

## 石见穿多糖对肝腹水 H22 荷瘤小鼠的作用及可能机制\*

蔡兴锐 黄芬 刘韵 许丹妮 曾江正

(海南医学院第一附属医院肿瘤内科, 海南海口 570102)

**【摘要】** 目的 探讨石见穿多糖(PSSC)对肝腹水 H22 荷瘤小鼠的作用效果及可能机制。方法 选取 BALB/c 小鼠 80 只,建立 H22 荷瘤小鼠模型,随机分为 5 组:对照组、环磷酰胺组(CTX, 20 mg/kg)、PSSC 组(20、40 和 120 mg/kg),每组 16 只。观察各组小鼠腹部周长、体重、生存率及生存时间;采用脾淋巴细胞转化试验检测 T、B 淋巴细胞增殖情况;E-玫瑰花结实验观察 T 细胞的免疫功能状态;ELISA 法检测血清和腹水中白介素 2(IL-2)、 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、血管内皮生长因子(VEGF)含量;TUNEL 法检测 H22 细胞凋亡;Caspase 比色法测定 Caspase-3 和 Caspase-8 酶活性;Western blot 法检测 Janus 激酶 1(Jak1)、信号传导和转录激活因子-3(Stat3)、Bcl2-相关 X 蛋白(Bax)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)蛋白表达。**结果** 与对照组相比,PSSC 组的腹部周长和体重显著下降,而存活率和存活时间呈剂量依赖性增加;与 CTX 组相比,PSSC 40、120 mg/kg 组腹部周长和体重下降,而存活率和存活时间升高(均  $P < 0.05$ )。与对照组相比,PSSC 组小鼠 SI 及 EtRFC 随 PSSC 治疗剂量的增加而增加;与 CTX 组相比,PSSC 120 mg/kg 组 SI 及 EtRFC 百分比升高(均  $P < 0.05$ )。ELISA 检测结果,与对照组相比,PSSC 组 H22 肿瘤小鼠血清和腹水中的 IL-2、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  水平呈剂量依赖性增加,而 VEGF 表达降低;与 CTX 组相比,PSSC 120 mg/kg 组小鼠血清和腹水中的 IL-2、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  表达升高,而 VEGF 表达下降(均  $P < 0.05$ )。TUNEL 实验显示,与对照组相比,PSSC 呈剂量依赖性增加 H22 细胞凋亡数量;与对照组相比,随着 PSSC 浓度的增加,Caspase-3 和 Caspase-8 表达上升( $P < 0.05$ );Western blot 检测结果,PSSC 组 Jak1、Stat3 和 Bcl-2 蛋白表达较对照组降低,而 Bax/Bcl-2 比值上升。**结论** 石见穿多糖对 H22 荷瘤小鼠具有一定的抗肿瘤作用,其机制可能与免疫调节与抗凋亡作用有关。

**【关键词】** 石见穿多糖;小鼠;脾淋巴细胞;E-玫瑰花结;肝腹水**【中图分类号】** R735.7 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 07. 004

## Effect of PSSC on tumor bearing mice(H22) in vivo and in vitro and JAK / STAT signaling pathway

CAI Xingrui, HUANG Fen, LIU Yun, XU Danni, ZENG Jiangzheng

(Internal Medicine Oncology, The First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570102, China)

**【Abstract】 Objective** To explore the effect and possible mechanism of PSSC on H22 Tumor bearing mice with hepatoma ascites. **Methods** Eighty BALB/ C mice were selected to establish H22 tumor-bearing mice model, and randomly divided into 5 groups: control group, cyclophosphamide group(CTX, 20 mg/kg), PSSC group(20, 40 and 120 mg/kg), with 16 mice in each group. Abdominal circumference, weight, survival rate and survival time of mice in each group were observed. T and B lymphocyte proliferation were detected by spleen lymphocyte transformation test. T cell immune function was observed by E- rosette experiment. The concentrations of IL-2,  $\gamma$ -interferon, TNF- $\alpha$  and VEGF in serum and ascites were detected by ELISA. Apoptosis of H22 cells was detected by TUNEL assay. The activities of Caspase-3 and Caspase-8 were determined by Caspase- colorimetry. The expressions of Janus kinase 1(Jak1), signaling and transcription activator -3(Stat3), Bcl2- related X protein(Bax) and B lymphocytoma -2(Bcl-2) were detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the abdominal circumference and body weight of PSSC group decreased significantly, while the survival rate and survival time increased in a dose-dependent manner; Compared with

基金项目:国家自然科学基金(81960549)

通信作者:曾江正,博士,主任医师,E-mail:zpay5537@163.com

引用本文:蔡兴锐,黄芬,刘韵,等.石见穿多糖对肝腹水 H22 荷瘤小鼠的作用及可能机制[J].西部医学,2022,34(7):954-959,965. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 07. 004

CTX group, PSSC 40 and 120mg/kg groups decreased abdominal circumference and body weight, but increased survival rate and survival time( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, SI and EtRFC in PSSC group increased with the increase of PSSC treatment dose; Compared with CTX group, the percentage of SI and EtRFC in PSSC 120mg/kg group increased( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the levels of IL-2, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in serum and ascites of H22 Tumor Mice in PSSC group increased in a dose-dependent manner, while the expression of VEGF decreased. Compared with CTX group, the expressions of IL-2, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in serum and ascites of mice in PSSC 120 mg/kg group were increased, while the expression of VEGF was decreased. TUNEL showed that PSSC increased the apoptosis of H22 cells in a dose-dependent manner compared with the control group. Compared with the control group, the expression of Caspase-3 and caspase-8 increased with the increase of PSSC concentration. The results of westerblot showed that the expression of Jak1, STAT3 and bcl-2 protein in PSSC group was lower than that in control group, while the ratio of Bax/Bcl-2 was higher. **Conclusion** PSSC has anti-tumor effect on H22 Tumor bearing mice, and its mechanism may be related to immune regulation and anti apoptosis.

