

君子扶正汤对环磷酰胺的增效减毒作用

苑军伟, 邹琳, 蔡航, 董春旻, 金吉, 董宇翔*
(吉林大学白求恩第一医院, 长春 130021)

[摘要] 目的:探讨君子扶正汤(JD)对化疗药物环磷酰胺(CTX)抗肿瘤的增效减毒作用。方法:建立小鼠前胃癌细胞(MFC)荷瘤鼠模型后,随机分为5组,即阴性对照(生理盐水)组、阳性对照(CTX)组(30 mg·kg⁻¹)、JD(高、中、低剂量组)+CTX组(20,10,5 g·kg⁻¹,CTX 30 mg·kg⁻¹),每组10只,给药10 d,观察抑瘤率及各项免疫功能指标的变化。结果:JD+CTX各组肿瘤生长明显低于阴性对照组($P < 0.01$),JD高、中剂量+CTX组肿瘤生长低于CTX组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。JD高剂量+CTX组与CTX组相比,脾指数、T淋巴细胞增殖能力和胸腺指数、NK细胞活性降低明显升高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。JD高、中剂量+CTX组与CTX组相比,外周血白细胞和骨髓有核细胞计数明显升高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论:JD对化疗药物环磷酰胺抗小鼠MFC胃癌具有增效减毒的作用。

[关键词] 君子扶正汤; 环磷酰胺; 增效减毒; 肿瘤化疗; 抑瘤率

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0257-04

Experimental Study on Effects of Junzi Fuzheng Decoction: Enhancing Anti-tumor Efficacy of Cyclophosphamide and Reducing its Toxicity

YUAN Jun-wei, ZOU Lin, CAI Hang, DONG Chun-min, JIN Ji, DONG Yu-xiang*

[收稿日期] 20120420(004)

[第一作者] 苑军伟, 硕士, 从事消化及心脑血管疾病的研究, Tel:18704468943, E-mail:yjwdevy@163.com

[通讯作者] *董宇翔, 硕士, 教授, 从事消化及心脑血管疾病的研究, Tel:0431-88782234, E-mail:dyx1215@126.com

[参考文献]

- [1] 曹尉尉, 郑钦岳, 王洪斌. 四物汤对小鼠淋巴细胞增殖及巨噬细胞产生白细胞介素1的影响[J]. 第二军医大学学报, 1998, 19(1): 91.
- [2] 王瑞霞, 俞超芹. 原发性痛经患者外周血T淋巴细胞亚群的研究[J]. 实用妇产科杂志, 2004, 20(4): 229.
- [3] Nowell P C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in culture of normal leukocytes [J]. Cancer Res, 1960, 20(4): 462.
- [4] 周光炎. 免疫学[M]. 6版. 北京:人民卫生出版社, 2005: 2.
- [5] 郑钦岳, 王洪斌, 周斌. 四物汤对血虚大鼠造血及免疫功能的影响[J]. 中国医药学报, 1993, 8(增刊): 57.
- [6] 田维毅, 杨娟, 蔡琨, 等. 小鼠脾淋巴细胞模型在中药复方免疫活性物质筛选中的应用研究[J]. 四川中医, 2009, 27(2): 17.
- [7] 刘培, 段金廛, 宿树兰, 等. 香附四物汤与四物汤对急性血瘀模型大鼠血液流变性及其卵巢功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8): 124.
- [8] 王雁梅, 康红钰, 刘春杰, 等. 高效液相色谱法测定当归-川芎药对配伍复方中阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 61.
- [9] 张畅斌, 陆茵, 段金廛, 等. 四物汤加减方对痛经模型小鼠干预作用的研究[J]. 药学与临床研究, 2007, 15(6): 459.
- [10] 华永庆, 段金廛, 宿树兰, 等. 用于不同证型痛经的四物汤类方生物效应评价(I)[J]. 中国药科大学学报, 2008, 39(1): 72.
- [11] 宿树兰, 段金廛, 赵新慧, 等. 四物汤及衍化方香附四物汤挥发性成分与子宫平滑肌收缩效应相关性分析[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2008, 10(2): 50.
- [12] Pei Liu, Jin-ao Duan, Yong-qing Hua, et al. Effects of Xiangfu Siwu Decoction and its main components for dysmenorrhea on uterus contraction [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 133(2): 591.
- [13] 曹永国, 邓旭明, 曾胜, 等. Caffeoyl Glycoside 对小鼠免疫细胞功能的影响[J]. 中国农学通报, 2008, 24(8): 1.

