

加味生脉散对气虚型鼻咽癌大鼠的
放射增敏作用及相关机制

魏辉¹, 王启瑞¹, 刘英², 王志远¹, 蔡红兵¹, 孙学刚¹, 刁建新¹, 刘远亮¹, 范钦^{1*}
(1. 南方医科大学中医药学院, 广州 510315; 2. 南方医科大学南方医院, 广州 510315)

[摘要] 目的:探讨加味生脉散对气虚型鼻咽癌大鼠放疗增敏作用及相关机制。方法:SD 大鼠于玻璃水缸中游泳, 每天 10 min, 共 30 d。同时在大鼠腋部皮下注射二亚硝基哌嗪(DNP), 剂量为 0.5 mg/只/次, 每 3 d 注射 1 次, 共注射 30 次, 于 90 d 内完成, 构建鼻咽癌大鼠模型。实验分为对照组、药物组、放疗组、药物 + 放疗组, 通过测量肿瘤体积及计算抑瘤率, 观察药物加味生脉散的放疗增敏作用; 荧光定量 PCR 及 Western-blot 检测瘤组织多药耐药基因-1(MDR1) 基因的表达差异。结果:肿瘤质量, 对照组(1 230.0 ± 106.8)mg, 放疗组为(447.2 ± 121.9)mg, 与对照组比较, $P < 0.05$, 抑瘤率 53.25%; 药物加放疗组为(259.9 ± 64.7)mg, 与放疗组比较, $P < 0.05$, 抑瘤率 72.81%; 相对表达倍数, 药物组为 1.21, 放疗组为 1.85, 药物加放疗组为 1.34。结论:加味生脉散对鼻咽癌的放疗具有增敏作用, 其增敏机制可能与抑制 MDRI 基因的表达相关。

[关键词] 加味生脉散; 气虚; 鼻咽癌; 放射增敏; 多药耐药基因

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0233-04

Radiosensitization and Mechanisms of Jiawei Shengmai San
on Nasopharyngeal Carcinoma in Rat with Qi Deficient Status

WEI Hui¹, WANG Qi-rui¹, LIU Ying², WANG Zhi-yuan¹, CAI Hong-bing¹,
SUN Xue-gang¹, DIAO Jian-xin¹, LIU Yuan-liang¹, FAN Qin^{1*}
(1. Southern Medical University's College of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510315, China;
2. Southern Hospital of the Southern Medical University, Guangzhou 510315, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate radiosensitization and mechanism of Chinese medicine Jiawei Shengmai San on nasopharyngeal carcinoma. **Method:** The SD rats swimed in Glass tank for 10 minute in 30 days, at the same time, subcutaneous injection of dinitrosopiperazine (DNP) was performed, the dose was 0.5 mg every time, every 3 days the injection was carried out once for 90 days. Then, nasopharyngeal carcinoma models with Qi deficient status was produced. The samples were divided into control group, drug group, radiotherapy group, drug + radiotherapy group. The radiosensitization effect was measured by measuring tumor volume and weight, and multidrug resistance 1 gene (MDR1) expression was detected by quantitative PCR and western-blot. **Result:** In the control group tumor weight was (1 230.0 ± 106.8) mg, in the radiotherapy group being (447.2 ± 121.9) mg. Compared with the control group, the ratio of tumor inhibition was 53.25%, there was a significant difference ($P < 0.05$). In the drug + radiotherapy group tumor weight was (259.9 ± 64.7) mg, the ratio of tumor inhibition was 72.81%, there also was a significant difference ($P < 0.05$). The Relative expression ratio, in the drug group was 1.21, the radiotherapy group was 1.85, drug + radiotherapy group was 1.34. **Conclusion:** Jiawei Shengmai San can enhance the sensitivity of radiotherapy to the nasopharyngeal

[收稿日期] 20111206(008)
[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81173616); 广东省中医药管理局项目(20112167)
[第一作者] 魏辉, 副教授, 从事中药方剂的实验及临床研究, Tel: 020-61648257, E-mail: 1390462092@ qq. com
[通讯作者] * 范钦, 副研究员, 肿瘤学博士后, 从事中医学及肿瘤的分子生物学研究, Tel: 020-62789493, E-mail: fanqin2002@ yahoo. com. cn

carcinoma, and its mechanisms may be related to regulating MDR1 gene expression.

