

毛钩藤碱联合奥沙利铂 对胃癌 HGC-27 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究

万如意^{1,2},周波²,陈博²(¹ 安徽医科大学第一临床医学院,合肥 230022; ² 安徽医科大学第一附属医院普外科,合肥 230022)

摘要 目的 探讨毛钩藤碱(hirsutine)联合奥沙利铂(oxaliplatin)对胃癌 HGC-27 荷瘤小鼠抗肿瘤作用的影响。方法 构建胃癌 HGC-27 荷瘤小鼠模型,将建模成功的荷瘤小鼠随机分为正常对照组(normal)、模型组(model)、oxaliplatin 组(10 mg/kg)、hirsutine 组(10 mg/kg)和联合组(combination)(hirsutine 10 mg/kg + oxaliplatin 10 mg/kg),连续干预 2 周。记录各组小鼠肿瘤生长情况,计算抑瘤率、胸腺指数和脾脏指数;流式细胞术检测外周血中 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞亚群比例,并计算 CD4⁺/CD8⁺ 比值;ELISA 检测血清中白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平;HE 染色观察肿瘤组织病理学变化;Western blot 法检测肿瘤组织中活化胱天蛋白酶 3(cleaved Caspase-3)、Bcl-2 关联 X 蛋白(Bax)和 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)以及肿瘤增殖抗原 Ki67、增殖细胞核抗原 PCNA 蛋白表达水平。结果 与 normal 组比较,model 组小鼠脾脏指数、胸腺指数以及外周血 CD4⁺T 细胞比例和 CD4⁺/CD8⁺ 比值均降低($P < 0.05$),而外周血 CD8⁺T 细胞比例、血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量增加($P < 0.05$);与 model 组比较,oxaliplatin 组、hirsutine 组、combination 组 3 组小鼠肿瘤生长均较为缓慢,肿瘤组织细胞体积减小,异型性较小,细胞核固缩减少,同时抑瘤率、脾脏指数、胸腺指数以及外周血 CD4⁺T 细胞比例和 CD4⁺/CD8⁺ 比值均增加($P < 0.05$),外周血 CD8⁺T 细胞比例、血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量均减少($P < 0.05$),肿瘤组织中 Bcl-2、Ki67、PCNA 蛋白表达水平均降低,cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平均升高($P < 0.05$),其中以毛钩藤碱与奥沙利铂联合使用的 combination 组干预效果最为明显。结论 毛钩藤碱可抑制胃癌荷瘤小鼠肿瘤细胞的增殖,促进其凋亡,且与奥沙利铂联合使用效果更为显著。

关键词 毛钩藤碱;奥沙利铂;HGC-27;抗肿瘤;胃癌;凋亡

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)12-2150-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.012

胃癌起源于胃黏膜上皮细胞病理组织学改变,因其早期症状不明显,且与胃炎、胃溃疡等慢性胃病症状相似,因此常被忽略。随着肿瘤持续增长,癌组织浸润超越黏膜下层,则需采取化疗、放疗和手术等治疗手段^[1]。奥沙利铂(oxaliplatin)是临床上治疗肿瘤的基础化疗药物,有显著的抗肿瘤效应,但其毒副反应大,在杀伤癌细胞的同时还会产生如恶心呕吐、血小板减少、神经病变等不良反应,影响患者预后^[2-3]。近年来研究^[4]证明,中医药联合化疗能通过抗炎、抗氧化应激、调节免疫等途径,在抗癌方面发挥增效减毒的良好疗效。毛钩藤碱(hirsutine)是从我国传统中药钩藤中分离得到的一种有效生物碱,具有抗炎、抗病毒和免疫应激等药理作用^[5]。

相关研究^[6-7]结果表明,毛钩藤碱可抑制结直肠等消化道癌细胞的增殖、迁移和侵袭,促进其凋亡,提示毛钩藤碱具有抗肿瘤作用,但对胃癌是否表现出抗癌作用目前尚不明确。该研究拟通过观察毛钩藤碱联合奥沙利铂对胃癌 HGC-27 荷瘤小鼠免疫功能及移植瘤生长的影响,探讨其抗癌作用及机制,为进一步的肿瘤临床治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及动物 人胃癌细胞株 HGC-27 购自中国科学院细胞库。50 只 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠,5 周龄,体质量 18~20 g,购自海南省疾病预防控制中心,许可证号为 SYXK(琼)2020-0012。所有动物均饲养于恒温恒湿(室温 22~24℃,湿度 50%~70%)的屏障系统中。本研究经安徽医科大学第一附属医院医学伦理委员会批准(伦理学批号:2023-2-24)。

1.1.2 药物和试剂 毛钩藤碱(纯度 $\geq 98\%$,货

2024-09-06 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:2208085MH240)

