);RPMI-1640培养基(批号:AAL205982)、青霉素-链霉素混合液(批号:J130043)、0.25%胰蛋白酶(批号:J150021)均为美国 Hyclone 公司产品;二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司,批号:67685TT);小鼠 IL-12p70、IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、IL-10炎症因子试剂盒(美国 BD 公司);顺铂注射液(江苏豪森药业集团有限公司,批号:170402,规格:6 mL:30 mg);苏木精(上海蓝季科技发展有限公司,批号:120920);伊红(天津市大茂化学试剂厂);食用油(金龙鱼菜籽油,益海嘉里食品营销有限公司)。

1.3 细胞与动物

鼠源性结肠癌细胞:CT-26.WT细胞株,购自中国科

学院上海细胞生物研究所,实验使用细胞为原代细胞传代至3~10代的细胞。SPF级健康BALB/c小鼠60只,♀♂各半,体质量为18~22 g,购自新疆疾病预防控制中心动物实验中心,实验动物使用许可证号:SYXK(新)2016-0001。

2 方法

2.1 新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物的制备

参考文献[13]方法,取新疆阿魏药材400 g,研碎成颗粒状,用200 mL石油醚在低于40℃温度下超声(功率:250 W,频率:53 kHz)提取40 min,反复提取3次,合并滤液,过液,浓缩,60℃干燥至无气泡产生,即得石油醚部位,本部位为浅黄色油状液体,主要为挥发油类成分。向残渣中加入2 000 mL 95%乙醇超声(功率:250 W,频率:53 kHz)提取40 min,过滤,重复相同方法提取3次,合并提取液,减压浓缩。浓缩的膏液用硅藻土拌样分散均匀后,用乙酸乙酯超声(功率:250 W,频率:53 kHz)提取5 min,滤过,滤液浓缩干燥即得乙酸乙酯部位提取物,得率为15.6%。

2.2 给药溶液的制备

精密称取新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物置于锥形瓶中,用无水乙醇超声(功率:250 W,频率:53 kHz)助溶,加入助溶剂聚山梨酯80,加入食用油稀释、分散均匀,制备成所需质量浓度的溶液(以新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物计),其中聚山梨酯80最终体积分数不得超过10%。

2.3 分组与建模

取小鼠,随机分为假手术组、模型组、顺铂对照组和新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物低、中、高剂量组,每组12只,适应性喂养1周。将CT-26.WT细胞配制成 1×10^7 个/mL的细胞混悬液,接种0.2 mL于小鼠左前肢腋下,7~9 d后出现明显瘤体,取出小鼠左前肢腋窝皮下肿瘤,以手术剪剪成 1.5 mm^3 的肿瘤组织块,备用。将禁食1 d的小鼠用戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔麻醉,皮肤消毒后从腹正中切口进腹,找到肠系膜处,将 1.5 mm^3 肿瘤组织块以4.0缝合线缝入肠系膜处,切勿损伤肠系膜,使肠系膜包裹住肿瘤组织块,将盲肠回纳腹腔,逐层关腹消毒。假手术组小鼠手术打开腹腔后,不移植瘤块,正常关腹缝合,消毒。造模手术后小鼠出现死亡,为保证结果的均一稳定,每组小鼠调整为10只。

2.4 给药

手术后1周,小鼠恢复精神状态后给药。新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物低、中、高剂量组小鼠每天分别灌胃新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物0.375、0.75、1.5 g/kg;顺铂对照组小鼠灌胃顺铂5 mg/kg;假手术组和模型组小鼠分别灌胃同等体积的溶剂(聚山梨酯80和食用

油)。给药剂量由本课题组前期研究结果和预实验结果调整得到,各组小鼠每日称体质量,每隔2 d给药1次,连续给药10 d。

2.5 脾指数、抑瘤率的测定

末次给药1 h后乙醚麻醉各组小鼠,颈动脉取血,分离血清,迅速摘取腹腔肿瘤和脾脏,观察后分别称质量,计算脾指数^[14]和抑瘤率。脾指数=脾质量(mg)/体质量(g);抑瘤率(%)=(模型组平均瘤质量-给药组平均瘤质量)/模型组平均瘤质量 $\times 100\%$ 。