[**Key words**] Jiawei Shengmai San; Qi deficient; nasopharyngeal carcinoma; radiosensitization; multidrug resistace gene 1 (MDR1)

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma,NPC)因其特殊的病理类型、生物学行为和解剖结构,放疗仍是治疗的首选方案,但放疗之后的局部复发、远端转移是导致治疗失败的主要原因^[1-2],提高肿瘤对放射的敏感性因此成为提高疗效的重要手段。中药复方体现了传统中医药的精髓和主流,是中药新药研究的重要源泉,更是中药现代化研究的重要内容^[3]。一些中药复方如四物汤、补中益气汤也表现出良好的抗辐射损伤的作用^[4]。近年来临床发现,中晚期鼻咽癌患者在交替放化疗中使用生脉散,对放化疗所致的黏膜炎有较好的治疗效果^[5],表现出初步的抑制肿瘤、放疗增敏效果,但其机制未明。本研究构建气虚型鼻咽癌大鼠模型,进一步观察加味生脉散对鼻咽癌大鼠的放射增敏作用,拟从MDR1基因角度,探讨中药放射增敏可能的分子机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级0周龄雄性SD大鼠约50只、灭菌饲料(南方医科大学动物实验中心),动物许可证号SCXK(粤)2010-0015。

1.2 药品 加味生脉散由黄芪15g,连翘15g,人参10g,麦门冬5g,五味子5g组成,药材购自南方医科大学附属中西医结合医院,由南方医科大学中医药学院药用植物教研室陈兴兴副教授鉴定。二亚硝基嘧啶(DNP,Sigma公司,货号PH009834)。

1.3 试剂 RNA提取试剂(TaKaRa生物公司,批号b3805-1TRIzol reagent,Invitrogen公司),RT-PCR试剂盒及所用酶(TaKaRa生物公司,批号bka3604),Western-blot检测相关试剂及抗体(购自Abcam公司)。

1.4 仪器 MXP3005型荧光定量PCR仪(Stratagen公司)。

2 方法

2.1 气虚造模 参考杨明等^[6]的方法进行。力竭游泳从4周龄开始,SD大鼠每天在长×宽×高50cm×60cm×50cm的玻璃水缸中游泳10min,水温用加热器控制在30℃左右,共游泳30d。

2.2 DNP诱癌 按照唐发清等^[7]方法,DNP诱导癌变。采用大鼠腋部皮下注射DNP,剂量为0.5mg/只,每3d注射1次,共注射30次(90d内完成)。病理切片确认鼻咽癌成瘤成功。

2.3 药物提取 黄芪15g,连翘15g,人参10g,麦门冬5g,五味子5g,水煎2次,将2次药液混合后以水浴浓缩,使含生药1.5g·mL⁻¹,动物均按4mL·kg⁻¹ig。

2.4 动物分组及放射处理 造模成功的大鼠随机分为4组,每组5只:模型组(生理盐水)、单纯用药组、单纯放射治疗组、药物联合放射治疗组。单纯药物组给予12g·kg⁻¹,每12h给药1次,连用5次;单纯照射组进行单次局部2Gy射线照射;联合治疗组先按12g·kg⁻¹剂量提前给予加味生脉散ig,每12h给药1次,12g·kg⁻¹连用5d后,再同时给予6MV的X射线2Gy·d⁻¹的放疗,连续1周。放疗2周后,处死大鼠并测量瘤体积(体积V=LD×SD²×0.5,LD:肿瘤最大直径;SD:最小直径)、瘤质量,计算抑瘤率。

