

青蒿鳖甲方抗肿瘤炎症反应研究

钱晓丹, 王 增, 张佳丽, 胡志娟, 蒋佳艺, 周慧君*

浙江大学药学院, 浙江 杭州 310058

摘要: 目的 考察青蒿鳖甲方对肿瘤炎症反应的干预作用, 分析其干预作用的量效关系以及君药青蒿及青蒿鳖甲组合在全方中的作用。方法 S_{180} 荷瘤小鼠随机分为青蒿组 (1.5 g/kg), 青蒿鳖甲组合组 (1.5 g/kg), 青蒿鳖甲方低、中、高剂量 (0.75、1.5、3.0 g/kg) 组及模型组, 每天 ig 给药 1 次, 连续给药 10 d。停药后称各组小鼠肿瘤质量, 免疫组织化学法与 Western blotting 法检测肿瘤组织中环氧合酶-2 (COX-2)、血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白表达, HE 染色、光学显微镜计数白细胞, ELISA 法测定荷瘤小鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、前列腺素 E_2 (PGE $_2$) 水平。结果 青蒿鳖甲组合较单一青蒿有更强的抑瘤作用和较强的 PGE $_2$ 抑制作用; 青蒿鳖甲方明显升高细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 水平, 明显抑制 COX-2、VEGF 蛋白表达和肿瘤生长; 青蒿鳖甲方低、中、高剂量抑制肿瘤生长的作用无明显量效关系。结论 青蒿鳖甲方通过对 TNF- α 和 IL-1 β 的调控作用干预肿瘤炎症反应, 进而产生抑制肿瘤生长作用。

关键词: 青蒿鳖甲方; 青蒿; S_{180} 肉瘤; 肿瘤炎症反应; 环氧合酶-2; 前列腺素 E_2

中图分类号: R285.5; R979.19 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)01-0065-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.01.013

Study on antitumor inflammatory response of Qinghao-Biejia Formula

QIAN Xiao-dan, WANG Zeng, ZHANG Jia-li, HU Zhi-juan, JIANG Jia-yi, ZHOU Hui-jun

College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: Objective To observe the intervention of antitumor inflammatory response of Qinghao-Biejia Formula, to analyze the dose-effect relationship of the intervention, and to investigate the roles of *Qinghao* and *Qinghao-Biejia* combination in the formula. **Methods** The ICR mice bearing S_{180} sarcoma were randomly divided into six groups: *Qinghao* (1.5 g/kg), *Qinghao-Biejia* combination (1.5 g/kg), Qinghao-Biejia Formula (0.75, 1.5, and 3.0 g/kg), and model groups. The drugs were ig administered once daily for 10 d continuously. After the last administration, the tumor weights in mice of each group were detected. The expression of COX-2 and VEGF protein in S_{180} sarcoma was detected by immunohistochemistry and Western blotting methods; Leukocyte numbers were counted by HE staining and optical microscope. Levels of TNF- α , IL-1 β , and PGE $_2$ in mice serum were measured by ELISA assay. **Results** *Qinghao-Biejia* combination had much stronger antitumor effects and inhibition on PGE $_2$ than single *Qinghao*. Qinghao-Biejia Formula improved the levels of TNF- α and IL-1 β significantly, and also decreased the expression of COX-2 and VEGF protein obviously. No obvious dose-effect relationship was observed in the inhibition on tumor growth by low-, mid-, and high-dose of Qinghao-Biejia Formula. **Conclusion** Qinghao-Biejia Formula has the inhibition on tumor and interferes the inflammatory response through the regulation of TNF- α and IL-1 β .