2.6 肿瘤病理切片观察

将结肠癌CT-26.WT原位移植瘤小鼠的肿瘤组织经过10%的中性福尔马林固定后,行苏木精-伊红(HE)染色,在显微镜下观察并记录肿瘤病理情况。

2.7 血清中炎症因子水平的测定

采用流式细胞磁珠微阵列法(CBA)检测各组小鼠血清中IL-12p70、IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、MCP-1、IL-10的水平。将小鼠血液静置1 h左右,采用低温(4℃)低速(1 000 r/min)离心10 min,收集上层血清,然后按试剂盒说明操作检测各组小鼠血清中IL-12p70、IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、MCP-1、IL-10水平,上流式细胞仪检测含量,以藻红蛋白(PE)通路荧光强度为横坐标,别藻青蛋白(APC)通路荧光强度为纵坐标,绘制散点图。

2.8 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件处理数据,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料先进行正态性检验和方差齐性检验,若满足,多组间均数比较采用单因素方差分析,两组比较采用独立样本 t 检验,方差不齐时数据进行对数转换后再进行方差分析,组间两两比较采用LSD法。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠体质量、脾指数、抑瘤率变化

解剖发现,模型组小鼠腹腔中移植瘤体积较大,贴附于小鼠肠壁生长,包膜层可见血管丰富,移植瘤周围有大量的小型瘤体生长。顺铂对照组小鼠移植瘤呈小型团块状,体积较小,表面少见血管分布,组织包膜完整,移植瘤周围无大量的小型瘤体生长。新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物低、中、高剂量组小鼠肿瘤组织生长被不同程度地抑制,表现为移植瘤体积较小,移植瘤周围有小量的小型瘤体生长。

与假手术组比较,模型组、顺铂对照组和新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物低、中、高剂量组小鼠体质量均明显降低($P<0.05$)。与假手术组比较,模型组小鼠精神萎靡,日常活动明显减少;顺铂对照组和新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物低、中、高剂量组小鼠日常活动、饮食、毛发、精神尚可。顺铂对照组和新疆阿魏乙酸乙酯部位

提取物低、中、高剂量组小鼠的抑瘤率分别是(62.96 ± 12.54)%、(40.74 ± 17.34)%、(45.93 ± 16.74)%、(57.05 ± 14.28)%。与假手术组和模型组比较,阳性对照组和新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物中、高剂量组小鼠的脾指数均明显增加($P < 0.05$)。各组小鼠体质量、脾指数和抑瘤率的测定结果见表1。

表1 各组小鼠体质量、脾指数和抑瘤率的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Determination of body weight, spleen indexes and inhibitory rate of tumor in mice of each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	体质量,g	脾质量,g	脾指数,mg/g	瘤质量,g	抑瘤率,%
假手术组	27.37 ± 3.12	0.07 ± 0.01	2.51 ± 0.38		
模型组	20.34 ± 2.36 [*]	0.05 ± 0.01	2.57 ± 0.46	1.35 ± 0.17	
顺铂对照组	21.94 ± 2.38 [*]	0.11 ± 0.01 ^{##}	5.09 ± 0.30 ^{##}	0.50 ± 0.37 [*]	62.96 ± 12.54
新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物低剂量组	22.43 ± 2.41 [*]	0.09 ± 0.03	3.88 ± 1.15	0.80 ± 0.09 [*]	40.74 ± 17.34
新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物中剂量组	20.33 ± 2.18 [*]	0.10 ± 0.02 ^{##}	5.06 ± 0.81 ^{##}	0.73 ± 0.10 [*]	45.93 ± 16.74
新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物高剂量组	18.39 ± 2.33 [*]	0.16 ± 0.02 ^{##}	8.62 ± 0.36 ^{##}	0.58 ± 0.14 [*]	57.05 ± 14.28

注:与假手术组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,^{##} $P < 0.05$

Note: vs. sham operation group, ^{*} $P < 0.05$; vs. model group, ^{##} $P < 0.05$

3.2 肿瘤病理变化

模型组小鼠肿瘤细胞排列紧密,分布大量的块状非典型细胞,有丝分裂现象极多。顺铂对照组小鼠肿瘤细胞排列松散,有丝分裂相对较少,表现为肿瘤细胞的增殖抑制。新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物低、中、高剂量组小鼠肿瘤细胞数量较少且细胞排列松散,有丝分裂现象及肿瘤细胞的浸润均显著低于模型组。各组小鼠肿瘤的病理结果见图1。

