

扶正散结汤拆方配伍中药抑制 Lewis 肺癌生长和对肿瘤细胞周期的影响

窦永超 陈慧彬 陈超

【摘要】 目的 研究扶正散结汤拆方抑制 Lewis 肺癌荷瘤小鼠移植瘤生长和对组织形态与细胞周期影响的差异与协同作用。**方法** C57BL/6 小鼠 80 只,随机分为:空白组、模型组、顺氯氨铂组、益气扶正组、化痰散结组、活血化痰组、清热解毒组、中药联合组,每组 10 只。除空白组外,其余小鼠建立肺癌移植瘤模型。接种后第 2 天开始用药,连续用药 14 天,于接种后第 15 天处死全部小鼠,测量小鼠的瘤重,组织 HE 染色观察和采用流式细胞仪分析肿瘤细胞周期及凋亡情况。**结果** 与模型组比较,其余各组瘤重均显著降低($P < 0.05$),各中药组对 Lewis 肺癌的抑制作用以联用组最为明显,抑瘤率最高;各组肿瘤细胞在 G_0/G_1 期比例,与模型组比较各组均增高($P < 0.05$),凋亡率显著增加($P < 0.01$),化痰组及解毒组在 G_0/G_1 期比例高于联用组($P < 0.05$),但联用组凋亡率最高;各组肿瘤细胞在 G_2/M 期的比例,除扶正组及活血组外,其余各中药组均明显减少($P < 0.05$);组织学观察示各组均较模型组细胞稀疏,呈散在、条索状分布,均可见不同程度的片状坏死区及核固缩、核破碎溶解的现象。**结论** 化痰组及解毒组单独应用时阻滞肿瘤细胞分裂的效果更突出,但各组中药联合应用对抑制肿瘤生长效果更明显,其机制与阻滞肿瘤细胞分裂,同时还可促进肿瘤细胞坏死及诱导肿瘤细胞凋亡有关。

【关键词】 扶正散结方; Lewis 移植瘤; 细胞周期; 细胞凋亡

【中图分类号】 R734.2 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.03.014

Effect of Fuzheng Sanjie Decoction and its compositions on tumor growth and cell cycle of transplanted Lewis lung carcinoma DOU Yong-qi, CHEN Hui-bin, CHEN Chao. Chinese Medicine Institute of PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: DOU Yong-qi, E-mail:dyqi_301@yeah.net

【Abstract】 Objective To study the inhibition of Fuzheng Sanjie Decoction and its compositions on the growth of tumors, and the effect on tissue morphology and cell cycle. **Method** Totally 80 C57BL/6 mice were randomly assigned into 8 groups including the blank group, model group, DDP group, Yiqi Huoxue group, Huatan Sanjie group, Huoxue Huayu group, Qingre Jiedu group and combined-therapy group with 10 mice in each group. The model of Lewis transplanted tumor was established except the blank group. Each group was intragastric administration one time every day for 14 days after the transplantation. Then the mice were sacrificed to measure the weight of tumor and observe tumor pathology, cell cycle and apoptosis. **Result** Compared with the model group, the weight of tumors in other groups were decreased significantly ($P < 0.05$). The tumor inhibition rate and apoptosis rate of the combined-therapy group were the highest. Compared with the model group, G_0/G_1 phase and apoptosis rate were increased in other groups ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). The G_0/G_1 phase ratios of Huatan group and Jiedu group in were both higher than the combined-therapy group. The proportion of tumor cells in G_2/M phase of all the groups except Fuzheng and Huoxue was significantly reduced ($P < 0.05$). According to the histological observation, cells of medicated groups were more sparsely distributed. Morphological changes including necrosis area, karyopyknosis, nuclear fragmentation and nucleus dissolved in the tumors could be observed under inverted microscope. **Conclusion** The effect on blocking tumor cell division were more outstanding in

作者单位:100853 北京,中国人民解放军总医院中医科

作者简介:窦永超(1965 -),硕士,主任医师,教授,博士生导师。研究方向:中西医结合防治恶性肿瘤。E-mail:dyqi_301@yeah.net

Huatan group and Jiedu group. But the inhibition on tumor growth was more obvious in the combined-therapy group, of which the mechanism was associated with blocking tumor cell division, promoting tumor cell necrosis and inducing tumor cell apoptosis.

