

扶正固本颗粒联合化疗放疗对于荷瘤小鼠的免疫增强作用

张然¹, 岳永花¹, 康永^{1*}, 孙国栋¹, 李慧娟¹, 菅晓勇², 王六贵², 秦霞³

(1. 山西省中医药研究院, 太原 030012; 2. 山西振东开元制药有限公司, 山西 长治 046108;
3. 太原理工大学附属医院, 太原 030024)

[摘要] 目的: 研究扶正固本颗粒联合化疗、放疗的体内抗肿瘤作用及对荷瘤小鼠免疫功能的影响, 并与单独放疗、化疗作比较。方法: 建立小鼠肉瘤 S180 移植性肿瘤模型, 次日随机分为 10 组, 放、化疗, 并 ig 给药每日 1 次, 10 d 后, 计算抑瘤率、胸腺指数和脾指数, 测定细胞因子白介素-2(IL-2), 白介素-6(IL-6) 和肿瘤坏死因子- (TNF-) 水平和外周血细胞数量, 检测其抑瘤作用及对荷瘤小鼠免疫功能的影响。结果: 联合治疗较单独的放化疗能增强荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能, 提高荷瘤小鼠的胸腺指数和脾脏指数; 拮抗化疗所致荷瘤小鼠血清 IL-2, IL-6 和 TNF- 的减少; 拮抗放疗所致荷瘤小鼠外周血细胞的减少。结论: 联合治疗可增强荷瘤小鼠免疫功能。

[关键词] 扶正固本颗粒; 顺铂注射液; 放疗; S180 荷瘤小鼠; 免疫功能

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0135-04

Immue-improving Effect of Fuzheng Guben Granule Combined with Radiotherapy and Chemotherapy on Tumor-bearing Mice

ZHANG Ran¹, YUE Yong-hua¹, KANG Yong^{1*}, SUN Guo-dong¹, LI Hui-juan, JIAN Xiao-yong²,
WANG Liu-gui², QIN Xia³

(1. Traditional Chinese Medicine Institute of Shanxi Province, Taiyuan 030012, China;
2. Shanxi Zhendong Kaiyuan Pharmaceutical Co., Ltd., Changzhi 046108, China;
3. Hospital of Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China)

[Abstract] Objective: To investigate the anti-tumor and immune effect of Fuzheng Guben Granule combined with chemotherapy and radiotherapy in tumor-bearing mice. **Method:** Tumor-bearing model of S180 sarcoma in mice was established by subcutaneous injection of S-180 ascites at armpit. On the next day, the mice were randomly divided into 10 groups, Fuzheng Guben Granule with radio- and chemotherapy was carried out once a day for ten days. Tumor inhibitory percentage, thymus gland, spleen indexes were then measured. The determination of cytokine, such as IL-2, IL-6, TNF- and peripheral blood cell counts was made. The effect of treatment on tumor inhibition and immunological function was studied. **Result:** The combined therapy could significantly increase thymus gland, spleen indexes and improved the phagocytic function; antagonize serum IL-2, IL-6 and TNF- reduction induced by chemotherapy; suppress the decrease in peripheral blood cells count induced by radiotherapy. **Conclusion:** Combinative therapy can enhance immune functions for S180-bearing mice.

[Key words] Fuzheng Guben Granule; cisplatin; radiotherapy; immune function

[收稿日期] 20100516(003)

[第一作者] 张然, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理学

[通讯作者] * 康永, 硕士研究生导师, Tel: 13803469925, E-mail: sxky@163.com

扶正固本颗粒由黄芩、淫羊藿、女贞子、何首乌、地黄、茜草、黄精、人参 8 味药组成, 具有益气养阴, 凉血解毒等功效, 用于食管癌、胃癌气阴两虚兼热毒症患者放、化疗时。本研究探讨扶正固本颗粒联合化疗、放疗对荷瘤小鼠免疫功能的影响, 并与单独放

