

西黄丸对荷瘤大鼠的抗肿瘤及其对炎症因子的调节作用

杨伟¹, 关硕¹, 胡俊霞¹, 马杰², 曾常茜¹, 高文斌³, 梁文波^{1*}

1. 大连大学 医学院, 辽宁 大连 116622

2. 遵义医学院, 贵州 遵义 563000

3. 大连大学附属中山医院 肿瘤科, 辽宁 大连 116000

摘要: **目的** 研究西黄丸对 Walker256 乳腺癌细胞荷瘤大鼠的抗肿瘤及对相关炎症因子的调节作用, 探讨其抗肿瘤作用机制。**方法** 60 只雌性 Wistar 大鼠, 随机抽取 10 只设为对照组, 剩余 50 只建立荷瘤大鼠模型, 随机分为模型组、西黄丸高、中、低剂量组和香菇多糖组, 每组 10 只, 按 10 mL/kg ig 给药, 每天 2 次, 连续 14 d。14 d 后腹主动脉取血, 取瘤组织称定质量, 计算抑瘤率; 采用 ELISA 法检测大鼠外周血 IL-2、IFN- γ 、IL-6、IL-10 和 TGF- β 水平。**结果** 西黄丸高、中、低剂量组抑瘤率分别为 33.1%、30.7%、28.5%; 与对照组比较, 西黄丸高、中、低剂量均可明显提高荷瘤大鼠外周血 IL-2、IFN- γ 的水平, 降低 IL-6、IL-10、TGF- β 水平 ($P < 0.05$)。**结论** 西黄丸具有明显的抑制肿瘤生长的作用, 可通过提高荷瘤大鼠 IL-2、IFN- γ 水平增强免疫清除功能; 降低 IL-6、IL-10、TGF- β 水平, 减少形成免疫抑制微环境的相关炎症因子, 呈现出逆转肿瘤免疫逃逸的趋势。

关键词: 西黄丸; Walker256 乳腺癌细胞; 大鼠; 炎症因子; 免疫清除; 免疫抑制微环境

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2013)06-0847-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.06.008

Antitumor activity of Xihuang Pill and its regulatory role of inflammatory cytokines

YANG Wei¹, GUAN Shuo¹, HU Jun-xia¹, MA Jie², ZENG Chang-qian¹, GAO Wen-bin³, LIANG Wen-bo¹

1. College of Medicine, Dalian University, Dalian 116622, China

2. Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China

3. Department of Oncology, Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 116000, China

Abstract: Objective To study the antitumor activity of Xihuang Pill on the growth of Walker 256 breast cancer cell in tumor-bearing rats and the regulatory role of the inflammatory cytokines of Xihuang Pill, and to explore its antitumor mechanism. **Methods** Ten of 60 female Wistar rats were seemed as control group and the remained 50 rats were established as tumor-bearing rat models which were randomly divided into five groups (each group with ten rats): model group, high-, mid-dose, and low-dose Xihuang Pill, and lentinan groups. Each group was treated by ig administration twice daily for 14 d. After 14 d, the tumor was removed and weighed to calculate inhibitory rate. The levels of IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-10 and TGF- β in peripheral blood were determined by ELISA. **Results** The tumor-inhibitory rates of high-, mid-, and low-dose Xihuang Pill groups were 33.1%, 30.7%, and 28.5%. Compared with the control group, the average levels of IL-2 and IFN- γ of the high-, mid-, and low-dose Xihuang Pill groups increased, and the levels of IL-6, IL-10 and TGF- β decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Xihuang Pill has an obvious antitumor action which can enhance the expression of IL-2 and IFN- γ and reduce the expression of IL-6, IL-10, and TGF- β . The increase of the levels of IL-2 and IFN- γ could improve the immune clearance function and the decline of the levels of IL-6, IL-10 and TGF- β could reduce the expression of the related inflammatory factors in the immunosuppressive microenvironment which shows a trend to reverse tumor immune escape.

