

# 复方乌骨藤胶囊对 Lewis 肺癌小鼠 TNF- $\alpha$ , NK 活性的影响

张晓双<sup>1,2</sup>, 孙建宁<sup>1\*</sup>, 宋延平<sup>3</sup>, 张恩户<sup>2</sup>

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046;  
3. 陕西省中医药研究院, 西安 710003)

**[摘要]** 目的: 观察复方乌骨藤胶囊对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和自然杀伤细胞 (NK) 活性的影响。方法: 取 C57 BL/6 雄性小鼠 50 只, 常规接种 Lewis 肺癌, 24 h 内随机分为 5 组: 荷瘤对照组、环磷酰胺组 (CTX, 0.02 g·kg<sup>-1</sup>) 和复方乌骨藤胶囊高、中、低剂量组 (2.25, 1.125, 0.563 g·kg<sup>-1</sup>)。每天 ig 给药 1 次, 连续给药 12 d。末次给药后次日, 处死小鼠, 剥离肿瘤, 称重后计算抑瘤率, 取脾脏制备脾细胞悬液, 检测 TNF- $\alpha$ , NK 的活性。结果: 复方乌骨藤胶囊高、中剂量组抑瘤率分别达到 31.43%, 22.38%; 与荷瘤对照组 TNF- $\alpha$  细胞毒指数 (45.79  $\pm$  7.01)% 相比, 复方乌骨藤胶囊 2.25, 1.125 g·kg<sup>-1</sup> 组的 TNF- $\alpha$  细胞毒指数 (60.48%  $\pm$  8.29)%, (56.00  $\pm$  9.72)%, 显著提高 ( $P < 0.005$ ,  $P < 0.01$ ); 与荷瘤对照组 NK 细胞杀伤率 (10.37  $\pm$  21.33)% 相比, 复方乌骨藤胶囊高、中、低剂量组的 NK 细胞杀伤率 (32.23  $\pm$  24.03)%, (35.22  $\pm$  12.67)%, (26.70  $\pm$  12.11)%, 显著提高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 结论: 复方乌骨藤胶囊对 Lewis 肺癌小鼠具有抑瘤作用, 并能够增强其 TNF- $\alpha$  和 NK 细胞活性, 从而提高荷瘤小鼠的免疫功能。

**[关键词]** 复方乌骨藤胶囊; 抑瘤率; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 自然杀伤细胞

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0220-04

## Effect of Compound Wuguteng Capsule on TNF- $\alpha$ , NK activity in Mice with Lewis Lung Cancer

ZHANG Xiao-shuang<sup>1,2</sup>, SUN Jian-ning<sup>1\*</sup>, SONG Yan-ping<sup>3</sup>, ZHANG En-hu<sup>2</sup>

(1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;  
2. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China;  
3. Shaanxi Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of compound Wuguteng capsule on tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), natural killer cell (NK) activity of in mice with Lewis lung cancer. **Method:** Fifty C57 BL/6 male mice of vaccination Lewis lung cancer were randomly divided into five groups within 24 hours, tumor-bearing control group, Cyclophosphamide group (CTX, 0.02 g·kg<sup>-1</sup>), Compound Wuguteng capsule large, medium and small dose groups (2.25, 1.125, 0.562 5 g·kg<sup>-1</sup>). give medicine, once a day, for 12 days, the next day after the last time given medicine, put to death mice, strip and weigh the neoplasm, calculate the tumor inhibition rate, take the spleen preparation splenic cell suspension liquid, detection of TNF- $\alpha$ , NK activity. **Result:** Tumor inhibiting rate of compound Wuguteng capsule 2.25, 1.125 g·kg<sup>-1</sup> dose group was 31.43% and 22.38%. Compared with tumor-bearing control group, TNF- $\alpha$  cytotoxic index (45.79  $\pm$  7.01)%, compound Wuguteng capsule 2.25, 1.125 g·kg<sup>-1</sup> dose group of cytotoxic index (60.48%  $\pm$  8.29)%, (56.00  $\pm$  9.72)%, are significantly improved ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). Compared with tumor-bearing control group, NK cell kill rate (10.37  $\pm$  21.33)%, compound Wuguteng capsule 2.25, 1.125, 0.562 5 g·kg<sup>-1</sup> dose group of NK cell kill rate (32.23  $\pm$  24.03)%, (35.22  $\pm$  12.67)%, (26.70  $\pm$  12.11)%, are significantly improved ( $P < 0.01$ ,  $P <$

