表 2 TMP和丹参对 Lewis肺癌小鼠移植瘤组织 MVD及 VEGF表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, n= 10)

Table 2 Effect of TMP and DS on MVD and expression of VEGF of tumor tissue in mice with Lewis lung carcinoma ($\bar{x}\pm s$, n= 10)

组 别	剂量 /(g·kg⁻¹)	MVD/(个·视野⁻¹)	VEGF (A值)
生理盐水	–	27.17± 7.97	0.63± 0.08
TMP	0.050	14.32± 9.11*	0.45± 0.07*
	0.100	12.27± 11.19*	0.44± 0.06*
	0.200	13.01± 8.34*	0.51± 0.08*
丹参	5	25.44± 11.23	0.63± 0.05
	10	24.97± 8.85	0.61± 0.06
	20	26.99± 13.01	0.62± 0.05
鱼精蛋白	0.060	11.31± 12.24*	0.59± 0.06

与生理盐水组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *vs* NS group

并形成了丰富的新生血管,从而促进了肿瘤的生长和肺转移。

肿瘤属于中医“癥瘕”范畴,运用活血化瘀法及其方药治疗肿瘤已被公认。但有关中药抗肿瘤机制中,抗血管生成的研究报道不多。本实验显示,在给予 TMP治疗后, Lewis肺癌的体积、质量、MVD和肺转移灶数均显著降低,证明 TMP有抗肿瘤生长和转移的作用。同时本研究首次表明, TMP可抑制肿瘤血管生成,降低 MVD,抑制 VEGF的表达,说明 TMP抗肿瘤生长和转移的作用与其抑制肿瘤血管生成,降低肿瘤 MVD密切相关,其确切机制很可能是通过抑制 VEGF的表达来实现的。

实验结果还表明,给予鱼精蛋白后,虽然肿瘤的生长和转移均受到了显著抑制,但是肿瘤细胞分泌的 VEGF与模型组相比并没有显著差异,这与既往的研究是一致的。鱼精蛋白作为一种抗血管生成剂,其机制并非是抑制 VEGF的产生,而是阻碍 VEGF与其受体结合而抑制 VEGF的生物功能的实现[7]。

眭建[4]、张培彤[8]等通过体外细胞实验证实,丹参素和丹参酮ⅡA均有一定的抗肿瘤活性。本实验所用的丹参注射液是以丹参素为主的水溶性成分,结果显示其对 Lewis肺癌小鼠移植瘤生长和肺转移无明显抑制作用,对肿瘤 MVD和 VEGF的分泌亦无明显影响。这一现象再次表明,体外细胞实验与体内实体瘤模型实验存在着较大的区别。其原因可能是,体外实验的药物浓度通常较高,体内很难达到如此高浓度;体外实验影响因素单一,而体内用药干预因素较多等。动物实体瘤模型实验更接近于人体的实际情况,或许更有参考价值。

References:

[1] Folkman J. Angiogenesis in cancer vascular rheumatoid and other disease [J]. *Nat Med*, 1995, 1: 27-31.

[2] Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis [J]. *Kidney Inter*, 1999, 56: 794-814.

[3] Liu J R, Ye S B. Antimetastasis effect of tetramethylpyrazine to tumor and its mechanism [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1993, 7(2): 149-152.

[4] Sui J, Lin F. Effect of Danshensu to adenocarcinoma NGCC cell [J]. *J Zhenjiang Med Coll* (镇江医学院学报), 1997, 7(4): 384-387.

[5] O'Reilly M S, Holmgren L, Shing Y, *et al*. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma [J]. *Cell*, 1994, 79: 315-321.

[6] Weidner N, Semple J P, Welch W R, *et al*. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma [J]. *New Engl J Med*, 1991, 324: 1-8.

[7] Vaisman N, Gospodarowiz D, Neufeld G. Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor [J]. *J Biol Chem*, 1990, 32: 19461-19466.

[8] Zhang P T, Pei Y X, Qi X, *et al*. Effects of certain drugs on the expression of antigens on human pulmonary giant cell carcinoma [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(5): 352-355.