作者简介:万如意,主治医师,硕士;

周波,副主任医师,博士,通信作者,E-mail: wry8407@163.com

号:A1067)购自成都曼思特生物科技有限公司;奥沙利铂(纯度 $\geq 99\%$,货号:O124003)购自上海阿拉丁生物公司。白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α ELISA试剂盒(货号:H002、H007、H052)购自南京建成生物工程研究所;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、APC-CD3e 抗体、PE-CD4 抗体、PE-CD8a 抗体(货号:C0105、AG1386、AG1397、AG1414)购自上海碧云天生物公司;凋亡相关蛋白活化胱天蛋白酶3(cleaved Caspase-3)、Bcl-2 关联 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)以及肿瘤增殖抗原 Ki67、增殖细胞核抗原 PCNA、GAPDH 和 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(货号:25128、50599、CL488-60178、CL647-28074、CL594-10205、10494-1-AP、SA00001)均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器 BX53M 型光学显微镜购自日本 OLYMPUS 公司;FACS Calibur 型流式细胞仪购自美国 BD 公司;ELX800UV 型酶标仪购自美国 Bio-TEK 公司;GelDoc Go 型凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 胃癌荷瘤小鼠造模 取对数生长期 HGC-27 细胞,胰酶消化制备单细胞悬液,调整细胞密度为 1.0×10^7 个/ml,随机选取 40 只小鼠,于小鼠右前肢腋窝皮下接种 HGC-27 细胞(接种体积 0.2 ml)构建胃癌荷瘤小鼠模型。若接种 1 周左右小鼠右侧腋下出现直径约 5 mm 的结节即判为造模成功。

1.2.2 动物分组与给药 将造模成功且肿瘤体积无差异的荷瘤小鼠随机分为模型组(model)、奥沙利铂组(oxaliplatin)、毛钩藤碱组(hirsutine)和联合组(combination,毛钩藤碱联合奥沙利铂干预),另选未接种 HGC-27 细胞的 BALB/c 小鼠作为正常对照组(normal),每组 10 只。皮下接种 1 周后开始腹腔注射给药,oxaliplatin 组、hirsutine 组和 combination 组小鼠分别注射 10 mg/kg 奥沙利铂^[8]和 10 mg/kg 毛钩藤碱^[9],normal 组和 model 组注射等量生理盐水,每日 1 次,连续 2 周。

1.2.3 绘制肿瘤生长曲线及计算抑瘤率 从开始给药干预第 1 天起,每 3 d 用游标卡尺测量肿瘤组织的最长径(a)和最短径(b),计算肿瘤体积并绘制肿瘤生长曲线,肿瘤体积(V) = $ab^2/2$ 。末次给药后次日处死小鼠,解剖取肿瘤组织称重计算抑瘤率,抑瘤率(%) = (荷瘤模型组瘤重 - 给药组瘤重)/荷瘤

模型组瘤重 $\times 100\%$ 。

1.2.4 计算胸腺/脾脏指数 末次给药后次日处死小鼠,解剖取出胸腺和脾脏,用滤纸吸干后称重,计算胸腺和脾脏指数。胸腺/脾脏指数 = 胸腺质量(mg)/脾脏质量(mg)除以小鼠体质量(g)。

1.2.5 流式细胞术检测外周血 T 淋巴细胞亚群 末次给药后次日摘眼球取血,加入肝素钠抗凝,并加入适量红细胞裂解液,混匀后静置 20 min 弃去上清液,PBS 冲洗 3 次后重悬白细胞,加入 APC-CD3e、PE-CD4 和 PE-CD8a 抗体进行标记,避光孵育 20 min 后于流式细胞仪上进行检测。检测完成后收集数据,使用 Cellquest 软件分析 CD4⁺T 细胞(CD3e⁺CD4⁺)、CD8⁺T 细胞(CD3e⁺CD8⁺)亚群比例,并计算 CD4⁺/CD8⁺ 比值。

1.2.6 ELISA 法检测血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平 摘眼球取血后以 5 000 r/min 离心 15 min 分离血清,按照试剂盒说明书进行操作,采用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔吸光度值(A 值),根据标准曲线计算血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量。

1.2.7 HE 染色观察移植瘤病理学变化 取肿瘤组织放在 4% 多聚甲醛中固定 24 h,经脱水、透明、浸蜡、包埋,制备 4 μ m 石蜡切片,将组织切片脱蜡至水,依次入苏木精染液和伊红染液中染色,自来水洗净多余染液,再次脱水后树脂封片。于显微镜下观察肿瘤组织病理学改变。

