

- [2] 许红心, 倪坚军. 苦药的药用研究概况[J]. 浙江中医学院学报, 2001, 25(4): 73-75.
- [3] Evandro FF, Chris ZYZ, Jack HW, et al. The MAP30 protein from bitter gourd (momordica charantia) seeds promotes apoptosis in liver cancer cells in vitro and in vivo[J]. Cancer Letters, 2012, 324(1): 66-74.
- [4] Thenmozhi AJ, Subramanian P. Antioxidant potential of momordica charantia in ammonium chloride-induced hyperammonemic rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2010, (4): 1-7.
- [5] Nivtabishekam SN, Asad M, Prasad VS. Pharmacodynamic interaction of momordica charantia with rosiglitazone in rats[J]. Chem Bio Interact, 2009, 177(3): 247-253.
- [6] Shih CC, Lin CH, Lin WL. Effects of momordica charantia on insulin resistance and visceral obesity in mice on high-fat diet[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2008, 81(2): 134-143.
- [7] Cheng HL, Huang HK, Chang CI, et al. A cell based screening identifies compounds from the stem of momordica charantia that overcome insulin resistance and activate AMP-activated protein kinase[J]. Agric Food Chem, 2008, 56(16): 6835-6843.
- [8] Prasad V, Jain V, Dorle AK. Evaluation of momordica charantia ghrita for immunomodulatory activity[J]. Journal of Plant Sciences, 2006, 1(1): 80-85.
- [9] Tripathi UN, Chandra D. Diabetes induced oxidative stress: a comparative study on protective role of momordica charantia and metformin [J]. Pharmacognosy Research, 2009, 1(5): 299-306.
- [10] Kay RA, Ferguson A. The immunological consequences of feeding cholera toxin I. Feeding cholera toxin suppresses the induction of systemic delayed-type hypersensitivity but not humoral immunity[J]. Immunology, 1989, 66(3): 410-415.
- [11] Zhao HY, Luo YY, Lu C, et al. Enteric mucosal immune response might trigger the immunomodulation activity of ganoderma lucidum polysaccharide in mice[J]. Planta Med, 2010, 76(3): 223-227.
- [12] 蔡寅, 刘敏, 吴勋贵, 等. 苦瓜多糖抗肿瘤及免疫增强活性的研究[J]. 药学与临床研究, 2010, 18(2): 131-134.
- [13] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2007: 53.
- [14] 侯春梅, 李新颖, 叶伟亮, 等. MTT法和CCK-8法检测悬浮细胞增殖的比较[J]. 军事医学科学院院刊, 2009, 33(4): 400-401.
- [15] Fortun-Lamothe L, Boullier S. A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits[J]. Livestock Science, 2007, 107(1): 1-18.
- [16] Mann JF, Acevedo R, Campo JD, et al. Delivery systems: a vaccine strategy for overcoming mucosal tolerance[J]. Expert Review of Vaccines, 2009, 8(1): 103-112.
- [17] 龚非力, 熊思东. 医学免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 35.
- [18] 刘冬妍, 刘沛. 肠道分泌型IgA的成分及功能[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(12): 2845-2848.
- [19] 程光文, 陈清山, 张绪忠. 苦瓜对正常小鼠和免疫受抑小鼠免疫促进作用的实验观察[J]. 中国冶金工业医学杂志, 1996, 15(4): 198-200.

