

柠檬苦素对MFC胃癌荷瘤模型小鼠免疫功能及凋亡相关因子表达的影响[△]

熊伟*, 韩华, 陈华敏, 吴晓明, 黄光钺(海南医学院第二附属医院胃肠外科, 海口 570311)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)07-0845-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.07.13

摘要 目的:研究柠檬苦素对MFC胃癌荷瘤模型小鼠免疫功能及凋亡相关因子表达的影响。方法:将MFC胃癌细胞接种于小鼠右侧腋下以复制MFC胃癌荷瘤模型,造模成功后分为模型组、环磷酰胺组(阳性对照,25 mg/kg)和柠檬苦素高、中、低剂量组(100、50、25 mg/kg),每组10只。除模型组小鼠灌胃0.5%羧甲基纤维素钠外,其余各组小鼠灌胃相应药物,每天1次,连续14天。小鼠给药前及末次给药后均测定体质量,并在末次给药后取脾、胸腺、肿瘤组织以计算脾指数、胸腺指数及抑瘤率;采用流式细胞术检测小鼠CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞百分数和CD4⁺/CD8⁺比值;采用酶联免疫吸附法检测小鼠血清中免疫功能相关指标[白细胞介素2(IL-2)、IL-10、干扰素γ(IFN-γ)]的表达水平;采用实时定量聚合酶链式反应法和Western blot法检测小鼠肿瘤组织中凋亡相关因子[细胞色素C(Cyt-C)、B淋巴细胞瘤2蛋白(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)]的mRNA和蛋白的相对表达水平。结果:除环磷酰胺组小鼠体质量较模型组显著降低外($P<0.05$),其余各组小鼠体质量的差异均无统计学意义($P<0.05$)。环磷酰胺组和柠檬苦素高、中、低剂量组小鼠的抑瘤率分别为(58.16±7.07)%、(37.09±4.26)%、(27.30±3.64)%、(15.13±2.95)%。与模型组比较,环磷酰胺组小鼠脾指数、胸腺指数、CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞百分数、CD4⁺/CD8⁺比值、血清中IL-2和IL-10的表达水平、肿瘤组织中Bcl-2的mRNA和蛋白的相对表达水平以及柠檬苦素各剂量组的IL-10表达水平、Bcl-2的mRNA和蛋白的相对表达水平均显著降低($P<0.05$);环磷酰胺组IFN-γ表达水平、Cyt-C和Bax的mRNA和蛋白的相对表达水平,以及柠檬苦素各剂量组的脾指数(低剂量组除外)和胸腺指数、CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞百分数、CD4⁺/CD8⁺比值、IL-2和IFN-γ的表达水平、Cyt-C和Bax的mRNA和蛋白的相对表达水平均显著升高($P<0.05$)。结论:柠檬苦素能抑制MFC胃癌荷瘤模型小鼠肿瘤组织的生长,且毒副作用相对较小;其作用机制与提高免疫功能和诱导凋亡有关。

关键词 柠檬苦素;MFC胃癌细胞;免疫功能;凋亡;小鼠

Effects of Limonin on Immune Function and Apoptosis-related Factors Expression in MFC Gastric Cancer Bearing Model Mice

XIONG Wei, HAN Hua, CHEN Huamin, WU Xiaoming, HUANG Guangyue (Dept. of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570311, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of limonin on immune function and apoptosis-related factors expression in MFC gastric cancer bearing model mice. METHODS: MFC gastric cancer bearing model was established by inoculating MFC gastric cancer cells into the right armpit of mice. After modeling, model mice were divided into model group, cyclophosphamide group (positive control, 25 mg/kg) and limonin high-dose, medium-dose and low-dose groups (100, 50 and 25 mg/kg), with 10 mice in each group. Other groups were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 14 days, except that model group was given 0.5% sodium carboxymethyl cellulose intragastrically. Before administration and after last administration, the body weight of mice was measured; spleen, thymus and tumor tissue were taken after the last administration to calculate the spleen index, thymus index and tumor inhibition rate. The percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, CD4⁺/CD8⁺ ratio were detected by flow cytometry. The expression of immune function related indexes (IL-2, IL-10, IFN-γ) in serum were detected by ELISA. RT-PCR and Western blot assay were adopted to detect relative mRNA and protein expression of apoptosis-related factors [cytochrome C (Cyt-C), Bcl-2, Bax] in tumor tissue of mice. RESULTS: There was no significant difference in body weight among the other groups except that of cyclophosphamide group was decreased significantly, compared with model group ($P<0.05$). Inhibitory rate of tumor were (58.16±7.07)%, (37.09±4.26)%, (27.30±3.64)%, (15.13±2.95)% in cyclophosphamide group, limonin high-dose, medium-dose and low-dose groups. Compared with model group, spleen index, thymus index, the percentages of CD4⁺ and CD8⁺T lymphocyte cells, CD4⁺/CD8⁺ ratio, serum levels of IL-2 and IL-10, relative mRNA and protein expression of Bcl-2 in tumor of mice in cyclophosphamide group as well as the expression of IL-10, relative mRNA and protein expression of Bcl-2 in limonin groups were decreased significantly ($P<0.05$). The expression of IFN-γ, relative mRNA and protein expression of Cyt-C and Bax of cyclophosphamide group as well as spleen index (except for low-dose group),