3.3 血清中炎症因子水平变化

与假手术组比较,模型组小鼠血清中TNF- α 、MCP-1、IL-6水平均明显增加($P < 0.05$),IFN- γ 和IL-10水平均明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较,新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物低、中、高剂量组和顺铂对照组小鼠血清中IL-12p70、TNF- α 、MCP-1、IL-10水平均明显增加($P < 0.05$),IL-6水平明显降低($P < 0.05$)。各组小鼠血清中IL-12p70、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、MCP-1、IL-10水平的流式图见图2,测定结果见表2。

4 讨论

4.1 抑制率的测定

《抗肿瘤药物药效学指导原则》^[15]中规定,天然药物对肿瘤的抑制率大于40%,可初步判定该天然药物有一定的抗肿瘤作用。本实验结果显示,新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物对结肠癌原位移植瘤的抑制率分别为(40.74 ± 17.34)%、(45.93 ± 16.74)%、(57.05 ± 14.28)%、均高于40%,表明该部位对结肠癌具有一定的抑制作用。

4.2 因子水平测定方法的选择

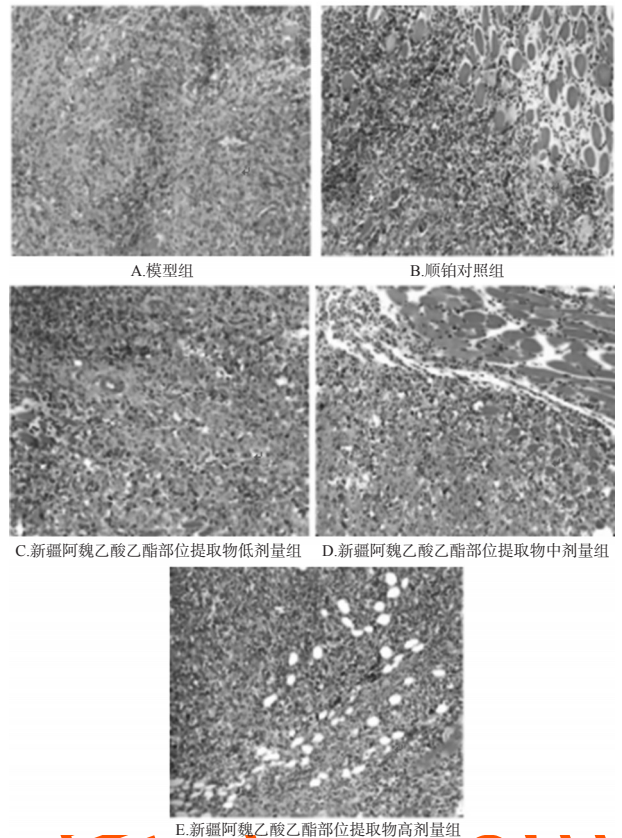


图1 各组小鼠肿瘤的病理结果(HE, ×200)

Fig 1 Pathological results of tumor in mice of each group(HE, ×200)

基于竞争法免疫分析原理,CBA法在液相环境中,保持蛋白质构象不变,有利于抗原抗体的结合,测试结果与酶联免疫吸附试验(ELISA)基本一致,与ELISA法比较具有通量大、标本利用率高、特异性强、敏感度高、重复性好等优点。因此本文通过该方法来测定小鼠血清中各因子的水平^[16]。

4.3 脏器的选择

脾是全身最大的周围淋巴器官,其在机体免疫防御系统中占有重要地位,故该脏器指数可在一定程度上反映机体免疫功能的强弱^[17]。脾除含有大量的B淋巴细胞、T淋巴细胞、巨噬细胞等免疫细胞外,还能合成抗体、分泌促吞噬素、淋巴因子等免疫活性物质,参与肿瘤免疫。本实验研究发现,与模型组比较,新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物低、中、高剂量组小鼠脾指数增大,说明该药物可通过促进小鼠免疫应答来提高模型小鼠的免疫功能,值得进一步研究。

4.4 炎症因子的选择

肿瘤的发生是对机体的一种损伤表现,在其发生发展的过程中,机体会出现相应的炎症反应。鉴于炎症与肿瘤的密切联系,在肿瘤发生发展过程中,炎症因子也就成为了一个重要的研究内容^[18]。

