

益气消瘤方对 H₂₂ 荷瘤小鼠免疫调节作用的实验研究

熊墨年 彭旦明 张进 吴东风 张瑾楠 邓罗英 刘雯

(江西省中医药研究院 南昌 330046)

摘要:目的:观察益气消瘤方对 H₂₂ 荷瘤小鼠应用 CTX(环磷酰胺)的免疫调节作用。方法:水煎煮制备益气消瘤方,建立 H₂₂ 荷瘤小鼠动物模型,接种后第 2 天开始给药,腹腔注射 CTX 及益气消瘤方灌胃连续 8 d,取脾采用酶标仪测 T、B 细胞活力,吸取腹腔渗出液测吞噬细胞活力。结果:与同期荷瘤 CTX 组相比,益气消瘤方组小鼠 T、B 细胞活力增高,腹腔巨噬细胞吞噬指数升高。结论:益气消瘤方对肿瘤及化疗药物造成的免疫功能抑制有调节作用。

关键词:益气消瘤方;H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠;免疫调节

中图分类号:R 285.5

文献标识码:B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2012.03.032

胸腺细胞和脾细胞是体内重要的免疫活性细胞,而带瘤机体一般免疫细胞活性降低,尤其是使用化疗药治疗后更为明显。因此寻找有效的免疫细胞增进剂是提高肿瘤治疗效果的重要环节。大量的临床和实验证明中医药有较好的免疫调节作用,为此我们观察益气消瘤方对 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠的免疫增强作用。

1 材料

1.1 实验动物 H₂₂ 肝癌小鼠来源上海医药工业研究院。KM 小鼠,8 周,雌雄各半,18.0~22.0 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2007-0005。

1.2 药品试剂 益气消瘤方来源于江西省中医药研究院国家中医药管理局肿瘤中医“益气清毒”重点实验室临床经验方,药物组成为:生晒参 15 g、白术 12 g、茯苓 12 g、甘草 10 g、黄芪 20 g、半枝莲 30 g、白花蛇舌草 30 g、藤梨根 15 g、浙贝母 15 g、金荞麦 15 g。CTX,天津金世制药有限公司,批号:110506;香菇多糖,金陵药业股份有限公司,产品批号:110405-2;RPMI 1640 培养基、胎牛血清(fetal calf serum,FCS)购自 Gibico 公司。刀豆蛋白 A (ConA)、二甲基亚砜(DMSO)、噻唑蓝(MTT,用 PBS 配制成 5 g/L 的工作液,-20 ℃ 贮存备用)均购自 Gibico 公司。

1.3 实验仪器 净化工作台(SW-CJ-2F,苏州净化设备有限公司),全自动生化分析仪(7170A,日立),血球计数仪(CD1400,美国),生物显微镜(CX-31, Olympus),二氧化碳培养孵箱(forma scientific,德国),酶标仪。

2 实验方法

2.1 动物模型 选取 2 只接种 H₂₂ 肝癌 7 d 腹水小鼠,处死后置于超净工作台,腹部去毛,剪开皮层,用无菌注射器抽取腹水,用 0.5 mL 生理盐水再冲洗 1 次腹腔,合并腹水和洗液,过滤置离心管中,500 r/min 离心 10 min 弃上清,用生理盐水重复洗涤 2

次弃上清,用 RPMI1640 将 H₂₂ 肝癌细胞制成 1×10⁷/mL 的细胞悬液,2 mL/L 台盼蓝染色,活细胞百分率达 96%,于小鼠右腋下注射 0.2 mL 混悬液,制成实验动物模型。

2.2 动物分组及给药 随机分为七组,模型对照组、CTX 高剂量组(35 mg/kg)、CTX 低剂量组(25 mg/kg)、CTX 低剂量+香菇多糖组(2 mg/kg)及 CTX 低剂量+益气消瘤方高剂量组[13.0 g(生药)/kg]、中剂量组[6.5 g(生药)/kg]、低剂量组[3.25 g(生药)/kg]。对照组采用等量生理盐水腹腔注射和灌胃,其它组分别采用益气消瘤方灌胃加 CTX 腹腔注射、CTX 腹腔注射及 CTX 加香菇多糖腹腔注射,每天上午给药 1 次。从接种后第 2 天开始给药,连续给药 8 d。