**[Key words]** Polysaccharides from salvia chinensis benth; Mouse; Spleen lymphocyte; E-rosette; Ascites

恶性腹水是由各种恶性肿瘤引起的腹水,50%左右的晚期或复发恶性肿瘤患者在其病程中可能出现恶性腹水<sup>[1]</sup>。目前,化疗、腹腔穿刺术、利尿剂和腹腔分流术等是临床上治疗腹水症状常用方法,但这些疗法会产生许多副作用<sup>[2]</sup>。因此,寻找更有效的治疗方法已成为当前研究的主要任务。越来越多的证据表明,中医药为治疗恶性腹水提供可能途径<sup>[3]</sup>。研究表明,中药能减轻部分肿瘤患者抗肿瘤治疗的毒副作用<sup>[4]</sup>。石见穿系唇形科鼠尾草属华鼠尾草 *Salvia chinensis benth* 的干燥地上部分,具有清热解毒、活血镇痛之功能,主治肝炎、肾炎、痛经、噎隔、痛肿、癌症等<sup>[5]</sup>。天然植物多糖具有较好的免疫调节活性,还能促进机体抗肿瘤免疫反应。因此本研究通过石见穿多糖 (Polysaccharides from *salvia chinensis benth*, PSSC)成分的有效提取,建立 H22 荷瘤小鼠腹水模型,探究其对肝癌腹水的抑制作用及可能机制。

## 1 材料与方 法

1.1 主要药物与试剂 石见穿药材购自湖北省中药材有限公司,按文献<sup>[6]</sup>方法提取 PSSC,溶于生理盐水备用;小鼠肝癌 H22 细胞株由中南大学湘雅医学院细胞典藏中心提供;刀豆蛋白 A(ConA)和脂多糖(LPS)购自美国 Sigma 公司产品;环磷酰胺(CTX)、CCK8 购自长春百金生物工程有限公司;白介素 2(IL-2)、 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、血管内皮生长因子(VEGF)酶联免疫检测试剂盒购自联科生物技术有限公司;Tunel 检测试剂盒、Caspase3/8 试剂盒购自南京凯基生物公司;GAPDH、Janus 激酶 1(Jak1)、信号传导和转录激活因子-3(Stat3)、Bcl2-相关 X 蛋白(Bax),B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)一抗抗体购自美国 Abbkines 公司。

1.2 实验动物 BALB/c 小鼠 80 只,体质量( $18 \pm 2$ )g,购自南华大学实验动物中心,许可证号:SYXK(湘)2018-0021。实验前于( $25 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ 和( $55 \pm 5$ )%相对湿

度适应性饲养一周,以 12 h 光照/12 h 避光交替循环饲养,所有小鼠均自由摄食、饮用蒸馏水。该实验小鼠的处理符合动物伦理要求,并获得本院伦理委员会批准。

### 1.3 方 法

1.3.1 动物分组及模型建立 取对数生长期的 H22 细胞,以  $1 \times 10^6$  个/mL 的浓度重新悬浮在盐水中,在左腹腔中注射 0.2 mL 细胞悬浮液。H22 荷瘤小鼠 80 只随机分为 5 组:对照组、CTX 组及 PSSC 组(20、40 和 120 mg/kg PSSC),每组 16 只。对照组给予等量生理盐水;CTX 组给予 20 mg/kg CTX;PSSC 组给予 20、40 和 120 mg/kg PSSC。荷瘤次日给药,给药方法为隔天腹腔注射 PSSC,共 7 次。每天测量小鼠腹部周长和体重,在第 18 天时处死一半小鼠,取脾脏、血清和腹水,其余小鼠正常喂养,记录存活时间。

1.3.2 脾淋巴细胞转化实验 采用无菌技术,粉碎小鼠脾脏,离心  $800 \times g$  30 min,分离脾细胞,将细胞洗涤并重新悬浮于 RPMI-1640 培养基中。将脾细胞悬液培养 24 h 后,分成实验组和对照组,以  $1 \times 10^6$  个/mL 浓度接种于 96 孔板中,分别加入 ConA 2 mg/L 和 LPS 5 mg/L,细胞于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 48 h,将 CCK8 试剂添加到每孔(20  $\mu\text{L}$ /孔)中,再孵育 2 h,450 nm 处测量每孔中脾淋巴细胞的吸光度。模拟指标计算如下:刺激指数(SI)=实验组吸光度值/对照组吸光度值 $\times 100\%$ 。

