

复方阿胶浆对 H22 肝癌荷瘤小鼠 5-FU 化疗的 增效减毒作用

栗敏¹, 马洪宇², 沈继朵³, 栗俞程^{3*}

(1. 郑州人民医院, 郑州 450003; 2. 郑州市中医院, 郑州 450007;
3. 河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的:探讨复方阿胶浆对 5-氟尿嘧啶(5-FU)抗小鼠 H22 肝癌的增效减毒作用。方法:SPF 级昆明种小鼠接种瘤细胞制备 H22 肝癌小鼠模型,将肝癌小鼠随机分为荷瘤模型组、5-FU 对照组(20 mg·kg⁻¹, ip)、5-FU 联用复方阿胶浆高、中、低剂量组(3, 1.5, 0.75 g·kg⁻¹, 以阿胶生药量计)。另设正常对照组($n=10$)。连续给药 7 d 后处死动物,检测外周血白细胞计数,计算瘤重、抑瘤率、脾脏指数和胸腺指数。采用淋巴细胞转化实验检测外周血淋巴细胞转化率;采用鸡红细胞吞噬实验检测腹腔巨噬细胞的吞噬功能。**结果:**与 5-FU 对照组相比,高剂量复方阿胶浆联合治疗组小鼠瘤质量明显减轻($P<0.05$),脾脏指数、胸腺指数以及外周血白细胞计数均显著提高($P<0.05$)。5-FU 化疗使荷瘤小鼠淋巴细胞转化率、腹腔巨噬细胞吞噬率和吞噬指数较荷瘤模型组均显著降低($P<0.01$)。复方阿胶浆联合治疗组小鼠淋巴细胞转化率、腹腔巨噬细胞吞噬率和吞噬指数均显著高于 5-FU 对照组($P<0.05$),其中高剂量组分别达(35.9±9.2)%, (41.9±6.3)%, (0.74±0.17)。**结论:**复方阿胶浆对 5-FU 抗小鼠 H22 肝癌具有明显的化疗增效减毒作用。

[关键词] 复方阿胶浆; 肝癌 H22 小鼠; 5-氟尿嘧啶; 免疫功能; 抑瘤率

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0216-04

Effects of Fufang Ejiao Jiang Enhances Efficacy and Reduces Toxicity of 5-FU in Hepatoma H22-bearing Mice

[收稿日期] 20120426(005)

[基金项目] 河南中医学院博士科研基金项目(BSJJ2010-24)

[通讯作者] *栗俞程, 博士, 讲师, Tel:0371-65962746, E-mail:Liuyucheng@hactcm.edu.cn

[参考文献]

[1] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. Am Rev Respir Dis, 2003, 120(4): 893.

[2] 支开叶. 肺纤方治疗特发性肺纤维化的临床观察[J]. 山西中医, 2011, 27(12): 23.

[3] 郑金旭, 卢坤琴, 夏德刚, 等. 柴胡皂甙 d 对博来霉素诱导肺纤维化小鼠的治疗作用及机制研究[J]. 中华医学杂志, 2010, 90(12): 808.

[4] 焦婧, 邢丽华. 特发性肺纤维化的治疗进展[J]. 国际呼吸杂志, 2010, 30(24): 1512.

[5] 吕建国, 周柔丽. 转化生长因子- β 对细胞外基质基因表达调节作用的研究进展[J]. 生理科学进展, 1994, 25: 80.

[6] Kehrl J H, Thevenin C, Bieckmann P, et al. TGF- β

suppresses human B lymphocyte Ig production by inhibiting synthesis and the switch from the membrane form to the secreted form of Ig mRNA[J]. J Immunol, 1991, 140: 4016.

[7] Gross T J, Hunninghake G W. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. N Eng J Med, 2001, 345: 517.

[8] Raghu G, Brown K K, Bradford W Z, et al. A placebo-controlled trial of interferon gamma-1b in patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. N Engl J Med, 2004, 350: 125.

