

# 加味四君固本汤与 Iressa 联合用药 对裸鼠移植瘤的影响

朱成全<sup>1</sup>, 曾伟霞<sup>2</sup>, 肖烈钢<sup>1</sup>, 何本夫<sup>1\*</sup>

(1. 中国人民解放军第四二一医院中西医结合科, 广州 510318;

2. 广州朗日生物技术有限公司, 广州 510663)

**[摘要]** **目的:**研究加味四君固本汤对皮下成瘤裸鼠的影响。**方法:**使用人非小细胞肺癌 A549 细胞在裸鼠皮下接种成瘤,随机分成对照组,易瑞沙(Iressa)治疗组( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),中药治疗组(加味四君固本汤  $0.10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),加味四君固本汤和 Iressa 联合治疗组,观察肿瘤生长情况及裸鼠生存质量,并采用免疫印记实验(Western blot)和实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测各组肿瘤中上皮生长因子受体(EGFR)蛋白质与 mRNA 的表达情况。**结果:**西药组、中药组和联合用药组的肿瘤抑制率分别为 55.75%、35.22% 和 82.3%,与对照组比较差异显著( $P < 0.01$ ),联合用药组与单独用药组差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。观察治疗期间裸鼠的运动量、饮食、体重等指标,显示联合用药组裸鼠的生存质量优于西药组。Western Blot 与 RT-PCR 结果显示联合用药组的肿瘤组织中增殖相关的指标明显低于其他 3 组。**结论:**加味四君固本汤与 Iressa 联合用药能更好地抑制肿瘤生长,对肿瘤的治疗效果明显优于 Iressa 组。加味四君固本汤能提高裸鼠治疗过程中的生存质量。

**[关键词]** 加味四君固本汤; 裸鼠; 移植瘤; 生存质量; 非小细胞肺癌

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0263-04

## Effect of Jiawei Sijun Guben Decoction with Iressa on Human Non Small Cell Lung Cancer Cell A549 Xenograft Model

ZHU Cheng-quan<sup>1</sup>, ZENG Wei-xia<sup>2</sup>, XIAO Lie-gang<sup>1</sup>, HE Ben-fu<sup>1\*</sup>

(1. Department of Integrated Chinese and Western Medicine, PLA 421 Hospital, Guangzhou 510318, China;

2. Laura Biotech Co, Ltd., Guangzhou 510663, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Jiawei Sijun Guben Decoction with iressa on human non small cell lung cancer cell A549 xenograft model. **Method:** Subcutaneous A549 xenograft nudemice were divided into 4 groups randomly: control group (treated with glucose solution), Western medicine treatment (WMT) group (Iressa,  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), Chinese medicine treatment (CMT) group (Jiawei Sijun Guben decoction,  $0.10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and Combined treatment (CT) group (Jiawei Sijun Guben decoction + Iressa). Tumor growth and life quality of tumor-bearing nude mice were observed. Western blotting and RT-PCR were used to detect the mRNA and protein expression of EGFR. **Result:** The tumor volumes of WMT, CMT and CT groups decreased greatly compared with control group, the inhibitory rate of tumor of was 55.75%, 35.22% and 82.3% respectively ( $P < 0.01$ ). And the significant difference of tumor volumes in CT group was also showed compared with WMT and CMT group respectively ( $P < 0.01$ ). Life quality (amount of exercise, diet and body weight) of CT group was better than that of WMT group. EGFR protein and mRNA expression in tumor tissue of CT group were significantly lower than those of other groups. **Conclusion:** Jiawei Sijun Guben decoction plus Iressa therapy could inhibit tumor growth more effectively, which led to better treatment effect instead of using Iressa treatment alone. Jiawei Sijun

**[收稿日期]** 20120208(010)

**[基金项目]** 全军医学科学技术研究“十一五”计划课题(06MA124)

**[第一作者]** 朱成全, 博士, 主任医师, 从事中西医结合, Tel: 020-61636364, E-mail: zcqdjp@sina.com

**[通讯作者]** \* 何本夫, 博士, 副主任医师, 从事肿瘤的研究和治疗, Tel: 13828488978, E-mail: hebenfu@126.com

Guben decoction therapy could greatly improve life quality of tumor-bearing nude mice during the treatment.

