

山药提取物联合 DC-CIK 细胞疗法对结肠癌 HT29 干细胞荷瘤裸鼠的体内抗肿瘤研究

孙雯雯^{1,2}, 窦金霞², 张琳², 乔丽葵², 沈娜², 高文远¹

1. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072

2. 天津市第四中心医院, 天津 300140

摘要: 目的 观察山药提取物联合树突状细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞(DC-CIK)疗法对结肠癌 HT29 细胞干细胞荷瘤裸鼠的治疗效果。方法 建立 Balb/c 裸鼠结肠癌干细胞荷瘤模型, 随机分为 4 组, 对照组、DC-CIK 组、山药提取物组、山药提取物联合 DC-CIK 组(联合治疗组), 每组 10 只。其中 DC-CIK 组、联合治疗组裸鼠在肿瘤干细胞接种第 4 天后通过尾 iv 1×10^6 个 DC-CIK 细胞给予治疗, 每周 2 次, 共 3 周; 山药提取物组和联合治疗组, 按山药提取物 125 mg/kg 给药, 每天 ig 给药 1 次, 共 3 周; 对照组以等体积生理盐水代替。各组裸鼠在治疗 3 周期间每 2 天测量瘤体大小及裸鼠体质量, 治疗结束后处死裸鼠, 取出瘤体称质量, 并计算抑瘤率, RT-PCR 法检测瘤组织中信号通路关键基因的表达水平。结果 治疗结束后, 山药提取物组、DC-CIK 组、联合治疗组的瘤体质量明显低于对照组, 其中, 联合治疗组抑瘤率为 51.26%。在信号通路关键基因的表达水平变化方面, 联合治疗组与 DC-CIK 组、山药提取物组相比, PI3K/Akt 通路中关键基因 PI3KR1, Wnt/ β -catenin 通路中关键基因 Wnt1, Notch 通路中关键基因 Notch1 的 mRNA 表达均有所下调, DC-CIK 组和山药提取物组相比, 各基因 mRNA 表达变化差异不显著。结论 对结肠癌 HT29 细胞干细胞荷瘤裸鼠模型, 山药提取物联合 DC-CIK 抑瘤效果最佳。

关键词: 山药; 树突状细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞(DC-CIK); 结肠癌; 肿瘤干细胞; 抗肿瘤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)07-1362-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.07.017

In vivo antitumor effect of Chinese yam extract combined with DC-CIK on nude mice bearing colon cancer HT29 stem cells

SUN Wen-wen^{1,2}, DOU Jin-xia², ZHANG Lin², QIAO Li-kui², SHEN Na², GAO Wen-yuan¹

1. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2. Tianjin Fourth Central Hospital, Tianjin 300140

Abstract: Objective To compare the therapeutic effects of different treatments on the nude mice bearing colon cancer HT29 cells. **Methods** Balb/C nude mice colon cancer stem cell model was established and the mice were randomly divided into following four groups: blank control group, DC-CIK group, yam group, and yam combined with DC-CIK group (combined treatment group), each group of 10 nude mice. In DC-CIK group and combined treatment group, after tumor stem cells were inoculated in nude mice for 4 d, 1×10^6 DC-CIK cells were used through the tail vein injection for treatment, twice a week for three weeks. The mice in Chinese yam group and combined treatment group were ig administered with 125 mg/kg Chinese yam extract, once daily for three weeks, and the mice in control group were treated with equal volume of saline instead. Tumor size and body weight of nude mice were measured every 2 d during treatment for three weeks in each group. After the treatment, the nude mice were sacrificed to take out the tumor weight and the tumor inhibitory rate was calculated. The RT-PCR method was used to detect the expression levels of the key genes in signal pathway. **Results** After treatment, the quality of tumor in yam group, DC-CIK group and combined treatment group was significantly lower than that in control group. Among them, the inhibitory rate was 51.26% in combined treatment group. In the changes of expression levels of key genes in signaling pathway, the key genes of PI3KR1 in PI3K/Akt pathway, the key gene of Wnt1 in

收稿日期: 2016-10-15

基金项目: 天津市应用基础与前沿技术研究计划(14JCYBJC26900); 天津市卫生行业重点攻关项目(13KG116)

作者简介: 孙雯雯(1970—), 女, 在读博士研究生, 研究员, 主要研究方向为肿瘤生物治疗。E-mail: sww33@sohu.com

*通信作者 高文远, 教授。E-mail: pharimgao@tju.edu.cn

Wnt/beta-catenin pathway, and the mRNA expression of key gene Notch1 in Notch pathway in combined treatment group were decreased compared with DC-CIK group and yam group. Compared with the DC-CIK group, the mRNA expression changes were not statistically significant. **Conclusion** The effect of Chinese yam combined with DC-CIK group is the best on the treatment of HT29 cell stem cell tumor of colon cancer in nude mice. It provides a new idea for clinical treatment of colon cancer.

