

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110321. 1138. 017

消癌解毒方体内抑瘤作用机制研究

张玉¹, 吴勉华^{2*}, 陈海彬², 周红光², 沈波²

(1. 南京中医药大学附属江苏省中西医结合医院, 南京 210028; 2. 南京中医药大学, 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨消癌解毒方体内抗肿瘤作用的可能机制。方法:对荷瘤小鼠(H22 肿瘤细胞株)用消癌解毒方煎剂剂量灌胃,观察光镜及电镜下肿瘤组织、细胞的形态,测定基质金属蛋白酶(MMP-2)含量。结果:消癌解毒方中剂量组凋亡细胞数量最大,并且所有消癌解毒方组中凋亡细胞除出现凋亡细胞一般的形态学改变,胞浆中可见大量吞饮空泡;消癌解毒方低剂量组外周血 MMP-2 水平显著降低($P < 0.05$),有统计学意义。结论:消癌解毒方对肿瘤抑制作用可能与其诱导肿瘤细胞凋亡,抑制 MMP-2 活性有关。

[关键词] 消癌解毒方; H22 肿瘤细胞株; 细胞凋亡; 测定基质金属蛋白酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0234-04

Study on *in vivo* Anti-tumor Mechanism of Xiaoi Jiedu Prescription

ZHANG Yu¹, WU Mian-hua^{2*}, CHEN Hai-bin², ZHOU Hong-guang², SHEN Bo²

(1. Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, China;

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-tumor mechanism of Xiaoi Jiedu prescription *in vivo*. **Method:** The mice bearing tumors (established by subcutaneous inoculation of H22 cells) were fed with Xiaoi Jiedu prescription. Morphology of the tissue of tumor under light microscope and tumor cells under electron microscope were observed. The matrix metalloproteinase (MMP-2) were assayed. **Result:** The medium dose group of Xiaoi Jiedu prescription has the largest amount of apoptosis. There were many pinocytosis except the general morphological change in each Xiaoi Jiedu prescription group. The activity of MMP-2 had significantly decreased in the low-dose group of Xiaoi Jiedu prescription ($P < 0.05$). **Conclusion:** Xiaoi Jiedu prescription has the anti-tumor effect *in vivo* possibly through the mechanism of inducing tumor cell apoptosis and inhibiting the activity of MMP-2.

[Key words] Xiaoi Jiedu prescription; empirical study; H22; apoptosis; MMP-2

消癌解毒方是在国医大师周仲瑛先生“癌毒”理论指导下经长期临床实践的有效抗癌方药。前期临床研究表明,采用消癌解毒方配合化疗药物治疗

中晚期恶性肿瘤患者,能提高近期临床疗效、生活质量及机体免疫功能,减少化疗药物毒副反应,具有良好的安全性^[1-2];实验研究表明消癌解毒方能明显抑

[收稿日期] 20101214(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973742/C190201);江苏省自然科学基金项目(BK2007240);江苏省高校自然科学研究面上项目(09KJB360003);江苏省中医药局科技项目(LB09032)

[第一作者] 张玉,博士,主治医师,从事中医药抗肿瘤的临床及实验研究,Tel:025-85637121,E-mail:xihen2000@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 吴勉华,博士生导师,教授,现任南京中医药大学校长,江苏省中医药学会副会长,中华中医药学会常务理事,中医药学术研究带头人,研究方向:中医药抗肿瘤的理论与实验研究,Tel:025-85811117,E-mail:Wmh7001@163.com

[网络出版时间] 2011-03-21 11:38

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110321.1138.017.html>

制荷瘤小鼠的实体瘤重,并延长其存活时间,对S180肉瘤、H22腹水型肿瘤均有一定的抑制作用^[3]。本研究以光镜及电镜下肿瘤组织、细胞的形态改变及基质金属蛋白酶(MMP-2)含量为评价指标,进一步从组织、细胞及分子水平探讨消癌解毒方的抗肿瘤作用及机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级ICR小鼠,雄性,体重(18±2)g,共72只,购自上海斯莱克实验动物责任有限公司,实验动物生产许可证SCXK(沪)2007-0005,实验动物使用许可证SYXK(苏)2007-0030。饲料均购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场。

1.2 细胞株 H22瘤株接种于小鼠腹腔内,并生长良好,接种动物均由南京市鼓楼医院动物房提供,并于本实验室接种传代,每隔7d左右传代一次,用于连续试验。

1.3 药物 消癌解毒处方由白花蛇舌草、僵蚕、蜈蚣、八月扎等按特定剂量比例组成,中药制剂购自安徽省亳州市中西药有限公司。由南京中医药大学药理教研室煎制,浓缩成生药量为2g·mL⁻¹滤液,保存备用。顺铂注射液(南京制药厂有限公司,批号20091118);注射用生理盐水(南京小营药业集团有限公司,批号2009090403)。