【Key words】 Fuzheng Sanjie Decoction; Transplanted Lewis Adenocarcinoma; Cell cycle; Cell apoptosis

细胞周期调控异常与肿瘤的发生和发展的关系密切,中医药在治疗肺癌的过程中显著提高了治疗的有效率和患者的临床获益率、疾病稳定率,显著延长肿瘤进展时间^[1]。自拟扶正散结汤是临床经验方,经多年临床实践证明,在稳定肺癌病灶、延缓肿瘤复发转移及延长患者生存期等方面均有一定疗效。为探讨其作用机制,本研究采用小鼠 lewis 肺癌移植瘤模型,观察其拆方配伍中药对肿瘤生长、组织病理、细胞周期和凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠 90 只,雄性 6~8 周龄,体质重 18~22 g,初进动物时间:2013 年 7 月 26 日,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(军)2012-0004。其中 10 只用于移植瘤细胞传代,70 只建立小鼠皮下移植瘤动物模型,另外 10 只小鼠作为空白组,用于一般情况观察、对比及排除小鼠非正常死亡情况。

1.2 瘤株

Lewis Lung Cancer 瘤株由军事医学科学院六所馈赠。

1.3 试剂及仪器

顺氯氨铂,齐鲁制药公司生产(批号:2030111DB),核糖核酸酶(RNase A)(批号:SLBD3952V)由 Sigma 公司生产;流式细胞仪(Cytomics FC 500, Beckman Coulter)。

1.4 分组及小鼠 Lewis 肺癌移植瘤模型制备

SPF 级 C57BL/6 小鼠 90 只,其中 10 只用于移植瘤细胞传代,其余 80 只随机分为:空白组、模型组、顺氯氨铂组、益气扶正组(简称扶正组)、化痰散结组(简称化痰组)、活血化瘀组(简称活血组)、清热解毒组(简称解毒组)、中药联合组(简称联用组),每组 10 只。按照文献方法制备小鼠 Lewis 移植瘤模型^[2]。复苏 Lewis 肺癌瘤株,在无菌条件下接种于 2 只 C57BL/6 小鼠右腋窝皮下,10 天后按无菌操作程序,脱颈处死小鼠,取生长良好肿瘤组织,用生理盐水洗净剪碎后加生理盐水用匀浆器研磨,

台盼蓝染色计算活细胞数 >95%,调整肿瘤细胞悬液浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 瘤细胞继续皮下接种 4 只小鼠,每只接种 0.1 mL,如此传代 3 次。除空白组外,其余组小鼠按同样方法接种传代完成后的肺癌移植瘤细胞。

1.5 药品及制备

将扶正散结汤按配伍拆分为益气扶正(简称扶正,由生黄芪 25 g、女贞子 15 g 组成)、化痰散结(简称化痰,由半夏 15 g、天南星 10 g 组成)、活血化瘀(简称活血,由莪术 15 g、郁金 15 g 组成)、清热解毒(简称解毒,由白花蛇舌草 15 g、半枝莲 15 g 组成)、四法联用(简称联用,由生黄芪 25 g、女贞子 15 g、半夏 15 g、天南星 10 g、莪术 15 g、郁金 15 g、白花蛇舌草 15 g、半枝莲 15 g 组成)5 个组分,以上药物均由解放军总医院中药房提供,经鉴定后,传统方法水煎、过滤、60℃ 浓缩,参照文献^[3]计算各中药组给药量,分别配制成含生药浓度为 0.8 g/mL、0.4 g/mL、0.6 g/mL、0.6 g/mL、2.45 g/mL 的药液,置 4℃ 保存备用。

1.6 给药

于接种后的第 2 天开始,各中药组分别给予相应中药煎剂 0.2 mL/d,空白组、模型组、顺氯氨铂组给予等体积的蒸馏水,连续灌胃 14 天;顺氯氨铂组在接种的第 2 天开始予以腹腔注射顺氯氨铂 2 mg/(kg·d),1 次/2 天,共 7 次,其余各组同时腹腔注射生理盐水 10 mL/kg。

