

# 补肾疏肝方对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠免疫及内分泌的影响

古兆森<sup>1</sup>, 王淑玲<sup>2\*</sup>, 刘源<sup>1</sup>

(1. 郑州大学第一附属医院中西医结合科, 郑州 450052;  
2. 郑州大学基础医学院病理生理学科, 郑州 450001)

**[摘要]** **目的:**研究补肾疏肝方对小鼠 Lewis 肺癌的抑制作用并探讨可能存在的免疫及内分泌机制。**方法:**选取荷瘤成功的小鼠 40 只, 随机分为 4 组, 分别为模型组、顺铂组、中药组、综合组。分别给予生理盐水(0.4 mL)、顺铂(0.5 mL, 0.2 g·L<sup>-1</sup>)、补肾疏肝方中药(0.4 mL, 1.75 g·L<sup>-1</sup>)、中药联合顺铂干预 14 d。于第 15 天摘眼球取血、剥取肿瘤称质量、计算抑瘤率。采取酶联免疫吸附(ELISA)的方法检测血清白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-10(IL-10)、雌二醇(E<sub>2</sub>)、睾酮(T)含量。**结果:**中药组、综合组、顺铂组抑瘤率及肺转移灶抑制率方面均显著高于模型组, 对比具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 中药组、顺铂组、综合组荷瘤小鼠血清 IL-2, T 水平升高; 血清 IL-10, E<sub>2</sub> 水平降低, 与模型组比较均有意义( $P < 0.05$ )。**结论:**补肾疏肝方可以抑制肿瘤生长, 降低肺转移灶数目; 具有调节免疫细胞因子 IL-2, IL-10 的作用, 从而提高荷瘤小鼠的免疫力; 可以调节荷瘤小鼠内分泌环境, 增强小鼠抗肿瘤的作用。

**[关键词]** 补肾疏肝方; Lewis 肺癌; 白细胞介素-2; 白细胞介素-10; 雌二醇; 睾酮

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0188-04

## Effect of Bushen Shugan Formula on Immune Function and Endocrine System of Lewis Lung Cancer Mice

GU Zhao-sen<sup>1</sup>, WANG Shu-ling<sup>2\*</sup>, LIU Yuan<sup>1</sup>

(1. Department of Integrative Chinese and Western Medicine, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Department of Pathophysiology, Basic Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Bushen Shugan (BSSG) formula on immune function and endocrine system of Lewis lung cancer mice and discuss the possible mechanism. **Method:** The mice transplanted Lewis lung cancer were randomly divided into model control group, BSSG group, BSSG combined with cisplatin (DDP) group and DDP group. After two weeks' treatment, the mice were sacrificed and blood was taken from eyeballs, and the tissue of tumor was taken and weighted. The concentration of serum interleukin-2 (IL-2), IL-10, estradiol (E<sub>2</sub>) and testosterone (T) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Compared with the control group, the BSSG group can inhibit mouse tumor growth and lung cancer metastasis. The content in blood serum of IL-2, T, E<sub>2</sub> of BSSG group, DDP group and BSSG combined with DDP group is higher than that of model control group respectively. The level of IL-10 in blood serum of them is lower than model control group respectively. **Conclusion:** BSSG formula can suppress tumor growth and decrease the number of lung metastatic tumors in the mice; BSSG formula can make an effect on the level of IL-2, IL-10, E<sub>2</sub> and T. It can improve the functions of immunity and regulate internal secretion.

**[Key words]** Bushen Shugan formula; Lewis lung cancer; interleukin-2 (IL-2); IL-10; estradiol (E<sub>2</sub>); testosterone (T)