**[Key words]** Jiawei Sijun Guben decoction; Nude mice; xenograft; life quality; non small cell lung cancer

目前癌症的治疗方法主要是依靠化疗,但化疗本身没有区别癌细胞和正常细胞的能力,往往在消灭癌细胞的同时也伤害了正常的细胞,对患者的身体造成巨大的伤害,使患者在治疗过程中生活质量严重下降。加味四君固本汤在中医上具有扶正固本的功效。之前的研究发现,加味四君固本汤配合化疗对末期恶性肿瘤中的治疗效果比单纯的化疗要好,并且能显著提高患者在治疗过程中的生活质量<sup>[1]</sup>。但中药成分复杂,不容易找出其治疗作用机制,许多可以治疗癌症的中草药方因为缺乏理论依据而不被认同。非小细胞肺癌中表皮生长因子受体(EGFR)的过度表达和活化与肿瘤增殖、分化和转移密切相关。EGFR被认为是治疗非小细胞肺癌的重要靶点<sup>[2,7-8]</sup>。我们的前期实验研究发现,加味四君固本汤对肺癌的治疗很可能通过EGFR介导作用。本实验通过观察对比加味四君固本汤与针对EGFR的分子靶向药物Iressa对肝癌细胞裸鼠移植瘤的抑制效果,并检测肿瘤组织中EGFR的表达情况,为加味四君固本汤治疗肿瘤提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雄性BALB/c Nude小鼠42只,体重18~20g,南方医科大学实验动物研究所提供,实验动物使用许可证号SYXK(粤)200820009。动物饲料为60℃灭菌的SPF级大小鼠维持饲料。动物饲养和实验全程均在SPF级动物实验室中进行。

**1.2 仪器和试剂** Thermo Scientific Series 8 000 CO<sub>2</sub>培养箱(美国Thermo),EPS300电泳仪(上海Tanon),VE180电泳槽(上海Tanon),VE-186转移电泳槽(Tanon),UB-7 pH仪(Denver),5810R台式冷冻离心机(德国Eppendorf),labcyclor PCR仪(德国Sensoquest),Gel Doc XR凝胶成像系统(美国Bio-Rad)。EGFR抗体,abcam,批号ab2430;Iressa,AstraZeneca UK Limited,国药准字J20100014;胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS),GIBCO,批号10099-141;RPMI-1640培养基,GIBCO,批号430-1800;葡萄糖,Sigma,批号G8270。

## 2 方法

**2.1 细胞处理** 人非小细胞肺癌A549细胞株,用含5% FBS的RPMI-1640培养基于37℃,5% CO<sub>2</sub>

培养箱中培养。

**2.2 动物处置** 消化收集人非小细胞肺癌A549细胞,按每只裸鼠 $5 \times 10^6$ 个细胞的量进行腋下皮下注射。接种后第3周后,测量裸鼠体重和肿瘤大小,将体重相若、肿瘤大小相近(直径约9mm左右)的20只裸鼠随机分成4组,对照组(A)5%葡萄糖溶液灌胃;西药组(B)用溶解于5%葡萄糖溶液的Iressa灌胃, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ;中药组(C)2倍浓缩液的加味四君固本汤灌胃, $0.10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ;联合用药组(D)2倍浓缩液的加味四君固本汤灌胃,0.5h后用溶解于5%葡萄糖溶液的Iressa灌胃, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。每组药物1次灌注量为0.2mL,每天灌注1次,连续用药15d,动态观测肿瘤生长抑制情况以及裸鼠的运动、饮食等生活质量指标。在开始治疗后第18天处死裸鼠,取其肿瘤组织分成两份,存放于-80℃冰箱,用于WB和RT-PCR检测。