抑瘤率=(模型组平均瘤重-实验组平均瘤重)/模型组平均瘤重×100%

分组处理后,隔日用游标卡尺测量肿瘤的最大径(mm)。当各组肿瘤的最大径增长至2倍时为实验终止点。计算肿瘤的生长延缓时间(d)。计算绝对肿瘤生长延缓时间(absolute growth delay,AGD),AGD=TR-TC(TR为单纯照射组天数,TC为模型组天数);标准化肿瘤生长延缓时间(normalized growth delay,NGD)NGD=TL-TG(TL为联合治疗组天数,TG为单纯药物组天数);增敏系数(EF),EF=NGD/AGD,EF>1提示有放射增敏效应。

2.5 检测MDR1 mRNA的表达 取各实验组肿瘤,取50mg肿瘤组织,按TRIzol试剂盒说明书提取总RNA。反转录为cDNA,然后扩增MDR1基因,MDR1的引物上游:5'-TCATTCGAGTAGCG-GCTCTT-3';下游:5'-TCAAGATCCATTCCGACCTC-3',产物149bp。内参GAPDH的引物上游:5'-ATCATCAG-CAATGCCTCCTG-3';下游:5'-ATGGACTGTGATCATGAGTC-3',产物102bp。Stratagrne MX3005P荧光定量PCR仪检测Ct值,并计算表达差异。

2.6 Western-blot法检测MDR1蛋白表达 肿瘤组织50mg经液氮研磨后,加入100μL细胞裂解液(100mol·L⁻¹Tris-HCl,1mmol·L⁻¹EDTA,1%TritonX-100,1mmol·L⁻¹PMSF),13000r·min⁻¹,4

℃离心后取上清,采用BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。15%聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白,并转移至PVDF膜上。室温封闭1 h,一抗4℃孵育过夜,二抗室温孵育1 h。ECL试剂显色、曝光并拍照。扫描后用Quantity One图像分析软件进行灰度值分析,以MDR1/ACTB的灰度值比值作为MDR1蛋白的相对表达量。

2.7 统计学处理 用SPSS 13.0统计软件对数据进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和t检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 加味生脉散的增敏作用 药物加放疗组的增敏系数达1.74,表明加味生脉散有明确的放射增敏效应。见表1。

表1 各组大鼠肿瘤平均径倍增时间及生长延缓时间($\bar{x} \pm s$)				
组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	最大径倍增 时间/d	生长延缓 时间/d	增敏 系数
模型(生理盐水)	—	11.50 ± 0.34	—	
加味生脉散	12	11.86 ± 0.57	0.24	
放疗	2 Gy	14.41 ± 1.02	2.91	
加味生脉散 + 放疗	12 + 2 Gy	16.93 ± 0.58	5.43	1.74

3.2 加味生脉散联合放疗对肿瘤生长的影响 单纯照射组肿瘤生长受到一定程度的抑制,肿瘤生长延缓,瘤体积、瘤质量和模型组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);药物联合放疗组的肿瘤生长明显受到抑制,和模型组相比具有统计学差异($P < 0.01$);药物联合放疗组与模型组、单纯放疗组及单纯药物组相比,能明显延缓肿瘤的生长($P < 0.05$);计算每组大鼠的抑瘤率,结果发现,药物联合放疗组抑瘤率可高达72.81%,显著高于单纯放疗组(53.25%, $P < 0.01$,表2)。说明加味生脉散可明显增强放疗的抑瘤效果,单纯药物组的抑瘤效果不显著。

表2 加味生脉散联合放疗对大鼠肿瘤生长的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)				
分组	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	治疗后瘤体积/ mm^3	瘤质量/mg	抑瘤率/%
模型	—	411.5 ± 71.7	1230.0 ± 106.8	—
加味生脉散	12	386.1 ± 56.1	838.4 ± 201.8	32.00
放疗	2 Gy	213.4 ± 38.8 ²⁾	447.2 ± 121.9 ²⁾	53.25
加味生脉散 + 放疗	12 + 2 Gy	100.3 ± 20.2 ^{2,3)}	259.9 ± 64.7 ^{2,4)}	72.81

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与放疗组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

