

金复康口服液对免疫衰老小鼠肺癌移植瘤的防治作用

田建辉^{1,2}, 杨晓霞^{1△}, 毕凌¹, 罗斌¹, 周之毅¹, 王青², 黄建华³, 李和根¹, 刘嘉湘¹(1. 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科, 上海 200032; 2. 上海市中医药研究院 中医肿瘤研究所 上海 200032; 3. 复旦大学附属华山医院 中西医结合研究所 上海 200040)

[摘要] **目的:** 探讨金复康口服液对 D-半乳糖诱导的免疫衰老模型小鼠肺癌移植瘤的防治作用。**方法:** 采用 SPSS 18.0 软件包随机取 10 只 C57BL/6J 雄性小鼠作空白对照、取 83 只 C57BL/6J 雄性小鼠连续 42 d 颈背部皮下注射 D-半乳糖[150 mg/(kg·d)]建立免疫衰老模型, 分别以生理盐水和金复康口服液进行干预; 造模后取 10 只对照组和 20 只免疫衰老模型组小鼠, 检测小鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)活力和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量, 摘取小鼠胸腺及脾脏, 计算器官指数; 流式细胞术检测小鼠胸腺及脾脏 T 细胞免疫衰老相关膜分子表达。其余 63 只免疫衰老模型小鼠左侧腋下前部接种肺癌细胞 LL2-Luc-M38 建立肺癌皮下移植瘤模型, 并随机分为生理盐水、金复康预防和金复康防治组进行干预, 其中 30 只(每组取 10 只)小鼠于移植瘤造模 14 d 后处死, 检测瘤体质量; 其余 33 只小鼠观察成瘤时间、计算生存期。**结果:** (1)与空白对照组相比, 生理盐水组小鼠的脾脏指数、胸腺指数明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 小鼠胸腺和脾脏的 $CD3^+ CD45RA^+$ 、 $CD3^+ CD25^+$ 、 $CD3^+ CD28^+$ 表达显著下降($P < 0.01$), $CD3^+ CD196^+$ 、 $CD4^+ CD25^+$ 表达显著上升($P < 0.01$), 血清 SOD 活力明显下降($P < 0.01$), MDA 含量明显上升($P < 0.01$); 金复康干预后, 与生理盐水组相比, 免疫衰老小鼠脾指数明显上升($P < 0.01$), 脾 $CD3^+ CD45RA^+$ 和 $CD3^+ CD28^+$ 表达明显上升($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 而 $CD3^+ CD196^+$ 及 $CD4^+ CD25^+$ 表达显著下降($P < 0.01$), 胸腺 $CD3^+ CD25^+$ 表达显著上升($P < 0.01$), $CD3^+ CD196^+$ 表达显著下降($P < 0.05$), 血清 SOD 活力明显上升($P < 0.01$), 而 MDA 含量明显下降($P < 0.01$)。 (2)免疫衰老小鼠皮下接种肺癌细胞后, 金复康预防组小鼠的成瘤时间和生存期明显长于生理盐水组($P < 0.05$), 金复康防治组的生存时间延长更为明显($P < 0.01$); 金复康防治组移植瘤体质量明显小于生理盐水组($P < 0.01$)和预防组($P < 0.05$), 后两组间无明显差异($P > 0.05$)。**结论:** D-半乳糖可诱导小鼠免疫衰老发生; 金复康可时间依赖性地延缓小鼠免疫衰老, 从而防治肺癌的发生发展及延长小鼠生存期。

[关键词] 免疫衰老; 金复康口服液; 肺癌; 肿瘤预防; 肿瘤治疗

[中图分类号] R734.2; R730.54

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)01-0036-08

Effect of Jinfukang decoction on prevention and treatment of transplanted lung cancer in immunosenescence mouse model

TIAN Jianhui^{1,2}, YANG Xiaoxia^{3△}, BI Ling³, LUO Bin³, ZHOU Zhiyi¹, WANG Qing², HUANG Jianhua⁴, LI Hegen¹, LIU Jiexiang¹(1. Department of Oncology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; 2. Institute of TCM & Oncology, Shanghai Institutes of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; 3. Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China)

[Abstract] **Objective:** To study the preventive and therapeutic effects of Jinfukang decoction on lung carcinoma in immunosenescence mouse induced by D-galactose. **Methods:** Using SPSS 18.0 software, 10 male C57BL/6J mice were randomly selected as control group and 83 male C57BL/6J mice as model group. In the model group, mice were subcutane-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81173224, No. 81373621); 国家中医药管理局第一批全国中医药传承博士后资助项目(No. 135818)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81173224, No. 81373621), and the First Group of National Post-Doctoral Project on Traditional Chinese Medicine Inheritance(No. 135818)

[作者简介] 田建辉(1973-), 男, 河南省平顶山市人, 博士, 主任医师, 主要从事中医药抗肿瘤研究; 杨晓霞(1989-), 女, 四川省宜宾市人, 硕士生, 主要从事中医药抗肿瘤研究, E-mail: liuxufenfei2013@163.com. △为共同第一作者