Key words: Chinese yam; DC-CIK; colon cancer; cancer stem cells; antitumor

在恶性肿瘤发病率和死亡率排位中, 结肠癌均位居各类癌症的第3位^[1], 结肠癌患者的早期临床症状并不典型, 误诊率高, 恶性度较高, 确诊晚, 易延误病情, 结肠癌患者5年生存率约为50%^[2], 分期为IIIc的结肠癌患者5年生存率为27%~44%^[3], 这是结肠癌的一个主要特点。有研究表明, 肿瘤干细胞是造成肿瘤耐受放疗和化疗, 以及复发和转移的基础, 靶向肿瘤干细胞是治疗肿瘤的关键^[4-6]。

目前广泛采用的树突状细胞(DC)联合细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer, CIK)在恶性肿瘤治疗方面, 体内外实验的有效性已经得到初步证实^[7]。山药为薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb. 的干燥块茎, 研究表明其能诱生干扰素样物质, 能增加T淋巴细胞的活性, 提高网状内皮系统的吞噬能力, 增强机体免疫功能, 抑制肿瘤细胞增殖^[8]。本研究采用山药提取物联合DC-CIK细胞免疫疗法, 对结肠癌HT29干细胞荷瘤裸鼠进行干预, 观察其体内抗肿瘤作用, 为临床结肠癌治疗提供新方案。

1 材料

1.1 药品与试剂

山药饮片, 皖西制药厂, 经天津大学高文远教授鉴定为薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb. 的干燥根茎。凝聚胺(Polybrene), 美国Sigma公司; Matrigel 基底胶, 美国Corning公司; PCR引物由北京奥科公司合成; 反转录试剂盒, 日本Takara公司。人重组 γ 干扰素(rhINF- γ)、人重组白细胞介素-2(rhIL-2)、白细胞介素-1 α (IL-1 α)、人重组粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)、人重组白细胞介素-4(rhIL-4), 均为美国Peprotech公司产品。

1.2 主要实验仪器

细胞培养箱(美国Thermo公司); 显微镜(日本Olympus公司); PCR仪(美国AB公司); 电泳仪(美国Bio-Rad公司); 凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司); 流式细胞仪(美国BD公司); 全自动细胞计数分析仪(韩国Countstar公司)。

2 方法

2.1 山药提取物的制备

山药饮片, 用8倍量的水提取3次, 每次2h, 合并滤液, 滤液浓缩, 浓缩液转移至蒸发皿中于70℃真空至干, 得山药提取物(提取率为2.78%, 含总多糖324.90 mg/g)。

2.2 结肠癌HT29细胞中CD133⁺细胞(干细胞)的分选

收集对数生长期的结肠癌HT29细胞(天津市肿瘤医院惠赠), 计数, 用300 μ L PBS重悬至数量为 1×10^8 个细胞, 加入100 μ L CD133磁珠和受体(购自德国Miltenyi公司), 混匀, 4℃孵育30 min。加入2 mL PBS, $300 \times g$ 离心10 min, 用500 μ L PBS重悬细胞。将3 mL PBS致敏于LS型细胞分选柱(LS柱, 购自美国Miltenyi公司), 待液体流干后, 加入细胞悬液, 洗去未结合的细胞, 收集CD133⁺细胞。

2.3 DC细胞和CIK细胞的制备

2.3.1 CIK细胞的制备与细胞免疫表型的检测 正常健康成人供者(健康志愿者, 经天津市第四中心医院伦理委员会批准), 进行干细胞动员(天津市第四中心医院进行), 然后进行外周血干细胞单采术, 收集供者当天的白细胞20 mL, 使用淋巴细胞分离液获取单个核细胞。收集单个核细胞中的非黏附细胞, 加入含10%小牛血清RPMI 1640完全培养基, 并加入50 ng/mL rhINF- γ , 刺激24 h后, 加入50 ng/mL抗CD3单抗及500 U/mL rhIL-2及5 ng/mL IL-1 α , 培养至第7天, 与DC细胞共培养, 每2天半量换液。