Key words: Qinghao-Biejia Formula; *Qinghao*; S_{180} sarcoma; inflammatory response; COX-2; PGE $_2$

青蒿鳖甲方出自清代吴鞠通《温病条辨》, 由青蒿、鳖甲、生地黄、知母、牡丹皮组成, 是治疗热病后期“阴虚内热”的代表方。现代在临床上用于治疗“癌热”效果满意^[1-2]。由于“癌热”与前炎症因子环氧合酶-2 (COX-2) 及代谢产物的产生有关, 因此被视为肿瘤恶性转化中的一个复杂事件。COX-2 可通过其产物前列腺素 (PG) 家族, 刺激细

胞增殖, 刺激肿瘤新生血管形成, 抑制肿瘤细胞凋亡, 具体机制尚未完全清楚, 但 COX-2 介导的血管内皮生长因子 (VEGF) 表达上调可能是其中一个重要机制^[3]。COX-2 过度表达使直接代谢产物前列腺素 E_2 (PGE $_2$) 能直接刺激血管生成; 同时 PGE $_2$ 能诱导细胞生成 VEGF, 产生的 VEGF 以旁分泌和自分泌的形式作用于内皮细胞, 从而促进肿瘤血管

收稿日期: 2012-03-12

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (Y207432)

作者简介: 钱晓丹 (1971—), 女, 主管药师, 在读硕士生, 主要研究方向为中药药理学。E-mail: qxd.001@163.com

*通信作者 周慧君 Tel: (0571)88208401 E-mail: zhouhj@zju.edu.cn

形成^[4]。本实验采用 S₁₈₀ 荷瘤小鼠, 比较青蒿、青蒿鳖甲组合、青蒿鳖甲方不同剂量对肿瘤组织 COX-2 炎症反应的干预作用, 分析肿瘤组织 COX-2 与 VEGF 蛋白表达水平, 测定荷瘤小鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、PGE₂ 水平, 探讨青蒿鳖甲方抗肿瘤作用机制, 为研发配合肿瘤化疗治疗的中药复方提供实验依据。

1 材料

1.1 药材与试剂

青蒿、鳖甲、生地黄、知母、牡丹皮, 均购自杭州华东武林大药房, 经浙江省中医院丰素娟主任中药师鉴定均为正品, 原(动)植物分别为青蒿 *Artemisia annua* L.、鳖 *Trionyx sinensis* Weigand、地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch、知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge、牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr.。

免疫组化 Envision™ plus 加强型试剂盒, 福州迈新生物技术有限公司; TNF- α 、IL-1 β 、PGE₂ 的 ELISA 试剂盒, 北京中杉金桥生物技术有限公司; 抗兔 COX-2 多克隆抗体、抗鼠 VEGF 单克隆抗体, Cayman Chemical 公司; 羊抗人 Actin 多克隆抗体, Santa Cruz 公司; 增强化学发光检测试剂, Santa Cruz 公司; PVDF 膜, Millipore 公司; M-MLV 逆转录酶、TaqDNA 聚合酶, MBI 公司; Trizol, 上海生物工程有限公司。琼脂糖, BBI 公司; RPMI 1640 培养基, Sigma 公司。

1.2 动物和瘤株

清洁级 ICR 系小鼠, 雄性, 6 周龄, 18~22 g, 浙江省医学科学院动物实验中心提供, 实验动物许可证号 SX(浙)2003-0001。小鼠 S₁₈₀ 瘤株, 中国科学院上海细胞生物学研究所提供。

1.3 仪器

荧光倒置显微镜, Leica 公司; 1851 型层流超净工作台, Thermo Electron 公司; 3111 型二氧化碳培养箱, Thermo Electron 公司; 酶联免疫分析仪, Bio-Tek 公司; 5415R 台式高速低温离心机, Eppendorf 公司; 凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 垂直电泳系统, Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 试药制备