[通信作者] 田建辉(TIAN Jianhui, corresponding author), E-mail: hawk7150@hotmail.com

ously injected with D-galactose (150 mg/kg/d) in scruff for 42 days to construct immunosenescence mouse model, normal saline and Jinfukang decoction were applied to intervene. After construction of the mouse model, 10 mice in the control group and 20 mice in the model group were selected to detect vitalities of serum superoxide dismutase (SOD) and contents of serum malondialdehyde (MDA), and then removed spleens and thymuses from the mice to calculate index of the organs; Flow cytometry was used to examine the expressions of immunosenescence related membrane molecules in T cells of the spleen and the thymuses. The rest 63 immunosenescence mice in the model group were subcutaneously injected with LL2-Luc-M38 lung cancer cells in the front of the left armpit to construct the model of Lewis lung cancer, and the mice were randomly divided into normal saline group, Jinfukang prevention group and Jinfukang prevention + treatment group. Among them, 30 mice (10 mice each group) were sacrificed at 14th day to measure the tumor mass, and the rest 33 mice were observed for time of tumor formation and survival time. **Results:** (1) Compared with the control group, the indexes of spleen and thymus in the normal saline group significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); expression of $CD3^+CD45RA^+$, $CD3^+CD25^+$ and $CD3^+CD28^+$ in the spleen and the thymus significantly decreased (all $P < 0.01$) while expression of $CD3^+CD196^+$ and $CD4^+CD25^+$ in the organs significantly increased ($P < 0.01$); the vitalities of serum SOD remarkably decreased ($P < 0.001$) while contents of serum MDA increased ($P < 0.001$). After intervention of Jinfukang decoction, in the model group the spleen indexes increased significantly ($P < 0.01$), expression of $CD3^+CD45RA^+$ and $CD3^+CD28^+$ increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) and expression of $CD3^+CD196^+$ and $CD4^+CD25^+$ decreased ($P < 0.01$) in the spleen, while expression of $CD3^+CD25^+$ increased ($P < 0.01$), expression of $CD3^+CD196^+$ in the thymus decreased ($P < 0.05$), vitalities of serum SOD increased ($P < 0.01$) and contents of serum MDA decreased ($P < 0.01$) compared with the normal saline group. (2) After the immunosenescence model mice were subcutaneously injected with lung cancer cells, times of tumor formation and survival in the Jinfukang prevention group were significantly longer than those in the normal saline group ($P < 0.05$), especially in the Jinfukang prevention + treatment group survival time was more significantly longer than that in the normal saline group ($P < 0.01$); the tumor mass in the Jinfukang prevention + treatment group was smaller than those in the normal saline group ($P < 0.01$) and the Jinfukang prevention group ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the latter two groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** The immunosenescence of mouse can be induced by D-galactose; Jinfukang decoction can time-dependently delay the immunosenescence of mouse, by which Jinfukang decoction can prevent the occurrence and development of lung cancer, and can prolong survival period of the mice bearing lung tumor.

[**Key words**] immunosenescence; Jinfukang decoction; lung cancer; tumor prevention; tumor therapy

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(1): 36-43. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.006]

研究^[1-2]发现,年龄升高是肿瘤高发最主要危险因素,从40岁开始直到80岁,恶性肿瘤是群体死亡的第一因素;这个年龄段的一个主要生理变化是免疫衰老的发生,由此导致免疫监视功能下降、免疫逃逸发生,这些都促进肿瘤的发生^[3]。研究组前期临床研究^[4]发现,健康成年人随着年龄增加而调节性T细胞 $CD4^+CD25^+$ 表达上升,细胞毒性T细胞 $CD8^+CD28^+$ 和初始T细胞 $CD4^+CD45RA^+$ 表达下降。金复康口服液是我国中医名家刘嘉湘教授研制的治疗肺癌的中成药,具有延长肺癌患者生存期、提高生活质量和预防术后复发转移的作用,调节增强肺癌患者细胞免疫功能可能是其发挥这些作用的主要机制;同时发现金复康口服液可以调节T细胞的功能状态,抑制调节性T细胞的表达,而这些正是免疫衰老的细胞学特征^[5-7]。基于上述研究结果,本研究旨在进一步探讨金复康是否通过干预免疫衰老

的发生从而预防肺癌的发生发展,探讨金复康在肺癌防治中的作用及其机制,从而丰富中医“治未病”的理论。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要试剂与材料

LL2-Luc-M38小鼠源肺癌细胞株,由冷泉港生物科技股份有限公司赠送。*D*-半乳糖购自德国Sigma公司(批号:SLBH4855V),金复康口服液(2 g/ml)为珠海金仁药业股份有限公司产品[其全方组成为:黄芪、北沙参、天冬、麦冬、女贞子(酒制)、山茱萸、绞股蓝、淫羊藿、葫芦巴(盐水炒)、石上柏、石见穿、重楼等药]。SOD试剂盒(生产批号:20150310)及MDA试剂盒(生产批号:20150112)均购自南京建成公司,FITC标记的抗小鼠CD4、PE标记的抗小鼠CD45RA和

CD28、PerCP-Cy5.5 标记的抗小鼠 CD3、APC 标记的抗小鼠 CD25 及 Alexa-647 标记的抗小鼠 CD196 均购自美国 BD 公司。全自动多色分析流式细胞仪系统(型号: FACSVerse)购自美国 BD 公司, CO₂ 培养箱(型号: MCO-18AIC)购自日本 SANYO 公司, 细胞计数仪(型号: Cedex XS)购自瑞士 Roche 公司, 电子分析天平(型号: BAS323S-CW)购自德国 Sartorius 公司, 多功能酶标仪(型号: infinite F200)购自瑞士 TECAN 公司。

1.2 实验动物

近交系 C57BL/6J 雄性小鼠, 6~8 周龄, 体质量(20±2)g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[生产许可证号: SCXK(沪)2012-0002], 饲养于上海中医药大学附属龙华医院无特殊病原体级动物房[动物使用许可证号: SYXK(沪)2010-0095], 室温为 25℃, 湿度为 70%, 自由摄食和饮水。

