

## 鸦胆子油抗肿瘤作用时间药理学研究

李滨萍, 王颖彦, 肖焕\*, 王俏玲, 骆梅娟, 陈文珠, 谢土养  
(广东省中医院, 广州 510120)

**[摘要]** **目的:**探索鸦胆子油抗肿瘤作用的时辰用药规律,为临床肿瘤治疗学提供一定的实验依据。**方法:**昆明种小鼠72只,雌雄各半,分成6组,分别为正常组,模型组,环磷酰胺组(20 mg·kg<sup>-1</sup>),鸦胆子油上午6点给药组,下午2点给药组,下午10点给药组(6 am 给药组,2 pm 给药组,10 pm 给药组),鸦胆子油 ip 鸦胆子油乳 5 mL·kg<sup>-1</sup>,除正常组外,制备肝癌 H 22 荷瘤小鼠动物模型,连续给药 10 d 后,眼球取血,分离血清,测定丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),总蛋白(TP),尿素氮(BUN)和血肌酐(SCr)等肝肾评价指标,脱颈椎处死,剥离肿瘤、胸腺、脾脏、肾脏、肝脏,称质量,计算抑瘤率及其脏器指数,并采用光镜观察肉瘤组织病理变化。**结果:**与模型组比较,鸦胆子油 6 am,2 pm,10 pm 给药组能显著抑制瘤重( $P < 0.01$ ),抑瘤率分别为 34.98%,39.92%,42.80%,能够显著提高肝、肾、脾、胸腺的指数( $P < 0.01$ ),以 2 pm,10 pm 给药组作用最好,能够降低 ALT,AST,TP,UNB,SCr 的含量,其中 10 pm 给药组 ALT,TP,SCr 的含量降低最为明显( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),2 pm 给药组 AST,BUN 含量降低最为明显( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ );组织病理结果显示,模型组肉瘤组织坏死区域较大,3 个给药组均可减少肉瘤细胞坏死区,以 10 pm 给药组最为明显。**结论:**鸦胆子油具有一定的抗肿瘤和保护肝肾的作用,而其疗效和毒副作用受给药时间的影响,以 10 pm 给药效果最佳,副作用较少。

**[关键词]** 鸦胆子油; H 22 荷瘤小鼠; 抗肿瘤; 时间药理学

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0150-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200150

**The Research of Time Pharmacology of Anti-tumor Effect for Bruceae Fructus Oil** LI Bin-ping, WANG Ying-yan, XIAO Huan\*, WANG Qiao-ling<sup>1</sup>, LUO Mei-juan, CHEN Wen-zhu, XIE Tu-yang (Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the medication rules of Bruceae Fructus oil for anti-tumor effect and provide some experimental basis for clinical treatment of cancer. **Method:** Seventy-two Kunming mice, half male and half female, were divided into 6 groups: normal group, model group, cyclophosphamide group (20 mg·kg<sup>-1</sup>), Bruceae Fructus oil 6 am administration group, 2 pm administration group, and 10 pm ministration group. Bruceae Fructus oil groups received oil emulsion 5 mL·kg<sup>-1</sup>. All other groups except normal group prepared hepatoma H 22 tumor-bearing mice as animal models. After 10 d of continuous oral administration, blood samples were taken from eyeball and serum was separated to determine the content of alanine amino transferase (ALT), aspartate amino transferase (AST), total protein (TP), urea nitrogen (UNB), serum creatinine (SCr) and other liver and kidney evaluation indexes. Mice were sacrificed by cervical dislocation, and their tumors, thymus, spleen, kidney, and liver were isolated for weighing. The tumor inhibitory rate and organ index were calculated then, and light microscopy was used to observe histopathological changes of sarcoma tissues. **Result:** Compared with model group, Bruceae Fructus oil 6 am, 2 pm, and 10 pm groups could significantly inhibit tumor weight ( $P < 0.01$ ) and its inhibition rate was 34.98%, 39.92% and 42.80% respectively, and could significantly improve the liver, kidney, spleen, and thymus indexes ( $P < 0.01$ ). 2 pm, 10 pm administration groups achieved best results, and could reduce the content of ALT, AST, TP, BUN, SCr, wherein 10 pm administration group could most reduce ALT, TP, and SCr ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and 2 pm administration group could most reduce AST,