1.2.8 Western blot 检测移植瘤组织中凋亡相关蛋白 cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2 及增殖相关蛋白 Ki67、PCNA 蛋白表达水平 取肿瘤组织置于匀浆器中,加入适量裂解液,于冰上充分研磨、匀浆、裂解,所得匀浆液在 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液保存待用。采用 BCA 法测定上清液中的蛋白浓度,向 SDS-PAGE 通道中加入等体积蛋白质,并将蛋白质转移到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, PBS 洗涤 3 次,加入一抗(cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2、Ki67、PCNA 和 GAPDH, 1 : 1 000)孵育过夜,再用 TBST 漂洗 40 min,加入 HRP 标记二抗(1 : 5 000)继续孵育 1 h,根据 ECL 试剂盒说明书对蛋白条带进行显影、定影,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行灰度分析,以 GAPDH 为内参计算各蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 25.0 统计软件进行统计学分析,符合正态分布的数据以均数 $\pm$ 标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 Tukey 事后检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意

义。

2 结果

2.1 毛钩藤碱联合奥沙利铂对荷瘤小鼠肿瘤生长的影响 如图 1 所示,给药后第 15 天,与 model 组比较,oxaliplatin 组、hirsutine 组、combination 组小鼠肿瘤体积减小($F = 304.156, P_{\text{Tukey}} < 0.05$ 或 $P_{\text{Tukey}} < 0.001$)。如表 1 所示,与 model 组比较,oxaliplatin 组、hirsutine 组、combination 组小鼠肿瘤质量降低,抑瘤率升高(均 $P_{\text{Tukey}} < 0.001$);与 oxaliplatin 组或 hirsutine 组比较,combination 组小鼠肿瘤质量降低,抑瘤率升高($P_{\text{Tukey}} < 0.01$ 或 $P_{\text{Tukey}} < 0.001$)。

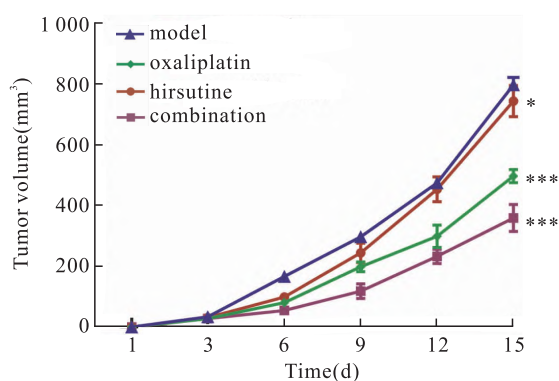


图 1 各组荷瘤小鼠肿瘤生长曲线

Fig. 1 Tumor growth curves of tumor-bearing mice in each group

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs model group.

表 1 各组荷瘤小鼠的瘤重和抑瘤率比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of tumor weight and tumor inhibition rate of tumor-bearing mice in each group ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Group	Weight of tumor (g)	Tumor inhibition rate (%)
model	2.66 ± 0.30	0.00 ± 0.11
oxaliplatin	$1.33 \pm 0.17^{***}$	$0.50 \pm 0.06^{***}$
hirsutine	$2.07 \pm 0.21^{***}$	$0.22 \pm 0.08^{***}$
combination	$1.02 \pm 0.09^{***\#\Delta\Delta\Delta}$	$0.62 \pm 0.04^{***\#\Delta\Delta\Delta}$
F value	128.321	127.661
P value	<0.001	<0.001

*** $P < 0.001$ vs model group; # $P < 0.01$ vs oxaliplatin group;

$\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs hirsutine group.

2.2 毛钩藤碱联合奥沙利铂对荷瘤小鼠胸腺/脾脏指数的影响 如表 2 所示,与 normal 组比较,model 组小鼠脾脏指数和胸腺指数均下降(均 $P_{\text{Tukey}} < 0.001$);与 model 组比较,oxaliplatin 组和 combination 组小鼠脾脏指数上升,hirsutine 组和 combination 组小鼠胸腺指数上升($P_{\text{Tukey}} < 0.01$ 或 $P_{\text{Tukey}} < 0.001$);与 oxaliplatin 组比较,combination 组小鼠胸腺指数上升($P_{\text{Tukey}} < 0.001$);与 hirsutine 组比较,

combination 组小鼠脾脏指数和胸腺指数均上升($P_{\text{Tukey}} < 0.05$ 或 $P_{\text{Tukey}} < 0.01$)。

表 2 各组小鼠脾脏和胸腺指数比较 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of spleen and thymus indexes in each group ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Group	Spleen index (mg/g)	Thymus index (mg/g)
normal	7.78 ± 0.70	3.47 ± 0.22
model	$4.71 \pm 0.62^{***}$	$2.44 \pm 0.17^{***}$
oxaliplatin	$6.07 \pm 0.47^{\#}$	2.85 ± 0.23
hirsutine	5.69 ± 0.46	$3.11 \pm 0.20^{\#}$
combination	$6.88 \pm 0.59^{\#\#\star}$	$3.69 \pm 0.26^{\#\#\Delta\Delta\Delta\star}$
F value	20.715	25.441
P value	<0.001	<0.001

*** $P < 0.001$ vs normal group; # $P < 0.01$, # $P < 0.001$ vs model group; $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs oxaliplatin group; $\star P < 0.05$, $\star\star P < 0.01$ vs hirsutine group.