1.3 皮下注射 D-半乳糖制作小鼠免疫衰老模型及金复康干预方案

参考文献[8]方法将 30 只 57BL/6J 雄性小鼠适应性饲养 7 d 后, 采用 SPSS 18.0 软件包随机分为空白组(Blank group), 金复康组(JFK group)和生理盐水组(NS group)(10 只/组)。空白组不予以任何干预措施, 其余两组小鼠每日右侧胸部靠近颈部处皮下注射 D-半乳糖 150 mg/(kg·d), 连续注射 42 d。模型建立的同时进行药物干预, 金复康组小鼠每天灌服 2 g/ml 的金复康口服液 0.35 ml/只, 空白组及生理盐水组小鼠每天灌服等体积的生理盐水。

另外 63 只小鼠分为生理盐水组、金复康预防组(JFK prevention group)及金复康防治组(JFK prevention and treatment group), 采用同样方法建立衰老动物模型并同时进行金复康干预; 至 42 d 时皮下接种肺癌细胞形成移植瘤。其中, 金复康预防组灌服 2g/ml 的金复康口服液 0.35 ml/d 共 42 d, 金复康防治组按照同样剂量灌服金复康口服液共 56 d。其中 30 只小鼠在造模第 56 d 处死, 观察瘤体质量, 其余 33 只小鼠自然死亡, 并观察平均成瘤时间及生存期。

1.4 免疫衰老小鼠模型的鉴定及分析金复康干预的效果

1.4.1 小鼠胸腺及脾脏器官指数的测定 注射 D-半乳糖第 42 天将空白组、生理盐水对照组及金复康组共 30 只小鼠脱颈处死、固定, 胸腹部乙醇消毒, 立即摘取小鼠胸腺及脾脏, 剔除多余组织; 置于一次性弯盘中, 用生理盐水清洗后, 放在干净的纱布上, 吸去多余水分; 将微量秤去皮归零, 微量称读取质量数值。

计算公式^[9]: 器官指数 = 器官质量(mg)/体质量(g)。

1.4.2 制备小鼠胸腺及脾单细胞悬液 参照参考文献[10]方法, 将胸腺以 200 目筛网充分研磨后, 用 5 ml 生理盐水冲洗筛网, 使细胞穿过筛网, 用一次性吸管将细胞悬液移入 15 ml 离心管中; 1 200 × g 离心 5 min; 弃上清, 再加 2 ml PBS, 清洗 2 遍, 最后加入 1 ml PBS 重悬, 制成胸腺单细胞悬液; 按照同样方法, 将脾脏制备成单细胞悬液。

1.4.3 流式细胞术检测小鼠胸腺和脾 T 细胞主要膜分子的表达 取 10 μl 胸腺单细胞悬液放入 EP 管, 吸取 10 μl 锥虫蓝, 将二者混匀; 取 10 μl 混匀后的液体放入细胞计数板上, 计数后, 加入适量的 PBS, 将细胞密度调整至 2 × 10⁵ 个/ml; 同法处理脾单细胞悬液。将胸腺和脾单细胞悬液分别分为两组并加入流式管, 每组各加单细胞悬液 100 μl, 1 200 × g 离心 5 min, 弃上清; 加抗体, 其中第一组加入抗小鼠直标抗体 PerCP-Cy5.5-CD3、APC-CD25 和 PE-CD28, 第二组加入抗小鼠直标抗体 PerCP-Cy5.5-CD3、PE-CD45RA 和 Alexa-647-CD196, 混匀后, 室温孵育 30 min; 加 1 ml PBS 清洗 2 次, 1 200 × g 离心 5 min; 每个流式管中加入 600 μl PBS 重悬, 上机检测, 重复检测 3 次。

1.4.4 实验小鼠血清 SOD 和 MDA 含量的检测 采用注射过 42 d D-半乳糖小鼠的血清, 将血清用生理盐水按照 1:10 稀释, 根据 SOD 试剂盒说明书配制试剂, 按照操作依次将样本和试剂加入 96 孔板的各个孔, 混匀, 各组恒温孵育 20 min, 取出将 96 孔板放入酶标仪上, 450 nm 处检测光密度值。采用注射 D-半乳糖 42 d 小鼠的血清, 按照 MDA 试剂盒说明书配制试剂, 按照操作表加入样本并进行操作, 最后将 96 孔板放在酶标仪上, 532 nm 处测光密度值。

1.5 在免疫衰老小鼠模型基础上建立肺癌皮下移植瘤模型

取 63 只免疫衰老并经金复康干预的小鼠, 在其左侧腋前部皮下注射小鼠肺癌细胞株 LL2-Luc-M38^[11](注: 采用浓度为 2 g/ml 的金复康口服液, 按照 0.35 ml/d 的量灌胃, 金复康预防组灌胃 42 d, 金复康防治组灌胃 56 d)。用胰酶将培养皿内的细胞消化, 移入 50 ml 离心管, 800 × g 离心 5 min; 弃上清, 加入适量 PBS, 将细胞密度调整至 1 × 10⁷ 个/ml; 给其中 30 只小鼠接种细胞悬液, 每只小鼠 0.2 ml(2 × 10⁶ 个细胞)。另外 33 只小鼠采用同样的方法, 细胞密度调整至 1 × 10⁵ 个/ml, 按照每只小鼠 0.2 ml 的量接种细胞悬液。该两组小鼠接种肺癌细