**2.3 肿瘤生长抑制率的计算** 从给药前3d开始每隔3d用游标卡尺测量瘤体最长径(a)和最短径(b),然后按公式 $V(\text{mm}^3) = 1/6\pi ab^2$ 计算肿瘤体积(V),并绘制肿瘤的生长曲线图。

肿瘤生长抑制率 = (对照组平均瘤体积 - 用药组平均瘤体积) / 对照组平均瘤体积 × 100%

**2.4 Western blot检测对比各组肿瘤组织中凋亡与增殖相关蛋白的表达量** 在各组中随机挑选1只裸鼠的肿瘤组织,液氮研磨成匀浆后加入细胞裂解液提取组织蛋白,用BCA法测量提取液的蛋白质含量然后进行蛋白电泳,每组上样量均为30μg,转膜封闭后室温孵育一抗1h,二抗30min后化学显影。抗体稀释比例分别为EGFR 1:1000、β-actin 1:6000。对比各组间的蛋白表达量的差异。

**2.5 RT-PCR检测对比各组肿瘤组织中凋亡与增殖相关mRNA的表达量** 在各组中随机挑选1只裸鼠的肿瘤组织,液氮研磨成匀浆后加入Torizol提取组织mRNA,逆转录成cDNA,普通PCR,反应条件为:95℃ 5min预变性,循环内95℃变性30s,56℃退火30s,72℃延伸25s,PCR反应循环后72℃ 5min,然后4℃保存。

**2.6 统计学处理** 应用SPSS 13.0统计软件进行统计学处理,对计数资料采用 $\chi^2$ 检验,对计量资料,统计学数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数的比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 治疗前各组裸鼠体重及肿瘤体积的均衡性** 4组裸鼠在治疗前体重和肿瘤体积如表1所示,经统计学分析组间差异均无统计学意义,说明各组裸鼠体重和肿瘤体积在治疗前均衡性好。

表1 治疗前各种治疗方法对裸鼠体重和肿瘤体积的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	裸鼠体重 /g	肿瘤体积 /mm <sup>3</sup>
对照		22.04 ± 0.30	101.57 ± 2.08
Iressa	0.1	22.32 ± 1.35	101.82 ± 1.17
加味四君固本汤	0.1	22.40 ± 2.56	99.89 ± 4.84
Iressa + 加味四君固本汤	0.1 + 0.1	21.96 ± 1.39	102.98 ± 1.68

注:与对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (表2同)。

### 3.2 治疗药物对人肺癌裸鼠移植瘤的治疗作用

**3.2.1 治疗期间各组裸鼠的全身状况** 给药后每天观察裸鼠的状况,结果显示,对照组、中药组均无不良反应,西药组和联合用药组裸鼠在给药后均出现不同程度的运动量,食量下降,其中西药组中有1只裸鼠出现脱水和衰弱。实验前后未出现动物死亡。

**3.2.2 治疗期间各组裸鼠肿瘤生长情况** 对照组和中药组裸鼠的肿瘤生长呈现不断上升趋势,西药组裸鼠的肿瘤生长呈现前期下降后期缓慢上升的趋势,联合用药组裸鼠的肿瘤生长呈缓慢的下降趋势。各组肿瘤生长曲线如图1所示。

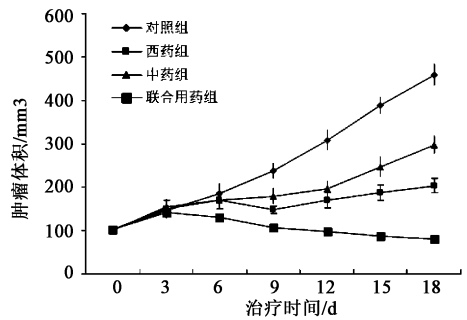


图1 各组药物对裸鼠肿瘤生长曲线的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

**3.2.3 治疗后各组裸鼠的肿瘤体积变化以及抑瘤率的差异** 治疗结束后测量肿瘤体积,计算各组抑瘤率。见图2及表2。结果显示,西药组、中药组与联合用药组较对照组肿瘤体积均有不同程度的减小,差异均具有极显著统计学意义( $P < 0.01$ )。同时,联合用药组的肿瘤体积小于西药组及中药组,差异具有极显著统计学意义( $P < 0.01$ )。西药组、中药组和联合用药组的抑瘤率分别为55.75%, 35.22%和82.3%,其中联合用药组与中、西药组间的差异均具有极显著统计学意义( $P < 0.01$ )。