CIK细胞免疫表型的检测: 收集培养第7天和第14天的CIK细胞, 台盼蓝染色法计总细胞数和活细胞数, 计算细胞存活率(细胞存活率=活细胞数/总细胞数)。将上述细胞 $200 \times g$ 离心3 min; 用PBS将细胞浓度调至 $1 \times 10^3/\mu$ L, 分别加入抗体PerCP-CyTM5.5 Mouse Anti-Human CD3、PE Mouse Anti-Human CD56、APC Mouse Anti-Human CD8, 4℃避光孵育30 min; 用1~2 mL PBS重悬细胞,

低温高速离心机 $200\times g$ 离心 3 min, 用 1 mL PBS 重悬细胞, 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰盒中; 用流式细胞仪检测 CIK 细胞表面分子的表达。

2.3.2 DC 细胞的制备与细胞免疫表型的检测 按“2.2.1”项方法采集供者当天的白细胞 50 mL, 使用淋巴细胞分离液获取单个核细胞。收集贴壁细胞, 加入含有 1 000 U/mL rhGM-CSF、1 000 U/mL rhIL-4 和 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 完全培养基中, 培养 7 d, 收获成熟的 DC 细胞, 第 8 天与 CIK 细胞混合培养。

DC 细胞免疫表型的检测: 收集培养第 8 天 DC 细胞, 计数; 用 PBS 将细胞浓度调整到 $1\times 10^3/\mu\text{L}$, 分别加入抗体 APC Mouse Anti-Human CD40、PE Mouse Anti-Human CD80、FITC Mouse Anti-Human HLA-DR、PerCP-CyTM5.5 Mouse Anti-Human CD86, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 用 1~2 mL PBS 重悬细胞, $218\times g$ 离心 3 min, 弃上清, 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰盒中; 用流式细胞仪检测 DC 细胞免疫表型。

2.4 结肠癌 HT29 干细胞(CD133⁺细胞)荷瘤裸鼠模型制备

Balb/c 裸鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证号为 11400700106716, 雌性, 3~4 周龄, 体质量 16~18 g) 40 只适应性饲养 1 周, 将浓度为 $1\times 10^5/\text{mL}$ 的 CD133⁺ 细胞 0.2 mL, 用微量注射器, 接种于 Balb/c 裸鼠右侧腋下, 观察裸鼠成瘤情况, 接种部位出现质地较硬的肿瘤结节等指征认定为成瘤。

2.5 荷瘤裸鼠的药物及免疫治疗

2.5.1 分组及给药 将上述荷瘤裸鼠随机分为 4 组, 每组 10 只。对照组, 尾 iv 生理盐水, 每周 2 次, 每次 0.2 mL; DC-CIK 组, 尾 iv 无抗原负载的 DC-CIK 细胞, 按小鼠体质量每克 5×10^5 个细胞治疗, 每周 2 次, 每次 0.2 mL; 山药提取物组, ig 给予山药提取物 125 mg/kg^[9], 每天 1 次, 每次 0.2 mL; 山药提取物联合 DC-CIK 组(联合治疗组), 尾 iv 无抗原负载的 DC-CIK 细胞, 按小鼠体质量每克 5×10^5 个细胞治疗, 每周 2 次, 每次 0.2 mL, 同时按山药提取物组每天 1 次 ig 0.2 mL 山药提取物 125 mg/kg。

2.5.2 肿瘤体积及肿瘤质量的测定 裸鼠在肿瘤干细胞接种后的第 4 天, 各组进行第 1 次免疫治疗。每组裸鼠进行 3 周的治疗, 期间每 2 天测量瘤体体积, 游标卡尺测量移植瘤的最小直径(宽)及最大

直径(长), 肿瘤体积(mm^3)= $0.52\times \text{长}\times \text{宽}\times \text{宽}$ 。给药结束后取瘤体组织, 称质量, 计算抑瘤率。

抑瘤率= $1-\text{给药组瘤质量}/\text{对照组瘤质量}$

2.5.3 瘤组织标本的 HE 染色病理学检测 瘤组织经常规取材、脱水、包埋、制成组织蜡块。石蜡切片后, 经烤片机烤片、环保透明剂脱蜡、无水乙醇脱除环保透明剂、梯度乙醇(分别为无水乙醇、95%乙醇、80%乙醇)、入水、流动水冲洗切片、苏木素染色、盐酸酒精分化、氨水反蓝、伊红染色、环保封片胶封片。