益气平悬饮对艾氏腹水癌小鼠肿瘤浸润淋巴细胞杀伤活性的影响

黄立中,伍参荣,肖 雅,何 欣,唐小梅,王大安*

(湖南中医学院,湖南 长沙 410007)

摘 要:目的 探讨益气平悬饮对肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor-infiltrating lymphocytes, TIL) 杀伤自体肿瘤细胞 (anto-tumor cells, ATC) 活性的影响。方法 取昆明种小鼠 40只,腹腔接种艾氏腹水癌瘤株 (EAC) 瘤液建立移植瘤模型,接种次日随机分为 4组: 益气平悬饮大、小剂量 (37.0, 18.5 g/kg) 组、环磷酰胺对照组、模型对照组。益气平悬饮大、小剂量组当日 ig给药,共给药 9 d,环磷酰胺组 ip环磷酰胺 75 mg/kg,自接种第 3日起,隔日给药,共

* 收稿日期: 2003-07-17

基金项目: 国家中医药管理局基金资助 (02-03JP30); 湖南省自然科学基金资助 (01JJ2037)

作者简介: 黄立中 (1956-),男,河北抚宁人,医学博士,副教授,副主任医师,硕士研究生导师,主要从事肿瘤的中医药防治研究。E-mail: HLZ992002@163.com

4次。末次给药次日,无菌抽取 EAC小鼠腹水,用不连续密度梯度离心收集 TIL作为效应细胞,分离出 ATC作为靶细胞,培养液中培养,效靶比为 10∶1,以 MTT法计算细胞杀伤活性。并在光镜下观察混合培养 2,4,10,14,24 h细胞形态学变化。结果 益气平悬饮大、小剂量组 TIL杀伤活性均高于模型对照组,差异显著 ($P < 0.05$)。结论 益气平悬饮能提高 TIL杀伤 ATC的活性。

关键词: 益气平悬饮; 癌性胸水; 肿瘤浸润淋巴细胞; 自体肿瘤细胞
中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)03-0299-03

Influence of Qi-boosting and Suspended Rheum-dispersing Beverage on killing activity of tumor-infiltrating lymphocytes to auto-tumor cells in EAC mice

HUANG Li-zhong, WU Can-rong, XIAO Ya, HE Xin, TANG Xiao-mei, WANG Da-an
(Hunan College of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

Key words Qi-boosting and Suspended Rheum-dispersing Beverage (QBSRDB); malignant pleural effusion; tumor infiltrating lymphocytes (TIL); auto-tumor cells (ATC)

肺癌合并癌性胸水病人意味着病变已局部或全身播散,生存期多在 6个月以内,而肺癌癌性胸水患者中位生存期仅 2.2个月[1]。因此,积极探讨更有效的治疗方法,对改善病人生活质量,延长生命具有重要意义。本实验对具有益气蠲饮、行气散结作用的益气平悬饮 (QBSRDB)影响艾氏腹水癌肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor infiltrating lymphocytes, TIL)杀伤自体肿瘤细胞 (auto-tumor cells, ATC)的作用进行研究,寻找治疗肺癌癌性胸水的药物。

1 材料

1.1 动物与瘤株: 昆明种小鼠,雌雄各半,18~22 g,本院实验动物中心提供。艾氏腹水癌 (EAC)瘤株,购自中山大学肿瘤研究所。

1.2 药物与试剂: 益气平悬饮处方由人参、生黄芪、椒目、葶苈子、瓜蒌壳、半夏、刺蒺藜等组成。从本院第一附属医院一次购回,经中药教研室鉴定后,三蒸水浸泡 4 h,煮沸 25 min,滤过,50℃ 水浴中浓缩成含生药 2 g/mL的药液。RPMI1640 (Gibco,美国),小鼠淋巴细胞分离液、肿瘤细胞分离液 (天津市灏洋生物制品科技有限公司);四甲基偶氮唑盐、二甲基亚砜 (DMSO, Sigma, 美国)。

1.3 主要仪器: MK3全自动酶标仪 (芬兰),SW-CJ-IF超净工作台 (苏州净化设备厂),CJ-1088 CO_2培养箱 (长沙长锦应用技术研究所),TD5台式多管架低速离心机 (长沙美泰仪器有限公司),XS-200光学显微镜 (江南光学仪器厂),XSB-1A生物倒置显微镜 (广西梧州光学仪器厂)。

