

肺癌平膏及其拆方对Lewis肺癌小鼠树突状细胞影响的实验研究

郑红刚 朴炳奎 花宝金 周雍明 熊 露
林洪生 侯 炜 裴迎霞 祁 鑫

摘要 **目的** 观察中药复方肺癌平膏及其拆方对Lewis肺癌荷瘤小鼠血中、脾中及瘤体中的树突状细胞(DC)含量的影响,以期阐明不同治则方药对机体免疫调节功能可能的作用机制。**方法** 观察肺癌平膏及其各拆方对Lewis肺癌小鼠血中及脾中DC含量的影响,并用免疫组化观察各组瘤组织中S-100蛋白的表达情况。**结果** Lewis肺癌荷瘤小鼠的外周血及脾中DC含量(‰)较正常组明显降低($P<0.01$),分别为: 0.43 ± 0.26 vs 4.68 ± 0.90 , 0.32 ± 0.16 vs 3.68 ± 1.58 , 瘤组织中S-100蛋白的表达较弱;肺癌平膏可明显提高其外周血及脾中DC含量($P<0.01$),分别为: 2.55 ± 0.29 , 2.70 ± 0.63 , 并明显上调S-100蛋白表达水平;拆方研究表明,肺癌平膏中的益气类方药对Lewis肺癌荷瘤小鼠DC含量及表达的升高作用最为显著。**结论** 在扶正培本为主要治则的肺癌平膏抗肿瘤作用明确,其作用机制可能是通过提高荷瘤小鼠DC含量及表达,增强机体的抗肿瘤免疫功能,进而发挥抑瘤作用。

关键词 肺癌平膏; Lewis肺癌; 树突状细胞; 拆方

Effect of Feiliuping Ointment and Its Disassembled Prescriptions on Dendritic Cell of Mice with Transplanted Lewis Lung Cancer ZHENG Hong-gang, PIAO Bing-kui, HUA Bao-jin, et al *Department of Oncology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing (100053)*

ABSTRACT **Objective** To explore the possible immuno-regulating mechanism of action of Chinese drugs in different combinations (assembled depending different therapeutic principles) through observing the effects of Feiliuping intment (FLP) and its disassembled prescriptions on dendritic cells (DC) in blood, spleen and tumor in mice with transplanted Lewis lung cancer (LLC). **Methods** Percentages of DC in blood, spleen and tumor of mice with transplanted LLC treated by FLP and its disassembled prescriptions were estimated, and the S-100 protein expression in tumor tissue was detected by immunohistochemical method. **Results** The percentage of DC (‰) in tumor bearing mice was 0.43 ± 0.26 in peripheral blood, and 0.32 ± 0.16 in spleen, significantly lower than those in normal mice 4.68 ± 0.90 and 3.68 ± 1.58 , ($P<0.01$); and S-100 protein expression in tumor was weakened. After FLP treatment, the percentages of DC (‰) in tumor bearing mice were increased to 2.55 ± 0.29 in peripheral blood and 2.70 ± 0.63 in spleen ($P<0.01$), with the S-100 protein expression in tumor tissue up-regulated significantly ($P<0.01$). Study on different assembled prescriptions of FLP showed that the qi supplementing components of FLP displayed the optimal actions. **Conclusion** FLP, a Chinese herbal prescription made depending on Chinese medicine therapeutic principle of strengthening body resistance and consolidating constitution, has an obvious anti-tumor effect, to improve the immunological anti-tumor function of organism by promoting the amount and expression of DC might be the possible intrinsic mechanism.

KEYWORDS Feiliuping Ointment, Lewis lung cancer, dendritic cell, disassembled prescription

现代医学认为细胞免疫是机体抗肿瘤主动免疫应答反应的主要途径。抗原递呈细胞(antigen-presenting cell, APC)尤其是分化成熟的树突状细胞(dendritic cell, DC)向T细胞有效地递呈肿瘤抗原,是机体抗肿瘤

瘤免疫应答的关键^[1]。近年来有关DC参与肿瘤特异性主动免疫效应与机制的研究十分活跃^[2]。中医药对DC功能的影响,有望成为中西医结合的切入点,朴炳奎主任医师长期从事肿瘤虚证与机体免疫失衡的分子机制研究,并研制出院内制剂“肺癌平膏”,应用于临床多年,疗效确切^[3, 4]。现选取该药进行拆方研究,观察它们对肺癌荷瘤小鼠血中、脾中及瘤体中的DC含量的影响,以期阐明不同治则方药对机体免疫调节功能可能

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30371821)