△ 基金项目:海南省卫生健康行业科研项目(No.20A200078)

* 副主任医师。研究方向:胃肠肿瘤的诊断与治疗。电话:0898-66809173。E-mail:xw36725747@163.com

thymus index, the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, CD4⁺/CD8⁺ ratio, the expression of IL-2 and IFN-γ, and relative mRNA and protein expression of Cyt-C

and Bax in limonin groups were increased significantly ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Limonin can inhibit tumor growth in MFC gastric cancer bearing model mice, and the side effects are relatively weak. Its mechanism is related to the improvement of immune function and the induction of apoptosis.

KEYWORDS Limonin; MFC gastric cancer cell; Immune function; Apoptosis; Mice

胃癌是一种严重威胁人类生命的致死性疾病,由于其发病隐匿、早期症状不明显,确诊时通常已是晚期^[1]。手术是目前治疗胃癌的首选手段,但对于晚期胃癌患者,术后仍易复发和转移,且远期疗效差,因此进行药物治疗必不可少^[2]。现有的化疗药物耐受性差、副作用明显^[3],故寻找副作用小且有效的抗肿瘤新药是当前研究者关注的热点问题。

柠檬苦素存在于芸香科及楝科的多种植物中,同时也是中药白鲜皮、黄柏等的主要成分之一,具有抗肿瘤、抗炎、镇痛、神经保护、抗菌、抗病毒、抗氧化及保肝等生物学活性^[4-6]。相关研究表明,柠檬苦素能有效抑制胃癌细胞的转移,其作用机制可能是通过阻断转录激活因子3(STAT3)信号转导通路的活化来发挥抗肿瘤作用^[7]。当STAT3信号转导通路被抑制时,可引起肿瘤细胞凋亡,并改善机体的免疫功能^[8-9]。

在肿瘤的发生与进展中,T淋巴细胞介导的细胞免疫具有重要作用^[10];同时,白细胞介素2(IL-2)、IL-10及干扰素 γ (IFN- γ)等免疫细胞因子的表达,有助于机体抗肿瘤免疫功能的形成^[11-12]。此外,肿瘤细胞凋亡进程受阻,也是导致肿瘤发生的又一重要因素,而细胞色素C(Cyt-C)、B淋巴细胞瘤2蛋白(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)等凋亡相关因子直接影响着肿瘤细胞的凋亡进程^[13]。基于此,本研究通过探讨柠檬苦素对MFC胃癌荷瘤模型小鼠免疫功能及凋亡相关因子表达的影响,以期进一步阐明柠檬苦素抗胃癌作用的潜在机制,为其应用于临床奠定基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有:HBS-1096C型酶标分析仪(南京德铁实验设备有限公司)、CytoFLEX型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司)、QuantStudio™型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)系统(美国Thermo Fisher Scientific公司)、MP-9030型蛋白电泳及转印仪(北京凯元信瑞仪器有限公司)、F3型全自动荧光与可见光凝胶成像分析系统(英国Syngene公司)。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用主要药品与试剂有:柠檬苦素(成都德思特生物技术有限公司,批号20190519,纯度95%),环磷酰胺片(通化茂祥制药有限公司,批号18121001,规格50 mg),胎牛血清、DMEM培养基及磷酸盐缓冲液(PBS)(美国Gibco公司,批号分别为10091-148、C11885500BT、C10010500BT),兔抗鼠CD4⁺(FITC标记)、CD8⁺(PE标记)多克隆抗体(美国eBioscience公司,批号分别为E-AB-F1097S、E-AB-F1104Q),IL-2、IL-10、

IFN- γ 酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20190817、20191025、20190912),逆转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq™ II试剂盒(日本Takara公司,批号分别为RR047A、RR820A),兔抗鼠Cyt-C、Bcl-2、Bax、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab216971、ab182858、ab32503、ab9485),辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(广州赛国生物科技有限公司,批号2019122401);其余试剂为实验室常用试剂或规格,水为纯净水。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级BALB/c小鼠,6~8周龄,雌雄各半,体质量(20±2)g,购自上海南方模式生物科技股份有限公司,动物生产许可证号为SCXK(沪)2019-0002。小鼠于湿度(50±10)%、温度(22±2)℃的条件下饲养,自由饮水及饮食,适应性饲养1周后用于实验。

1.4 细胞

本研究所用细胞为小鼠MFC胃癌细胞株,购于武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

将MFC胃癌细胞从液氮中取出,立即放于37℃恒温水浴锅中解冻,再转移至离心管中,加入含10%胎牛血清的DMEM培养基(以下简称“培养基”)适量,以1500 r/min离心5 min,弃上清液;细胞沉淀用培养基重悬后,于37℃、5%CO₂孵育箱中进行常规培养及传代。