1.4 试剂与仪器 GS-15R型台式冷冻离心机(美国Beckman公司);OL-901型混悬仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);BT323S型电子天平(d=0.001g,德国赛多利斯);MMP2-ELISA试剂盒(美国Pierce公司,批号E0900225)。

2 方法

2.1 动物造模及分组 颈椎脱臼法处死种鼠,用碘酒、乙醇消毒腹部,抽取种鼠腹水5mL,加入10mL的生理盐水稀释。取60只小鼠,75%乙醇消毒小鼠右腋皮肤,按每鼠0.2mL接种于小鼠右腋下。整个操作在60min内完成,接种24h后称重。随机分为5组,每组12只,即模型对照组(生理盐水灌胃),阳性对照组(顺铂腹腔注射),中药高、中、低剂量组(消癌解毒方中药灌胃)。另取12只小鼠为空白组,方法同上,每鼠接种0.2mL生理盐水。接种后第2天开始给药,给药剂量参考临床用量,按人与小鼠(1:0.0026)换算。

2.2 给药方法 空白组、模型组灌胃(ig)生理盐水0.9mL,qd;顺铂组腹腔注射(ip)顺铂0.001g·kg⁻¹·

d⁻¹,中药高、中、低剂量组分别灌胃(ig)消癌解毒方低剂量10g·kg⁻¹·d⁻¹,中剂量30g·kg⁻¹·d⁻¹,高剂量90g·kg⁻¹·d⁻¹。除顺铂组仅给药1d外,其余各组均连续给药10d。10d后腹主动脉取血,处死小鼠,剥离瘤块。

2.3 普通光镜组织切片 每组随机取2只小鼠,剥离瘤体,取材、固定,常规制片,HE染色。

2.4 电镜标本的制作 每组随机取2只小鼠,剥离瘤体后切取0.5mm³体积的瘤体组织,2.5%戊二醛固定、常规脱水、渗透、包埋、切片、染色。将做好的电镜切片在透射电镜下观察。

2.5 MMP-2含量测定 外周血样本,按MMP2-ELISA试剂盒说明书标准流程操作。

2.6 统计方法 所有数据均输入计算机,采用SPSS 12.0统计软件进行分析,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 光镜下肿瘤组织形态学变化(图1)

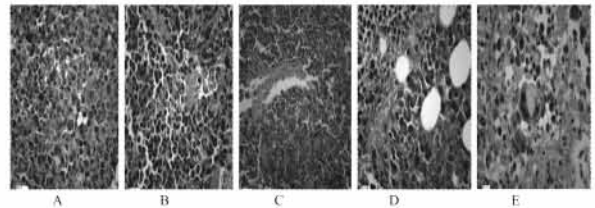


图1 各组给药后肿瘤组织形态学变化(HE,×200)

A.模型组;B.消癌解毒方10g·kg⁻¹;C.消癌解毒方30g·kg⁻¹剂量组;D.90g·kg⁻¹剂量组;E.顺铂组

3.2 电镜下肿瘤细胞形态学变化(图2) 模型组肿瘤细胞弥漫分布,其间可见少许凋亡细胞,凋亡的细胞皱缩,质膜完整,胞浆致密,细胞器不同程度退变,核染色质致密,形成形状不一、大小不等的团块边集于核膜处,部分细胞胞浆芽突迅速脱落,形成许多凋亡小体。消癌解毒方低剂量组:肿瘤细胞弥漫分布,其间可见凋亡细胞,凋亡细胞数量多于模型组,凋亡的细胞皱缩,质膜完整,胞浆内细胞器不同程度退变,可见大量吞饮空泡,核染色质致密,形成形状不一、大小不等的团块边集于核膜处,部分细胞胞浆芽突迅速脱落,形成许多凋亡小体。消癌解毒方中剂量组:肿瘤细胞弥漫分布,其间可见凋亡细胞,凋亡细胞数量多于中药低剂量组,凋亡的细胞皱缩,质膜完整,胞浆内细胞器不同程度退变,可见大量吞饮空泡,核染色质致密,形成形状不一、大小不等的团块边集于核膜处,部分细胞胞浆芽突迅速脱

