

5种补益方对环磷酰胺毒性的拮抗作用

王明艳, 赵凤鸣, 许冬青, 江励华, 李育, 张旭, 蔡宝昌*

(南京中医药大学, 江苏南京 210029)

[摘要] 目的: 研究5种补益方对环磷酰胺造模小鼠毒性的拮抗作用。方法: 采用微核法、逆转录PCR、抗氧化试剂盒、流式细胞术等检测骨髓细胞微核率、P53基因表达、还原型谷胱甘肽(GSH)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、脾指数、脾细胞凋亡率、胸腺指数、细胞周期等。结果: 5种补益方能拮抗环磷酰胺造成的小鼠骨髓细胞、胸腺细胞的增殖抑制; 拮抗脾细胞增殖抑制(理中汤不明显); 增重免疫器官; 降低骨髓细胞微核率; 拮抗小鼠血清CAT的降低; 拮抗小鼠血清GSH降低(理中汤不明显); 抑制MDA升高(金匮肾气汤不明显); 四君子汤和六味地黄汤还在减少脾细胞凋亡、拮抗SOD降低、影响P53基因表达等方面显示了较好的效果。结论: 5种补益方能拮抗环磷酰胺的毒性, 对环磷酰胺造模小鼠有一定的保护作用。其中以四君子汤、六味地黄汤效果较佳。

[关键词] 补益方; 拮抗作用; 环磷酰胺; 毒性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)01-0051-04

环磷酰胺(Cyclophosphamide CP)是目前临床上常用的烷化剂类的抗肿瘤药物, 同时又是一种免疫抑制剂, 在杀伤肿瘤细胞的同时, 也损伤了正常组织细胞, 特别是对人体中生长旺盛的血液、淋巴组织细胞, 产生许多毒副作用。补益类中药在肿瘤治疗中有一定的应用, 可治疗癌前期病变, 预防肿瘤发生、复发、转移; 减轻放疗毒副反应; 治疗中晚期肿瘤, 改善症状; 提高生存质量、延长带瘤生存时间。

本研究从以往课题中选取了5种具有抗突变作用的补益方, 从不同方面(免疫系统和抗氧化系统)和不同水平(细胞、分子水平)探讨了补益方对环磷酰胺毒性的拮抗作用。为临床选用补益方辅助化疗提供实验依据。

1 实验材料

1.1 实验用药及配制 六味地黄汤按《小儿药证直诀》: 熟地黄24g、山茱萸12g、山药12g、泽泻9g、牡丹皮9g、茯苓9g; 金匮肾气汤按《金匮要略》: 生地黄24g、薯蓣12g、山茱萸12g、泽泻9g、茯苓9g、牡丹皮9g、桂枝3g、附子3g; 理中汤按《伤寒论》: 党参15g、白术15g、干姜15g、炙甘草15g; 四君子汤按

《太平惠民和剂局方》: 人参12g、白术9g、茯苓9g、炙甘草4.5g; 生脉散出自《内外伤辨惑论》: 人参10g、麦冬15g、五味子6g。以上中药均由南京中医药大学门诊部提供。每种方药均加适量水浸泡2h, 加热煮沸30min, 滤出头煎, 药渣加水适量, 再煮沸30min, 滤出2煎, 将2次滤液合并, 加热浓缩至100mL。六味地黄汤、金匮肾气汤、理中汤、四君子汤、生脉散药液浓度分别为: 0.75, 0.81, 0.60, 0.345, 0.31 g·mL⁻¹。

1.2 试剂 环磷酰胺(CP), 购自上海华联制药公司; 碘化丙啶, Sigma公司; Gicmsa染液, 南京生兴公司; TRIZOL, invitrogen; Rt-PCR试剂盒, Promega; 溴乙锭: 南京生达生物研究所; 琼脂糖, 中国医药上海化学试剂公司; EDTA, 南京生兴公司; 溴酚兰、Tris、硼酸(分析纯), 中国医药(集团)上海化学试剂公司; 抗氧化试剂盒, 南京聚力生物医学工程研究所。

