

化癥丸对小鼠 Lewis 肺癌生长及血栓形成相关因子的干预作用

于明薇, 杨国旺*, 王笑民

(首都医科大学附属北京中医医院肿瘤科, 北京 100010)

[摘要] **目的:**观察以益气活血解毒为治法的化癥丸对肿瘤生长及血栓形成相关因子的影响。**方法:**建立小鼠 Lewis 肺癌动物模型,造模后 24 h 随机分组并开始给药,实验分为 5 组:模型组(无菌水 10 mL·kg⁻¹ ig,0.9% NaCl 10 mL·kg⁻¹ ip,1 次/d)、低分子肝素组(无菌水 10 mL·kg⁻¹ ig,低分子肝素注射液 100 u·kg⁻¹,ip)、环磷酰胺(CTX)组[无菌水 10 mL·kg⁻¹ ig,CTX 50 mg·kg⁻¹(1,6,11,16 d) ip,1 次/d]、化癥丸组(化癥丸 4 g·kg⁻¹ ig,0.9% NaCl 10 mL·kg⁻¹ ip,1 次/d)、空白对照组(无菌水 10 mL·kg⁻¹ ig,0.9% NaCl 10 mL·kg⁻¹ ip,1 次/d),给药 12 d 或 19 d。定期观察各组小鼠体重及肿瘤生长情况,接种后 13,20 d 处死小鼠,检测瘤重、肺转移数,酶联免疫法(ELISA)检测小鼠血清肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、P-选择素(P-selectin)、内皮素-1(ET-1)水平。**结果:**化癥丸组小鼠瘤重显著低于模型组($P < 0.01$),抑瘤率分别为 34.97% (13 d)和 31.52% (20 d),肺转移抑制率为 83.25% (20 d)。20 d 化癥丸组小鼠血清 ET-1 水平低于模型组($P < 0.05$),P-selectin,ET-1 水平低于低分子肝素组($P < 0.05$),并显著低于 CTX 组($P < 0.01$)。**结论:**化癥丸作用于 Lewis 肺癌荷瘤小鼠,具有一定抗肿瘤生长的作用,并能降低荷瘤小鼠异常升高的血栓形成相关因子水平。

[关键词] 益气活血解毒;肿瘤;血栓形成;化癥丸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0163-04

Effect of Huayu Wan on Tumor Growth and Expression of Thrombosis Related Factors in Lewis Lung Cancer-bearing Mice

YU Ming-wei, YANG Guo-wang*, WANG Xiao-min

(Department of Oncology, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China)

[Abstract] **Objective:**To observe the effect of Huayu Wan on tumor growth and expression of thrombosis related factors in Lewis lung cancer-bearing mice. **Method:** Lewis lung cancer model in mice was established. They were then divided into 5 groups 24 h after model establishment: model group (sterile water 10 mL·kg⁻¹ ig,0.9% NaCl 10 mL·kg⁻¹ ip, daily), low-molecular-weight heparins group (sterile water 10 mL·kg⁻¹ ig, low-molecular-weight heparins 100 u·kg⁻¹ ip, daily), cyclophosphamide (CTX) group (sterile water 10 mL·kg⁻¹ ig, CTX 50 mg·kg⁻¹(1,6,11,16 d) ip, once), Huayu Wan group (Huayu Wan 4 g·kg⁻¹ ig,0.9% NaCl 10 mL·kg⁻¹ ip, daily) and control group (sterile water 10 mL·kg⁻¹ ig,0.9% NaCl 10 mL·kg⁻¹ ip, daily). The tumor inhibiting rate, the inhibiting rate of lung metastasis and change of weight was observed regularly and the levels of tumor necrosis factor-α(TNF-α), P-selectin, endothelin-1 (ET-1) in peripheral blood serum were tested by ELISA. **Result:** The decrease of tumor weight was obvious in Huayu Wan group ($P < 0.01$). The tumor inhibition rate was 34.97% (13 d) and 31.52% (20 d), the inhibiting rate of lung metastasis was 83.25% (20 d). The level of ET-1 in

[收稿日期] 20110124(002)

[基金项目] 北京市卫生局、北京市中医管理局青年科学研究资助项目(QN2009-11)

[第一作者] 于明薇, Tel:010-52176673, E-mail:yumingwei1120@163.com

[通讯作者] * 杨国旺, Tel:010-52176568, E-mail:guowangyang@sina.com

peripheral blood serum of Huayu Wan group was lower than those in model group ($P < 0.05$). The level of P-selectin and ET-1 in peripheral blood serum of Huayu Wan group were lower than those in low-molecular-weight heparins group ($P < 0.05$), the decrease was obvious compared with CTX group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Huayu Wan can be an effective measure for inhibiting the tumor growth and reducing the expression of thrombosis related factor in lewis lung cancer-bearing mice.