**[收稿日期]** 20140927(003)

**[基金项目]** 广东省中医药局科研项目(20121181)

**[第一作者]** 李滨萍,主管药师,从事医院药学工作,Tel:020-81887233,E-mail:libinping2012@gmail.com

**[通讯作者]** \*肖焕,硕士,副主任药师,从事医院药学工作,Tel:13925026309,E-mail:670985723@qq.com

BUN ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The histopathological results showed that the model group had larger necrosis area for sarcoma tissues, and three treatment groups can reduce necrosis area of sarcoma cells, with 10 pm administration group most obvious. **Conclusion:** Bruceae Fructus oil has some anti-tumor effect and protects the liver and kidney function, and its efficacy and side effects were affected by administration time. 10 pm administration group has the best results and fewer side effects.

**[Key words]** Bruceae Fructus oil; H22 tumor-bearing mice; anti-tumor; chronopharmacology

鸦胆子油为苦木科植物鸦胆子的干燥成熟果实中提取得到的脂肪油<sup>[1]</sup>。主要含有三油酸甘油酯、非皂化物、皂化物及油酸、亚油酸等成分<sup>[2]</sup>,其中油酸、亚油酸与肿瘤细胞膜有特异的亲和力,具有很强的抗癌活性,三油酸甘油酯虽不具有抗癌活性,但可水解得到油酸<sup>[3]</sup>。临床上,鸦胆子油不仅用于治疗多种恶性肿瘤,还可用于治疗慢性胃炎、结肠炎和尖锐湿疣等非肿瘤疾病,与化疗药合用可提高疗效,毒副反应少<sup>[1]</sup>。而时间生物学研究表明,生物体内存在与外环境周期性变化相适应的时间调控机制,使机体的许多生理、生化功能具有一定的周期节律性,并导致许多组织、器官、系统对药物的敏感性呈用药时间依赖性变化,其中以昼夜节律尤为多见<sup>[4-5]</sup>。因此,在 1 d 不同时间给药,药物的疗效及不良反应可能会有明显的差异。目前,鸦胆子油抗肿瘤作用的时间药理学研究尚未见报道,本研究将根据传统医学“择时用药”原则,探索鸦胆子油抗肿瘤作用与时辰给药的规律,确定出最佳的给药时间,为临床肿瘤治疗学提供一定药理实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 昆明种小鼠雌雄各半,8~12 周龄,体重 18~22 g,购自广东省中医药科学院实验动物中心,动物合格证号 SCXK(粤)0001290。

**1.2 药物及试剂** 小鼠腹水型肝癌 H22 瘤株均购自广东省医学科学院提供,鸦胆子油乳注射剂(广州白云山明兴制药有限公司,批号 120404),环磷酰胺(山西普德药业股份有限公司,批号 014120706)。

## 1.3 仪器

## 2 方法

**2.1 鼠肝癌 H22 模型的建立** 将冻存 H<sub>22</sub> 细胞复苏,传代,以无菌生理盐水将处于对生长期 H22 细胞稀释,调整细胞密度为  $1.0 \times 10^7/\text{mL}$ ,取 0.2 mL 注入昆明小鼠腹腔,6~8 d 成腹水,无菌条件下用 5 mL 注射器抽吸除 1~2 mL 牛奶状、较黏稠的腹水,先用 0.4% 台盼蓝染色,计数活细胞率 > 90%,再用灭菌 0.9% 生理盐水稀释,于倒置显微镜下计数后将密度调整至  $1 \times 10^7/\text{mL}$ ,每只小鼠取 0.2 mL

细胞悬液接种于右侧腋后线皮下,观察肿瘤生长,选取肿瘤生长良好、腹部隆起明显的小鼠,抽取腹水生长良好小鼠腹水为瘤源,作为传代的瘤种。用 1640 培养液调整荷瘤小鼠的乳白色癌性腹水至细胞密度为  $(2 \sim 3) \times 10^6/\text{mL}$  以作建立实体型肝癌小鼠模型使用。