作者单位:中国中医科学院广安门医院肿瘤科(北京 100053)

通讯作者:郑红刚, Tel: 010-88001192, E-mail: macrogone@

126.com

的作用机制。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞株 小鼠Lewis肺癌株由中国中医科学院广安门医院肿瘤科提供。用含100 U/mL青链霉素、10%灭活小牛血清的RPMI1640培养液,在37℃和5%CO₂充分湿化条件下培养备用。

1.2 动物 C57BL/6小鼠,雄性,6~8周龄,体重18~20 g,由中国医学科学院生物技术研究所提供。

1.3 药物

1.3.1 肺癌平膏全方 药物组成包括黄芪、西洋参、麦冬、北沙参、仙鹤草、拳参、败酱草、桃仁、三七、川贝、杏仁、桔梗、炙甘草、冬虫夏草、白花蛇舌草等。药物由中国中医科学院广安门医院制剂室提供,经生理盐水稀释为终浓度为1.71 g/mL后备用。

1.3.2 各拆方药物 各方组成如下:解毒方(白花蛇舌草、拳参、败酱草)、益气方(黄芪、党参)、益气解毒方(白花蛇舌草、拳参、败酱草、黄芪、党参),草药均购自广安门医院中药房,剂量以原方为准,制成浸膏后备用,其终浓度为分别为含生药2.32 g/g、3.62 g/g、2.77 g/g。

1.3.3 阳性对照药物 环磷酰胺(CTX),0.2 g/支,江苏恒瑞医药股份有限公司生产,生产批号:04081921。

1.4 主要试剂 小鼠CD14单抗(FITC)、CD16单抗(FITC)、DC Marker单抗(PE)及MHC-II单抗(PE-CY5)均购自美国Becton-Dicknson公司。

1.5 主要仪器 LEICA全自动图像分析系统,为德国产品;FACsort流式细胞仪,为美国Becton-Dicknson公司产品。

2 方法

2.1 造模方法 制备Lewis肺癌荷瘤小鼠,剥离生长旺盛期的瘤组织,选取1.0 mm×0.5 mm×0.3 mm左右生长良好的肿块,按肿瘤(g):生理盐水(mL)为1:3比例匀浆,调细胞数为2×10⁶/mL。选取C57BL/6小鼠,在无菌条件下,每只小鼠右侧腋窝皮下接种0.2 mL。

2.2 分组及用药方法 接种24 h后,采用数字随机法将小鼠分为6组,每组10只:即模型组(简称模型组),阳性对照组(简称CTX组),模型组加肺癌平膏全方(简称肺癌平膏组),模型组加解毒方(简称解毒组),模型组加益气方(简称益气组),模型组加益气解毒方(简称益气解毒组)。各给药组接种后第2天开始灌胃给药,每只0.3 mL(具体剂量依照动物体

表面积折算成等效剂量,用生理盐水将各浸膏稀释,使其浓度分别为肺癌平膏全方1.71 g/mL、益气方0.45 g/mL、解毒方0.47 g/mL、益气解毒方0.92 g/mL);模型组给同剂量的生理盐水;CTX组于接种后第2天腹腔注射CTX0.2 mL(给药剂量以60 mg/kg计,用生理盐水稀释,浓度为6 mg/mL)。

2.3 观察指标及检测方法

2.3.1 DC的分布及密度检测 采取各组小鼠外周血1 mL,肝素抗凝,取100 μL血标本,加入10 μL CD14单抗、20 μL CD16单抗、20 μL DC Marker单抗及20 μL MHC-II单抗,25℃避光温育30 min,加入溶血剂600 μL,25℃温育20 min,PBS洗涤2次,流式细胞仪检测DC的分布及密度。另取100 μL血标本进行白细胞计数,分别求得DC与单核细胞比值(DC/PBMC)和DC计数。

2.3.2 DC的含量测定 取各组小鼠的脾脏,同上法标记抗体,用流式细胞仪检测小鼠脾中DC的含量。具体方法参见文献[5]。

2.3.3 S-100在肿瘤组织中表达情况 选用小鼠瘤体,10%甲醛固定,采用免疫组化切片,根据各组切片中的染色条件,应用免疫图像分析系统在统一阈值下进行分析。首先输入图像,在400(40×10)倍显微镜下,以任意5个阳性显色作为评定依据。参考许玲等^[6]的评判标准,根据染色强度与阳性细胞数分别记分评定。(1)依照着色细胞强弱程度分为阴性、弱阳性(淡黄色)、中等阳性(棕黄色)、强阳性(棕褐色),分别给予分值为:0、1、2、3分;(2)以着色细胞占视野细胞总数的比例分为5级:0、1%~25%、26%~50%、51%~75%、76%~100%,分别给予分值为:0、1、2、3、4分;将每一标本的(1)、(2)两个分数相加判断结果,0~1分为阴性“-”,2~3分为弱阳性“+”,4~5分为阳性“++”,6~7分为强阳性“+++”。

