

益气清毒方联合 CTX 对 H₂₂ 肝癌小鼠抑瘤实验研究及机制探讨

Experimental Research on Anti-tumor Effect of Yiqiqingdu Compound Combined with CTX in H₂₂ Hepatoma-bearing Mice and Its Mechanism // XIONG Mo-nian, PENG Dan-ming, ZHANG Jin, et al.

熊墨年¹, 彭旦明¹, 张进¹, 邓罗英¹, 刘雯¹, 熊林楷², 唐晓玲¹

(1. 江西省中医药研究院, 江西 南昌 330046; 2. 江西省肿瘤医院, 江西 南昌 330029)

摘要: [目的] 观察益气清毒方联合环磷酰胺(CTX)的抗肿瘤效果并探讨其作用机制。[方法] 水煎制备益气清毒方汤剂, 建立 H₂₂ 荷瘤小鼠动物模型, 接种后第 2d 开始给药, 腹腔注射 CTX 及益气清毒方灌胃, 第 9d 称重后处死小鼠, 眼眶取血做血液学检查, 并观察小鼠胸腺、脾脏及肿瘤瘤体生长情况。[结果] 与 CTX 低剂量组相比, CTX+益气清毒方高、中剂量组小鼠胸腺指数明显增加, 瘤重下降, 白细胞及血小板计数无明显下降。[结论] 益气清毒方能明显加强 CTX 的抗肿瘤作用, 抑制 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤生长, 减轻 CTX 不良反应, 提高免疫功能。

关键词: 益气清毒方; H₂₂ 细胞; 抑瘤作用; 肝肿瘤; 小鼠

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)08-0593-03

益气清毒方系江西省中医药研究院国家中医药管理局肿瘤中医“益气清毒”重点研究室根据“益气清毒”的原则所创经验方, 其临床疗效较为满意^[1-7]。本实验通过建立小鼠肝癌细胞 H₂₂ 移植瘤模型, 研究益气清毒方联合 CTX 抗肿瘤活性及其抑瘤作用机理, 为该法的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器试剂

净化工作台(SW-CJ-2F, 苏州净化设备有限公司), 全自动生化分析仪(7170A, 日立), 血球计数仪(CD1400, 美国), 生物显微镜(CX-31, Olympus)。益气清毒方(江西省中医药研究院附属医院), 环磷酰胺(CTX, 天津金世制药有限公司, 批号: 110506), RPMI 1640 培养基(Gibico 公司)。

1.2 益气清毒方药物组成

益气清毒方药物组成包括: 生晒参 15g、白术 12g、茯苓 12g、甘草 10g、黄芪 20g、半枝莲 30g、白花蛇舌草 30g、藤梨根 15g、浙贝母 15g、金荞麦 15g。

基金项目: 江西省卫生厅中医药科研基金重点课题(2008Z07)

通讯作者: 唐晓玲, 副主任医师, 硕士; 江西省中医药研究院附属医院肿瘤科, 江西省南昌市文教路 529 号(330046); E-mail: k8500160@163.com。

收稿日期: 2012-05-16; **修回日期:** 2012-07-04

1.3 实验动物

H₂₂ 肝癌小鼠来源上海医药工业研究院。KM 小鼠, 8w, 雌雄各半, 体质量 18.0~22.0g, 江西中医学院提供。许可证号: SCXK(赣)2005-0001。

1.4 动物模型的建立

选取 2 只经接种 H₂₂ 肝癌细胞 7d 致腹水小鼠, 处死后置于超净工作台, 腹部去毛, 剪开皮层, 用无菌注射器抽取腹水, 用 0.5ml 生理盐水再冲洗一次腹腔, 合并腹水和洗液, 过滤置离心管中, 500r/min 离心 10min 弃上清; 用生理盐水重复洗涤 2 次弃上清; 最后用 RPMI 1640 将 H₂₂ 肝癌细胞制成 1×10⁷/ml 的细胞悬液。台盼蓝染色检测, 活细胞百分率达 96%。于小鼠右腋下注射 0.2ml 混悬液, 制成实验动物模型。