1.7 观察项目

一般情况观察:每日观察各组小鼠体态、毛色、进食、活动等情况。

抑瘤率:于给药后第 14 天脱颈处死小鼠,剥取瘤块,天平称重,计算抑瘤率:抑瘤率 = $(1 - \text{实验组平均瘤重} / \text{模型组平均瘤重}) \times 100\%$

病理 HE 染色:取各组移植瘤用 10% 甲醛固定,常规石蜡包埋,应用组织切片苏木素—伊红染色法,光镜下观察。观察肿瘤细胞的分布、生长状态、核固缩、核碎裂和坏死,以及瘤组织内微血管分布情况。

流式细胞术检测瘤组织细胞周期:将小鼠瘤体剥离称重后,每组取小块瘤组织,并分别浸泡在含

有 PBS 的平皿中,用眼科剪将瘤组织剪碎、匀浆,制成瘤细胞悬液,100 目不锈钢网过滤,PBS 洗 2 次,每次 1000 r/min 离心 5 分钟,75% 乙醇固定,置于 4℃ 冰箱内过夜。次日离心,PBS 洗 1 次调整细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 后离心,小心弃上清液,用含有终浓度为 1 mg/mL RNaseA 酶加 100 μL 后混匀,之后加 PI 染液 0.4 mL 避光染色 30 分钟,上流式细胞仪检测细胞周期及凋亡率的变化^[4],结果以细胞周期各时相细胞百分比表示。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理。瘤重数据符合正态性检验及方差齐情况,以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析;抑瘤率数据符合正态性检验但方差不齐,采用 Kruskal-Wallis 法秩和检验,平均等级间的两两比较;细胞周期及凋亡率数据均采用单因素方差分析,以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组之间采用均数两两比较 (Dunnett 法)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 Lewis 肺癌小鼠一般情况观察

接种后第六天,小鼠右前肢腋下可触及黄豆大小瘤块,造模后第 7 天,小鼠瘤体生长明显加快。与空白组相比,造模后小鼠逐渐出现反应迟钝、动作迟缓、毛发无光泽,模型组小鼠出现拱背、喜静、蜷缩抱团的现象,顺氯氨铂组小鼠出现体温降低、体重增长缓慢,各中药组大部分小鼠行动较灵活,精神状态一般,饮食尚可,体重增长较模型组及顺氯氨铂组快。除空白组和顺氯氨铂组外,其余组小鼠出现少量死亡,多由于肿瘤增长较快压迫肺组织导致呼吸困难,以及后期出现消瘦、不进食饮水等肿瘤恶病质现象,个别小鼠因皮下肿瘤溃烂出血后,被同笼小鼠撕咬所致。

2.2 扶正散结拆方对 Lewis 肺癌移植瘤的瘤重及抑瘤率的影响

尽管各组有死亡,但其生存率各组无统计学差异。各组瘤重经单因素方差分析比较,差异有统计学意义 ($F = 10.98, P < 0.05$)。两两比较经 Dunnett 法,与模型相比,其余各组瘤重均显著降低,各中药组以联用组抑瘤作用最为明显,其次为扶正组和解毒组;各中药组瘤重及抑瘤率独立比较差异也具有统计学意义 ($P < 0.05$),其中联用组抑瘤率最高,为 63.63%,化痰组和活血组与联用组相比,差异具有

统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 扶正散结汤拆方各组对小鼠 Lewis 肺癌的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 瘤重 (g) | 抑瘤率 (%) |
|--------------------|-----------------------|--------------|
| 空白组 ($n = 10$) | — | — |
| 模型组 ($n = 9$) | 3.10 ± 0.76 | — |
| 顺氯氨铂组 ($n = 10$) | 0.92 ± 0.34^b | 70.39 |
| 扶正组 ($n = 8$) | 1.16 ± 0.48^b | 62.45 |
| 化痰组 ($n = 9$) | 2.06 ± 0.51^{adf} | 33.43^{df} |
| 活血组 ($n = 9$) | 1.99 ± 1.07^{adf} | 35.88^{de} |
| 解毒组 ($n = 8$) | 1.67 ± 0.77^{bd} | 46.15^e |
| 联用组 ($n = 9$) | 1.13 ± 0.62^b | 63.63 |