2.2 造模、分组及给药

将MFC胃癌细胞培养至对数生长期后,调整细胞密度为 1.5×10^6 mL⁻¹。取0.2 mL细胞悬液接种于小鼠的右侧腋下,当瘤块直径达到0.5 cm时,表明造模成功^[14]。造模成功后,随机分为模型组、环磷酰胺组(阳性对照,25 mg/kg,剂量参考文献[15]进行设置)和柠檬苦素高、中、低剂量组(100、50、25 mg/kg,剂量参考文献[16]进行设置),每组10只。除模型组灌胃0.5%羧甲基纤维素钠外,其余各组灌胃相应药物(临用时用0.5%羧甲基纤维素钠溶解为混悬液),灌胃体积均为20 mL/kg,每天1次,连续14天。

2.3 小鼠体质量、脾指数、胸腺指数及抑瘤率的测定

各组小鼠给药前及末次给药后均称体质量并记录。末次给药后的次日,采用颈椎脱臼法处死小鼠,分别剥离其脾脏、胸腺及肿瘤组织,称质量,并计算脾指数、胸腺指数及抑瘤率。计算公式如下:脾指数(mg/g)=脾质量/体质量;胸腺指数(mg/g)=胸腺质量/体质量;抑瘤率(%)=(模型组肿瘤组织质量-药物处理组肿瘤组织

质量)/模型组肿瘤组织质量。

2.4 小鼠CD4⁺、CD8⁺ T淋巴细胞百分数和CD4⁺/CD8⁺比值的测定

将小鼠的脾脏置于玻璃平皿中,加入适量PBS,用镊子轻轻将脾脏磨碎后,以200目筛网过滤。将过滤后的混悬液以1 500 r/min离心5 min,用适量PBS重悬细胞,制备脾淋巴细胞悬液,并调整细胞密度为1×10⁶ mL⁻¹。取脾淋巴细胞悬液0.1 mL置于1.5 mL离心管中,依次加入CD4⁺和CD8⁺抗体(稀释度为1:1 000),充分混匀后,低温下放置0.5 h;再加入PBS 1 mL,以1 500 r/min离心5 min后,弃上清液;细胞沉淀继续加入PBS 0.5 mL,于流式细胞仪中检测CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞百分数,并计算CD4⁺/CD8⁺比值。

2.5 小鼠血清中IL-2、IL-10及IFN-γ表达水平测定

采用ELISA法进行检测。各组小鼠末次给药后,采用摘眼球法取血,以12 000 r/min离心10 min分离血清。按照试剂盒说明书中的操作步骤,采用酶标仪于450 nm波长下检测血清中IL-2、IL-10及IFN-γ的表达水平。

2.6 小鼠肿瘤组织中Cyt-C、Bcl-2、Bax的mRNA相对表达水平的检测

采用实时定量PCR法进行检测。取“2.3”项下各组小鼠的肿瘤组织100 mg,采用Trizol法提取总RNA,根据逆转录试剂盒说明书的操作方法,合成cDNA。以合成的cDNA为模板,进行PCR扩增,引物序列及产物长度见表1。PCR反应体系为:cDNA 2 μL,SYBR Premix 10 μL,上下游引物各0.5 μL,加双蒸水至20 μL。PCR反应条件为:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,共35个循环;72℃延伸10 min。以GAPDH为内参,采用2^{-ΔΔCt}法计算Cyt-C、Bcl-2、Bax mRNA的相对表达水平。

表1 引物序列及产物长度

Tab 1 Primer sequence and product length

| 基因 | 引物序列(5'→3') | 产物长度, bp |
|-------|----------------------------|----------|
| Cyt-C | 上游: GTTGACAGCCCCGATTTA | 136 |
| | 下游: TTGAGAAAGGAAAGCAGTGT | |
| Bcl-2 | 上游: ATCTGGGCCACAAGTGAAGT | 152 |
| | 下游: GCTGATTCGACGTTTTGGCT | |
| Bax | 上游: TCATGGGCTGGACATTGGAC | 114 |
| | 下游: GAGACAGGGACATCAGTCGC | |
| GAPDH | 上游: ATGGTTTACATGTTCCAATATG | 128 |
| | 下游: ATTTGGAGGGATCTCGCTC | |

2.7 小鼠肿瘤组织中Cyt-C、Bcl-2、Bax蛋白的相对表达水平的检测

采用Western blot法进行检测。取“2.3”项下各组小鼠的肿瘤组织100 mg,加入RIPA裂解液适量,低温匀浆;以12 000 r/min离心10 min,取上清液,采用BCA法进行总蛋白定量后,于沸水浴中放置5 min使蛋白变性。取等量总蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳分离目的蛋白,电泳完成后转移至