[9] 蔡后荣. 特发性肺纤维化治疗药物临床研究中的困惑与反思[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 33(11): 869

[10] 栗增强, 曹文富. 黄芪防治肺纤维化的研究现状[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 275.

[责任编辑 聂淑琴]

LI Min¹, MA Hong-yu², SHEN Ji-duo³, LI Yu-cheng^{3*}

(1. People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450003, China;

2. Zhengzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Zhengzhou 450007, China;

3. Henan University of TCM, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] Objective: To study the effects of Fufang Ejiao Jiang (FFEJJ) against 5-fluorouracil (5-FU) chemotherapy in hepatoma H22-bearing mice. **Method:** The SPF-Kunming mice were used to establish mouse model of hepatoma H22. The mice were randomly divided into 5 groups: tumor model group, 5-FU group (20 mg · kg⁻¹, ip), 5-FU combined FFEJJ group. FFEJJ were orally administrated at a daily dose of 3, 1.5, 0.75 g · kg⁻¹, respectively corresponding to high, middle and low dose. The normal control group was set up and each group had 10 mice. After continuous administration for 7 d, the peripheral white blood cell count (WBC), tumor weight, inhibition rate, spleen index and thymus index were measured. The peripheral blood lymphocyte transformation rate and the phagocytotic activity of peritoneal macrophages were detected. **Result:** The high-dose FFEJJ significantly reduced the tumor weight, elevated the spleen index, thymus index and WBC counts compared with 5-FU group ($P < 0.05$). 5-FU decreased the lymphocyte transformation rate and peritoneal macrophage phagocytosis rate and the phagocytic index ($P < 0.01$). These index in FFEJJ group were significantly higher than that of 5-FU group ($P < 0.05$), and reached to (35.9 ± 9.2)%, (41.9 ± 6.3)%, and (0.74 ± 0.17) in high dose FFEJJ group respectively. **Conclusion:** The results suggest that FFEJJ could enhance efficacy and reduce toxicity in hepatoma treatment as a supplement of 5-FU.

[Key words] Fufang Ejiao Jiang (FFEJJ); hepatoma H22-bearing mice; 5-fluorouracil (5-FU); immune function; inhibition rate

肝癌是目前世界上仅次于胃癌和食道癌的第三大常见恶性肿瘤。手术后的化疗是治疗肝癌的常用手段,但化疗药物大都具有严重的毒副作用,除引起骨髓抑制、内脏毒性、变态反应等,还常常导致患者免疫功能低下,进而继发感染性疾病。因此,采用免疫辅助疗法,提高机体的免疫功能,降低化疗的毒副作用,已成为近年临床治疗肝癌的热点之一^[1-3]。复方阿胶浆由阿胶、红参、党参、熟地黄、山楂组成,具益气生血、滋养阴液、健脾消食之功效。近年来研究发现,复方阿胶浆可明显减轻环磷酰胺 (CTX) 化疗所引起的免疫损伤。本研究采用复方阿胶浆联合 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 治疗 H22 肝癌小鼠,旨在探讨复方阿胶浆对 5-FU 化疗的增效减毒作用。

1 材料

1.1 动物 SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,体重 18 ~ 22 g,由河南省实验动物中心提供,许可证号 SCXK(豫)2010-0002。H22 肝癌小鼠购自山东省医学科学院药物研究所。

1.2 药物与试剂 复方阿胶浆(阿胶、党参、人参、熟地黄、山楂,山东东阿阿胶股份有限公司(批号 091146,20 mL/支,含阿胶 3 g,以生药计);5-FU 注射液购自上海旭东海普药业有限公司(批号

070201);植物血凝素购自 Sigma;鸡红细胞购自郑州百基生物科技有限公司。

1.3 仪器 CD-3700 全血细胞分析仪(雅培,美国),JA1003 电子天平(上海方瑞仪器有限公司),BX41 显微镜(奥林巴斯,日本)。

2 方法

2.1 H22 小鼠肝癌模型的建立 无菌条件下,抽取 H22 肝癌小鼠的腹腔积液,无血清培养基调至细胞密度为 1×10^7 个/mL。正常小鼠适应性喂养 3 d 后,取 0.2 mL 细胞悬液接种于小鼠右前肢腋窝皮下(肿瘤细胞数约为 2×10^6 个),制备小鼠肝癌实体瘤模型。

