

中药复方肠安泰对肠癌肺转移模型小鼠肠黏膜固有层B细胞及IL-12的影响

王文萍,王垂杰,姜良铎,饭乡正明

王文萍,辽宁中医学院附属医院肿瘤内科 辽宁省沈阳市 110032
 王垂杰,辽宁中医学院附属医院消化内科 辽宁省沈阳市 110032
 姜良铎,北京中医药大学东直门医院内科 北京市 100029
 饭乡正明,日本国立癌中心细胞增生实验室 日本东京 104-0045
 辽宁省科委基金资助课题, No.962243
 项目负责人:王文萍,110032,辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路79号,辽宁中医学院附属医院. wenpingwang.263.net
 电话:024-23887357 传真:024-23887357
 收稿日期:2002-11-21 接受日期:2003-01-18

摘要

目的:探讨中药复方肠安泰对肠管绒毛黏膜固有层B细胞及IL-12的影响及其与肺转移的关系。

方法:经皮下植入大肠癌高度肺转移细胞(Co26Lu),建立大肠癌肺转移小鼠动物模型,采用ABC免疫染色及免疫荧光染色方法做相关分析。

结果:荷瘤治疗组与荷瘤对照组相比IgA、IgM及IL-12阳性细胞在小肠绒毛黏膜固有层均有显著意义的增加。两组数值依次为 172.3 ± 6.7 , 59.2 ± 5.3 , 79.6 ± 4.1 ; 131.2 ± 5.3 , 45.1 ± 4.3 , 24.4 ± 2.5 ($P < 0.01$)。

结论:中药复方肠安泰预防大肠癌肺转移的机制,与其促进了荷瘤小鼠小肠绒毛黏膜固有层B细胞的活化及IL-12的诱导有关。

王文萍,王垂杰,姜良铎,饭乡正明. 中药复方肠安泰对肠癌肺转移模型小鼠肠黏膜固有层B细胞及IL-12的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(4):478-480
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/478.htm>

0 引言

大肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,手术是治疗大肠癌的主要手段,但术后5a生存率一直徘徊在50-55%,50a来并无显著提高,成为手术失败的主要原因。根据中医基础理论^[1]本研究提出肿瘤转移“痰毒流注”病机假说^[2-4],研制中药复方肠安泰进行预防大肠癌转移的研究。实验证明中药复方肠安泰预防大肠癌(Co26Lu)肺转移机制中,T细胞、NK细胞及细胞因子IFN γ 发挥着重要的作用^[5,6]。本实验的目的在于探讨中药复方肠安泰对肠管绒毛黏膜固有层B细胞及IL-12的影响及其与肺转移的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 CDF1系5WK小鼠(购自日本CharlesRiver公司)30只,体质量23-26g分笼饲养,自由饮水,饲料为繁殖用固性饲料(CLEA日本),动物室为无菌条

件,控制温度,12h明暗周期。给予1wk的预备饲养,待小鼠6wk时进行实验。中药复方肠安泰为省科委基金课题观察处方,由藤梨根,黄芪,补骨脂,鸡血藤组成。所有生药均购自辽宁中医学院附属医院,由辽宁中医学院中药系醇提精制成干膏。山羊抗小鼠IgA抗体,工作浓度1:16,山羊抗小鼠IgM抗体,工作浓度1:128,购于美国Sigma公司,大鼠抗小鼠IL-12抗体,工作浓度2 μ g/L,购于美国PharMingen公司,ABC免疫组化试剂盒购于美国VectorLaboratories,Inc公司。大肠癌高度肺转移细胞(Co26Lu)由日本国立癌中心饭乡正明惠赠。