PVDF膜,用5%脱脂奶粉封闭;加入Cyt-C、Bcl-2、Bax抗体(稀释度均为1:1 000),4℃孵育过夜;以TBST漂洗3次,加入二抗(稀释度为1:5 000),室温孵育1 h后进行化学发光法显色,采用荧光与可见光凝胶成像分析系统拍照。以GAPDH为内参,采用Image J 1.8.0图像软件分析,并计算Cyt-C、Bcl-2、Bax蛋白与内参的光密度值比值,来表示目的蛋白的相对表达水平。

2.8 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 柠檬苦素对MFC胃癌荷瘤模型小鼠体质量、脾指数、胸腺指数、抑瘤率的影响

治疗前,各组小鼠体质量差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗后,除环磷酰胺组小鼠体质量较模型组显著降低外($P < 0.05$),其余各组小鼠体质量的差异均无统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,环磷酰胺组小鼠脾指数、胸腺指数均显著降低($P < 0.05$),柠檬苦素高、中剂量组小鼠的脾指数和柠檬苦素各剂量组的胸腺指数均显著升高($P < 0.05$)。环磷酰胺组和柠檬苦素高、中、低剂量小鼠的抑瘤率分别为(58.16 ± 7.07)%、(37.09 ± 4.26)%、(27.30 ± 3.64)%、(15.13 ± 2.95)%。上述指标测定结果见表2。

表2 各组小鼠体质量、脾指数、胸腺指数及抑瘤率的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Body weight, spleen index, thymus index and tumor inhibition rate of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 给药前体质量, g | 给药后体质量, g | 脾指数, mg/g | 胸腺指数, mg/g | 抑瘤率, % |
|----------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| 模型组 | 22.49 ± 1.63 | 32.05 ± 2.36 | 5.15 ± 0.74 | 1.98 ± 0.34 | |
| 环磷酰胺组 | 22.25 ± 2.04 | 25.76 ± 3.25* | 4.62 ± 0.68* | 1.42 ± 0.28* | 58.16 ± 7.07 |
| 柠檬苦素高剂量组 | 21.60 ± 1.79 | 32.31 ± 2.80 | 5.71 ± 0.85* | 2.87 ± 0.33* | 37.09 ± 4.26 |
| 柠檬苦素中剂量组 | 21.75 ± 1.86 | 31.69 ± 2.38 | 5.64 ± 0.41* | 2.40 ± 0.29* | 27.30 ± 3.64 |
| 柠檬苦素低剂量组 | 22.03 ± 2.41 | 31.26 ± 3.14 | 5.48 ± 0.58 | 2.25 ± 0.21* | 15.13 ± 2.95 |

注:与模型组比较,* $P < 0.05$

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

3.2 柠檬苦素对MFC胃癌荷瘤模型小鼠CD4⁺、CD8⁺ T淋巴细胞百分数和CD4⁺/CD8⁺比值的影响

与模型组比较,环磷酰胺组小鼠CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞百分数和CD4⁺/CD8⁺比值均显著降低($P < 0.05$),柠檬苦素各剂量组小鼠CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞百分数和CD4⁺/CD8⁺比值均显著升高($P < 0.05$),详见图1、表3。

3.3 柠檬苦素对MFC胃癌荷瘤模型小鼠血清中IL-2、IL-10、IFN-γ表达的影响

与模型组比较,环磷酰胺组小鼠血清中IL-2、IL-10表达水平均显著降低($P < 0.05$),IFN-γ表达水平显著升高($P < 0.05$);柠檬苦素高、中、低剂量组小鼠血清中IL-2、IFN-γ表达水平均显著升高($P < 0.05$),IL-10表达水平均显著降低($P < 0.05$),详见表4。