胞的同时继续按实验方案给予金复康干预。

1.6 测量移植肿瘤负荷质量

建立皮下移植瘤模型 14 d 后,将 30 只小鼠脱颈椎处死,剥除瘤体,清洗后放在干净纱布上吸收多余水分,然后置于电子称上称瘤体质量。

1.7 观察移植瘤成瘤时间及荷瘤小鼠生存期

当建立皮下移植瘤模型后,开始观察小鼠成瘤情况,左手抓取小鼠,取仰卧位,充分暴露胸部,右手触摸接种瘤细胞的部位,若触及明显突起的结节或者肿块,继续观察 2 d,若肿块仍存在,则确定小鼠成瘤,把第一次触及肿块的时间作为成瘤日期。继续观察荷瘤小鼠生存期,将小鼠自然死亡的日期作为判断生存期的时间截点。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验,等级资料采用非参数检验,用 Kaplan-Meier 法作生存期分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫衰老模型小鼠的生存状态发生改变

在建立免疫衰老模型后开始观察,至第 42 天各组小鼠均无死亡。皮下注射 *D*-半乳糖的各组小鼠逐渐出现形体消瘦、皮肤松弛、皮毛光泽度减少、脊柱突起、活动减少和喜抱团蜷缩的表现,而未注射

D-半乳糖的空白组小鼠则没有出现这些异常改变,从小鼠生存状态变化说明 *D*-半乳糖可诱导衰老小鼠模型。

2.2 免疫衰老模型小鼠免疫器官的指数明显下降

实验结果显示,与空白组相比,皮下注射 *D*-半乳糖的生理盐水组及金复康组小鼠的胸腺指数均明显下降[(1.60 ± 0.19)、(1.61 ± 0.12) vs (1.88 ± 0.11), 均 $P < 0.01$];与空白组相比,皮下注射 *D*-半乳糖的生理盐水组脾指数下降[(2.68 ± 0.21) vs (2.86 ± 0.27), $P < 0.05$],而金复康组脾指数无明显差异[(2.90 ± 0.10) vs (2.86 ± 0.27), $P > 0.05$];但金复康组小鼠脾指数与生理盐水组比明显上升(2.90 ± 0.10) vs (2.68 ± 0.21), $P < 0.01$ 。

2.3 金复康对免疫衰老小鼠脾 T 细胞表面分子表达的影响

流式细胞术免疫荧光标记法检测结果(表 1)显示,与空白组相比,生理盐水组及金复康组小鼠脾 CD3⁺CD45RA⁺、CD3⁺CD25⁺和 CD3⁺CD28⁺表达显著下降(均 $P < 0.01$);CD3⁺CD196⁺、CD4⁺CD25⁺表达显著上升(均 $P < 0.01$)。与生理盐水组相比,金复康组小鼠脾 CD3⁺CD45RA⁺和 CD3⁺CD28⁺表达明显上升($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$);CD3⁺CD196⁺及 CD4⁺CD25⁺表达显著下降(均 $P < 0.01$);而金复康组与生理盐水组小鼠脾的 CD3⁺CD25⁺表达无显著差异($P > 0.05$)。

表 1 免疫衰老小鼠脾脏 T 细胞重要表面膜分子的表达($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 1 Expression of important surface membrane molecules of T cells in immunosenescence mouse spleen($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	<i>n</i>	CD3 ⁺ CD45RA ⁺	CD3 ⁺ CD25 ⁺	CD3 ⁺ CD28 ⁺	CD3 ⁺ CD196 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺
Blank	10	47.54 ± 0.51	63.47 ± 3.87	22.22 ± 0.73	10.38 ± 0.62	4.50 ± 0.49
NS	10	30.72 ± 1.93**	7.77 ± 1.49**	3.93 ± 0.71**	21.97 ± 2.67**	10.96 ± 3.22**
JFK	10	35.31 ± 2.43**△△	9.11 ± 1.37**	5.30 ± 1.67**△	15.20 ± 1.50**△△	7.01 ± 0.78**△△

** $P < 0.01$ vs blank group; △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ vs NS group

2.4 金复康对免疫衰老小鼠胸腺 T 细胞表面分子表达的影响

流式细胞术免疫荧光标记检测结果(图 2)显示,与空白对照组相比,生理盐水组及金复康组小鼠胸腺 CD3⁺CD45RA⁺、CD3⁺CD25⁺、CD3⁺CD28⁺表达显著下降(均 $P < 0.01$);CD3⁺CD196⁺表达显著上升($P < 0.01$)。与生理盐水组相比,金复康组小鼠胸腺 CD3⁺CD25⁺表达显著上升(均 $P < 0.01$);

CD3⁺CD196⁺表达显著下降(均 $P < 0.05$);CD3⁺CD45RA⁺及 CD3⁺CD28⁺表达无显著差异(均 $P > 0.05$)。

2.5 金复康对免疫衰老小鼠血清中 SOD 活力及 MDA 含量的影响

因每组有一个血清样本溶血,因此每组有效样本量均为 9。实验结果(表 3)显示,在血清 SOD 活力方面,与空白组相比,生理盐水组明显

下降 ($P < 0.01$), 金复康组无显著差异 ($P > 0.05$); 与生理盐水组相比, 金复康组显著上升 ($P < 0.01$)。在血清 MDA 含量方面, 与空白组相比, 生理盐水组明显上升 ($P < 0.01$), 金复康组无显著差异 ($P > 0.05$), 与生理盐水组相比, 金复康组显著下降 ($P < 0.01$)。