**[收稿日期]** 20111103(018)

**[基金项目]** 河南省科技厅科技攻关项目(112300410049)

**[第一作者]** 古兆森, 硕士, 从事中西医结合防治呼吸系统疾病研究, Tel: 15093224200, E-mail: gzs420@126.com

**[通讯作者]** \* 王淑玲, 博士, 教授, 从事中西医结合防治呼吸系统疾病研究, E-mail: wsl651127@163.com

世界上很多国家肺癌的发病率和死亡率一直呈急剧上升趋势,目前已居恶性肿瘤的第一位。在我国,肺癌的死亡率也已代替肝癌成为首位恶性肿瘤死亡原因,占全部恶性肿瘤死亡的 22.7%,且发病率及死亡率仍呈上升趋势。肺癌多发生于中老年人,与机体脏腑功能减退,阴阳气血失调,情绪躁动不安密切相关。补肾疏肝方为医者运用多年的经验方,以五子衍宗丸合逍遥散加减组方,具有补肾养精、疏肝理气、化痰散结等功效,经多年临床观察用于晚期非小细胞肺癌具有良好疗效<sup>[1]</sup>。本文从对免疫调节及内分泌系统影响角度来探讨该方可能存在的抗肿瘤机制。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** C57BL/6 雄性近交系小鼠 50 只,6~8 周龄,体重(20±2)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[合格证号 SCXK(京)2006-0009],饲养于郑州大学实验动物中心。

**1.2 药物** 补肾疏肝方(由枸杞、车前子、覆盆子、菟丝子、制北五味子、淫羊藿、柴胡、瓜蒌、黄芪等组成,按常规方法制成 1.75 g·mL<sup>-1</sup>,4℃ 保存备用),注射用顺铂(DDP,规格 10 mg/支,山东齐鲁制药有限公司,批号 712056CF),均购自郑州大学第一附属医院药房。

**1.3 仪器与试剂** SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台(百级)(0307126,苏州净化设备有限公司),电子天平(d=0.1 mg,北京赛多利斯仪器系统有限公司),PYX-DHS-35X40 型隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂)。小鼠 ELISA 检测试剂盒(试剂盒货号分别为 CK-E20010M,CK-E20005M,CK-E20381M,CK-E20375M,美国 R&D 公司)。

**1.4 模型制备及分组** 选取生长良好的 Lewis 肺癌荷瘤小鼠,脱颈处死,75% 乙醇浸泡消毒,在净化工作台上,无菌条件下剥取肿瘤,选择状态良好的肿瘤组织,剪碎,匀浆研磨,按照肿瘤质量(g)与生理盐水(mL)1:3 的比例制成细胞悬液,经 0.2% 台盼蓝染色计数,活细胞数>95%。调整细胞密度为 1×10<sup>6</sup> 个/mL。取健康 C57BL/6 小鼠 50 只,每只小鼠右腋皮下接种 0.2 mL 细胞悬液。将荷瘤接种成功 40 只小鼠随机分为模型组、顺铂组、中药组、综合组,每组 10 只。

**1.5 给药方式** 本实验采用中药质量浓度为 1.75 g·mL<sup>-1</sup>,顺铂注射液质量浓度为 0.2 g·L<sup>-1</sup>。接种后第 7 天开始干预,模型组及中药组采用灌胃的给药方法,每天分别给予 0.9% NaCl 及中药各 0.4

mL;顺铂组采用腹腔注射顺铂 0.5 mL,1 次/2 d,共 3 次;综合组每天给予中药 0.4 mL 及腹腔注射顺铂 0.5 mL,1 次/2 d,共 3 次。干预 14 d 后,于 15 d 取血,脱颈处死小鼠,剥取肿瘤组织,称重,计算抑瘤率,摘取肺组织,计算肺部转移率。用小鼠 ELISA 试剂盒检测血清白细胞介素-2(IL-2),白细胞介素-10(IL-10),雌二醇(E<sub>2</sub>),睾酮(T)水平。

## 1.6 观察指标

### 1.6.1 小鼠生存状态

**1.6.2 计算抑瘤率** 实验后将剥取的肿瘤组织称重,计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = (1 - \text{实验组平均瘤重} / \text{对照组平均瘤重}) \times 100\%$$

**1.6.3 计算肺转移率** 实验后解剖小鼠,将 Bouin 氏液经气管注入肺中,并在注入处下方结扎气管,摘取肺部。计算肺部转移瘤数目,计算转移率。

$$\text{转移率} = (1 - \text{实验组平均转移数目} / \text{对照组平均转移数目}) \times 100\%$$

**1.6.4 血清 IL-2, IL-10, E<sub>2</sub>, T 水平** 实验结束后摘取眼球取血,3 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 10 min 分离血清。血清 IL-2, IL-10, E<sub>2</sub>, T 水平检测严格按照小鼠 ELISA 检测试剂盒说明书进行。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件对实验结果进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示;多样本均数比较采用方差分析,组间比较用 LSD 检验,以  $\alpha = 0.05$  为检验水准。