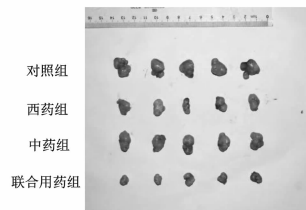


图2 各组药物对裸鼠肿瘤生长的影响

表2 各组药物对肿瘤体积的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	Iressa /mg·kg <sup>-1</sup>	加味四君固本汤 /g·kg <sup>-1</sup>	动物存活数		肿瘤体积/mm <sup>3</sup>		抑瘤率 /%
			治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	
A	0	0	5	5	101.57 ± 2.08	459.13 ± 25.32	0
B	100	0	5	5	101.82 ± 1.17	203.17 ± 16.19 <sup>1)</sup>	55.75
C	0	0.10	5	5	99.89 ± 4.84	297.42 ± 20.68 <sup>1)</sup>	35.22
D	100	0.10	5	5	102.98 ± 1.68	81.28 ± 4.10 <sup>2)</sup>	82.30

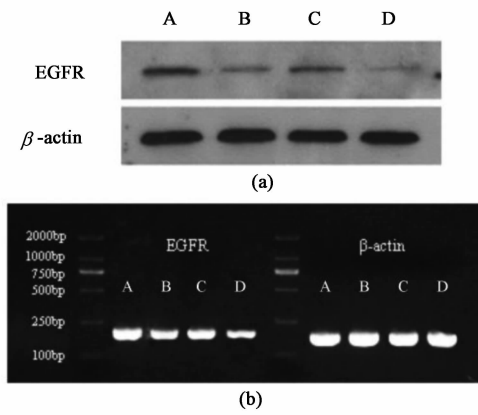
**3.3 治疗后肿瘤组织中增殖等相关指标的蛋白质和 mRNA 表达情况** 如图3所示,3组治疗组裸鼠肿瘤组织中 EGFR 蛋白质表达量均较对照组低,与西药组及中药组相比,联合用药组的肿瘤组织 EGFR 表达量明显下降。

### 4 讨论

肺癌是世界上发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,而在确诊的肺癌患者中有80%是非小细胞肺癌<sup>[9]</sup>。大多数非小细胞肺癌晚期患者有疲乏、体重减轻、食欲下降等表现,生活质量受到严重的影响<sup>[3,10]</sup>。

中医上认为肺癌是多种病理因素综合作用的结

果,本病是因虚而得,因虚致实,全身属虚,局部属实的疾病。虚、瘀、痰、毒贯穿了肺癌的整个发病过程。“虚”主要表现为脾肺气虚,可以说,脾肺气虚是肺癌发病的内在病理基础,瘀、痰、毒是肺癌发病的必然条件,治疗时应予兼顾,但决不能舍本逐末。我们认为脾肺气虚是肺癌最基本的病机特征,其贯穿了肺癌发病的始终。因此,扶正固本是临床治疗肺癌的基本大法,它不仅可增加机体抗癌能力,还可降低化、放疗的毒副作用,提高患者生活质量,延长生存周期,预防肿瘤的复发和转移<sup>[4]</sup>。在前期的研究中我们在四君子汤<sup>[5]</sup>基础上,自拟加味四君固本汤,治疗中晚期恶性肿瘤,与单纯化疗组比较,疗效