2.6 金复康防治明显降低免疫衰老模型小鼠的瘤体质量

实验结果(图3)显示,在建模后第14天,与生理盐水组相比,金复康防治组的瘤体质量显著下降 [$(0.53 \pm 0.27) \text{ vs } (1.16 \pm 0.47) \text{ g}, P < 0.01$]; 与金复康预防组相比,金复康防治组瘤体质量明显下降 [$(0.53 \pm 0.27) \text{ vs } (0.95 \pm 0.27) \text{ g}, P < 0.05$]; 生理盐水组与金复康预防组瘤体质量无明显差异 [$(0.95 \pm 0.27) \text{ vs } (1.16 \pm 0.47) \text{ g}, P > 0.05$]。

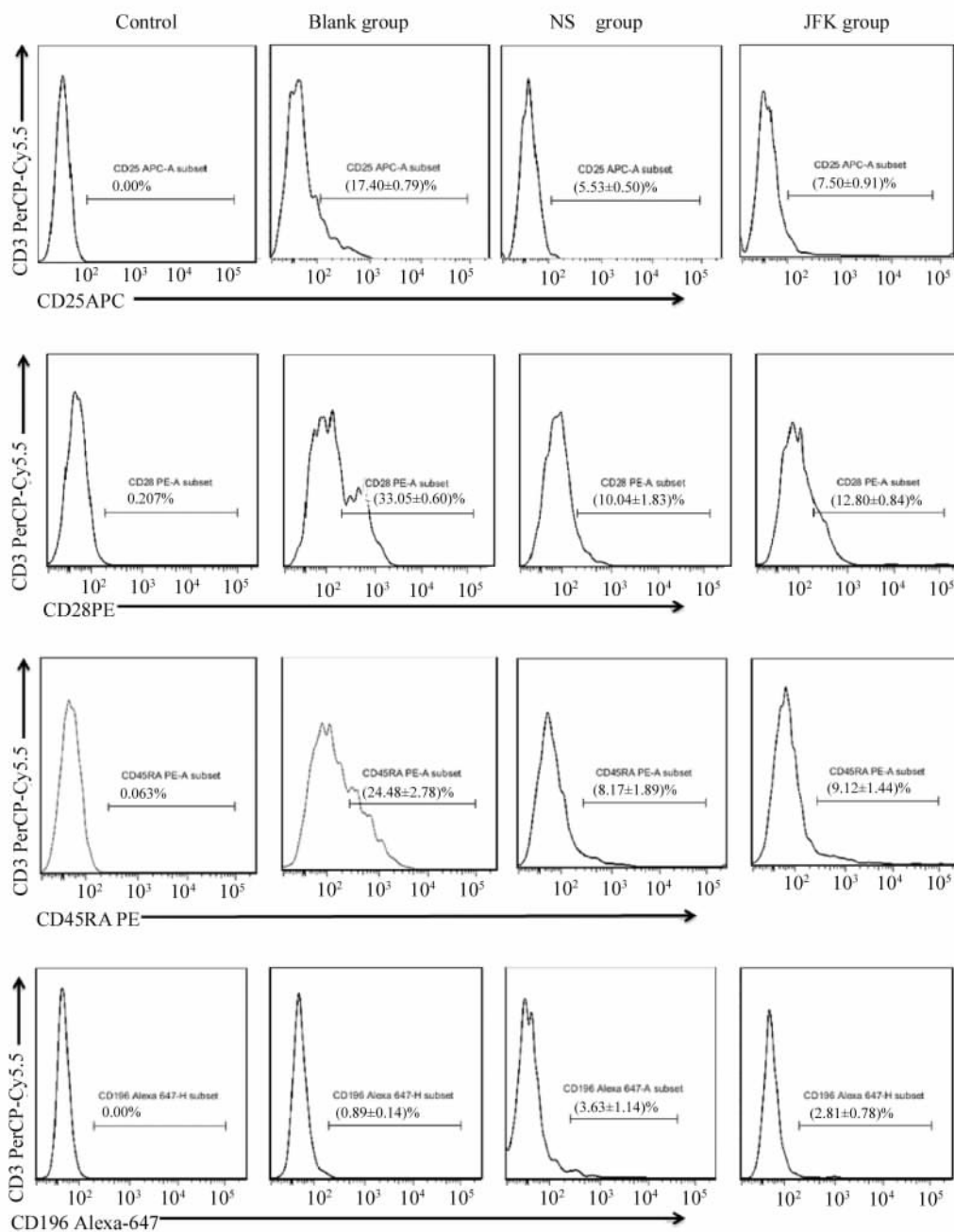


图1 免疫衰老小鼠胸腺 T 细胞重要表面膜分子的表达

Fig. 1 Expression of important surface membrane molecules of T cells in immunosenescence mouse thymus

2.7 金复康明显延长免疫衰老小鼠肺癌皮下移植瘤的成瘤时间

在免疫衰老小鼠模型的基础上皮下接种肺癌细胞, 观察小鼠成瘤时间, 实验结果(表3)显示, 与生理盐水组相比, 金复康预防组成瘤时间较长[(11.18 ± 1.60) vs (9.55 ± 1.44) d, $P < 0.05$], 金复康防治组成瘤时间显著延长[(11.45 ± 1.64) vs (9.55 ± 1.44) d, $P < 0.01$]。

表2 三组小鼠血清 SOD 活力及 MDA 含量的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 2 Comparison of SOD activity and MDA content in the serum of mice among three groups($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	n	SOD	MDA
		Z/(U · ml ⁻¹)	[c _B /(nmol · ml ⁻¹)]
Blank	9	144.15 ± 10.65	8.09 ± 2.18
NS	9	116.83 ± 12.33**	22.89 ± 8.03**
JFK	9	135.41 ± 4.07 ^{△△}	11.98 ± 2.91 ^{△△}

