

不同滋阴中药对小鼠诱发性肺肿瘤发生及抗肿瘤免疫功能的影响

郭慧君*, 朱金华, 刘春花, 杜人塘, 魏娜, 王彪, 程一琳
(江西中医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的:研究六味地黄丸和二冬膏对乌拉坦诱发性肺肿瘤小鼠的肿瘤发生情况和抗肿瘤免疫功能的影响。方法:雌性昆明种小鼠33只,使用乌拉坦($1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)注射诱发小鼠肺肿瘤,随机分为对照组、六味地黄丸组($1.56\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)和二冬膏组($0.78\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),连续给药100d后肉眼及病理切片和苏木精-伊红染色观察药物对小鼠肺肿瘤发生的影响,测定脾指数、胸腺指数、巨噬细胞吞噬功能以及测定血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量。结果:与对照组比较,六味地黄丸和二冬膏给药组小鼠肺肿瘤诱发率明显降低,诱发率分别是63.6%,18.2%,36.4%。与对照组比较,六味地黄丸和二冬膏给药组小鼠脾指数、巨噬细胞活性明显增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),小鼠血清中TNF- α 含量明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:六味地黄丸和二冬膏均能通过提高小鼠的抗肿瘤免疫功能和减少炎症因子产生来延缓乌拉坦诱发肺肿瘤的发生发展。

[关键词] 乌拉坦;诱发性肺肿瘤;六味地黄丸;二冬膏;抗肿瘤免疫;肿瘤坏死因子- α

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0226-04

Effect of Different Traditional Chinese Medicine for Nourishing Yin on Lung Chemical Carcinogenesis and Antitumor Immune Function in Mice

GUO Hui-jun*, ZHU Jin-hua, LIU Chun-hua, DU Ren-tang, WEI Na, WANG Biao, CHENG Yi-lin
(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** The effect of Liuwei Dihuang Wan (LWDH) and Erdong Gao (ED) on the tumorigenesis and the antitumor immune function were studied in a model of chemical carcinogenesis in the mouse lung. **Method:** Thirty three female Kunming mice with urethane subcutaneous injection ($1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) were randomized into three groups: the control group, the group treated with LWDH ($1.56\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) and the group treated with ED ($0.78\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). The mice were sacrificed after 100 days to investigate the rate of tumor formation by naked eye, pathological section and hematoxylin-eosin staining. The spleen index, thymus

[收稿日期] 20110829(004)

[通讯作者] *郭慧君,硕士研究生,讲师,从事中药抗肿瘤免疫与分子机制研究, Tel: 15979171845, 0791-7118931, E-mail: guohuijun_81@126.com

- [4] 张磊,孟林.植物多糖的免疫调节作用研究进展[J].天津医科大学学报,2007,13(4):615.
- [5] 中国药典.一部[S].2010:295.
- [6] 高学敏,钟赣生.实用中药学[M].北京:中国中医药出版社,2006:190.
- [7] 李贵荣.野菊花多糖的提取及其对活性氧自由基的清除作用[J].中国公共卫生,2002,18(3):269.
- [8] Hisashi Matsuda. Structural requirements of flavonoids and related compounds for aldose reductase inhibitory activity[J]. Chem Pharm Bull,2002,50(6):788.
- [9] 母海成,金在久,施溯筠.玉米粗多糖对免疫低下小鼠免疫功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(20):227.
- [10] 石娟,邓兴安,周玲,等.黄精粗多糖对正常小鼠免疫功能的影响[J].中国现代应用药学,2011,28(1):19.
- [11] 李仪奎.中药药理实验方法学[M].上海:上海科学技术出版社,1991:159.

[责任编辑 聂淑琴]

index, activity of macrophage and content of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in the blood serum were tested. **Result:** In the process of lung carcinogenesis, compared with control group, LWDH and ED could reduce the rate of lung chemical carcinogenesis which was 18.2% and 36.4%, respectively. Compared with control group, LWDH and ED could also increase the spleen index, elevate the activity of macrophage ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and decrease the content of TNF- α in the blood serum ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** LWDH and ED can delay the occurrence and development of lung carcinoma induced by urethane through enhancing antitumor immunity and decreasing content of the inflammatory factor.

