

参芪扶正注射液对化疗后免疫抑制的减毒作用

史晓光, 丁治国*, 张林

(北京中医药大学东直门医院普外科, 北京 100700)

[摘要] **目的:**探讨参芪扶正注射液含药血清对化疗药物所造成免疫抑制的减毒作用。**方法:**选用 Wistar 雄性大鼠 20 只, 随机分为含药血清组和空白血清组。含药血清组按 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的剂量尾静脉注射参芪扶正浓缩液, 每日给药 2 次, 连续给药 5 次。空白血清组给予生理盐水代替参芪扶正浓缩液, 余相同。2 组大鼠于末次给药后 1 h 后自腹主动脉采血, 分离血清。研究设药物组和对照组。药物组分别用 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 注射液 ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、顺铂注射液 ($6.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、参芪扶正注射液含药血清作用于小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞; 对照组用空白血清作用于 RAW264.7 细胞。利用酶标仪对作用后的 RAW264.7 细胞进行检测, 观察 5-Fu 注射液、顺铂注射液、含药血清对 RAW264.7 细胞增殖的影响。**结果:**单用参芪扶正注射液组与空白对照组相比能明显促进 RAW264.7 细胞增殖 ($P < 0.01$)。5-Fu、顺铂注射液联合含药血清后与单用 5-Fu、顺铂注射液相比, 对于 RAW264.7 细胞增殖的抑制明显降低, 其差异皆有显著性 ($P < 0.01$)。**结论:**参芪扶正注射液在体外环境下可促进巨噬细胞的增殖, 改善化疗药物所造成的免疫抑制, 对不同化疗药物的减毒趋势相同而减毒强度不同。

[关键词] 化疗; 参芪扶正注射液; RAW264.7 细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0158-03

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110721.1733.004 **[网络出版时间]** 2011-07-21 17:33

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110721.1733.004.html>

The Attenuation of Shenqi Fuzheng Injection Treatment on Immunosuppression Caused by Chemotherapeutics

SHI Xiao-guang, DING Zhi-guo*, ZHANG Lin

(Department of General Surgery, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To explore attenuation that serum containing drug of Shenqi Fuzheng injection treatment on immunosuppression caused by chemotherapeutics. **Method:** Twenty male Wistar rates are divided into drug serum group and control group. Drug serum group is injected through caudal vein with $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Shenqi Fuzheng injection twice a day and five times in total. Control group are injected with 0.9% NaCl solution instead of Shenqi Fuzheng injection and others are the same. All the rates' blood are collected from abdominal aorta and then serum are Separated. Researches are divided into drug group and control group. In drug group, RAW264.7 cells are treated with Fluorouracil injection ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), Cisplatin injection ($6.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), drug serum and in control group no-drug serum is used instead of drug. Treated RAW264.7 cells are detected with microplate reader. Observe effect on Fluorouracil injection, Cisplatin injection, serum containing drug of Shenqi Fuzheng injection on cell multiplication of RAW264.7 cells. **Result:** The serum containing drug of Shenqi Fuzheng injection can promote RAW264.7 cells multiplication ($P < 0.01$). The serum containing drug of Shenqi Fuzheng injection can produce

[收稿日期] 20110531(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81001524)

[第一作者] 史晓光, 副主任医师, 研究方向: 中西医结合围手术期处理, Tel:010-84013135, E-mail:13301119560@126.com

[通讯作者] * 丁治国, 主治医师, 研究方向: 中西医结合围手术期处理, Tel:010-84013135, E-mail:dingzhiguo_1@yahoo.com.cn

attenuation on immunosuppression caused by Fluorouracil injection and Cisplatin injection ($P < 0.01$).

Conclusions: *In vitro* environment Shenqi Fuzheng injection can promote RAW264.7 cells multiplication, and improve immunosuppression caused by chemotherapeutics. It can induce same trend and different intension of attenuation on different types of chemotherapy drugs.

[**Key words**] chemotherapy; Shenqi Fuzheng injection; RAW264.7 cells

化疗作为肿瘤三大常规治疗手段之一,能弥补手术和放疗的不足。但化疗药物缺乏选择性作用,在杀伤肿瘤细胞的同时,也会对机体带来损伤,特别是对免疫功能有很大的影响。参芪扶正注射液是国内首创的纯中药静脉型大输液,具有补中益气、活血化瘀功效,以往研究显示其可明显减轻化疗药物对免疫系统的抑制,且多从检测淋巴细胞、白细胞等方面来验证其减毒作用^[1]。本课题以小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞为研究对象,探讨参芪扶正注射液含药血清对化疗药物所造成免疫抑制的减毒作用。