2.5.4 RT-PCR 检测信号通路关键基因表达水平变化 取出用液氮冷冻的肿瘤组织, 研磨为粉末, 将粉末放入到离心管中, 将 0.3 mL(当组织样本量在 10~20 mg, BB4 用量 0.6 mL; 当组织样本量 ≤ 10 mg, BB4 用量 0.3 mL)的 BB4(加 10 μL β -巯基乙醇于 1 mL BB4 中, 现配现用)加入 10 mg 的组织中, 和 15 μL Proteinase K 混匀后, 10~20 min, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理。 $12\ 000\times g$ 离心 5 min, 将上清放入 RNase-free 离心管中。

RNA 提取(使用全式金 EasyPure[®] RNA Kit-ER101): (1) 向上清中加入 1 倍体积 70%乙醇, 混匀。(2) 彻底混匀, $12\ 000\times g$ 离心 30 s, 弃掉流出液。(3) 于离心柱中加入 CB4 500 μL , $12\ 000\times g$ 离心 30 s。于离心柱中央加入 80 μL 的 DNase I 工作液(现用现配: 70 μL Reaction Buffer 中加入 10 μL DNase I), 室温放置 15 min。重复步骤(3)。(4) 加 500 μL WB4, $12\ 000\times g$ 室温离心 30 s, 弃掉流出液。(5) 重复步骤 4。(6) $12\ 000\times g$ 离心 2 min, 室温静置数分钟后, 晾干离心柱。(7) 将离心柱放入 1 个新的 1.5 mL RNase-free 离心管中, 加入 30~100 μL RNase-free Water 于离心柱中央, 室温静置 1 min。(8) $12\ 000\times g$ 离心 2 min, 洗脱 RNA。(9) 将 RNA 分装, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。(10) 进行琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 状态、使用分光光度仪检测 RNA 浓度和纯度。

反转录反应体系: 先将 RNA 模板、引物和 RNase-free Water 混匀, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min。加入 2.0 μL 10 mmol/L dNTPs, 2.0 μL 10 $\times$ TS II RT Buffer, 0.5 μL Ribonuclease Inhibitor, 0.5 μL TransScript II RT 共 20 μL , 轻轻混匀, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。 $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 5 s 失活 TransScript II RT。

PCR 反应: 配制 PCR 反应体系, 加入 0.5 μL cDNA 模板, 100 $\mu\text{mol/L}$ 引物-F1.0 μL , 100 $\mu\text{mol/L}$

引物-R 1.0 μL , 10 $\times$ Buffer 2.5 μL , 25 mmol/L MgSO_4 1.0 μL , 2 mmol/L dNTPs 2.5 μL , DNA Polymerase KOD 0.5 μL 和 ddH₂O 16 μL , 共 25 μL 。分别设计信号通路关键基因引物, 引物均由金维智公司合成。以 β -actin 基因为内参。引物序列见表 1。

2.6 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件, 计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间及各组内指标进行方差分析或配对 t 检验, 方差分析后, 各组间比较用 Bonferroni 法。

3 结果

3.1 结肠癌裸鼠动物模型成模标准

接种 CD133⁺细胞的裸鼠, 在第 4 天全部出现了直径 3~5 mm 的结节, 以后移植瘤迅速生长, 质地逐渐坚硬, 边缘清晰。肉眼可见移植瘤具有黄色的包膜。CD133⁺细胞移植瘤病理切片, 为结肠中分化腺癌 (图 1)。

3.2 DC-CIK 细胞形态及免疫表型检测

外周血单个核细胞贴壁 2 h 后, 获得 DC 前体细胞, 细胞贴壁呈圆形, 表面光滑, 聚集呈小型集落; 培养至第 5 天, 细胞表面可见树突 (图 2)。CIK 培养初期细胞呈小圆形, 形态均一, 于第 8 天与 DC 混合培养, 随着培养时间延长, 细胞数目不断增加, 细胞形态不规则且聚集成大型悬浮集落 (图 2)。

表 1 RT-PCR 反应引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-PCR reaction

基因	引物序列 (3'→5')	产物 片段/bp
PIK3R1	正向引物 ACGTTTTGGCTGACGCTTTC	525
	反向引物 AGGTCCCGTCTGCTGTATCT	
Wnt1	正向引物 TGTGAACGTAGCCTCCTCCA	351
	反向引物 TCACACGTGCAGGATTTCGAT	
Notch1	正向引物 GCAGAGGCGTGGCAGACTA	572
	反向引物 CCCGTTCTTGACAGTTGTTTCC	
β -actin	正向引物 CGGGAAATCGTGCGTGACATTA	481
	反向引物 CGGACTCGTCATACTCCTGCTTG	