2 方法

2.1 分组及给药: 无菌抽取 EAC瘤液,生理盐水 1∶3稀释,取小鼠 40只,每只小鼠腹腔接种瘤液 0.3 mL。接种次日随机分成 4组,益气平悬饮大、小剂量组、环磷酰胺组、模型对照组,每组 10只,雌雄各半。益气平悬饮大、小剂量组分别按 37.0, 18.5 g/kg ig给药,模型组 ig蒸馏水 20 mL/kg,每日 1次,连续 9 d;环磷酰胺组 ip环磷酰胺 75 mg/kg,从接种瘤株后第 3天开始 ip,隔日 1次,共 4次。

2.2 TIL的制备: 末次给药后次日,无菌抽取 EAC小鼠腹水 4 mL,肝素抗凝,1 200 r/min离心 10 min,去上清液,取沉淀 1份,加入到 2份淋巴细胞分离液表面,1 200 r/min离心 10 min,收集界面上的细胞,洗入 Hanks液中,1 200 r/min离心 5 min,反复洗 2次,得所需 TIL细胞,调整细胞浓度为 1×10^7/mL,作为效应细胞。同时,另取沉淀 1份,以肿瘤细胞分离液同法制备 ATC作为靶细胞,调整细胞浓度为 1×10^6/mL,用以测定 TIL的杀伤活性。

2.3 TIL杀伤活性的测定: 取 96孔培养板,每实验孔加入效应细胞和靶细胞各 100 μL,效、靶细胞比为 10∶1,同时设靶细胞孔、效应细胞孔、空白孔,在 37℃、5% CO_2条件下,作用 4 h后每孔加入 MTT (2 mg/mL) 5 μL,同样条件下继续作用 4 h,每孔取上清液 150 μL,加入 96孔反应板,每孔加入 DMSO 150 μL,以溶解形成的色素颗粒,于酶标仪 630 nm波长下测 A 值,计算细胞杀伤活性[2]。

$$\text{TIL杀伤活性} = \left(1 - \frac{A_{\text{效靶细胞}} - A_{\text{效应细胞}}}{A_{\text{靶细胞}}}\right) \times 100\%$$

2.4 TIL体外杀伤 ATC的形态学观察: 将 TIL与 ATC混合培养 2, 4, 10, 14, 24 h,用生物倒置显微镜观察培养的细胞并拍照记录。

3 结果

3.1 对 EAC小鼠腹水中 TIL杀伤 ATC活性的影响: 见表 1。结果显示,益气平悬饮大、小剂量组 TIL杀伤活性均有所提高,与模型对照组比较,经 Dunnett-T检验,差异显著 ($P < 0.05$)。

3.2 对 TIL杀伤 ATC活性影响的形态学观察:

表 1 益气平悬饮对荷 EAC小鼠腹水中 TIL 杀伤 ATC活性的影响 ($\bar{x}\pm s$, n= 10)

Table 1 Influence of QBSRDB on killing activity of TIL to ATC in hydroperitonia of bearing-EAC mice ($\bar{x}\pm s$, n= 10)

组 别	剂量 /(g· kg^{-1})	杀伤活性 /%
模型对照	–	11.27± 4.42
环磷酰胺	0.075	12.98± 3.88
益气平悬饮	37.0	18.72± 5.64*
	18.5	17.69± 6.82*

与模型对照组比较: * P < 0.05

* P < 0.05 *vs* model group

EAC小鼠腹水中的 TIL (图 1–A) 与 ATC共同孵育 2 h,光镜下即可见 TIL向 ATC靠拢,开始形成花环 (图 1–B); 培养 4 h, TIL攻击 ATC,与 ATC接触,呈花环状 (图 1–C); 培养 10 h, TIL与 ATC接触更密切, ATC细胞膜已有破损 (图 1–D); 培养 14 h,被 TIL包绕的 ATC细胞膜破碎 (图 1–E); 培养 24 h, ATC细胞裂解成碎片状, TIL完好,可攻击其他 ATC细胞 (图 1–F)。形态学的改变为 TIL杀伤 ATC细胞提供了有力证据,同时提示 TIL杀伤 ATC细胞具有主动性和一定的特异性。

