

# 阳和汤对裸鼠人癌移植瘤的抗肿瘤作用研究

高永翔<sup>1\*</sup>, 沈欣<sup>2</sup>, 宗桂珍<sup>2</sup>, 李德凤<sup>2</sup>

(1. 成都中医药大学, 四川 成都 610072; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 观察阳和汤对动物移植性肿瘤的抑制作用和可能的作用机理。方法: 采用荷瘤模型裸鼠进行在体抑瘤实验, 对体外培养肿瘤细胞进行肿瘤细胞增殖及诱导细胞凋亡实验。结果: 发现阳和汤 8g 生药/kg 4g 生药/kg(相当于人用量 16、8 倍)可明显抑制人小细胞肺癌在裸鼠体内的生长, 其抑瘤率为 59.2%~30.1%, 对体外培养的肿瘤细胞增殖有明显的抑制作用, IC<sub>50</sub> 在 7~15 μg/mL 范围内, 并对肿瘤细胞诱导凋亡的作用, 表现为 G<sub>1</sub> 期细胞数增多, S 期细胞数减少, G<sub>2</sub>M 期细胞数增多。结论: 阳和汤具有明显的抑制动物移植肿瘤生长的作用, 对体外培养的癌细胞生长也有一定的抑制作用, 其抑瘤作用机制和对癌细胞直接的杀伤, 通过及干扰其细胞生长周期、诱导细胞凋亡有着紧密的联系。

**[关键词]** 阳和汤; 肿瘤; 药效; 机理

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)07-0057-03

阳和汤是中医古典方剂之一, 由清代名医王洪绪创制<sup>[1]</sup>, 处方精炼, 法度谨然, 以其温补和阳、散寒通滞的功效用于阴疽疮疡等症应手而效, 现经长期临床探讨发现本方对多种常见慢性疾病如关节病、呼吸系统疾病、心血管疾病等均取得明显效果, 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>。本实验利用荷瘤裸鼠模型和体外培养肿瘤细胞观察它对肿瘤细胞的抑制作用<sup>[3]</sup>。

## 1 材料与方法

**1.1 药物** 阳和汤由熟地、肉桂、麻黄、鹿角胶、白芥子、姜炭、甘草等中药组成, 经本室乙醇提取后进一步精制而成, 状为棕褐色粉末, 含生药量 5g·g<sup>-1</sup>, 环磷酸胺为临床注射用粉针剂, 为上海华联制药有限公司产品, 批号: 030507。

**1.2 动物** BALB/C 裸鼠, 6~8 周龄, 体重 18 ± 2.0g, 雌雄兼用, II 级(清洁级)合格动物, 由中国医学科学院肿瘤医院动物中心提供, 接种瘤株人小细胞肺癌为裸鼠连续传代保种。体外实验人肺巨细胞癌(PG)由北京大学医学院肿瘤中心提供。

## 1.3 方法

**[收稿日期]** 2006-01-19

**[通讯作者]** 高永翔, Tel: (028) 87777978; E-mail: adelezhaosina.com

**1.3.1 对裸鼠移植人小细胞肺癌的影响** 从种鼠皮下无菌取出肿瘤块,用生理盐水冲净血液,选择生长良好的肿瘤组织剪成小块,约米粒大小。选择体重  $15 \pm 2.0\text{g}$  的 BALB/C 健康裸鼠,将小组织块接种于小鼠右侧肩胛骨部位皮下,接种后按动物体重均匀分为 5 组,分别为模型对照组、环磷酰胺组(30mg/kg)、阳和汤 3 个不同剂量组(1600、800、400mg/kg,相当于 8g 生药/kg、4g 生药/kg、2g 生药/kg,分别为人用量的 16.8、4 倍),每组均为 9 只小鼠。模型对照组灌胃灭菌自来水,阳性药环磷酰胺为腹腔注射给药,隔日 1 次,共 5 次,阳和汤各剂量组小鼠均为灌胃给药,0.2mL/10g,每日上午约九点给药 1 次/d,连续给药 10d。第 11d 处死动物,称体重,剥离瘤体称瘤重,计算抑瘤百分率,进行组间 *t* 检验。

**1.3.2 体外 PG 细胞增殖实验** 取人体肿瘤细胞,经消化分散成单个细胞,计数,稀释成  $1 \sim 5 \times 10^4$  cell/mL,接种在 96 孔板中,180 $\mu$ L/孔,置 37℃含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 18h,然后加已稀释好的阳和汤,20 $\mu$ L/孔,再继续培养 48h。悬浮生长细胞采用四唑盐(MTT)法,药物与细胞作用 48h 后,吸去培养液,加入 MTT 显色,用 3550 型酶标仪测定 570nm 吸光度。贴壁生长细胞采用罗丹明(SRB)法,培养 48h 后,吸去培养液,加入 SRB 显色,用 3550 型酶标仪测定 540nm 处吸光度。以光密度值表示细胞数量,最后求出平均值及抑制率,并观察阳和汤对肿瘤细胞形态的影响变化。