## 2 结果

**2.1 补肾疏肝方对各组小鼠精神状态的影响** 在治疗过程中,中药组小鼠精神状态较好,进食增多,体重增加,毛色光润,活泼好动。顺铂组小鼠则食欲欠佳,体重下降,毛色较差,喜静厌动。其余二组基本状况介于前二者之间。

**2.2 补肾疏肝方对各组荷瘤小鼠移植瘤的作用** 与模型组相比,中药组、顺铂组及综合组抑制小鼠肿瘤生长方面均有显著性差异( $P < 0.01$ ),结果均具有统计学意义。结果见表 1。

表 1 补肾疏肝方对各组 Lewis 肺癌移植瘤的作用( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	瘤重/g	抑瘤率/%
模型	105.174 ± 1.516	
DDP	102.966 ± 1.454 <sup>1)</sup>	42.67 <sup>1)</sup>
补肾疏肝方	103.503 ± 0.940 <sup>1)</sup>	32.3 <sup>1)</sup>
DDP + 补肾疏肝方	102.155 ± 0.946 <sup>1,2)</sup>	58.35 <sup>1,2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与中药组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

**2.3 补肾疏肝方对各组小鼠肺转移的作用** 顺铂组、中药组及综合组小鼠的肺转移灶数目均明显低于模型组 ( $P < 0.05$ ), 对比具有统计学意义 (表 2)。

表 2 补肾疏肝方对肺转移率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	肺转移灶/个	抑制率/%
模型	1 021 ± 8. 301	
DDP	1 011. 125 ± 5. 540	47. 02 <sup>1)</sup>
补肾疏肝方	1 012. 625 ± 5. 208	39. 89 <sup>1)</sup>
DDP + 补肾疏肝方	1 010. 89 ± 8. 753	48. 14 <sup>2)</sup>

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

**2.4 补肾疏肝方对各组小鼠血清 IL-2, IL-10 的影响** 与模型组相比, 中药组、顺铂组及综合组血清 IL-2 含量升高, 血清 IL-10 含量降低, 均差异明显

表 4 补肾疏肝方对小鼠血清 E<sub>2</sub>, T 含量及 E<sub>2</sub>/T 的作用

组别	E <sub>2</sub> /pmol·L <sup>-1</sup>	T/pmol·L <sup>-1</sup>	E <sub>2</sub> /T
模型	1 021. 545 ± 0. 720	5. 341 ± 0. 359	4. 051 ± 0. 332
DDP	1 017. 508 ± 0. 770 <sup>1)</sup>	6. 286 ± 0. 337 <sup>1,2)</sup>	2. 796 ± 0. 243 <sup>1,2)</sup>
补肾疏肝方	1 017. 74 ± 0. 798 <sup>1)</sup>	8. 254 ± 0. 420 <sup>1)</sup>	2. 152 ± 0. 109 <sup>1)</sup>
DDP + 补肾疏肝方	1 016. 31 ± 0. 774 <sup>1,2,3)</sup>	10. 8 ± 0. 460 <sup>1,2,3)</sup>	1. 515 ± 0. 125 <sup>1,2,3)</sup>

### 3 讨论

肺癌属中医学“息贲”、“肺积”等范畴。不少学者认为肺癌发生与正气虚损和邪毒入侵关系密切, 基本病机为正虚邪实, 正虚是肺癌发生的基础, 是复发、转移的关键, 邪毒是重要的致病条件。朱丹溪指出“壮人无积, 虚人则有之”, 肺癌是因虚而得病, 由虚而致实, “气不足, 而后邪气居之”。肺癌多见于 40 岁以上中老年人, “五八肾气衰”, 肾中精气亏虚于内, 外邪乘虚入侵, 痰、湿、气、淤、毒等搏结日久成积。研究还发现抑郁状态不仅是肺癌发病前的重要危险因素之一, 同时也是肺癌发病后的主要负性情绪表现<sup>[2-3]</sup>, 情志失调, 气机不得疏泄, 病愈深重。补肾疏肝方由五子衍宗丸合逍遥散化裁而成, 具有补肾养精、疏肝理气、调畅情志、化痰散结之功效, 临床施治, 每多验效。