2.3 淋巴结细胞的制备 将小鼠断髓处死,无菌条件下剖取脾脏,放入 100 目不锈钢丝网内,以眼科剪剔除结缔组织和脂肪,置于盛有 5~10 mL 冷 D-Hank's 液的培养皿中,用针芯碾碎脾组织,使成细胞悬液,置于离心管中,500 r/min 离心 10min,弃上清。低渗处理去除 RBC,以冷 D-Hank's 液洗涤细胞 3 次,加入 10%NBS-RPMI-1640 培养液 1.5 mL 悬浮脾细胞,计数,台盼蓝染色活细胞百分率达 97%,调整细胞数为 5×10⁶ 个/mL。

2.4 小鼠淋巴细胞活性测定 取制备的淋巴细胞加入 96 孔板,每孔 100 μL,空白孔只加培养液,其他孔按分组设计加入 ConA(50 μg·mL⁻¹)、LPS(25 μg·mL⁻¹)20 μL,分别刺激 T、B 淋巴细胞。在 CO₂ 培养箱内培养 48 h 后,加入 10 μLMTT,继续培养 4 h 后吸弃所有上清,每孔加 100 μLDMSO 终止反应,振荡器上振荡 1 min,酶标仪 570 nm 读板,结果以 OD 值表示。

2.5 荷瘤小鼠腹腔吞噬能力测定 第 8 天分别腹腔注射鲜牛肉汤 1 mL/只,24 h 后再腹腔注射 2%鸡红细胞生理盐水悬液 0.5 mL/只,30 min 后处死小鼠,取腹腔炎性渗出液涂片,瑞氏染色,镜检。数 50

两种术式治疗翼状胬肉疗效观察

宋小平 李育广 危高生

(中国人民解放军第 184 医院 江西鹰潭 335000)

摘要:目的:比较翼状胬肉切除术联合游离结膜瓣移植术与联合自体角膜缘干细胞移植术的临床疗效。方法:将 156 例(206 只眼)翼状胬肉患者随机分成两组,一组行翼状胬肉切除术联合游离结膜瓣移植术,另一组行翼状胬肉切除术联合角膜缘干细胞移植术,随访 6~24 个月,观察胬肉复发情况。结果:术后复发:游离结膜瓣移植组 22 只眼(21.6%),角膜缘干细胞移植组 5 只眼(4.8%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:翼状胬肉切除术联合自体角膜缘移植术明显优于游离结膜瓣移植术,自体角膜缘干细胞移植术复发率低,值得临床推广。

关键词:翼状胬肉;角膜缘干细胞移植;游离结膜瓣移植

中图分类号:R 777.33

文献标识码:B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2012.03.033

翼状胬肉是常见病、多发病,特别是户外活动较多者,翼状胬肉易引起眼红不适感,较重者引起散光、视力下降^[1]。目前手术是有效的治疗手段,但易复发。为比较不同手术疗效,我院自 2007 年 1 月

~2009 年 12 月将门诊及住院病人 156 例(206 只眼),随机分成两组,采用翼状胬肉切除术联合游离结膜瓣移植术或联合自体角膜缘干细胞移植术治疗翼状胬肉,观察临床疗效。现报道如下:

个吞噬细胞,计算吞噬百分率和吞噬指数。

2.6 统计处理 各组数据均以均数±标准差($\bar{X} \pm S$)表示,用 EXCEL 软件进行统计学处理分析,组间差异用 t 检验。

3 实验结果

3.1 益气消瘤方对小鼠淋巴细胞增殖能力的影响 CTX 高、低剂量组与模型组比较对 B 细胞活力有抑制作用,对 T 细胞无明显作用。与 CTX 低剂量组比较,益气消瘤方各组及香菇多糖对 B 细胞和 T 细胞活性均有明显提高作用。见表 1。

表 1 益气消瘤方联合 CTX 对 H₂₂ 肝癌小鼠淋巴细胞活性的影响 ($\bar{X} \pm S$)

组别	B 细胞(OD)	T 细胞(OD)
模型组	0.213± 0.005	0.089± 0.005
CTX 高剂量组	0.190± 0.011 [▲]	0.092± 0.004
CTX 低剂量组	0.191± 0.008 [▲]	0.084± 0.006
CTX 低+益气消瘤方高剂量组	0.220± 0.010 [*]	0.163± 0.006 [*]
CTX 低+益气消瘤方中剂量组	0.228± 0.008 [*]	0.124± 0.004 [*]
CTX 低+益气消瘤方低剂量组	0.245± 0.008 [*]	0.106± 0.007 [*]
CTX 低+香菇多糖组	0.215± 0.005 [*]	0.153± 0.009 [*]