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与顺氯氨铂组比较^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$;与联合组比较,^e $P < 0.05$,^f $P < 0.01$ 。

2.3 扶正散结拆方对肿瘤组织病理学变化的影响

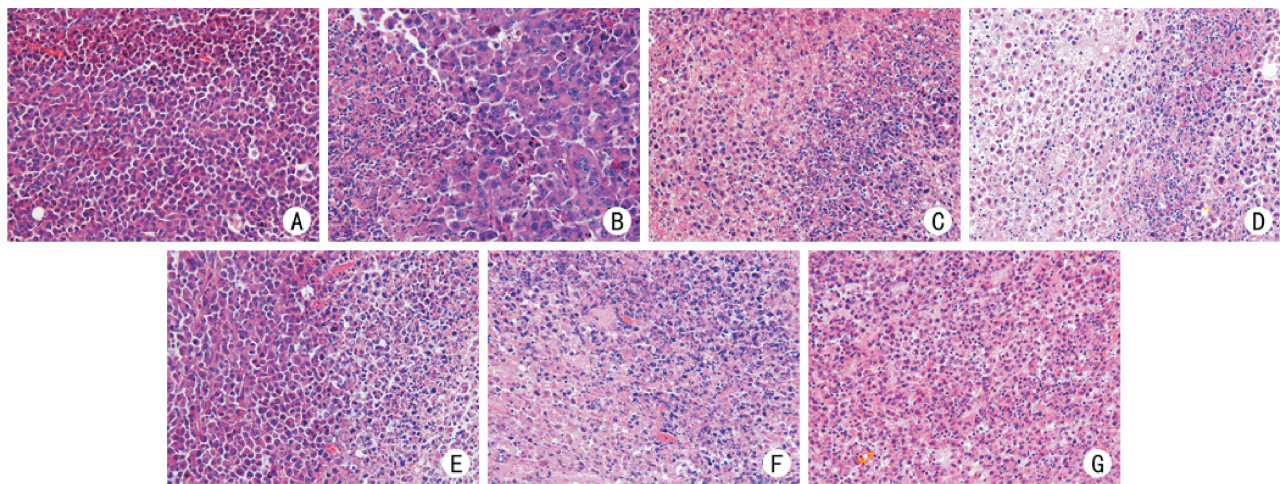
光镜下观察,肿瘤细胞形态多样,核不对称分裂明显。模型组肿瘤组织中细胞生长旺盛,数量丰富排列紧密,形状不规则,呈片状分布,肿瘤实质和间质分界不清,病理性核分裂相多见,细胞坏死较少;顺氯氨铂组及各中药组细胞数目较模型组稀疏,呈散在、条索状分布,均可见不同程度的片状坏死区及核固缩、核破碎溶解的现象。见图 1。

2.4 扶正散结拆方对 Lewis 肺癌移植瘤细胞周期及凋亡率的影响

细胞周期及凋亡率的比较采用单因素方差分析。 G_0/G_1 期比例各组间差异有统计学意义 ($F = 14.13, P < 0.05$),两两比较经 Dunnett 法,各治疗组均较模型组增高;凋亡率各组间差异有统计学意义 ($F = 19.41, P < 0.01$),两两比较经 Dunnett 法,各治疗组均较模型组显著增加。除扶正组及活血组外,其余各组肿瘤细胞在 G_2/M 期的比例明显减少 ($P < 0.05$);化痰组及解毒组在 G_0/G_1 期比例高于顺氯氨铂组及联用组,其余拆方组尽管未显示显著性差异,但趋势清晰;扶正散结各拆方组凋亡率独立比较具有统计学差异 ($P < 0.01$),以联用组凋亡率最高,其次为解毒组、化痰组、活血组、扶正组。见表 2。