2.2 分组及处理 接种瘤细胞 24 h 后,将小鼠随机分为 5 组,即荷瘤模型组、5-FU 对照组、5-FU 联合复方阿胶浆组(高、中、低 3 个剂量)。另设正常对照组(小鼠右前肢腋窝皮下接种 0.2 mL 生理盐水),每组各 10 只。正常对照和荷瘤模型组以 $0.4 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ 生理盐水 ig,5-FU 对照组 ip 给予 5-FU $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,复方阿胶浆高、中、低剂量组分别以 0.4,0.2,0.1 mL 原液 ig(剂量以阿胶计为 3,1.5,0.75 g · kg⁻¹),连续给药 7 d。

2.3 对荷瘤小鼠免疫器官及抑瘤率的影响 末次

给药 24 h 后,摘眼球取血,肝素管收集血液,采用全血细胞分析仪检测白细胞(WBC)计数。脱颈椎处死小鼠,无菌条件下从小鼠腋部皮下完整剥取肿瘤组织,剥离干净后于电子天平称瘤体质量,计算抑瘤率。

快速分离脾脏和胸腺称质量。计算脾和胸腺指数。

$$\text{抑瘤率} = (1 - \text{治疗组平均瘤重} / \text{模型组平均瘤重}) \times 100\%$$

$$\text{脏器指数} = (\text{脏器质量} / \text{体重}) \times 100\%$$

2.4 对荷瘤小鼠外周淋巴细胞转化率的影响 于给药第 1,2,3 天 im 植物血凝素(PHA)80 mg·kg⁻¹,末次给药 2 h 后,尾静脉取血,肝素抗凝,滴于载玻片上,推片,瑞氏染液染色,油镜下观察淋巴细胞转化,计算转化率。

$$\text{转化率} = (\text{外周淋巴细胞的转化数} / \text{外周淋巴细胞总数}) \times 100\%$$

2.5 对荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 动物分组及处理同 2.2,末次给药 2 h 后,ip 5% 鸡红细胞悬液 1 mL,2 h 后 ip 生理盐水,脱颈椎处死小鼠,轻揉小鼠腹部,剪开腹部皮肤,吸取腹腔液滴于载玻片上,37 ℃ 孵育 30 min,漂洗后以丙酮-甲醇(1:1)溶液固定 5 min,4% Giemsa 染色 3 min 后冲洗并晾干,油镜下观察巨噬细胞,连续选取 10 个视野计算吞噬率和吞噬指数。

$$\text{吞噬率} = (\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数} / \text{巨噬细胞总数}) \times 100\%$$

$$\text{吞噬指数} = \text{被吞噬的鸡红细胞数} / \text{计数的巨噬细胞总数}$$

2.6 统计处理 采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠瘤重和抑瘤率的影响 与 5-FU 对照组相比,高剂量复方阿胶浆联合治疗组瘤质量显著降低($P < 0.05$)。5-FU 单用时抑瘤率为 55.40%,而联用低、中、高剂量的复方阿胶浆后,抑瘤率分别增至 59.11%,61.65%,66.48%。表明复方阿胶浆可提高 5-FU 的疗效。见表 1。

3.2 对小鼠脾脏、胸腺指数的影响 5-FU 对照组脾脏和胸腺指数较模型组均显著下降($P < 0.05$)。5-FU 联合复方阿胶浆治疗组的小鼠脾脏指数和胸腺指数均显著高于 5-FU 对照组($P < 0.05$),且呈剂量依赖性。见表 2。