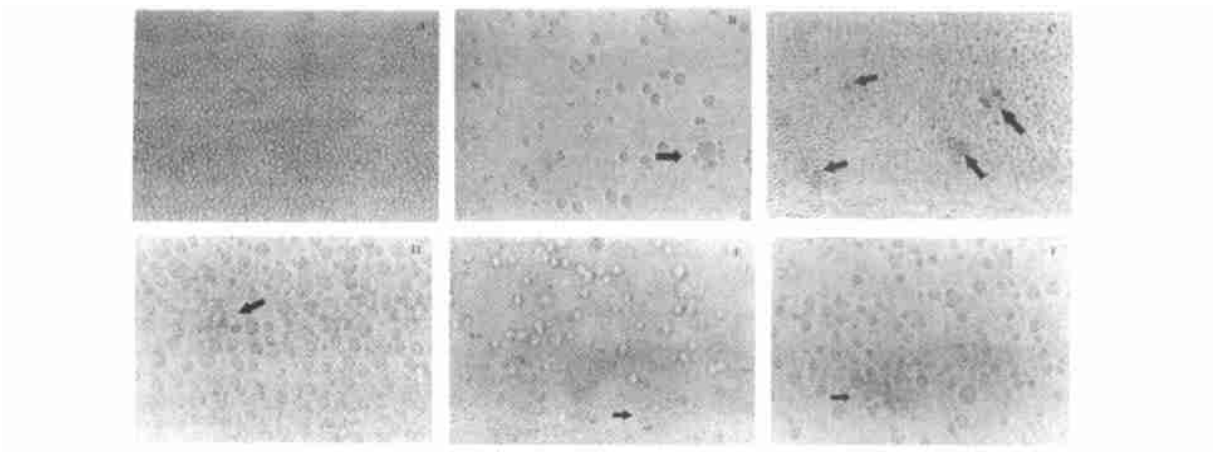

图 1 EAC小鼠 TIL杀伤 ATC形态学变化

Fig. 1 Cell-morphological changes of TIL killing ATC in bearing-EAC mice

4 讨论

TIL由 Mac Carty 1992年首次描述,其后一直受到关注。这种渗入到肿瘤组织内的细胞的活性及表型分布,与恶性肿瘤发生、发展直接相关。研究表明, TIL是一种抗肿瘤效应细胞,其抗肿瘤效价是淋巴因子激活的杀伤细胞 (LAK) 的 50~ 100倍[3],具有重要潜在价值。近年,随着 TIL分离制备技术和体外扩增培养方法的建立, TIL在免疫生物学和功能研究方面进展快速,已经从实验研究进入临床应用研究,显示了良好的前景。

TIL是以淋巴细胞为主的异质性淋巴细胞群体,大多聚集在肿瘤周围或其间质中,也存在于癌性胸腹水中,其杀伤功能主要依赖其中的 CTL (细胞毒性 T细胞) 是否能有效地激活和行使功能。但研究显示, TIL原位功能是抑制或麻痹的,从而造成肿瘤免疫不能奏效[3]。因此,激活和扩增 TIL,成为肿瘤免疫治疗的又一重要手段。近年,有学者对癌性胸水中 TIL进行体外培养,再回输体内抗癌,取得较好疗效。但由于技术设备条件要求高,推广困难。所以,在体内提高 TIL杀伤活性从而积极发挥其抗癌作用,具有重要意义。研究表明,益气平悬饮对 Lewis肺癌有明显抑瘤作用,并显著延长荷艾氏腹水癌小鼠生存期,与榄香烯胸腔注射联合治疗肺癌性胸水 22例有效率达 95.5%,抗癌作用明显[4]。本实验在给药后分离培养细胞中直接观察到益气平悬饮大、小剂量组均能提高 TIL杀伤 ATC活性,并加速 ATC死亡,为其用于治疗肿瘤提供重要依据。

References

[1] Cui X B. *Practical Subject of Lung Disease* (实用肺脏病学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1991.

[2] Jiang J T, Wu C P, Deng H F, *et al*. Study on the killing activity of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) on hydrothorax complicated from lung cancer [J]. *Shaanxi J Med Lab Sci* (陕西医学检验), 2001, 16(1): 28-29.

[3] Yang Z. *Tumor Immunology* (肿瘤免疫学) [M]. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 1998.

[4] Huang L Z. Studies on the experimental and clinical effects of Qi-boosting and suspended rheum-dispersing beverage on the local immunologic function and the lesion of hydrothorax complicated from lung cancer [A]. *Doctoral Degree Thesis Album of Hunan College of Traditional Chinese Medicine* (湖南中医学院博士学位论文集) [C]. Changsha: Hunan College of Traditional Chinese Medicine, 2003.