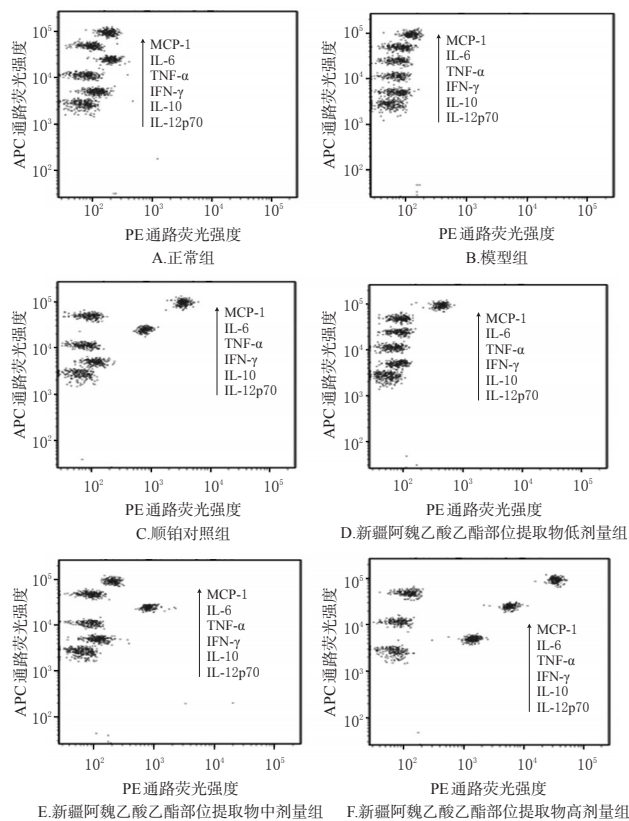


图2 各组小鼠血清中IL-12p70、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、MCP-1、IL-10因子表达的流式图

Fig 2 Flow chart for the expression of IL-12p70, TNF- α , IL-6, IFN- γ , MCP-1 and IL-10 in mice of each group

表2 各组小鼠血清中IL-12p70、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、MCP-1、IL-10因子水平的测定结果($\bar{x} \pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

Tab 2 Serum levels of IL-12p70, TNF- α , IL-6, IFN- γ , MCP-1 and IL-10 in mice of each group ($\bar{x} \pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

组别	IL-12p70	TNF- α	IL-6	IFN- γ	MCP-1	IL-10
假手术组	0.00 \pm 0.00	9.51 \pm 1.24	4.78 \pm 1.25	2.86 \pm 0.58	23.79 \pm 3.12	3.12 \pm 1.22
模型组	0.00 \pm 0.00	10.89 \pm 1.54*	11.56 \pm 1.99*	2.13 \pm 0.82*	35.04 \pm 3.33*	1.78 \pm 0.45*
顺铂对照组	2.69 \pm 0.21**	15.56 \pm 2.24**	6.69 \pm 1.65*	2.99 \pm 0.69	168.54 \pm 19.48**	4.14 \pm 1.20*
新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物低剂量组	0.96 \pm 0.33**	14.75 \pm 2.03**	6.52 \pm 1.43*	2.11 \pm 0.63	38.72 \pm 6.81**	4.54 \pm 1.54*
新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物中剂量组	1.31 \pm 0.12**	16.87 \pm 2.02**	6.87 \pm 1.10*	3.28 \pm 0.74	46.97 \pm 2.51**	4.98 \pm 1.42*
新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物高剂量组	1.54 \pm 0.25**	19.75 \pm 1.91**	7.08 \pm 2.14*	4.59 \pm 1.01*	69.86 \pm 3.64**	6.27 \pm 1.26**

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,** $P<0.05$

Note: vs. sham operation group, * $P<0.05$; vs. model group, ** $P<0.05$

IL-12是一种有多种免疫调节功能的异源二聚体细胞因子,由p35及p40两个亚基通过二硫键连接而成,主要由树突状细胞、单核噬细胞、B细胞以及其他的抗原提呈细胞产生,能促进CD4⁺T辅助细胞(Th1)的增殖,诱