[**Key words**] urethane; induced lung carcinoma; Liuwei Dihuang Wan; Erdong Gao; antitumor immunity; tumor necrosis factor alpha

目前西医学在肿瘤的预防和早期治疗方面仍然缺乏有效的方法,而中医中药在防治恶性肿瘤方面的历史悠久^[1-2]。根据中医阴阳学说理论和实践证明,阴虚始终贯穿于肿瘤的发生发展过程,使用滋阴中药六味地黄丸可抑制小鼠自发乳腺癌或诱发性肺腺癌的生长^[3-5],和放化疗合并使用可提高放化疗疗效,减轻放化疗的副作用,并降低肿瘤的复发率^[6-7]。

二冬膏由天冬、麦冬组成,功能养阴润肺,高建平证实二冬膏具有抗炎和增强免疫的作用^[8]。但二冬膏是否也有预防肿瘤发生发展的作用,不同的滋阴药对于同一种类型肿瘤的预防作用是否存在相同的机制,国内外还没有相关研究。

西医学认为人体自身的免疫监视功能可预防肿瘤的发生,而免疫功能缺陷的人如艾滋病病人则好发恶性肿瘤,故机体的免疫功能状态对肿瘤的发生、发展、转移有着重要的影响。中医临床与实验研究也证明许多中药都能通过增强免疫功能发挥抗肿瘤的作用^[9-10]。因此本研究旨在观察两种不同滋阴中药六味地黄丸和二冬膏对小鼠诱发性肺肿瘤发生情况和抗肿瘤免疫功能的影响,初步探讨其免疫预防机制。

1 材料

1.1 药品与试剂 乌拉坦(国药集团化学试剂有限公司,批号 T20100310),六味地黄丸(北京同仁堂,批号 0033192,将 12 g 六味地黄丸溶于 100 mL 蒸馏水中制成 0.12 g·mL⁻¹六味地黄丸溶液),二冬膏(广东一方制药有限公司,天冬颗粒批号 1101048,麦冬颗粒批号 101059,将天冬颗粒 6 g 与麦冬颗粒 6 g 溶于 100 mL 蒸馏水中制成 0.06 g·mL⁻¹的二冬膏溶液),小鼠 TNF- α ELISA 测定试剂盒(上海西塘公司,批号 1105261),国产化学试剂石蜡、无水乙醇、二甲苯、4% 甲醛溶液、1% 肝素、6% 可溶性淀粉肉汤、姬姆萨-瑞特氏染液等,2% 鸡红

细胞悬液。

1.2 仪器 生物显微镜(日本 Olympus),石蜡包埋机(湖北博太电子科技有限公司),轮转式切片机(湖北亚光医用电子技术有限公司),EL-800 酶标仪(BIO-TEK 公司)。

1.3 动物 清洁级雌性昆明种小鼠,体重 18~20 g,由江西中医学院实验动物研究室提供,许可证号 SCXK(赣)2005-0001。

2 方法

2.1 小鼠肺肿瘤模型制备 雌性昆明种小鼠 33 只,以乌拉坦 1 g·kg⁻¹·d⁻¹皮下注射,连续注射 2 d 建立短期小鼠肺肿瘤诱发模型。

2.2 动物分组、给药与样本采集 将 33 只小鼠随机分成 3 组,每组 11 只:第 1 组为蒸馏水 ig 对照组,第 2 组为六味地黄丸 ig 组(1.56 g·kg⁻¹·d⁻¹),第 3 组为二冬膏 ig 组(0.78 g·kg⁻¹·d⁻¹),连续 ig 100 d。100 d 后摘除小鼠眼球取血,断颈处死小鼠,取脾脏、胸腺称重;取肺脏肉眼及解剖镜下观察肿瘤形成情况,然后将右肺固定于 4% 甲醛中;腹腔印片染色测定吞噬细胞吞噬率和吞噬指数。

2.3 病理切片观察 将在甲醛中固定 3 d 的小鼠肺脏常规石蜡包埋,切片,苏木精-伊红染色,显微镜下观察。

2.4 免疫功能检测

2.4.1 脾指数和胸腺指数检测 小鼠解剖后,取脾脏和胸腺称重并计算脾指数和胸腺指数。

脾(胸腺)指数 = 脾脏(胸腺)质量(mg)/小鼠体重(g)

2.4.2 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的测定 参考文献[11]方法。实验前 1 d 给每只小鼠腹腔注射 6% 可溶性淀粉肉汤 1 mL,以刺激小鼠腹腔中吞噬细胞增加。24 h 后给每只小鼠腹腔注射 2% 的鸡红细胞悬液 2 mL,轻揉腹部使鸡细胞分散,2 h 后,用颈椎脱臼法处死小鼠。取腹腔液印片,自然干燥。姬姆萨-瑞氏染色 5~10 min,冲洗,晾干,油镜观察,

计数 100 个吞噬细胞, 按下列公式计算吞噬率及吞噬指数。

$$\text{吞噬率} = (\text{吞噬了鸡红细胞的吞噬细胞数} / \text{观察到的吞噬细胞总数}) \times 100\%$$

$$\text{吞噬指数} = \text{被吞噬的鸡红细胞数} / \text{观察到的吞噬细胞总数}$$

2.5 血清中 TNF- α 含量测定 各组小鼠摘眼球取血, 室温下静置 1 h, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液于 -20 °C 冻存储用。血清中 TNF- α 含量用 ELISA 方法测定, 严格按试剂盒说明书操作, A₄₅₀ 测定由 EL-800 酶标仪完成。