[**Key words**] Yiqi Huoxue Jiedu; tumor; thrombosis; Huayu Wan

恶性肿瘤患者中普遍存在凝血功能异常,有报道 90% 以上的晚期患者可出现一项或多项凝血指标异常,尤其是肺癌、消化道肿瘤和乳腺癌等^[1],由此而易于并发血栓性疾病。中医理论认为,恶性肿瘤的形成发展以及血栓形成都与气虚、血瘀、毒聚证候有关,其程度加重与肿瘤的进展及某些治疗干预(如化疗)有关。益气活血解毒法是中医临床治疗恶性肿瘤以及治疗血栓性疾病的主要法则。本研究拟观察以益气活血解毒为治法的临床有效方剂化痰丸对肿瘤生长、转移及血栓形成相关因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、P-选择素 (P-selectin)、内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 的影响。

1 材料

1.1 动物 C57BL/6 小鼠,雄性,6~8 周龄,体重(20±2)g,清洁级,由中国医学科学院实验动物研究所提供,许可证号 SCXK-11-00-0006。饲养环境温度(22±2)℃,湿度 55%±5%。

1.2 细胞株 Lewis 肺癌细胞株,由中国中医科学院广安门医院肿瘤实验室惠赠。

1.3 药物 化痰丸,首都医科大学附属北京中医医院院内制剂(京药制字 Z20053296),主要成分水蛭、西红花、王不留行、桃仁等,批号 080619;低分子肝素钠注射液,法国 Sanofi-aventis 公司,批号 5961;注射用环磷酰胺 (CTX),山西普德药业有限公司,批号 20090902。

1.4 试剂及仪器 Mouse TNF- α ELISA kit (Lot 273593),Mouses P-selectin ELISA kit (Lot 271667), R&D 公司; Mouse Endothelin-1 ELISA kit (Lot 04151091), Enzo Life Science 公司。全波长酶标仪, Thermo 公司。

2 方法

2.1 动物模型复制 取传代后 12 d Lewis 肺癌荷瘤小鼠,无菌剥离瘤组织,选取生长良好的肿瘤组织,制备 Lewis 肺癌细胞悬液,每只小鼠右腋下接种 0.2 mL(约含活细胞 1×10^6 个)。

2.2 分组及给药 小鼠接种后随机分为 4 组,每组 20 只,另随机取 20 只同批正常小鼠,不接种,为空白对照组。接种后 24 h 开始给药,具体方法见表 1,其中化痰丸组给药剂量为正常人(60 kg)剂量 20 倍。给药 12,19 d。

表 1 实验分组及给药方法

组别	ig, 1 次/d	ip, 1 次/d
空白对照	无菌水 10 mL·kg ⁻¹	0.9% NaCl 10 mL·kg ⁻¹
模型	无菌水 10 mL·kg ⁻¹	0.9% NaCl 10 mL·kg ⁻¹
低分子肝素	无菌水 10 mL·kg ⁻¹	低分子肝素注射液 100 u·kg ⁻¹
CTX	无菌水 10 mL·kg ⁻¹	CTX 50 mg·kg ⁻¹ (1, 6, 11, 16 d, 1 次/d; 0.9% NaCl 10 mL·kg ⁻¹ , 2~5, 7~10, 12~15, 17~19 d, 1 次/d)
化痰丸	化痰丸 4 g·kg ⁻¹	0.9% NaCl 注射液 10 mL·kg ⁻¹

2.3 观察指标

2.3.1 小鼠体重 于接种后 13, 20 d 处死小鼠每组 10 只,称荷瘤小鼠体重,剥离肿瘤组织,精确电子天平称取瘤重,小鼠体重 = 荷瘤小鼠体重 - 瘤重。