** $P < 0.01$ vs Blank group; ^{△△} $P < 0.01$ vs NS group

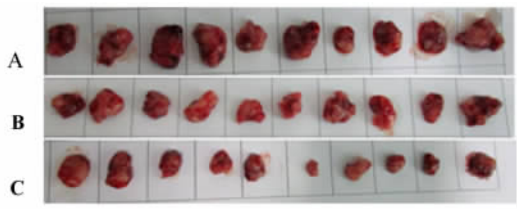


图2 三组小鼠瘤体的比较

Fig. 2 Comparison of tumor burden among three groups

A: Normal saline group; B: Jingfukang prevention group;
C: Jingfukang prevention + treatment group

表3 三组免疫衰老小鼠肺癌细胞皮下接种后的成瘤时间和存活时间($n = 11, \bar{x} \pm s, t/d$)

Tab. 3 Average times of tumor formation and survival of immune senescence transplanted with lung cancer cells among three groups ($n = 11, \bar{x} \pm s, t/d$)

Group	Tumor formation time	Survival time
NS	9.55 ± 1.44	28.45 ± 5.99
JFK prevention	11.18 ± 1.60*	33.45 ± 4.18*
JFK prevention and treatment	11.45 ± 1.64**	35.18 ± 5.86**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NS group

2.8 金复康明显延长荷瘤小鼠生存期

实验结果(表4)显示, 与生理盐水组相比, 金复康预防组生存期有所延长[(33.45 ± 4.18) vs (28.45 ± 5.99) d, $P < 0.05$]; 而金复康防治组生存期显著延长[(28.45 ± 5.99) vs (35.18 ± 5.86) d, $P < 0.01$]。

3 讨论

高龄是恶性肿瘤发病的最主要危险因素^[1,12]。高龄后骨髓、胸腺和脾等免疫器官萎缩或者被脂肪组织替代, 会引起各类免疫细胞数量与比例发生变化。免疫衰老可引起 T 细胞表面受体多样性减少、初始和记忆 T 细胞应对肿瘤抗原功能缺陷、免疫监视功能下降, 导致难以对发生突变的细胞进行及时识别, 从而癌变细胞的清除效率下降; 衰老的记忆 T 细胞及最终分化的 CD8⁺ T 细胞分泌的炎症因子有助于慢性炎症的产生, 这些都将促进肿瘤的发生^[3]。初始 T 细胞数量减少、记忆 T 细胞数量增多是免疫衰老的重要特征^[13]。研究^[14]发现, 50 岁以上老年人血清内 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺ 和 CD3⁺CD8⁺ 表达量远低于 50 岁前。当初始 T 细胞与记忆 T 细胞比例发生改变以后即会发生免疫逃逸, 最终形成肿瘤。

D-半乳糖亚急性中毒模拟衰老小鼠模型是 1991 年由龚国清等^[15]根据衰老代谢紊乱学说^[16]建立的, 该模型具有造模周期短、价格廉及重复性好等特点而被广泛应用于老年病的研究。胸腺和脾是机体重要的免疫器官, 机体正常的衰老进程与免疫系统衰老息息相关^[17], 有文献报道^[11,18], D-半乳糖诱导衰老小鼠模型的胸腺及脾组织 T 细胞重要表面膜分子的表达会发生相应的改变, 其中初始 T 细胞比例下降、记忆 T 细胞比例升高, 是免疫衰老的最重要特征之一。CD45 可分为 CD45RA 和 CD45RO, 在淋巴细胞的功能调节及信号传递中有重要意义, CD45RA⁺ T 细胞为未致敏 T 细胞^[19]。在本实验中, CD45RA 在衰老模型小鼠的胸腺及脾中的表达均下降。CD25 主要分布于活化 T 细胞、活化 B 细胞及活化单核/巨噬细胞, 是 IL-2 受体的 α 链^[20]; 本实验中, 其在衰老模型小鼠 T 细胞表面的表达下降。CD28 是协同刺激分子, 介导 T 细胞的活化及增殖, 在机体衰老过程中, 其表达会逐渐下降; 在本实验中, CD25 在衰老小鼠模型 T 细胞表面的表达下降。CD196 是记忆 T 细胞重要的表面膜分子, 其在一定程度上可反映机体记忆 T 细胞的含量^[21]; 在本实验中, CD196 分子在衰老模型小鼠 T 细胞表面的表达量上升。CD4⁺CD25⁺ T 细胞在机体内发挥着免疫

调节功能,能够维持自身免疫耐受,但若表达过高,则可能引起免疫功能抑制;在本实验中,CD4⁺CD25⁺T细胞在衰老模型小鼠的脾中表达量上升。MDA是自由基引起的脂质过氧化过程中生成的一种醛类物质,代表了机体组织细胞受自由基攻击后的损伤程度。SOD可以歧化超氧离子生成H₂O₂,它的活力反映了机体清除自由基的能力。本实验中,模型小鼠血清SOD活力下降、MDA含量上升,说明注射D-半乳糖的小鼠清除氧自由基的能力下降。从实验结果可看出,从免疫器官脏器指数、胸腺和脾免疫衰老特征性表型变化和自由基清除能力等多角度反映出免疫衰老的特征。说明采用D-半乳糖诱导免疫衰老模型是可靠可行的,从而为免疫衰老与肿瘤发生关系研究提供了合适的模型。