(编辑: 梁进权)

清金得生片联合化疗对 Lewis 荷瘤小鼠 Fas、FasL mRNA 表达的影响

陈燕¹, 刘展华², 周岱翰¹ (1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 观察清金得生片联合化疗对 Lewis 荷瘤小鼠 Fas、FasL mRNA 表达的影响。**方法** Lewis 肺癌荷瘤小鼠随机分为模型组、清金组、顺铂组、清金加顺铂组, 给药 10 d 后, 取肿瘤组织, 采用实时荧光定量 PCR 法检测各组小鼠 Fas、FasL mRNA 的表达。**结果** 清金加顺铂组瘤体组织 Fas mRNA 的表达显著高于模型组 ($P < 0.05$), 各给药组间差异无统计学意义; 与模型组比较, 清金组、顺铂组、清金加顺铂组瘤体组织 FasL mRNA 的表达差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 各给药组间差异无统计学意义。**结论** 清金得生片联合化疗的抗肿瘤作用与调节 Fas/FasL 系统, 从而逆转肿瘤的免疫逃逸有关。

关键词: 清金得生片; Lewis 肺癌; Fas mRNA; FasL mRNA

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)03-0264-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.03.015

收稿日期: 2012-11-23

作者简介: 陈燕, 女, 博士研究生, 研究方向: 肿瘤的中西医结合临床及实验研究。Email: 554885653@qq.com。通讯作者: 周岱翰, 首席教授, 主任医师, 研究方向: 肿瘤的中西医结合临床及基础研究。Email: 13902206571@139.com。

Effect of *Qingjin Desheng* Tablets Combined with Chemotherapy on Fas/FasL Gene Expression in Lewis Lung Cancer Mice

CHEN Yan¹, LIU Zhanhua², ZHOU Daihan¹(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of *Qingjin Desheng* tablets (QDT) combined with chemotherapy on Fas/FasL gene expression in Lewis lung cancer mice. **Methods** Lewis lung carcinoma cells were transplanted into 40 C57BL/6J mice, and the tumor-bearing mice were randomly divided into model group, QDT group, Cisplatin group, and the combination group. After treatment for 10 days, the expression of Fas and FasL mRNA in the tumor tissue was detected with real-time fluorescent quantitation PCR. **Results** The combination group had higher Fas mRNA expression level than the model group ($P < 0.05$), but QDT group and Cisplatin group did not differ from the model group. The difference of FasL mRNA expression between the three medication groups and the model group was significant ($P < 0.05$), while the difference between the three medication groups was insignificant. **Conclusion** QDT combined with chemotherapy can suppress Lewis lung cancer by regulating the balance of Fas/FasL, thus to resist tumor immune escape.

Keywords: *Qingjin Desheng* tablets; Lewis lung cancer; Fas mRNA; FasL mRNA

肿瘤的凋亡抵抗是近年肿瘤研究领域提出的新观点,是肿瘤发生免疫逃逸的机制之一。许多研究均已表明,Fas/FasL系统在肿瘤的免疫逃逸过程中起重要作用^[1]。癌细胞通过抑制Fas表达而逃逸自身免疫细胞的攻击,使癌细胞更具有侵袭力,更易发生转移^[2]。化疗能延长大部分患者的生存时间,但同时使患者的免疫功能受到不同程度的影响,如果免疫功能持续下降,可促进肿瘤的复发和转移,降低患者的生活质量和生存率^[3]。清金得生片由广州中医药大学周岱翰教授研制,由西洋参、麦冬、绞股蓝、蟾酥、山慈菇等中药组成,具有益气养阴、扶正固本、清肺解毒、祛痰散结的功效,临床用于治疗原发性肺癌及转移性肺癌,既往研究多从抑瘤机制^[4-6]着手,对其免疫机制的研究较少。本研究探讨清金得生片抗肿瘤机制是否与调节小鼠Fas/fasL系统免疫逃逸机制有关。

1 材料与方法

1.1 瘤株 Lewis肺癌瘤株,广州中医药大学肿瘤研究所。

1.2 动物 C57BL/6J雌性小鼠40只,SPF级,体重19~22 g,6~8周龄,南方医科大学动物实验中心,许可证号:SCXK(粤)2008-0002。

1.3 药物 清金得生片,每片含生药0.3 g,广州中医药大学第一附属医院制剂室制备,实验时用蒸馏

水配成 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,4℃冰箱冷藏备用。顺铂,南京制药厂有限公司,批号:20110806,以生理盐水稀释成 $0.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液。