2.3.2 肿瘤生长曲线 游标卡尺测量肿瘤长径(a)、短径(b),每 4 日 1 次,计算肿瘤体积,绘制肿瘤生长曲线。

$$\text{肿瘤体积} = ab^2/2$$

2.3.3 瘤重、抑瘤率 于接种后 13, 20 d 处死小鼠每组 10 只,剥离肿瘤组织,精确电子天平称取瘤重。

$$\text{抑瘤率} = [1 - \text{实验组平均瘤质量(g)} / \text{模型组平均瘤质量(g)}] \times 100\%$$

2.3.4 肺转移数、肺转移抑制率 于接种后 20 d 处死小鼠每组 10 只,取肺,生理盐水冲洗, Bouin 氏液固定,解剖显微镜下观察肺转移灶个数。

$$\text{肺转移抑制率} = [1 - \text{实验组平均肺转移灶数(个)} / \text{模型组平均肺转移灶数(个)}] \times 100\%$$

2.3.5 小鼠血清 TNF- α , P-Selectin, ET-1 水平 于接种后 20 d 小鼠摘眼球取血,室温凝固 4h, 3 500 r·min⁻¹离心 15 min,收集上清,按照试剂说明书要求检测小鼠血清 TNF- α , P-Selectin, ET-1 水平。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 进行统计学分析,计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差

分析,方差不齐时采用秩和检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 各组药物干预对小鼠体重的影响 各组荷瘤小鼠体重随病程延长有不同程度下降;接种后 13 d 和 20 d,各组荷瘤小鼠体重均显著低于正常小鼠;接种后 20 d,化癍丸组小鼠体重显著高于模型组($P < 0.01$),其他各组荷瘤小鼠各时间点体重比较无差异。见表 2。

表 2 药物干预后各组小鼠体重($\bar{x} \pm s$) g

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	n	荷瘤体重	
			(13 d)	(20 d)
空白对照	-	10	24.04 ± 0.85 ¹⁾	24.39 ± 1.53 ¹⁾
模型	-	10	22.21 ± 1.06	15.72 ± 1.12
低分子肝素 ²⁾	100	10	21.99 ± 1.64	15.57 ± 1.40
CTX	5 × 10 ⁻²	10	22.54 ± 1.88	17.3 ± 1.96
化癍丸	4	10	22.79 ± 1.29	19.24 ± 2.93 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$; ²⁾ 剂量为 U·kg⁻¹。

3.2 各组药物干预对小鼠肿瘤生长曲线的影响

从图 1 可见,在接种后 5,9,13,17 d,CTX 组和化癍

丸组小鼠肿瘤体积均显著低于模型组($P < 0.01$),而低分子肝素组小鼠肿瘤体积与模型组比较无显著差异。

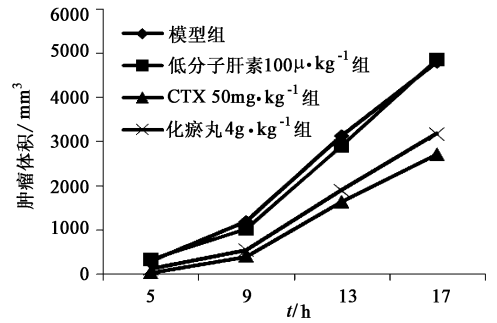


图 1 药物干预后各组小鼠肿瘤生长曲线

3.3 各组药物干预对小鼠瘤重、抑瘤率的影响 接种后 13,20 d,CTX 组小鼠瘤重显著低于模型组($P < 0.01$);化癍丸组小鼠瘤重显著低于模型组($P < 0.01$),抑瘤率分别为 34.97% 和 31.52%;低分子肝素组小鼠瘤重与模型组比较无差异;13 d 化癍丸组瘤重低于低分子肝素组($P < 0.05$),20 d 化癍丸组瘤重显著低于低分子肝素组($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 药物干预后各组小鼠瘤重、抑瘤率

