

· 论著 ·

肠胃清煎剂对裸鼠大肠癌皮下移植瘤 奥沙利铂治疗的增效作用

金泉克 许建华 肖海娟 陆海 余文燕 王国娟 孙珏 范忠泽

【摘要】 目的 探讨肠胃清煎剂对奥沙利铂(L-OHP)治疗结肠癌耐药细胞皮下移植瘤的增效作用。**方法** 采用皮下接种构建结肠癌耐药细胞 HCT 116/L-OHP 及敏感细胞 HCT 116 异位瘤模型,运用中药复方肠胃清煎剂及 1/2 最大耐受剂量的 L-OHP 干预后,观察 L-OHP 对移植瘤体积及裸鼠体重的影响、中药复方作用后 L-OHP 治疗效果的变化。**结果** 肠胃清煎剂及肠胃清煎剂联合 L-OHP 组荷瘤鼠体重减轻影响均少于单纯 L-OHP 组($P < 0.01$)。肠胃清煎剂低、高剂量联合 L-OHP 组肿瘤体积分别为 53.75%、48.32%,同单纯中药或 L-OHP 比较,减小明显($P < 0.01$)。**结论** 肠胃清煎剂具有一定抑制肿瘤生长的能力,在联合化疗药物作用下,其抑制效果明显,在有效治疗剂量中,与肠胃清煎剂剂量成正比。

【关键词】 肠胃清煎剂; 中医药; 移植瘤; 奥沙利铂; 耐药; 结肠癌;

【中图分类号】 R73-3 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.03.004

Changweiqing decoction increase the effects of oxaliplatin in human colorectal cancer cell line HCT 116/L-OHP tumor xenograft mice JIN Quan-ke, XU Jian-hua, XIAO Hai-juan, et al. Department of oncology, Shanghai Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM. Shanghai 200062, China
Corresponding author: FAN Zhong-ze, E-mail: fanzhongze@citiz.net

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Changweiqing Decoction(CWQ) formula on the growth of human colorectal carcinoma cell line HCT 116 and HCT 116/L-OHP transplanted subcutaneously in nude mice. **Methods** Nude mouse model of human colorectal carcinoma by subcutaneous transplantation of HCT 116 and HCT/L-OHP cell line was reproduced. A total of 50 mice were divided into 5 groups: control group and CWQ group(oral administration of CWQ at 50 mg/kg/d)、L-OHP(1/2 TMD)、high doses CWQ + L-OHP and low doses CWQ + L-OHP. The growth of the subcutaneously transplanted tumor and changes in mouse body weight in each group after treatment were observed three weeks. **Results** The decrease of weight in CWQ + L-OHP group was less than L-OHP group; the tumor volume in lower dose CWQ + L-OHP group and higher dose CWQ + L-OHP group were 53.75%、48.32%, respectively, which were significantly smaller than that of CWQ or L-OHP groups($P < 0.01$). **Conclusion** CWQ has inhibitory effect on the growth of human colorectal carcinoma transplanted subcutaneously in nude mice, especially on HCT 116/L-OHP transplanted subcutaneously nude mice. The results provide the evidence of CWQ combination with L-OHP for the prevention and treatment of human colorectal carcinoma.

【Key words】 Changweiqing Decoction; Chinese medicine; Xenograft; Oxaliplatin; Multi-drug resistance; Colon cancer

基金项目:国家自然科学基金(30873404,81073105);上海市科委中药现代化专项(09dZ1975500,10dZ1975500);上海市普陀区卫生系统自主创新科研基金

作者单位:200062 上海中医药大学附属普陀医院[金泉克(博士研究生)、肖海娟(博士研究生)、余文燕(博士研究生)、王国娟(博士研究生)];上海市普陀区中心医院肿瘤科[许建华、陆海、孙珏、范忠泽、金泉克(博士研究生)、肖海娟(博士研究生)、余文燕(博士研究生)、王国娟(博士研究生)]