**[收稿日期]** 20120913(002)

**[第一作者]** 张晓双, 博士研究生, 讲师, E-mail: sxzyxyzs @ 126.com

**[通讯作者]** \* 孙建宁, 教授, 博士研究生导师, Tel: 010-84738627, E-mail: jn\_sun@ sina.com

0.05)。 **Conclusion:** Compound Wuguteng capsule has inhibitory effect on tumor in mice with Lewis lung cancer, enhance TNF- $\alpha$  and NK activity so as to improve the immune function of mice tumor-burdened.

[ **Key words** ] compound Wuguteng capsule; tumor inhibiting rates; TNF- $\alpha$ ; NK

复方乌骨藤胶囊由乌骨藤、半枝莲、桔梗等组成的中药复方制剂,具有益气扶正,清热解毒,活血消癥之功效。临床用于治疗中晚期肺癌、肝癌、食道癌、胃癌等有显著疗效,尤其对晚期非小细胞肺癌治疗效果显著。临床观察表明,复方乌骨藤胶囊对中晚期肺癌和肺癌化疗期及化疗后康复期,具有改善临床症状,减轻化疗毒副作用,提高生活质量,降低复发转移,延长肺癌患者生存期作用。复方乌骨藤胶囊的前期研究表明对多种肿瘤均具有抑制作用<sup>[1-3]</sup>,为了进一步证实其对肺癌的抑瘤作用,探讨其抗肿瘤作用机制,以小鼠 Lewis 肺癌为模型,研究复方乌骨藤胶囊对荷瘤小鼠的抑瘤作用,并观察其对肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和自然杀伤细胞(NK)的影响,从而为临床运用提供充分的实验依据。

## 1 材料

**1.1 药物** 复方乌骨藤胶囊,由乌骨藤、半枝莲、黄芪、三七、桔梗 5 味组成。杨凌无为制药有限公司生产,批号 20080808;注射用环磷酰胺(CTX),江苏恒瑞医药股份有限公司生产,批号 08040321。

**1.2 动物** C57 BL/6 小鼠,SPF 级,体质量 18~22 g,中国人民解放军第四军医大学,许可证号 SCXK(军)2007-007。

**1.3 瘤株** Lewis 肺癌细胞株及 L929 细胞株,由中国军事医学科学院引进。

**1.4 试剂** 标准胎牛血清(中国医学科学院生物工程研究所生产),二甲基亚砷(DMSO,美国 SoLarbio 公司生产),刀豆蛋白 A(ConA)、四甲基偶氮唑盐(MTT)、胰蛋白酶消化液(均为西安舟鼎国生产),RPMI-1640(Gbico 公司)。

**1.5 仪器** BS210S 电子天平(北京赛多利斯天平厂),普通光学显微镜(Olympus),计数池(上海仪器厂),SW-CJ-2D 型双人净化工作台(苏州净化设备有限公司),TDZ4-WS 台式低速自动平衡离心机(湘仪离心机仪器有限公司),Heraeus CO<sub>2</sub> 恒温培养箱, BIO-RAD Model 680 型酶标仪(日本产)。

## 2 方法

**2.1 造模、分组、给药** 取生长 10~14 d,且健康状况较佳的 Lewis 肺癌肿瘤小鼠,脱颈椎处死,在洁净工作台内无菌操作,取瘤块研磨,沙网过滤(200 目)制备瘤细胞悬液( $1 \times 10^7$ /mL),备用。于右前肢腋

窝皮下接种 C57 BL/6 小鼠 50 只,雄性,接种量 0.2 mL/只(即  $2 \times 10^6$  个瘤细胞)。24 h 内随机分为 5 组:荷瘤对照组、CTX 组( $0.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )和复方乌骨藤胶囊高、中、低剂量组( $2.25, 1.125, 0.5625 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,相当临床用量的 36,18,9 倍)。每天 ig 给药 1 次,给药体积  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,连续给药 12 d,荷瘤对照组给予同体积蒸馏水。

## 2.2 指标检测

**2.2.1 抑瘤率** 末次给药后次日,称体重后处死小鼠,解剖取瘤称重,计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = (\text{对照组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}) / \text{对照组平均瘤重} \times 100\%$$

