

六味地黄丸入血成分对自杀基因杀伤 B16 细胞的增效作用

张广献¹, 王苏萍², 曾 玲¹, 谭宇蕙¹, 吴映雅¹, 杜标炎² (1. 广州中医药大学生化教研室, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学病理教研室, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 探讨六味地黄丸主要入血成分对自杀基因系统(HSV-tk/GCV)杀伤黑色素瘤 B16 细胞的增效作用及作用机制。**方法** 采用 MTT 法检测六味地黄丸主要入血成分丹皮酚、马钱素、莫诺苷、5-羟甲基-2-糠酸和獐牙菜苷 5 种化合物及其混合组分对 HSV-tk/GCV 杀伤 B16 细胞的影响; 入血成分混合组分处理脾淋巴细胞后培养上清对 HSV-tk/GCV 杀伤 B16 细胞的影响; 荧光显微镜观察及流式细胞术结合荧光示踪法分析含药淋巴细胞上清对细胞间缝隙连接通讯(GJIC)功能的影响及 Western blot 分析缝隙连接蛋白(Cx43)表达; MTT 法检测含药淋巴细胞上清对 HSV-tk/GCV 杀伤 B16 细胞的增效作用。**结果** HSV-tk/GCV 联合丹皮酚、马钱素、莫诺苷、5-羟甲基-2-糠酸和獐牙菜苷 5 种化合物及 5 种化合物的混合组分, 均未显示其对自杀基因的杀伤有直接增效作用; 而混合组分处理脾淋巴细胞后培养上清对 HSV-tk/GCV 杀伤 B16 细胞具有协同增效作用, 并呈一定的量效关系。含药淋巴上清可明显促进 Cx43 表达, 改善 B16 细胞间缝隙连接功能。含药淋巴上清对 HSV-tk/GCV 的 B16 细胞杀伤敏感性则无明显影响。**结论** 六味地黄丸主要入血成分可能刺激脾淋巴细胞产生某些活性物质, 并对 HSV-tk/GCV 杀伤 B16 细胞起增效作用, 这些淋巴细胞产生的免疫活性物质可能才是六味地黄丸对肿瘤自杀基因疗法增效作用的药效物质基础; 其增效机制可能与改善 B16 细胞间 GJIC 相关。

关键词: 六味地黄丸; HSV-tk/GCV 系统; B16 细胞; 旁杀伤

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)02-0153-06

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.02.010

Synergistic Effect of Plasma Constituents After Oral Administration of *Liuwei Dihuang* Pills in Suicide Gene Killing of B16 Cells

ZHANG Guangxian¹, WANG Suping², ZENG Ling¹, TAN Yuhui¹, WU Yingya¹, DU Biaoyan² (1. Department of Biochemistry, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Department of Pathology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To explore the synergistic effect and mechanism of plasma constituents after oral administration of *Liuwei Dihuang* Pills (LDP) in suicide gene killing of B16 cells. **Methods** MTT assay was adopted to observe the effect of plasma constituents after oral administration of LDP, paeonol, loganin, morroniside, 5-hydroxymethyl-2-furoic acid, and sweroside, and their mixture composition on HSV-tk/GCV suicide gene system in killing B16 cells. We also observed the effects of culture supernatant of lymphocytes treated by the mixture of five plasma components on HSV-tk/GCV suicide gene system in killing B16 cells. The gap junction function was analyzed by Fluorescent tracer with flow cytometry and fluorescence microscopy, and the expression of connexin was detected by Western blotting. The sensitization effects of drug-treated lymphocytes supernatant on tk/GCV system of B16-tk⁺ cells were investigated by MTT assay. **Results** Not only the 5 components but also their mixture compounds did not show the bystander effect when they were used together with tk/GCV system. However, the drug-treated lymphocytes supernatant showed the synergism in dose-effect relationship. Drug-treated lymphocytes supernatant significantly enhanced Cx43 expression and

收稿日期: 2013-12-09

作者简介: 张广献, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 分子免疫学。Email: zhangguangxian@gzucm.edu.cn。通讯作者: 杜标炎, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合肿瘤防治与肿瘤药理学。Email: dubiaoyan@gzucm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072906, 30973811)。

improved the GJ function of B16 cells, but had no significant effect on the sensitization of B16-tk⁺ cells to tk/GCV system. **Conclusion** Plasma LDP constituents can stimulate the lymphocytes to produce certain active substances which enhance the TSV-tk/GCV bystander effect on B16 cells. The immune active substances may be the material basis of the synergism of LDP in promoting suicide gene therapy for tumor, and the mechanism is probably associated with the improvement of B16 cells GJ function.