1.2 方法 将小鼠随机分成正常对照组、荷瘤对照组及荷瘤治疗组,每组10只小鼠。正常对照组为非造模组。荷瘤对照组为造模组:将Co26Lu细胞皮下注入小鼠右大腿,每只0.1mL,含 1×10^5 个癌细胞。荷瘤治疗组:从小鼠造模后3d开始,每天灌胃予肠安泰0.75g/Kg,持续给药18d。正常对照组,荷瘤对照组小鼠于每日相同时间,用相同方法给予等量生理盐水。灌胃18d后24h,乙醚麻醉小鼠,解剖取小肠、大肠,4%丙酮固定,标本切除,石蜡包埋,制成3 μ m切片备用。小肠、大肠的IL-12细胞均采用ABC免疫组化方法染色,方法参见试剂盒说明书进行。主要步骤为:切片按常规脱蜡处理至水,1mL/L牛奶浸泡20min,PBS漂洗5min,每片加入一抗20 μ L,室温2h,PBS漂洗3次各5min,在含30mL/L的H₂O₂的Metoh中浸泡5min,PBS漂洗3次各5min,加入二抗(黄色液3滴,蓝色液1滴)20 μ L,室温1h,PBS漂洗15min,加入(ABC盒的A液2滴,B液2滴)20 μ L,常温1h,PBS漂洗3次各5min,0.1g/L的DAB/0.3mL/L的H₂O₂显色,流水冲洗10min,苏木紫核染色2sec,经过脱水,透澈及封入剂封入。在高倍光镜下,随机观察相连10个绒毛,计数小肠、大肠的绒毛黏膜固有层的IL-12阳性细胞数,IL-12阳性细胞在细胞核上出现棕色颗粒。免疫荧光染色:切片按常规脱蜡处理至水,1mL/L的牛奶浸泡20min,PBS漂洗5min,加入含有FITC的一次抗体,室温放置60min,用PBS洗3次,干燥后加盖玻片,暗处保存。在高倍光镜下,随机观察相连10个绒毛,计数小肠、大肠的绒毛黏膜固有层的IL-12阳性细胞及IgA,IgM阳性细胞数,IgA,IgM阳性细胞在细胞核上出现荧光。

统计学处理 数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采

用日本医学统计软件, 组间 IgA、IgM 及 IL-12 阳性细胞的对比用 Dunnett's T 检验。

2 结果

2.1 小肠绒毛黏膜固有层 B 细胞及 IL-12(表 1) 小肠绒毛黏膜固有层的 IgA、IgM 阳性细胞数, 荷瘤对照组与正常对照组相比, 均有显著增高, 有统计学意义($P < 0.01$)。荷瘤治疗组与荷瘤对照组相比也具有显著性差别($P < 0.01$); 小肠绒毛黏膜固有层的 IL-12 阳性细胞数, 荷瘤对照组与正常对照组相比, 有增高趋势, 但无统计学意义。荷瘤治疗组与荷瘤对照组相比具有显著性增高($P < 0.01$)。

2.2 大肠绒毛黏膜固有层 B 细胞及 IL-12(表 1) 荷瘤对照组与正常对照组相比, 大肠绒毛黏膜固有层的 IgA、IgM 及 IL-12 阳性细胞均有增高趋势, 但无统计学意义。大肠的荷瘤治疗组与荷瘤对照组相比 IgM 有增高趋势, 但无统计学意义, 而 IgA 及 IL-12 组有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 中药复方肠安泰对肠绒毛黏膜固有层 B 细胞及 IL-12 的影响($n = 10$, $\bar{x} \pm s$ 阳性细胞数/10 个肠绒毛)

分组		IgA	IgM	IL-12
小肠	正常对照组	88.6 ± 3.2	26.7 ± 3.6	18.2 ± 2.1
	荷瘤对照组	131.2 ± 5.3 ^a	45.1 ± 4.3 ^a	24.4 ± 2.5
	荷瘤治疗组	172.3 ± 6.7 ^a	59.2 ± 5.3 ^a	79.6 ± 4.1 ^a
大肠	正常对照组	42.7 ± 2.6	18.4 ± 1.9	10.5 ± 1.6
	荷瘤对照组	50.1 ± 3.2	26.7 ± 2.1	16.1 ± 1.9
	荷瘤治疗组	65.4 ± 4.1 ^b	30.0 ± 2.9	25.6 ± 2.1 ^b