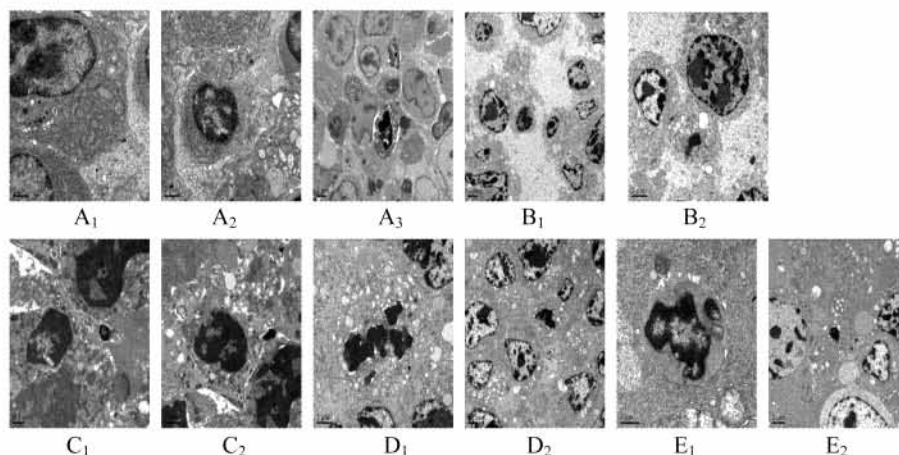


图 2 各组小鼠给药后肿瘤组织形态学变化(2 μm)

A. 模型组; B. 中药低剂量组; C. 中药中剂量组; D. 中药高剂量组; E. 顺铂组

落,形成许多凋亡小体。消癌解毒方高剂量:肿瘤细胞弥漫分布,消癌解毒方凋亡细胞数量与中药低剂量组相似,凋亡的细胞皱缩,质膜完整,胞浆内细胞器不同程度退变,可见大量吞饮空泡,核染色质致密,形成形状不一、大小不等的团块边集于核膜处,部分细胞胞浆芽突迅速脱落,部分核发生碎裂。顺铂组肿瘤细胞弥漫分布,凋亡细胞数量与中药低剂量组相似,凋亡的细胞皱缩,质膜完整,胞浆内细胞器不同程度退变,核染色质致密,形成形状不一、大小不等的团块边集于核膜处,部分核碎裂,部分细胞胞浆芽突迅速脱落,形成许多凋亡小体。

3.3 外周血 MMP-2 含量 与模型组比较,空白组、消癌解毒低剂量组外周血 MMP-2 水平显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$);顺铂组与中药组高剂量组外周血 MMP-2 水平降低,但无显著性差异;中药中剂量组 MMP-2 水平上升。

表 1 消癌解毒方对肿瘤小鼠外周血 MMP-2 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	MMP-2/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	$323.9 \pm 325^{1)}$
模型	-	$1\ 587.3 \pm 419$
消癌解毒方	10	$683.4 \pm 394.8^{2)}$
	30	$2\ 269.5 \pm 125.0$
	90	964.2 ± 769.2
顺铂	0.001	$1\ 133.4 \pm 652.7$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

肿瘤本质上都表现为细胞失去控制的异常增殖,转移是决定肿瘤良恶性的本质特征。越来越多的资料显示,细胞凋亡异常在大多数恶性肿瘤的发病学上占重要地位。而肿瘤自原位生长转变成转移

性疾病,取决于肿瘤细胞侵犯局部组织及穿透组织屏障的能力。MMPs 由一系列蛋白溶解酶家族组成,可通过降解基底膜及启动血管内皮细胞生长来促进肿瘤增长及转移^[4],对原发性肿瘤和继发性肿瘤的生长有促进调节作用,并造成适应肿瘤生长扩散的微环境。

“癌毒”是周仲瑛教授根据近 60 年临床实践提出的创新性中医学观点,认为癌毒是肿瘤发生发展的关键,是在肿瘤发病过程中体内产生的一种特殊的病理因素,可能由多种物质、多种因素复合而成;癌毒是肿瘤患者在正虚的基础上,因体内邪盛而生毒,癌毒与痰浊、瘀血、湿浊、热毒等病理因素同时胶结存在、互为因果,亦可兼夹转化、共同为病;癌毒一旦形成,阻滞体内,则病变乖戾,一方面大量耗伤人体气血津液,一方面导致脏腑气血功能失调,诱生痰浊、瘀血、湿浊、热毒等多种病理因素,并耗气伤阴,发生各种复杂证候,表现出邪毒嚣张、难以消除、易于传变、病情笃重、病势凶险、正气虚败、预后极差等证候特点^[5-8]。消癌解毒方正是在“癌毒”理论指导下,在辨证与辨病相结合的基础上,根据恶性肿瘤“痰瘀郁毒、阴伤气耗”这一基本病机,以“消癌解毒,益气养阴”为法,选择白花蛇舌草、半枝莲、漏芦、僵蚕、蜈蚣、八月扎、太子参、麦冬、制甘草等按特定比例组成,方中白花蛇舌草、半枝莲、漏芦、僵蚕、蜈蚣、八月扎清热解毒、化痰散结、活血祛瘀,太子参、麦冬益气养阴,制甘草调和诸药,全方祛邪扶正,攻补兼施,临床应用多年,已证实具有非常好的抗肿瘤疗效^[9-10]。现代医学研究表明本方中各单味药多有抗肿瘤生长及转移的作用,是临床常用抗癌中