IL-2 为 T 细胞生长因子, 是机体免疫调节中最重要的细胞因子之一。刺激 T 细胞的生长和分化, 激活 NK 细胞和巨噬细胞, 促进 CTL 功能, 从而杀灭肿瘤细胞。IL-10 是一种由 Th<sub>2</sub> 细胞和癌细胞分泌的相对分子质量为  $18 \times 10^3$  的酸性蛋白, 抑制活化的单核细胞产生细胞因子, 抑制 Th1 细胞因子的产生, 促进 B 细胞增殖, 具有多向性的强免疫抑制因子, 能改变机体的免疫应答和 MHC II 类抗原的表

( $P < 0.01$ ), 对比具有统计学意义 (表 3)。

表 3 补肾疏肝方对小鼠血清 IL-2, IL-10 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	IL-2	IL-10
模型	1 079. 202 ± 6. 072	117. 615 ± 6. 595
DDP	10 100. 235 ± 6. 399 <sup>1,2)</sup>	78. 187 ± 5. 143 <sup>1,2)</sup>
补肾疏肝方	10 119. 88 ± 5. 052 <sup>1)</sup>	88. 960 ± 4. 449 <sup>1)</sup>
DDP + 补肾疏肝方	10 127. 91 ± 6. 235 <sup>1,3)</sup>	98. 841 ± 5. 771 <sup>1,2,3)</sup>

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与中药组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 DDP 组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$  (表 4 同)。

**2.5 补肾疏肝方对各组小鼠血清 E<sub>2</sub>, T 的影响** 与模型组相比, 中药组、顺铂组及综合组血清 T 含量升高, 血清 E<sub>2</sub> 含量降低, E<sub>2</sub>/T 比值降低, 差异均明显 ( $P < 0.01$ )。见表 4。

达, 并介导 Th1 和 Th2 类 T 细胞之间的相互调节<sup>[4]</sup>。Li Zeng 等<sup>[5]</sup>认为 IL-10 能增加引流淋巴管中肿瘤细胞的数量, 介导肿瘤细胞的转移, 并作为自分泌或旁分泌生长因子直接促进肿瘤生长, 并能抑制细胞凋亡。Re V F 等<sup>[6]</sup>分析了大量非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者的临床资料, 发现患者血浆 IL-10 水平较健康志愿者明显升高, 而对于治疗有效组, IL-10 水平明显下降。有研究报道五子衍宗丸具有提高非特异性免疫功能的作用<sup>[7]</sup>。董晓辉等<sup>[8]</sup>观察扶正类中药黄芪注射液联合 MHC I 类限制性肿瘤抗原多肽 Mut1 致敏的树突细胞 (DCs) 对肺癌小鼠的治疗作用, 发现肿瘤抗原多肽致敏的 DCs 与黄芪注射液联合治疗比单用 DCs 更有效的治疗转移性肺癌, IL-2/IL-4 比例明显升高。本研究发现补肾疏肝方能明显提高荷瘤小鼠血清 IL-2 水平 ( $119. 67 \pm 5. 919$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $P < 0.01$ ), 降低 IL-10 水平 ( $88. 96 \pm 4. 491$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $P < 0.01$ ), 提示补肾疏肝方可能通过调节反映免疫平衡状态的 Th1/Th2 相关细胞因子的表达水平而发挥抗肿瘤作用。

流行病学资料及临床研究表明, 肺癌发生发展过程中往往伴随外周血清中性激素紊乱的情况<sup>[9-10]</sup>。Slatore 等对 36 588 例绝经期前后的女性研究后发现, 服用雌激素超过 10 年的女性罹患肺癌的