疗、化疗作比较,旨在为扶正固本颗粒临床应用于肿瘤放化疗的辅助用药提供实验依据。

1 材料

1.1 药物、试剂、瘤株、动物与仪器 扶正固本颗粒:山西开元制药有限公司,批号 090401;顺铂注射液:云南个旧生物药业有限公司生产,批号 090508,瑞氏染液为上海生工公司产品;小鼠 IL-6(批号 EK0411),IL-2(批号 EK0398),TNF-ELISA(批号 EK0526)试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司;动物血球计数试剂,法国 ABX 试剂包(血球试剂),批号 VET ABC LMG(REF:0604052);照射源为中国辐射防护研究院⁶⁰Co-辐射源,全身 1 次照射 7.5 Gy,照射率为 75 伦/min。小鼠肉瘤细胞株 S180,由四川大学华西医学中心提供。昆明种小鼠 200 只,体重(18 ±2)g,雌雄各半,由山西省中医药研究院实验动物中心提供,合格证号晋动(证)字 A00—001。AT-858 型自动酶标分析仪(上海安泰分析仪器有限公司);法国 ABX 动物血球计数仪。

2 方法

2.1 制备荷瘤小鼠模型 无菌条件下抽取传第 3 代后接种 7 d 的 S180 小鼠的腹水,细胞密度调至 1 ×10⁷/mL,每只小鼠右腋下皮下接种 0.2 mL。每日观察肿瘤生长情况,按荷瘤小鼠造模评价标准判断造模是否成功^[1-2]。

2.2 动物分组及给药 接种次日将荷瘤小鼠随机分为 10 组:正常对照组,模型组:ig 等体积蒸馏水;化疗组:ip 顺铂注射液 1 mg·kg⁻¹。化疗(顺铂注射液)+扶正固本颗粒(低、中、高剂量)组,ip 顺铂注射液 1mg·kg⁻¹联合 ig 扶正固本颗粒(5.625, 11.25, 22.5 g·kg⁻¹);放疗组:⁶⁰Co-射线全身照射 1 次 7.5 Gy,照射率为 75 伦/min。放疗+扶正固本颗粒(低、中、高剂量)组:⁶⁰Co-射线全身照射 1 次联合 ig 扶正固本颗粒(5.625, 11.25, 22.5 g·kg⁻¹),给药每天 1 次,连续 10 d^[3]。

2.3 对抑瘤率、胸腺指数和脾指数的影响 分组及给药同 2.2 项。小鼠末次给药后 24 h 脱颈椎处死,迅速剥取瘤块、胸腺和脾脏并称质量,按下列公式计算抑瘤率、胸腺指数和脾指数。

肿瘤抑制率 = (对照组平均瘤质量 - 实验组平均瘤质量) / 对照组平均瘤质量 ×100%

胸腺(脾)指数 = 胸腺(脾)质量(mg) / 体重(g) ×10

2.4 对血清细胞因子水平的影响 按照 2.1 制备荷瘤小鼠、分组和给药,连续给药 10 d,末次给药 24

h 后摘眼球取血,收集血液,放置 4 h 后离心,取血清放于 -20℃ 备用。临用前平衡至室温,按照 Elisa 试剂盒说明书步骤进行操作,测定细胞因子 IL-2, IL-6, TNF-α 水平。

2.5 对外周血细胞数量的影响 按照上述制备荷瘤小鼠、分组和给药,连续给药 10 d,末次给药 24 h 后摘眼球取血,收集血液,用动物血球计数仪测定外周血细胞数量。

3 结果

3.1 对荷瘤小鼠体重、抑瘤率的影响 与正常组比较,模型组体重显著降低, $P < 0.05$;与模型组比较,化疗组能显著抑制小鼠的体重增长, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,能显著抑制小鼠的瘤重, $P < 0.01$;与单纯化疗组比较,扶正固本颗粒各剂量联合化疗组体重均显著增加, $P < 0.01$,对瘤重的影响无显著差异。结果见表 1。