1 材料

1.1 动物 健康 Wistar 大鼠 20 只,雄性,体重 206~225 g。北京维通利华实验动物公司提供,合格证号 SCXK(京)2006-0009。

1.2 细胞 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞株,中国中医科学院中药研究所惠赠。

1.3 药物 参芪扶正注射液浓缩液(10 mL 相当于生药 10 g),丽珠集团利民制药厂提供,批号 071130;5-氟尿嘧啶(5-Fu)注射液,上海旭东海普药业有限公司生产,批号 090108;顺铂注射液,江苏豪森药业股份有限公司生产,批号 091102。

2 方法

2.1 参芪扶正注射液含药血清的制备 将大鼠随机分为 2 组,参芪扶正注射液给药组(10 只)和空白组(10 只)。2 组大鼠在体重方面的差异无统计学意义。将随机分组后的大鼠按如下方案给药:参芪扶正注射液给药组按 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给予参芪扶正浓缩液尾静脉注射,每日给药 2 次(间隔 6 h 以上),剂量为 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,连续给药 5 次,空白组按 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给予生理盐水,每日给药 2 次,连续给药 5 次,余同含药血清组。最后 1 次给药后 1 h 内,自腹主动脉采血。采血结束后, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,分离血清, $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.2 细胞培养 RAW264.7 细胞用含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 完全培养液,在 5% CO_2 , $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条

件下培养箱培养。2 d 传代 1 次。

2.3 5-Fu,顺铂药液的制备 取 5-Fu 注射液($0.25 \text{ g}/10 \text{ mL}$)1 支,用无血清 1640 液稀释至 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,然后倍比稀释该药液;取顺铂注射液($10 \text{ mg}/\text{支}$)1 支,用无血清 1640 液稀释至 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,然后倍比稀释该药液。

2.4 5-Fu,顺铂注射液对 RAW264.7 细胞的抑制作用 取对数生长期 RAW264.7 细胞,调细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,接种于 96 孔板,每孔加入细胞悬液 $160 \text{ }\mu\text{L}$ 。5-Fu 组和顺铂组在每孔中加入不同质量浓度的药液 $20 \text{ }\mu\text{L}$ 和空白血清 $20 \text{ }\mu\text{L}$,空白对照组用 $20 \text{ }\mu\text{L}$ 无血清 1640 液代替药液。各孔加液后总体积为 $200 \text{ }\mu\text{L}$ 。化疗药物组分别设置 6 个浓度,每个浓度设 4 个复孔。5-Fu 注射液的 6 个质量浓度分别为 800,600,400,200,100,50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。顺铂注射液的 6 个质量浓度分别为 50,25,12.5,6.25,3.125,1.5625 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。加药结束后,96 孔板置 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 条件下培养 24 h。从培养箱里取出 96 孔板,弃上清液,加入无血清 1640 培养液 $200 \text{ }\mu\text{L}$,再在各孔中加入 $20 \text{ }\mu\text{L}$ 0.5% 的 MTT 溶液,放入培养箱中继续培养 4 h。从培养箱里取出 96 孔板,弃上清液,每孔加入 $200 \text{ }\mu\text{L}$ 二甲基亚砜,微量震荡仪震荡 10 min,用全自动酶标仪测 570nm 处 A 值。根据结果计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{空白对照组}} - A_{\text{药物组}}) / A_{\text{空白对照}} \times 100\%$$

2.5 参芪扶正注射液含药血清对 5-Fu,顺铂注射液的减毒作用 设空白血清对照组、参芪血清组、5-Fu 组($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、参芪血清 + 5-Fu 组($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、顺铂组($6.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、参芪血清 + 顺铂组($6.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)共 6 个组,每组 6 个复孔,每孔加入 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 密度的细胞悬液 $160 \text{ }\mu\text{L}$,然后分别加入空白血清/含药血清 $20 \text{ }\mu\text{L}$,化疗药物/1640 液 $20 \text{ }\mu\text{L}$,各孔加液后总体积为 $200 \text{ }\mu\text{L}$ 。置 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 条件下培养 24 h。同 2.3 法测 570 nm 处 A,根据结果计算抑制率。