1.3.3 E-花环实验 依据 1.3.2 操作,提取各组小鼠的脾淋巴细胞,用 Hanks 液配成  $1 \times 10^6$  个/mL 细胞悬液,每只小试管加入 0.1 mL 脾淋巴细胞悬液,再加 0.1 mL 1% 绵羊红细胞(SRBC)和 0.05 mL 灭活 FBS,然后低速离心混合物,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日用 0.8% 戊二醛在冰上固定细胞 30 min,在高倍显微镜下观察。能够结合三个或更多的 T 细胞 SRBCs 被认为是阳性对照。随机抽取 5 个视野中不少于 200 个淋巴细胞计算花环形成率(EtRFC)。

1.3.4 血清和腹水细胞因子分析 取小鼠眼眶血,分离血清进行细胞因子分析;提取腹水离心,收集上清液,按 ELISA 试剂盒说明书操作,检测 IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、VEGF 水平。

1.3.5 TUNEL 法检测 H22 细胞凋亡 PSSC 处理 (1、2、4 mg/mL) H22 细胞 24 h 后,4%多聚甲醛固定 30 min,用 PBS 洗涤后,加入 10%蛋白酶 K 孵育 20 min,然后加入 50  $\mu$ L TDT 溶液 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 洗涤后,加入 50  $\mu$ L Tritc 染色剂 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min,用 DAPI(4,6-二氨基-2-苯基喹啉)染色细胞核,荧光显微镜观察细胞。

1.3.6 比色法测定 Caspase-3 和 Caspase-8 活性 按试剂盒说明书步骤收集细胞、处理检测样品,在酶标仪激发波长 405 nm 处测定吸光度(A)值,相对活性(%)=(实验组吸光度值/对照组吸光度值) $\times$ 100%。

1.3.7 Western blot 检测 Jak1、Stat3、Bax 和 Bcl-2 蛋白 将 H22 细胞( $1\times 10^5$  个/mL)接种于 6 孔平板中,用不同浓度的 PSSC(1、2、4 mg/mL)孵育 48 h,然后预冷的 PBS 中洗涤 2 次,通过 BCA 法检测蛋白浓度,然后用 8%或 12%十二烷基硫酸钠/聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS/PAGE)分离蛋白,转膜,用含 5%脱脂牛奶的 TBST 封闭,加入 Jak1、Stat3、Bcl-2、Bax 和 GAPDH 的多克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜, TBST 洗膜,加入 HRP

标记的二抗稀释液孵育,采用 ECL 化学发光法进行显色反应,并使用 GEDOC 2000 系统进行分析。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,使用 Prism5 软件创建图形。所有的实验都重复了至少三次。数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间均数比较采用独立样本 *t* 检验及单因素方差分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 PSSC 在体内抗肿瘤作用 将 H22 细胞移植到小鼠左腹腔,用不同剂量 PSSC(20、40、120 mg/kg)和 CTX 20 mg/kg 处理。5 d 后,接种肿瘤细胞的对照组小鼠出现明显的腹胀,而注射 PSSC 的小鼠则没有腹胀。7 d 后,对照组小鼠腹水增多,腹部隆起明显,开始出现饮水和进食困难,变得懒惰,毛发没有光亮,体重和腹部周长迅速增加。第 13 天,对照组小鼠腹部隆起呈球形,小鼠无动于衷,几乎不活动,开始死亡(图 1A)。接种后测量小鼠腹部周长和体重结果,与对照组相比,PSSC 组的腹部周长和体重显著下降,且 PSSC 40、120 mg/kg 组腹部周长和体重均低于 CTX 组( $P<0.05$ )(图 1B、1C);与对照组相比,PSSC 组的存活率和存活时间(在第 50 天结束时)呈剂量依赖性增加,且 PSSC 组小鼠存活率和存活时间均高于 CTX 组( $P<0.05$ ),见图 1D、1E。