Keywords: *Liuwei Dihuang* Pills; HSV-tk/GCV system; B16 cells; Bystander effect

我们前期体内、外研究^[1]表明, 滋阴补肾经典名方六味地黄丸可以提高自杀基因系统(HSV-tk/GCV)对肿瘤的杀伤效应, 但六味地黄丸增效作用的物质基础及机制仍有待阐明。根据“只有入血成分才可能发挥药理效应”的假说, 有学者^[2]采用血清药物化学的方法, 最终确定 5-羟甲基-2-糠酸、莫诺昔、獐牙菜苷、马钱子苷、丹皮酚 5 种成分为六味地黄丸主要入血成分。我们研究了上述 5 种成分对自杀基因治疗杀伤小鼠黑色素瘤 B16 细胞的增效作用, 发现并没有直接效应。由于六味地黄丸具有免疫调节功效, 能刺激淋巴细胞分泌淋巴因子等多种活性物质^[3-8]; 又有文献报道^[9], 淋巴因子及神经内分泌物质能影响细胞缝隙连接蛋白(Cx)的表达和细胞缝隙连接功能(GJIC)。因而设想淋巴细胞能产生某些活性物质, 比如淋巴因子、神经递质、激素等, 通过免疫活性物质介导的“缝隙连接”机制增强肿瘤自杀基因系统的“旁杀伤”效应; 也有可能通过免疫活性物质介导肿瘤细胞对自杀基因毒性代谢产物的杀伤敏感性增强; 从而发挥对自杀基因系统杀伤黑色素瘤细胞的增效作用。基于上述考虑, 本实验将六味地黄丸 5 种入血成分与脾淋巴细胞共同培养制成含药淋巴上清, 体外处理小鼠黑色素瘤 B16 细胞, 研究六味地黄丸入血成分是否通过免疫活性物质介导自杀基因治疗的增效作用及机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株及实验动物 小鼠黑色素瘤 B16 细胞系购自中山大学细胞库, B16-RFP, B16-tk⁺ 和 B16-tk⁻-GFP 细胞均由本实验室构建并鉴定。B16 细胞和 B16-tk⁺ 细胞分别培养在含 10 % 小牛血清的 RPMI1640 培养基中, 置于培养箱中培养至对数生长期, 用胰酶消化传代培养。雄性 SD 大鼠购自广州中医药大学实验动物中心, 180 ~ 220 g, SPF 级, 动物合格证号: SCXK(粤)2008-0020, 动物实验合格证

号: SYXK(粤)2008-0085。

1.2 药物及配制方法 獐牙菜苷, 成都瑞芬思生物科技有限公司, 批号: 110412; 莫诺昔(批号: 110626)、丹皮酚(批号: 090627)、马钱素(批号: 090317), 上海融禾医药科技发展有限公司; 5-羟甲基-2-糠酸, 上海物竞化工科技有限公司, 批号: A05S033。以上成分均为纯度 >98 %。各单体用无水乙醇溶解配制成母液, 现配现用, 工作液用 RPMI1640 培养基稀释至所需浓度; 混合组分药物(mixture)的配制: 按入血成分比例^[2]称取丹皮酚 3 mg、马钱素 2.7 mg、莫诺昔 2.7 mg、5-羟甲基-2-糠酸 2.7 mg、獐牙菜苷 1 mg, 溶于 150 μ L DMSO 和 150 μ L 无水乙醇中, 再加 700 μ L RPMI1640 培养基制成母液, 现配现用, 工作液用 RPMI1640 培养基稀释至所需浓度。

1.3 仪器及试剂 BNA-321D 型细胞培养箱, 日本 Espec 公司; XDS-1B 型倒置显微镜, 中国重庆 COIC 公司; 680 型酶标仪, 美国 Bio Rad 公司; RPMI1640、胰酶, 美国 Gibco 公司; 新生牛血清, 美国 PAA 公司; 更昔洛韦(GCV)、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO), 美国 Sigma 公司。