**2.2 动物给药与分组** 选取昆明种小鼠 72 只,雌雄各半,分成 6 组,分别为正常组,模型组,环磷酰胺组,鸦胆子油上午 6 点给药组,下午 2 点给药组,下午 10 点给药组(6 am 给药组,2 pm 给药组,10 pm 给药组),每组各 12 只,称重并标记每只小鼠。给药组分别于上午 6 点,下午 2 点,下午 10 点等 3 个时间 *ip* 鸦胆子油乳  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ;环磷酰胺组 *ip* 环磷酰胺  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ;正常组、模型组分别注射生理盐水  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,1 次/d,每天观察各组小鼠进食、饮水、活动情况及皮毛变化,每天称体重 1 次,以便调整给药剂量,连续给药 10 d,停药,于末次给药禁食 24 h,小鼠眼眶取血,分离血清,按照试剂盒方法测定肝肾指标,颈椎脱臼处死。

**2.3 计算抑瘤率和脏器指数** 小鼠于末次给药禁食 24 h,称鼠体重,眼眶取血后,颈椎脱臼处死,剥离肿瘤称瘤重,按下式计算抑瘤率。以无菌操作取下脾脏、胸腺、肾脏、肝脏,电子天平称量,并按下式计算其脏器指数。

$$\text{抑瘤率} = C - T/C \times 100\%$$

式中:C 为正常组平均瘤重(mg);T 为实验组平均瘤重(mg)

$$\text{脏器指数} = \text{内脏各器官质量}(\text{mg})/\text{终体重}(\text{g})$$

**2.4 肝、肾功能指标的检测** 小鼠于末次给药禁食 24 h,眼球取血,1 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,分离血清,用试剂盒测血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),总蛋白(TP),尿素氮(BUN)和血肌酐(SCr)的含量。

**2.5 小鼠 H22 肉瘤组织病理学观察** 小鼠肿瘤组织,于 4℃ 下,切成大小为  $1 \text{ mm}^2 \times 3 \text{ mm}$  的小块 3~4 块,戊二醛固定,石蜡包埋切片,常规 HE 染色,光镜观察肉瘤组织病理变化。

### 3 结果

**3.1 小鼠一般情况观察** 实验过程中,正常组小鼠体质量自然增加,行动敏捷,食欲正常,皮毛密集有光泽;模型组、环磷酰胺组小鼠精神萎靡,动作迟缓,皮毛干涩,蓬松灰暗,食欲欠佳,体质量增长缓慢或不增长,尤以雌性小鼠明显,部分小鼠出现间歇震颤;不同时间给药组,小鼠精神、毛色及进食量均好于模型组,其中以 10 pm 给药组精神状态的较好,没有出现间歇震颤的现象。

**3.2 对 H22 肉瘤小鼠瘤重和脏器指数的影响** 3 个给药组的抗肿瘤作用虽不如环磷酰胺组 ( $P < 0.01$ ),但与模型组比较,6 am,2 pm,10 pm 给药组瘤重明显降低 ( $P < 0.01$ ),其抑瘤率分别为 34.98%,39.92%,42.80%,说明鸦胆子油具有一定的抗肿瘤作用,以 10 pm 给药组的抗肿瘤作用较强。见表 1。与模型组比较,环磷酰胺组肝脏指数、肾脏指数、脾脏指数、胸腺指数均有不同程度的降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );6 am,2 pm,10 pm 等给药组 4 个脏器指数也低于模型组,但明显高于环磷酰胺组 ( $P < 0.01$ ),其中 2 pm 给药组中肝脏、肾脏指数最高,10 pm 给药组中脾脏、胸腺指数最高。见表 2。

**3.3 对小鼠血清中 ALT,AST,TP,BUN,SCr 含量的**

表 1 鸦胆子油乳对 H22 肝癌小鼠肿瘤的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 1 Effects of Bruceae Fructus oil on inhibition of H22 liver cancer tumors in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量 /mL·kg <sup>-1</sup>	瘤重 /g	抑瘤率 /%
模型	-	2.43 ± 0.45	-
环磷酰胺	20	1.02 ± 0.29 <sup>2)</sup>	58.02
6 am 给药	5	1.58 ± 0.36 <sup>2,4)</sup>	34.98
2 pm 给药	5	1.46 ± 0.25 <sup>2,4)</sup>	39.92
10 pm 给药	5	1.39 ± 0.32 <sup>2,4)</sup>	42.80

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与环磷酰胺组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (表 2 同)。