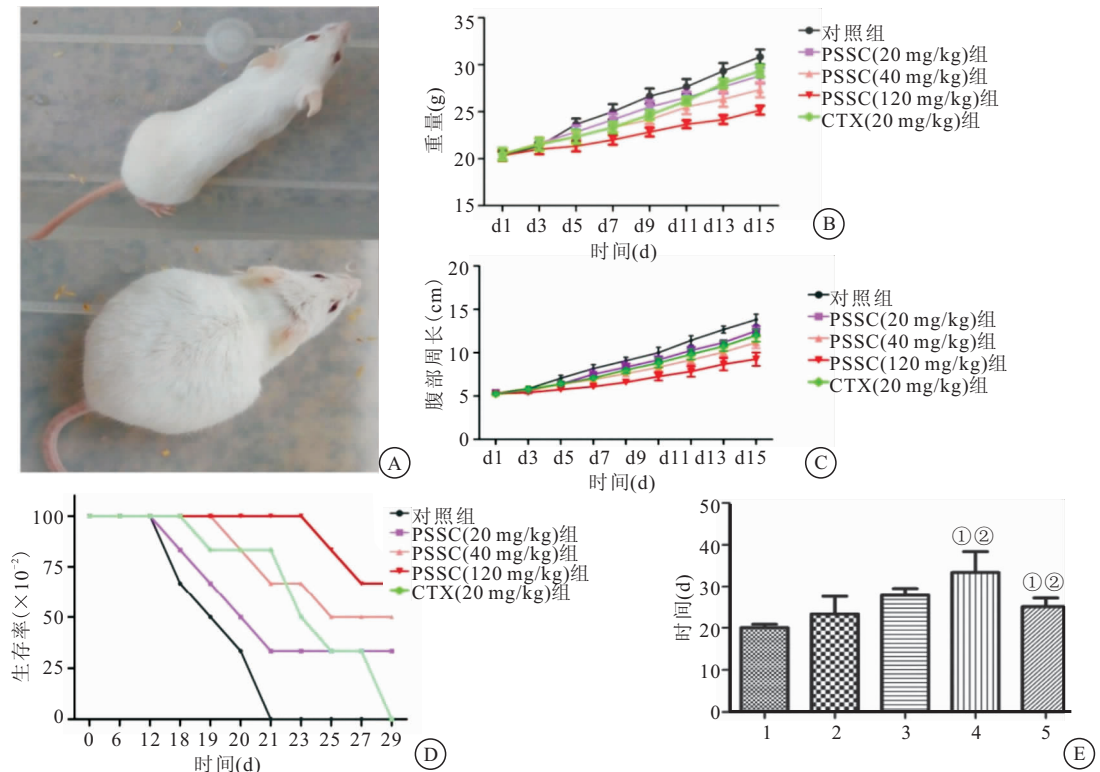


图 1 PSSC 对 H22 恶性腹水小鼠模型的影响

Figure 1 Effect of PSSC on H22 malignant ascites mouse model

注: A. H22 恶性腹水小鼠模型; B. 各组小鼠平均体重; C. 各组小鼠腹部周长; D. 各组小鼠存活曲线; E. 各组小鼠生存时间。1. 对照组; 2. PSSC 20 mg/kg 组; 3. PSSC 40 mg/kg 组; 4. PSSC 120 mg/kg 组; 5. CTX 20 mg/kg 组。与对照组比较, ① $P<0.05$ ; 与 CTX 组比较, ② $P<0.05$

2.2 PSSC 对脾淋巴 T 细胞增殖影响 采用 ConA 和 LPS 诱导 H22 肿瘤小鼠淋巴细胞增殖,与对照组相比,PSSC 组小鼠脾脏淋巴细胞增殖量(SI)随 PSSC 治疗剂量的增加而增加,而与 CTX 组相比,PSSC 120mg/kg 组 SI 升高(均  $P < 0.05$ ),见图 2。

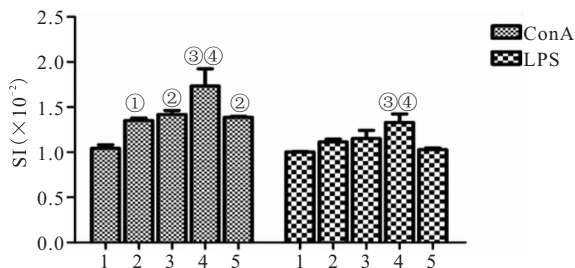


图 2 PSSC 对淋巴细胞增殖影响

Figure 2 Effect of PSSC on lymphocyte proliferation

注:1. 对照组;2. PSSC 20 mg/kg 组;3. PSSC 40 mg/kg 组;4. PSSC 120 mg/kg 组;5. CTX 20 mg/kg 组。与对照组比较,①  $P < 0.05$ ,②  $P < 0.01$ ,③  $P < 0.001$ ;与 CTX 组比较,④  $P < 0.05$

2.3 PSSC 对淋巴细胞玫瑰花结形成影响 T 细胞 CD2 受体能特异性结合 SRBC 并形成特征性的花环(图 3A)。各组玫瑰花结形成率结果显示,与对照组相比,PSSC 组 EtRFC(E-玫瑰花结形成细胞的比率)百分比呈剂量依赖性增加,而与 CTX 组相比,PSSC 120 mg/kg 组 EtRFC 百分比升高( $P < 0.05$ ),见图 3B。

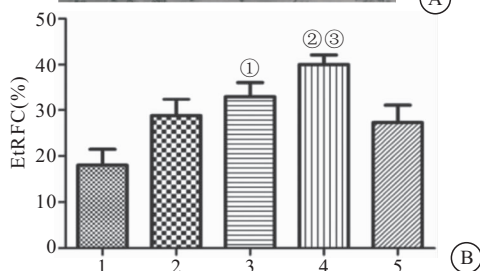


图 3 PSSC 对淋巴细胞玫瑰花结形成率影响

Figure 3 Effect of PSSC on lymphocyte rosette formation rate

注:A. 花环样结构;B. 各组玫瑰花结形成率(EtRFC%)。1. 对照组;2. PSSC 20 mg/kg 组;3. PSSC 40 mg/kg 组;4. PSSC 120 mg/kg 组;5. CTX 20 mg/kg 组。与对照组比较,①  $P < 0.05$ ,②  $P < 0.01$ ;与 CTX 比较,③  $P < 0.05$

2.4 PSSC 对血清和腹水细胞因子水平的影响 PSSC 组 H22 肿瘤小鼠血清和腹水中的 IL-2、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  水平较对照组增加,而 VEGF 表达降低,均呈剂量依赖性;PSSC 120mg/kg 组小鼠血清和腹水中的 IL-2、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  水平均高于 CTX 组,而 VEGF 表达水平低于 CTX 组(均  $P < 0.05$ ),见图 4。