1.4 方法

1.4.1 入血成分及混合组分对 tk/GCV 系统杀伤 B16 细胞效应的影响 将 B16、B16-tk⁺ 细胞混合成 B16-tk⁺ 细胞占 20 % 的比例, 将混合细胞悬液稀释至 $3.5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$, 每孔 100 μ L 接种于 96 孔板, 培养 24 h 后, 分别加入适合浓度的药物, 设置对照组、联合中药组(丹皮酚、马钱素、莫诺昔、5-羟甲基-2-糠酸、獐牙菜苷、混合组分)、GCV 组、GCV 联合中药组; 联合中药组又再分为 6 组, 即丹皮酚组、马钱素组、莫诺昔组、5-羟甲基-2-糠酸组、獐牙菜苷组、混合组; 丹皮酚和马钱素的终浓度均为 25, 50, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (低、中、高剂量, 以下同), 莫诺昔、獐牙菜苷和 5-羟甲基-2-糠酸的终浓度均

为 37.5, 75, 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 混合组分的终浓度为 0.0033, 0.0067, 0.0135 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, GCV 的终浓度为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 按照上述分组, 换加含药培养基 100 μL , 对照组加 100 μL 含药物溶剂的培养基。每组设 6 个复孔, 继续培养 72 h 后, MTT 法检测各药物对细胞生长的抑制率。

1.4.2 含药脾淋巴上清和空白脾淋巴上清的制备 颈椎脱臼处死大鼠, 75 %乙醇浸泡, 剖腹取脾, PBS 洗涤过 400 目滤网, 离心, PBS 洗涤, 单细胞用 PBS 重悬, 缓慢加入淋巴细胞分离液, 2000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min 分离脾淋巴细胞, 用 RPMI1640 培养基悬液, 将混合组分母液稀释 36 倍, 空白上清组每皿加 2 mL RPMI1640 培养基, 含药上清组每皿加 2 mL 稀释的混合组分药物, 培养箱中培养 72 h, 收集淋巴培养上清, 用 0.45 μm 滤器过滤后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4.3 含药脾淋巴上清对 tk/GCV 系统杀伤 B16 细胞效应的影响 按 B16-tk⁺ 占总细胞数 20 %的比例混合 B16 与 B16-tk⁺ 细胞, 稀释至 $3.5\times 10^4\cdot\text{mL}^{-1}$, 每孔 100 μL 接种于 96 孔板, 细胞培养同 1.4.1, 24 h 后加药处理。设置对照组、GCV 组、空白脾淋巴上清 (7.5 %、15 %、30 %, 均为体积分数, 下同)组、GCV 联合空白脾淋巴上清 (7.5 %、15 %、30 %)组、含药脾淋巴上清 (7.5 %、15 %、30 %)组、GCV 联合含药淋巴上清 (7.5 %、15 %、30 %)组, GCV 的终浓度为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 换加含药培养基 100 μL , 对照组加 100 μL 药物溶媒。每组设 6 个复孔, 继续培养 72 h 后, MTT 法检测各药物组对细胞的抑制率。

1.4.4 药物与 tk/GCV 系统联合作用效果 评价联合用药对 B16 细胞的抑制是否有协同作用, 参照文献^[10]以金正均 Q 值法判断: $Q=\text{Ea}+\text{b}/(\text{Ea}+\text{Eb}-\text{Ea}\times\text{Eb})$, 其中 Ea+b 为合并用药的抑制率, Ea 和 Eb 分别为 A 药和 B 药单独用药的抑制率。式中分子代表“实测合并效应”, 分母是“期望合并效应”, Q 是两者之比。Q < 0.85 为拮抗, $0.85\leq Q < 1.15$ 为相加, $Q\geq 1.15$ 为协同。

1.4.5 含药淋巴上清对 B16 细胞 GJ 功能及 Cx 表达的影响^[11] 荧光显微镜观测和流式细胞仪测定含药淋巴上清对 B16 细胞 GJ 功能影响及 Western blot 检测含药淋巴上清对 B16 细胞 Cx 表达的影响。