1.3 实验动物 ICR纯种小鼠(20~22g), 雌雄均可, 由南京中医药大学实验动物中心提供。

2 实验方法

2.1 动物分组及处理 ICR小鼠随机分组, 每组8只, 分为正常对照组、环磷酰胺模型组及用药组。模型组和正常对照组连续用蒸馏水ig 10d, 用药组每天分别ig(相当于临床等效量), 连续10d。小鼠处死前30h, 除正常对照组外各组小鼠分别ip环磷酰胺(CP)0.040 g·kg⁻¹。

[收稿日期] 2008-05-12

[基金项目] 江苏省教育厅自然科学基金资助项目
(KJB360006)

[通讯作者] * 蔡宝昌, Tel: (025) 85811112

2.2 动物取材 摘眼球取血, 制备血清; 于 ig 第 10 天, 颈椎脱臼处死小鼠, 取小鼠双侧股骨, 剪去骨垢, 通过注射器用生理盐水冲出骨髓细胞, 用离心管收集备用; 取小鼠胸腺、脾脏, 称重后用载玻片碾磨, 用生理盐水制成细胞悬液备用。

2.3 微核(MN) 制片及观察分析 将骨髓细胞悬液离心(1 000 r·min⁻¹) 后去上清液, 用 37 °C 预温的 0.4% KCl 低渗 8 min, 用固定液(甲醇: 冰醋酸为 3: 1) 固定两次后气干法滴片, Giemsa 染色。每组标本统计 5 000 个细胞, 计算出微核率。

2.4 细胞凋亡及细胞周期的检测 取骨髓、胸腺、脾细胞悬液, 200 目筛网过滤, 用 PBS 洗涤 2 次后 70% 冷乙醇固定, - 20 °C 保存。上机前 PBS 洗涤, 制成细胞悬液, 加入含 RNA 酶的碘化丙啶(PI) 染液, 4 °C 30 min, 经 300 目尼龙网滤过后, 上流式细胞仪测定各组细胞凋亡率及细胞周期。每个样本获取 10 000 个细胞, 以分析软件 CELLQuset 及 ModFit 2.0 分析结果。

2.5 Rt-PCR 检测 收获骨髓细胞, 用 TRIZOL 试剂提取骨髓细胞总 RNA, RNA 变性电泳检测 RNA, 一步法 Rt-PCR 试剂盒扩增特异性片段: 依据小鼠 P53 基因全序列设计上下游引物, 扩增引物长度 250 bp 的一个长片段, 上游引物 ACACCTGATCGTTAC-TCGGC, 下游引物 GAGGGCTTACCATCACCATC, 反应条件为: 48 °C, 45 min → 94 °C, 2 min → 94 °C, 35s, 56 °C, 40s, 72 °C, 1 min 20s, 30 循环 → 72 °C, 5 min → 10 °C。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上 5 V/cm 电泳, EB 染色, 用凝胶成像系统进行光密度扫描分析。

2.6 脾指数、胸腺指数测定 脾脏、胸腺称重, 计算脾指数、胸腺指数。

2.7 抗氧化检测 取小鼠血清, 用试剂盒进行 GSH(还原性谷胱甘肽)、CAT(过氧化氢酶)、SOD(超氧化物歧化酶) 和 MDA(丙二醛) 的检测, 测定方法详见南京聚力生物医学工程研究所提供的试剂盒说明书。

3 结果

3.1 对骨髓细胞微核的影响 见表 1。结果显示每组观察 5 000 个细胞, 模型组与正常组相比: 微核率明显升高, 5 个用药组与模型组相比微核率显著下降。反映了药物的拮抗作用。