**影响** 与正常组比较,模型组中 ALT,AST,TP,BUN,SCr 的含量明显升高 ( $P < 0.01$ ),说明建模成功;与模型组比较,环磷酰胺组及 3 个给药组中 5 个检测指标均有不同程度降低,其中 ALT,AST,SCr 降低最大 ( $P < 0.01$ );与环磷酰胺组比较,6 am,2 pm,10 pm 等给药组中 5 个检测指标也有所降低,其中 10 pm 给药组中 ALT ( $P < 0.01$ ),TP ( $P < 0.05$ ),SCr ( $P < 0.01$ ) 的含量降低最为明显,6 pm 给药组中 AST ( $P < 0.01$ ),BUN ( $P < 0.05$ ) 含量降低最为明显。见表 3。

表 2 鸦胆子油乳对荷 H22 肝癌小鼠脏器指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 2 Effects of Bruceae Fructus oil on visceral index in mice of H22 liver cancer tumors ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/mL·kg <sup>-1</sup>	肝脏指数/mg·g <sup>-1</sup>	肾脏指数/mg·g <sup>-1</sup>	脾脏指数/mg·g <sup>-1</sup>	胸腺指数/mg·g <sup>-1</sup>
模型	-	52.18 ± 6.03	12.43 ± 2.65	6.22 ± 1.63	2.90 ± 0.85
环磷酰胺	20	44.61 ± 4.78 <sup>2)</sup>	10.09 ± 2.46 <sup>1)</sup>	3.85 ± 1.82 <sup>2)</sup>	1.79 ± 0.76 <sup>2)</sup>
6 am 给药	5	51.36 ± 6.30 <sup>1,4)</sup>	11.42 ± 1.75 <sup>1,3)</sup>	5.72 ± 2.69 <sup>1,4)</sup>	2.96 ± 1.33 <sup>4)</sup>
2 pm 给药	5	53.54 ± 4.71 <sup>1,4)</sup>	12.59 ± 2.14 <sup>4)</sup>	5.55 ± 2.73 <sup>1,4)</sup>	3.21 ± 0.95 <sup>1,4)</sup>
10 pm 给药	5	52.06 ± 5.60 <sup>4)</sup>	11.73 ± 2.25 <sup>3)</sup>	5.93 ± 2.97 <sup>1,4)</sup>	3.32 ± 1.03 <sup>1,4)</sup>

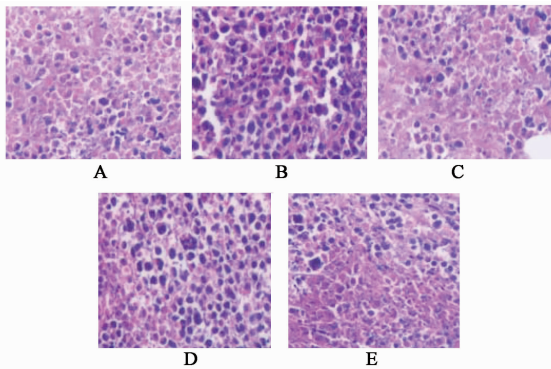
表 3 鸦胆子油乳对荷 H22 肝癌小鼠肝、肾指标的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 3 Effects of Bruceae Fructus oil on index of liver and kidney in mice of H22 liver cancer tumors ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/mL·kg <sup>-1</sup>	ALT/U·L <sup>-1</sup>	AST/U·L <sup>-1</sup>	TP/μg·mL <sup>-1</sup>	BUN/mmol·L <sup>-1</sup>	SCr/μmol·L <sup>-1</sup>
正常	-	45.89 ± 13.06	88.56 ± 20.62	47.62 ± 3.25	6.08 ± 0.94	30.89 ± 1.05
模型	-	132.25 ± 38.29 <sup>2)</sup>	230.50 ± 71.29 <sup>2)</sup>	52.58 ± 3.27 <sup>2)</sup>	8.78 ± 1.51 <sup>2)</sup>	45.13 ± 1.46 <sup>2)</sup>
环磷酰胺	20	87.13 ± 17.77 <sup>4,6)</sup>	174.38 ± 34.14 <sup>4)</sup>	56.39 ± 4.09 <sup>3)</sup>	8.68 ± 1.16	50.63 ± 0.74 <sup>4)</sup>
6 am 给药	5	61.84 ± 16.52 <sup>4,6)</sup>	153.75 ± 46.11 <sup>4,6)</sup>	52.01 ± 3.00 <sup>5)</sup>	7.08 ± 1.04 <sup>3,5)</sup>	43.50 ± 1.20 <sup>3,6)</sup>
2 pm 给药	5	58.78 ± 15.29 <sup>4,6)</sup>	163.88 ± 49.56 <sup>4,6)</sup>	53.33 ± 4.17 <sup>5)</sup>	7.24 ± 0.98 <sup>3,5)</sup>	44.88 ± 1.13 <sup>6)</sup>
10 pm 给药	5	58.10 ± 16.37 <sup>4,6)</sup>	162.63 ± 53.61 <sup>4,6)</sup>	51.04 ± 3.56 <sup>3,5)</sup>	7.14 ± 1.11 <sup>3,5)</sup>	42.88 ± 1.73 <sup>3,6)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ;与环磷酰胺组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>6)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.4 对 H22 肝癌小鼠组织病理学的影响** 经 HE 染色后镜下观察,可见瘤组织呈巢状或片状生长。肿瘤细胞密集排列,细胞大小不同,形态各异;细胞核大小不一,核质比例增大;染色质呈颗粒状,分布不均匀,可见不对称性,多极性核分裂等病理性核分裂象。模型组肿瘤细胞生长旺盛,核固缩较少,片状坏死区面积较小,环磷酰胺组也发现大片的细胞坏死区;6 am,2 pm,10 pm 给药组可见不同程度的片状坏死区,瘤组织内及其周围微血管均减少,其中以 10 pm 给药组的瘤组织坏死区最少。见图 1。