2.1.1 青蒿粉末^[3] 青蒿 6 g 在 60 °C 干燥至恒定质量, 碾碎, 过 100 目筛, 备用。

2.1.2 青蒿鳖甲组合粉末 青蒿粉末制备同“2.1.1”项。鳖甲 15 g 水浸 1 h, 煎煮 2 次, 每次浓缩至 100

mL, 滤过, 合并 2 次滤液, 继续加热浓缩至 3~4 mL, 呈黄色胶状。将青蒿与鳖甲胶混合均匀, 置于 60 °C 烘箱干燥至恒定质量, 碾碎, 备用。

2.1.3 青蒿鳖甲方片剂 由太极集团重庆桐君阁股份有限公司技术指导, 按中药成方制剂标准 WS-B-1355-93 制备。具体组方为青蒿 80 g、鳖甲胶 13.4 g、地黄 160 g、知母 80 g、牡丹皮 120 g。牡丹皮粉碎成细粉, 取 104 g, 余作粗头留用; 青蒿蒸馏提取挥发油, 药渣、粗头与知母、地黄加水煎煮 3 次, 合并煎液, 滤过, 滤液浓缩成清膏, 加入鳖甲胶使溶化, 浓缩成稠膏, 与牡丹皮细粉混匀, 干燥, 研细, 制成颗粒, 干燥, 加入上述挥发油, 混匀, 压制成片(每片含 0.45 g 生药), 即得。

2.2 体内抑瘤实验

S₁₈₀ 肿瘤细胞于 RPMI 1640 培养液(含 10% 小牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μ g/mL)中 5% CO₂, 37 °C 培养。取对数生长期细胞(5×10^3 /mL), 无菌条件下给 ICR 小鼠 ip 0.2 mL。取接种后 8 d 的小鼠腹水, 用生理盐水稀释成 1×10^7 /mL 细胞悬液, 给每鼠左前肢腋窝皮下接种 0.2 mL。将接种成功的小鼠随机分为 6 组(每组 10 只): 青蒿(生药 1.5 g/kg)组, 青蒿鳖甲组合(生药 1.5 g/kg)组, 青蒿鳖甲方低、中、高剂量(生药 0.75、1.5、3.0 g/kg), 模型组(给予同体积生理盐水), 于接种次日每天 ig 给药 1 次, 连续给药 10 d。停药次日断头处死小鼠, 剥取肿瘤称质量, 计算抑瘤率。留取血清, -80 °C 保存待测。

抑瘤率 = $1 - \frac{\text{给药组平均瘤质量}}{\text{模型组平均瘤质量}}$

2.3 免疫组化法分析 COX-2 及 VEGF 表达与 HE 染色法计数白细胞总数

免疫组化分析按照试剂盒操作说明进行。肿瘤取出后用多聚甲醛固定, 常规处理, DAB 显色, 梯度乙醇脱水, 中性树胶封片, 根据检测的目标蛋白, 一抗采用抗鼠 COX-2 及 VEGF 单克隆抗体, 阴性对照组采用 PBS 代替特异性一抗, 均以棕黄色的强弱程度表示 COX-2 及 VEGF 蛋白表达的强弱。肿瘤组织切片经 HE 染色, 光学显微镜下($\times 100$)计数 100 个细胞中多核白细胞(WBC)数量。

2.4 Western blotting 分析 COX-2 及 VEGF 表达

称取各组肿瘤组织 50 mg, 冰上研磨后用预冷 PBS 洗涤 2 次, 加入 200 μ L 蛋白裂解液, 冰浴中放置 30 min(每隔 10 min 用漩涡混合仪震荡 5 s), 于 4 °C、13 000 r/min 离心 30 min, 吸取上清液置离心

管中, 超声、煮沸使其变性后提取蛋白, 用 Bradford 法测定蛋白浓度, 调整各组蛋白浓度为相同值。用 12% SDS-PAGE 进行电泳, 每个泳道上总蛋白 80 μg 。电泳后蛋白条带转移至 PVDF 膜上, 膜用含 5% 脱脂奶粉的 TPBS 室温封闭 1 h, 加入抗兔 COX-2 多克隆抗体、抗鼠 VEGF 单克隆抗体(1:500 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜, TPBS 洗膜, 辣根过氧化物酶标记的二抗室温作用 1 h (1:5 000 稀释), TPBS 洗膜, 采用增强化学发光法 (ECL 法) 对目标条带进行检测。同一张膜通过抗体的洗脱, 重新对 β -actin 的蛋白条带进行检测, 作为内参。

2.5 ELISA 法测定荷瘤小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 PGE₂ 水平

各组小鼠血清样品按相应试剂盒说明测定, 根据对照品和样品的吸光度 (A) 值, 计算各组小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、PGE₂ 水平。