[责任编辑 邹晓翠]

(First Hospital of Bethune, Jilin University, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Junzi Fuzheng decoction in enhancing anti-tumor efficacy of cyclophosphamide and reducing its toxicity. **Method:** Fifty MFC bearing mice models were established and then divided randomly into five groups: control group, cyclophosphamide (CTX) group ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Junzi Fuzheng decoction (high, medium and low dose, $20, 10, 5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) combined with CTX ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups. There were 10 mice in each group. After 10 days of treatment, all mice were killed and the tumor inhibiting rates and the index of immunological function were observed. **Result:** The tumor inhibition rate was higher in each Junzi Fuzheng decoction + CTX group than that in control group ($P < 0.01$). The tumor inhibition rate of high-dose and medium-dose Junzi Fuzheng decoction + CTX group was higher than that in CTX group ($P < 0.01, P < 0.05$). The indexes of spleen and thymus as well as proliferation of T lymphocytes and nature killer cell activity in CTX group were lower than those in the high-dose Junzi Fuzheng decoction + CTX group ($P < 0.01, P < 0.05$). The counting of peripheral white blood cells and bone marrow nucleated cells in CTX group was lower than those in the high-dose and the medium-dose Junzi Fuzheng decoction + CTX groups ($P < 0.01, P < 0.05$). **Conclusion:** Junzi Fuzheng decoction can enhance the efficacy of chemotherapy and reduce its toxicity in the MFC-burdened mice exposed to CTX.

[Key words] Junzi Fuzheng decoction; cyclophosphamide; enhancing effect and reducing toxicity; tumor chemotherapy; tumor inhibiting rate

随着相关研究的进展,抗癌中药的使用已成为中医肿瘤临床的重要治疗手段^[1],中药对机体的免疫调节和扶正抗癌作用已越来越受到人们的重视。因而探讨提高肿瘤化疗疗效,减轻其副作用的组方药物,在临床上具有重要的意义。君子扶正汤(JD)是我院董宇翔教授根据多年临床经验,结合肿瘤化疗的常见毒副作用,以扶正驱毒为原则研制而成。本研究通过建立 MFC 荷瘤小鼠模型,探讨君子扶正汤联合化疗药物环磷酰胺治疗肿瘤是否具有增效减毒作用,以期为君子扶正汤的临床应用提供一定的实验依据。

1 材料

1.1 动物与瘤株 清洁级昆明种小鼠 50 只,8~12 周龄,雌雄各半,体重 18~22 g,由吉林大学基础医学院实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(吉)2008-0005。MFC 瘤株由吉林大学公共卫生学院冻存并提供。

1.2 药物与试剂 君子扶正汤由人参、黄芪、白术、当归、茯苓、白花蛇舌草、半枝莲、炙甘草等药物组成,所有饮片均由吉林大学白求恩第一医院中医科提供,将上述药物加水浸泡 20 min 后,煎煮 3 次,每次约 30 min,3 煎溶液混合过滤,取汁 300 mL,离心,取上清,80 °C 水浴浓缩至每 mL 含生药 1.5 g,分装,高温消毒后置于 4 °C 冰箱内保存备用。注射用环磷酰胺,江苏恒瑞医药股份有限公司提供,批号

10012621。刀豆蛋白(A Con ASigma 公司,批号 E4632);四甲基偶氮唑盐(MTT 美国 Sigma 公司,批号 M2128)。

1.3 仪器 SW-CJ-IF 型超净工作台(苏州净化设备厂),LDZ5-2 型离心机(北京医用离心机厂),精密电子天平(美国 OHAOS 公司),MODEL550 型酶标测定仪(日本 Bio-Rad 厂)。

2 方法

2.1 MFC 细胞培养及荷瘤小鼠模型的建立 从液氮中取出冻存的 MFC 细胞,37 °C 水浴中,轻摇使其融化。移入离心管中并滴加 10 倍的无菌生理盐水洗涤后 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清,再重复洗涤 1 次,用生理盐水调节细胞密度为 5×10^6 个/mL,每只 0.2 mL 于小鼠腹腔注射。无菌条件下抽取 7 d 生长良好的 MFC 小鼠的腹水,用生理盐水洗涤 2 次,每次 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,以生理盐水制成癌细胞悬液并调整细胞密度为 5×10^6 个/mL,每只 0.2 mL 接种于小鼠右腋下。