机率要远高于未服用雌激素的女性<sup>[11]</sup>。苏庆军等检测了 27 例肺癌患者、19 例肺良性病变患者和 34 例正常健康人员的血清卵泡刺激素、黄体生成素、雌二醇、睾酮、孕酮及催乳素,发现肺癌患者血清中睾酮水平显著下降,雌二醇显著上升,表明男性患者体内存在 T、E<sub>2</sub> 水平的失衡和紊乱<sup>[12]</sup>。顾玉兰等<sup>[13]</sup>亦发现男性及绝经后女性肺癌患者血清中存在性激素代谢的异常。CHEN G 等<sup>[14]</sup>研究发现 NSCLC 患者体内的雌激素水平往往较正常同年龄人高,经过有效治疗后患者高雌激素水平会明显下降。Weinberg 等检测发现晚期 NSCLC 患者肺癌组织中的芳香化酶活性较正常肺组织高,相应体外实验表明,芳香化酶抑制剂 anastrozole 能显著抑制肺癌细胞 A549 的增殖<sup>[15]</sup>。芳香化酶是正常男性及绝经期妇女体内雄激素转化为雌激素的限速酶,肺癌患者雌激素的增多及雄激素的降低可能与芳香化酶的过表达有关。雌激素有助于催化起始阶段肺癌细胞的增殖,并可促使增殖迅速的细胞向恶性细胞发生转化,抑制雌激素的产生可能会达到抗肿瘤的作用。本研究结果显示,与模型组比较,补肾疏肝方组荷瘤小鼠血清 E<sub>2</sub> 水平显著下降 $[(17.74 \pm 0.798) \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}]$  ( $P < 0.01$ ), T 水平明显上升 $[(8.254 \pm 0.42) \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}]$  ( $P < 0.01$ ), E<sub>2</sub>/T 显著下降 ( $P < 0.01$ ),提示本方抗肿瘤的机制可能与其调节雌雄激素的分泌、改善机体内分泌紊乱状态有关。

综上所述,本研究结果显示补肾疏肝方具有抑制肿瘤生长、降低肺转移灶数目的作用,其抗肿瘤的作用机制可能与调节 Th1/Th2 相关细胞因子的表达及雌雄激素的分泌等途径有关。

#### [参考文献]

- [ 1 ] 刘源,王淑玲. 补肾散结方联合 GP 方案治疗晚期非小细胞肺癌临床疗效观察[J]. 中华中医药杂志, 2011,26(4):864.
- [ 2 ] 毛佩贤,贺佳丽,蔡焯基,等. 肺癌患者抑郁状态的相关因素分析[J]. 中国心理卫生杂志, 2000, 14(6):417.
- [ 3 ] Ashbury F D, Madlensky L, Raich P, et al. Antidepressant prescribing in community cancer care [J]. Support Care Cancer, 2003, 11(5):278.
- [ 4 ] 何维. 医学免疫学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2010:414.
- [ 5 ] Zeng Li, Colleen O'Connor, Zhang Jiayou, et al. IL-10 promotes resistance to apoptosis and metastatic potential in lung tumor cell lines [J]. Cytokine, 2010, 49(3): 294.
- [ 6 ] Re V F, Orditura M, Galizia G, et al. Serum interleukin-10 levels as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients [J]. Chest, 2000, 117:365.
- [ 7 ] 金龙,葛争艳,刘建勋. 五子衍宗丸对小鼠记忆力、免疫功能、耐缺氧及耐疲劳的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16):123.
- [ 8 ] 董晓辉,董尧成. 黄芪注射液增强树突细胞的抗肿瘤作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(1):25.
- [ 9 ] Zhou X D, Cai W Q, Cao H W. Relationship between level of sexual hormone in external blood and aromatase expression in cancer tissues of male patients with lung cancer [J]. Chin J Cancer, 2002, 21(3): 259.
- [ 10 ] Stabile L P, Davis A L G, Gubish C T, et al. Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  and show biological responses to estrogen [J]. Cancer Res, 2002, 62:2141.
- [ 11 ] Slatore C G, Chien J W, Au D H, et al. Lung cancer and hormone replacement therapy: association in the vitamins and lifestyle study [J]. J Clin Oncol, 2010, 28: 1540.
- [ 12 ] 苏庆军,陈建国,王一男,等. 男性肺癌患者血清性激素水平的分析[J]. 华南国防医学杂志, 2007, 21(6):13.
- [ 13 ] 顾玉兰,张子文,李璐,等. 肺癌患者血清性激素水平的变化及意义[J]. 中国实用医药, 2010, 5(1):7.
- [ 14 ] Chen G G, Zeng Q, Tsr G M. Estrogen and its receptors in cancer [J]. Med Res Rev, 2008, 28(6):954.
- [ 15 ] Weinberg O K, Marouez-garban D C, Fishbein M C, et al. Aromatase inhibitors in human lung cancer therapy [J]. Cancer Res, 2005, 65(24): 11287.

[责任编辑 邹晓翠]