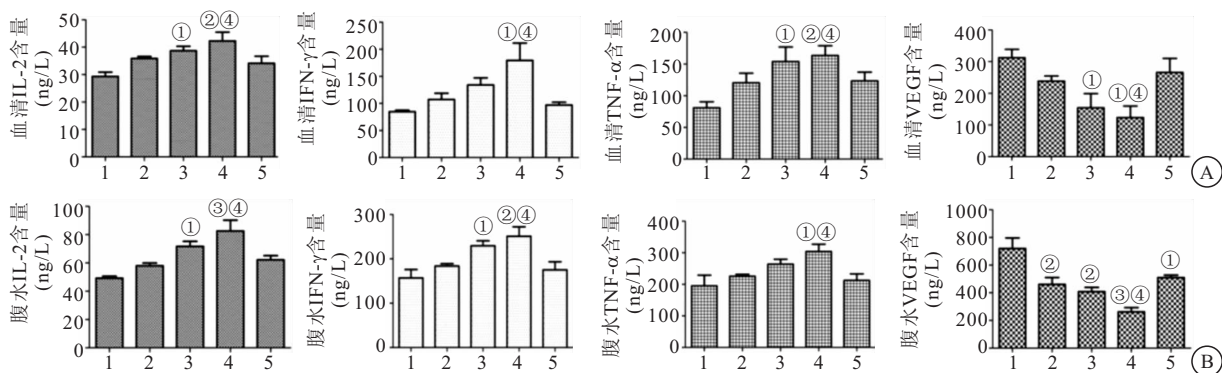


图 4 PSSC 对各组小鼠血清和腹水细胞因子影响

Figure 4 Effect of PSSC on cytokines in serum and ascites of mice in each group

注:A. PSSC 对小鼠血清细胞因子表达影响;B. PSSC 对小鼠腹水细胞因子表达影响。1. 对照组;2. PSSC 20 mg/kg 组;3. PSSC 40 mg/kg 组;4. PSSC 120 mg/kg 组;5. CTX 20 mg/kg 组。与对照组比较,①  $P < 0.05$ ,②  $P < 0.01$ ,③  $P < 0.001$ ;与 CTX 组比较,④  $P < 0.05$

2.5 PSSC 诱导 H22 细胞凋亡 TUNEL 实验中,非凋亡细胞经 DAPL 染色呈蓝色核荧光,凋亡细胞经 TRITC 染色呈强红色荧光。与对照组相比,PSSC 组 H22 细胞凋亡数量增加,呈剂量依赖性,见图 5。

2.6 PSSC 体外抗肿瘤活性分析 用 Caspase 比色法

测定 PSSC 处理的 H22 细胞 Caspase-3 和 Caspase-8 酶活性,与对照组相比,PSSC 诱导 H22 细胞 Caspase-3 和 Caspase-8 活化,且随着 PSSC 浓度的增加而表达上升,见图 6。

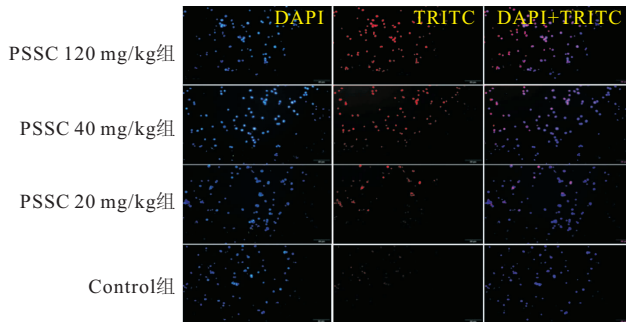


图 5 TUNEL 法检测 H22 细胞凋亡(400×)

Figure 5 Apoptosis of H22 cells detected by TUNEL method

注:用 DAPI(左)、TRITC(中)和 Merged(右)获得的代表性细胞图像

2.7 Western blot 检测 Jak1、Stat3、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达 随着 PSSC 浓度的增加,PSSC 组 Jak1、Stat3

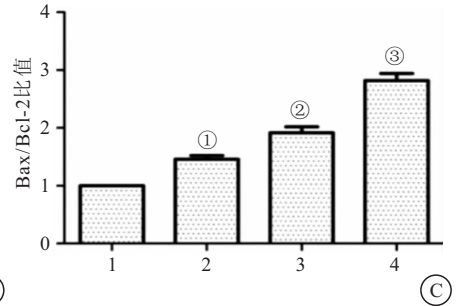
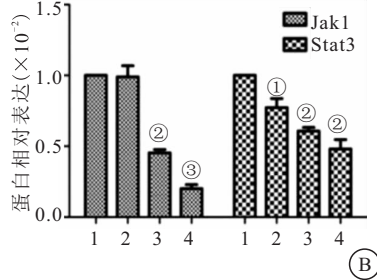
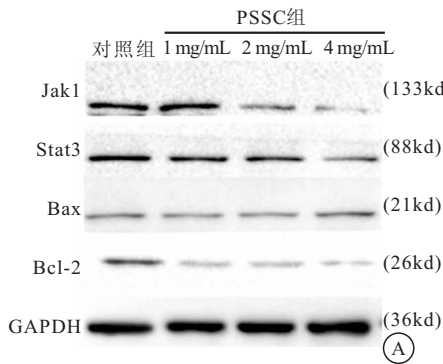