2.4 统计学方法 应用SPSS 13.0统计分析软件对实验数据进行统计学处理,采用单因素方差分析进行各组间比较,对于等级资料采用秩和检验。

结 果

1 各组荷瘤小鼠外周血中DC含量比较(表1) 正常组DC含量较其他各组均高,差异均有统计学意义($P<0.01$),肺癌平膏组和益气组比正常组DC含量低,但比模型组明显升高($P<0.01$),CTX组、解毒组、益气解毒组DC含量同模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2 各组荷瘤小鼠脾中DC含量比较(表2) 模型

表1 各组荷瘤小鼠外周血中DC计数及含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	DC ($\times 10^6$)	PBMC ($\times 10^9$)	DC/PBMC (‰)
正常	10	1.30 $\pm$ 0.22	0.31 $\pm$ 0.12	4.68 $\pm$ 0.90
模型	10	0.15 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.07	0.43 $\pm$ 0.26 [*]
CTX	9	0.13 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.10	0.60 $\pm$ 0.09 [*]
益气	10	0.31 $\pm$ 0.13	0.21 $\pm$ 0.06	2.20 $\pm$ 1.05 ^{*△}
解毒	10	0.13 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.09	0.58 $\pm$ 0.10 [*]
益气解毒	10	0.16 $\pm$ 0.05	0.13 $\pm$ 0.04	1.15 $\pm$ 0.34 [*]
肺瘤平膏	10	0.38 $\pm$ 0.16	0.15 $\pm$ 0.04	2.55 $\pm$ 0.29 ^{*△}

注：与正常组比较，^{*}*P*<0.01；与模型组比较，[△]*P*<0.01

组脾中DC含量较正常组显著降低 (*P*<0.01)，CTX组及解毒组较模型组虽有升高，但差异无统计学意义 (*P*>0.05)；益气组及肺瘤平膏组均较模型组显著升高 (*P*<0.01)，且接近于正常组 (*P*>0.05)；而益气解毒组高于模型组 (*P*<0.05)。

表2 各组荷瘤小鼠脾中DC含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	DC (‰)
正常	10	3.68 $\pm$ 1.58
模型	10	0.32 $\pm$ 0.16 [*]
CTX	9	0.68 $\pm$ 0.13 [*]
益气	10	2.53 $\pm$ 0.88 ^{△△}
解毒	10	0.63 $\pm$ 0.17 [*]
益气解毒	10	2.13 $\pm$ 0.59 ^{*△}
肺瘤平膏	10	2.70 $\pm$ 0.63 ^{△△}

注：与正常组比较，^{*}*P*<0.01；与模型组比较，[△]*P*<0.05，^{△△}*P*<0.01

3 各组肿瘤组织中S-100蛋白的表达情况比较 (表3, 图1) S-100蛋白阳性反应颗粒位于细胞质中，细胞核阴性。在Lewis肺癌组织中，阳性细胞呈区域性分布于间质中，常和淋巴细胞相伴浸润形成细胞簇，其突起和淋巴细胞紧密接触，环绕癌细胞周围；提示DC以其突起摄取并识别肿瘤相关抗原，然后把这种抗原传递给T细胞，使淋巴细胞浸润在肿瘤旁组织中，从而启动机体的抗肿瘤免疫，以细胞毒作用杀伤肿瘤细胞。模型组及CTX组中S-100蛋白阳性颗粒密度较小，阳性反

表3 各组肿瘤组织中S-100蛋白的表达情况比较

组别	<i>n</i>	-	+	++	+++	平均秩和
模型	10	8	2	0	0	44.34
CTX	9	6	3	0	0	37.67
益气	10	0	1	2	7	157.72 [*]
解毒	10	2	5	3	0	90.34 [*]
益气解毒	10	2	2	5	1	107.67 [*]
肺瘤平膏	10	1	1	2	6	143.50 [*]