**1.3.3 体外 PG 细胞凋亡实验** 消化、收集细胞、计数、接种在 T25 培养瓶或 24 孔板内( $1 \times 10^5$  个细胞/mL,营养液为 5mL 或 2mL),每组每天 1 个瓶,于接种后第 3 天加药,分别于给药后第 1d、2d 和 3d,制备各组细胞悬液,盛入 10mL 离心管内,离心沉淀细胞(1000r/min, 5min),PBS 洗两次,取沉淀细胞 0.3mL,置入 5mL 离心管内,加入冷的 70% 乙醇 3mL,4℃冰箱过夜。第 2d,离心弃掉乙醇,PBS 洗两次,余约 0.5mL PBS 液(含沉淀细胞),吹打均匀,加入 RNA 酶(10 $\mu$ g/mL)2 滴(5 号针头),37℃温箱内保温 30min,再加入碘化丙锭(PI)200 $\mu$ L(50 $\mu$ g/mL),混匀,4℃冰箱染色 30min,流式细胞仪测定前,200 目筛过滤。计算机处理,绘制出细胞周期的曲线,并显示周期各时相(G<sub>1</sub> 期、S 期和 G<sub>2</sub>/M 期)的百分数,测定出凋亡细胞百分数(Sub-G<sub>1</sub>%)。

## 2 结果

**2.1 阳和汤对裸鼠移植人小细胞肺癌的抑制作用** 从表 1 结果显示阳和汤 1600 和 800mg/kg 组动物在 10d 给药后,可明显抑制人小细胞肺癌在裸鼠体内的生长,其抑瘤率为 59.2~30.1%,并呈现正相剂量依类型药-效关系。

表 1 阳和汤对裸鼠移植人小细胞肺癌的抑制作用(n=9)

组别	剂量 mg/kg	体重 终	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
模型对照	-	21.12 ± 2.36	1.589 ± 0.545	-
环磷酰胺	30	20.09 ± 1.85	0.053 ± 0.031 <sup>2)</sup>	96.7
阳和汤	1600	21.75 ± 3.17	0.649 ± 0.318 <sup>2)</sup>	59.2
	800	22.02 ± 2.74	0.834 ± 0.127 <sup>1)</sup>	47.5
	400	22.19 ± 2.56	1.112 ± 0.309	30.1

注:与模型对照组相比<sup>1)</sup> *P* < 0.05, <sup>2)</sup> *P* < 0.01, <sup>3)</sup> *P* < 0.001, (下同)。

**2.2 阳和汤对体外培养 PG 细胞生长的影响** 阳和汤对肿瘤细胞的增殖有明显的抑制作用,并随药物浓度的增加其作用逐渐增强,与对照组比有非常显著性差异,阳和汤对 PG 细胞作用 48h IC<sub>50</sub> 25.57 $\mu$ g/mL,见表 2。在给药 24h 后,镜下观察可见,细胞形态与对照比发生变化,并随着浓度加大,胞浆内脂滴增多,细胞形态变小,核固缩,随浓度增高及作用时间延长其形态变化作用增强,给药后 48h,可见细胞死亡,并随作用时间延长和浓度增高,细胞死亡数量增多。

**2.3 阳和汤体外诱导 PG 细胞凋亡的影响** 结果见表 3。用阳和汤后第 1d,周期各时期变化不大;第 2d,阳和汤各组,变化基本相似,即 G<sub>1</sub> 期细胞数增多,S 期细胞数减少,G<sub>2</sub>/M 期细胞数增多;第 3d,PG 细胞大部分破碎死亡,不再显示规律的细胞周期,用阳和汤 2d 后,Sub-G<sub>1</sub>% 明显增加,与剂量和时间呈较好的相关性。

表 2 阳和汤作用 48h 对 PG 细胞生长的影响

组别	剂量 ( $\mu$ g/mL)	$\bar{x} \pm SD$ (OD 值)	抑瘤率 (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
对照	-	1.778 ± 0.121	-	
阳和汤	4	1.697 ± 0.058	4.52	
	8	1.564 ± 0.084	12.03	
	16	1.091 ± 0.035 <sup>1)</sup>	38.69	25.57
	32	0.582 ± 0.029 <sup>2)</sup>	67.22	
	64	0.363 ± 0.069 <sup>2)</sup>	79.58	
	128	0.012 ± 0.002 <sup>3)</sup>	99.32	

表 3 阳和汤对 PG 细胞周期各时相  
(百分数)的影响( $n=1$ )

分组	剂量 μg/mL	24hr				48hr			
		G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	SubG <sub>1</sub>	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	SubG <sub>1</sub>
PG 对照	—	31.5	53.0	15.0	8.9	30.0	60.0	10.0	12.0
阳和汤	4	33.0	46.0	24.5	12.3	32.0	55.0	13.0	35.6
	8	34.0	48.0	18.0	9.8	30.0	45.0	25.0	28.9
	16	30.0	40.5	30.0	14.5	35.5	43.0	21.5	22.8
	32	36.0	43.0	21.0	120.7	36.0	49.0	15.0	43.8
	64	32.0	43.0	25.0	11.8	38.5	32.0	29.5	36.9

### 3 讨论

在实验研究中发现,阳和汤具有较强的抑瘤活性,明显抑制了瘤体的生长,对人瘤系瘤株反应敏感,能直接阻断肿瘤细胞的生长分化,对治疗肿瘤和

防止转移扩散有着重大的意义。其抗癌机理,可能是通过直接损伤癌细胞,使癌细胞活力降低、干扰癌细胞周期,抑制癌细胞生长、以及通过诱导癌细胞凋亡的综合途径,发挥活性作用,这为该方剂的应用提供一定的实验依据和理论基础。

### [参考文献]

- [1] 程广里. 阳和汤在骨科中的应用[J]. 中医药学报, 1987, (4): 26.
- [2] 郁仁存. 肿瘤研究[M]. 上海: 上海科技出版社, 1991. 125.
- [3] 艾军, 何兰欣, 梁索源, 等. 抗癌药物对细胞增殖的影响及凋亡的诱导作用[J]. 癌变畸变突变, 2002, 14(3): 200.