作者简介:金泉克(1980-),2009 级在读博士研究生。研究方向:中药防治恶性肿瘤的临床与实验研究。E-mail:keerkin@yahoo.com.cn

通讯作者:范忠泽(1950-),硕士,教授,主任医师。研究方向:中药防治恶性肿瘤的临床与实验研究。E-mail:fanzhongze@citiz.net

文献标引格式:

金泉克,许建华,肖海娟,等.肠胃清煎剂对裸鼠大肠癌皮下移植瘤奥沙利铂治疗的增效作用[J].环球中医药,2012,5(3):175-179.

大肠癌是世界各国恶性肿瘤中的主要死亡原因之一,在中国,大肠癌的死亡率位居癌症死亡率的第 4、5 位^[1],而发达地区其死亡率已上升到各种恶性肿瘤中的第 3 位,上海则已居第二位^[2]。奥沙利铂是目前结肠癌的一线化疗用药,虽然奥沙利铂对许多耐顺铂或卡铂的肿瘤细胞仍抑制作用,并且在抗癌活性及毒副反应方面表现出明显的优势,但奥沙利铂耐药问题也成为影响临床疗效的一大难题^[3]。笔者的前期研究表明,具有健脾化湿解毒功效的上海中医药大学附属普陀医院制剂肠胃清方可明显提高晚期胃肠道肿瘤患者以铂类为基础的化疗的疗效,明显改善生存质量,延长中位生存期^[4,5]。应用笔者所在的课题组建立的奥结肠癌耐药细胞株 HCT 116/L-OHP 及其亲本株 HCT 116 进行实验,体外实验研究表明,肠胃清药物血清可通过影响 DNA 损伤修复途径,提高奥沙利铂抑制肿瘤细胞增殖的效果^[6]。本研究在上述工作的基础上,建立 HCT 116 及 HCT 116/L-OHP 结肠癌皮下移植瘤模型,进一步观察中药复方肠胃清煎剂对 L-OHP 抑瘤的增效作用。

1 材料与方法

1.1 细胞系及实验动物

人结肠癌细胞株 HCT 116,购于南京凯基生物公司。HCT 116/L-OHP 为本实验室自行诱导,对 L-OHP 耐药倍数达 17.00 倍。BALB/c 裸小鼠 80 只,4~6 周龄,体重(20±2)g,雌雄各半。购自于上海西普尔-必凯实验动物有限公司[生产许可证号为 SCXK(沪)2003-0002],饲养于上海中医药大学附属普陀医院动物房 SPF 级动物实验室[动物实验室许可证号为 SYXK(沪)2005-0008],自由饮食。

1.2 主要试剂及仪器

CELL 240 型二氧化碳恒温培养箱(德国贺利氏公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司);101-2 干燥箱(上海市实验仪器总厂);95% 乙醇(分析纯)(上海振兴化工厂);奥沙利铂(江苏恒瑞医药股份有限公司);乙二醇双乙胺醚-N,N'-四乙酸(EDTA)(Sigma 公司)。

1.3 中药制备

肠胃清煎剂:由生黄芪 30 g、党参 15 g、生白术 15 g、猪苓 24 g、薏苡仁 30 g、八月札 24 g、野葡萄藤 30 g、红藤 30 g 组成。由上海中医药大学附属普陀医院制剂室熬制成水煎剂,参照人与小鼠等效剂量

换算公式,小鼠剂量约合 25 g/kg,高剂量组为 50 g/kg。煎煮方法:加水浸泡 1 小时,水煎 2 次,每次煎煮 1.5 小时,每次用水量为药材的 10 倍量,水煎液过滤后浓缩至约 150 ml,即为含生药 1.33 g/ml 的水煎剂。