注：与模型组比较，^{*}*P*<0.01

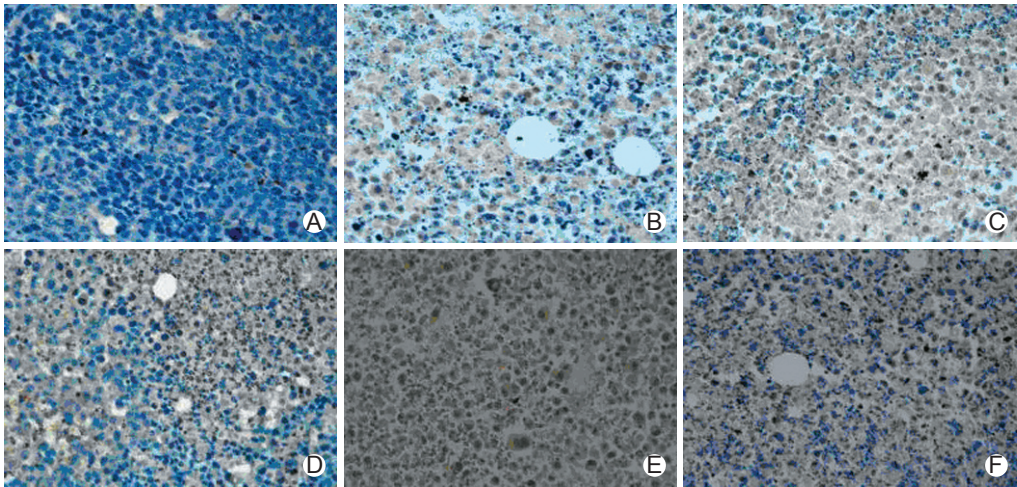
应较弱。各中药复方组对S-100蛋白表达呈明显上调趋势，可见阳性颗粒在细胞核周围聚集，密度较大，阳性反应强，平均秩和高，同模型组比较，差异有统计学意义 (*P*<0.01)。

讨 论

在几十年的中西医结合肿瘤实践中，已经形成了扶正培本、活血化瘀、清热解毒、软坚散结、以毒攻毒等多种治疗方法。

近年来国外研究发现肺癌组织局部DC浸润的程度与肿瘤患者的生存及预后有关^[7]。目前对于DC的了解主要来自于通过密度梯度离心、培养和、和/或阴性选择富集后的DC，产率和纯度较低，会影响DC的功能，且无法做定量分析。因此，直接检测荷瘤小鼠外周血中、脾中DC含量及其在癌组织的浸润程度，符合体内自然状态，更有助于阐明该复方抗肿瘤免疫反应的作用机制。本研究借鉴Upham JE等^[8]的方法，用CD14、CD16、MHC-II单抗及小鼠DC的特异性标志DC Marker进行标记，采用流式细胞仪检测小鼠外周血中及脾中DC的含量；而对于瘤组织中浸润性DC则选用常用的指标，即检测S-100蛋白表达情况。

肺瘤平膏的组方原则充分体现了以扶正培本为主



注：A为模型组；B为CTX组；C为益气组；D为解毒组；E为益气解毒组；F为肺瘤平膏组

图1 肿瘤S-100—抗免疫组化染色结果 (DAB显色，苏木素轻度复染， $\times 200$)

导及解毒抗癌、活血化瘀相结合的中西医结合肿瘤基本治疗模式。该方中黄芪、西洋参、冬虫夏草、沙参、麦冬益气养阴以扶正，白花蛇舌草、拳参、败酱草、仙鹤草清热解毒以抗癌，川贝、杏仁、桔梗、炙甘草止咳化痰，桃仁、三七活血化瘀共治标，全方扶正与祛邪相结合，共奏扶正抗癌、标本兼治之功。通过本研究证实，Lewis肺癌荷瘤小鼠的外周血及脾中DC含量明显降低，表明荷瘤机体抗肿瘤免疫功能低下、DC功能存在缺陷可能是其机体正气亏虚的重要表现形式，这与临床研究的结论相一致^[9-11]。结合本课题的其他相关研究成果可见，中药复方肺瘤平膏抑瘤作用明确，并可提高DC在外周血及脾中的含量，增加在肿瘤组织的浸润，使其能更好地发挥其抗肿瘤的作用^[12-14]。进一步的拆方研究表明，在调节DC功能方面，肺瘤平膏方中的扶正（益气为主）部分药物发挥了至关重要的作用。