表3 加味生脉散联合放疗对肿瘤MDR1 mRNA相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)				
组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	MDR1/Ct	GAPDH/Ct	相对表达倍数
模型	—	27.13 ± 0.29	19.25 ± 0.22	1
加味生脉散	12	25.72 ± 0.23	18.12 ± 0.19	1.21
放疗(C)	2 Gy	25.67 ± 0.22	18.68 ± 0.21	1.85 ²⁾
加味生脉散 + 放疗	12 + 2 Gy	26.61 ± 0.18	19.15 ± 0.16	1.34 ¹⁾

注:与其他各组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。数据来自每组的均值,每次荧光定量实验均为3次重复。

3.3 检测MDR1 mRNA的表达 荧光定量PCR检测各组肿瘤的MDR1 mRNA表达,结果显示,放疗组MDR1表达明显增高,而药物联合放疗组MDR1表达显著下降(图1,表3)。

3.4 检测MDR1蛋白表达 Western-blot检测各组肿瘤的MDR1蛋白表达,结果显示,放疗组MDR1表达明显增高,而药物联合放疗组MDR1表达显著下降(图1)。

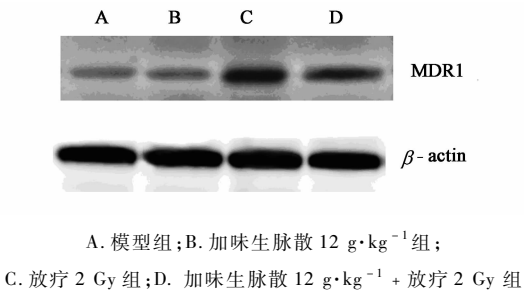


图1 各组肿瘤的MDR1蛋白表达

4 讨论

Druckrey认为,亚硝胺类化合物的致癌作用并不在局部,具有器官亲和性^[8]。陈主初等^[9]用环状亚硝胺包括二亚硝基哌嗪经背部皮下注射,诱发了高频率的大鼠鼻咽癌。杨明等^[6]在力竭游泳造模气虚体质状态基础上,采用DNP诱导鼻咽癌变,比单纯DNP诱癌,其鼻咽癌前病变例数显著增多,说明气虚状态能提高DNP的诱癌率,也证实了气虚状态是DNP诱癌的敏感体质状态。本研究采用同样的方法,成功地复制了DNP诱导的鼻咽癌气虚模型,进一步证实该模型的可靠性,并可用于鼻咽癌相关的实验研究。

从中医角度分析,放疗患者出现的口干、咽干、双眼红肿疼痛等症状,其病机为热壅毒盛,气阴两虚。以清热解毒、益气养阴是治疗鼻咽癌放疗反应

的重要治则。研究发现,清热解毒、益气养阴方药在减缓放疗患者症状的同时,初步表现出放射增敏、增强免疫功能的作用^[10]。

本研究在生脉散原方基础上,增加黄芪和连翘二味,以增强益气滋阴,清热解毒之功效,并针对放疗增敏特性做了初步的探索性研究。在药物剂量等的使用上,我们经过高、中、低等多组剂量的摸索^[11],最后确定了合理的使用浓度及处理时间等,为今后临床应用提供了可靠的实验数据。我们发现,加味生脉散单独使用,对大鼠鼻咽癌的抑制作用并不明显,而与放疗联合处理时,对肿瘤的抑制作用非常显著。有意思的是,以清热益气原则为主组成方,或以加味生脉散中药物组成的其他中药配方也表现出良好的抗肿瘤效果。临床发现,贞芪扶正分散片对肿瘤放疗有着明显的增效和减毒作用^[12]。对荷 S180 小鼠肿瘤细胞凋亡的影响,发现参芪扶正注射液单独应用可以通过促进肿瘤细胞的凋亡而发挥抑制肿瘤的作用^[13]。热毒净(主要成分为黄芪)功能清热解毒、益气养血,实验发现对鼻咽癌细胞株 CNE2 有明显抑制作用,且浓度越高,热毒净对肿瘤生长的影响越明显^[14]。