1.4.6 含药淋巴上清对 GCV 杀伤 B16-tk⁺ 增敏效应的影响 按 B16-tk⁺ 占总细胞数 100 %的比例稀释至

$3.5\times 10^4\cdot\text{mL}^{-1}$, 每孔 100 μL 接种于 96 孔板, 培养 24 h 后, 加含药淋巴上清处理。设置 GCV 组、GCV 联合 15 %体积分数淋巴上清中 0 %含药淋巴上清 (15 %空白淋巴上清)、5 %含药淋巴上清 (5 %含药淋巴上清 +10 %空白淋巴上清)、10 %含药淋巴上清 (10 %含药淋巴上清 +5 %空白淋巴上清)、15 %含药淋巴上清, 并设不带 tk 的 B16 细胞组以观测 GCV 对肿瘤细胞的毒性作用; 每组设 6 个复孔, 继续培养 72 h 后, MTT 法检测各药物组对细胞生长的抑制率。

1.5 统计学处理方法 采用 SPSS13.0 软件包, 所有数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用两样本均数的 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 入血成分和混合组分对 tk/GCV 系统杀伤 B16 细胞效应的影响 MTT 结果显示, GCV 组抑制率为 $(18.32\pm 1.32)\%$, 低、中、高剂量的丹皮酚组分别为 $(5.88\pm 1.66)\%$, $(7.51\pm 0.89)\%$, $(13.20\pm 4.35)\%$, 两者联合组的实际抑制率分别为 $(15.79\pm 5.10)\%$, $(17.71\pm 0.99)\%$, $(19.07\pm 0.63)\%$ 均小于理论药效 23.12, 24.46, 29.10, Q 值为 0.68, 0.72, 0.66 均小于 0.85, 为拮抗作用。

低、中、高剂量的马钱素组分别为 $(7.38\pm 3.79)\%$, $(8.24\pm 2.49)\%$, $(10.59\pm 3.24)\%$, GCV 联合马钱素组的实际抑制率分别为 $(7.92\pm 3.54)\%$, $(11.23\pm 3.50)\%$, $(14.14\pm 3.71)\%$, 均低于理论药效 24.35, 25.05, 26.97, Q 值为 0.33, 0.45, 0.52 均小于 0.85, 为拮抗作用。

低、中、高剂量的莫诺昔组分别为 $(5.50\pm 8.00)\%$, $(14.93\pm 11.02)\%$, $(12.24\pm 10.56)\%$, GCV 联合莫诺昔组的实际抑制率分别为 $(22.20\pm 8.67)\%$, $(20.93\pm 7.76)\%$, $(18.68\pm 8.10)\%$, 均低于理论药效 23.07, 30.75, 28.56, Q 值 0.96, 0.68, 0.65 皆小于 1.15, 为相加或拮抗作用。

低、中、高剂量的 5-羟甲基-2-糠酸组分别为 $(1.48\pm 2.91)\%$, $(2.79\pm 3.66)\%$, $(-6.11\pm 5.11)\%$, GCV 联合 5-羟甲基-2-糠酸组的实际抑制率分别为 $(6.14\pm 3.12)\%$, $(16.27\pm 1.79)\%$, $(12.11\pm 1.55)\%$, 均低于理论药效 19.53, 20.59, 13.33, Q 值 0.31, 0.79, 0.91 均小于 1.15, 为相加或拮抗作用。

低、中、高剂量的獐牙菜苷组分别为 $(7.42\pm$

8.06)%, (12.86 ± 5.61)%, (11.98 ± 5.68)%, GCV 联合樟牙菜苷组的细胞实际抑制率分别为 (6.36 ± 10.54)%, (19.78 ± 4.79)%, (24.40 ± 10.75)%, 均低于理论药效 24.47, 28.91, 28.80, Q 值 0.26、0.68、0.86, 均小于 1.15, 为拮抗或相加作用。

低、中、高剂量的混合组分组分别为 (2.17 ± 1.49)%, (9.78 ± 1.47)%, (15.16 ± 1.65)%, GCV 联合混合组分组的实际抑制率分别为 (4.22 ± 1.16)%, (11.83 ± 3.02)%, (17.77 ± 4.59)%, 均低于理论药效 19.65, 25.90, 30.32, Q 值 0.21, 0.46, 0.59 均小于 0.85, 为拮抗作用。