组别	剂量/g·kg ⁻¹	13 d			20 d		
		n	瘤重/g	抑瘤率/%	n	瘤重/g	抑瘤率/%
模型	-	10	3.15 ± 0.91 ³⁾	-	9	7.15 ± 1.26 ³⁾	-
低分子肝素 ⁴⁾	100	10	2.80 ± 0.72 ²⁾	11.22	8	7.19 ± 0.81 ³⁾	-
CTX	5 × 10 ⁻²	10	1.23 ± 0.45 ^{1,2)}	60.97	9	4.28 ± 1.01 ¹⁾	40.16
化癍丸	4 × 10 ⁻²	10	2.05 ± 0.78 ¹⁾	34.97	9	4.89 ± 1.24 ¹⁾	31.52

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与化癍丸组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$,⁴⁾ 剂量为 U·kg⁻¹, (表 4 同)。

3.4 各组药物干预对小鼠肺转移数、肺转移抑制率的影响 从表 4 可见,在接种后 20 d,CTX 组和化癍丸组肺转移抑制率分别为 77.75% 和 83.25%,低分子肝素组对荷瘤小鼠肺转移无抑制作用。见表 4。

表 4 药物干预后各组小鼠肺转移数、肺转移抑制率($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	n	发生肺转移		肺转移抑制率	
			小鼠数/只	发生率/%	灶数/秩次	抑制率/%
模型	-	9	6	66.67	49.17	-
低分子肝素 ⁴⁾	100	8	6	75	55.81	-
CTX	5 × 10 ⁻²	9	3	33.33	34.06	77.75
化癍丸	4	9	3	33.33	33.50	83.25

3.5 各组药物干预对小鼠血清 TNF-α, P-selectin, ET-1 水平的影响 接种后 20 d,各组荷瘤小鼠血清 TNF-α, P-selectin, ET-1 水平分别显著高于正常小鼠($P < 0.01$);各组荷瘤小鼠血清 TNF-α 无差异;CTX

组小鼠血清 P-selectin 水平显著高于模型组($P < 0.01$),低分子肝素组和化癍丸组与模型组比较无差异;化癍丸组小鼠血清 ET-1 水平低于模型组($P < 0.05$),低分子肝素组和 CTX 组与模型组比较无差异。化癍丸组小鼠血清 P-selectin, ET-1 水平低于低分子肝素组($P < 0.05$),并显著低于 CTX 组($P < 0.01$)。见表 5。

4 讨论

恶性肿瘤相关的血栓栓塞性疾病是一类疾病群,包括深静脉血栓(DVT)、肺栓塞(PE)、动脉血栓栓塞(AT)、门静脉血栓(PVT)、弥散性血管内凝血(DIC)等。据临床统计,恶性肿瘤患者中血栓症的发生率为 10% ~ 15%;尸解发现,50% 的恶性肿瘤患者体内有血栓形成^[2]。Donati 等研究显示,肿瘤患者的死亡原因中,血栓及相关并发症仅次于肿瘤

表 5 药物干预后各组小鼠血清 TNF- α , P-selectin, ET-1 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	P-selectin/ μ g·L ⁻¹	ET-1/ng·L ⁻¹
空白对照	-	16.38 \pm 5.85 ^{2,4)}	470.2 \pm 72.7 ^{2,4)}	31.75 \pm 4.34 ²⁾
模型	-	53.48 \pm 17.83	909.2 \pm 127.8	48.06 \pm 4.68 ³⁾
低分子肝素 ⁵⁾	100	46.17 \pm 15.57	1118.0 \pm 196.4 ³⁾	47.66 \pm 6.82 ³⁾
CTX	5 \times 10 ⁻²	47.23 \pm 12.53	1228.7 \pm 150.4 ^{2,4)}	50.22 \pm 8.91 ⁴⁾
化癥丸	4	45.29 \pm 14.42	880.3 \pm 184.0	35.98 \pm 2.14 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与化癥丸组比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01; ⁵⁾ 剂量为 u·kg⁻¹。