3 讨论

研究表明,细胞周期调控紊乱是细胞增殖失控从而导致癌变的重要原因^[5]。细胞周期不同时相 (G_1 、S、 G_2 、M) 与细胞周期的关键调控点密切相关,由于细胞的周期长短主要决定于 G_1 期时间长短,



A 模型组;B 顺氯氨铂组;C 扶正组;D 化痰组;E 活血组;F 解毒组;G 联合组
图 1 扶正散结拆方各组对肿瘤组织学的影响(HE, ×400)

表 2 扶正散结汤拆方各组对小鼠 Lewis 肺癌细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

| 组别 | G ₀ /G ₁ | S | G ₂ /M | 凋亡率 |
|-------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 模型组(n=9) | 22.05 ± 6.19 | 11.86 ± 4.92 | 66.08 ± 10.44 | 9.40 ± 1.87 |
| 顺氯氨铂组(n=10) | 39.37 ± 2.97 ^b | 26.71 ± 4.96 ^a | 33.92 ± 7.21 ^b | 20.03 ± 1.72 ^b |
| 扶正组(n=8) | 32.47 ± 4.26 ^a | 13.49 ± 2.85 ^c | 54.04 ± 5.61 ^d | 13.63 ± 0.89 ^{bdf} |
| 化痰组(n=9) | 50.44 ± 2.07 ^{bce} | 5.45 ± 3.28 ^{de} | 44.11 ± 3.68 ^b | 17.89 ± 0.39 ^b |
| 活血组(n=9) | 31.82 ± 7.19 ^a | 8.95 ± 8.54 ^d | 59.23 ± 4.84 ^{de} | 14.10 ± 2.86 ^{bdf} |
| 解毒组(n=8) | 51.48 ± 6.06 ^{bce} | 7.86 ± 4.79 ^d | 40.66 ± 2.38 ^b | 19.06 ± 0.92 ^b |
| 联用组(n=9) | 37.32 ± 2.45 ^b | 19.22 ± 2.14 | 43.46 ± 3.18 ^b | 19.57 ± 0.76 ^{bd} |

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与顺氯氨铂组比较^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$;与联合组比较,^e $P < 0.05$,^f $P < 0.01$ 。

所以最重要的调控点是 G₁/S 调控点,细胞在该点分析细胞内、外的各种复杂信号以及 DNA 损伤情况,将信号传递、整合、汇集到细胞核,以决定细胞周期的长短、细胞处于静止的 G₀ 期或诱发其凋亡。因此,影响和调控肿瘤的细胞周期在肿瘤的治疗中具有重要意义。

对肿瘤细胞周期影响的观察结果表明,拆方各组均可作用于细胞周期中的 G₁/S 调控点,使肿瘤细胞停滞于 G₀ ~ G₁ 期,而不进入 S 期进行 DNA 复制,以化痰组及解毒组作用最优;但在抑制荷瘤小鼠的肿瘤细胞生长及促进凋亡方面,联合组效果最佳,说明联合应用可以发挥其它组分,如扶正及活血组分,促进肿瘤细胞坏死、诱导肿瘤细胞凋亡及其它机制如增强机体免疫力、抑制肿瘤血管生成等方面的作用,这体现了中药复方配伍的重要价值,也提示运用现代分子生物学等新技术,对中药复方配伍的作用

靶点及途径进行深入研究,对于提高中医药抗肿瘤的理論认识,及提高临床配伍运用的合理性和有效性,具有非常重要的价值。

参 考 文 献

[1] 刘硕. 中医药参与治疗晚期(ⅢB、Ⅳ期)NSCLC 回顾性临床研究[D]. 北京:中国中医科学院,2009.
[2] 钟婷. 黄茂扶正汤抗肿瘤与免疫调节作用的初步研究[D]. 长沙:中南大学湘雅医院,2010.
[3] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:1262.
[4] 姜金丽,邱全琰,何秀娟,等. 威麦宁对小鼠 Lewis 肺癌细胞周期的影响[J]. 北京中医药大学学报,2004,(2):41-44.
[5] Marx J. How cells Cycle Toward Cancer[J]. Science, 1994,(263):319-321.

(收稿日期:2014-05-04)
(本文编辑:黄凡)