1.5 动物分组及给药

随机分为正常对照组、模型组、单纯 CTX 高剂量组(35mg/kg)和低剂量组(25mg/kg)、环磷酰胺低剂量+益气清毒方高剂量(13.0g/kg)组、中剂量(6.5g/kg)组和低剂量(3.25g/kg)组。每组 10 只小鼠。正常对照组和模型组采用等量生理盐水腹腔注射和灌胃; 益气清毒方采用灌胃给药; 环磷酰胺为腹腔注射, 每天上午 1 次。从接种后第 2d 开始给药, 连续 8d。

1.6 观察指标

给药第 1、4、9d 称量小鼠体重, 第 9d 给药 2h 后

眼眶静脉取血,进行血液学(白细胞、红细胞、血红蛋白、血小板)检查;称重后处死小鼠,剥离瘤体,取瘤体、胸腺和脾脏称重记录。

1.7 统计学处理

各组数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 Excel 软件进行统计学处理分析,组间差异用 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 益气清毒方对小鼠体重影响

CTX 高、低剂量组与模型组对比,小鼠体重在第 9d 有显著不同(*P*<0.05),而益气清毒方各组的小

鼠体重则无明显改变。提示 CTX 对小鼠的不良反应有可能延缓小鼠的生长发育;而益气清毒方具有减轻 CTX 此类不良反应的作用。见表 1。

2.2 益气清毒方对小鼠胸腺、脾脏和瘤重的影响

模型组与正常对照组比较,脾脏指数明显增大(*P*<0.01)。无论是 CTX 高剂量组还是 CTX 低剂量组,小鼠瘤重、胸腺指数、脾脏指数均低于模型组,有显著性差异(*P*<0.05)。CTX+益气清毒方高、中剂量组与 CTX 低剂量组对比,胸腺指数高于 CTX 低剂量组,小鼠瘤重低于 CTX 低剂量组,说明益气清毒方对免疫器官胸腺有保护作用,对小鼠肿瘤病灶生长有明显抑制作用。见表 2。

2.3 益气清毒方对小鼠外周血细胞的影响

CTX 高、低剂量组与模型组相比,小鼠白细胞、红细胞、血红蛋白、血小板计数均明显下降,有显著性差异(*P*<0.05)。CTX+益气清毒方高、中剂量组能明显减轻 CTX 对小鼠骨髓抑制的不良反应,明显减少白细胞、血小板下降数量,且有显著性差异(*P*<0.05)。见表 3。

3 讨 论

目前,实体瘤的治疗一般早中期以手术为主,配合放、化疗;中晚期则以放、化疗为主。由于化疗在杀灭癌细胞的同时,有较大的不良反应,严重影响患者生活质量,甚至缩短生存期。因此,中草药以其疗效确切,不良反应小,已受到越来越多的重视^[8]。

表 1 益气清毒方对小鼠体重(g)影响(n=10, $\bar{x}\pm s$)

组别	第 1d	第 4d	第 9d
正常对照组	19.03±0.92	25.36±1.14	28.60±1.63
模型组	19.30±1.34	26.60±2.66	30.79±2.21
CTX 高剂量组	19.30±0.82	25.19±2.13	26.49±1.92 ^{▲▲}
CTX 低剂量组	19.30±1.16	24.25±1.14	27.55±2.36 [▲]
CTX(低)+益气(高)组	18.70±1.06	25.02±1.59	28.75±2.68
CTX(低)+益气(中)组	18.90±1.60	25.11±2.52	29.09±4.25
CTX(低)+益气(低)组	20.70±1.25	26.25±1.85	28.30±2.11

注:与模型组比较,▲:*P*<0.05,▲▲:*P*<0.01。

表 2 益气清毒方对小鼠胸腺、脾脏指数和瘤重的影响(n=10, $\bar{x}\pm s$)

组别	瘤重(g)	胸腺指数	脾脏指数
正常对照组		5.175±0.912	4.895±0.901
模型组	1.980±0.529	4.125±1.041	8.834±3.841 ^{###}
CTX 高剂量组	0.470±0.218 ^{▲▲}	1.170±0.710 ^{▲▲}	2.718±0.978 ^{▲▲}
CTX 低剂量组	1.025±0.324 [▲]	1.561±0.576 ^{▲▲}	4.537±1.092 ^{▲▲}
CTX(低)+益气(高)组	0.494±0.299 ^{**}	1.948±0.631 [*]	3.504±0.694
CTX(低)+益气(中)组	0.749±0.159 [*]	2.475±0.749 ^{**}	4.606±1.241
CTX(低)+益气(低)组	0.996±0.575	1.484±0.780	5.936±1.729