MDR1(multidrug resistance gene1)编码 P-糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp),P-gp 的过度表达是目前发现的最重要的一种多药耐药机制,多数肿瘤 MDR 的发生与 P-gp 的异常表达有关。P-gp 可稳定肿瘤细胞线粒体膜电位和线粒体膜通透性,抑制 X 射线的凋亡效应,从而呈递放射抵抗表型,阻断 P-gp 表达可有效逆转放射抵抗性^[15]。卜俊国等^[16]证实鼻咽癌 CNE1 细胞射线照射前 MDR1 基因不表达,照射后较长时间内基因明显表达,提示临床对于中晚期鼻咽癌的治疗应考虑先化疗再放疗,即诱导化疗的治疗方案,避免放疗后诱导的耐药出现。本研究的结果提示,在放射治疗前,MDR1 只有低水平的表达,而放疗后,MDR1 表达明显增强,可能是由于射线诱导了肿瘤的抵抗作用^[17],而放疗联合用药组,MDR1 表达水平明显下降,呈恢复正常的趋势,提示加味生脉散的增敏作用可能是通过抑制 MDR1 的表达而实现。

中医药在恶性肿瘤的预防及辅助治疗方面的功效日益凸显,本研究证实了加味生脉散对鼻咽癌放疗的增敏作用,同时也初步探讨了增敏的分子机制,为该复方的临床应用打下了良好的基础。

[参考文献]

[1] Bao H, Gao J, Huang T, et al. Relationship between

traditional Chinese medicine syndrome differentiation and imaging characterization to the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma[J]. Chin J Cancer,2010,29(11):937.

[2] Lu H, Chen J, Huang B, et al. Feasibility and efficacy study of weekly cisplatin with concurrent intensity-modulated radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma: preliminary results[J]. Oral Oncol,2010,46(10):743.

[3] 范颖. 中药复方现代化研究的现状与基本思路[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(6):53.

[4] 沈世林,张汝学,贾正平. 具有抗辐射损伤作用的中药复方研究进展概述[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(11):64.

[5] 李涛,郎锦义,文浩,等. 生脉注射液治疗鼻咽癌放射性粘膜炎 68 例的临床观察[J]. 华西医科大学学报,1996,27(增刊):69.

[6] 杨明,陈学东,田道法. 黄芪、黄连复方有效成分对二亚硝基嘧啶诱导气虚状态大鼠鼻咽上皮组织癌前病变的影响[J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志,2008,16(4):245.

[7] 唐发清,李建玲,荆照政,等. 鼻咽癌变过程中基因表达的 cDNA 阵列研究[J]. 湖南医科大学学报,2002,27(5):397.

[8] 潘世晟. 肿瘤[M]. 北京:人民卫生出版社,1984:108.

[9] 陈主初,孙去病. 关于亚硝胺类化合物特 1,4 二亚硝基嘧啶器官亲和性的研究进展概况[J]. 医学研究通讯,1989,18(7):1.

[10] 陈俊杰,祝希媛. 放射性损伤的中医证候学研究[J]. 北京中医药大学学报,1999,22(5):23.

[11] 肖华平,周蓉蓉,廖遇平. E1A 抑制鼻咽癌细胞裸鼠移植瘤的生长并增强其对放疗的敏感性[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2009,16(6):614.

[12] 田茸,景明,王小荣,等. 贞芪扶正分散片对肿瘤放疗的增效和减毒作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(10):158.

[13] 丁治国,史晓光,李兰芳,等. 参芪扶正注射液对荷 S180 小鼠肿瘤细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(10):37.

[14] 詹少兵,周玲,叶树清,等. 热毒净对鼻咽癌细胞株 CNE2 抑制作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(3):41.

[15] 周小军,田道法. 鼻咽癌高危人群体质调查研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2003,9(8):52.

[16] 卜俊国,袁亚维,陈俊. X 射线照射后鼻咽癌细胞多药耐药基因的表达[J]. 第一军医大学学报,2004,24(6):646.

[17] Zubova S G, Danilov A O, Myshkov A I, et al. The MDR gene and cellular sensitivity to various effects[J]. Vopr Onkol,2000,46(2):199.

[责任编辑 聂淑琴]