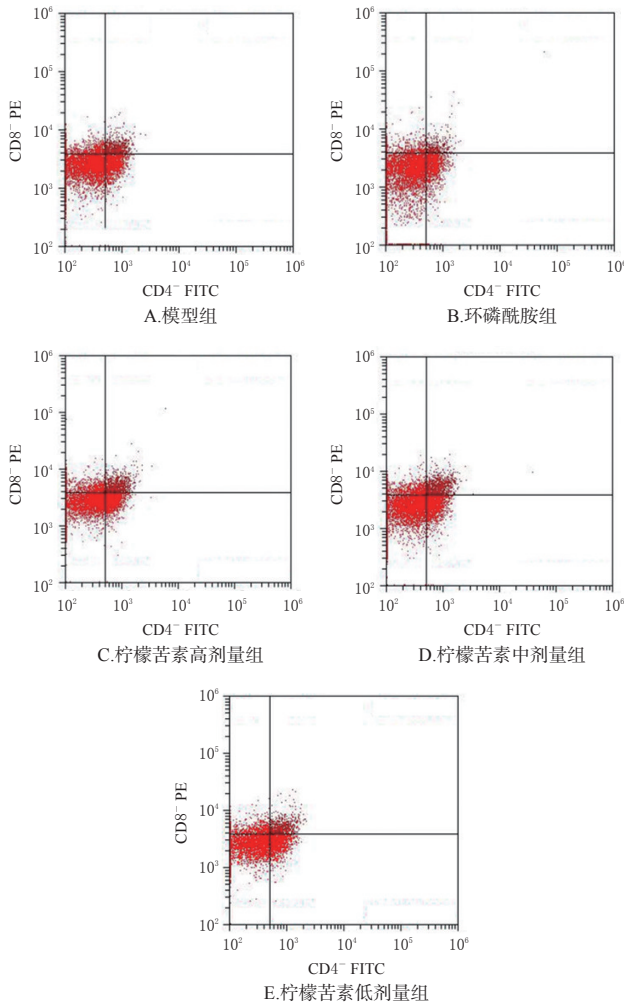


图1 各组小鼠T淋巴细胞亚群分布的流式细胞图

Fig 1 Electrophoretogram of the distribution of T lymphocyte subsets in mice of each group

表3 各组小鼠CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞百分数和CD4⁺/CD8⁺比值的测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 The percentages of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and CD4⁺/CD8⁺ ratio of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 组别 | CD4 ⁺ , % | CD8 ⁺ , % | CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 比值 |
|----------|----------------------|----------------------|---------------------------------------|
| 模型组 | 25.36 ± 3.59 | 17.18 ± 2.69 | 1.48 ± 1.96 |
| 环磷酰胺组 | 18.78 ± 2.23* | 15.16 ± 1.88* | 1.24 ± 1.62* |
| 柠檬苦素高剂量组 | 35.85 ± 4.80* | 20.52 ± 2.06* | 1.74 ± 2.27* |
| 柠檬苦素中剂量组 | 33.64 ± 3.18* | 20.10 ± 3.30* | 1.67 ± 1.84* |
| 柠檬苦素低剂量组 | 30.50 ± 3.13* | 18.77 ± 2.52* | 1.62 ± 1.59* |

注:与模型组比较, *P<0.05

Note: vs. model group, *P<0.05

3.4 柠檬苦素对MFC胃癌荷瘤模型小鼠肿瘤组织Cyt-C、Bcl-2、Bax mRNA表达的影响

与模型组比较,环磷酰胺组和柠檬苦素高、中、低剂量组小鼠肿瘤组织中Cyt-C、Bax mRNA的相对表达水平均显著升高(P<0.05),Bcl-2 mRNA的相对表达水平均显著降低(P<0.05),详见表5。

表4 各组小鼠血清中IL-2、IL-10、IFN-γ表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

Tab 4 Expression of IL-2, IL-10 and IFN-γ in serum of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

| 组别 | IL-2 | IL-10 | IFN-γ |
|----------|--------------|---------------|--------------|
| 模型组 | 1.29 ± 0.18 | 12.87 ± 1.61 | 4.06 ± 0.67 |
| 环磷酰胺组 | 0.96 ± 0.14* | 7.49 ± 0.82* | 7.23 ± 0.92* |
| 柠檬苦素高剂量组 | 2.37 ± 0.34* | 8.58 ± 1.06* | 6.20 ± 0.83* |
| 柠檬苦素中剂量组 | 1.81 ± 0.23* | 10.07 ± 1.55* | 5.75 ± 0.58* |
| 柠檬苦素低剂量组 | 1.46 ± 0.12* | 10.62 ± 1.45* | 5.18 ± 0.61* |

注:与模型组比较, *P<0.05

Note: vs. model group, *P<0.05

表5 各组小鼠肿瘤组织中Cyt-C、Bcl-2、Bax mRNA的相对表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 5 Relative mRNA expression of Cyt-C, Bcl-2 and Bax in tumor tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 组别 | Cyt-C/GAPDH | Bcl-2/GAPDH | Bax/GAPDH |
|----------|--------------|--------------|--------------|
| 模型组 | 1.24 ± 0.21 | 1.16 ± 0.13 | 0.95 ± 0.15 |
| 环磷酰胺组 | 2.39 ± 0.47* | 0.71 ± 0.12* | 3.17 ± 0.51* |
| 柠檬苦素高剂量组 | 1.92 ± 0.33* | 0.80 ± 0.09* | 2.05 ± 0.38* |
| 柠檬苦素中剂量组 | 1.53 ± 0.16* | 0.98 ± 0.20* | 1.76 ± 0.23* |
| 柠檬苦素低剂量组 | 1.42 ± 0.24* | 0.94 ± 0.14* | 1.61 ± 0.26* |

注:与模型组比较, *P<0.05

Note: vs. model group, *P<0.05

3.5 柠檬苦素对MFC胃癌荷瘤模型小鼠肿瘤组织中Cyt-C、Bcl-2、Bax蛋白表达的影响

与模型组比较,环磷酰胺组和柠檬苦素高、中、低剂量组小鼠肿瘤组织中Cyt-C、Bax蛋白的相对表达水平均显著升高(P<0.05),Bcl-2蛋白的相对表达水平均显著降低(P<0.05),详见图2、表6。