2.6 统计方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 18.0 软件进行 *t* 检验分析, 以 *P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 药物对小鼠肺肿瘤发生的影响 肉眼观察: 小鼠肺肿瘤直径约为 0.5 ~ 3.0 mm, 呈现多发性, 略突起于肺胸膜表面, 大多呈圆形, 边缘整齐, 灰白色, 半透明, 经固定后呈白色。

镜下观察: 对照组小鼠有 7 例肺腺瘤, 腺瘤可见

排列成条索状或巢状的肿瘤细胞, 分化程度不一, 分化良好者有腺腔样结构。细胞大小与形态比较均一排列整齐, 胞浆嗜酸性染色较深, 核大小不等, 圆形嗜碱性深染, 染色质有点、块状浓集, 可见 1 ~ 2 个核仁。没有发生肿瘤的小鼠肺组织中均有不同程度的炎症浸润, 且中小支气管上皮呈现重度乳头状增生。而六味地黄丸组和二冬膏组肿瘤均为腺瘤, 且分化好, 有明显腺腔样结构, 没有发生肿瘤的小鼠肺组织比较正常, 未见明显炎症浸润。

肉眼及镜下检查对照组发瘤鼠有 7 只, 平均每只小鼠发生肿瘤数为 7 个; 六味地黄丸组发瘤鼠有 2 只, 平均每只小鼠发生肿瘤数为 2 个; 二冬膏组发瘤鼠有 4 只, 平均每只小鼠发生肿瘤数为 3 个。3 组小鼠肿瘤发生率分别为 63.6%、18.2%、36.4%。

3.2 对小鼠抗肿瘤免疫功能的影响 与对照组比较, 给药组小鼠的脾脏指数明显增加, 腹腔巨噬细胞的吞噬率和吞噬指数也明显增加, 其差异有统计学意义 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。但胸腺指数无明显差异 (表 1)。

表 1 各组小鼠的抗肿瘤免疫指标 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	脾指数/mg·g ⁻¹	胸腺指数/mg·g ⁻¹	吞噬率/%	吞噬指数
对照组	-	2.608 ± 0.267	1.643 ± 0.520	35.0 ± 9.8	0.556 ± 0.213
六味地黄丸	1.56	3.121 ± 0.630 ¹⁾	1.859 ± 0.534	43.2 ± 7.3 ¹⁾	0.947 ± 0.222 ²⁾
二冬膏	0.78	3.030 ± 0.379 ¹⁾	2.007 ± 0.452	46.3 ± 13.6 ¹⁾	1.111 ± 0.454 ²⁾

注: 与对照组相比¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01。

3.3 对小鼠血清中 TNF- α 含量的影响 小鼠血清中 TNF- α 含量对照组为 (40.34 ± 8.99) ng·L⁻¹, 六味地黄丸组为 (28.9 ± 11.3) ng·L⁻¹, 二冬膏组为 (26.65 ± 9.48) ng·L⁻¹。与对照组比较, 给药组小鼠血清中 TNF- α 含量均明显降低, 其差异有统计学意义 (*P* < 0.05, *P* < 0.01)。

4 讨论

根据中医阴阳学说理论, 人类肿瘤的发生、发展就是在内外因素的作用下导致人体阴阳动态平衡被破坏而产生。现代医学研究成果从癌基因、细胞信号传导、细胞周期等角度论证了这一观点^[12]。本课题组在此理论上提出机体“阴虚”是恶性肿瘤发病主要起因的“阴虚癌瘤相关”假说, 并认为滋阴可有效预防恶性肿瘤的发生和发展^[13]。

本研究选用两种滋阴中药六味地黄丸和二冬膏, 在给小鼠注射化学致癌剂乌拉坦后, 立即灌胃给药, 结果证明给药以后小鼠肺肿瘤的发生率和肿瘤发生个数均明显降低。对照组中没有发生肿瘤的小

鼠肺组织中均有不同程度的炎症浸润, 支气管上皮重度乳头状增生, 此为腺瘤的早期病变, 若延长诱发时间, 可发展为肺肿瘤; 而给药组发瘤小鼠肿瘤均为腺瘤, 分化程度高, 未发瘤小鼠肺组织未见明显炎症浸润。此结果显示六味地黄丸和二冬膏均能抑制小鼠肺肿瘤的发生发展和减轻炎症反应的发生, 并且六味地黄丸的作用优于二冬膏。