注:与正常对照组比较,^{###}:*P*<0.01;与模型组比较,▲:*P*<0.05,▲▲:*P*<0.01;与 CTX 低剂量组比较,^{*}:*P*<0.05,^{**}:*P*<0.01。

表 3 益气清毒方对小鼠外周血细胞的影响(n=10, $\bar{x}\pm s$)

组别	白细胞计数(10 ⁹ /L)	红细胞计数(10 ¹² /L)	血红蛋白(g/L)	血小板计数(10 ⁹ /L)
正常对照组	5.80±0.74	7.85±0.26	130.10±4.46	948.2±78.8
模型组	6.57±2.18	7.77±0.61	126.44±9.79	850.6±124.7
CTX 高剂量组	2.17±0.52 ^{▲▲}	6.94±0.33 [▲]	112.10±6.32 [▲]	318.4±111.9 ^{▲▲}
CTX 低剂量组	3.53±0.67 [▲]	7.17±0.48 [▲]	115.67±6.93 [▲]	618.0±190.3 ^{▲▲}
CTX(低)+益气(高)组	5.10±1.04 [*]	7.30±0.36	116.40±5.73	920.6±117.3 ^{**}
CTX(低)+益气(中)组	4.53±0.43 [*]	6.90±0.34	112.60±5.17	858.4±192.0 [*]
CTX(低)+益气(低)组	4.00±0.97	7.30±0.45	117.80±7.92	764.0±304.9

注:与模型组比较,▲:*P*<0.05,▲▲:*P*<0.01;与 CTX 低剂量组比较,^{*}:*P*<0.05,^{**}:*P*<0.01。

“益气清毒方”是基于“扶正祛邪”的思想创立的。中医认为肿瘤发生的主要病因病机是正气亏虚,以致热毒痰瘀之邪结聚,侵害经络脏腑。其中气虚抗邪乏力是本,而热毒痰瘀结聚是标。因此,治疗上我们主张以益气健中,清毒消瘤为治,在临床上运用于治疗肺癌、胃癌、大肠癌等肿瘤,获得较为满意的疗效。

“益气清毒方”以四君子汤加黄芪益气健脾扶正为基础;伍以半枝莲、白花蛇舌草、藤梨根、浙贝母、金荞麦清毒消瘤,共成扶正抗癌之剂。方中四君子汤之人参、白术、甘草、茯苓组方具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[9,10],能够抑制肿瘤细胞生长^[11,12],调节机体免疫功能^[13],增效减毒^[14,15],延长荷瘤机体生存期^[16]等作用;黄芪具有较好的抗肿瘤^[17]和调节免疫功能^[18]的作用。白花蛇舌草、半枝莲、藤梨根等药不仅可以抑制肿瘤生长,促进肿瘤细胞凋亡,同时还有消除炎症,抑制炎症物质产生的作用^[19-22],浙贝母化痰散结,浙贝母及其生物碱具有较好的多药耐药逆转活性^[23]。诸药配合标本兼顾、正邪并治,扶正而不留邪,攻邪而不伤正,起到相得益彰的效果。

实验结果显示,小鼠注射 CTX 后体重明显下降,而 CTX+益气清毒方组体重下降则不明显;模型组小鼠接种 H₂₂ 肝癌细胞后,胸腺并未明显萎缩,脾脏指数还因此增大,可能是癌细胞刺激引起免疫反应加强造成。益气清毒方既能加强 CTX 的抑瘤作用,缩小肿瘤,减少瘤体重量;又能减轻 CTX 产生的白细胞、血小板下降等不良反应,并一定程度上提高小鼠胸腺和脾脏重量。提示益气清毒方能明显加强 CTX 抗肿瘤作用,抑制 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤生长,减轻 CTX 不良反应,保护机体免疫器官,提高免疫功能。

参考文献:

- [1] 黄兆明,熊墨年.健脾化痰解毒法加化疗治疗晚期大肠癌疗效分析[J].浙江中西医结合杂志,2000,10(6):332-333.
- [2] 熊墨年,于庆兰,唐晓玲,等.三癍促调法治疗中晚期胃癌对照观察[J].中国肿瘤,2006,15(12):883-884.
- [3] 熊墨年,崔宁莉.三癍抑瘤法联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌的临床观察[J].实用新医学,2009,10(4):328-329.
- [4] 熊墨年,熊林楷.益气清毒法加中药静滴治疗晚期大肠癌的临床观察[J].现代肿瘤医学,2010,18(9):1839-1840.
- [5] 熊墨年,唐晓玲,余灵,等.益气清毒法联合化疗治疗中

- 晚期胃癌的临床观察[J].西部中医药,2011,24(11):90-93.
- [6] 熊墨年,熊林楷.益气清毒化痰法治疗晚期肿瘤 15 例临床观察[J].临床医药实践,2008,1(9):699-701.
- [7] 熊墨年,唐晓玲,余灵,等.益气清毒化痰法治疗中晚期胃癌 30 例[J].陕西中医,2012,33(1):7-10.
- [8] He W,Sun H,Yang B,et al. Immunoregulatory effects of theherba epimediia glycoside icariin [J].Drug Res, 1995,45(8):910-913.
- [9] 赵爱光,杨金坤,赵海磊,等.四君子汤诱导裸鼠移植性人胃癌细胞凋亡的初步研究[J].癌症,2001,20(2):132-133.
- [10] 李传刚,李墨林,舒晓宏,等.四君子汤通过 Fas 受体诱导小鼠膀胱癌细胞凋亡[J].肿瘤防治杂志,2005,12(20):1539-1541.
- [11] 陶正鹏,冯秋珍,徐建民,等.四君子汤含药血清抑癌作用的实验研究[J].湖北中医杂志,2006,28(9):879-880.
- [12] 席与斌,吴允孚,陈刚.四君子汤抗胃癌活性部位配伍作用及其对细胞周期的影响[J].中国中西医结合消化杂志,2012,20(1):26-29.
- [13] 温庆祥,古颖.四君子汤对脾虚患者免疫功能的影响[J].北京中医,2006,25(4):239-240.
- [14] 李传刚,刘用楫,贺瑞麟,等.三氧化二砷配伍四君子汤治疗小鼠膀胱癌的实验研究[J].中华中医药学刊,2002,20(5):421-423.
- [15] 裘维焰,魏克民,李践,等.四君子汤增强生物反应调节因子抗肿瘤作用的实验研究[J].中国中医药科技,2007,14(2):82-83.
- [16] 王玉荣,王泽时.加味四君子汤抗小鼠宫颈癌作用的实验研究[J].山西中医学院学报,2003,4(4):375-376.
- [17] 田寅,王博,石磊,等.黄芪水煎剂对荷瘤小鼠抗肿瘤的的实验研究[J].黑龙江医药科学,2012,35(1):109.
- [18] 高旭,李丽芬,刘斌钰,等.黄芪多糖对小鼠免疫功能影响的实验研究[J].山西大同大学学报(自然科学版),2010,26(4):42-44.
- [19] 曾永长,梁少瑜,罗佳波,等.白花蛇舌草提取物(HDNF)体内外抗肿瘤实验研究[J].中药材,2011,34(4):594-597.
- [20] 王凤鸣,沈一平.白花蛇舌草抗肿瘤的的实验研究及临床运用进展[J].深圳中西医结合杂志,2011,21(5):305-307.
- [21] 宋增芳,廖月霞,肖炜明,等.半枝莲水提取物调节肿瘤 VEGF /DC 实验研究[J].实用临床医药杂志,2011,15(19):1-5.
- [22] 王岚,康琛,杨伟鹏,等.藤梨根正丁醇提取物和总黄酮苷抗肿瘤作用研究[J].中国中药杂志,2010,35(16):2184-2186.
- [23] 李冬云,郑智,侯丽,等.复方浙贝母药物血清抑制 L1210/CDDP 细胞增殖与诱导凋亡研究[J].现代生物医学进展,2009,9(13):2413-2416.