1.4 人结肠癌耐药细胞株 HCT 116/L-OHP 的皮下移植瘤的建立

接种方法参考《细胞培养》^[7],取对数生长期 HCT 116/L-OHP 及 HCT 116。将细胞消化后收集到离心管中,然后用磷酸缓冲液(PBS)制成浓度为 1×10^7 /ml 的细胞悬液。取 4~6 周龄 BALB/C 裸鼠 6 只,体重(20±2)g,雌雄各半。常规消毒裸鼠右前肢的腋部皮下。按 2×10^6 个/0.2 ml 的细胞数量,接种到裸小鼠的右前肢的腋部皮下,传代 14 天后,自裸鼠身上剥离肿瘤组织,选取生长状态良好,无破溃的肿瘤组织置于生理盐水中,切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的组织块备用。在超净台中,裸鼠常规消毒,用 20 号套管针接种于裸小鼠背部右侧近前肢皮下。本实验所用肿瘤细胞株为第 4 代,异位瘤传至第 3 代为模型。

1.5 L-OHP 剂量的确定

最大耐受剂量(maximum tolerated dose, MTD)指动物能够耐受的而不引起动物死亡的最高剂量。通过预实验,确认本研究以裸小鼠对 L-OHP 1/2 MTD 为实验剂量。参照文献^[8]报道,选择健康裸小鼠 15 只,分设不同的剂量组(30、25、20、15、10 mg/kg),每组 3 只动物,每周腹腔注射 L-OHP 3 次(星期一、三、五),连续 3 周,最后确定本研究的 MTD,1/2 MTD 作为实验剂量。实验结果仅有 10 mg/kg 组裸鼠均存活,即本研究 MTD 量。故以 5 mg/kg 作为实验剂量。见表 1。

表 1 荷瘤裸鼠 L-OHP 剂量确定

组别	动物数(只)	
	终	始
30 mg/kg	3	0
25mg/kg	3	0
20mg/kg	3	1
15mg/kg	3	2
10mg/kg	3	3

1.6 动物分组及药物干预

参照《中药新药研制开发技术与方法》^[9]。造模成功后,待 HCT 116 及 HCT 116/L-OHP 肿瘤生长

至 50 ~ 100 mm³ 左右, 分别将 50 只裸鼠随机分成 5 组, 每组 10 只: 对照组予以生理盐水灌胃, 0.4 ml/次, 1 天 1 次, 每周 5 次, 并予以生理盐水腹腔注射, 隔天 1 次, 每周 3 次, 共 3 周; 肠胃清组, 以 50 g/kg 的肠胃清煎剂予以灌胃, 0.4 ml/次, 1 天 1 次, 每周 5 次, 并予以生理盐水腹腔注射, 同前, 共 3 周; L-OPH 组予以 1/2 MTD L-OPH 腹腔注射, 隔天 1 次, 每周 3 次, 共 3 周, 生理盐水灌胃同前; 肠胃清高、低剂量 + L-OPH 组, 分别按 50 g/kg 和 25 g/kg 的肠胃清煎剂予以灌胃, 0.4 ml/次, 1 天 1 次, 每周 5 次, 予以 L-OPH 1/2 MTD 腹腔注射, 隔天 1 次, 每周 3 次, 共 3 周。

1.7 肿瘤体积的测量

以肿瘤体积的变化, 反映药物的疗效。从开始给药当天即用卡尺测量肿瘤大小, 每周 2 次, 肿瘤体积以公式 $[\pi/6(w_1 \times w_2 \times w_2)]$ 计算 (w_1 为瘤块最大径, w_2 为最小径), 根据测定结果描绘肿瘤生长曲线。并以此计算 T/C% (T 代表实验组肿瘤体积, C 代表对照组肿瘤体积) [10]。

1.8 荷瘤小鼠的体重

以体重的减轻反映治疗的毒副作用。体重每周测定 3 次, 直至末次治疗后 2 周。体重的减轻用公式: 开始体重 - 最轻体重/开始体重 $\times 100\%$ 计算 [11]。