A. 模型组;B. 环磷酰胺组;C. 6 am 给药组;D. 2 pm 给药组;E. 10 pm 给药组

图 1 鸦胆子油乳对小鼠 H22 肝癌肉瘤组织病理学的影响 (HE, ×400)

Fig.1 Effects of Bruceae Fructus oil on sarcoma tissue pathology in mice of H22 liver cancer tumors (HE, ×400)

#### 4 讨论

中医学有悠久的“因时制宜”和“择时用药”的理论和实践,但迄今仍停留在经验性阶段,缺乏实验依据和实证。本研究根据临床常规的给药时间设计了 6 am,2 pm,10 pm 等 3 个时间段,通过测定其抑

瘤率大小,肝、肾、脾和胸腺指数大小,同时测定 ALT,AST,TP,BUN,SCr 等肝肾指标,考察其抗肿瘤及保护肝肾功能的作用,综合评价不同时间段(昼夜)药效及毒副作用的大小,优选出最佳的给药时间,为临床肿瘤的治疗提供一定的实验依据。

实验结果表明,鸦胆子油 6 am,2 pm,10 pm 抑瘤作用虽比环磷酰胺作用差,但其能够明显提高肝、肾、脾和胸腺指数,降低 ALT,AST,TP,BUN,SCr 等肝肾指标,具有保护肝肾的作用,提高机体免疫,通过比较 6 am,2 pm,10 pm 给药时间的抗肿瘤作用,结果经过综合分析,10 pm 给药的作用最佳,该时间的抑瘤作用最高,毒副作用较小,能过明显改善小鼠的生存质量。说明鸦胆子油抗肿瘤作用具有一定的“时辰节律性”,临床上应结合其疗效及副作用的大小,确定最佳的给药时间,降低副作用,提高病人的生存质量。

#### [参考文献]

- [1] 林宏英,吴建梅,张文生. 鸦胆子油的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(4):65-69.
- [2] 程富胜,辛蕊华,罗永江,等. 中药鸦胆子有效成分现代医学与临床应用研究[J]. 中兽医医药杂志,2009,6(增刊):22-23.
- [3] 王奇,芦柏震. 鸦胆子及其制剂的药理作用与临床应用[J]. 海峡药学,2012,24(1):49-51.
- [4] 何绍雄. 时间药理学与时间治疗学[M]. 天津:天津科学技术出版社,1994,5-7,37,44,259-260.
- [5] 韩军,宋建国. 鸡鸣散镇痛抗炎作用及其机理的时间药理学实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(9):63-68.

[责任编辑 周冰冰]