2.3 毛钩藤碱联合奥沙利铂对荷瘤小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群分布的影响 如表 3 所示,与 normal 组比较,model 组小鼠外周血 $CD4^+$ 和 $CD4^+/CD8^+$ 比例降低, $CD8^+$ 增加(均 $P_{\text{Tukey}} < 0.001$);与 model 组比较,oxaliplatin 组和 combination 组小鼠外周血 $CD4^+$ 和 $CD4^+/CD8^+$ 比例增加, $CD8^+$ 降低($P_{\text{Tukey}} < 0.01$ 或 $P_{\text{Tukey}} < 0.001$),hirsutine 组小鼠外周血 $CD8^+$ 降低($P_{\text{Tukey}} < 0.01$);与 oxaliplatin 组比较,combination 组小鼠外周血 $CD8^+$ 降低($P_{\text{Tukey}} < 0.05$);与 hirsutine 组比较,combination 组小鼠外周血 $CD4^+$ 和 $CD4^+/CD8^+$ 比例增加, $CD8^+$ 降低($P_{\text{Tukey}} < 0.01$ 或 $P_{\text{Tukey}} < 0.001$)。

2.4 毛钩藤碱联合奥沙利铂对荷瘤小鼠血清炎症因子水平的影响 如表 4 所示,与 normal 组比较,model 组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量增加(均 $P_{\text{Tukey}} < 0.001$);与 model 组比较,oxaliplatin 组、hirsutine 组、combination 组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量降低(均 $P_{\text{Tukey}} < 0.001$);与 oxaliplatin 组或 hirsutine 组比较,combination 组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量降低(均 $P_{\text{Tukey}} < 0.001$)。

2.5 毛钩藤碱联合奥沙利铂对荷瘤小鼠肿瘤组织病理形态的影响 如图 2 所示,model 组肿瘤细胞密集,生长旺盛,细胞形态各异大小不一,细胞核浆比例大,染色较深;oxaliplatin 组、hirsutine 组、combination 组肿瘤细胞体积减小,异型性较小,细胞核固缩、核分裂减少,其中 combination 组改变最为明显。

2.6 毛钩藤碱联合奥沙利铂对荷瘤小鼠肿瘤组织中凋亡相关蛋白及增殖相关蛋白表达水平的影响

表3 各组小鼠外周血 CD4⁺ 和 CD8⁺ 比例比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)Tab. 3 Comparison of CD4⁺ and CD8⁺ in peripheral blood of mice in each group ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Group	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ (%)
normal	45.57 ± 5.01	25.22 ± 1.88	1.83 ± 0.20
model	26.00 ± 3.77 ***	39.05 ± 2.03 ***	0.68 ± 0.26 ***
oxaliplatin	36.86 ± 2.17 ###	30.48 ± 1.13 ###	1.23 ± 0.17 ##
hirsutine	30.91 ± 2.00	34.34 ± 1.02 ##	0.91 ± 0.19
combination	40.59 ± 2.64 ***	27.59 ± 1.08 #△***	1.52 ± 0.28 ***
<i>F</i> value	27.203	67.940	20.890
<i>P</i> value	<0.001	<0.001	<0.001

*** $P < 0.001$ vs normal group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs model group; △ $P < 0.05$ vs oxaliplatin group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs hirsutine group.

表4 各组小鼠血清中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)Tab. 4 Comparison of the levels of serum IL-1β, IL-6 and TNF-α in each group ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Group	IL-1β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)
normal	13.22 ± 2.03	26.28 ± 2.77	58.34 ± 2.08
model	89.00 ± 4.42 ***	130.04 ± 5.95 ***	149.03 ± 6.07 ***
oxaliplatin	50.68 ± 3.01 ###	74.43 ± 4.01 ###	97.49 ± 3.37 ###
hirsutine	73.87 ± 3.33 ###	110.23 ± 5.05 ###	118.36 ± 6.88 ###
combination	37.99 ± 2.80 ###△△***	55.90 ± 3.05 ###△△***	79.40 ± 2.00 ###△△***
<i>F</i> value	429.733	460.281	295.142
<i>P</i> value	<0.001	<0.001	<0.001

*** $P < 0.001$ vs normal group; ### $P < 0.001$ vs model group; △△△ $P < 0.001$ vs oxaliplatin group; *** $P < 0.001$ vs hirsutine group.