2.6 数据处理

体外实验均重复 3 次, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 15.0 统计软件, 以 Dunnett's t 检验分析两样本均数间差异。

3 结果

3.1 对 S₁₈₀ 移植瘤生长的影响

体内抑瘤实验显示, 与模型组相比, 青蒿、青蒿鳖甲组合、青蒿鳖甲方 3 个剂量对小鼠 S₁₈₀ 移植瘤生长均有非常明显的抑制作用, 均明显减轻肿瘤质量 ($P < 0.01$), 其中青蒿鳖甲组合及青蒿鳖甲方组较青蒿组的作用明显 ($P < 0.05$), 青蒿鳖甲方的 3 个剂量未显示明显的量效关系。结果见表 1。

3.2 对 S₁₈₀ 移植瘤组织白细胞总数的影响

与模型组相比, 青蒿及青蒿鳖甲组合组小鼠 S₁₈₀ 移植瘤内白细胞数量明显减少, 青蒿鳖甲方 3

个剂量组白细胞减少更加明显。结果见表 1。

3.3 对 S₁₈₀ 移植瘤组织 COX-2 和 VEGF 蛋白表达的影响

免疫组化分析显示, 模型组小鼠 S₁₈₀ 移植瘤组织呈较深棕黄色; 青蒿及青蒿鳖甲组合组肿瘤组织染色明显减弱; 青蒿鳖甲方 3 个剂量组的肿瘤组织染色减弱更明显。结果见图 1。Western blotting 分析结果显示, 与模型组比较, 青蒿、青蒿鳖甲组合、青蒿鳖甲方各剂量组小鼠肿瘤组织中 COX-2、VEGF 蛋白表达均有下降趋势, 其中青蒿鳖甲方 3.0 g/kg 组 COX-2、VEGF 蛋白表达下降与模型组和青蒿组相比差异显著 ($P < 0.05$)。结果见图 2。

3.4 对荷瘤小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 和 PGE₂ 水平的影响

与模型组相比, 青蒿组、青蒿鳖甲组合组、青蒿鳖甲方 1.5 g/kg 组小鼠血清中的强致热剂 PGE₂ 水平均明显下降 ($P < 0.05$ 、 0.01), TNF- α 明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 青蒿组小鼠血清中 IL-1 β 无明显变化, 青蒿鳖甲组合组小鼠血清中 IL-1 β 明显下降 ($P < 0.01$), 青蒿鳖甲方 1.5 g/kg 组小鼠血清中 IL-1 β 明显升高 ($P < 0.05$)。结果见图 3。

4 讨论

环氧合酶 (COX), 又称前列腺素 (PG) 过氧化物合成酶, 是催化花生四烯酸转变为 PG 和其他前列腺物质的重要限速酶, 包括 COX-1 和 COX-2^[5]。COX-1 属于结构型基因, 在正常组织和细胞中表达, 而 COX-2 属于诱导型基因, 静息时不表达, 而在诱导条件 (如细胞因子、内毒素、白细胞介素、肿瘤诱导因子等) 刺激下均能产生^[6]。近年来研究表明, COX-2 在直肠癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、结肠癌等多种恶性肿瘤中均过度表达, 表明 COX-2

表 1 青蒿、青蒿鳖甲组合、青蒿鳖甲方对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠肿瘤质量、白细胞总数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effects of Qinghao, Qinghao-Biejia combination, and Qinghao-Biejia Formula on tumor weight, total number of leukocyte of S₁₈₀-bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	去瘤体质量 / g	肿瘤质量 / g	抑瘤率 / %	白细胞总数 / %
模型	—	28.25 ± 3.26	2.11 ± 0.43	—	21 ± 2
青蒿	1.5	28.65 ± 2.56	1.20 ± 0.49**	43.13	9 ± 1
青蒿鳖甲组合	1.5	28.80 ± 2.11	0.98 ± 0.21**#	53.55	10 ± 1
青蒿鳖甲方	0.75	29.91 ± 2.87	0.97 ± 0.42**#	51.35	6 ± 1
	1.5	29.79 ± 2.87	0.96 ± 0.27**#	54.50	5 ± 1
	3.0	28.54 ± 2.87	0.92 ± 0.22**#	61.38	5 ± 1