表 1 扶正固本颗粒联合化疗对荷瘤小鼠体重、瘤重的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	体重增长/g	瘤重/g	抑制率/%
正常	-	6.90 ±1.65 ¹⁾	-	-
模型	-	5.50 ±1.75	1.08 ±0.27	-
顺铂化疗	0.001	-2.7 ±1.83 ²⁾	0.61 ±0.16 ²⁾	45.52
化疗+扶正固本颗粒	0.001+5.625	1.85 ±0.67 ^{2,4)}	0.65 ±0.14 ^{2,4)}	39.81
	0.001+11.25	2.00 ±0.82 ^{2,4)}	0.56 ±0.16 ²⁾	48.15
	0.001+22.5	2.40 ±0.77 ^{2,4)}	0.53 ±0.12 ²⁾	50.93

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与单纯化(放)疗组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~6 同)。

与正常组比较,模型组体重显著降低, $P < 0.05$;与模型组比较,放疗组能显著抑制小鼠的体重增长, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$;与单纯放疗组比较,扶正固本颗粒各剂量联合放疗组对小鼠的体重和瘤重影响均无显著差异。结果见表 2。

表 2 扶正固本颗粒联合放疗对荷瘤小鼠体重、瘤重的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	体重增长/g	瘤重/g	抑制率/%
正常	-	6.90 ±1.65	-	-
模型	-	5.50 ±1.75	1.08 ±0.27	-
放疗 7.5 Gy	-	4.10 ±0.84 ¹⁾	0.49 ±0.11 ²⁾	54.63
放疗 7.5 Gy + 扶正固本	5.625	4.25 ±1.09 ¹⁾	0.50 ±0.12 ²⁾	53.70
	11.25	4.60 ±1.35	0.47 ±0.12 ²⁾	56.48
	22.5	4.90 ±1.05	0.45 ±0.16 ²⁾	58.33

3.2 对各组小鼠胸腺指数和脾指数的影响 与正常组比较,模型组小鼠胸腺指数显著降低, $P < 0.01$,

脾脏指数有所降低;与模型组比较,化疗组、化疗组联合扶正固本颗粒各剂量组胸腺指数和脾脏指数均显著降低, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$;与化疗组比较,化疗组联合扶正固本颗粒各剂量组的胸腺指数和化疗组联合扶正固本颗粒(中、高)组的脾脏指数均显著升高, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 。见表 3。

表 3 扶正固本颗粒联合化疗对各组小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$) $\text{mg} \cdot (10 \text{g})^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	胸腺指数	脾脏指数
正常	-	34.06 \pm 7.28	69.35 \pm 16.20
模型	-	25.11 \pm 6.60 ²⁾	62.03 \pm 15.67
化疗	0.001	8.66 \pm 2.61 ²⁾	19.96 \pm 6.75 ²⁾
化疗+扶正固本颗粒	0.001+5.625	15.43 \pm 4.25 ^{2,3)}	30.11 \pm 10.84 ²⁾
	0.001+11.25	18.60 \pm 6.27 ^{1,3)}	32.68 \pm 13.71 ^{2,3)}
	0.001+22.5	21.81 \pm 7.40 ⁴⁾	49.56 \pm 13.71 ^{1,4)}

与正常组比较,模型组小鼠胸腺指数显著降低, $P < 0.01$,脾脏指数有所降低;与模型组比较,放疗组、放疗组联合扶正固本颗粒(低)的胸腺指数和放疗组联合扶正固本颗粒(低、中)的脾脏指数也均显著降低, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$;与单纯放疗组比较,放疗组联合扶正固本颗粒各剂量组的胸腺指数和化疗组联合扶正固本颗粒(中、高)组的脾脏指数均显著升高, $P < 0.01$,见表 4。

表 4 扶正固本颗粒联合放疗对各组小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$) $\text{mg} \cdot (10 \text{g})^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	胸腺指数	脾脏指数
正常	-	34.06 \pm 7.28 ²⁾	69.35 \pm 16.20
模型	-	25.11 \pm 6.60	62.03 \pm 15.67
放疗 7.5Gy	-	11.14 \pm 2.94 ²⁾	25.16 \pm 8.44 ²⁾
放疗 7.5Gy + 扶正固本	5.625	18.87 \pm 6.96 ^{1,4)}	31.45 \pm 9.76 ²⁾
	11.25	21.18 \pm 7.46 ⁴⁾	45.78 \pm 13.48 ^{2,4)}
	22.5	22.10 \pm 7.06 ⁴⁾	51.15 \pm 13.55 ⁴⁾