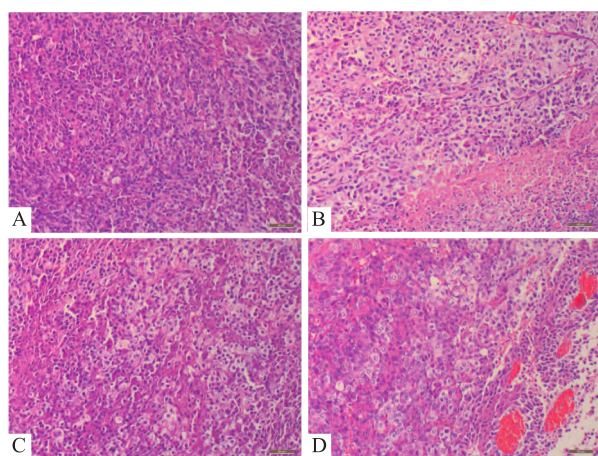


图2 各组荷瘤小鼠肿瘤组织病理学 HE 染色图 HE × 200

Fig. 2 Pathological HE staining of tumor tissues of tumor-bearing mice in each group HE × 200

a: model group; b: oxaliplatin group; c: hirsutine group; d: combination group.

如图3所示,model组肿瘤组织中抗凋亡蛋白 Bcl-2 和增殖蛋白 Ki67、PCNA 蛋白高表达,而凋亡蛋白 cleaved Caspase-3 和 Bax 低表达;与 model 组比较,oxaliplatin 组、hirsutine 组、combination 组小鼠肿瘤组织中 Bcl-2、Ki67、PCNA 蛋白表达水平降低,Bax 蛋白表达水平升高(均 $P_{\text{Tukey}} < 0.001$),oxaliplatin 组和

combination 组小鼠肿瘤组织中 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平升高(均 $P_{\text{Tukey}} < 0.001$);与 oxaliplatin 组或 hirsutine 组比较,combination 组小鼠肿瘤组织中 Bcl-2、Ki67、PCNA 蛋白表达水平进一步降低(均 $P_{\text{Tukey}} < 0.05$),而 cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平进一步升高(均 $P_{\text{Tukey}} < 0.001$)。

3 讨论

近些年来研究^[10]显示,中药在治疗各类肿瘤疾病方面具有显著疗效,可通过调节机体免疫功能缓解放化疗过程中产生的免疫抑制等副作用,达到提高患者生活质量、缓解病痛、延长生存期限、稳定肿瘤病灶的目的。奥沙利铂是目前应用最广的胃癌、结肠癌等消化道癌症的一线化疗药物,但其在发挥抗肿瘤疗效的同时也伴有一定的副作用。在基础研究^[11-12]中,毛钩藤碱表现出显著的抗癌潜力,但尚未在临床中证实,同时其在胃部肿瘤中作用如何也尚未明确。为探讨毛钩藤碱联合奥沙利铂对胃癌的协同抑制作用和对免疫器官的保护作用,本实验以胃癌 HGC-27 荷瘤小鼠为模型,记录各组小鼠移植瘤体积和瘤重,计算抑瘤率,结果显示,毛钩藤碱能有效抑制胃癌荷瘤小鼠移植瘤生长,且与奥沙利铂联合使用表现出最佳的抑瘤作用,体现了较好的

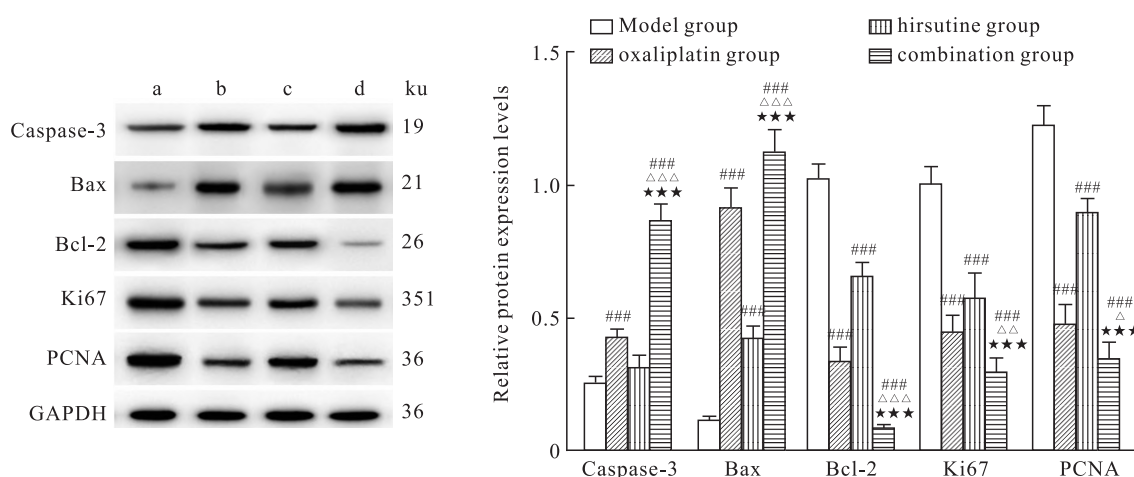


图3 各组荷瘤小鼠肿瘤组织中 cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2、Ki67 和 PCNA 蛋白表达水平比较