Key words: Xihuang Pill; walker256 breast cancer cell; rats; inflammatory factor; immune clearance; immunosuppressive microenvironment

收稿日期: 2013-09-01

作者简介: 杨伟 (1986—), 男, 研究生, 主要研究方向为肿瘤生物治疗。Tel: 13804243314 E-mail: junweiyang@163.com

*通信作者 梁文波 (1962—), 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为中药抗肿瘤药理。Tel: (0411)87403409 E-mail: dllwb@126.com

西黄丸是抗癌中成药的经典名方,由牛黄、麝香、乳香(醋制)、没药(醋制)4味中药组成,具有清热解毒、活血化瘀、软坚散结等功效,临床上常用于多种恶性肿瘤的治疗及辅助治疗^[1-2]。目前研究报道主要为西黄丸抗肿瘤作用的体外细胞实验^[3]、辅助放化疗^[4]以及组方中药中活性成分的抗肿瘤作用研究^[5],鲜有对动物体内炎性因子调节作用的研究^[6]。近年来研究发现炎症因子在肿瘤的发生发展中起重要作用^[7]。因此本实验采用动物体内实验方法,结合现代肿瘤免疫学理论,研究西黄丸对荷瘤大鼠的抗肿瘤及对相关炎性因子的调节作用,探讨西黄丸增强免疫清除功能、逆转免疫逃逸的抗肿瘤作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及瘤株 健康雌性 Wistar 大鼠 60 只,体质量(200±20)g,雌性幼年 Wistar 大鼠 3 只,体质量(80±10)g,购自大连医科大学实验动物中心,许可证号 SCKK(辽)20080002。Walker256 乳腺癌瘤株购于中国科学院上海细胞库。

1.1.2 实验药品 西黄丸,北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂生产,产品批号 1040990,20 粒质量为 1 g;香菇多糖片,浙江普洛康浴天然药物有限公司生产,产品批号 120501,基片质量为 0.1 g。

1.1.3 实验试剂与仪器 大鼠 IL-2(批号 20121129GF)、IFN-γ(批号 20121126RT)、IL-6(批号 20121126PP)、IL-10(批号 20121129TU)、TGF-β(批号 20121129HY) ELISA 试剂盒由上海朗顿生物技术有限公司生产;PL203 电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);ELX800 酶标仪(美国 BioTek 公司)。

1.2 方法

1.2.1 荷瘤大鼠模型的建立 复苏后的 Walker256 乳腺癌细胞株调整细胞浓度为 $2 \times 10^7/\text{mL}$,抽取 1 mL 细胞悬液接种于(80±10)g Wistar 大鼠腹腔,5~7 d 长出腹水。抽取传代后的大鼠腹水,以 1 200 r/min 离心 5 min, PBS 调整细胞浓度为 $5 \times 10^7/\text{mL}$,1 mL 注射器抽取 0.4 mL 细胞悬液接种于 Wistar 大鼠右腋皮下^[8],4 d 后大鼠出现食量明显减少,活动少,倦怠状,毛发竖立、无光泽,体质消瘦等癌症恶病质体征,右腋皮下可触及一黄豆大小的实体瘤。

1.2.2 给药剂量 根据实验动物和人临床用药剂量的换算公式计算,西黄丸高、中、低剂量组的给药

剂量分别是 1.37、0.55、0.27 g/kg;香菇多糖组的给药剂量是 0.23 g/kg。

$$d_B = d_A \times \frac{R_B}{R_A} \times \frac{\sqrt[3]{W_A}}{\sqrt[3]{W_B}}$$

d_B 为欲求 B 种动物的千克体质量的剂量, d_A 为已知 A 种动物的千克体质量的剂量, W_A 、 W_B 为已知动物 A、B 的体质量, R_A 、 R_B 为已知 A、B 的体质量系数

1.2.3 分组及给药 60 只 Wistar 大鼠,随机抽取 10 只设为对照组,剩余 50 只建立荷瘤大鼠模型,建模后随机分为模型组,西黄丸高、中、低剂量组,阳性对照香菇多糖组,每组 10 只。将西黄丸高、中、低剂量组分别按 1.37、0.55、0.27 g/kg 剂量,香菇多糖组按 0.23 g/kg 剂量用蒸馏水配成悬液;模型组和对照组给予相应体积的蒸馏水,按 10 mL/kg 的给药液体量,于造模后第 2 天,ig 给药,2 次/d,连续 14 d。末次给药前禁食 12 h,给药后 2 h ip 20% 乌拉坦 5 mL/kg 麻醉,无菌操作,腹主动脉取血,剥离瘤组织。

1.2.4 抑瘤率的计算 分别称量各组大鼠荷瘤组织,计算抑瘤率。

抑瘤率 = (模型组平均瘤质量 - 用药组平均瘤质量) / 模型组平均瘤质量

1.2.5 ELISA 法检测血清炎性因子 分离血清,采用 ELISA 检测各组大鼠血清中 IL-2、IFN-γ 及 IL-6、IL-10 及 TGF-β 的水平,实验步骤按照 ELISA 试剂盒说明书进行,显色终止后 450 nm 波长依序测量各孔吸光度值,绘标准曲线,分析结果。

