

# 独活寄生汤对荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究

张若楠<sup>1,3\*</sup>, 王三虎<sup>2,3</sup>, 任东青<sup>3</sup>

(1. 解放军第 451 医院中医科, 陕西 西安 710054; 2. 柳州市中医医院肿瘤研究所, 广西 柳州 545001; 3. 第四军医大学, 陕西 西安 710033)

**[摘要]** 目的: 探讨独活寄生汤(DHJSHD)对小鼠肉瘤 S<sub>180</sub> 的抑制作用及其机制。方法: 以 S<sub>180</sub> 荷瘤小鼠为模型, 观察独活寄生汤对荷瘤鼠瘤重的影响和肿瘤组织病理学改变, 用改良的 MTT 法测定荷瘤鼠主要免疫指标。结果: 独活寄生汤能显著抑制 S<sub>180</sub> 瘤重, 抑瘤率为 32.45% ~ 43.75%; 肿瘤组织有明显的出血坏死及炎细胞浸润, 同时独活寄生汤活化荷瘤鼠的 T 细胞增殖能力, 促进其自然杀伤细胞(NK)活性和白介素-2(IL-2)分泌水平。结论: 独活寄生汤能抑制小鼠肉瘤 S<sub>180</sub> 的生长, 其机制可能与调节机体免疫功能有关。

**[关键词]** 独活寄生汤; 小鼠肉瘤细胞 180; 移植性肿瘤; 瘤重抑制率; 免疫功能

**[中图分类号]** R285.5    **[文献标识码]** B    **[文章编号]** 1005-9903(2007)10-0028-04

**[收稿日期]** 2006-10-31

**[基金项目]** 陕西省中医药管理局科研项目(2003, 70)

**[通讯作者]** \* 张若楠, Tel: (029) 82331218; E-mail: zhangm16@sohu.com

## An Experimental Study on the Anti-tumor Effects of Duhuoji sheng Decoction in Tumor Bearing Mice

ZHANG Ruo-nan<sup>1,3\*</sup>, WANG San-hu<sup>2,3</sup>, REN Dong-qing<sup>3</sup>

(1. Department of Chinese Integrative Medicine, No. 451 Hospital of Chinese PLA, Xi'an 710054, China;

2. Institute for Cancer Research, Liuzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Liuzhou 545001, China;

3. Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China)

**[ Abstract ] Objective:** To study the anti-tumor effects of Duhuoji sheng Decoction on mice bearing sarcoma 180 and its possible mechanism. **Methods:** S<sub>180</sub> bearing mice as model, effects of Duhuoji sheng Decoction on tumor weight and the pathological diagnosis of tumor tissue were investigated. Modified MTT assay was used to determine immunological function in bearing mice. **Results:** Duhuoji sheng Decoction could markedly inhibit the tumor weight of S<sub>180</sub>, the rate of inhibition ranged from 32.45~43.75 percent. Duhuoji sheng Decoction could prompt tumor tissue large area necrosis and inflammation cell infiltration, activate proliferating ability of T cells, markedly increase activity of natural killers(NK) and secretion of interleukin-2(IL-2). **Conclusion:** Duhuoji sheng Decoction had anti-tumor effects by regulating immune system.

**[ Key words ]** Duhuoji sheng Decoction; sarcoma 180; transplanted tumor; inhibition ratio of the tumor weight; immune function

独活寄生汤(Duhuoji sheng Decoction, DHJSHD)出自《千金要方》,是治疗风寒湿痹兼有体虚的通用方剂。现代药理认为该方具有镇痛、抗炎、免疫及促进微循环、脑循环的作用,临床上用于风湿性疾病、骨伤科疾病、自身免疫性疾病及心脑血管疾病的治疗<sup>[1]</sup>,近年来也有将该方用于临床肿瘤治疗并取得理想疗效的报道<sup>[2]</sup>。本研究采用小鼠移植性肿瘤模型,观察独活寄生汤对荷瘤鼠瘤重和肿瘤组织病理学改变的影响,并用改良的MTT法测定荷瘤鼠主要免疫指标,初步探讨了其在体内对小鼠肉瘤S<sub>180</sub>的抑瘤作用及其可能机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 动物与实验瘤株** 动物:昆明种小鼠和C<sub>57</sub>BL/6小鼠,清洁级,雌雄兼用,体重(20.0±2.0)g,均由第四军医大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(军)2002-2005号。肿瘤细胞株:小鼠S<sub>180</sub>肉瘤细胞,每周传代1次,由第四军医大学实验动物中心提供。慢性髓性白血病瘤细胞株K<sub>562</sub>,由第四军医大学医学遗传与发育生物学教研室传代培养。