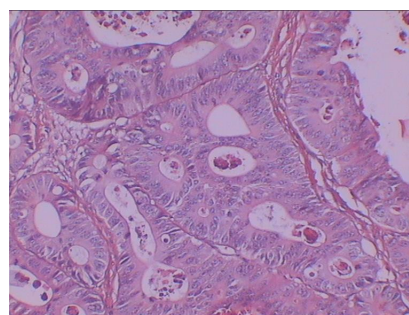


图 1 裸鼠移植瘤组织切片 HE 染色 (×400)

Fig. 1 HE staining of tissue slice of nude mice xenograft tumor (×400)

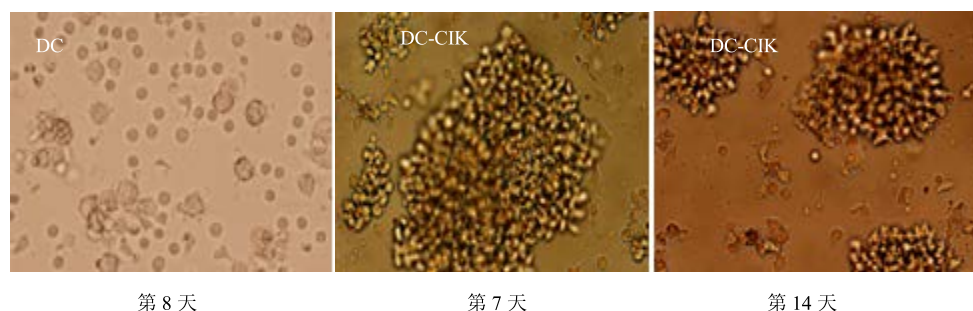


图 2 DC-CIK 细胞光学显微镜下细胞形态 (×400)

Fig. 2 Morphology of DC-CIK cells under inverted microscope (×400)

应用流式细胞仪测定 CIK 细胞表面分子 CD3、CD8、CD56 的表达情况, 结果见图 3 和 4, DC 细胞表面分子 CD40、CD80、CD86、HLA-DR 表达情况结果见图 5。经流式细胞仪分析显示, DC 细胞与同源 CIK 细胞共培养后, CIK 细胞中 CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺双阳性细胞的表达率均上升 ($P < 0.05$), 见表 2。DC 细胞培养至第 8 天 CD40、CD80、CD86、HLA-DR 细胞的表达率分别为 (17.28 $\pm$ 3.11) %、

(37.22 $\pm$ 3.26) %、(30.21 $\pm$ 2.96) %、(33.11 $\pm$ 3.52) %。

3.3 对荷瘤裸鼠的影响

与对照组比较, 山药提取物组、DC-CIK 组、联合治疗组荷瘤裸鼠的瘤体积显著减小 ($P < 0.05$), 各组瘤质量明显降低 ($P < 0.05$), 联合治疗组裸鼠瘤体积和瘤质量均明显低于山药组和 DC-CIK 组 ($P < 0.05$), 联合治疗组抑瘤率可达 51.26%, 结果见表 3。

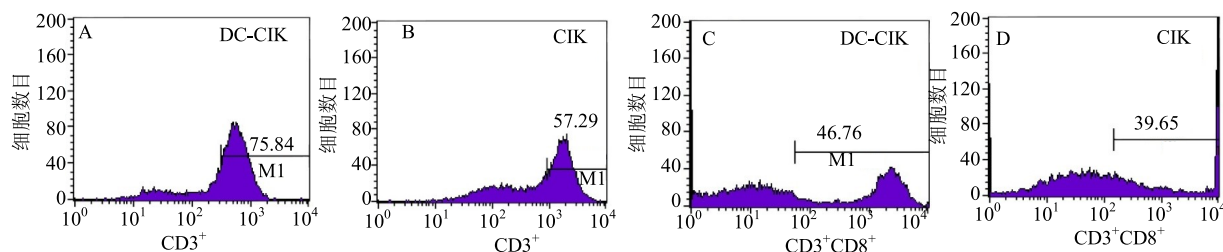


图 3 流式细胞仪分析 DC-CIK 和 CIK 细胞 CD3⁺ (A、B) 和 CD3⁺CD8⁺ (C、D) 的表达

Fig. 3 Flow analysis of expression of CD3⁺ (A, B) and CD3⁺CD8⁺ (C, D) cells of DC-CIK and CIK cells