导自然杀伤(NK)细胞和T细胞产生细胞因子,在感染免疫、肿瘤免疫及自身免疫性疾病中起重要作用。在产生IL-12的细胞中,p35只作为IL-12的一个亚基,随p70一起表达;p40除随p70一起表达外,还能够单独表达。单独的p40没有生物活性,而只有与p35结合形成异二聚体p70才具有生物学活性^[19-20]。由于IL-12p70浓度太低,低于仪器的灵敏度,故表2中检测结果为0。张才波^[10]研究发现IFN- γ 在对肿瘤发生发展中具有免疫监控和抑制作用。IFN- γ 对结直肠癌细胞的生长具有抑制作用,可以抑制抗凋亡蛋白Bcl-x1的表达,增加结肠癌细胞对TNF相关凋亡诱导配体(TARIL)的敏感性。IFN- γ 可以抑制HCT15细胞中 β -连环蛋白(β -catenin)的活性,有效抑制小鼠肠道肿瘤的发生发展。本实验结果显示,与模型组比较,而新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物各剂量组小鼠血清中IL-12p70、IFN- γ 水平随给药剂量的增加而升高,且与顺铂的作用趋势一致,表明新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物有提高机体免疫之功,从而发挥抗肿瘤作用。

IL-6可由T细胞、巨噬细胞、B细胞等多种细胞产生。相关文献中有提到在肿瘤的发展过程中,IL-6作为前炎性因子,具有抗细胞凋亡、促进细胞的增殖及血管的形成等作用,从而促进肿瘤的生长和发展^[11]。张晓玲等^[11]研究发现,结肠癌患者术前外周血中IL-6水平明显高于健康对照组,IL-6在结肠癌中表达明显升高。廖德贵等^[12]研究发现,血清IL-6水平与肿瘤分期具有正相关性,且恶性程度越高,IL-6水平越高,越利于肿瘤的发生与发展。本实验研究结果表明,假手术组小鼠血清中IL-6水平较低,模型组小鼠血清中IL-6水平显著升高,新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物各剂量组和顺铂对照组小鼠血清中IL-6水平均显著低于模型组,表明其可能是通过降低IL-6表达水平而起到抗肿瘤作用。

IL-10是具有双向调节作用的因子,研究初期IL-10被定义为具有免疫抑制作用的抗炎因子,通过抑制活化T细胞来促进肿瘤的生长。而相关研究发现,IL-10还可以活化NK细胞和肿瘤特异性CD8⁺T细胞,提高NK细胞、CD8⁺T细胞的细胞毒活性,增强机体肿瘤杀伤效应,从而抑制肿瘤的发展^[22]。MCP-1,由包括正常组织细胞、白细胞及许多肿瘤细胞等多种细胞分泌,在许多肿瘤组织中存在趋化因子及其受体的表达。MCP-1参与调节的肿瘤微环境更倾向于促进肿瘤细胞生长、存活及加速肿瘤侵袭和转移。TNF- α 既能够激活CD8⁺T细胞或NK细胞等释放IFN- γ 和穿孔素,从而抑制肿瘤细胞的生长^[23-25],TNF- α 又能通过促进肿瘤细胞增殖,促进血管再生、肿瘤细胞侵袭和转移等多种方式促进肿瘤的发生和发展。目前,对IL-10、MCP-1、TNF- α 在肿瘤中的作用还存在争议,故被认为是具有双向调节作用的因子。王海

艳^[26]研究发现,促进了抗肿瘤的Th1型细胞因子TNF- α 、MCP-1表达水平,调节细胞因子分泌,可加强其抗原提呈功能,激活效应T细胞的免疫应答,进一步增强巨噬细胞杀伤肿瘤的能力。本实验结果显示,小鼠血清中IL-10、MCP-1、TNF- α 均表现为升高趋势。