1.9 统计学分析

本实验采用 SPSS 16.0 软件统计分析。裸鼠治疗前后的体重系数、瘤体体积系数用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。起始体重和最轻体重为正态分布, 方差齐, 采用单因素多样本的 SNK-q 检验。体重减轻系数方差不齐, 用近似 F 值检验, 两两比较 Tamhane 法; T/C% 用重复测量方差分析。以 $\alpha = 0.05$ 为检验标准。

2 结果

2.1 肠胃清煎剂联合化疗药物对皮下移植瘤瘤体抑制率

瘤体生长曲线表明, 肠胃清煎剂及 L-OPH 均能在一定程度延缓皮下移植瘤的生长, 肠胃清联合化疗药物可显著减缓肿瘤的生长, 尤以肠胃清高剂量 + L-OPH 组瘤体生长最为缓慢, 见图 1、3。肠胃清组、L-OPH 组、肠胃清高、低剂量 + L-OPH 组对荷 HCT 116 移植瘤小鼠抑瘤率分别为 84.48%、56.66%、53.75%、48.32%, 以肠胃清煎剂联合

L-OPH 组明显, 与对照组有统计学差异 ($P < 0.01$); 对荷 HCT 116/L-OPH 移植瘤小鼠抑瘤率分别为 74.87%、47.90%、43.52%、38.01%, 与对照组有统计学差异 ($P < 0.01$); 见图 2、4。同时联合给药对耐药株皮下异位瘤的抑制率较敏感株增加, 其抑制效果明显, 在有效治疗剂量中, 与肠胃清剂量存在量效关系, 见图 1-4。

2.2 肠胃清煎剂联合化疗药物对皮下移植瘤荷瘤体重的影响

两组移植瘤小鼠体重在治疗后, 敏感株异位瘤组: 对照组体重减轻为 2%, 肠胃清组、L-OPH 组、肠胃清高、低剂量 + L-OPH 组裸鼠体重减轻分别为 5%、9.87%、7%、6.43%, 同空白对照组比较具有统