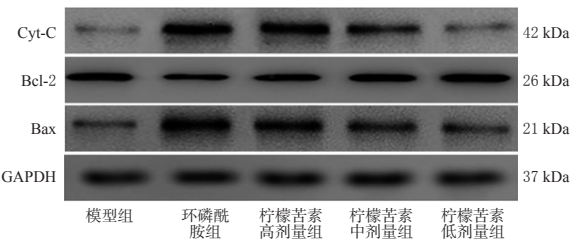


图2 各组小鼠肿瘤组织中Cyt-C、Bcl-2、Bax蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoretogram of protein expression of Cyt-C, Bcl-2 and Bax in tumor tissues of mice in each group

4 讨论

本研究通过灌胃给予MFC胃癌荷瘤模型小鼠不同剂量的柠檬苦素14天后发现,与模型组比较,柠檬苦素高、中剂量组小鼠的脾指数和柠檬苦素各剂量组小鼠的胸腺指数均显著升高(P<0.05),且柠檬苦素高、中、低剂量组小鼠的抑瘤率分别为(37.09 ± 4.26)%、(27.30 ± 3.64)%和(15.13 ± 2.95)%,表明柠檬苦素具有抑制MFC胃癌荷瘤模型小鼠肿瘤生长的作用,且可以在一定

表6 各组小鼠肿瘤组织中Cyt-C、Bcl-2、Bax蛋白的相对表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 6 Relative protein expression of Cyt-C, Bcl-2 and Bax in tumor tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 组别 | Cyt-C/GAPDH | Bcl-2/GAPDH | Bax/GAPDH |
|----------|-------------|-------------|------------|
| 模型组 | 0.15±0.02 | 0.87±0.11 | 0.28±0.03 |
| 环磷酸胺组 | 1.64±0.21* | 0.29±0.04* | 1.41±0.16* |
| 柠檬苦素高剂量组 | 1.42±0.15* | 0.40±0.06* | 1.16±0.12* |
| 柠檬苦素中剂量组 | 0.81±0.13* | 0.64±0.08* | 0.88±0.09* |
| 柠檬苦素低剂量组 | 0.26±0.03* | 0.76±0.07* | 0.53±0.06* |

注:与模型组比较,* $P<0.05$

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

程度上提高其免疫功能。环磷酸胺作为临床常用的抗肿瘤药物,其抑瘤作用已被公认,但由于较严重的毒副作用,限制了其应用范围的扩大^[17]。在本研究中,采用环磷酸胺作为阳性对照药物干预后发现,虽然柠檬苦素各剂量组小鼠的抑瘤率均低于环磷酸胺组,但小鼠体质量、脾指数、胸腺指数均增加,提示柠檬苦素的毒副作用低于环磷酸胺,具有潜在的临床应用价值。

T淋巴细胞由CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞两个亚群构成,其介导的细胞免疫在机体的抗肿瘤免疫系统中具有重要地位:当发生肿瘤时,CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞百分数及CD4⁺/CD8⁺比值降低,提示机体的免疫状态失衡;而经过免疫治疗后,CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞百分数及CD4⁺/CD8⁺比值升高^[18]。环磷酸胺为免疫抑制剂类抗肿瘤药物,相关研究发现,宫颈癌U14荷瘤模型小鼠经环磷酸胺治疗后,CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞百分数及CD4⁺/CD8⁺比值与模型组相比均降低^[19]。IL-2由T淋巴细胞分泌,在免疫调节反应中发挥着重要作用,同时还可以促进T淋巴细胞的增殖、活化;IL-2水平降低是肿瘤患者细胞免疫功能受损的重要标志^[20]。在肿瘤细胞入侵时,IL-10可通过抑制自然杀伤(NK)细胞对癌细胞的杀灭而促进肿瘤细胞的生长;此外,IL-10还具有促进肿瘤转移及抑制肿瘤细胞凋亡的作用^[21]。研究表明,IFN- γ 可增强NK细胞对肿瘤细胞的杀灭,也可以直接抑制肿瘤血管生长^[22]。本研究结果发现,与模型组比较,柠檬苦素各剂量组小鼠CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞百分数、CD4⁺/CD8⁺比值和血清中IL-2、IFN- γ 表达水平均显著升高($P<0.05$),而IL-10表达水平均显著降低($P<0.05$),表明柠檬苦素可通过调节T淋巴细胞亚群及免疫细胞因子的表达而抑制MFC胃癌荷瘤模型小鼠的肿瘤生长。

在肿瘤的发生、进展、转移及侵袭过程中,凋亡扮演着重要角色^[23]。Cyt-C、Bax等促凋亡因子及Bcl-2等抗凋亡因子是调节凋亡作用的关键分子:在遭受伤害性因子刺激或损伤下,细胞线粒体外膜遭到破坏,细胞膜通透性增加,促使Cyt-C释放进入胞质,进而激活胱天蛋白酶3(Caspase-3),诱导细胞凋亡^[24]。此外,在肿瘤组织中,Bax可与过表达的Bcl-2形成异二聚体,产生抗凋亡作用^[25]。本研究发现,与模型组比较,柠檬苦素各剂量