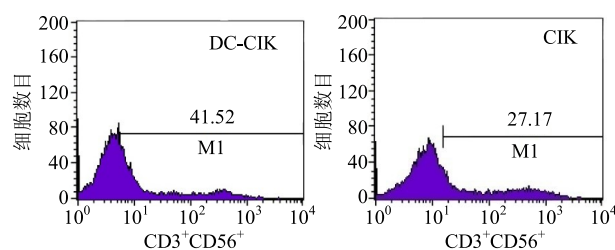


图 4 流式细胞仪分析 DC-CIK 和 CIK 细胞 CD3⁺CD56⁺ 的表达

Fig. 4 Flow analysis of expression of CD3⁺CD56⁺ cells of DC-CIK and CIK cells

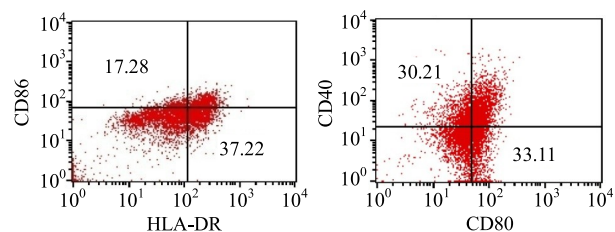


图 5 流式细胞仪分析 DC 细胞 CD40、CD80、CD86 和 HLA-DR 的表达

Fig. 5 Flow analysis of expression of CD40, CD80, CD86 and HLA-DR of DC cells

表 2 CIK 细胞免疫表型分析 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Analysis of CIK cell phenotype ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	CD3 ⁺ /%	(CD3 ⁺ CD8 ⁺)/%	(CD3 ⁺ CD56 ⁺)/%
DC-CIK	75.84 ± 7.35*	46.76 ± 6.03*	41.52 ± 5.85*
CIK	57.29 ± 6.37	39.65 ± 5.96	27.17 ± 3.45

与 CIK 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs CIK group

3.4 对荷瘤小鼠瘤组织关键基因表达的影响

联合治疗组、DC-CIK 组、山药提取物组与对照组相比, PI3K/Akt 通路中的关键基因 PIK3R1、Wnt/ β -catenin 通路中的关键基因 Wnt1、Notch 通路中的关键基因 Notch1 的 mRNA 表达均显著降低

表 3 各组对 HT29 结肠癌干细胞荷瘤裸鼠瘤体积和瘤质量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Comparison on tumor volume and weight of tumor-bearing nude mice with HT29 colon cancer stem cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	瘤质量/g	抑瘤率/%	肿瘤体积/mm ³
对照	5.93 ± 0.46	—	324.06 ± 22.36
DC-CIK	4.10 ± 0.41* [△]	30.86	261.12 ± 11.89* [△]
山药提取物	3.79 ± 0.40* [△]	36.09	209.36 ± 18.03* [△]
联合治疗	2.89 ± 0.35*	51.26	100.55 ± 15.43*

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与联合治疗组比较: [△] $P < 0.05$, 下表同

* $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.05$, same as below

($P < 0.05$)。联合治疗组与 DC-CIK 组和山药提取物组相比, mRNA 表达降低更显著 ($P < 0.05$)。DC-CIK 组和山药提取物组相比, mRNA 表达差异不显著 ($P > 0.05$), 结果见图 6 和表 4。

4 讨论

山药味甘、平, 归脾、肺、肾经, 具有补脾养胃、生津益肺、补肾涩精的功效。山药用于治疗脾虚食少、久泻不止、肺虚喘咳、肾虚遗精、带下、

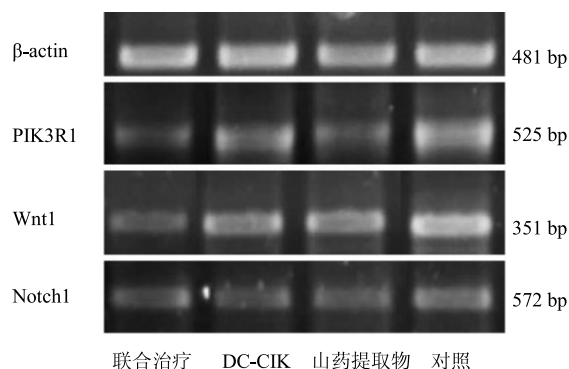


图 6 各组荷瘤小鼠瘤组织关键基因表达

Fig. 6 mRNA Expression of gene in signaling pathway in tumor tissue of nude mice in each group