Fig. 3 Comparison of the protein expression levels of cleaved Caspase-3, Bax, Bcl-2, Ki67 and PCNA in tumor tissues of tumor-bearing mice in each group

a: model group; b: oxaliplatin group; c: hirsutine group; d: combination group; ### $P < 0.001$ vs model group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs oxaliplatin group; *** $P < 0.001$ vs hirsutine group.

协同作用。

肿瘤的发生和发展与机体免疫功能的下降密切相关,而机体免疫功能的下降常伴随着免疫器官的萎缩和功能退化^[13]。胸腺和脾脏是机体的主要免疫器官,脾脏和胸腺指数在一定程度上反映了机体免疫功能的强弱。有研究表明^[14],提高荷瘤小鼠的胸腺和脾脏等免疫器官指数,可增强机体的免疫力,达到抑制肿瘤生长的作用。肿瘤在发生发展的过程中常出现以 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞等 T 淋巴细胞亚群改变为标志的细胞免疫异常,这两种作用迥异的 T 淋巴细胞能以相互拮抗的作用保持免疫功能的平衡^[15]。本研究结果显示,model 组小鼠脾脏指数和胸腺指数以及外周血 $CD4^+/CD8^+$ 比值降低,与 Ayeka et al^[16] 研究一致,而给予药物干预后,小鼠的脾脏指数、胸腺指数、外周血 $CD4^+/CD8^+$ 比值均得到明显提升,其中 combination 组的作用最为明显。说明肿瘤可引发机体免疫器官的萎缩和免疫功能的下降,而毛钩藤碱与奥沙利铂联合使用能够更好地通过增加各类 T 细胞水平从而增强机体免疫功能。

肿瘤免疫分为免疫清除、免疫平衡和免疫逃逸三个阶段。在免疫清除期,免疫系统可通过炎症反应和免疫应答作用使肿瘤细胞发生坏死和生长抑制;而在免疫平衡期,肿瘤细胞获得新的免疫特性,诱导 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等炎性因子过度产生,在肿瘤细胞周围形成免疫抑制的微环境^[17]。本研究

结果显示,模型组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平较对照组明显增加,而 3 个给药组均能明显逆转这种变化,且 combination 组的效果最为显著。有研究^[18]表明,毛钩藤碱可通过调低 Bcl-2/Bax 蛋白比值,活化 Caspase-9 和 Caspase-3 诱导乳腺癌细胞凋亡;同时也有研究报道^[7],毛钩藤碱能抑制结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭,促进其凋亡。本研究结果显示,药物干预后,移植瘤组织中 Ki67、PCNA、Bcl-2 蛋白表达水平明显下调,cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平明显上调,且以 combination 组变化最为显著。说明毛钩藤碱能通过调控凋亡相关蛋白表达水平,促进胃癌细胞凋亡,抑制胃癌荷瘤小鼠移植瘤生长,且与奥沙利铂联合使用能更好地发挥抗肿瘤作用。

综上所述,毛钩藤碱与奥沙利铂联合使用能有效降低荷瘤小鼠血清炎症因子水平,减轻脾脏和胸腺的损伤程度,增强机体免疫功能,促进移植瘤组织细胞凋亡,从而抑制胃癌荷瘤小鼠移植瘤生长。二者联合使用的最终目的是为了减轻化疗药物毒副作用,但联合使用过程中奥沙利铂剂量下调是否影响治疗结果,目前尚不明确,后续还将继续探索两种药物联合使用时的更小有效剂量及毒副作用。以期为胃癌的临床治疗提供更多安全有效的方案。