组小鼠肿瘤组织中Cyt-C、Bax的mRNA和蛋白相对表达水平均显著升高($P<0.05$),Bcl-2的mRNA和蛋白相对表达水平均显著降低($P<0.05$),表明柠檬苦素具有诱导MFC胃癌荷瘤模型小鼠肿瘤细胞凋亡的作用。

综上所述,柠檬苦素具有抑制MFC胃癌荷瘤模型小鼠肿瘤生长的作用,其作用机制与提高免疫功能和诱导凋亡有关。虽然本研究发现柠檬苦素对MFC胃癌荷瘤模型小鼠凋亡相关指标的改变幅度不如环磷酸胺强,但其毒副作用较小,还能提高免疫功能,这也可为其应用于临床提供依据。

参考文献

- [1] WANG L, LI C, TIAN J, et al. Genome-wide transcriptional analysis of Aristolochia manshuriensis induced gastric carcinoma[J]. Pharm Biol, 2020, 58(1): 98-106.
- [2] CHEN Z, LI Y, TAN B, et al. Progress and current status of molecule-targeted therapy and drug resistance in gastric cancer [J]. Drugs Today (Barc), 2020, 56(7): 469-482.
- [3] 张晓栋, 白少雄, 单贵刚, 等. 沙利度胺联合常规化疗用于晚期胃癌有效性及安全性的Meta分析[J]. 中国药房, 2019, 30(6): 830-835.
- [4] 尤文挺, 王洒, 何龙, 等. 柠檬苦素单体的药理活性研究进展[J]. 中药材, 2017, 40(1): 242-246.
- [5] 张群琳, 何雅静, 李甜, 等. 柠檬苦素类化合物抗病原体作用及机制研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(6): 1078-1085.
- [6] 卢小锋, 林鹏程, 訾佳辰, 等. 印楝种子中柠檬苦素类成分及其抗菌活性研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(22): 4864-4873.
- [7] 刘伯霞, 申琴, 焦海燕, 等. 柠檬苦素抑制胃癌细胞转移的作用及机制研究[J]. 宁夏医科大学学报, 2020, 42(4): 340-345.
- [8] 韩晓丽, 席作武, 王凯, 等. 毛钩藤碱调控IL-6/STAT3信号通路抑制结肠癌细胞增殖、迁移及诱导细胞凋亡的体外实验[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(18): 3955-3959.
- [9] 苏晓英, 王红又, 董倩, 等. 右美托咪定对Lewis肺癌小鼠免疫功能影响机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2020, 27(13): 1040-1048.
- [10] XI Y, JING Z, LIAO H A, et al. Analysis of T lymphocyte-related biomarkers in pancreatic cancer[J]. Pancreatology, 2020, 20(7): 1502-1510.
- [11] TALIB W H, AL-NOAIMI M, ALSULTAN E S, et al. A new acetylacetone derivative inhibits breast cancer by apoptosis induction and angiogenesis inhibition[J]. J Cancer Res Ther, 2019, 15(5): 1141-1146.
- [12] 张瑞奎, 汪超. 苦参碱对大鼠乳腺癌细胞荷瘤生长及其炎症因子与免疫功能的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2018, 34(4): 375-378.
- [13] 洪晶, 楼寿增, 王平. 姜黄素对荷宫颈癌小鼠肿瘤细胞凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(19): 3075-3078.
- [14] 吕品田, 段昕波. 黄精多糖对MFC胃癌荷瘤小鼠抑瘤及免疫调节作用[J]. 中成药, 2020, 42(8): 2169-2172.
- [15] 汪正飞, 杨祝仁, 张轶雯, 等. 三叶青总黄酮对人肝癌HepG-2细胞及裸鼠异种移植瘤的药效作用研究[J]. 中华

抗凝药物防治癌症患者静脉血栓栓塞症的药物经济学系统评价^Δ

周 谦*,高笑男,高敬林,冯章英,王明霞*(河北医科大学第四医院临床药理研究部,石家庄 050011)