**1.1.2 主要药品试剂仪器** 药品:独活寄生汤组

方、用量以《千金要方》记载为标准,由第四军医大学药物研究所按最佳优选水煎提取工艺经喷雾干燥而得<sup>[3]</sup>,为棕褐色粉末,含生药量2.99g·g<sup>-1</sup>,实验时用灭菌生理盐水配成不同浓度的混悬液;5-氟尿嘧啶注射液,上海旭东海普药业有限公司产品,规格250mg·10mL<sup>-1</sup>,批号030617。试剂:刀豆蛋白A(ConA)、RPMI-1640培养基、四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲亚砜(DMSO),均为美国Sigma公司产品;新生小牛血清购自杭州四季青公司;淋巴细胞分层液,十二烷基磺酸钠(SDS),均为上海试剂二厂生产;SDDM组成:10%SDS 100μL+25%DMSO 100μL。仪器:OLYMPUS倒置显微镜(日本),OLYMPUS光学显微镜(日本)。酶标仪:DG-3021型(华东电子管厂)。AO显微镜(AO公司,美国)。CO<sub>2</sub>培养箱(Forma Scientific,美国)。

#### 1.2 方法

**1.2.1 荷瘤小鼠抑瘤实验** 取昆明鼠50只,制备S<sub>180</sub>移植瘤模型,实验方法和疗效评价均按抗癌药物研究与实验技术指导原则进行<sup>[4]</sup>。将荷瘤鼠称重后随机分成5组,即生理盐水组,5-氟尿嘧啶组(18.75mg·kg<sup>-1</sup>)、独活寄生汤12960,6480,3240mg·kg<sup>-1</sup>组(相当于38.75,19.78,9.67g生药·kg<sup>-1</sup>,分别为人

用量的 25, 12.5, 6.25 倍), 每组 10 只。分别用生理盐水、高、中和低浓度独活寄生汤溶液灌胃, 每次 0.65 mL/20 g 体重, 5-氟尿嘧啶腹腔注射, 每次 0.30 mL/20 g 体重, 每日 1 次连续 10 d, 第 11 日处死、剥瘤、称重、按下式计算抑瘤率:

抑瘤率(%) = (1 - 给药组平均瘤重/对照组平均瘤重) × 100%

固定实体瘤组织标本作石蜡切片, HE 染色, 光镜组织学观察。同时制备各组小鼠脾细胞悬液待检。

**1.2.2 荷瘤小鼠 T 淋巴细胞增殖测定<sup>[5]</sup>** 取  $2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$  脾细胞悬液, 加入 96 孔培养板, 分组同抑瘤实验。设对照孔: 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液 + 100  $\mu\text{L}$  1640 培养液; 实验孔: 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液 + 100  $\mu\text{L}$  ConA (终浓度  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。标准条件下培养 60 h 后, 每孔弃去 100  $\mu\text{L}$  上清液, 加入 15  $\mu\text{L}$  ( $5 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) MTT 溶液孵育 4 h 后取上清液, 加入 100  $\mu\text{L}$  SDDM 吹打均匀, (8~12) h 内在倒置显微镜下可见紫色结晶溶解, 在酶标仪 490 nm 测吸光度(A)值。求增殖指数(SI)。

SI = 实验孔 A 均值 / 对照孔 A 均值。

**1.2.3 荷瘤小鼠 NK 细胞活性的测定<sup>[6]</sup>** 以荷瘤鼠脾淋巴细胞为效应细胞 ( $10 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 体外传代培养的 K<sub>562</sub> 细胞为靶细胞 ( $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 设不加靶细胞的效应细胞对照孔和不加效应细胞的靶细胞对照孔, 靶细胞对照孔加靶细胞、培养液各 100  $\mu\text{L}$ , 实验孔效、靶细胞各取 100  $\mu\text{L}$ , 每个样品做 3 个复孔。分组同上。加入靶细胞 1 h 后再加效应细胞, 将效应细胞和靶细胞按效靶细胞的比例 (10:1) 充分混匀, 于标准条件中培养 4 h 取出, 每孔加 MTT 液 10  $\mu\text{L}$ , 继续孵育 4 h 取出, 每孔吸出上清 100  $\mu\text{L}$ , 再加入 100  $\mu\text{L}$  SDDM 溶剂轻轻振荡, 至细胞内的紫色结晶完全溶解, 用酶标仪 490 nm 测 A 值, 结果以 NK 细胞活性表示, 其计算方法如下:

NK 细胞活性 = [1 - (实验孔 A 均值 - 效应细胞孔 A 均值) / 靶细胞孔 A 均值] × 100%

**1.2.4 荷瘤小鼠 IL-2 的诱生及活性测定<sup>[7]</sup>** 取  $5 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$  的荷瘤鼠脾细胞悬液 1.0 mL 加入 24 孔培养板, 再加入  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 ConA 10  $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ , 置标准条件下培养 48 h 后离心收获上清, 即 IL-2 待测样品。以 C<sub>57</sub> BL/6 小鼠脾细胞经体外 ConA 诱导转化成淋巴母细胞后作为靶细胞, 调整细胞数至  $2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ , 加入 96 孔培养板上, 每孔加 100  $\mu\text{L}$ 。将待测

IL-2 待测样品倍增稀释为 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 等浓度, 每 1 稀释度做 3 个平行孔。设对照孔: 100  $\mu\text{L}$  靶细胞悬液 + 100  $\mu\text{L}$  1640 培养液; 实验孔: 100  $\mu\text{L}$  靶细胞悬液 + 100  $\mu\text{L}$  IL-2 稀释液, 将培养板置标准条件下培养 48 h, 取出后每孔弃去 100  $\mu\text{L}$ , 加入 10  $\mu\text{L}$  MTT, 继续培养 4 h 后取出加 SDDM 0.1 mL/孔, 待紫色结晶完全溶解后在酶标仪 490 nm 测 A 值。按上式计算增殖指数(SI), 昆明种小鼠脾细胞产生 IL-2 对 C<sub>57</sub> BL/6 小鼠淋巴母细胞促增殖指数即为 IL-2 的活性。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS 11.5 软件, 用方差分析进行统计学处理。

## 2 结果

**2.1 独活寄生汤对 S<sub>180</sub> 瘤生长的抑制作用** 从表 1 结果显示, 各治疗组药物对荷瘤小鼠的肿瘤生长均有一定的抑制作用, 抑制程度依次为 5-氟尿嘧啶 > 独活寄生汤中剂量 > 独活寄生汤大剂量 > 独活寄生汤小剂量, 它们与生理盐水组相比有显著差异 ( $P < 0.01$ )。

表 1 独活寄生汤对小鼠肉瘤 S<sub>180</sub> 生长的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
生理盐水	—	2.15 ± 0.23	—
5-氟尿嘧啶	18.75	1.05 ± 0.12 <sup>1)</sup>	51.42
独活寄生汤	12 960	1.29 ± 0.22 <sup>1)</sup>	40.26
独活寄生汤	6 480	1.21 ± 0.18 <sup>1)</sup>	43.75
独活寄生汤	3 240	1.45 ± 0.24 <sup>1)</sup>	32.45

注: 与生理盐水相比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$

**2.2 荷瘤鼠肿瘤组织病理学变化** 生理盐水组可见肿瘤组织大量异型细胞呈团块状分布, 细胞排列密集, 细胞体积较大, 少量坏死(+)。5-氟尿嘧啶组肿瘤组织大片坏死(++~++++), 可见肿瘤细胞残影。独活寄生汤各组现不同程度的肿瘤细胞数量减少, 大部分细胞坏死、变性(++~++++), 可见肿瘤细胞残影, 且肿瘤周边组织反应明显: 大量淋巴细胞、浆细胞浸润。

**2.3 独活寄生汤对荷瘤小鼠 T 淋巴细胞、NK 细胞的影响** 由表 2 可知, 独活寄生汤中、小两个剂量可显著促进荷瘤小鼠脾淋巴细胞的增殖 ( $P < 0.05$ ) 和明显增强荷瘤小鼠 NK 细胞活性 ( $P < 0.01$ ), 与 5-氟