2.2 动物分组及给药 小鼠接种 24 h 后按体重随机分成阴性对照组、阳性对照组、君子扶正汤(高、中、低剂量) + CTX 组,每组 10 只。阴性对照组用生理盐水灌胃 $0.4 \text{ mL}/\text{只}$,1 次·d⁻¹,连续 10 d。阳性对照组腹腔注射 CTX $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,1 次·d⁻¹,连续 10 d;同时用生理盐水灌胃, $0.4 \text{ mL}/\text{只}$,1 次·d⁻¹,连续 10 d。君子扶正汤高、中、低剂量 + CTX 组的

化疗药物剂量、给药途径及时间与 CTX 组相同,君子扶正汤高、中、低剂量分别按小鼠体重 20,10,5 g·kg⁻¹ 给药,并用生理盐水调节容量,配制成每只小鼠 0.4 mL 灌胃,1 次·d⁻¹,连续 10 d。各组于瘤细胞接种第 2 天开始用药,于实验第 12 天眼球采血后处死小鼠,取脾脏、胸腺、骨髓检测各项指标。

2.3 抑瘤率、脾指数、胸腺指数计算 于实验第 12 天,将各组小鼠眼球采血后处死称质量,无菌剥取肿瘤组织称瘤体质量,按公式计算抑瘤率^[2]:

$$\text{抑瘤率} = (\text{阴性对照组平均瘤重} - \text{治疗组平均瘤重}) / (\text{阴性对照组平均瘤重} \times 100\%)$$

无菌剥取脾脏、胸腺称质量,计算脾指数、胸腺指数。

$$\text{脾指数} = \text{脾重} / \text{体重} \times 100\%$$

$$\text{胸腺指数} = \text{胸腺质量} / \text{体重} \times 100\%$$

2.4 外周血白细胞及骨髓有核细胞计数 小鼠处理同 2.3,将各组小鼠眼球采血计白细胞数;剥离股骨取小鼠完整右侧股骨,抽取 3% 冰醋酸溶液反复冲洗其骨髓细胞于 10 mL 3% 冰醋酸溶液内,4 号针头过滤后,充分混匀,在血细胞计数盘上计数 4 个大方格的细胞数,然后乘以 2.5 × 10⁴,即得 1 根股骨中的骨髓有核细胞总数^[3]。

2.5 小鼠脾淋巴细胞增殖能力的测定 取小鼠脾脏,无菌制备脾细胞悬液,调密度至 1 × 10⁷/mL。取 96 孔平底培养板,每只鼠设对照孔、Con A 刺激孔,各 3 复孔。在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下孵育 68 h 后,各孔加入浓度为 5 g·L⁻¹ 的 MTT 溶液 10 μL,继续孵育 4 h 后,吸弃上清液,每孔加入 100 μL DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分溶解。选择 570 nm 波长,在酶标仪上测定各孔吸光度(A),记录结果。计算刺激指数^[4-5]。

$$\text{刺激指数(SI)} = \text{Con A 刺激孔 A} / \text{对照孔 A}$$

2.6 NK 细胞活性测定 取 2.5 中所用脾细胞悬液,密度为 1 × 10⁷/mL。制备常规培养 YAC-1 细胞悬液,调密度至 1 × 10⁶/mL。取 96 孔圆底培养板,每只鼠设效应细胞:靶细胞孔(20:1)、效应细胞(小鼠脾细胞)对照孔、靶细胞(YAC-1 细胞)对照孔,各 3 复孔,在 CO₂ 孵箱中,37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下孵育 24 h 后,操作同 2.5,测定各孔 A,记录结果。计算 NK 细胞活性百分率^[5-6]。

$$\text{NK 细胞毒} = [1 - (\text{效靶孔 A} - \text{效应细胞对照孔 A}) / \text{靶细胞对照孔 A}] \times 100\%$$