图 7 PSSC 对 Caspase-3 和 Caspase-8 活化及其它相关蛋白表达的影响

Figure 7 Effect of PSSC on Caspase-3 and caspase-8 activation and expression of other related proteins

注:A. western blot 检测 Jak1、Stat3、Bcl-2 和 Bax 表达;B. Jak1、Stat3 蛋白相对表达;C. Bax/Bcl-2 比值。1. 对照组;2. PSSC 1 mg/kg 组;3. PSSC 2 mg/kg 组;4. PSSC 4 mg/kg 组。与对照组比较,①P<0.05,②P<0.01,③P<0.001

### 3 讨论

恶性腹水是恶性肿瘤病情恶化或预后不良的标志,也是引起肿瘤患者死亡的常见原因之一<sup>[7-9]</sup>。目前肿瘤治疗方法主要为手术、化疗、放疗,但是这些方法具有副作用较强,治疗费用高昂等缺点<sup>[10]</sup>。目前反复穿刺仍是治疗恶性腹水的常用方法,但效果有限,且这些方法只是缓解症状,并不能解决根本问题。

研究表明,从中草药中分离出来的多糖具有多种生物功能<sup>[11]</sup>。石见穿作为中草药中的一种,各部位提取物对多种癌细胞具有一定的抗肿瘤作用<sup>[12-13]</sup>。由于多糖的毒副作用小,目前已成为研究热门领域。本实验通过观察石见穿多糖对 H22 荷瘤小鼠治疗效果,以及对各种细胞因子表达影响,探讨其抗肝腹水的可能机制,为临床治疗肝腹水提供一定的参考。

本研究发现 CTX 组小鼠的生存时间较中、高浓度 PSSC 组明显降低。PSSC 组的腹部周长和体重较对照组显著下降,存活率和存活时间较对照组呈剂量依赖性增加。这些结果均表明 PSSC 在 H22 肿瘤模

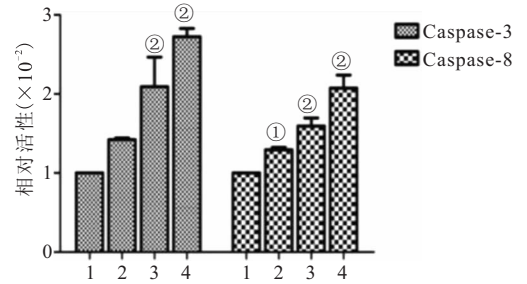


图 6 Caspase-3 和 Caspase-8 在 H22 细胞中的相对活性

Figure 6 The relative activity of Caspase-3 and caspase-8 in H22 cells

注:1. 对照组;2. PSSC 1 mg/kg 组;3. PSSC 2 mg/kg 组;4. PSSC 4 mg/kg 组。与对照组比较,①P<0.05,②P<0.01,③P<0.001

和 Bcl-2 蛋白表达较对照组降低,而 Bax/Bcl-2 比值上升,见图 7。

型中具有一定的抗肿瘤作用。

脾脏和胸腺是动物主要的中枢免疫器官,是 T 细胞发育、成熟的场所,在细胞免疫系统的建立中具有重要作用<sup>[14-15]</sup>。ConA 对 T 淋巴细胞具有丝裂原作用,可诱导淋巴细胞体外增殖。PSSC 对脾淋巴 T 细胞增殖影响发现,脾脏淋巴细胞增殖量(SI)随 PSSC 治疗剂量的增加而增加,这说明 PSSC 能促进脾淋巴细胞增殖,而在 CTX 的作用下,小鼠脾脏 SI 均显著降低,说明 CTX 抑制 ConA 和 LPS 刺激的脾脏淋巴细胞增殖作用;E-花环实验检测发现,与对照组相比,PSSC 组 EtRFC 呈剂量依赖性增加,这说明 PSSC 具有促进 T 细胞增殖作用,通过 T 细胞分泌的细胞因子(IL-2、IFN-γ 等)发挥抗癌作用。

肿瘤的发生、发展与机体的免疫功能失调有密切相关<sup>[16-17]</sup>。IL-2 主要是由激活的 T 淋巴细胞产生的一类细胞因子,其主要生理功能是促进 T 淋巴细胞的增殖<sup>[18]</sup>;经证实,TNF-α 是一多功能的细胞因子,调节包括细胞凋亡在内的许多细胞生物学进程,在抗肿

瘤活动中发挥重要作用<sup>[19]</sup>；在防御和免疫系统中 IFN- $\gamma$  具有多种生物功能，如抗病毒、抗菌、抗增殖和抗肿瘤活性<sup>[20]</sup>；VEGF 表达与浸润深度、淋巴结转移、病理分期、肿瘤分化程度密切相关，可激活 Jak-Stat 通路里的 Stat-3<sup>[21]</sup>。ELISA 法检测结果发现，PSSC 组小鼠血清和腹水中的 IL-2、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  水平增加，VEGF 水平降低，均呈剂量依赖性。说明 PSSC 具有强抗肿瘤免疫反应，其机制可能除了对肿瘤细胞的直接杀伤作用外，还通过促进宿主的免疫反应而间接发挥作用。