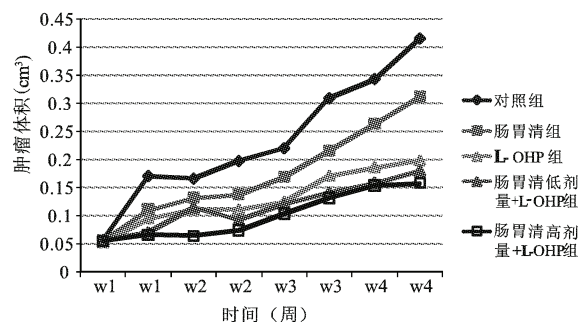


图 1 肠胃清煎剂对 HCT 116/L-OPH 细胞系皮下移植瘤瘤体生长曲线

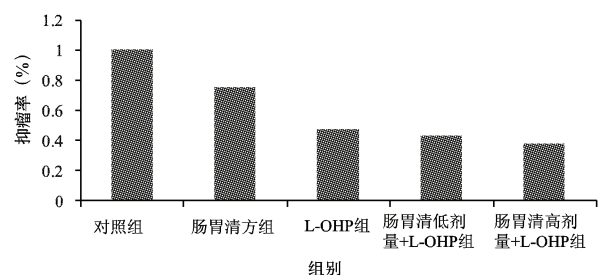


图 2 肠胃清煎剂对 HCT 116/L-OPH 细胞系皮下移植瘤抑瘤率

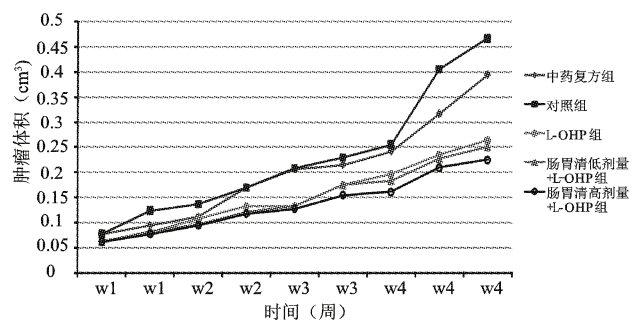


图 3 肠胃清煎剂对 HCT 116 细胞系皮下移植瘤瘤体生长曲线

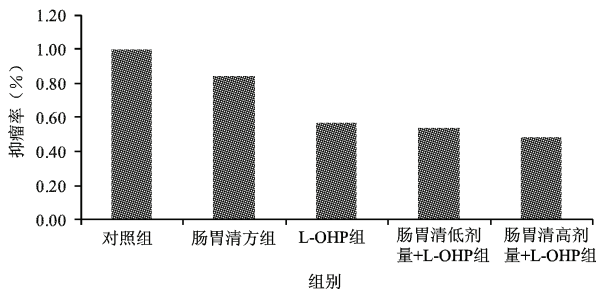


图4 肠胃清煎剂对 HCT116 细胞系皮下移植瘤抑瘤率

计学差异 ($P < 0.05$), 见表 2; 耐药细胞株异位瘤组: 对照组体重减轻为 2.20%, 肠胃清组、L-OHP 组、肠胃清高、低剂量 + L-OHP 组裸鼠体重减轻分别为 4.29%、8.77%、3.21%、3.97%, 以 L-OHP 组最为显著, 同空白对照组比较具有统计学差异 ($P < 0.05$), 两肠胃清煎剂联合化疗作用组荷瘤鼠体重减轻影响均少与化疗组, 同对照组比较没有统计学差异 ($P > 0.05$); 同 L-OHP 组比较有统计学差异 ($P < 0.05$)。见表 3。

表2 肠胃清煎剂对荷 HCT116 移植瘤小鼠体重变化

组别	起始体(g)	最轻体(g)	减轻(%)
对照组	19.88 ± 1.52	19.39 ± 1.57	2%
肠胃清组	20.55 ± 0.83	19.50 ± 1.49	5%
L-OHP 组	20.04 ± 0.83	18.08 ± 1.78	9.87% ^a
肠胃清低剂量 + L-OHP 组	20.43 ± 0.97	18.99 ± 1.92	7% ^a
肠胃清高剂量 + L-OHP 组	20.27 ± 0.34	18.96 ± 1.17	6.43% ^a

注: 与对照组相比^a $P < 0.05$ 。

表3 肠胃清煎剂对荷 HCT116/L-OHP 移植瘤小鼠体重变化

组别	起始体重(g)	最轻体重(g)	减轻(%)
对照组	20.07 ± 1.79	19.62 ± 1.71	2.20%
肠胃清组	19.56 ± 1.13	18.67 ± 0.99	4.29%
L-OHP 组	19.22 ± 1.71	17.45 ± 2.98	8.77% ^a
肠胃清低剂量 + L-OHP 组	19.89 ± 1.15	19.23 ± 0.87	3.21% ^b
肠胃清高剂量 + L-OHP 组	20.78 ± 1.88	19.93 ± 1.65	3.97% ^b

注: 与对照组相比^a $P < 0.05$, 同 L-OHP 组比较^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

近年来中国结肠癌发病率逐渐升高, 但临床上肿瘤化疗耐药现象日益严重, 影响了患者生存期的延长和生活质量的改善^[12]。肿瘤的多药耐药性 (MDR) 是一个复杂的生物学过程, 影响因素和参与机制众多, 这也是造成化疗失败的重要原因^[13]。临床和实验研究表明, 中医药联合化疗可提高化疗的

效果, 其增效作用不仅表现在非铂类化疗的个体中, 而且在以铂类为基础治疗方案的肺癌、卵巢癌等肿瘤中也得到充分体现^[14,15]。体内的增效作用, 与增加肿瘤化疗的敏感性密切相关, 同时与减少肿瘤血管的生成、抑制癌细胞的侵袭转移、调节机体的免疫功能等关联。