**2.2.2 TNF- $\alpha$  活性的测定**<sup>[4]</sup> 取脾脏,研磨,沙网过滤(200 目),加入红细胞裂解液,裂解 3 min,  $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,弃上清,生理盐水冲洗 2 次,  $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,用 RPMI-1640 培养液调细胞密度为  $5 \times 10^6$ /mL,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养,备用<sup>[5]</sup>。将制备的小鼠脾细胞悬液用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液调整细胞密度为  $1 \times 10^6$ /mL,接种于 24 孔培养板,每孔 500  $\mu\text{L}$ ,每孔再加终质量浓度为  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 ConA,500  $\mu\text{L}$ /孔,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 48 h 后,吸出细胞培养上清,  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min,取上清液,备用。将生长良好的 L<sub>929</sub> 细胞用 0.25% 胰酶消化液消化,用 RPMI-1640 培养液配制成  $4 \times 10^5$ /mL,接种于 96 孔培养板 100  $\mu\text{L}$ /孔,同时将待测样品也加入培养板 100  $\mu\text{L}$ /孔,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 48 h 后,轻轻吸去上清液 100  $\mu\text{L}$ ,加入 MTT( $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )试液 100  $\mu\text{L}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 2 h 后,  $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,吸弃上清液,每孔加 DMSO 100  $\mu\text{L}$ ,作用 30 min,用酶联免疫检测仪测 570 nm 处的吸收度(A)。记录 A 值,按公式计算细胞毒指数。

$$\text{TNF-}\alpha \text{ 细胞毒指数} = (\text{对照组 } A - \text{实验组 } A) / \text{对照组 } A \times 100\%$$

**2.2.3 NK 细胞活性的测定**<sup>[6]</sup> 将制备的脾细胞悬液调密度为  $3.1 \times 10^6$ /mL。取传代两次且生长良好的靶细胞 L<sub>929</sub>,用培养液调密度为  $1.4 \times 10^5$ /mL,使得效应细胞和靶细胞的比例为 25:1。将两种细胞接种于 96 孔培养板,每只小鼠脾细胞悬液均设 6 孔,其中 5 孔加入效应细胞和靶细胞,各 100  $\mu\text{L}$ ,另

1 孔为效应细胞对照,加入效应细胞和 RPMI-1640 (含 10% 小牛血清),各 100  $\mu\text{L}$ 。同时还设靶细胞对照,加入靶细胞和 RPMI-1640 各 100  $\mu\text{L}$ 。上述各孔于 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  条件杀伤 20 h 后,弃上清,每孔加入 MTT(5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 试液 10  $\mu\text{L}$ ,继续培养 4 h,弃上清,每孔加入 DMSO 100  $\mu\text{L}$ ,振荡 10 min,用酶联免疫检测仪在 570 nm 处 A。记录 A,按公式计算 NK 细胞杀伤率。

$$\text{NK 细胞杀伤率} = (\text{对照组 A} - \text{实验组 A}) / \text{对照组 A} \times 100\%$$

2.3 统计学方法 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS

17.0 统计软件分析,采用方差分析,组间采用  $t$  检验, $P < 0.05$  具有显著性差异。

### 3 结果

3.1 对 Lewis 肺癌小鼠抑瘤率的影响 结果显示,复方乌骨藤胶囊 2.25, 1.125  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量与荷瘤对照组比较,能明显抑制小鼠移植性肺癌瘤体的生长 ( $P < 0.01$ ),抑瘤率分别达到 31.43%, 22.38%,并且呈现出一定的量效关系,2.25  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量对小鼠移植性肺癌的体内抗肿瘤活性已达到抗癌药筛选规程规定的药效标准(抑瘤率  $\geq 30\%$ ),见表 1。

表 1 复方乌骨藤胶囊对 Lewis 肺癌小鼠抑瘤率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	动物数(始/末)	动物体重/ $\text{g}$ (始/末)	瘤重/ $\text{g}$	抑瘤率/%
荷瘤对照	-	10/10	18.66 $\pm$ 0.53/22.66 $\pm$ 1.54	2.10 $\pm$ 0.59	-
CTX	20	10/10	18.72 $\pm$ 0.56/17.48 $\pm$ 1.33 <sup>2)</sup>	0.41 $\pm$ 0.32 <sup>2)</sup>	80.48
复方乌骨藤	2.25	10/10	18.74 $\pm$ 0.58/22.38 $\pm$ 1.15	1.44 $\pm$ 0.45 <sup>2)</sup>	31.43
	1.125	10/10	18.71 $\pm$ 0.56/22.04 $\pm$ 1.49	1.63 $\pm$ 0.71 <sup>2)</sup>	22.38
	0.562 5	10/10	18.72 $\pm$ 0.61/22.50 $\pm$ 1.17	1.98 $\pm$ 0.67	5.71