本身,居第 2 位^[3]。因此,肿瘤并发血栓形成是一个不容忽视的课题,恶性肿瘤与凝血异常、血栓的相关性日益引起临床医生的广泛关注。

TNF- α , P-selectin, ET-1 是与肿瘤生长和血栓形成密切相关的因子。TNF- α 是一种主要由单核-吞噬细胞产生的单核因子, TNF- α 受体广泛地分布于多种肿瘤细胞和血细胞,不仅能选择性地杀伤某些肿瘤细胞,而且具有多种免疫调节作用^[4],其生物学作用与体内水平高低密切相关,许多肿瘤患者血清 TNF- α 水平异常升高^[5-6]。TNF- α 在体内实验性肿瘤效应的特征是引起肿瘤坏死,肿瘤体积缩小以至减退,引起肿瘤组织缺氧、肿瘤血管损伤和血栓形成,诱发肿瘤局部炎症,调节免疫系统功能。P-selectin 又称血小板 α 颗粒膜蛋白-140 (GMP-140),是血小板活化的特异性分子标志物之一,反映体内血小板活化程度及血栓形成倾向。肿瘤细胞的生长必须依赖于血管的生成,ET 可参与血管的形成过程^[7]。肿瘤细胞可分泌 ET,某些肿瘤细胞表面存在 ET 受体,ET 可通过 ET 受体调控肿瘤细胞生长繁殖^[8]。肿瘤细胞分泌 ET-1 作为生长因子,通过旁分泌和自分泌诱导细胞增殖,起到内生性生长促进剂的作用,研究发现多种肿瘤患者 ET-1 水平高于正常人。

益气活血解毒法是郁仁存等国家级名老中医在多年临证基础上,针对肿瘤的主要病机所提出的治疗中晚期恶性肿瘤的主要法则,依据此项治则开发出化癥丸等系列方剂,化癥丸由水蛭、西红花、王不留行、桃仁等 15 味中药组成,其中重用活血药物,同时辅以益气药,取“气为血帅、气行则血行之意”,另外还佐以适量解毒散结之品,以达到标本兼顾的效果,临床研究证实,化癥丸能够明显改善肿瘤患者的血瘀证候和异常的凝血指标^[9]。

本研究结果显示,化癥丸能显著抑制小鼠 Lewis 肺癌生长,并能抑制荷瘤晚期小鼠体重严重下降。化疗药 CTX 虽有较好的抑瘤、抗转移作用,却导致了荷瘤小鼠血清 P-selectin, ET-1 水平的异常升高,

这与化疗可能引起或加重肿瘤患者血瘀证的描述相一致。低分子肝素是临床常用的抗凝药物,但对小鼠 Lewis 肺癌特别是病期晚的肿瘤没有抑制作用,且对荷瘤小鼠血栓形成相关因子 TNF- α , P-selectin, ET-1 增高无改善作用。与 CTX 和低分子肝素相比,化癥丸兼具一定抗肿瘤作用并能显著下调荷瘤小鼠血清 P-selectin, ET-1 水平,说明其抗血栓形成机制可能与抑制血小板异常活化,对抗血管内皮损伤有关。

[参考文献]

[1] 王学锋,赵维莅,璩斌,等. 肿瘤患者凝血及纤溶分子标志物变化 [J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23 (6): 331.

[2] Sutherland D E, Weitz I C, Liebman H A. Thromboembolic complications of cancer:epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment [J]. Am J Hematol, 2003, 72(1) : 43.

[3] Donati M B. Cancer and thrombosis [J]. Haemostasis, 1994, 24(2) : 128.

[4] 窦肇华,张远强,郭顺根. 免疫细胞学与疾病 [M]. 北京:中国医药科技出版社, 2004: 9.

[5] Shimony J S, Mckinstry R C, Akbudak E, et al. Quantitative diffusion-tensor anisotropy brain MR imaging: normative human data and anatomic analysis [J]. Radiology, 1999, 212(3) : 770.

[6] Le Bihan D, Mangin J F, Poupon C, et al. Diffusion tensor imaging: concepts and applications [J]. J Magn Reson Imaging, 2001, 13(4) : 534.

[7] Economos K, Macdonald P C, Casey M L. Endothelin-1 gene expression and biosynthesis in human endometrial HEC-1A cancer cells [J]. Cancer Res, 1992, 52 (3): 554.

[8] Shichiri M, Hirata Y, Nakajima T, et al. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine growth factor for human cancer cell lines [J]. J Clin Invest, 1991, 87 (5): 1867.

[9] 杨中,徐咏梅,张青,等. 化癥丸联合化疗治疗晚期卵巢癌临床研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15 (7): 17.

[责任编辑 聂淑琴]