大肠癌在中医学中属“积聚”、“肠风”、“下痢”、“脏毒”等范畴, 其发病普遍认为涉及二方面因素: 一为内因, 为正气不足; 一是外因, 为毒邪损伤肠络, 痰瘀凝聚肠道所致。肠胃清方是上海中医药大学附属普陀医院博士生导师范忠泽教授的经验方, 主要由生黄芪、白术、猪苓、米仁、八月札、野葡萄藤等组成, 具有益气补脾、燥湿理气解毒之功效。对病理确诊的术后复发或未能手术的晚期胃癌、大肠癌患者, 在化疗方案的基础上, 加用具有健脾化湿解毒作用的中药复方, 与单纯化疗组对比, 中药复方加化疗组生存质量明显提高, 中位生存期明显延长^[4,5]。

奥沙利铂 (L-OHP) 是近年来被推荐的 II、III 期结直肠癌的一线治疗药物, 是继顺铂、卡铂后推出的第三代铂类抗癌药, 其特点是对耐顺铂、卡铂细胞株均有显著的抑制作用^[16]。本实验通过逐步增加作用于亲代细胞 HCT 116 的 L-OHP 浓度与间断大剂量 L-OHP 作用, 建立耐药细胞 HCT 116/L-OHP^[17], 采用皮下接种的方式建立结肠癌皮下异位瘤模型, 观察了肠胃清煎剂对 L-OHP 治疗结肠癌耐药细胞皮下移植瘤的增效作用。研究结果显示, 肠胃清煎剂联合 L-OHP 组荷瘤小鼠体重减轻影响均少于化疗组, 尤其是对 HCT 116/L-OHP 耐药细胞异位瘤裸鼠体重的减轻影响效果更为显著, 表明肠胃清煎剂可以减少 L-OHP 的毒副作用。同样, 肠胃清煎剂具有一定抑制肿瘤生长的能力, 在联合化疗药物作用下, 其抑制效果明显, 以耐药细胞异位瘤体更为显著, 表明肠胃清煎剂可以对 L-OHP 治疗耐药结肠癌具有增敏作用。而且, 在有效治疗剂量中, 与肠胃清煎剂剂量存在量效关系。

随着对肿瘤多药耐药机制研究的深入, 逆转耐药治疗已成为肿瘤治疗的热点之一, 而耐药机制的复杂性决定了理想的逆转药物应该具有多靶点效应。中药复发的多靶点特性, 在肿瘤治疗中的作用引起了人们的广泛关注, 临床实践证明肠胃清煎剂具有良好的减毒增效作用, 且体外研究已表明中药逆转耐药的有效性。本研究亦表明, 化疗药物联合