3.2 对环磷酰胺影响骨髓细胞周期的拮抗作用 见表 2。结果显示: 模型组与正常对照组相比, G0-

G1 期细胞明显增多, S 期细胞明显减少, G2-M 期细胞变化不明显; 用药组与模型组相比, G0-G1 期细胞明显减少, S 期细胞明显增多, G2-M 期细胞变化不明显; 药物组与正常对照组相比, 各期细胞均无明显差异, 可见环磷酰胺影响骨髓细胞增殖周期, 几种方药具有保护作用。

表 1 对环磷酰胺诱发的 MN 的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量(g·kg ⁻¹) | 微核率(%) |
|--------|-------------------------|--------------------------|
| 正常对照 | — | 2.2 ± 0.12 ²⁾ |
| 环磷酰胺模型 | 0.04 | 9.2 ± 0.09 |
| 理中汤 | 8.57 | 3.0 ± 0.34 ²⁾ |
| 金匱肾气汤 | 11.57 | 3.2 ± 0.22 ²⁾ |
| 四君子汤 | 4.93 | 3.0 ± 0.28 ²⁾ |
| 六味地黄汤 | 10.71 | 2.8 ± 0.53 ²⁾ |
| 生脉散 | 4.43 | 4.6 ± 0.17 ¹⁾ |

注: 与环磷酰胺模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01(下同)

表 2 小鼠骨髓细胞 DNA 周期变化情况(n = 8)

| 组别 | 剂量(g·kg ⁻¹) | G0-G1(%) | S(%) | G2-M(%) |
|--------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------|
| 正常对照 | — | 67.68 ± 3.24 ²⁾ | 23.98 ± 2.65 ²⁾ | 8.33 ± 2.65 |
| 环磷酰胺模型 | 0.04 | 77.56 ± 6.42 | 15.37 ± 3.00 | 8.06 ± 3.30 |
| 理中汤 | 8.57 | 70.80 ± 3.99 ¹⁾ | 22.45 ± 5.21 ²⁾ | 6.76 ± 3.61 |
| 金匱肾气汤 | 11.57 | 68.98 ± 5.76 ¹⁾ | 21.11 ± 4.67 ¹⁾ | 9.97 ± 4.14 |
| 四君子汤 | 4.93 | 67.64 ± 3.84 ²⁾ | 25.25 ± 6.82 ²⁾ | 7.02 ± 4.01 |
| 六味地黄汤 | 10.71 | 65.89 ± 5.32 ²⁾ | 25.91 ± 4.74 ²⁾ | 7.93 ± 3.93 |
| 生脉散 | 4.43 | 66.48 ± 4.32 ²⁾ | 24.86 ± 3.81 ²⁾ | 8.59 ± 4.25 |

3.3 Rt-PCR 实验 图 2 小鼠骨髓细胞 Rt-PCR 结果初步可见长为 250 bp 的特异电泳带, 且环磷酰胺组 p53 基因 mRNA 表达与对照组比明显增强, 六味地黄汤和四君子汤对环磷酰胺的这种作用有一定的拮抗效应。

3.4 对脾指数及脾细胞凋亡率的影响 见表 3。由表 3 可见, 模型组脾指数与正常对照组比明显降低, 而金匱肾气汤、四君子汤、六味地黄汤、生脉散组脾指数均明显升高, 反映出这些药物的保护作用。金匱肾气汤与正常对照组差异显著。环磷酰胺能明显诱导小鼠脾细胞凋亡, 经用药后, 六味地黄汤、四君子汤组能明显拮抗环磷酰胺引起的脾细胞凋亡。

3.5 对小鼠脾细胞周期的影响 见表 4。从表 4 可以看出, 环磷酰胺能明显抑制脾细胞增殖, 经用药后, 六味地黄汤、四君子汤、生脉散、金匱肾气汤能拮抗环磷酰胺引起的脾细胞增殖抑制, 表现为 G0+ G1 期较环磷酰胺模型组明显减少, S 期明显增加。