3.3 对荷瘤小鼠血清细胞因子的影响 与正常组比较,模型组无明显差异;与模型组比较,化疗组小鼠血清 IL-2, IL-6 和 TNF- α 含量显著减少, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$;与化疗组比较,扶正固本颗粒各剂量组联合化疗能明显升高小鼠血清中 TNF- α 的水平, $P < 0.01$,扶正固本颗粒(中、高)联合化疗能明显升高小鼠血清中 IL-2, IL-6 的水平, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,结果见表 5。

表 5 扶正固本颗粒联合化疗对荷瘤小鼠血清中细胞

组别	因子水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)			$\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-2	IL-6	
正常	-	6.05 \pm 1.68	29.48 \pm 8.50	45.87 \pm 19.90
模型	-	5.63 \pm 1.89	26.41 \pm 6.77	43.17 \pm 16.46
化疗	0.001	3.65 \pm 1.95 ²⁾	20.36 \pm 7.51 ¹⁾	100.20 \pm 15.51 ²⁾
化疗+扶正固本颗粒	0.001+5.625	5.51 \pm 1.92	23.67 \pm 12.83	69.93 \pm 14.5 ⁴⁾
	0.001+11.25	6.40 \pm 1.65 ⁴⁾	25.33 \pm 7.37 ³⁾	62.80 \pm 22.5 ⁴⁾
	0.001+22.5	7.50 \pm 1.8 ⁴⁾	29.48 \pm 8.50 ⁴⁾	43.20 \pm 27.1 ⁴⁾

3.4 对荷瘤小鼠外周血细胞的影响 与正常组比较,模型组无明显差异;与模型组比较,放疗组小鼠红细胞、白细胞和血小板的数量显著减少, $P < 0.01$;与单纯放疗组比较,扶正固本颗粒(低、中)剂量联合放疗组小鼠红细胞、白细胞和血小板的数量有所增加,但无明显差异,扶正固本颗粒大剂量联合放疗组小鼠红细胞、白细胞的数量显著增加, $P < 0.05$ 。结果见表 6。

表 6 扶正固本颗粒联合放疗对荷瘤小鼠外周血细胞的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	白细胞/ $\times 10^9/\text{L}$	红细胞/ $\times 10^{12}/\text{L}$	血小板/ $\times 10^9/\text{L}$
正常	-	7.36 \pm 1.91	10.56 \pm 2.17	166 \pm 19
模型	-	6.89 \pm 2.01	9.59 \pm 2.24	159 \pm 16
放疗 7.5 Gy	-	3.65 \pm 1.10 ²⁾	8.19 \pm 1.85 ²⁾	127 \pm 31 ²⁾
放疗 7.5 Gy + 扶正固本	5.625	3.83 \pm 1.20	8.72 \pm 1.65	136 \pm 35
	11.25	4.38 \pm 1.30	8.99 \pm 1.52	147 \pm 42
	22.5	5.39 \pm 1.74 ³⁾	10.29 \pm 1.97 ³⁾	140 \pm 42

4 讨论

脾脏和胸腺的重量及免疫器官指数是反映动物免疫器官发育状况好坏的最基本的指标,免疫功能低下小鼠的脾脏指数和胸腺指数明显低于正常小鼠,实验结果提示扶正固本颗粒联合放化疗较单纯放化疗能提高荷瘤小鼠整体的免疫功能状态。血清 IL-2 和 IL-6 则反映机体细胞免疫功能状态。细胞因子是细胞间信号网络的重要成员之一,在机体免疫应答等诸多方面起着重要作用。其中,IL-2 和 IL-6 是机体免疫调节中的两种最重要的细胞因子,IL-2 主要是由活化的 T 细胞(CD4 + Th1 细胞)合成产生,具有促进 B 细胞和 T 细胞增殖分化以及抗体产生等多种生物学功能,在机体免疫调节中起着关键性作用^[4]。IL-2 是最早应用于肿瘤治疗的细胞因子,也是目前应用最多的细胞因子^[5]。它能有效地