注:与模型组比,▲ $P < 0.05$;与 CTX 低剂量组比,* $P < 0.01$ 。

3.2 益气消瘤方对小鼠吞噬能力的影响 CTX 高剂量组与模型组比较,吞噬百分率及吞噬指数均降低;益气消瘤方及香菇多糖组与 CTX 低剂量组比较,对小鼠吞噬百分率及吞噬指数均明显提高。见表 2。

表 2 益气消瘤方对小鼠吞噬能力的影响 ($\bar{X} \pm S$)

组别	吞噬百分率(%)	吞噬指数
模型组	33.45± 6.42	2.43± 0.51
CTX 高剂量组	23.78± 5.36 [▲]	1.26± 0.32 ^{▲▲}
CTX 低剂量组	24.50± 5.22 [▲]	1.36± 0.42 [▲]
CTX(低)+益气消瘤方高剂量组	31.51± 5.30 [*]	2.017± 0.42 [*]
CTX(低)+益气消瘤方中剂量组	30.04± 3.70 [*]	1.91± 0.39 [*]
CTX(低)+益气消瘤方低剂量组	29.03± 4.80 [*]	1.93± 0.51 [*]
CTX(低)+香菇多糖组	31.41± 4.55 [*]	1.97± 0.42 [*]

注:与模型组比,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;与 CTX 低剂量组比,* $P < 0.05$ 。

4 讨论

肿瘤的免疫治疗作为重要的辅助手段日益受到医学界的重视。本实验选用香菇多糖作为阳性对

照药,药理研究证明它可以促进 T、B 细胞等多种免疫细胞的增殖活化。T 淋巴细胞在抗肿瘤中担任十分重要的角色,在特异性免疫中发挥重要作用,杀灭癌细胞;B 细胞可通过其分泌抗体介导免疫细胞,发挥抗体依赖性介导细胞的作用,以及补体依赖性细胞作用。单核巨噬细胞具有二种特性,一是巨噬颗粒性抗原,二是重要的抗原细胞,在诱导特异性免疫应答中起重要作用。益气消瘤方以四君子汤加黄芪为基础益气健中,具有较好的改善机体免疫功能的作用^[2-5],半枝莲、白花蛇舌草、藤梨根、金荞麦、浙贝母亦具有一定免疫学调节活性和抗肿瘤活性^[6-9],因而能明显改善 CTX 对荷瘤小鼠造成的 T 细胞、B 细胞活力下降及巨噬细胞吞噬率和吞噬指数下降等毒副作用,实验结果显示益气消瘤方对荷瘤小鼠有明显的免疫调节作用,且略优于香菇多糖,因而具有较好的抑瘤效果。

参考文献

- [1]温庆祥,古颖.四君子汤对脾虚患者免疫功能的影响[J].北京中医,2006,25(4):239-240
- [2]胡祖光,王建华.四君子汤及其配伍对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响[J].中西医结合杂志,1984,4(6):19
- [3]刘辉,林敬连,郭秋月.因中药免疫组学而对中药四君子汤免疫调节作用的研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(7):125-127
- [4]祝晨,桂蜀华,王培训,等.四君子汤免疫活性部位 SJZPS-Vb-1-2 的分离纯化及理化性质研究[J].中药材,2003,26(10):751-753
- [5]高旭,李丽芬,刘斌钰.黄芪多糖对小鼠免疫功能影响的实验研究[J].山西大同大学学报(自然科学版),2010,26(4):42-44
- [6]单保恩,张金艳,杜肖娜,等.白花蛇舌草的免疫学调节活性和抗肿瘤活性[J].中国中西医结合杂志,2001,21(5):370-374
- [7]王刚,董玫,郭会灿,等.中药半枝莲提取物体外抗肿瘤活性研究[J].河北中医,2006,28(9):701-702
- [8]王岚,康琛,杨伟鹏,等.藤梨根正丁醇提取物和总黄酮苷抗肿瘤作用研究[J].中国中药杂志,2010,35(16):2184-2186
- [9]李伟,胡凯文,苏伟,等.浙贝母散剂逆转急性白血病多药耐药的临床研究[J].北京中医药大学学报,2004,27(1):63

(收稿日期:2012-02-24)