^a $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^b $P < 0.05$ vs 荷瘤对照组。

3 讨论

肠道黏膜是一个非常复杂的免疫部位或免疫器官, 黏膜淋巴细胞具有归巢性, 口服具有免疫作用的药物可以引起黏膜的免疫反应, 也能引起系统免疫反应, 因此黏膜是宿主防御的第一道防线。肠道黏膜固有层的淋巴细胞 LPL 位于上皮层下, 是黏膜免疫系统 MIS 受作用于黏膜表面的特异抗原物质发展而成, 在预防肿瘤转移中发挥着重要的作用^[7-10]。

阻止肿瘤转移免疫机制的研究多从 T 淋巴细胞角度探讨^[11-15]。对体液免疫研究者较少, 有临床研究发现大肠癌患者的免疫球蛋白中的 IgG、IgM 处于正常水平, 而 IgA 则明显低于正常值^[16]。本实验显示肿瘤(Co26Lu)发生及肿瘤转移初期, 小肠的肠管绒毛黏膜固有层的 IgA 及 IgM B 细胞均有增加趋势, 但这种程度的增加, 仅仅是机体产生的肿瘤免疫反应或是免疫刺激, 并未能达到抑制肿瘤生长及转移的作用。而中药复方肠安泰显著地、有意义地增加了荷瘤小鼠 IgA、IgM B 细胞及细胞因子 IL-12 在小肠绒毛黏膜固有层的分布。表明中药复方肠安泰抗大肠癌肺转移(Co26Lu)的机制与 B 细胞和细胞因子 IL-12 在小肠内增加有关, IL-12 的抗肿

瘤作用特别是其抗转移活性尤其令人注目^[17-22]。许多肿瘤动物实验模型表明, IL-12 可在肿瘤的微环境中达到持久的局部浓度, 能抑制肿瘤的生长或使肿瘤完全消退, 阻止恶性转移, 抑制远处肿瘤的生长^[23-27]。更重要的是, IL-12 使一些动物显示持久的系统免疫, 对肿瘤的再攻击具有保护作用^[28-31]。IL-12 通过调节 NK 细胞、巨噬细胞介导的非特异性免疫和 Th 细胞、细胞毒性 T 细胞介导的特异性免疫作用^[32]。

过去实验表明中药复方肠安泰能够增加 T 细胞及 NK 细胞在小肠黏膜固有层的数量^[5], 并能通过诱导 IFN 的产生而抑制肿瘤生长和转移^[6]。也就是说中药复方肠安泰一方面在来源于 B 细胞的 IL-12 介导下, 产生 IFN 而发挥抗肿瘤转移的作用, 另一方面诱导产生的 IL-12 的抗肿瘤作用可能是由于 CD8+T、NK 细胞所介导的。在整个免疫应答过程中, 小肠黏膜固有层淋巴细胞起主导作用, 大肠黏膜固有层淋巴细胞起辅助作用。