恢复机体的免疫功能。白细胞介素 6(IL-6) 主要是由巨噬细胞、T 细胞、B 细胞等多种细胞产生的一种糖蛋白, 具有调节免疫应答、急性期反应及造血作用, 并参与机体炎症反应和抗感染防御作用, 还与自身免疫病和某些肿瘤的发生和转归有密切联系。TNF- α 是一种主要由单核和巨噬细胞产生的细胞因子, 是介导免疫应答和炎症反应的关键介质。TNF- α 能导致内皮细胞形态和活性的改变并且增加单层内皮细胞的通透性并释放大量细胞因子。实验结果显示扶正固本颗粒联合化疗较单纯化疗可以提高荷瘤小鼠血清中细胞因子 IL-2, IL-6, TNF- α 的水平, 调节细胞免疫功能以及调节淋巴细胞的生长分化。应用⁶⁰Co 射线放疗引起的白细胞减少是临床最常见的毒副作用, 白细胞能吞噬异物产生抗体, 在机体损伤治愈、抗御病原的入侵和对疾病的免疫方面起着重要的作用。实验结果显示扶正固本颗粒联合放疗可拮抗单纯放疗引起的白细胞减少。

综上所述, 扶正固本颗粒联合放化疗能提高荷瘤机体的特异性和非特异性免疫功能, 可初步解释

本品的扶正祛邪作用机制, 从药理学的角度支持组方及方解。因此, 我们认为扶正固本颗粒与放化疗联合, 能增强荷瘤机体免疫功能, 具有较好的临床应用前景。

[参考文献]

[1] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1757.
 [2] 国家食品药品监督管理局. 抗肿瘤药物药效学研究指导原则[S]. 2004.
 [3] 陈奇. 中药药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 35.
 [4] 汤钊猷. 现代肿瘤学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1993: 6.
 [5] Misawa, Eriko, Sakurai, et al. Booster effect of interleukin-2 natural killer cells stimulated by administration of macrophage colong stimulating factor in mice[J]. J Immunother, 2003, 26(1): 1.

[责任编辑 聂淑琴]

关于本刊变更为半月刊的重要通知

尊敬的作者、读者:

由于本刊近来投稿量不断增加, 杂志影响力不断扩大, 每月 1 刊的出版周期已无法满足广大科研工作者的投稿及发表需求。经过编辑部研究, 主管单位国家中医药管理局及北京市新闻出版管理局的批准, 本刊自 2010 年 7 月变更为半月刊。半月刊后本刊发文量将大大提高, 发表周期将进一步缩短, 为作者和读者的服务水平也将不断提升。欢迎广大作者、读者、审稿专家及编委会专家继续关注、支持本刊发展!

由于刊期变更, 作者已被录用的待发表稿件的原定刊发“月份”维持不变, 但是因每月分为 2 期, 需要明确具体期号的作者请及时与各栏目责任编辑联系, 联系方式见本刊网站“联系我们”, 由此给您带来的不便请您谅解!

栏目/岗位	责任编辑	电话(010)	手机	邮箱	QQ
综述, 专论, 学术探讨; 资源鉴定、代谢、药事管理	蓝海	84076882	13683362408	178562955@ qq. com	178562955
制剂	仝燕	84027721	13693506677	791489912@ qq. com	791489912
质量控制、化学成分	顾雪竹	84076882	13601383260	guxuezhu@ gmail. com	14182115
药理、毒理	聂淑琴		13520980068	nieshuqin@ sina. com	
临床	小安		13811016479	zou-ak48@ 163. com	65029229
费用查询, 发票, 稿费, 杂志邮寄等	何希荣	84076882		syfjx_2010@ 188. com	840155934