表 4 信号通路关键基因表达的半定量分析 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 4 mRNA expression of PI3KR1 and Akt1 in PI3K/Akt signaling pathway ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	PI3KR1		Wnt1		Notch1	
对照	97.21	±16.73	59.31	±12.21	48.51	±11.02
山药提取物	48.05	±9.21 ^{*△}	21.37	±6.32 ^{*△}	33.15	±7.93 ^{*△}
DC-CIK	47.16	±9.56 ^{*△}	20.56	±6.02 ^{*△}	35.01	±8.22 ^{*△}
联合治疗	28.12	±8.01 [*]	11.09	±2.73 [*]	17.18	±4.82 [*]

尿频及虚热消渴等疾病。山药作为一种药食同源植物,受到大家的青睐。《本草纲目》中记载:“补虚羸,除寒热邪气,补中、益气力,长肌肉,强阳。久服,耳目聪明,轻身,不饥,延年”。山药块茎富含多糖,能诱生干扰素样物质,增加 T 淋巴细胞的活性,提高网状内皮系统的吞噬能力,增强肌体免疫功能,抑制肿瘤细胞增殖,故山药可作为抗肿瘤和放、化疗及术后体弱虚症的治疗药物。山药中所含的脱氢表雄酮也具有强化免疫功能、提高记忆力、镇静安眠、延缓骨骼肌肉老化和预防动脉硬化等抗衰老作用^[8,10]。

DC 是启动 T 细胞免疫应答的关键抗原提呈细胞。DC 需从不成熟阶段向成熟阶段发育才能获得免疫源性,从而活化 T 细胞。不成熟的 DC 位于外周上皮组织和结缔组织,具有极强的抗原摄取、加工和处理能力,摄取和吞入从上皮屏障进入机体的微生物抗原,把蛋白抗原处理为肽段,从而能够与主要组织相容性复合体(MHC)分子结合为 MHC 分子-抗原肽复合物,同时 DC 分化成熟,表现为 MHC 分子、共刺激分子(CD80 和 CD86)和黏附分子的表达显著增高,携带 MHC 分子-抗原肽复合物向局部引流淋巴结迁移,提呈 MHC 分子-抗原肽复合物给 T 细胞,活化 T 细胞,启动 T 细胞免疫应答^[11-12]。DC 细胞和 CIK 细胞共培养,DC 能够分泌细胞因子和共刺激分子,促进 CIK 细胞的分化和活化;通过刺激抗原特异性 T 细胞增殖,间接激活 CIK 细胞,达到杀伤肿瘤细胞的效果。

Hierchy 学说认为肿瘤细胞在功能上存在很大异质性,只有极小部分肿瘤起始细胞才具有成瘤能力,且成瘤率较高,也就是说肿瘤组织中存在极少数具有无限增殖和自我更新能力、导致肿瘤发生的细胞,即肿瘤干细胞,它是肿瘤转移、复发及耐药的根源^[13]。Yang 等^[14]证明了结肠癌肿瘤的发生发展、转移和术后复发都与肿瘤干细胞有关。

本研究采用山药提取物联合 DC-CIK 细胞免疫来治疗荷结肠癌 HT29 干细胞裸鼠,结果显示,治疗后,山药提取物组、DC-CIK 组、联合治疗组荷结肠癌 HT29 干细胞裸鼠的瘤质量明显低于对照组,联合治疗组又明显低于山药组和 DC-CIK 组;其中,联合治疗组抑瘤率可达 51.26%。

肿瘤的发生、发展、增殖和分化中与很多信号通路有关,如 Wnt/ β -catenin、Wnt、Notch、HOX、Bmi-1 等^[15-16]。Vermeulen 等^[17]发现,在大肠癌干细胞中 Wnt/ β -catenin 信号高度活化,而普通成熟的大肠癌细胞中 β -catenin 信号几乎不活化,提示大肠癌干细胞的形成可能与 Wnt/ β -catenin 信号的激活有关。此外研究也表明,在已知的 Wnt 信号级联反应中,大约 90%结肠癌中发现 β -catenin 的基因突变和肿瘤抑制基因(APC)导致了异常 Wnt/ β -catenin 信号途径^[18]。有研究表明,PI3K/AKT 信号通路中相关因子 PI3Kp110 α 、p-AKTs-er473、p-mTORser2448、CyclinD1 在结肠癌组织中阳性表达率均显著高于结肠腺瘤组织,这一结论表明,PI3K/AKT/m-TOR/CyclinD1 信号通路在结肠癌发生发展有密切关联性^[19-22]。研究发现,Notch1 可通过促进大肠癌细胞的上皮间质化来维持大肠癌干细胞的多向分化潜能^[23]。研究表明,在许多肿瘤干细胞中发现 Notch 通路蛋白的异常扩增和表达^[24-25]。