参考文献

[1] 史玉雪,赵卫刚,钟少东,等. 126 例青年胃癌临床特点及预

- 后分析[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(5):867-71. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.028.
- [1] Shi Y X, Zhao W G, Zhong S D, et al. Clinical features and prognosis of 126 young gastric cancer patients[J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58(5):867-71. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.028.
- [2] Rassy E, Le Roy F, Smolenschi C, et al. Rechallenge after oxaliplatin-induced hypersensitivity reactions[J]. JAMA Oncol, 2023, 9(3):434-5. doi:10.1001/jamaoncol.2022.7136.
- [3] Yang Y, Zhao B, Gao X, et al. Targeting strategies for oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: clinical syndrome, molecular basis, and drug development[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1):331. doi: 10.1186/s13046-021-02141-z.
- [4] 《胃癌中西医结合诊疗指南》标准化项目组. 胃癌中西医结合诊疗指南(2023年)[J]. 中国中西医结合杂志, 2024, 44(3):261-72. doi:10.7661/j.cjim.20240131.008.
- [4] “Guideline for the Diagnosis and Treatment of Gastric Cancer with Integrated Traditional Chinese and Western Medicine” standardization project group. Guideline for the diagnosis and treatment of gastric cancer with integrated traditional Chinese and western medicine (2023) [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2024, 44(3):261-72. doi:10.7661/j.cjim.20240131.008.
- [5] 崔莹. 钩藤化学成分和药理活性研究进展[J]. 西安文理学院学报(自然科学版), 2015, 18(4):16-8.
- [5] Cui Y. Advances in study on chemical compositions and pharmacological activities of *Uncaria rhynchophylla* [J]. J Xi'an Univ Arts Sci Nat Sci Ed, 2015, 18(4):16-8.
- [6] 王晨宇, 李兴旺, 张军杰, 等. 毛钩藤碱调控 Shh 信号通路对结直肠癌荷瘤鼠的抑瘤作用及 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(20):2473-8. doi: 10.3969/j.issn.1000-484X.2022.20.008.
- [6] Wang C Y, Li X W, Zhang J J, et al. Anti-tumor effect of hirsutine regulated Shh signaling pathway on colorectal cancer-bearing mice and effect of CD4⁺ and CD8⁺ T cells[J]. Chin J Immunol, 2022, 38(20):2473-8. doi: 10.3969/j.issn.1000-484X.2022.20.008.
- [7] 韩晓丽, 席作武, 王凯, 等. 毛钩藤碱调控 IL-6/STAT3 信号通路抑制结肠癌细胞增殖、迁移及诱导细胞凋亡的体外实验[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(18):3955-9. doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2020.18.046.
- [7] Han X L, Xi Z W, Wang K, et al. *In vitro* experiment of hirsutine regulating IL-6/STAT3 signaling pathway to inhibit proliferation, migration and induce apoptosis of colon cancer cells [J]. Chin J Gerontol, 2020, 40(18):3955-9. doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2020.18.046.
- [8] 黄勇, 张晗, 龚红霞, 等. 基于 PI3K/Akt/caspase-9 信号通路研究归芪白术方联合奥沙利铂对胃癌荷瘤小鼠胃癌细胞凋亡的影响[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(9):1781-6. doi:10.12360/CPB202207050.
- [8] Huang Y, Zhang H, Gong H X, et al. Effect of Guiqi Baizhu recipe combined with oxaliplatin on apoptosis in tumor-bearing rats based on PI3K/Akt/caspase-9 signaling pathway[J]. Chin Pharmacol Bull, 2023, 39(9):1781-6. doi: 10.12360/CPB202207050.
- [9] Zhang R, Li G, Zhang Q, et al. Hirsutine induces mPTP-dependent apoptosis through ROCK1/PTEN/PI3K/GSK3 β pathway in human lung cancer cells[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(6):598. doi: 10.1038/s41419-018-0641-7.
- [10] 王荟荟, 李惠, 张延英, 等. 中医药辅助癌症免疫治疗的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(3):130-5. doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.03.017.
- [10] Wang H H, Li H, Zhang Y Y, et al. Research progress of Traditional Chinese Medicine adjuvant immunotherapy for cancer[J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(3):130-5. doi:10.3969/j.issn.1671-7856.2023.03.017.
- [11] 李亚威, 谢磊, 王娜. 毛钩藤碱对人宫颈癌 Ca Ski 细胞增殖、凋亡、转移及侵袭的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(4):109-15. doi: 10.13422/j.cnki.syfx.20220323.
- [11] Li Y W, Xie L, Wang N. Effect of hirsutine on proliferation, apoptosis, metastasis, and invasion of human cervical cancer Ca Ski cells[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(4):109-15. doi: 10.13422/j.cnki.syfx.20220323.
- [12] Meng J, Su R, Wang L, et al. Inhibitory effect and mechanism of action (MOA) of hirsutine on the proliferation of T-cell leukemia Jurkat clone E6-1 cells[J]. PeerJ, 2021, 9:e10692. doi:10.7717/peerj.10692.
- [13] 陈红梅, 冯强, 黎娟, 等. 姜黄素对宫颈癌大鼠肿瘤细胞凋亡、免疫功能的影响及作用机制[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(13):3271-4. doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2023.13.051.
- [13] Chen H M, Feng Q, Li J, et al. Effects of curcumin on apoptosis of tumor cells and immune function in rats with cervical cancer and its mechanism[J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(13):3271-4. doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2023.13.051.
- [14] 刘晶, 朱莹清, 张泽峰, 等. 不同配比黄芪、守宫与蜈蚣药组对 H22 肝癌小鼠抑瘤效果及免疫器官的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(1):195-9,227. doi:10.13192/j.issn.1000-1719.2023.01.051.
- [14] Liu J, Zhu W Q, Zhang Z F, et al. Effects of different proportions of formula with huangqi (astragal radix), wugong (centipede) and shougong (gecko) on tumor inhibition and immune organs of H22 hepatoma mice[J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2023, 50(1):195-9,227. doi:10.13192/j.issn.1000-1719.2023.01.051.
- [15] Wu L, Yang F R, Xing M L, et al. Multi-material basis and multi-mechanisms of the Dahuang Zhechong pill for regulating Treg/Th1 balance in hepatocellular carcinoma[J]. Phytomedicine, 2022, 100:154055. doi: 10.1016/j.phymed.2022.154055.
- [16] Ayeka P A, Bian Y, Githaiga P M, et al. The immunomodulatory activities of licorice polysaccharides (Glycyrrhiza uralensis Fisch.) in CT 26 tumor-bearing mice[J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1):536. doi:10.1186/s12906-017-2030-7.