药^[11-14],白花蛇舌草、半枝莲有诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[15-17];太子参、麦冬、白花蛇舌草、半枝莲等具有抗肿瘤的侵袭、转移及抑制肿瘤血管生成等作用^[18-19]。

本课题前期研究表明消癌解毒方具有明显的抑瘤作用^[3]。本实验研究也证实,在光镜下消癌解毒方高、低剂量治疗组除在纤维脂肪组织中见片状异型细胞浸润,还可见大片坏死,面积较模型组显著增大。提示消癌解毒方具有抑瘤作用。在电镜下,各治疗组中凋亡细胞数量最大的是中药中剂量组,中药低剂量组、中药高剂量组和顺铂组相似,模型组最少,但在所有消癌解毒方高、低剂量治疗组中凋亡细胞除出现凋亡细胞一般的形态学改变,胞浆中可见大量吞饮空泡,而这一点在模型组及顺铂组中未见。外周血 MMP-2 含量测定显示消癌解毒方高、低剂量组 MMP-2 含量均下降,其中低剂量组显著降低($P < 0.05$),有统计学意义。消癌解毒方抑瘤作用可能与诱导肿瘤细胞凋亡及降低 MMP-2 活性有关。

药物对肿瘤的抑制作用机制往往是多方面、多途径的,同样消癌解毒方通过何种途径影响细胞凋亡及 MMP-2 表达,其具体机制尚不完全清楚,有待做更进一步的研究。

[参考文献]

[1] 陈海彬,周红光,吴勉华,等. 消癌解毒方对中晚期恶性肿瘤患者免疫功能的影响[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2009,29(9):1257.

[2] 周红光,吴勉华. 消癌解毒方抗肿瘤作用的实验研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(4):815.

[3] 周红光,陈海彬,吴勉华. 消癌解毒方配合化疗治疗中晚期恶性肿瘤临床疗效观察[J]. 中华中医药杂志,2010,25(7):1140.

[4] Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during

carcinogenesis[J]. Nat Cell Biol,2000,10(2):737.

[5] 陈四清. 周仲瑛教授从癌毒辨治肿瘤经验[J]. 新中医,2004,36(2):7.

[6] 叶丽红,顾勤. 周仲瑛教授的肿瘤观[J]. 中国中医药信息杂志,2002,9(3):63.

[7] 程海波,吴勉华,周红光. 周仲瑛从癌毒辨治恶性肿瘤的经验[J]. 北京中医药,2009,28(11):844.

[8] 程海波,吴勉华. 周仲瑛教授从癌毒辨治恶性肿瘤病机要素分析[J]. 中华中医药学刊,2010,28(2):313.

[9] 陈四清,张成铭,叶丽红. 消癌扶正法治疗肝癌介入后复发[J]. 江苏中医药,2007,39(2):42.

[10] 郭立中,吴勉华,周学平,等. 周仲瑛教授学术思想简介(一)[J]. 南京中医药大学学报,2008,24(6):361.

[11] 陈秀珍,朱大诚,王艳辉. 白花蛇舌草药理作用及临床应用研究新进展[J]. 中药材,2009,32(1):157.

[12] 林敬明,刘煜,罗荣城. 半枝莲的化学成分及其抗肿瘤作用的研究现状[J]. 中药材,2006,29(4):407.

[13] 王会仓,王秀明. 复方漏芦汤治疗原发性肝癌 30 例临床观察[J]. 湖南中医杂志,2008,24(1):26.

[14] 曲爱兵,赵维诚,梁良,等. 蜈蚣组织提取物抗肿瘤活性的初步研究[J]. 实用肿瘤学杂志,2003,17(1):29.

[15] 贾英杰,田菲,陈军,等. 解毒祛瘀法对肿瘤血管生成影响的实验研究[J]. 天津中医药,2004,21(6):467.

[16] 杨培民,代龙,李钦青,等. 白花蛇舌草多糖对人宫颈癌 Hela 细胞和人肝癌 Bel-7402 细胞生长的影响[J]. 现代中药研究与实践,2010,24(3):32.

[17] 王刚,董玫,刘秀书,等. 半枝莲醇提物抗肿瘤活性的研究[J]. 现代中西医结合杂志,2004,13(9):1141.

[18] 孙静. 益气养阴方抗肿瘤转移及对肿瘤细胞 VEGF 表达的影响[J]. 山东中医药大学学报,2009,33(4):340.

[19] 冯正权,吴良村,沈敏鹤,等. 新加沙参麦冬煎剂抑制肿瘤转移及其作用机制的实验研究[J]. 医药导报,2006,25(12):1249.

[责任编辑 邹晓翠]