注:与荷瘤对照组相比<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

3.2 对 Lewis 肺癌小鼠 TNF- $\alpha$  活性的影响 复方乌骨藤胶囊 2.25, 1.125  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  组 TNF- $\alpha$  细胞毒指数升高与荷瘤对照组比较有显著差异 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),表明复方乌骨藤胶囊具有增强小鼠脾脏 TNF- $\alpha$  活性的作用。CTX 组与荷瘤对照组比较,具有降低 TNF- $\alpha$  活性的作用 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

3.3 对 Lewis 肺癌小鼠 NK 细胞活性的影响 复方乌骨藤胶囊 3 个剂量组 NK 细胞杀伤率提高,与荷瘤对照组比较有显著差异 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 复方乌骨藤胶囊对 Lewis 肺癌小鼠脾细胞 TNF- $\alpha$  及 NK 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ ) %

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	TNF 细胞毒指数	NK 细胞杀伤力
荷瘤对照	-	45.79 $\pm$ 7.01	10.37 $\pm$ 21.33
CTX	20	31.37 $\pm$ 7.87 <sup>2)</sup>	6.94 $\pm$ 10.54
复方乌骨藤	2.25	60.48 $\pm$ 8.29 <sup>2)</sup>	32.23 $\pm$ 24.03 <sup>1)</sup>
	1.125	56.00 $\pm$ 9.72 <sup>1)</sup>	35.22 $\pm$ 12.67 <sup>2)</sup>
	0.562 5	47.98 $\pm$ 7.42	26.70 $\pm$ 12.11 <sup>1)</sup>

### 4 讨论

中医学认为,恶性肿瘤的发生与机体正气亏虚密切相关,正气亏虚,邪气乘虚而入就容易导致肿瘤的发生。《医宗必读》曰“积之成者,正气不足,而后邪气踞之也。”另一方面,邪气入内又将进一步影响

机体的正气,导致正气更虚,从而肿瘤会进一步发展或转移。即《内经》所谓“正气存内,邪不可干;邪之所凑,其气必虚。”近年来大量的实验研究证明,中药可以提高肿瘤宿主的免疫功能<sup>[7-8]</sup>。

TNF- $\alpha$  是由单核-巨噬细胞系统分泌的细胞因子,具有多种生物学活性。如能够激活 T 细胞、刺激 B 细胞产生抗体、刺激单核细胞等产生细胞因子、促进白细胞杀死微生物及杀灭肿瘤细胞等功能。其最大特点是能选择性杀伤肿瘤细胞,抑制肿瘤细胞增殖,而不影响正常细胞的生长、分化和代谢功能<sup>[9]</sup>。化疗药 CTX 组 TNF- $\alpha$  细胞毒指数降低,提示化疗药 CTX 对肺癌小鼠有一定的免疫抑制作用;复方乌骨藤胶囊具有增强小鼠脾脏 TNF- $\alpha$  细胞毒指数,增强机体免疫功能,提高对肿瘤细胞生长的抑制作用。

NK 细胞是机体内存在的具有自然杀伤能力的细胞,其细胞毒活力作用发生快,是机体重要的非特异性防御机能之一。NK 细胞能在无任何抗原刺激下,无需补体参与即可破坏溶解靶细胞,可直接诱发免疫反应,并迅速出发分泌大量的细胞因子。化疗药 CTX 组可以抑制肺癌小鼠体内 NK 细胞活性,而 NK 细胞活性的降低,致使肿瘤发生率有所增加,提示 CTX 具有一定的免疫抑制作用,可提高肿瘤发生率。复方乌骨藤胶囊可以提高肺癌小鼠体内 NK 细胞活性,增强免疫,降低肿瘤发生率。

# 脉络宁注射液对脂多糖与角叉菜胶诱导 热毒血瘀证模型大鼠的影响

黎同明\*, 邓敏贞

(广州中医药大学 中药学院, 广州 510006)