中医关于机体衰老的学说影响较大的有主要可分为以下几类:肾虚衰老、脾胃虚弱衰老、气阴两虚夹瘀衰老、气虚血瘀衰老、肾虚血瘀衰老、多器官虚损与气滞血瘀痰浊衰老等^[22-23]。沈自尹等^[24]通过动物实验和临床研究证明补肾益寿胶囊有下调T细胞凋亡和*Fas*、*FasL*基因表达的作用,能通过补肾延缓机体免疫衰老。颜德馨等^[25]根据中医文献记载及其多年临床经验在上世纪八十年代提出“人体衰老的本质在于气虚血瘀”。陈丰等^[26]认为脾肾气虚夹瘀是衰老的主要原因,并发现补肾健脾化痰方在改善衰老小鼠免疫功能、自由基代谢等方面的功能优于补肾化痰方。李家帮等^[27]认为脾虚是免疫衰老的主要原因,观察到四君子汤具有改善脾虚模型大鼠免疫功能的作用。因此,上述研究均已认识到干预免疫衰老可能延缓衰老引起的疾病。

金复康口服液是刘嘉湘教授^[6-8]将益气养阴和清热解毒的经验方研制而成的用于治疗肺癌的中成药,具有提高晚期肺癌患者生存质量、延长生存、预防转移和提高细胞免疫功能等确切功效。研究^[22-24]表明,金复康口服液中的生黄芪、天冬、女贞子、山茱萸、淫羊藿等中药具有明确抗衰老作用。因此,提出金复康可能通过干预免疫衰老发生达到治疗肺癌作用的假说,开拓其在肺癌预防领域的应用。如能从预防角度着眼而做到未病先防,避免肿瘤的发生,则对肺癌的防治具有重要意义。本实验结果显示,金复康口服液可以改善免疫器官脏器指数、下调胸腺和脾T细胞表面的免疫衰老分子表达,增强机体清除自由基的能力,从而能延缓免疫衰老的发生。在免疫衰老小鼠的基础上制备肺癌移植瘤模型,金复康防治组和预防组均可延迟小鼠成瘤,金复康防治组效果更为明显($P < 0.01$);金复康有效抑

制小鼠肺癌细胞的增殖,尤其是防治组效果更为显著($P < 0.01$);金复康可延长肺癌移植瘤模型小鼠的生存期,金复康防治组作用更加明显($P < 0.01$)。研究充分说明,金复康口服液能够在一定程度上防治肿瘤,并且和用药时间有关,这种作用特征与临床应用规律相似。本研究初步探讨金复康口服液通过干预免疫衰老防治肿瘤发病的作用,为刘嘉湘“扶正治癌”思想指导肺癌预防提供初步实验依据,并丰富中医的“治未病”学说,值得深入研究。

[参考文献]

- [1] 陈万青,张思维,曾红梅,等. 中国2010年恶性肿瘤发病与死亡[J]. 中国肿瘤, 2014, 23(1): 1-10. DOI: 10.11735/j.issn.1004-0242.2014.01.001.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29. DOI: 10.3322/caac.21254.
- [3] FOSTER A D, SIVARAPATNA A, GRESSS R E. The aging immune system and its relationship with cancer [J]. Aging Health, 2011, 7(5): 707-718. DOI: 10.2217/ah.11.56.
- [4] 董静懿,宁小晓,王蕾,等. 上海地区健康成年人外周血T淋巴细胞亚群参考区间调查[J]. 检验医学, 2014, 29(6): 617-627. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2014.06.010.
- [5] 刘嘉湘,施志明,李和根,等. 益肺抗癌饮治疗271例非小细胞肺癌研究[J]. 医学研究通讯, 2003, 32(3): 23-24. DOI: 10.3969/j.issn.1673-548X.2003.03.015.
- [6] 刘嘉湘,施志明,徐振晔,等. 金复康口服液治疗非小细胞肺癌的临床表现[J]. 中医杂志, 1997, 38(12): 727-729. DOI: 10.13288/j.11-2166/r.1997.12.012.
- [7] 孙玺媛,孙建立,刘嘉湘. 金复康口服液对Lewis肺癌荷瘤鼠脾细胞分泌Th1/Th2类细胞因子的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(9): 160-162. DOI: 10.13194/j.ljunivtem.2008.09.162.sunxy.085.
- [8] 蔡华珍,李冬雪,肖和平. 乌鸡黑色素对D-半乳糖致衰小鼠抗氧化能力的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(34): 1277-1279. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2014.05.057.
- [9] 萧能,余瑞元,袁明秀,等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社, 2006:240-242.
- [10] 张彦君,朱华亭,黄赛男,等. D-半乳糖致衰老小鼠胸腺T细胞重要膜型分子的改变及意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(2): 130-132. DOI: 10.13423/j.cnki.cjcmi.006277.
- [11] 邱明,易成,侯梅. 联合低剂量化疗对小鼠Lewis肺癌抗血管生成和抗肿瘤作用的研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2006, 37(4): 534-537. DOI: 10.3969/j.issn.1672-173X.2006.04.009.
- [12] PAWELEC G E, DERHOVANESSIAN A, LARBI A. Immunosenescence and cancer [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2010, 75(2): 20-26. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2010.06.012.
- [13] SANSONI P, VESCOVINI R, FAGNONI F, et al. The immune system in extreme longevity [J]. Exp Gerontol, 2008, 43(2): 1-5. DOI: 10.1016/j.exger.2007.06.008.