3.3 对小鼠外周血淋巴细胞转化率、白细胞计数的影响 与荷瘤模型组相比,5-FU 对照组淋巴细胞转化率和外周血白细胞计数均显著降低($P < 0.01$)。

表 1 复方阿胶浆对 H22 肝癌荷瘤小鼠瘤重和抑瘤率的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | 瘤重/g | 抑瘤率/% |
|--------------|---------------------------|-----------------------------|-------|
| 正常对照 | - | - | - |
| 荷瘤模型 | - | 3.52 ± 0.38 | - |
| 5-FU 对照 | 0.02 | 1.57 ± 0.45 ¹⁾ | 55.40 |
| 5-FU + 复方阿胶浆 | 0.02 + 0.75 | 1.44 ± 0.46 ¹⁾ | 59.11 |
| | 0.02 + 1.5 | 1.35 ± 0.39 ¹⁾ | 61.65 |
| | 0.02 + 3.0 | 1.18 ± 0.32 ^{1,2)} | 66.48 |

注:与荷瘤模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 5-FU 对照组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 复方阿胶浆对 H22 肝癌荷瘤小鼠脾脏和胸腺指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | 脾脏指数 | 胸腺指数 |
|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常对照 | - | 9.45 ± 3.97 | 3.34 ± 1.18 |
| 荷瘤模型 | - | 7.27 ± 2.38 ¹⁾ | 2.42 ± 1.31 ¹⁾ |
| 5-FU 对照 | 0.02 | 5.86 ± 2.49 | 1.67 ± 0.69 |
| 5-FU + 复方阿胶浆 | 0.02 + 0.75 | 6.32 ± 2.76 ¹⁾ | 1.85 ± 0.84 |
| | 0.02 + 1.5 | 7.13 ± 3.97 ²⁾ | 2.16 ± 1.20 ¹⁾ |
| | 0.02 + 3.0 | 8.77 ± 5.12 ²⁾ | 2.53 ± 1.17 ²⁾ |

注:与 5-FU 对照组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.001$ (表 3~4 同)。

联合复方阿胶浆治疗组淋巴细胞转化率和白细胞计数均显著高于 5-FU 对照组($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 复方阿胶浆对 H22 肝癌荷瘤小鼠外周血淋巴细胞转化率和白细胞计数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | 淋巴细胞 转化率/% | 白细胞 /10 ⁹ ·L ⁻¹ |
|--------------|---------------------------|--------------------------|--|
| 正常对照 | - | 46.8 ± 9.4 | 8.97 ± 0.72 |
| 荷瘤模型 | - | 32.5 ± 8.3 ²⁾ | 8.15 ± 0.69 ³⁾ |
| 5-FU 对照 | 0.02 | 21.6 ± 5.7 | 5.54 ± 0.97 |
| 5-FU + 复方阿胶浆 | 0.02 + 0.75 | 24.2 ± 7.1 ¹⁾ | 6.27 ± 1.18 ¹⁾ |
| | 0.02 + 1.5 | 31.8 ± 6.6 ²⁾ | 6.94 ± 1.22 ²⁾ |
| | 0.02 + 3.0 | 35.9 ± 9.2 ²⁾ | 7.53 ± 1.48 ³⁾ |

3.4 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 与荷瘤模型组相比,5-FU 对照组小鼠腹腔巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬率和吞噬指数均显著降低($P < 0.01$)。复方阿胶浆 3 个剂量组均可显著提高吞噬率和吞噬指数,与 5-FU 对照组相比具有显著性差异($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 复方阿胶浆对 H22 肝癌荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | 吞噬率/% | 吞噬指数 |
|--------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 正常对照 | - | 47.2 ± 5.4 | 0.85 ± 0.09 |
| 荷瘤模型 | - | 41.8 ± 3.5 ²⁾ | 0.62 ± 0.07 ²⁾ |
| 5-FU 对照 | 0.02 | 26.1 ± 3.9 | 0.38 ± 0.05 |
| 5-FU + 复方阿胶浆 | 0.02 + 0.75 | 31.7 ± 6.8 ¹⁾ | 0.49 ± 0.12 ¹⁾ |
| | 0.02 + 1.5 | 38.2 ± 7.4 ²⁾ | 0.65 ± 0.14 ²⁾ |
| | 0.02 + 3.0 | 41.9 ± 6.3 ²⁾ | 0.74 ± 0.17 ³⁾ |