与模型组比较: ** $P < 0.01$; 与青蒿组比较: # $P < 0.05$

** $P < 0.01$ vs model group; # $P < 0.05$ vs Qinghao group

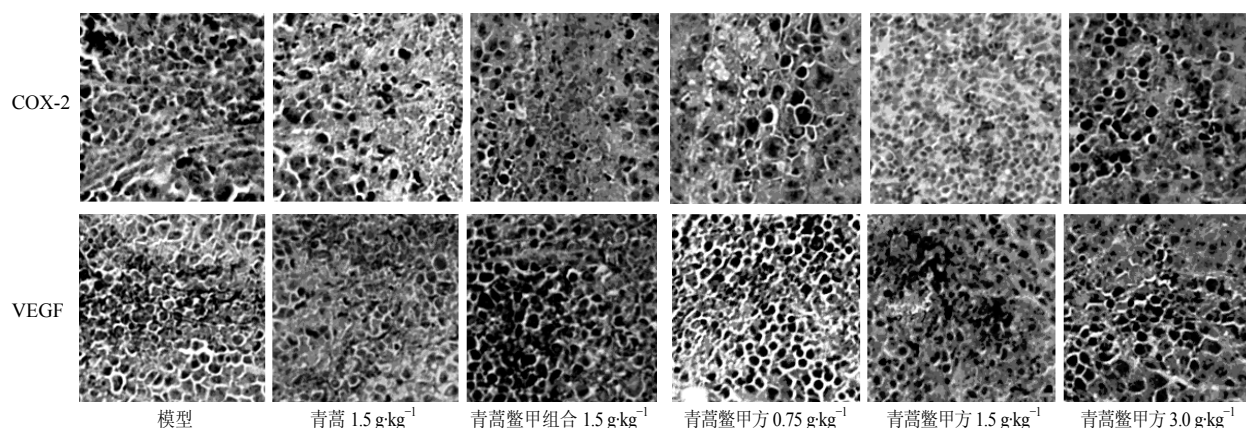


图 1 青蒿、青蒿鳖甲组合、青蒿鳖甲方对肿瘤组织中 COX-2 和 VEGF 蛋白表达的影响 (免疫组化染色分析)

Fig. 1 Effects of *Qinghao*, *Qinghao-Biejia* combination, and *Qinghao-Biejia* Formula on COX-2 and VEGF protein expression in tumor tissue (immunohistochemistry staining)

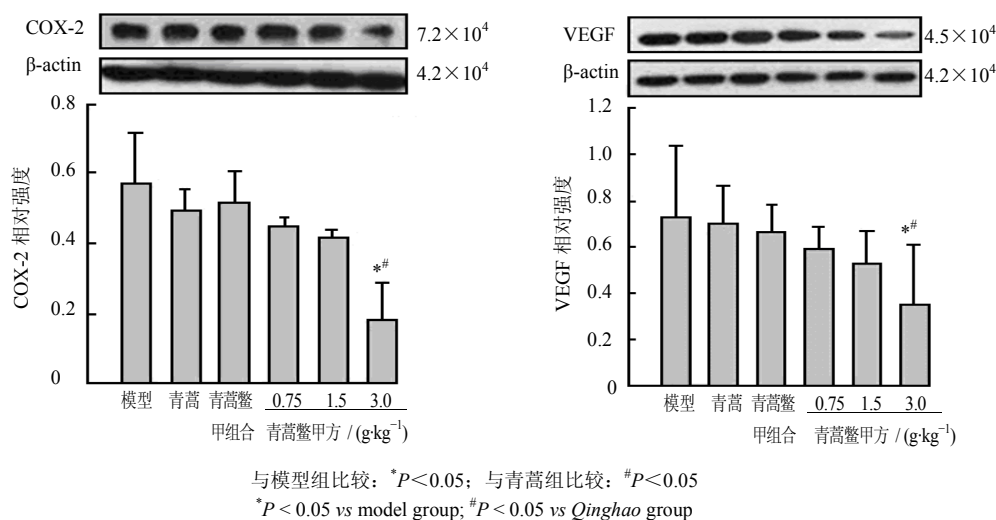


图 2 青蒿、青蒿鳖甲组合、青蒿鳖甲方对肿瘤组织中 COX-2 和 VEGF 蛋白表达的影响 (Western blotting 分析)