Jak/Stat 蛋白被认为是关键的细胞生长、增殖、分化和免疫调节功能。文献报道<sup>[22]</sup>，STAT3 经 JAK 磷酸化，成为其活性形式-pSTAT3 (Tyr705)，并形成二聚体从细胞质转移至细胞核，与 Bcl-2 启动子结合，能减少 Bax 促凋亡基因的表达，而诱导 Bcl-2 抗凋亡的基因的表达<sup>[23]</sup>。TUNEL 法检测发现，与对照组相比，PSSC 呈剂量依赖性增加 H22 细胞凋亡数量，提示 PSSC 抗肿瘤作用可能与促 H22 细胞凋亡有关；Caspase-3 和 Caspase-8 是细胞凋亡的重要介质<sup>[24]</sup>，Caspase 比色法发现，PSSC 诱导 H22 细胞 Caspase-3 和 Caspase-8 活化，且随着 PSSC 浓度的增加而表达上升。Western blot 结果显示，与对照组相比，PSSC 组 Jak1、Stat3 和 Bcl-2 蛋白随着 PSSC 浓度的增加而表达降低，Bax/Bcl-2 比值上升。推测 PSSC 的抗癌机制可能通过刺激 T 细胞和 B 细胞生长，促进分泌 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和 IL-2，减少 VEGF 表达，起到抗肿瘤作用。除此之外，还可能与通过激活 Caspase 家族和下调 Jak1-Stat3 表达，从而提高 Bax/Bcl-2 的比例，促进 H22 细胞凋亡有关。

#### 4 结论

PSSC 对体外和 H22 荷瘤小鼠腹水模型具有一定的抗肿瘤作用，其机制可能与免疫调节与抗凋亡作用有关。可将 PSSC 作为一种新的免疫调节剂，为肿瘤药物的开发提供一个新的依据和治疗靶点。

#### 【参考文献】

[1] STUKAN M. Drainage of malignant ascites: Patient selection and perspectives[J]. *Cancer Manag Res*, 2017, 9: 115-130.  
 [2] STEFANIE M, ROSENBERGPA-C. Palliation of malignant ascites[J]. *Gastroenterol Clin N Am*, 2006, 35(1): 189-199.  
 [3] PANG CLK, ZHANG X, WANG Z, *et al*. Local modulated electro-hyperthermia in combination with traditional chinese medicine vs. Intraperitoneal chemoinfusion for the treatment of peritoneal carcinomatosis with malignant ascites: A phase II randomized trial[J]. *Mol Clin Oncol*, 2017, 6(5): 723-732.  
 [4] ZHOU J, ZHOU T, JIANG M, *et al*. Research progress on synergistic anti-tumor mechanisms of compounds in traditional

chinese medicine [J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34 (1): 100-105.  
 [5] 柳芳, 刘建勋, 任国钧, 等. 石见穿提取物通过阻断血管生成抑制肿瘤生长的研究[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(9): 1285-1288.  
 [6] SHU G W, ZHAO W H, YUE L, *et al*. Antitumor immunostimulatory activity of polysaccharides from *Salvia chinensis* Benth[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 168: 237-247.  
 [7] WEI M T, YANG T H, CHEN X Z, *et al*. Malignant ascites-derived exosomes promote proliferation and induce carcinoma-associated fibroblasts transition in peritoneal mesothelial cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(26): 42262-42271.  
 [8] KIM S, KIM S, KIM J, *et al*. Author Correction: Evaluating Tumor Evolution via Genomic Profiling of Individual Tumor Spheroids in a Malignant Ascites[J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 17395.  
 [9] 秦方方, 周福有, 赵小静. 复方苦参注射液联合洛铂腔内灌注治疗恶性腹水[J]. *肿瘤基础与临床*, 2017, 30(5): 401-403.  
 [10] EMENS L A. Chemotherapy and tumor immunity: An unexpected collaboration[J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 249-257.  
 [11] 梁乙川, 潘欢欢, 吴清芳, 等. 中药材多糖的提取、分离纯化研究进展[J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(8): 1774-1777.  
 [12] 莫雨晓, 吴胜男, 李青雅, 等. 石见穿乙醇提取物氯仿部位抗 HIV-1 活性的体外实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(12): 2847-2849.  
 [13] 黄旭, 张浪, 郝吉, 等. 石见穿多糖对脂多糖和 D-氨基半乳糖胺联合诱导小鼠急性肝衰竭的保护作用[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2017, 31(4): 311-317.  
 [14] 司原成, 苗维纳, 何嘉悦, 等. 针刺对肥胖鼠胸腺、脾脏及肠派氏淋巴结中 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29 (8): 2043-2045.  
 [15] XIONG H Z, MANCINI M, GOBERT M, *et al*. Spleen plays a major role in DLL4-driven acute T-cell lymphoblastic leukemia [J]. *Theranostics*, 2021, 11(4): 1594-1608.  
 [16] OSULLIVAN J, LYSAGHT J, DONOHOE C L, *et al*. Obesity and gastrointestinal cancer: the interrelationship of adipose and tumour microenvironments[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(11): 699-714.  
 [17] FLUEGEN G, AVIVAR-VALDERAS A, WANG Y, *et al*. Phenotypic heterogeneity of disseminated tumour cells is preset by primary tumour hypoxic microenvironments[J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(2): 120-132.  
 [18] AKIYAMA M, SASAKI T, KANEKO Y, *et al*. Serum soluble interleukin-2 receptor is a useful biomarker for disease activity but not for differential diagnosis in IgG4-related disease and primary Sjögren's syndrome adults from a defined population[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2018, 112(3): 157-164.  
 [19] SHEN Y L, SHI Y Z, CHEN G G, *et al*. TNF- $\alpha$  Induces Drp1-mediated Mitochondrial Fragmentation During Inflammatory Cardiomyocyte Injury[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41 (4): 2317-2327.  
 [20] NAKANISHI Y, SATO T, TAKAHASHI K, *et al*. IFN- $\gamma$ -dependent Epigenetic Regulation Instructs Colitogenic Monocyte/Macrophage Lineage Differentiation in Vivo[J]. *Mucosal Immunol*, 2018, 11(3): 871-880.