本研究中, 六味地黄丸和二冬膏对诱发性肺肿瘤小鼠的脾脏有明显的增重作用, 腹腔巨噬细胞的吞噬功能也明显增强, 表明机体的抗肿瘤免疫功能有所增强。TNF- α 由活化的巨噬细胞和 T 细胞产生, 在炎症反应、细胞免疫应答、肿瘤免疫中发挥关键作用。刘妍等证明六味地黄丸可降低小鼠脑中 TNF- α 及调节 TNF- α /TGF- β 的比值接近正常, 减轻炎症反应, 促进髓鞘修复, 从而达到防治实验性自身免疫性脑脊髓炎的作用^[14]。也有研究显示肺癌患者血清中 TNF- α 水平明显高于正常对照组, 且随着病情的进展而逐步升高^[15]。而在肺癌患者化疗后

sIL-2R、IL-6 和 TNF- α 的血清水平均明显下降^[16]。本研究的结果与上面的结果一致,给药组小鼠血清中 TNF- α 含量较肿瘤对照组明显降低,六味地黄丸与二冬膏可通过抑制 TNF- α 过度生成而抑制炎症瀑布效应的产生来延缓肿瘤发生发展。

然而,张军能等应用小柴胡颗粒治疗 Lewis 肺癌小鼠,发现治疗组小鼠的生存率显著提高,血清中 TNF- α 、IFN- γ 含量增高,这说明小柴胡颗粒可通过促进抗瘤细胞因子的分泌来抑制肿瘤生长^[17]。因此笔者猜测可能在肺肿瘤发生的不同阶段,六味地黄丸和二冬膏对 TNF- α 含量的影响也不同。在肿瘤发生早期,药物可能通过促进 TNF- α 的释放来抑制肿瘤生成,但到后期,TNF- α 的过度产生就导致了炎症反应和肿瘤晚期的恶病质,而这时滋阴药物对 TNF- α 的过度产生起到抑制作用,但这一假设还需进一步的动态观察试验来证实。

[参考文献]

- [1] 鲁恒心,方肇勤.从现代医学治疗肿瘤的缺陷谈中医药的优势[J].辽宁中医杂志,2007,28(7):394.
- [2] 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.
- [3] 徐振晔,郑展.试论中医阴阳平衡治疗恶性肿瘤[J].上海中医药杂志,2007,41(4):37.
- [4] 郑里翔,刘红宁,乔玉丹,等.六味地黄丸对自发乳腺癌小鼠瘤块中血管内皮生长因子和周期蛋白 D3 基因表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(11):117.
- [5] 李惠,金亚宏,姜廷良.六味地黄汤对小鼠诱发性肺腺瘤 P53 基因表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,1997,3(3):17.
- [6] 杜业勤,李玉新,张瑾熔,等.六味地黄汤化痰配合放

- 射治疗食管癌的临床研究[J].中华肿瘤防治杂志,2006,13(18):1428.
- [7] 葛彩凤.六味地黄丸减轻消化道肿瘤化疗毒副反应 34 例观察与护理[J].现代中西医结合杂志,2007,16(9):1283.
- [8] 高建平,许旭,吴耀平,等.二冬膏祛痰、抗炎及免疫作用的研究[J].中成药,2003,25(9):762.
- [9] 蔡秀江,黄美艳,丁安伟.二至丸考源及药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(23):272.
- [10] 刘玉军,李刚,马睿.天龙抗肿瘤研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(7):262.
- [11] 朱大诚,徐彭.医学功能学科实验指导[M].2版.北京:中国协和医科大学出版社,2010:173.
- [12] 颜兵,魏品康.中医阴阳动态失衡与肿瘤的关系[J].江苏中医药,2011,43(6):5.
- [13] 孙有智,刘红宁,朱卫丰,等.“阴虚癌瘤相关”假说的提出及其意义[J].江西中医学院学报,2008,20(4):1.
- [14] 刘妍,张平,李明.补肾方对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠 T 辅助细胞 1,17 和调节性 T 细胞的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(3):116.
- [15] Sachin Kumar, Randeep Guleria, Anant Mohan, et al. Utility of plasma tumour necrosis factor- α and transforming growth factor- β 1 as predictors of survival and treatment outcome in advanced non-small cell lung carcinoma[J]. Biomarkers,2010,15(5):446.
- [16] 余寿益,田华琴,黄志庆,等.肺癌患者血清 sIL-2R、IL-6 和 TNF- α 水平的测定及其临床意义[J].癌症,2000,19(10):945.
- [17] 张军能,张轶.小柴胡颗粒抗肺癌的机制研究[J].湖南中医药大学学报,2010,30(6):46.

[责任编辑 聂淑琴]