(a) Western blot 实验检测各组药物  
对肿瘤组织中 EGFR 蛋白表达量的影响

A. 对照组; B. Iressa 0.1 g·kg<sup>-1</sup> 组;  
C. 加味四君固本汤 0.1 g·kg<sup>-1</sup> 组;

D. Iressa 0.1 g·kg<sup>-1</sup> + 加味四君固本汤 0.1 g·kg<sup>-1</sup> 组

(b) RT-PCR 实验检测各组药物

对肿瘤组织中 EGFR 的 mRNA 表达量的影响

A. 对照组; B. Iressa 0.1 g·kg<sup>-1</sup> 组;  
C. 加味四君固本汤 0.1 g·kg<sup>-1</sup> 组;

D. Iressa 0.1 g·kg<sup>-1</sup> + 加味四君固本汤 0.1 g·kg<sup>-1</sup> 组

图 3 Western blot 和 RT-PCR 检测各组药物  
对肿瘤组织中 EGFR 蛋白及 mRNA 的影响

有显著性差异,并且在改善患者生活质量方面,亦好于单纯的化疗组。目前国内外并没有关于四君固本汤配合 Iressa 治疗非小细胞肺癌的报道。

本研究的结果显示,无论是单独使用 Iressa (100 mg·kg<sup>-1</sup>)或加味四君固本汤治疗还是联合两者共同治疗人非小细胞肺癌 A549 细胞移植瘤裸鼠 18 天后,治疗组裸鼠的肿瘤体积较对照组均明显缩小,Iressa 药治疗后裸鼠肿瘤体积较加味四君固本汤治疗后裸鼠的肿瘤体积小,联合用药又较单独用药的治疗效果要好。Iressa 药治疗、加味四君固本汤治疗和联合用药治疗对裸鼠移植瘤的抑瘤率分别为 55.75%、35.22% 和 82.3%,说明联合 Iressa 和加味四君固本汤治疗效果非常明显,比单独使用 Iressa 或加味四君固本汤的效果要好。

观察给药期间各组裸鼠的饮食,运动,肤色等各个指标的变化显示,Iressa 药会使裸鼠出现不同程度的进食减少,脱水,脱屑、疲乏等不良反应,而使用加味四君固本汤辅助 Iressa 药联合治疗则可缓解一定程度 Iressa 药所带来的不良反应,说明加味四君固本汤能有效改善治疗期间裸鼠的生活质量。

另外 Western blot 和 RT-PCR 结果显示,3 组治疗组肿瘤组织中的 EGFR 蛋白和 mRNA 均较对照组表达量下降,说明加味四君固本汤影响了肿瘤组

织中 EGFR 的表达,使之下调。

本实验结果说明加味四君固本汤治疗人非小细胞肺癌 A549 细胞裸鼠移植瘤效果明显(抑瘤率达 35.22%),并且改善治疗期间裸鼠的生活质量。通过运用现代医学实验验证了中医药治疗癌症的疗效,同时也为采用中药结合西医治疗肺癌可提高抑瘤率、减少毒副作用、延长生存期,提供了实验依据。WB 和 PCR 实验结果显示加味四君固本汤治疗在治疗肿瘤时能影响肿瘤组织中 EGFR 的表达,尽管其具体的作用机制目前尚不明确,但实验结果却为进一步的研究提供了重要的研究依据。

### [参考文献]

- [1] 肖烈钢,张玉亮,薛松,等. 加味四君固本汤配合化疗治疗晚期恶性肿瘤的临床观察[C]. 广州:第二届国际中西医结合、中医肿瘤学术研讨会论文集. 2003,750.
- [2] 白莉,余祖滨,祝蓉,等. 靶向 EGFR 基因的短发夹 RNA 对 A549 细胞生长及药物敏感性的影响[J]. 中国癌症杂志,2007,17(11):833.
- [3] 胡作为,孙易娜,黄建华,等. 肺癌合剂配合化疗治疗中晚期非小细胞肺癌[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):249.
- [4] 杨新中,李全采,邹银水. 对中医肿瘤病因病机与治疗的思考[J]. 中国医学药报,1999,14(6):57.
- [5] 张彩,曹海涛. 四君子汤抗小鼠运动性疲劳拆方研究. 中成药[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):187.
- [6] Mantha A J, McFee K E, Niknejad N, et al. Epidermal growth factor receptor targeted therapy potentiates lovastatin induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cells [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2003,129(11):631.
- [7] Levitzki A. EGF receptor as a therapeutic target [J]. Lung Cancer, 2003, 41 (Suppl 1): S9.
- [8] Han W, Lo H W. Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations [J]. Cancer Lett. 2012,318(2):124.
- [9] Carter C A, Giaccone G. Treatment of nonsmall cell lung cancer: overcoming the resistance to epidermal growth factor receptor inhibitors [J]. Curr Opin Oncol. 2012, 24(2): 123.
- [10] Zhou C. Current status and future direction of multi-targeted drugs in the era of personalized therapy-overview of advances in multi-targeted therapy in non-small cell lung cancer [J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2011, 36(17): 2423

[责任编辑 李玉洁]