- 皮 Toll 样受体 4/髓样分化因子/核转录因子- $\kappa$ B 信号通路的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38(4):662-664.
- [12] 王其进, 陈玉, 张涛, 等. FOXO3 调控 NF- $\kappa$ Bp50 表达介导肠上皮细胞凋亡参与溃疡性结肠炎相关癌变及健脾清热活血方药干预研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(12):3043-3046.
- [13] 陈勇华, 曹群奋, 洪琼怪, 等. 黄芩汤辅助柳氮磺吡啶对溃疡性结肠炎患者血清 TNF- $\alpha$  及白介素族水平影响研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(2):500-503.
- [14] EBRAHIMPOUR S, SHAHBAZI M, KHALILI A, *et al.* Elevated levels of IL-2 and IL-21 produced by CD4<sup>+</sup> T cells in inflammatory bowel disease[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2017, 31(2): 279-287.
- [15] ISHIDA N, MIYAZU T, MATSUURA T, *et al.* Effect of ulcerative colitis duration on the usefulness of immunochemical fecal occult blood test result as a disease activity biomarker[J]. Int J Colorectal Dis. 2020, 35(9):1729-1739.
- [16] RATHNAM G. Formulation and Evaluation of Colon Targeted Compression Coated Tablet of Mesalamine and Prednisolone for Ulcerative Colitis[J]. Asian J Pharmaceutics, 2017, 11(3): 231-239.
- [17] SINGH A K, PANDEY R K, SHAHA C, *et al.* MicroRNA expression profiling of Leishmania donovani-infected host cells uncovers the regulatory role of MIR30A-3p in host autophagy [J]. Autophagy, 2016, 12(10):1817-1831.
- [18] YANG S, WANG Y, GAO H, *et al.* MicroRNA-30a-3p over-expression improves sepsis-induced cell apoptosis in vitro and in vivo via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(2): 2081-2087.
- [19] YIN Y, YANG C. miRNA-30a-3p improves myocardial ischemia via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(10):17326-17336.
- [20] 王龙飞, 彭洪, 苏强, 等. miRNA-301a-3p 调控结肠癌对 5-氟尿嘧啶敏感性的机制研究[J]. 西部医学, 2019, 31(8):1165-1169.
- [21] ZHANG R, ZHU H, YUAN Y, *et al.* SPAG6 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis through the PTEN/PI3K/AKT pathway in Burkitt lymphoma[J]. Oncol Rep, 2020, 44(5):2021-2030.
- [22] YIN R, JIANG J, DENG H, *et al.* miR-140-3p aggregates osteoporosis by targeting PTEN and activating PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. Human Cell, 2020, 33(3):569-581.
- [23] 周海新, 方健松, 张涛, 等. miR-21 介导肠上皮细胞凋亡维持肠道稳态参与溃疡性结肠炎相关癌变研究[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(4):523-527.
- [24] 随何欢, 赵海霞, 朱丽莎, 等. 内质网应激-自噬参与葫芦素 E 诱导的结肠癌细胞凋亡[J]. 西部医学, 2020, 32(11):1604-1607.

(收稿日期:2021-06-07;修回日期:2022-02-11;编辑:刘灵敏)

(上接第 959 页)

- [21] 李永辉, 李婷婷, 郭强, 等. 食管癌组织中 VEGF-C 表达量与淋巴管新生及肿瘤组织生长的相关性[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(22):44-48.
- [22] 折胜利, 宋兴华, 周杨, 等. 骨肉瘤细胞外泌体调控 JAK2/STAT3 信号通路影响成纤维细胞向肿瘤相关成纤维细胞转化[J]. 西部医学, 2021, 33(8):1096-1100, 1105.
- [23] 言成一, 杨继承, 袁跃西, 等. 微小 RNA-520e 对非小细胞肺癌细胞侵袭迁移和 JAK1/STAT3 信号通路的影响[J]. 临床肿瘤学杂志, 2019, 24(11):978-983.
- [24] 商华, 任宪辉, 杨红欣, 等. 姜黄素对 A $\beta$ 25-35 诱导的 PC12 细胞 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(1):168-172, 182.

(收稿日期:2021-07-12;修回日期:2022-03-25;编辑:刘灵敏)