尿嘧啶组的抑制作用相比, 独活寄生汤 3 个剂量组均有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

**2.4 独活寄生汤对荷瘤小鼠 IL-2 的影响** 由图 1 可见, 独活寄生汤 3 个剂量组均有促进荷瘤小鼠 IL-2 生成的作用, 与生理盐水组、5-氟尿嘧啶组相比有显著差异 ( $P < 0.01$ )。

表 2 独活寄生汤对荷瘤 T 淋巴细胞、NK 细胞的影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	T 淋巴细胞增殖 指数(SI)	NK 细胞活性 (%)
生理盐水	—	1.042 ± 0.089	36.23 ± 2.02
5-氟尿嘧啶	18.75	1.010 ± 0.070	31.86 ± 1.51 <sup>2)</sup>
独活寄生汤	12 960	1.086 ± 0.081 <sup>3)</sup>	38.54 ± 2.93 <sup>4)</sup>
独活寄生汤	6 480	1.145 ± 0.079 <sup>1, 4)</sup>	47.17 ± 3.95 <sup>2, 4)</sup>
独活寄生汤	3 240	1.123 ± 0.062 <sup>1, 4)</sup>	40.05 ± 2.56 <sup>2, 4)</sup>

注: 与生理盐水组相比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 5-氟尿嘧啶组相比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$

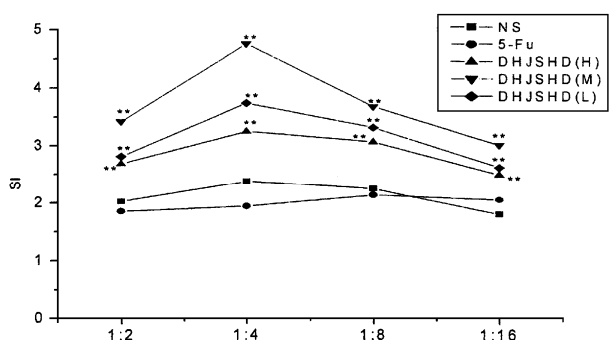


图 1 独活寄生汤对荷瘤小鼠 IL-2 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
注: 与生理盐水组(NS)相比较<sup>\*</sup>  $P < 0.01$

### 3 讨论

本实验观察到独活寄生汤可有效抑制小鼠  $S_{180}$  实体瘤的生长, 并在一定范围内存在着量效关系, 其抑瘤率 32.45% ~ 43.75%。独活寄生汤治疗组病理检查可见大量瘤细胞变性、坏死。研究提示该方可能是一种有效的抗癌复方, 这对发现独活寄生汤新的药理作用、扩大其治疗范围, 具有一定的研究价值。

独活寄生汤作用于荷瘤小鼠, 促进其体内 T 淋巴细胞的增殖, 提高 NK 细胞的杀伤活性, 提高淋巴细胞对 IL-2 生物活性的反应性。这一结果提示: 此方不仅能诱导激活荷瘤机体的免疫细胞, 还能诱导产生相应的细胞因子 IL-2, 后者又能进一步激活 T 淋巴细胞活性。因此, 独活寄生汤对荷瘤小鼠免疫系统的调节作用, 可能是通过免疫细胞与相应的细胞因子相互协同作用, 共同参与免疫功能的网络调节。临床应用及实验研究已证实方中的某些中药对免疫功能具有调节作用<sup>[8]</sup>。本研究表明独活寄生汤充分发挥了中药复方协同作用的优势, 抑制肿瘤, 调节免疫。

5-氟尿嘧啶做为阳性对照, 与独活寄生汤组及生理盐水组相比, 显示出对荷瘤小鼠免疫功能的抑制现象, 不及独活寄生汤在治疗肿瘤上安全、可靠, 提示独活寄生汤具有良好的应用前景, 应进一步研究。

### [参考文献]

- [1] 张若楠, 王三虎. 独活寄生汤临床应用研究进展[J]. 中国医药报, 2003, 7: 1.
- [2] 张若楠, 王星. 王三虎教授应用千金方治疗癌证的经验[J]. 中医杂志, 2004, 45(3): 176-177.
- [3] 张若楠, 王三虎, 王剑波, 等. 正交法探讨独活寄生汤的提取工艺条件[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(3): 246-248.
- [4] 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997. 297, 451.
- [5] 刘民, 马华, 李柏青. MTT 法检测小鼠淋巴细胞增殖性反应探讨[J]. 中国实验动物学杂志, 1999, 9(3): 146-148.
- [6] 何金生, 李瑞珠, 宗庭益. MTT 还原法检测 NK 细胞活性的方法学研究[J]. 中国免疫学杂志, 1996, 12(6): 356-358.
- [7] 钱玉昆. 实用免疫新技术[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1994. 46-48.
- [8] 张民庆, 龚惠明. 抗肿瘤中药的临床应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 376, 403, 259, 379, 346, 374, 367, 253, 371, 363, 186.