由此可见，提高荷瘤机体DC含量，干预并调节其抗原递呈功能是中药复方肺瘤平膏抗肿瘤免疫治疗的作用机制之一，这也可能是中医扶正培本法治疗肿瘤的科学内涵之一。

参 考 文 献

- [1] Steinman RM, Inaba K, Turley S, et al. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent biological studies[J]. Hum Immunol, 1999, 60 (7): 562-567.
- [2] Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, et al. Idiotype pulsed dendritic cell vaccination for B cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients[J]. J Blood, 2002, 95 (5): 1517.
- [3] 朴炳奎, 唐文秀, 张宗歧, 等. 肺瘤平膏治疗晚期原发性肺癌临床观察——附339例临床分析[J]. 中医杂志, 1991, 32 (4): 21-23.
Piao BK, Tang WX, Zhang ZQ, et al. Clinical observation on Feiliuping Ointment for patients with advanced primary non-small cell lung cancer[J]. J Trad Chin Med, 1991, 32 (4): 21-23.
- [4] 郑红刚, 朴炳奎, 花宝金, 等. 肺瘤平膏治疗晚期非小细胞肺癌(气阴两虚型) 患者38例临床观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14 (5): 64-65.
Zheng HG, Piao BK, Hua BJ, et al. Feiliuping Ointment in the treatment of 38 patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2007, 14 (5): 64-65.
- [5] 王建中. 临床流式细胞分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 569-576.
Wang JZ, editor. Clinical flow cytometry[M]. Shanghai: Sientific and Technology Press of Shanghai, 2005: 569-576.
- [6] 许玲, 孙大志, 何金, 等. 胃癌同证型中肿瘤转移相关基因蛋白的表达[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12 (12): 2782-2787.
Xu L, Sun DZ, Jin H, et al. Expression of tumor metastasis-related gene protein in the same syndromic classification of gastric carcinoma on traditional Chinese medicine[J]. World Chin J Digestol, 2004, 12 (12): 2782-2787.
- [7] Zeid NA, Muller HK. S-100 positive dendritic cells in human lung tumors associated with cell differentiation and enhanced survival[J]. Pathology, 1993, 25 (4): 338-343.
- [8] Upham JE, Lundahl J, Liang JA, et al. Simplified quantitation of myeloid dendritic cells in peripheral blood by flow cytometry[J]. Cytometry, 2000, 40 (1): 50.
- [9] 朴炳奎, 郑红刚, 林洪生, 等. 晚期非小细胞肺癌患者外周血DC亚型与免疫状态关系研究[J]. 中国肺癌杂志, 2007, 10(5): 425-428.
Piao BK, Zheng HG, Lin HS, et al. A study on the relationship between the DC subsets and immunology state of patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. Chin J Lung Cancer, 2007, 10 (5): 425-428.
- [10] 郑红刚, 朴炳奎, 林洪生, 等. 晚期非小细胞肺癌患者外周血DC亚型与NK细胞的关系[J]. 肿瘤防治研究, 2008, 35(1): 18-22.
Zheng HG, Piao BK, Lin HS, et al. A study on the relationship between the DC subsets and nature killer cell of patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res Prevent Treat, 2008, 35 (1): 18-22.
- [11] 郑红刚, 朴炳奎, 林洪生, 等. 中药肺瘤平膏合并化疗对肺癌患者树突状细胞亚型的影响[J]. 中国肿瘤, 2008, 17 (2): 113-115.
Zheng HG, Piao BK, Lin HS, et al. Effect of Feiliuping Ointment in combination with chemotherapy on dendritic cell subsets of patients with non-small cell lung cancer[J]. China Cancer, 2008, 17 (2): 113-115.
- [12] 郑红刚, 熊露, 朴炳奎, 等. 肺瘤平膏及其拆方对Lewis肺癌移植瘤的抑瘤作用及对S-100蛋白和VEGF表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13 (5): 370-372.
Zheng HG, Xiong L, Piao BK, et al. Effect of Feiliuping Ointment and its modified formulas on growth inhibition of Lewis lung cancer transplantation tumor and expression of S-100 protein and VEGF [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2007, 13 (5): 370-372.
- [13] 郑红刚, 朴炳奎, 林洪生, 等. 中药复方肺瘤平膏对树突状细胞功能影响的拆方研究[J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30 (8): 525-528.
Zheng HG, Piao BK, Lin HS, et al. Decomposed recipes analysis of Feiliuping Ointment regulating the function of dendritic cell[J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2007, 30 (8): 525-528.
- [14] 郑红刚, 朴炳奎, 林洪生, 等. 肺瘤平膏及其拆方对树突状细胞抗原递呈功能影响的分子机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25 (6): 1133-1136.
Zheng HG, Piao BK, Lin HS, et al. Molecular mechanism of Feiliuping Ointment and its modified formulas in regulating antigen presentation function of DC [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2007, 25 (6): 1133-1136.

(收稿: 2009-06-05 修回: 2010-07-18)