2.2 含药淋巴上清对 tk/GCV 系统杀伤 B16 细胞效应的影响 GCV 联合 7.5 %空白淋巴上清组的实际抑制率 (4.10 ± 6.29)% 低于理论药效 21.097, Q 值 0.19 小于 0.85, 为拮抗作用; GCV 联合 7.5 %含药淋巴上清组的实际抑制率 (32.23 ± 6.04)% 高于理论药效 27.28, Q 值 1.18 大于 1.15, 为协同作用。见表 1。

表 1 7.5 %含药淋巴上清联合 tk/GCV 对 B16 细胞杀伤效应的量效关系($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The killing effect of 7.5 % drug lymphatic supernatants on B16 cells combining with tk/GCV system

组别	n	浓度 /%	抑制率 /%			Q 值
			GCV (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	20 % tk/GCV (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	理论药效	
对照组	6	0	0.00 ± 2.96	14.58 ± 6.29	-	-
空白上清组	6	7.5	8.64 ± 2.67	4.10 ± 5.97*	21.97	0.19
含药上清组	6	7.5	14.87 ± 0.91	32.23 ± 6.04***	27.28	1.18

注: 与对照组(0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GCV)比较, *** $P < 0.01$; 与对照组(20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GCV)比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

GCV 联合 15 %空白淋巴上清组的实际抑制率 (9.26 ± 4.63)% 低于理论药效 17.76, Q 值 0.52 小于 0.85, 为拮抗作用; GCV 联合 15 %含药淋巴上清组的实际抑制率 (33.92 ± 6.82)% 高于理论药效 25.71, Q 值 1.32 大于 1.15, 为协同作用。见表 2。

表 2 15 %含药淋巴上清联合 tk/GCV 对 B16 细胞杀伤效应的量效关系($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The killing effect of 15 % drug lymphatic supernatants on B16 cells combining with tk/GCV system

组别	n	浓度 /%	抑制率 /%			Q 值
			GCV (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	20 % tk/GCV (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	理论药效	
对照组	6	0	0.00 ± 2.96	14.58 ± 6.29	-	-
空白上清组	6	15	3.71 ± 4.38	9.26 ± 4.63**	17.76	0.52
含药上清组	6	15	13.03 ± 4.19	33.92 ± 6.82***	25.71	1.32

注: 与对照组(0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GCV)比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.01$; 与对照组(20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GCV)比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

GCV 联合 30 %空白淋巴上清、30 %含药淋巴上清组的实际抑制率高于理论药效, Q 值为 1.65, 1.31 均大于 1.15, 为协同作用。见表 3。

表 3 30 %含药淋巴上清联合 tk/GCV 对 B16 细胞杀伤效应的量效关系($\bar{x} \pm s$)

Table 3 The killing effect of 30 % drug lymphatic supernatants on B16 cells combining with tk/GCV system

组别	n	浓度 /%	抑制率 /%			Q 值
			GCV (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	20 % tk/GCV (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	理论药效	
对照组	6	0	0.00 ± 2.96	14.58 ± 6.29	-	-
空白上清组	6	30	6.08 ± 2.97	32.68 ± 4.89***	19.78	1.65
含药上清组	6	30	16.95 ± 5.23	37.95 ± 7.10***	29.05	1.31

注: 与对照组(0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GCV)比较, *** $P < 0.01$; 与对照组(20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GCV)比较, ** $P < 0.01$ 。

2.3 含药淋巴上清对 B16 细胞 GJ 功能影响

2.3.1 荧光显微镜观测含药淋巴上清对 B16 细胞 GJ 功能影响 见图 1。荧光显微镜观察 15 %体积分数淋巴上清对 B16 细胞 GJ 功能的影响, 传递率用处理组平均每个供体细胞周围传递的绿色荧光的细胞个数与对照组的比值表示。15 %体积分数淋巴上清能浓度依赖性地促进 GJ 介导的 B16 细胞间 Calcein 传递, 15 %体积分数淋巴上清处理组与对照组比较,