在本研究中联合治疗组、DC-CIK 组、山药组与对照组相比,PI3K/Akt 通路中关键基因 PI3KR1, Wnt/ β -catenin 通路中关键基因 Wnt1, Notch 通路中关键基因 Notch1 的 mRNA 下调较为明显;并且联合治疗组与 DC-CIK 组、山药提取物组比也有所下调。与治疗效果是一致的。

综上所述,山药提取物联合 DC-CIK 比单纯 DC-CIK 或山药提取物对结肠癌肿瘤干细胞更具杀伤效果,这为临床治疗结肠癌提供了新的方案。

参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2012, 62(1): 10-29.
- [2] 徐以浩, 席亚明. 结肠癌的诊断及治疗进展 [J]. *普外临床*, 1996, 11(3): 152-155.
- [3] Greene F L, Stewart A K, Norton H J. A new TNM staging strategy for node-positive (stage III) colon cancer: an analysis of 50, 042 patients [J]. *Annals Surg*, 2002, 236(4): 416-421.
- [4] Riether C, Schurch C, Ochsenbein A F. From "magic

- bullets" to specific cancer immunotherapy [J]. *Swiss Med Week*, 2013, 143(w13734): 1-12.
- [5] Collins A T, Berry P A, Hyde C, *et al.* Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23): 10946-10951.
- [6] Zeimet A G, Reimer D, Soppor S, *et al.* Ovarian cancer stem cells [J]. *Neoplasma*, 2012, 59(6): 747-755.
- [7] Ning N, Pan Q, Zheng F, *et al.* Cancer stem cell vaccination confers significant antitumor immunity [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(7): 1853-1864.
- [8] 赵宏, 谢晓玲, 万金志, 等. 山药的化学成分及药理研究进展 [J]. *今日药学*, 2009, 19(3): 49-52.
- [9] Liu Y, Li H, Fan Y, *et al.* Antioxidant and antitumor activities of the extracts from Chinese Yam (*Dioscorea oppositifolia* Thunb.) flesh and peel and the effective compounds [J]. *J Food Sci*, 2016, 81(6): H1553-H1564.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [11] Sangiolo D. Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors [J]. *J Cancer*, 2011, 2(1): 363-368.
- [12] Mehta B A, Schmidt-Wolf I G, Weissman I L, *et al.* Two pathways of exocytosis of cytoplasmic granule contents and target cell killing by cytokine-induced CD3+ CD56+ killer cells [J]. *Blood*, 1995, 86(9): 3493-3499.
- [13] Peitzsch C, Kurth I, Kunz-Schughart L, *et al.* Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance [J]. *Radiother Oncol: J Eur Soc Therap Radiol Oncol*, 2013, 108(3): 378-387.
- [14] Yang Y M, Chang J W. Current status and issues in cancer stem cell study [J]. *Cancer Invest*, 2008, 26(7): 741-755.
- [15] Raaphorst F M. Self-renewal of hematopoietic and leukemic stem cells: a central role for the Polycomb-group gene Bmi-1 [J]. *Trends Immunol*, 2003, 24(10): 522-524.
- [16] Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells [J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 255-260.
- [17] Vermeulen L, De Sousa E M F, van der Heijden M, *et al.* Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(5): 468-476.
- [18] Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer [J]. *Nature*, 2012, 487(7407): 330-337.
- [19] Ward S G, Finan P. Isoform-specific phosphoinositide 3-kinase inhibitors as therapeutic agents [J]. *Current Opin Pharmacol*, 2003, 3(4): 426-434.
- [20] Pene F, Claessens Y E, Muller O, *et al.* Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma [J]. *Oncogene*, 2002, 21(43): 6587-6597.
- [21] Rychahou P G, Murillo C A, Evers B M. Targeted RNA interference of PI3K pathway components sensitizes colon cancer cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) [J]. *Surgery*, 2005, 138(2): 391-397.
- [22] 张雪群, 高卫, 潘盼, 等. PI3K/AKT 及其相关因子在结肠癌中的表达 [J]. *山东大学学报: 医学版*, 2016, 54(1): 52-57.
- [23] Fender A W, Nutter J M, Fitzgerald T L, *et al.* Notch-1 promotes stemness and epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(11): 2517-2527.
- [24] 胡娜, 宋毅, 来卫东, 等. Notch1、Jagged1 在肝细胞癌组织中的表达及临床意义 [J]. *中国医药导报*, 2013, 10(19): 4-7.
- [25] Sriuranpong V, Borges M W, Ravi R K, *et al.* Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(7): 3200-3205.