4 参考文献

- 王文萍, 姜良铎. 肿瘤转移器官特异性发生机制与中医经络藏象理论. 北京中医药大学学报 2002;25:11-13
- 王文萍, 王垂杰, 姜良铎. 肿瘤转移“痰毒流注”理论形成基础及实践意义. 中国中医基础医学杂志 2002;8:324-326
- 王文萍, 王垂杰. 中医学对大肠癌肿瘤转移的认识及对策. 中医药学刊 2002;14:41-42
- 王文萍, 姜良铎, 刘明. 肿瘤转移“痰毒流注”病机假说的研究思路. 辽宁中医杂志 2002;3:137-138
- 王文萍, 姜良铎, 王垂杰, 饭乡正明. 中药复方肠安泰胶囊对大肠癌肺转移模型小鼠肠黏膜 T 细胞及 NK 细胞的诱导. 北京中医药大学学报 2001;4:34-36
- 王文萍, 姜良铎, 王垂杰, 饭乡正明. 肠安泰对 IFN 的诱导及肺转移的抑制. 中国中医基础医学杂志 2002;12:23-24
- Mowat AM, Smith RE, Donachie AM, Furrer E, Grdic D, Lycke N. Oral vaccination with immune stimulating complexes. *Immunol Lett* 1999;65:133-140
- Angstrom J, Backstrom M, Berntsson A, Karlsson N, Holmgren J, Karlsson KA, Lebens M, Teneberg S. Novel carbohydrate binding site recognizing blood group A and B determinants in a hybrid of cholera toxin and Escherichia coli heat-labile enterotoxin B-subunits. *J Biol Chem* 2000;275:3231-3238
- Del Giudice G, Pizza M, Rappuoli R. Mucosal delivery of vaccines. *Methods* 1999;19:148-155
- Wang WP, Iigo M, Sato J, Sekine K, Adachi I, Tsuda H. Activation of intestinal mucosal immunity in tumor-bearing mice by lactoferrin. *Jpn J Cancer Res* 2000;91:1022-1027
- 王文萍, 饭乡正明, 津田洋幸. 大肠癌及癌转移的预防与 Lactoferrin. 肿瘤学杂志 2002;1:55-56
- 吕仁荣, 寿楠海, 姜希宏. 大肠癌细胞增生活性和细胞免疫水平与淋巴结转移规律的研究. 世界华人消化杂志 2001;9:455-456
- 吴金生, 谭文军, 赖大年. 胃癌术后输注脂肪乳对 IL-12 及细胞免疫功能的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:712-713
- 李明松, 袁爱力, 张万岱, 陈学清, 张亚历, 周殿元. 大肠癌患者外周血树突状细胞免疫功能研究. 世界华人消化杂志 1999;7:429
- 赵任, 郁宝铭, 郑民华, 李东华, 张国弛, 朱佑明, 胡宝瑜. 硒对淋巴细胞杀伤大肠癌细胞的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:80-83
- 赵任, 郁宝铭, 张国弛, 郑民华, 李东华, 黄梁, 邹鸿志. 手术前后硒对大肠癌患者的免疫功能及抗氧化功能的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:1013-1016
- Martinet O, Ermekova V, Qiao JQ, Sauter B, Mandeli J, Chen L, Chen SH. Immunomodulatory gene therapy with interleukin 12 and 4-1BB ligand: long-term remission of liver metastases in a mouse model. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:931-936
- Wang Z, Qiu SJ, Ye SL, Tang ZY, Xiao X. Combined IL-12 and GM-CSF gene therapy for murine hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2001;8:751-758