4 讨论

复方阿胶浆是由阿胶、红参、党参、熟地黄、山楂等组成,临床用于治疗气血两虚、白细胞减少及免疫低下等症。近年来研究表明,复方阿胶浆与环磷酰胺联合治疗恶性肿瘤具有增效减毒的作用,在提高抑瘤率的同时,可有效防止环磷酰胺所致免疫损伤,保护免疫器官^[4-8]。然而,复方阿胶浆与另一常用化疗药 5-FU 联用是否具有增效减毒的作用,目前尚未见明确报道。

本研究以复方阿胶浆联合 5-FU 治疗 H22 肝癌荷瘤小鼠,并以单用 5-FU 为对照,结果显示,联用低、中、高剂量的复方阿胶浆后,荷瘤小鼠的瘤质量显著减小($P < 0.01$),抑瘤率分别增至 59.11%、61.65% 和 66.48%,较 5-FU 对照组明显提高,表明复方阿胶浆可增强 5-FU 对 H22 肝癌小鼠的抑瘤作用。5-FU 化疗后,荷瘤小鼠的脾脏和胸腺指数均显著下降($P < 0.05$),而联合复方阿胶浆治疗组小鼠脾脏指数和胸腺指数则显著上升,且呈剂量依赖性,表明 5-FU 化疗引起免疫器官的萎缩,而复方阿胶浆可保护免疫器官,减轻 5-FU 诱导的免疫器官损伤。

T 淋巴细胞在植物血凝素的刺激下,可转化为淋巴母细胞。因此,常用外周血淋巴细胞转化率来反映机体细胞免疫水平。巨噬细胞在体内扮演清道夫角色,负责吞噬侵入体内的抗原,其吞噬功能可直观反映机体非特异性免疫水平。本研究结果显示,

5-FU 显著降低了外周血淋巴细胞转化率、白细胞数、巨噬细胞吞噬率和吞噬指数($P < 0.01$),表明 5-FU 对机体细胞免疫和非特异性免疫均有抑制作用。复方阿胶浆联合治疗组上述各指标均显著提高,表明复方阿胶浆不仅可防止免疫器官损伤,亦显著提高机体特异性和非特异性免疫功能。

综上所述,复方阿胶浆可增强 5-FU 对 H22 肝癌小鼠的抑瘤作用,并明显减轻 5-FU 所致的免疫器官萎缩及免疫功能低下,具有增效减毒的作用。然而,复方阿胶浆对 5-FU 的化疗增效减毒作用是否还体现在其他方面,我们将进一步研究。

[参考文献]

- [1] 刘秀均,刘婷. 苦参碱联合顺铂抗肝癌的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(6): 37.
- [2] 陈涛,付亚玲,巩仔鹏,等. 中药有效成分组方联合顺铂抑制小鼠肝癌血管生成的机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 157.
- [3] 周阿高,张勇,孔德云,等. 黄连解毒汤对荷瘤小鼠免疫调节作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(3): 56.
- [4] 邵玉英,刘培民. 复方阿胶浆对乳腺癌患者化疗后骨髓保护作用的临床观察[J]. 医护论坛, 2009, 6(28): 161.
- [5] 张宇航,李要轩,李雁. 复方阿胶浆对恶性肿瘤化疗后白细胞减少症的临床观察[J]. 中医中药, 2010, 17(12): 777.
- [6] 刘培民,蔡宝昌,尤金花. 复方阿胶浆对 Lewis 肺癌的抑瘤作用研究[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(5): 44.
- [7] 孙叙敏,刘福鼎,陈信义. 复方阿胶浆对保护环磷酰胺导致移植性 Lewis 肺癌小鼠外周血象研究[J]. 中国医药指南, 2011, 9(5): 60.
- [8] 孙叙敏,陈信义. 复方阿胶浆对移植性肺癌小鼠脾、胸腺质量指数与脾淋巴细胞增殖影响[J]. 医学信息, 2011, 24(2): 699.

[责任编辑 聂淑琴]