- [14] 刘尧娟,欧超伟,钟琼. 健康人外周血 T 细胞亚群参考区间的建立 [J]. 检验医学与临床, 2010, 7(7): 596-597. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2010. 07. 009.
- [15] 龚国清,徐戴本. 小鼠衰老模型研究 [J]. 中国药科大学学报, 1991, 22(2): 101-103. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-8467. 2007. 04. 036.
- [16] TARAZONA R, SOLOANA R, OUYANG Q, et al. Basic biology and clinical impact of immunosenescence [J]. Exp Gerontol, 2003, 38(1): 183-189. DOI: 10. 1016/S0531-5565(01) 00182-6.
- [17] 郑集. 从代谢观点看衰老机制 [J]. 中华老年医学杂志, 1983, 2(1): 50-56. DOI: 10. 3969/j. issn. 1005-9202. 2010. 02. 057.
- [18] 黄赛男,张彦君,朱华亭,等. D-半乳糖致衰老小鼠脾脏 B 细胞的变化 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(2): 133-136. DOI: 10. 13423/j. enki. cjemi. 006278.
- [19] 毕胜利. CD45RA/CD45RO 研究进展 [J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(4): 561-564. DOI: 10. 3969/j. issn. 1007-4287. 2007. 04. 051.
- [20] CLEMENT L T, VINK P E, BRADELEY G E. Novel immunoregulatory functions of phenotypically distinct subpopulations of CD4⁺ cells in the human neonate [J]. J Immunol, 1990, 145(1): 102-108. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-2478. 2007. 06. 014.
- [21] RAMOS-MEDINA R, MONTES-MORENO S, MAESTRE L, et al. Immunohistochemical analysis of HLA9 workshop antibodies against cell-surface molecules in reactive and neoplastic lymphoid tissues [J]. Immunol Lett, 2011, 134(2): 150-156. DOI: 10. 1016/j. imlet. 2010. 10. 007.
- [22] 杜怀棠,周丽珍. 近 10 年中医衰老学说研究述评 [J]. 北京中医药大学学报, 1995, 18(2): 2-7. DOI: 10. 3321/j. issn: 1006-2157. 1995. 02. 001.
- [23] 李淑雯. 衰老与气阴两虚关系探讨 [J]. 湖北中医杂志, 2004, 26(10): 15-17. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-0704. 2004. 10. 007.
- [24] 沈自尹,郑振,郭为民,等. 补肾法延缓免疫衰老的临床与实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(3): 178-181. DOI: 10. 3321/j. issn: 1003-5370. 2002. 03. 006.
- [25] 颜德馨,颜乾麟,颜乾珍,等. 气血与衰老 [J]. 江苏中医, 1990, 27(4): 27-29. DOI: 10. 13192/j. ljtem. 1994. 01. 20. lvly. 010.
- [26] 陈丰,李顺成. 补肾化痰及补肾健脾化痰调整小鼠免疫衰老的对比研究 [J]. 中国医药学报, 1997, 12(2): 5-10. DOI: 10. 3321/j. issn: 1673-1727. 1997. 02. 002.
- [27] 李家邦,陈松,李立新,等. 四君子汤对脾虚证模型大鼠淋巴细胞功能的影响 [J]. 成都中医药大学学报, 2001, 24(3): 31-32. DOI: 10. 3969/j. issn. 1004-0668. 2001. 03. 014.
- [收稿日期] 2015 - 09 - 24 [修回日期] 2015 - 12 - 04
[本文编辑] 阮芳铭

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中国肿瘤生物治疗杂志》征稿和征订启事

《中国肿瘤生物治疗杂志》是由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办的高级学术刊物,为中国精品科技期刊、RCCSE 中国权威学术期刊、中国中文核心期刊、中国科学引文数据库核心源期刊、中国科技核心期刊、中国人民解放军优秀医学期刊,为同行专家评审期刊和开放获取(OA)期刊;获 2015-2017 年度中国科协精品科技期刊工程项目资助。本刊主要报道肿瘤生物治疗领域基础研究和临床应用的新成果、新理论、新技术和新经验,常设有述评、院士论坛、专家论坛、研究快报、青年学者论坛、基础研究、临床研究、转化医学、技术方法、短篇论著、学术争鸣、文献综述、个案报告等栏目,以从事肿瘤防治的中高级临床和科研工作者、医药院校师生及相关学科科技人员为读者对象。双月刊,每双月底 20 日出版,国内外公开发行。

本刊主编为中国医学科学院院长、中国免疫学会理事长曹雪涛院士,编委会由包括 15 名院士和 9 名外籍专家的众多名家大师组成。本刊已被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、荷兰《医学文摘》(EMbase)等 10 个国际著名检索系统收录。本刊在国内肿瘤学领域的学术地位和影响力名列前茅,在国际学术界的显示度日益广泛和增强。

本刊使用网络远程投稿、审稿系统和编校管理系统进行编辑出版工作,工作效率高,编校质量好,论文发表周期短。另设“快速发表通道”,将有较高创新性的论文以 2~3 个月的速度快速发表。

热忱欢迎广大肿瘤防治工作者通过本刊网站投稿系统、电子信箱踊跃投稿。

《中国肿瘤生物治疗杂志》每册定价 15.00 元,全年定价 90.00 元。邮发代号: 4-576,请通过当地邮局订阅。若错过,可从本刊编辑部补订,请将 90.00 元(优惠免邮资)寄编辑部,并注明详细通讯地址及邮政编码,编辑部负责将每期杂志准时寄给您。

联系地址:上海市翔殷路 800 号;第二军医大学免疫楼《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部(邮编 200433)

联系人:韩丹 黄静怡

联系电话: 021-55620605 × 22, 021-81871002 × 22

传真: 021-81871007

网址: www.biother.org

电子邮箱: cjcb@biother.org