2.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行多组间单因素方差分析。以 $P <$

0.05 为有统计意义。

3 结果

3.1 对化疗小鼠体重、瘤质量及抑瘤率的影响 生理盐水组、CTX 组和 JD 高、中、低剂量组的体重分别为 (27.32 ± 1.85), (21.26 ± 1.03), (22.38 ± 1.05), (22.03 ± 1.08), (21.74 ± 1.10)。CTX 组和 JD 高、中、低剂量组的瘤质量分别为 (1.30 ± 0.21), (0.95 ± 0.19), (1.04 ± 0.20), (1.16 ± 0.23) 与生理盐水组 (2.35 ± 0.44) 相比差异显著 ($P < 0.01$)。CTX 组的抑瘤率达 44.68%, JD 高、中、低剂量组的抑瘤率分别可达 59.57, 55.74, 50.64%, CTX 组与 JD 高、中剂量组相比差异显著 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

3.2 对化疗小鼠免疫器官质量的影响 CTX 组脾脏和胸腺指数均下降,与生理盐水组相比差异显著 ($P < 0.01$), JD 高、中剂量组脾脏指数均较 CTX 组增高,差异显著 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), JD 高剂量组胸腺指数较 CTX 组增高,差异显著 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 JD 对化疗小鼠脾指数和胸腺指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	脾指数 /g·kg ⁻¹	胸腺指数 /g·kg ⁻¹
生理盐水	-	7.84 ± 1.15	3.29 ± 0.58
CTX	0.03	6.05 ± 0.42	2.37 ± 0.39
JD + CTX	20	7.14 ± 0.69 ^{1,3)}	2.86 ± 0.33 ^{1,2)}
	10	6.96 ± 0.68 ^{1,2)}	2.72 ± 0.36 ¹⁾
	5	6.65 ± 0.73 ¹⁾	2.58 ± 0.40 ¹⁾

注:与生理盐水组比较¹⁾ $P < 0.05$;与 CTX 组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.3 对化疗小鼠外周血白细胞数及骨髓有核细胞数的影响 荷瘤小鼠在注射 CTX 后外周血白细胞数和骨髓有核细胞数均下降,与生理盐水组相比差异显著 ($P < 0.01$),联合应用 JD 后,JD 高、中、低剂量组外周血白细胞数均较 CTX 组增高,差异显著 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$), JD 高、中剂量组骨髓有核细胞数较 CTX 组增高,差异显著 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),见表 2。

3.4 对化疗小鼠脾淋巴细胞增殖能力及 NK 细胞活性的影响 CTX 组小鼠脾淋巴细胞增殖能力及 NK 细胞活性均下降,与生理盐水组相比差异显著 ($P < 0.01$), JD 高、中剂量组小鼠脾淋巴细胞增殖能力均较 CTX 组增高,差异显著 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), JD 高剂量组 NK 细胞活性较 CTX 组增高,差异显著 ($P < 0.05$),见表 3。

表 2 JD 对化疗小鼠外周血白细胞数和骨髓有核细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	外周血白细胞数 / × 10 ⁹ /L	骨髓有核细胞数 / × 10 ⁶ /根
生理盐水	-	7.36 ± 1.19	11.07 ± 1.28
CTX	0.03	5.18 ± 0.72	8.57 ± 0.82
JD + CTX	20	6.49 ± 0.70 ^{1,3)}	9.88 ± 0.86 ^{1,3)}
	10	6.02 ± 0.73 ^{1,2)}	9.60 ± 0.84 ^{1,2)}
	5	5.94 ± 0.75 ^{1,2)}	9.17 ± 0.86 ¹⁾

表 3 JD 对化疗小鼠脾淋巴细胞增殖能力及 NK 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	SI	NK 细胞活性/%
生理盐水	-	0.42/0.08	18.89/3.70
CTX	0.03	0.17 ± 0.04	14.29/1.74
JD + CTX	20	0.25/0.05 ^{1,3)}	16.50/1.22 ^{1,2)}
	10	0.22 ± 0.04 ^{1,2)}	16.22/2.15 ¹⁾
	5	0.20 ± 0.06 ¹⁾	15.75/2.55 ¹⁾