- 19 Rakhmilevich AL, Janssen K, Hao Z, Sondel PM, Yang NS. Interleukin-12 gene therapy of a weakly immunogenic mouse mammary carcinoma results in reduction of spontaneous lung metastases via a T-cell-independent mechanism. *Cancer Gene Ther* 2000;7:826-838
- 20 Fuji N, Ueda Y, Fujiwara H, Toh T, Yoshimura T, Yamagishi H. Antitumor effect of alpha-galactosylceramide (KRN7000) on spontaneous hepatic metastases requires endogenous interleukin 12 in the liver. *Clin Cancer Res* 2000;6:3380-3387
- 21 Worth LL, Jia SF, Zhou Z, Chen L, Kleinerman ES. Intranasal therapy with an adenoviral vector containing the murine interleukin-12 gene eradicates osteosarcoma lung metastases. *Clin Cancer Res* 2000;6:3713-3718
- 22 Iwazawa T, Chau GY, Mori T, Dookeran KA, Rubin JT, Watkins S, Robbins PD, Lotze MT, Tahara H. Potent antitumor effects of intra-arterial injection of fibroblasts genetically engineered to express IL-12 in liver metastasis model of rat: no additional benefit of using retroviral producer cell. *Cancer Gene Ther* 2001;8:17-22
- 23 Mariani E, Meneghetti A, Tarozzi A, Cattini L, Facchini A. Interleukin-12 induces efficient lysis of natural killer-sensitive and natural killer-resistant human osteosarcoma cells: the synergistic effect of interleukin-2. *Scand J Immunol* 2000;51:618-625
- 24 Nakui M, Ohta A, Sekimoto M, Sato M, Iwakabe K, Yahata T, Kitamura H, Koda T, Kawano T, Makuuchi H, Taniguchi M, Nishimura T. Potentiation of antitumor effect of NKT cell ligand, alpha-galactosylceramide by combination with IL-12 on lung metastasis of malignant melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:147-153
- 25 Kishida T, Asada H, Satoh E, Tanaka S, Shinya M, Hirai H, Iwai M, Tahara H, Imanishi J, Mazda O. In vivo electroporation-mediated transfer of interleukin-12 and interleukin-18 genes induces significant antitumor effects against melanoma in mice. *Gene Ther* 2001;8:1234-1240
- 26 Shin T, Nakayama T, Akutsu Y, Motohashi S, Shibata Y, Harada M, Kamada N, Shimizu C, Shimizu E, Saito T, Ochiai T, Taniguchi M. Inhibition of tumor metastasis by adoptive transfer of IL-12-activated Valpha14 NKT cells. *Int J Cancer* 2001;91:523-528
- 27 Smyth MJ, Cretney E, Takeda K, Wiltrott RH, Sedger LM, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med* 2001;193:661-670
- 28 Melero I, Mazzolini G, Narvaiza I, Qian C, Chen L, Prieto J. IL-12 gene therapy for cancer: in synergy with other immunotherapies. *Trends Immunol* 2001;22:113-115
- 29 Mikyskova R, Bubenik J, Mendoza L, Vonka V, Smahel M, Simova J, Jandlova T. Local cytokine treatment of HPV16-associated tumours results in inhibition of their lung metastases. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:581-587
- 30 Gambotto A, Tuting T, McVey DL, Kovacs I, Tahara H, Lotze MT, Robbins PD. Induction of antitumor immunity by direct intratumoral injection of a recombinant adenovirus vector expressing interleukin-12. *Cancer Gene Ther* 1999;6:45-53
- 31 Aruga A, Tanigawa K, Aruga E, Yu H, Chang AE. Enhanced adjuvant effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-12 compared with either alone in vaccine-induced tumor immunity. *Cancer Gene Ther* 1999;6:89-95
- 32 杨家和,钱其军,吴孟超,郭亚平. 白介素12:重要的免疫调节因子. 世界华人消化杂志 1999;7:71-72

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 征文通知 •

全国第八届中西医结合普通外科学术研讨会征文通知

由中国中西医结合学会急腹症专业委员会主办,大连医科大学附属第一医院承办的全国第八届中西医结合普通外科学术研讨会将于2003年6月中旬在辽宁省大连市召开,现将征文通知如下。

1 征文内容:

(1)急性及性胰腺炎的中西医结合基础实验研究和临床经验总结。(2)肝胆疾病的中西医结合基础实验研究和临床经验总结。(3)梗阻性黄疸的诊断和中西医结合治疗经验。(4)肝胆、胰腺疾病的影像学诊断及中西医结合介入治疗(5)中西医结合胃肠疾病的基础实验研究和临床经验总结。(6)

有关肝胆胰腺胃肠疾病新技术、新进展的应用经验。(7)中西医结合治疗中晚期肿瘤的基础与临床研究(8)有关肝胆胃肠疾病的腹腔镜,内窥镜诊治新技术和新方法。

2 征文要求:

(1)文章未公开发表过(包括会议及杂志)。(2)请寄4000字以内全文及600字以内摘要打印稿各一份,摘要应包括目的,方法,结果和结论四部分,不投摘要者恕不能收入汇编。(3)投稿时请附软盘,用word软件输入,注明作者姓名,单位,邮编并加盖公章或附单位介绍信。(4)稿件请于2003年4月15日前(以邮戳为准)寄至大连医科大学附属第一医院,陈海龙教授收,地址:大连市中山路222号,邮编:116011。(5)欢迎网上投稿,Email:hailong_chen@x263.net。

3本次会议将邀请著名中西医结合专家做专题讲座。中国中西医结合普通外科专业委员会将会同中国中西医结合外科杂志对全部征文进行优秀论文评选,获奖者除参加大会交流外,还将被授予中国中西医结合学会优秀论文证书。参会者将被授予国家级继续教育学分。

中国中西医结合学会普通外科(急腹症)专业委员会

2003-03-08