**[摘要]** 目的:研究脉络宁注射液对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)与角叉菜胶(carrageenan, Ca)联合诱导“热毒血瘀证”模型大鼠的影响。方法:随机将 50 只 SPF 级 SD 雄性大鼠分为 5 组,即空白对照组,模型对照组和脉络宁低、中、高剂量组(3.75, 15, 30 mg·kg<sup>-1</sup>)。空白对照组和模型对照组腹腔注射等容量的注射用生理盐水,脉络宁低、中、高剂量组分别腹腔注射脉络宁注射液(3.75, 15, 30 mg·kg<sup>-1</sup>),连续 14 d,每天 1 次。给药到 12 d,除空白组外,其余各组大鼠腹腔注射 Ca(50 mg·kg<sup>-1</sup>)16 h 后,再尾静脉注射 LPS(5 μg·kg<sup>-1</sup>),24 h 后大鼠尾部出现淤血现象为模型建立成功。给药第 14 天,禁食 12 h,自由饮水,10% 水合氯醛麻醉大鼠,从腹主动脉取血和取肝、脾。竞争性抑制法检测血清白介素-6(IL-6),固相夹心法检测肿瘤坏死因子-α(TNF-α),检测全血黏度、血浆黏度、血浆凝血酶原时间(PT)和血小板聚集率,光镜下观察肝脏和脾脏的病理变化。结果:与模型组比较,脉络宁各剂量组的 IL-6 和 TNF-α 含量都相应减少( $P < 0.05$ ),全血黏度、血浆黏度和血小板聚集率都降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),血浆凝血酶原时间增长( $P < 0.01$ ),且呈量效依赖变化,肝脏和脾脏的炎症和淤血症状有一定的改善。结论:脉络宁注射液对 LPS/Ca 诱导“热毒血瘀证”模型大鼠的有一定的改善作用。

**[关键词]** 脉络宁注射液; 脂多糖; 角叉菜胶; 热毒血瘀证; 炎症; 血液流变学

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0223-04

## Effect of Mailuoning Injection on Noxious Heat Stasis Syndrome Rat Model Induced by Lipopolysaccharide in Combination with Carrageenan

LI Tong-ming\*, DENG Min-zhen

(Guangzhou University of Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of mailuoning injection on noxious heat stasis syndrome rat

**[收稿日期]** 20120826(012)

**[基金项目]** 广东省自然科学基金项目(K2100027)

**[通讯作者]** \*黎同明,副教授,从事方剂配伍规律与理论及方药药理研究, Tel:020-39358092, E-mail: ltmwqx@yahoo.com.cn

### [参考文献]

- [1] 王晓趁,董银兰,赵岗,等.复方乌骨藤胶囊对恶性肿瘤化疗的增效作用[J].临床医药实践,2010,19(5):594.
- [2] 董银兰,赵岗,宋延平,等.复方乌骨藤胶囊与环磷酰胺合用治疗 Lewis 肺癌研究增效减毒作用[J].陕西医学杂志,2010,39(11):1461.
- [3] 张晓双,宋延平,张恩户.复方乌骨藤胶囊对 60Coy 照射 S180 荷瘤小鼠的增效减毒作用[J].中药药理与临床,2012,28(3):97.
- [4] 徐叔云,卞如瀛,陈修.药理实验方法学[M].3 版.北京:人民卫生出版社,2003:365.
- [5] 陈奇.中药药效研究思路与方法[M].北京:人民卫生出版社,2005:223.
- [6] 王玉炯,张贤,吕玉玲.肿瘤坏死因子的体外诱生及检测[J].甘肃畜牧兽医,1998,28(1):11.
- [7] 张爱琴,马胜林,孙在典,等.康莱特注射液对 Lewis 肺癌小鼠免疫功能的影响[J].浙江中西医结合杂志,2007,17(4):199.
- [8] 贾英杰,李小江,杨佩颖,等.消岩汤不同时段联合化疗对 Lewis 肺癌小鼠免疫功能的影响[J].天津中医药,2010,27(4):312.
- [9] 宁安红,曹倩,黄敏,等.灵芝多糖对荷瘤小鼠免疫系统的影响[J].中国微生态学杂志,2004,16(1):13.

[责任编辑 聂淑琴]