肠胃清煎剂后,其抑制裸鼠体内耐药皮下移植瘤的作用明显得到增强,其增效作用与增加瘤体内的药物浓度有关,但其具体的作用机制目前尚不明确,有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 张思维,雷正龙,李光琳,等. 中国肿瘤登记地区 2006 年肿瘤发病和死亡资料分析[J]. 中国肿瘤,2010,19(6):356-365.
- [2] 张云,张艳,凌青,等. 上海市黄浦区 2002~2006 年恶性肿瘤发病情况分析[J]. 中国肿瘤,2010,19(4):232-234.
- [3] 崔建东,龙桂宁,张羽,等. 以草酸铂联合甲酰四氢叶酸及氟尿嘧啶为二线治疗方案治疗晚期大肠癌的疗效[J]. 广东医学,2005,26(1):112-113.
- [4] 许建华,范忠泽,孙珏,等. 肠胃清治疗晚期胃癌及对外周血 MDR1mRNA 的影响[J]. 上海中医药杂志,2007,41(5):40-42.
- [5] 曹勤,孙珏,沈江帆,等. 肠胃清抗幽门螺杆菌感染的临床前瞻性研究[J]. 中华消化杂志,2000,20(1):70.
- [6] 陆海,孙珏,许建华,等. 肠胃清逆转耐草酸铂结肠癌细胞的 DNA 损伤修复实验研究[J]. 中国医药导刊,2011,13(8):1384-1387.
- [7] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版西安公司,2007:356.
- [8] Mathieu A, Rummelink M, D'Haene N, et al. Development of a chemoresistant orthotopic human non-small cell lung carcinoma model in nude mice: analyses of tumor heterogeneity in relation to the immunohistochemical levels of expression of cyclooxygenase-2, ornithine decarboxylase, lung-related resistance protein, prostaglandin E synthetase, and glutathione-S-transferase-alpha (GST)-alpha, GST-mu, and GST-pi [J]. Cancer, 2004, 101(8):1908-1918.
- [9] 王北婴,李仪奎. 中药新药研制开发技术与方法[M]. 上海:上海科学技术出版社,2001:995.
- [10] Prewett M, Deevi D S, Bassi R, et al. Tumors established with cell lines selected for oxaliplatin resistance respond to oxaliplatin if combined with cetuximab [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(24):7432-7440.
- [11] Liu L, Schwartz S, Davis B M, et al. Chemotherapy-induced O(6)-benzylguanine-resistant alkyltransferase mutations in mismatch-deficient colon cancer [J]. Cancer Res, 2002, 62(11):3070-3076.
- [12] 邹健,冉志华,黄美兰,等. 人结肠癌羟基喜树碱耐药细胞株 SW1116/HCPT 的建立与鉴定[J]. 胃肠病学,2006,11(6):327-331.
- [13] 周岱翰. 中药抗肿瘤研究的评析与前景[C]//2008 年首届国际中西医结合肿瘤研究论坛论文集. 2008:34-41.
- [14] 曾芹,高国俊. 中西医结合治疗难治性卵巢癌疗效观察[J]. 苏州大学学报(医学版),2005,25(1):170-171,173.
- [15] Gatti L, Zunino F. Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms [J]. Methods Mol Med, 2005, 111:127-148.
- [16] Samimi G, Manorek G, Castel R, et al. cDNA microarray-based identification of genes and pathways associated with oxaliplatin resistance [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2005, 55(1):1-11.
- [17] 陆海,孙珏,许建华,等. 人结肠癌奥沙利铂耐药细胞 HCT116/L-OHP 的建立及其耐药机制初探[J]. 肿瘤,2011,31(8):675-681.

(收稿日期:2012-01-21)

(本文编辑:钮丽霞)

· 信息之窗 ·

《环球中医药》2012 年征稿启事

《环球中医药》杂志是由中华人民共和国卫生部主管,中华国际医学交流基金会主办,国内外公开发行的中医药学术期刊,本刊为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),美国《化学文摘》收录期刊。

欢迎广大中医药学界同仁积极投稿。

1 本刊在重点反映科研成果与临床进展的同时,重视学术思考与海内外信息交流。主要栏目有:述评、论著、理论探讨、综述、临床经验、学术论坛等;特色栏目有:中医病案析评、海外中医、争鸣、中医文化、名医心鉴等。

2 “论著”、“综述”等以 4000~5000 字为宜,“临床经验”等栏目须 2000 字以上。欢迎长篇稿件,重大科研创新与理论突破稿件不受字数限制。“论著”、“理论探讨”与“综述”栏目文章须有英文题名、中英文摘要和中英文关键词。

3 建议作者以电子邮件方式投稿,发送至 hqzyy@163.com。本刊 1 周左右手工发回含稿号的收稿回执,2~8 周左右回复稿件处理情况。如未收到稿号回执和稿件处理情况请电话或邮件查询。

4 本刊 2012 年来稿免收审稿费。

编辑部地址:北京市东城区东四西大街 46 号综合楼 203 室

邮编:100711 电话:010-65133322 转 5203