A. 对照组 B16 细胞 Calcein 传递 (400 倍); B-E: 15 %体积分数淋巴上清处理组 B16 细胞 Calcein 传递 (400 倍), 其中 B. 0 %含药淋巴上清; C. 5 %含药淋巴上清; D. 10 %含药淋巴上清; E. 15 %含药淋巴上清。

图 1 荧光显微镜观察含药淋巴上清对 B16 细胞 GJ 介导的荧光染料传递影响

Figure 1 Effects of lymphatic supernatants with mixture on calcein spread through GJ in B16 cells observed under a fluorescence microscope

各药物处理组可明显促进 B16 细胞之间荧光染料 Calcein 的传递($P < 0.01$)。

2.3.2 流式细胞仪测定含药淋巴上清对 B16 细胞 GJ 功能影响 见图 2。用 15 %体积分数淋巴上清处理 B16 细胞 48 h 后, 对照组、0 %含药淋巴上清组、5 %含药淋巴上清组、10 %含药淋巴上清组、15 %含药淋巴上清组的绿色荧光细胞(G4)与双阴性受体

细胞(G3)比值(G4/G3)依次为 0.04 ± 0.02 、 0.09 ± 0.02 、 0.10 ± 0.01 、 0.12 ± 0.02 和 0.11 ± 0.01 , 各含药淋巴上清组 G4/G3 值明显高于对照组 $0.04(P < 0.01)$, 并呈现剂量效应关系, 表明 15 %体积分数淋巴上清组中, 含药上清组分可促进 B16 细胞的缝隙连接功能, 并与荧光显微镜观察结果基本一致。

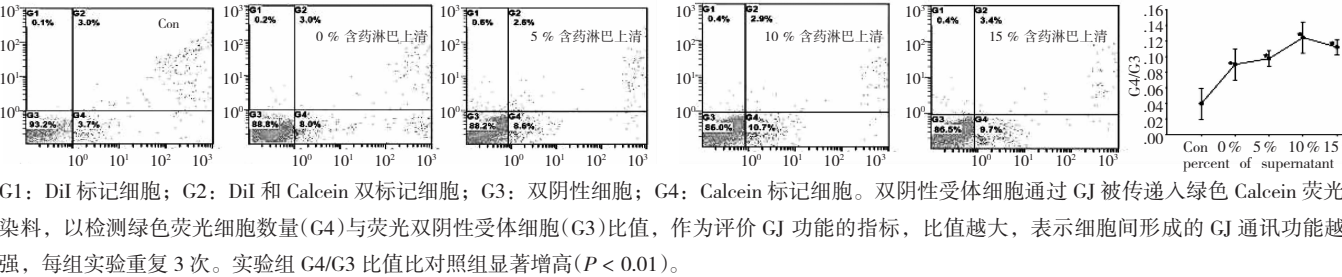


图 2 流式分析含药淋巴上清对 B16 细胞 GJ 功能影响

Figure 2 Effects of lymphatic supernatants with mixture on the GJ function in B16 cells by flow cytometry

2.3.3 Western blot 测定含药淋巴上清对 B16 细胞 Cx43 的表达 见图 3。15 %体积分数淋巴上清中 0 %含药淋巴上清、5 %含药淋巴上清、10 %含药淋巴上清、15 %含药淋巴上清的 Cx43 蛋白表达条带随淋巴上清比例的增加, 出现明显的变宽、密度增大。表明含药淋巴上清对 B16 细胞 Cx43 蛋白的表达有明显的上调。

2.4 六味地黄丸 5 种入血成分混合对 GCV 杀伤 B16-tk⁺ 增敏效应的影响 见表 4。当 100 % B16-tk⁺ 细胞

用 GCV 处理(排除旁杀伤效应影响), 同时检测 15 %体积分数淋巴上清中 0 %含药淋巴上清、5 %含药淋巴上清、10 %含药淋巴上清、15 %含药淋巴上清对自杀系统杀伤 B16 细胞的影响, 结果显示含药脾淋巴上清并没有增加 B16 细胞对 tk/GCV 自杀系统的敏感性。

表 4 15 %含药脾淋巴上清联合 tk/GCV 系统对 B16-tk⁺ 细胞抑制率的影响($\bar{x} \pm s$)