1.4 仪器 Trizol、SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity、SYBR Green I,美国Invitrogen公司;3900台式高通量DNA合成仪、9700 PCR仪、7500全自动荧光定量PCR仪,美国ABI公司;HC-3018R高速冷冻离心机,安徽科大创新股份有限公司。

1.5 Lewis肺癌动物模型的建立 选用移植10 d、生长良好Lewis肺癌瘤体组织,研磨,按1:3加生理盐水配成肿瘤细胞混悬液,用1 mL注射器抽取0.2 mL瘤细胞混悬液,接种于C57BL/6J小鼠右前肢腋窝皮下。

1.6 分组及给药 小鼠在接种Lewis肺癌瘤株后,随机分为4组,每组10只:模型组(灌胃等量生理盐水),清金组(灌胃清金得生片 $8.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),顺铂组(腹腔注射顺铂生理盐水溶液 $3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,给药容积为 $15\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,隔天1次,共5次);清金加顺铂组同时给予顺铂和清金得生片,给药方法与清金组和顺铂组相同。各组小鼠于接瘤次日开始给药,连续10 d,停药次日进行Lewis小鼠的肺癌组织取材。

1.7 免疫荧光定量PCR法检测Fas、FasL mRNA的表达 取瘤体组织100 mg加Trizol试剂1 mL,在匀浆管中匀浆,提取总RNA,紫外分光光度计测定

260 mm 和 280 mm 处的吸光度(A)值,分析 RNA 纯度并调整浓度。逆转录反应制备 cDNA, -80 ℃冰箱保存备用。引物在 GenBank 上查找目的基因 mRNA 序列,在 CDS 区设计特异性引物,采用 Primer express 2.0 软件,序列如下: Fas 上游引物: ATCTGGG-CTGTCCTGCCT, Fas 下游引物: CCTC-CTTGATATAATC CTTCTG, FasL 上游引物: GGTG-GTATTTTTCATGGTTCT, FasL 下游引物: ACTTTAAG-GCTTTGG-TTGT, 内参 TBP 上游引物: AACCACG-GCACTGATTTT, TBP 下游引物: CTGCCAGTCTG-GACTGTTCT。

1.8 PCR 反应 50 ℃预变性 15 min, 95℃变性 15 min, 然后 94 ℃退火 15 s, 55 ℃延伸 45 s, 共 45 循环,在每个循环第 3 步收集荧光信号。扩增后,进入结果分析界面,与 TBP 为内参照基因相比,得到目的基因的相对定量值。

1.9 统计学处理方法 采用 SPSS Statistics v 17.0 软件,用单因素方差分析方法及独立样本 *t* 检验进行分析。

2 结果

实验过程中模型组小鼠死亡 2 只,顺铂组及清金加顺铂组死亡各 1 只,共 36 个瘤体样本。与模型组比较,清金加顺铂组瘤体组织 Fas mRNA 的表达明显升高($P<0.05$),表明清金得生片与顺铂合用有一定的增效作用,而单用作用则不明显;清金组、顺铂组、清金加顺铂组瘤体 FasL mRNA 的表达明显下降($P<0.05$),各给药组间差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 各组小鼠瘤体 Fas、FasL mRNA 的表达结果($\bar{x}\pm s$, %)
Table 1 Comparison of Fas and FasL mRNA expression in tumor tissue of Lewis mice

组别	<i>n</i>	Fas/TBP	FasL/TBP
模型组	8	12.73 ± 9.76	1.89 ± 0.79
清金组	10	15.31 ± 8.89	0.92 ± 0.89*
顺铂组	9	15.99 ± 7.72	0.72 ± 0.57*
清金加顺铂组	9	28.37±17.17*	0.62 ± 0.25*