综上所述,新疆阿魏乙酸乙酯部位提取物可使小鼠血清中IL-12p70、IFN- γ 、TNF- α 、IL-10、MCP-1的表达升高,IL-6的表达降低,由此可推测,新疆阿魏可能通过抑制肿瘤组织周围的炎症反应和增强抗肿瘤因子的表达来抑制肿瘤的生长。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:190.
- [2] 黄雅婷,岳丽君,申翔宇,等.新疆阿魏化学成分及药理活性研究进展[J].国际药学研究杂志,2017,44(6):495-499.
- [3] KIM KH, LEE HJ, JEONG SJ, et al. Galbanic acid isolated from *Ferula assafoetida* exerts in vivo anti-tumor activity in association with anti-angiogenesis and anti-proliferation[J]. *Pharmaceutical Research*, 2011, 28(3):597-609.
- [4] 郭天安,谢丽,赵江,等.中国结直肠癌1988-2009年发病率和死亡率趋势分析[J].中华胃肠外科杂志,2018. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0274.
- [5] 周龙龙,张海英,任燕,等.新疆阿魏树脂不同分离部位对结肠癌细胞HCT116的抑制作用[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(23):183-186.
- [6] 张海英,李伟,周龙龙,等.新疆阿魏抗肿瘤活性部位筛选[J].中国中医药信息杂志,2016,23(2):52-55.
- [7] 罗福祥,卢军,张海英,等.新疆阿魏乙酸乙酯部位体内外对CT-26.WT细胞的影响[J].中成药,2017,39(2):238-243.
- [8] 刘乾,刘松,韩锋锋,等.人肺癌原位移植瘤模型的建立及活体成像观察[J].实验动物与比较医学,2016.DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2016.04.002.
- [9] 刘仲伟,张澍,李宗芳.脾脏与肿瘤[C].//2010国际腹部创伤暨第十届全国脾脏外科学术研讨会论文集,西安:西安交通大学,2010:71-77.
- [10] 张才波. IFN- γ 信号通路在Apc^{Min+}小鼠肠道肿瘤发生发展中的作用及机制研究[D].济南:山东大学,2016.
- [11] 张晓玲,韩国达,邢荣格. IL-6在不同Dukes分期结肠癌中的表达及临床意义[J].现代肿瘤医学,2016,24(14):2256-2259.
- [12] 廖德贵,王珊,周春辉,等. IL-6和TNF- α 在结肠癌患者血清中的测定及其意义[J].中国医学创新,2015.DOI: 10.3969/j.issn.1674-4985.
- [13] 张海英,李伟,周龙龙,等.新疆阿魏乙酸乙酯部位质量控制方法研究[J].中国中医药信息杂志,2016.DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.
- [14] 阮毅铭,梅全喜,关键缨,等.漆大姑水提物外用对慢性皮炎-湿疹模型小鼠的改善作用研究[J].中国药房,2018,29(11):1536-1541.
- [15] 国家食品药品监督管理局.抗肿瘤药物药理学指导原则[S]. 2006-12-19.
- [16] 李向阳,华慧,颜超,等.流式细胞术检测血清细胞因子常见问题与对策[J].济宁医学院学报,2018.DOI: 10.3969/j.issn.1000-9760.
- [17] 王文龙,孙子凯,徐丽华,等.固本咳喘颗粒对实验性慢性阻塞性肺疾病大鼠胸腺指数及脾指数的影响[J].中国临床药理学杂志,2015.DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2015.11.011.
- [18] 廖楚舒,邓中华,乐杨桦,等. Th17相关炎症因子与原发肝癌关系的研究[J].实用预防医学,2016,23(5):554-556.
- [19] KONERU M, O'CEARBHAILL R, PENDHARKAR S, et al. A phase I clinical trial of adoptive T cell therapy using IL-12 secreting MUC-16^{sc}, directed chimeric antigen receptors for recurrent ovarian cancer[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2015. DOI: 10.1186/s12967-015-0460-x.
- [20] OHNO Y, KITAMURA H, TAKAHASHI N, et al. IL-6 down-regulates HLA class II expression and IL-12 production of human dendritic cells to impair activation of antigen-specific CD4⁺ T cells[J]. *Cancer Immunology*, 2016, 65(2):193-204.
- [21] 王倩,范文涛.马齿苋多糖对溃疡性结肠炎相关性结肠癌IL-6/STAT3信号通路的影响[J].世界中医药,2013,8(10):1256-1260.
- [22] MUMM JB, OFT M. Pegylated IL-10 induces cancer immunity: the surprising role of IL-10 as a potent inducer of IFN- γ -mediated CD8⁺ T cell cytotoxicity[J]. *Bioessays*, 2013, 35(7):623-631.
- [23] WANG B, SONG N, YU T, et al. Expression of tumor necrosis factor-alpha-mediated genes predicts recurrence-free survival in lung cancer[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e115945.
- [24] HAMADIEN MA, KHAN Z, VAALI-MOHAMMED MA, et al. Polymorphisms of tumor necrosis factor alpha in middle eastern population with colorectal cancer[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(4):5529-5537.
- [25] 罗伦才,童妍,季小平,等.刺三甲醇提物对AA大鼠血清中炎症因子含量的影响[J].中国药房,2015,26(34):4779-4781.
- [26] 王海艳.复方肠泰诱导结肠癌细胞自噬活化巨噬细胞的研究[D].南京:南京中医药大学,2016.

(收稿日期:2018-05-30 修回日期:2018-09-20)

(编辑:邹丽娟)