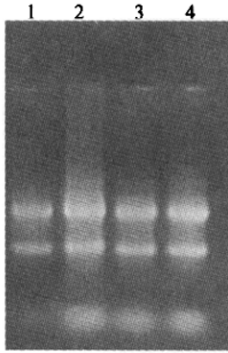


图 1 RNA 甲醛凝胶电泳(总 RNA 质量鉴定)

1-环磷酰胺组; 2-正常组; 3-六味地黄汤组; 4-四君子汤组

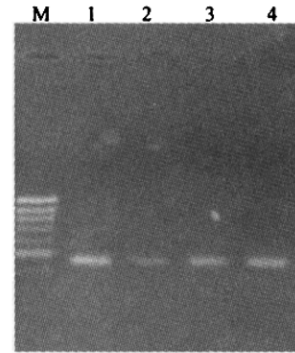


图 2 小鼠骨髓细胞 p53 基因 mRNA 的检测情况

表 3 小鼠脾指数、脾细胞凋亡率($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量($g \cdot kg^{-1}$) | 脾指数($\times 10^{-3}$) | 凋亡率(%) |
|--------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|
| 正常对照 | — | $7.09 \pm 1.10^{2)}$ | $4.25 \pm 1.49^{2)}$ |
| 环磷酰胺模型 | 0.04 | 4.42 ± 0.92 | 36.01 ± 18.29 |
| 理中汤 | 8.57 | 5.93 ± 1.71 | 29.48 ± 5.49 |
| 金匱肾气汤 | 11.57 | $9.79 \pm 1.03^{2)}$ | 23.39 ± 6.33 |
| 四君子汤 | 4.93 | $8.06 \pm 1.16^{2)}$ | $5.06 \pm 1.09^{2)}$ |
| 六味地黄汤 | 10.71 | $6.96 \pm 1.08^{2)}$ | $10.95 \pm 2.90^{2)}$ |
| 生脉散 | 4.43 | $7.63 \pm 1.45^{2)}$ | 22.47 ± 10.33 |

表 4 小鼠脾细胞的细胞周期($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量($g \cdot kg^{-1}$) | G0+G1 期(%) | S 期(%) | G2+M 期(%) |
|--------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|
| 正常对照 | — | $90.21 \pm 2.96^{2)}$ | $8.70 \pm 3.51^{2)}$ | 1.08 ± 1.06 |
| 环磷酰胺模型 | 0.04 | 96.20 ± 0.94 | 1.40 ± 1.49 | 2.43 ± 1.80 |
| 理中汤 | 8.57 | 96.38 ± 1.79 | 3.51 ± 1.70 | 0.19 ± 0.21 |
| 金匱肾气汤 | 11.57 | $90.50 \pm 2.79^{2)}$ | $8.20 \pm 2.81^{2)}$ | 0.29 ± 0.21 |
| 四君子汤 | 4.93 | $84.97 \pm 5.45^{2)}$ | $11.76 \pm 5.20^{2)}$ | 3.26 ± 0.25 |
| 六味地黄汤 | 10.71 | $89.20 \pm 3.27^{2)}$ | $10.63 \pm 3.30^{2)}$ | 0.16 ± 0.22 |
| 生脉散 | 4.43 | $79.8 \pm 6.67^{2)}$ | $17.83 \pm 5.52^{2)}$ | 2.36 ± 1.15 |