Fig. 2 Effects of *Qinghao*, *Qinghao-Biejia* combination, and *Qinghao-Biejia* Formula on COX-2 and VEGF protein expression in tumor tissue (Western blotting analysis)

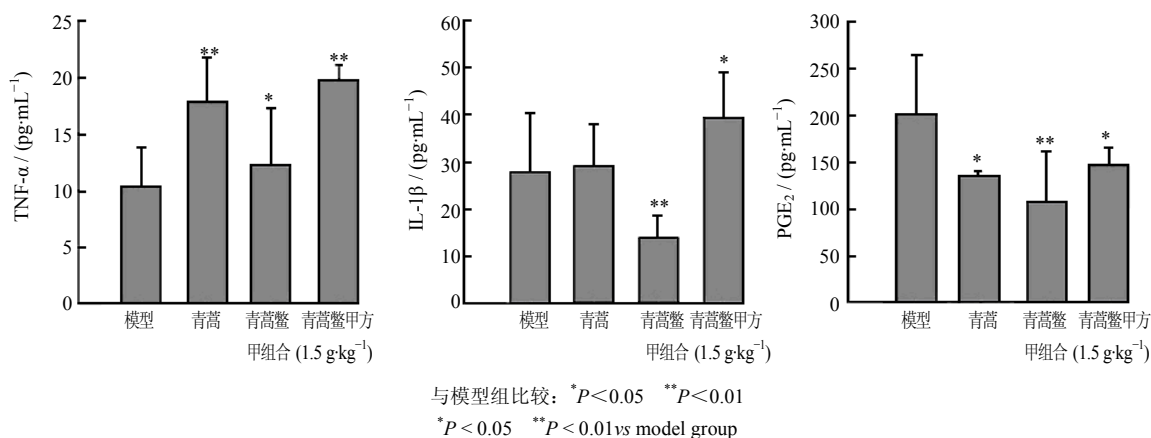


图 3 青蒿、青蒿鳖甲组合、青蒿鳖甲方对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 PGE₂ 水平的影响

Fig. 3 Effects of *Qinghao*, *Qinghao-Biejia* combination, and *Qinghao-Biejia* Formula on levels of TNF- α , IL-1 β , and PGE₂ in serum of S₁₈₀-bearing mice

的过度表达与肿瘤发生、发展密切相关^[7]。COX-2与肿瘤的多种生物学行为有关:抑制肿瘤细胞凋亡,促进肿瘤血管生长,促进肿瘤侵袭能力,抑制免疫,参与致癌物代谢等^[8-12]。

青蒿鳖甲方中鳖甲性善入阴分养阴液,且鳖为蠕动之物,入络剔邪;青蒿轻清芳香,清热透络,引邪外出;鳖甲先煎而青蒿后下,更有先入后出之妙,先入阴搜邪,后引邪出表。该方配伍地黄滋阴凉血,知母、牡丹皮清泻阴分伏火,全方配伍严谨,共奏滋阴清热、透邪外出之功。青蒿鳖甲方不仅治疗温病后期的虚热病,也广泛用于癌症晚期化疗后低热不退,疗效满意^[13]。现代医学认为,“癌热”与前炎症因子 COX-2 及代谢产物有关。COX 作为花生四烯酸转化为前列腺素的生物合成通路中的一种关键酶,其中 COX-2 为前炎症因子与花生四烯酸代谢有关,可生成 PG, PGE₂ 是痛觉过敏物质也是强致热剂^[14-15]。此外,在炎症反应中由单核巨噬细胞产生的 TNF- α 和 IL-1 β 等趋化因子涉及炎症细胞趋化和自身免疫过程。