1.2.6 统计学处理 数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析,多组间数据采用单因素方差分析(F 检验),两两比较采用 LSD 法。

2 结果

2.1 对荷瘤大鼠肿瘤生长的影响

与模型组比较,西黄丸高、中、低剂量组瘤质量均明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明,西黄丸对荷瘤大鼠肿瘤生长的抑制作用呈剂量相关性,见表 1。

2.2 对荷瘤大鼠外周血 IL-2、IFN-γ 水平的影响

与对照组比较,模型组荷瘤大鼠外周血 IL-2、IFN-γ 水平均明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,西黄丸高、中、低剂量组荷瘤大鼠外周血 IL-2、IFN-γ 水平均明显升高($P < 0.05$),见表 2。

表 1 西黄丸对荷瘤大鼠瘤质量和抑瘤率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of Xihuang Pill on tumor weight and tumor-inhibitory rate of tumor-bearing rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	瘤质量/g	抑瘤率/%
模型	—	6.61±1.60	
香菇多糖	0.23	4.71±1.24*	28.7
西黄丸	0.27	4.80±1.50*	27.5
	0.55	4.58±1.16*	30.7
	1.37	4.42±1.37*	33.1

与模型组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs model group

表 2 西黄丸对荷瘤大鼠外周血 IL-2、IFN- γ 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of Xihuang Pill on IL-2 and IFN- γ levels of peripheral blood in tumor-bearing rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-2/(ng·L ⁻¹)	IFN- γ /(ng·L ⁻¹)
对照	—	218.33±15.87	267.42±11.65
模型	—	147.86±12.07 ^{##}	195.08±16.95 ^{##}
香菇多糖	0.23	172.80±15.09*	230.38±18.61*
西黄丸	0.27	170.49±18.36*	225.99±11.52*
	0.55	183.43±19.50*	231.03±14.08*
	1.37	190.62±20.90*	246.80±24.38*

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: * $P<0.05$

^{##} $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ vs model group

表 3 西黄丸对荷瘤大鼠外周血 IL-6、IL-10、TGF- β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Effect of Xihuang Pill on IL-6, IL-10 and TGF- β levels of peripheral blood in tumor-bearing rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)	IL-10/(ng·L ⁻¹)	TGF- β /(ng·L ⁻¹)
对照	—	41.79±7.39	48.68±9.43	139.02±12.61
模型	—	103.96±8.57 ^{##}	93.19±12.45 ^{##}	221.22±13.75 ^{##}
香菇多糖	0.23	77.81±11.21*	78.24±12.04*	188.57±17.47*
西黄丸	0.27	81.33±14.71*	80.02±14.34*	191.35±14.93*
	0.55	76.28±12.92*	78.95±15.99*	187.35±19.03*
	1.37	72.60±10.63*	70.30±11.08*	180.48±16.51*

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: * $P<0.05$

^{##} $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ vs model group

散结的功效。现代研究发现西黄丸有抗癌、调节免疫功能、抗炎镇痛的作用^[9-10]。本实验通过荷瘤动物模型研究表明,西黄丸高、中、低各剂量组均具有明显抑制肿瘤生长的作用。

Schreiber 和 Dunn 提出的免疫编辑理论认为,在肿瘤的发生发展中免疫系统发挥着机体保护和肿瘤细胞重塑两方面的作用,机体的免疫不仅可以抑制肿瘤的生长,还可以促进肿瘤的发展。在此过程中肿瘤细胞与众多的免疫细胞如 T 细胞、巨噬细胞、

2.3 对荷瘤大鼠外周血 IL-6、IL-10 和 TGF- β 水平的影响

与对照组比较,模型组荷瘤大鼠外周血 IL-6、IL-10 和 TGF- β 水平均明显升高 ($P<0.05$);与模型组比较,西黄丸高、中、低剂量组荷瘤大鼠外周血 IL-6、IL-10 和 TGF- β 水平明显降低 ($P<0.05$),见表 3。