表 5 小鼠胸腺指数、胸腺细胞周期($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量($g \cdot kg^{-1}$) | 胸腺指数($\times 10^{-3}$) | G0-G1(%) | S(%) | G2-M(%) |
|--------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|
| 正常对照 | — | $3.55 \pm 0.88^{2)}$ | $92.90 \pm 1.88^{1)}$ | $6.36 \pm 1.20^{1)}$ | 0.68 ± 0.49 |
| 环磷酰胺模型 | 0.04 | 1.13 ± 0.72 | 95.57 ± 2.12 | 2.88 ± 2.89 | 0.73 ± 0.46 |
| 理中汤 | 8.57 | $3.26 \pm 1.11^{2)}$ | $87.36 \pm 1.53^{2)}$ | $11.78 \pm 1.44^{2)}$ | 0.99 ± 0.39 |
| 金匱肾气汤 | 11.57 | $3.99 \pm 0.43^{2)}$ | $85.28 \pm 3.85^{2)}$ | $14.31 \pm 3.21^{2)}$ | 0.77 ± 0.63 |
| 四君子汤 | 4.93 | $3.86 \pm 0.76^{2)}$ | $90.63 \pm 2.36^{2)}$ | $5.97 \pm 1.72^{2)}$ | 3.26 ± 0.68 |
| 六味地黄汤 | 10.71 | $4.06 \pm 1.18^{2)}$ | $90.71 \pm 2.64^{2)}$ | $6.73 \pm 2.08^{2)}$ | 1.93 ± 1.49 |
| 生脉散 | 4.43 | 2.23 ± 0.65 | $86.95 \pm 3.92^{2)}$ | $7.48 \pm 1.50^{2)}$ | 4.01 ± 3.27 |

3.6 对胸腺指数及胸腺细胞周期的影响 见表 5。由表 5 可见,环磷酰胺模型组胸腺指数与正常对照组比明显降低,而理中汤、金匱肾气汤、四君子汤、六味地黄汤胸腺指数均有升高,反映出这些药物的保护作用。生脉散组结果不明显。模型组与正常对照组相比,胸腺 G0-G1 期细胞明显增多,S 期细胞明显减少,G2-M 期细胞变化不明显;药物组与模型组相比,5 种药物组均使 G0-G1 期细胞明显减少,S 期细胞明显增多,G2-M 期细胞变化不明显。

3.7 小鼠血清抗氧化检测 GSH、CAT、SOD、MDA 见表 6。表 6 结果表明:与正常对照组相比,模型组 GSH 的含量、CAT 活力、SOD 值明显低于正常对照组,MDA 值高于正常对照组,5 种方药均能拮抗环磷酰胺对小鼠血清 CAT 的活力的抑制作用;使环磷酰胺降低的小鼠血清 GSH 有不同程度的提高(理中汤不明显);对环磷酰胺组造成的 MDA 增高具有抑制作用(金匱肾气汤不明显),此外六味地黄汤与四君子汤用药组的 SOD 活力明显高于环磷酰胺模型组。

表 6 小鼠血清 GSH、CAT、SOD、MDA 结果(n=8)

| 组别 | 剂量(g·kg ⁻¹) | SOD(U·mL ⁻¹) 值 | MDA(nM·mL ⁻¹) | GSH(mmol·L ⁻¹) | CAT(U·gHb ⁻¹) |
|--------|-------------------------|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 正常对照 | — | 255.58 ± 39.30 ²⁾ | 19.23 ± 1.19 ²⁾ | 0.855 ± 0.177 ²⁾ | 52.59 ± 5.267 ²⁾ |
| 环磷酰胺模型 | 0.04 | 186.36 ± 35.12 | 25.28 ± 1.12 | 0.494 ± 0.036 | 15.01 ± 3.142 |
| 理中汤 | 8.57 | 140.98 ± 51.04 | 7.17 ± 3.05 ²⁾ | 0.558 ± 0.059 | 45.64 ± 5.70 ²⁾ |
| 金匱肾气汤 | 11.57 | 145.81 ± 22.31 | 26.38 ± 1.92 | 0.684 ± 0.086 ²⁾ | 44.85 ± 4.552 ²⁾ |
| 四君子汤 | 4.93 | 250.49 ± 12.36 ²⁾ | 15.25 ± 1.88 ²⁾ | 0.709 ± 0.145 ¹⁾ | 40.86 ± 5.945 ²⁾ |
| 六味地黄汤 | 10.71 | 270.83 ± 16.56 ²⁾ | 11.68 ± 2.21 ²⁾ | 0.674 ± 0.061 ²⁾ | 39.01 ± 7.413 ²⁾ |
| 生脉散 | 4.43 | 132.87 ± 53.99 | 13.51 ± 4.46 ²⁾ | 0.572 ± 0.039 ¹⁾ | 40.17 ± 4.444 ²⁾ |