注:与模型组比较, * $P<0.05$ 。

3 讨论

Fas/FasL 系统是由 Fas(CD95 受体)与 FasL(CD95 配体)及相关调控因子组成,在传导细胞凋亡信号和免疫监控中起重要作用。当肿瘤细胞 Fas 表达水平下调,低于 Fas/FasL 途径诱导凋亡的阈值时,肿瘤细胞凋亡受到抑制,而肿瘤细胞表面 FasL 高表达能使 Fas 高表达激活的抗肿瘤的 T 淋巴细胞(TIL)发生凋

亡,从而使肿瘤细胞自身逃避机体的免疫监控^[7-8]。

体外实验研究^[9]表明顺铂可上调肺癌细胞表面 Fas mRNA 的表达。但由于顺铂具有细胞毒性,会杀伤正常细胞,其对骨髓抑制和肝、肾及免疫功能的损伤较大,影响了其远期疗效。中医药联合化疗能减轻化疗的毒副反应,同时中药可调高机体的免疫监视功能,增强机体对肿瘤细胞的杀伤作用,逆转肿瘤细胞免疫逃逸^[10]。我们前期研究表明,清金得生片可调节化疗荷瘤小鼠免疫机能,使外周血 T 淋巴细胞亚群中的 CD3、CD4 百分率回升,减轻化疗引起的毒副反应^[5];通过抑制抗凋亡基因 bcl-2 表达,促进凋亡基因 bax 的表达,以抑制人肺腺细胞(LAC)增殖、诱导细胞凋亡^[6],发挥其抗肿瘤作用。本研究结果显示,清金得生片联合化疗可上调荷瘤小鼠肿瘤组织 Fas mRNA 表达,并抑制 FasL mRNA 的表达。提示清金得生片和顺铂合用的抗肿瘤作用可能与其逆转 Fas/FasL 系统,以抑制 T 淋巴细胞凋亡的激活,从而避免肿瘤细胞发生免疫逃逸有关。

参考文献:

[1] Chatterjee K, Engelmark M, Gyllenstein U, et al. Fas and FasL gene polymorphisms are not associated with cervical cancer but differ among Black and Mixed-ancestry South Africans[J]. BMC Res Notes, 2009, 26(2): 238.

[2] Gabrilovich DI, Cheng P, Fan Y, et al. H1 histone and differentiation of dendritic cells. A molecular target for tumor-derived factors [J]. J Leukoc Biol, 2002, 72(2): 285-296.

[3] 姜彩虹. 化疗对肿瘤免疫功能的影响[J]. 中国社区医师(医学专业), 2012, 14 (3): 13.

[4] 陈瑶, 陈林香, 周岱翰, 等. 清金得生片对 Lewis 肺癌小鼠血清 IL-2、TNF 的影响[J]. 实用肿瘤学杂志, 2006, 20(4): 280-281.

[5] 陈林香, 戴馨仪, 周岱翰. 清金得生片对化疗荷瘤小鼠的增效减毒作用研究[J]. 中医药学刊, 2004, 22 (12): 2215.

[6] 陈林香, 周岱翰, 陈雪馨, 等. 清金得生片对人肺腺癌细胞端粒酶及凋亡相关基因蛋白表达的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(3): 203-205.

[7] Strand S, Hofmann WJ, Hug H, et al. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells-A mechanism of immune evasion[J]. Nature Med, 1996, 2(12): 1361-1363.

[8] Zhang B, Sun T, Xue L, et al. Functional polymorphisms in Fas and FasL contribute to increased apoptosis of tumor infiltration lymphocytes and risk of breast cancer[J]. Carcinogenesis, 2007, 28: 1067-1073.

[9] 王强, 张泉, 方立德. 顺铂在肺癌细胞 Fas 基因上调中的作用[J]. 华中医学杂志, 2002, 26 (6): 335-336.

[10] 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(12): 1801-1804.

(编辑: 梁进权)