- [17] 夏睿雪, 雷绘敏, 周斌兵, 等. 肿瘤免疫代谢靶向治疗的研究进展[J]. 现代免疫学, 2023, 43(5):417-22.
- [17] Xia R X, Lei H M, Zhou B B, et al. Research progress of tumor immuno-metabolism-targeted therapy [J]. Current Immunol, 2023, 43(5):417-22.
- [18] 黄器伟, 翟娜娜, 黄涛, 等. 毛钩藤碱通过线粒体途径诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡[J]. 生理学报, 2018, 70(1):40-6. doi:10.13294/j.aps.2018.0010.
- [18] Huang Q W, Zhai N N, Huang T, et al. Hirsutine induces apoptosis of human breast cancer MDA-MB-231 cells through mitochondrial pathway[J]. Acta Physiol Sin, 2018, 70(1):40-6. doi:10.13294/j.aps.2018.0010.

Study on the antitumor effect of hirsutine combined with oxaliplatin on HGC-27 tumor-bearing gastric cancer mice

Wan Ruyi^{1,2}, Zhou Bo², Chen Bo²

(¹Anhui Medical University First Clinical School Hefei 230022;

²Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effect of hirsutine combined with oxaliplatin on the antitumor activity of HGC-27 mice with gastric cancer. **Methods** Gastric cancer HGC-27 tumor-bearing mice model was established. The successfully established tumor-bearing mice were randomly divided into normal control group, model group, oxaliplatin group (10 mg/kg), hirsutine group (10 mg/kg) and combination group (10 mg/kg hirsutine + oxaliplatin 10 mg/kg). The intervention lasted for 2 weeks. The tumor growth of mice in each group was recorded, and the tumor inhibition rate, thymus index and spleen index were calculated. The proportion of CD4⁺T cells and CD8⁺T cell subsets in peripheral blood was detected by flow cytometry, and the CD4⁺/CD8⁺ ratio was calculated. ELISA was used to measure the serum levels of interleukin (IL) -1 β , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF) - α . HE staining was used to observe the pathological changes in tumor tissues. Western blot was used to detect the protein expression levels of cleaved Caspase-3, Bcl-2 associated X protein (Bax), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and tumor proliferation antigen (Ki67), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in tumor tissues. **Results** Compared with the control group, the spleen index, thymus index, CD4⁺T cell ratio and CD4⁺/CD8⁺ ratio in peripheral blood of the model group decreased ($P < 0.05$), while the proportion of CD8⁺T cells in peripheral blood and the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the tumor growth in oxaliplatin group, hirsutine group and combined group was significantly inhibited, the volume of tumor cells decreased, the heteromorphism was smaller, and the nucleosomes decreased less. The inhibitory rate, spleen index, thymus index, CD4⁺T cell ratio and CD4⁺/CD8⁺ ratio in peripheral blood of the model group increased ($P < 0.05$), the proportion of CD8⁺T cells in peripheral blood and the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum decreased ($P < 0.05$), while the protein expression levels of Bcl-2, Ki67 and PCNA in tumor tissues decreased and the cleaved Caspase-3 and Bax levels increased ($P < 0.05$). Among them, the combination group of rhynchophylline and oxaliplatin had the most obvious intervention effect. **Conclusion** Hirsutine can inhibit the proliferation of tumor cells in gastric cancer bearing mice and promote their apoptosis, and has a more significant effect when combined with oxaliplatin.

Key words hirsutine; oxaliplatin; HGC-27; anti-tumor; gastric cancer; apoptosis

Fund program Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2208085MH240)

Corresponding author Zhou Bo, E-mail: wry8407@163.com