4 讨论

中医认为肿瘤患者本来就正气不足,应用化疗药后,正气更加虚弱;另外,肿瘤乃有形毒邪,邪正交争,耗伤正气,故应从扶正和驱毒两方面入手。君子扶正汤是以四君子汤为基础化裁而来,由人参、黄芪、白术、当归、茯苓、白花蛇舌草、半枝莲、炙甘草等药物组成,方中以人参大补元气为君药,黄芪、当归补气生血,白术、茯苓健脾益气为臣药,白花蛇舌草、半枝莲驱邪解毒为佐药,炙甘草调和诸药。诸药合用共奏扶正驱毒之效。本研究通过观察君子扶正汤联合环磷酰胺抗 MFC 胃癌荷瘤鼠的效果,发现君子扶正汤联合环磷酰胺组其肿瘤抑瘤率明显高于环磷酰胺组,提示君子扶正汤对环磷酰胺的抗肿瘤生长具有一定的增效作用。

肿瘤患者的免疫功能不仅与肿瘤的发生和发展密切相关,而且对判断肿瘤患者的治疗效果和评估疾病预后都有重要的参考价值^[7]。化疗药物的应用可以加重机体的免疫抑制^[8],因此提高肿瘤患者的免疫功能,尤其是防治化疗后出现的免疫机能的严重抑制,成为抗肿瘤治疗的一个主要方面。本研究显示,MFC 荷瘤小鼠应用 CTX 后脾脏和胸腺指数、T 淋巴细胞增殖能力和 NK 细胞杀伤活性均下降,而通过联合君子扶正汤可使脾脏和胸腺指数有所增加、T 淋巴细胞增殖能力和 NK 细胞杀伤活性升高,提示君子扶正汤可对抗化疗药物 CTX 所致的

免疫抑制,促进机体免疫功能的恢复,从而可提高机体的抗肿瘤作用。化疗药物多属于细胞毒性药物,对肿瘤细胞和正常细胞无选择性。CTX 为直接破坏 DNA 并阻止其复制的抗癌药物,骨髓抑制是其剂量限制性毒性^[9],本研究结果表明,MFC 荷瘤小鼠在单独应用 CTX 后出现外周血白细胞计数和骨髓有核细胞计数明显降低,联合君子扶正汤后,荷瘤小鼠的外周血白细胞计数和骨髓有核细胞计数降低有明显改善,说明 CTX 所引起的骨髓抑制状态得到改善。

综上所述,君子扶正汤与化疗药环磷酰胺合用可增强环磷酰胺抑制肿瘤生长的作用,同时减轻其所致的免疫功能下降,骨髓抑制的损害,提示君子扶正汤在肿瘤化疗中具有增效减毒的作用,这为君子扶正汤在肿瘤化疗中的应用提供了一定的实验依据。有关君子扶正汤在化疗中扶正减毒的确切机制有待进一步研究。目前,君子扶正汤仅用于提高化疗药物的效果及降低其毒副作用,对于君子扶正汤本身是否具有一定的抗肿瘤作用,还需进一步研究。

[参考文献]

[1] 杜琴,胡兵,沈克平. 抗癌中药配伍研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(13):232.

[2] 姚宝泰,赵建雄,王学习,等. 红芪总多糖体内抗肿瘤的实验研究[J]. 中华中医药杂志,2008,23(7):628.

[3] 冯雪梅,吕艳,祝彼得,等. 熟地和制首乌多糖对贫血小鼠骨髓有核细胞数和细胞周期的影响[J]. 四川中医,2006,24(6):17.

[4] 巴图德力根,孔英,高志红,等. MTT 法与流式细胞术检测肺炎合剂促进 T 淋巴细胞转化的实验研究[J]. 中国免疫学杂志,2002,18(4):249.

[5] 李凡,刘永茂. 基础医学实验教程[M]. 北京:高等教育出版社,2002:78.

[6] 宫丽华,任大宏,熊密,等. 褪黑素对小鼠肝癌细胞凋亡及自然杀伤细胞活性的影响[J]. 华中科技大学学报:医学版,2003,32(3):239.

[7] Kastelan Z, Lukac J, Derezić D, et al. Lymphocyte subsets, lymphocyte reactivity to mitogens, NK cell activity and neutrophil and monocyte phagocytic functions in patients with bladder carcinoma [J]. Anticancer Res,2003,23(6D):5185.

[8] 许志良,刘永林,俞颖. 肿瘤患者 CD4⁺/CD8⁺、γδT 细胞化疗前后的变化[J]. 中国预防医学杂志,2004,5(2):140.

[9] 张如刚,王兴旺. 烷化剂-环磷酰胺//刘鲁明,杨宇飞. 肿瘤科中西药物手册[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:111.

[责任编辑 李玉洁]