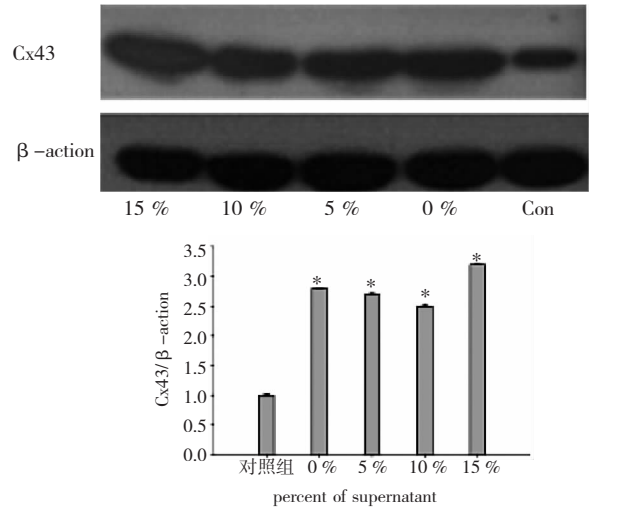
Table 4 The killing effect of 15 % drug lymphatic supernatants on B16-tk⁺ cells combining with tk/GCV system

GCV / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率 /%				
	0 % + 0 %	0 % + 15 %	5 % + 10 %	10 % + 5 %	15 % + 0 %
0	0	-5.75 ± 1.26	-6.18 ± 1.70	-7.43 ± 1.44	-4.04 ± 1.83
5	19.91 ± 1.21	19.86 ± 1.91	17.93 ± 2.22	20.27 ± 3.18	20.89 ± 1.86
10	26.31 ± 2.55	26.35 ± 2.80	24.12 ± 2.93	28.82 ± 3.61	26.77 ± 2.02
20	46.66 ± 4.01	47.55 ± 3.96	42.85 ± 5.06	47.83 ± 5.07	47.95 ± 4.89

3 讨论

本研究结果显示, 六味地黄丸 5 种入血成分及其混合组分均未显示出对肿瘤自杀基因治疗系统杀伤 B16 细胞的增效作用, 提示前期研究^[1]中六地黄丸体内及含药血清体外对自杀基因治疗的增效作用可能不是由药物入血成分直接引起。

六味地黄丸有免疫调节作用^[3-4,7], 可刺激淋巴细胞分泌多种淋巴因子及其他活性物质^[3-8], 这些淋巴因子及其他活性物质可出现在淋巴细胞培养上清液中。淋巴因子是细胞因子的一种, 种类很多, 其中



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 3 Western blot 分析含药淋巴上清对 B16 细胞 Cx43 蛋白表达影响

Figure 3 Effects of lymphatic supernatants with mixture on the expression of Cx43 in B16 cells by western blot

一部分淋巴因子用白介素(IL)来命名,主要有 IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IL-12 等,其他研究的淋巴因子主要有 TNF、TGF- β 、CM-CSF、IFN- γ 等,淋巴因子作用于不同的靶细胞表现出不同的生物活性。淋巴细胞除能产生淋巴因子外,还能产生神经递质及激素物质,如乙酰胆碱、多巴胺、促肾上腺皮质激素、糖皮质激素等^[12]。国外有文献^[13-14]报道,多种淋巴因子、神经递质及激素能影响细胞缝隙连接蛋白的表达和缝隙连接功能。TGF- β_1 能促进 Cx43 蛋白的表达,对缝隙连接功能具有双向调节作用^[15];糖皮质激素能促进 Cx32 和 Cx26 蛋白的表达,改善缝隙连接功能^[16];甲状旁腺素能提高 Cx43 蛋白的表达和缝隙连接功能。神经递质乙酰胆碱降低缝隙连接功能,肾上腺素促进缝隙连接功能,去甲肾上腺素对缝隙连接功能的调节具有双向作用。缝隙连接机制是自杀基因治疗增效的重要靶点,提示六味地黄丸可通过促进淋巴细胞产生淋巴因子、神经递质及激素,以改善缝隙连接功能,发挥其对自杀基因的“旁杀伤”增效作用;另外,这些活性物质也可能通过提高肿瘤细胞对 tk/GCV 系统的杀伤敏感性增强自杀基因疗效。