中图分类号 R956 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)07-0850-10

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.07.14

摘要 目的:系统评价抗凝药物预防或治疗癌症患者静脉血栓栓塞症(VTE)的药物经济性。方法:计算机检索PubMed、Embase、Cochrane图书馆、中国知网、万方数据、维普网、中国生物医学文献服务系统以及The NHS Economic Evaluation Database、The Healthy Technology Assessment Database、EconLit等数据库,并辅以手工检索,收集不同抗凝药预防或治疗癌症患者VTE的经济学评价研究,检索时限为建库至2020年11月12日。经筛选、提取后,采用卫生经济评估报告标准清单评价纳入文献的质量。采用描述性的方法总结纳入文献的基本特征,并根据用药目的和不同干预分组归纳其经济学结果。结果:共纳入15篇文献,3篇质量优秀,10篇质量良好,其余2篇质量适中。研究分布于中国(1项)、美国(7项)、加拿大(3项)、法国(2项)、荷兰(1项)、巴西(1项)、奥地利(1项)等不同收入水平的国家。对于预防癌症患者VTE,华法林和低分子肝素(LMWH)的经济学评价有待更新;在VTE中高风险的癌症患者中,新型口服抗凝药(NOACs)在中国的经济优势不如美国,但是其在VTE高风险人群中的经济优势却在增加;阿司匹林对比依诺肝素预防骨髓瘤患者VTE具有绝对经济优势。对于治疗癌症患者VTE,LMWH对比华法林在美国不具有成本-效用优势,但是在加拿大和北欧等国家具有明显的经济优势;NOACs对比LMWH能节省总成本,但是美国和巴西的增量效果正负相反。敏感性分析显示,经济学结果对药物价格、血栓发生风险基线率以及不同干预下的不良事件(血栓复发、大出血、死亡)发生风险敏感,其中药物价格和血栓发生基线率能够逆转结论。结论:对于预防癌症患者VTE,与无干预或安慰剂相比,NOACs在不同国家、不同血栓风险人群中的经济性不同;华法林、LMWH的经济性尚未明确;阿司匹林对比依诺肝素的经济学优势明显。对于治疗癌症患者VTE,LMWH对比华法林在不同国家的经济优势不同;NOACs对比LMWH能节省成本。经济策略受不同国家的疾病发生风险、医疗体系、药物价格、患者偏好和价值观以及经济水平、成本-效用阈值标准等影响较大,最终的经济决策需要依据不同国家背景而定。

关键词 抗凝药物;癌症;静脉血栓栓塞症;药物经济学;系统评价

- 中医药学刊,2017,35(10):2615-2620.
- [16] 李林子,胡文敏,唐靓,等.柠檬苦素对自然衰老大鼠抗氧化和学习记忆能力的影响[J].中国食品卫生杂志,2016,28(1):22-27.
- [17] FERNANDES R, MAZZARELLO S, STOBBER C, et al. Optimal primary febrile neutropenia prophylaxis for patients receiving docetaxel-cyclophosphamide chemotherapy for breast cancer: a systematic review[J]. Breast Cancer Res Treat, 2017, 161(1): 1-10.
- [18] MAULHARDT H A, MARIN A M, DIZEREGA G S. Intratumoral submicron particle docetaxel inhibits syngeneic Renca renal cancer growth and increases CD4⁺, CD8⁺, and Treg levels in peripheral blood[J]. Invest New Drugs, 2020, 38(5): 1618-1626.
- [19] 王娜,谢磊.红景天苷调节免疫及抑制宫颈瘤U14荷瘤小鼠肿瘤生长作用的研究[J].中药材,2020,43(7):1736-1740.
- [20] WIDOWATI W, JASAPUTRA D K, SUMITRO S B, et al. Effect of interleukins (IL-2, IL-15, IL-18) on receptors activation and cytotoxic activity of natural killer cells in breast cancer cell[J]. Afr Health Sci, 2020, 20(2): 822-832.
- [21] SWAFFORD D, SHANMUGAM A, RANGANATHAN P, et al. The Wnt-β-catenin-IL-10 signaling axis in intestinal APCs protects mice from colitis-associated colon cancer in response to gut microbiota[J]. J Immunol, 2020, 205(8): 2265-2275.
- [22] 方艳,张朝玉,应小平,等.山仙颗粒对Lewis肺癌荷瘤小鼠抗肿瘤免疫力及外周血中IFN-γ、TNF-β、IL-10的影响[J].中国免疫学杂志,2017,33(10):1487-1492.
- [23] CHEN P, KUANG P, WANG L, et al. Mechanisms of drugs-resistance in small cell lung cancer: DNA-related, RNA-related, apoptosis-related, drug accumulation and metabolism procedure[J]. Transl Lung Cancer Res, 2020, 9(3): 768-786.
- [24] 马永超,杜晓鹃,李海龙,等.白细胞介素6对胰腺癌荷瘤小鼠移植瘤生长及Caspase-3/Bax/Bcl-2信号通路的影响[J].解剖学报,2020,51(2):216-219.
- [25] TOMPKINS K D, THORBURN A. Regulation of apoptosis by autophagy to enhance cancer therapy[J]. Yale J Biol Med, 2019, 92(4): 707-718.

Δ 基金项目:“重大新药创制”国家科技重大专项项目(No.2020ZX09201006-003)

* 硕士研究生。研究方向:肿瘤药理学、药物经济学。电话:0311-66696258。E-mail:zhouqheb@163.com

通信作者:主任药师,博士生导师,博士。研究方向:肿瘤药理学、药物经济学。电话:0311-66696233。E-mail:mxia_wang@163.com

(收稿日期:2020-12-01 修回日期:2021-01-29)

(编辑:唐晓莲)