4 讨论

在肿瘤治疗中如何降低放疗、化疗的毒副作用、改善肿瘤病人的状况已经成为治疗肿瘤的关键。

传统中医药在癌症的治疗中有其独到之处,用中医药进行治疗常可改善症状、缓解病情,从而提高病人的生存质量、延长生命。祖国医学中很多补益类的名方、经方都有扶正固本、提高机体免疫功能等作用,若能将传统中医药与化疗结合起来,达到既能杀伤肿瘤细胞,又能维持机体较好的免疫状态,提高机体清除突变细胞的能力,将不失为一条治疗肿瘤的好途径。

围绕补益方、药抑制化疗药物环磷酰胺的遗传毒性,我们已完成了多项课题。六味地黄汤、理中汤、四君子汤、生脉散、金匱肾气汤是以往课题中筛选出来的方药,均为补益代表方,临床上具有治疗虚证、扶正固本的作用,本研究从不同方面(免疫系统和抗氧化系统)观察 5 种补益方对环磷酰胺毒性的拮抗作用。其可能机理是:①减轻了环磷酰胺对骨髓细胞染色体和 DNA 的损伤、加强了 DNA 损伤的修复能力以及逆转环磷酰胺对骨髓细胞增殖周期的抑制,保护骨髓细胞不受损伤、破碎,促进骨髓细胞的增殖分化,保证有充足的骨髓细胞发育成熟,进入血液循环,从而拮抗环磷酰胺对骨髓造血系统的抑制作用,维持其正常功能。②减少了环磷酰胺造成的脾细胞凋亡、拮抗了环磷酰胺对胸腺细胞、脾细胞增殖周期的抑制,提高机体的免疫力。③拮抗环磷酰

胺所致抗氧化系统的抑制作用,提高 SOD、GSH 和 CAT 的活力,减少了 MDA 生成,全面提高机体的抗氧化能力,清除自由基,使细胞免受过多自由基的侵袭。本研究为具有扶持正气、固本培元的补益类方药临床用于治疗肿瘤提供了微观实验依据。

[参考文献]

- [1] 杨同华. 中药抗化疗药物所致骨髓抑制实验研究概述[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(8): 506-508.
- [2] 刘连升, 王玉梅, 郭强. 黄芪注射液配合环磷酰胺治疗肾病综合症和血液系统的影响[J]. 陕西医学杂志, 2003, 32(4): 1095-1097
- [3] Loughlin K R, Manson K, Cragdale D, *et al.* The use of hydrogen peroxide to enhance the efficacy of doxorubicin hydrochloride in a murine bladder tumor cell line [J]. J Urol, 2001, 165(4): 1300-1304.
- [4] 赵富清, 张翠岚, 彭兆云, 等. 五参素片升高白细胞和降低环磷酰胺毒副作用的研究[J]. 南京军医学院学报, 2003, 25(2): 73-76.
- [5] 曲卫敏, 吴敏毓. 四君子汤与环磷酰胺合用对荷瘤小鼠免疫功能的影响及抑瘤作用[J]. 中药药理与临床, 1996, 12(3): 8-10.
- [6] 胡旭光, 臧建伟, 唐春萍, 等. 六味地黄汤生物制剂对肾阴虚小鼠脾 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(5): 1033-1034.
- [7] 韩春杨, 林德贵, 刘翠艳, 等. 四君子汤发酵液的抗肿瘤作用及其对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(6): 814-818.