本实验 MTT 检测结果显示,没有药物作用的空白淋巴上清对 B16 细胞生长无明显的增殖抑制作用。低中浓度空白淋巴上清对 tk/GCV 系统治疗为拮抗作用, Q 值小于 0.85,低中浓度含药淋巴上清对 tk/GCV 系统治疗为协同作用, Q 值大于 1.15;高浓度空白淋巴上清及高浓度含药淋巴上清对 tk/GCV 系统治疗为协同增效作用, Q 值均大于 1.15。为排除药物组分是否对 B16 细胞本身具有自杀系统增敏作用,把单纯 B16-tk⁺ 用不同体积百分比的含药脾淋巴上清与不同浓度 GCV 共同给药,用 GCV 处理 100 % B16-tk⁺ 细胞,细胞间 GJ 功能对抑制率的影响可以忽略,荧光染料传递及 Western blot 结果提示,含药脾淋巴上清可明显促进连接蛋白 Cx43 表达,改善 B16 细胞间缝隙通讯功能,进一步说明六味地黄丸 5 种入血成分对 B16-tk⁺/GCV 系统增效作用是通过免疫活性物质介导旁杀伤效应而起作用。

上述结果提示,六味地黄丸入血成分作用于淋巴细胞后,确实可能产生了某些淋巴因子、神经递质及激素等免疫活性物质,可以通过免疫活性物质,改善细胞间 GJ 功能,增强自杀基因的旁杀伤效应,

发挥对自杀基因治疗系统对 B16 细胞杀伤的增效作用,但六味地黄丸入血成分刺激脾淋巴细胞产生具体哪些活性物质,尚需进一步研究阐明。

参考文献:

- [1] 杜标炎,郭玉荣,易华,等. 六味地黄丸含药血清对自杀基因治疗黑色素瘤增效作用的缝隙连接机制初探[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(5): 651-658.
- [2] 张宁,王喜军. 六味地黄丸血中移行成分的含量测定[J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(3): 174-176.
- [3] 吴炜景,李立平,赵亚刚. 六味地黄丸免疫调节作用的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(32): 4180-4182.
- [4] 赖小东,赵益,尚广彬,等. 4 种滋阴药含药血清的免疫调节作用的比较研究[J]. 江西中医药, 2013, 44(368): 65-67.
- [5] 刘妍,张平,李明,等. 补肾方对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠 T 辅助细胞 1, 17 和调节性 T 细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 116-119.
- [6] 郭御飞,王惠,钟雪梅. 补肾养经汤对雌性去势大鼠白细胞介素-2 和白细胞介素-8 含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(1): 194-195.
- [7] 梁华,朱明雪,孙燕佩,等. 六味地黄丸、金匱肾气丸的免疫调节作用研究进展[J]. 中医药学报, 2012, 40(2): 97-99.
- [8] 方鉴,张永祥,茹祥斌,等. 六味地黄汤对佐剂性关节炎大鼠脾脏细胞表达细胞因子的影响[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(2): 128-131.
- [9] Chanson M, Derouette JP, Roth I, et al. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1711(2): 197-207.
- [10] Jin ZJ. About the evaluation of drug combination[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(2): 146-147.
- [11] 张广献,肖建勇,邵宏伟,等. 薯蓣皂苷对人肾癌 786-0 细胞缝隙连接功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(6): 778-782.
- [12] 方静,崔恒敏,何敏. 神经内分泌细胞在鸭胸腺中的表达特征[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(4): 446-450.
- [13] Salameh A, Dhein S. Pharmacology of gap junctions. New pharmacological targets for treatment of arrhythmia, seizure and cancer? [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1719(1-2): 36-58.
- [14] Alves LA, Nihei OK, Fonseca PC, et al. Gap junction modulation by extracellular signaling molecules: the thymus model[J]. Braz J Med Biol Res, 2000, 33(4): 457-465.
- [15] Liu ML, Wang H, Wang ZR, et al. TGF- β_1 regulation of estrogen production in mature rat Leydig cells[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e60197.
- [16] Diego GN, Jessica T, Carmen G, et al. The Role of Inflammatory Mediators in Immune-to-Brain Communication during Health and Disease[J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013: 429231.

(编辑: 邓响潮)