本实验采用 S₁₈₀ 荷瘤小鼠模型,对青蒿鳖甲方及方中君药青蒿与青蒿鳖甲组合的抗肿瘤炎症反应活性进行研究,结果表明,青蒿鳖甲方对肿瘤组织白细胞浸润、COX-2 与 VEGF 蛋白表达、小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、PGE₂ 水平均有明显的干预效应,显示清热解毒中药与鳖甲合理配伍具有良好的抗肿瘤炎症反应活性。青蒿鳖甲组合物较单一青蒿有更强的抑制肿瘤作用,并具有较强的抑制 PGE₂ 的作用,其配伍地黄、知母、牡丹皮组成的青蒿鳖甲方能明显升高 TNF- α 和 IL-1 β 水平,明显抑制 COX-2 蛋白及下游 VEGF 蛋白表达,通过抑制肿瘤炎症反应及抑制肿瘤组织血管生成能更有效抑制肿瘤生长,表明青蒿鳖甲方不仅是治疗“癌热”优良古方剂,而且对 TNF- α 和 IL-1 β 也有一定调控作用,有望成为良好的肿瘤化疗辅助药物。

参考文献

- [1] 边荣华. 青蒿鳖甲汤治疗癌症发热临床观察 [J]. 天津中医, 1997, 14(5): 210-211.
- [2] 黄礼明, 胡莉文. 丘和明教授以青蒿鳖甲汤治疗血液病验案 [J]. 新中医, 2004, 36(7): 7-8.
- [3] Chang S H, Liu C H, Conway R, *et al.* Role of prostaglandin E2 dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2 induced breast cancer progression [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 591-596.
- [4] Li W, Zhang H H, Xu R J, *et al.* Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, nimesulide, on the growth of ovarian carcinoma *in vivo* [J]. *Med Oncol*, 2008, 25(2): 172.
- [5] Yildirim Y, Ozycikan O, Bilezirci B, *et al.* Lack of influence of cyclooxygenase-2 expression in hepatocellular carcinomas on patient survival [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2008, 9(2): 295-302.
- [6] Smith W L, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes [J]. *Chin Invest*, 2001, 107(12): 1491-1498.
- [7] Marks F, Furstemberger G. Cancer chemoprevention through interruption of multistage carcinogenesis. The lesson learns by comparing mouse skin carcinogenesis and large bowel cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2008, 36(3): 314-319.
- [8] Soh J W, Kazi J, Li H, *et al.* Celecoxib-induced growth inhibition in SW480 colon cancer cells is associated with activation of protein kinase G [J]. *Mol Carcinog*, 2008, 47(7): 519-526.
- [9] Fuji W R, Iida K, Kanaski H, *et al.* Cyclooxygenase-2 expression in endometrial cancer correlation with microvessel count and expression of vascular endothelial growth factor and phosphorylase [J]. *Hum Pathol*, 2002, 33(2): 213-221.
- [10] Dohadwala M, Luo J, Zhu L, *et al.* Non-small lung cancer cyclooxygenase-2 dependent invasion is mediated by CD44 [J]. *J Biol Chem*, 2009, 276(24): 20809-20817.
- [11] Liu M, Matsumura N, Mandai M, *et al.* Classification Using hierarchical clustering of tumor-infiltrating immune cells identifies poor prognostic ovarian cancers with high levels of COX expression [J]. *Mod Pathol*, 2009, 22(3): 373-379.
- [12] Estenban J, Robert D, Costanzo A, *et al.* Lung cancer and cyclooxygenase-2 [J]. *Ann Thorac Surg*, 2008, 76(4): 1327-1335.
- [13] 杜美君. 青蒿鳖甲汤证探析 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1996, 2(3): 34.
- [14] Saukkonen K, Rintahaka J, Sirula A, *et al.* Cyclooxygenase-2 and gastric carcinogenesis [J]. *APMIS*, 2003, 111(10): 915-925.
- [15] Hida T, Kozaki K, Muramatsu H, *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(5): 2006-2011.