2.6 统计学处理 本研究数据处理所用统计学软

件为 SAS 9.0 版本, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 5-Fu, 顺铂注射液对 RAW264.7 细胞的抑制作用 6 组不同浓度的 5-Fu, 顺铂注射液与空白对照组相比均能显著抑制 RAW264.7 细胞 ($P < 0.05$), 其抑制作用呈现剂量依赖性特点, 随着剂量的增加抑制率随之升高。5-Fu 注射液顺铂注射液对 RAW264.7 细胞的抑制作用的回归方程: $Y = 7.790 2X + 43.257$ 。 $Y = 36.114X + 18.711$ 。5-Fu 的 $IC_{50} 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 顺铂的 $IC_{50} 6.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2 参芪扶正注射液含药血清对 5-Fu, 顺铂注射液的减毒作用 单用参芪扶正注射液组与空白对照组相比能明显促进 RAW264.7 细胞增殖 ($P < 0.01$)。5-Fu, 顺铂注射液联合含药血清后与单用 5-Fu, 顺铂注射液相比, 对于 RAW264.7 细胞增殖的抑制明显降低, 其差异皆有显著性 ($P < 0.01$)。5-Fu 注射液联合含药血清后与空白对照组相比, 对于 RAW264.7 细胞增殖抑制的差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 参芪扶正注射液含药血清对 5-Fu, 顺铂注射液作用 24 h 的减毒作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	A	抑制率/%
空白对照	0.62 ± 0.06	-
含药血清(20 μL)	1.49 ± 0.39 ¹⁾	-140.5
空白血清(20 μL) + 5-Fu(50 mg·L ⁻¹)	0.21 ± 0.02 ¹⁾	66.1
含药血清(20 μL) + 5-Fu(50 mg·L ⁻¹)	0.33 ± 0.02 ^{1,2)}	46.3
空白血清(20 μL) + 顺铂(6.25 mg·L ⁻¹)	0.28 ± 0.06 ¹⁾	54.0
含药血清(20 μL) + 顺铂(6.25 mg·L ⁻¹)	0.64 ± 0.03 ³⁾	-3.84

注: 与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 5-Fu 组比较²⁾ $P < 0.01$; 与顺铂组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

本研究中, 6 种不同浓度的 5-Fu, 顺铂注射液与空白对照组相比均能显著抑制 RAW264.7 细胞的增殖 ($P < 0.05$), 且抑制作用呈剂量依赖性特点。此结果与临床实践及以往的实验研究^[2]相符, 从中可以确定 5-Fu, 顺铂注射液的 IC_{50} , 为进一步实验做准备。

参芪扶正注射液含药血清可明显促进 RAW264.7 细胞的增殖, 与空白对照组相比有显著差异 ($P < 0.01$), 提示参芪扶正注射液可促进巨噬细胞的增殖, 从而增强患者的免疫功能。

本研究中, 5-Fu, 顺铂注射液联用含药血清后, 对于 RAW264.7 细胞增殖的抑制都比单独应用时显著降低 ($P < 0.01$)。提示参芪扶正注射液在体外环境下对于化疗药物造成的免疫抑制具有明显的减毒作用, 促进巨噬细胞增殖可能是其减毒作用的机制之一。

本实验中, 我们选用的 5-Fu, 顺铂是分属不同种类、作用途径不同的两类化疗药物。其中 5-Fu 属于抗代谢类药物中的胸苷酸合成酶抑制剂, 顺铂属于铂类抗肿瘤药物。实验结果显示, 参芪扶正注射液对这两种化疗药物均有显著的减毒作用, 提示参芪扶正注射液对化疗药物的减毒趋势相同, 不因其种类及作用途径的改变而改变。同时, 在减毒强度方面, 5-Fu 注射液联用含药血清后, 其对 RAW264.7 细胞的抑制率由 66.1% 下降到 46.3%, 虽有明显改善, 但仍较空白对照组有显著差异 ($P < 0.01$); 而顺铂注射液的抑制率则由 54% 下降到 -3.84%, 与空白对照组相比无统计学意义。因此, 尚不能说顺铂注射液联合含药血清后对 RAW264.7 细胞有抑制作用。此结果提示参芪扶正注射液对不同种类化疗药物的减毒强度不同, 配合化疗药物应用时其改善免疫抑制的程度也就不同。由于本研究是在体外进行的小样本实验, 且仅针对巨噬细胞系统, 缺乏体内实验的大样本数据及免疫系统其他组成部分的实验结果, 因此为了明确参芪扶正注射液对不同种类化疗药物在体内具体的减毒效果, 还需今后进一步的研究验证。

综上所述, 参芪扶正注射液在体外环境下可促进巨噬细胞的增殖, 改善化疗药物所造成的免疫抑制。另外, 参芪扶正注射液对不同化疗药物的减毒趋势相同, 不因其种类及作用途径的改变而改变; 与此同时, 参芪扶正注射液对化疗药物的减毒强度不同, 其具体减毒效果尚有待进一步的研究验证。

[参考文献]

[1] 朱小玉, 陈运贤. 参芪扶正注射液对化疗后小鼠免疫功能保护作用研究[J]. 中国免疫学杂志, 2006, 22(10): 925.

[2] 黄波, 冯作化. 化疗药物体内外对免疫活性细胞的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2002, 9(1): 39.

[责任编辑 聂淑琴]