3 讨论

西黄丸方中牛黄性寒味甘,具有清热解毒、开窍豁痰之功效;麝香辛通走窜、活血通络;佐以乳香、没药消肿止痛、活血行气,共奏西黄丸之软坚

粒细胞、B 细胞以及免疫抑制细胞和肿瘤相关的炎症因子相互作用^[7],因此本实验针对肿瘤相关炎症因子进行了研究。免疫编辑理论认为,肿瘤免疫分 3 个阶段:免疫清除、免疫平衡和免疫逃逸^[11-12]。免疫清除即为传统意义上的免疫监视,在肿瘤的发展中起免疫保护作用,此过程中 IL-2、IFN- γ 、淋巴细胞和穿孔素等起到了重要作用^[13-14]。免疫均衡即为机体的免疫系统未能完全清除肿瘤细胞,两者处于相持衡的状态,此过程免疫系统赋予肿瘤细胞新

的免疫学特性;第 3 阶段即为免疫逃逸,指免疫原性较低的肿瘤细胞绕过第 2 阶段免疫防御、逃避免疫系统的“编辑”,进入临床肿瘤期^[15]。免疫均衡阶段的肿瘤细胞能过度产生 IL-6、IL-10、TGF- β 等抑制性炎症因子,并可诱导产生抑制性 T 细胞等一系列抑制性细胞,在肿瘤周围形成一免疫抑制的微环境^[16],免疫抑制是肿瘤微环境的主要特点,也是肿瘤免疫治疗的主要障碍,因此免疫抑制微环境的形成更利于肿瘤细胞的免疫逃逸。因此,提高 IL-2、IFN- γ 的水平可以增强机体的免疫清除功能,而控制抑制性炎症因子的产生可以起到降低肿瘤免疫逃逸的作用。

本研究结果发现,西黄丸高、中、低剂量组可使荷瘤大鼠外周血 IL-2、IFN- γ 水平明显升高,抑制性因子 IL-6、IL-10、TGF- β 的水平明显降低。说明西黄丸可以诱导 IL-2、IFN- γ 的分泌,增强免疫清除功能,同时降低 IL-6、IL-10、TGF- β 水平,减少形成免疫抑制微环境的相关炎症因子,双重调节荷瘤机体的抗肿瘤免疫功能,发挥抗肿瘤作用。

参考文献

- [1] 朱晓静,李 峰,欧阳兵. 西黄丸抗肿瘤作用研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2012, 36(1): 83-85.
- [2] 戴 一. 西黄丸的药理作用及临床应用概况 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(35): 473-476.
- [3] 金沈锐,张新胜,祝彼得,等. 西黄丸对肝癌细胞 SMMC7721 分泌的血管内皮生长因子及基质金属蛋白酶 2、9 的影响 [J]. 中成药, 2008, 30(7): 1079-1081.
- [4] 李聚林. 西黄丸配合放化疗治疗宫颈癌的疗效研究 [C]. 西黄丸临床应用研究论文集. 北京: 北京同仁堂科技发展有限公司, 2009.
- [5] 常允平,韩英梅,张俊艳. 乳香的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(1): 52-59.
- [6] 王志宏,王中霞,刘 超,等. 西黄丸滴丸抗肿瘤作用及对免疫功能的影响 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2013, 51(4): 18-20.
- [7] 黄 波. 肿瘤微环境中免疫与炎症的调节 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2012, 19(2): 111-115.
- [8] 王红卫,卓忠雄,赵树文,等. 大鼠 Walker-256 皮下移植瘤模型的建立及其超声评价 [J]. 临床超声医学杂志, 2007, 9(2): 68-71.
- [9] 陈信义,王 婧,张雅月,等. 西黄丸药效学研究及治疗肿瘤特点分析 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(3): 409-412.
- [10] 金 娟,李志鸿. 西黄丸联合化疗治疗乳腺癌 30 例 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(5): 715-716.
- [11] Oleinika K, Nibbs R J, Graham G J, *et al.* Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression [J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 171(1): 36-45.
- [12] 陈 影,葛海良. 肿瘤的免疫监视和免疫编辑 [J]. 现代免疫学, 2005, 25(6): 522-525.
- [13] 薛 娜,林洪生. 免疫编辑理论与中医药抗肿瘤免疫 [J]. 中医杂志, 2012, 53(21): 1801-1804.
- [14] 王胜典,贾明明. 肿瘤免疫微环境在肿瘤常规治疗效应中的作用 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2012, 19(3): 229-238.
- [15] 李 杰,林洪生,王晓瞳,等. 中医药对肿瘤免疫编辑过程重塑的分子机制研究 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2009, 11(5): 747-752.
- [16] Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-saito C, *et al.* The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies [J]. *Int J Hematol*, 2011, 93(3): 294-300.