

加味升阳益胃汤组方对荷瘤小鼠化疗后骨髓抑制及免疫功能的影响

张润莲 岳斌 李维 王宝琴 温丽英 刘冬彦 连平 何晓华 赵冬梅

【摘要】 目的 重点探究加味升阳益胃汤组方对荷瘤小鼠化疗的骨髓抑制及免疫功能的影响。**方法** 建立小鼠肉瘤 S180 移植性肿瘤模型,并将小鼠分成五组,荷瘤细胞对照组腹腔注射生理盐水 0.2 mL,环磷酰胺组注射环磷酰胺(cyclophosphamide,CTX)20 mg/kg,三组治疗组分别给予注射同等剂量 CTX 化疗,同时给予不同剂量的加味升阳益胃汤组方,其中小剂量组每只中药灌胃 0.1 mL,中剂量组每只中药灌胃 0.2 mL,大剂量组每只中药灌胃 0.3 mL,1 mL 大约含有 70 g 生药量。**结果** 环磷酰胺组小鼠的白细胞、血红蛋白及血小板均降低,荷瘤对照组和环磷酰胺组对比差异有统计学意义($P<0.05$)。大剂量组、中剂量组、小剂量组的白细胞、血红蛋白及血小板均正常,大剂量组、中剂量组升高程度相对明显。三个剂量组和环磷酰胺组对比差异存在统计学意义($P<0.05$)。**结论** 加味升阳益胃汤组方能拮抗荷瘤小鼠化疗后引起的骨髓抑制及免疫功能的下降。

【关键词】 加味升阳益胃汤组方; 荷瘤小鼠; 化疗; 骨髓抑制; 免疫功能

【中图分类号】 R273 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.03.009

作者单位:075000 张家口,河北北方学院附属第一医院中医科(张润莲、岳斌、温丽英、连平、何晓华、赵冬梅);河北省张家口市崇礼县中医院内科(李维);河北省张家口市崇礼县妇幼保健院妇产科(王宝琴);河北省张家口市沽源县医院内科(刘冬彦)

作者简介:张润莲(1974-),女,本科,副主任医师。研究方向:中医肿瘤临床和针灸教学工作。E-mail:109798530@qq.com

Effects of Jiawei Shengyang Yiwei decoction on bone marrow and immune function after chemotherapy in tumor-bearing mice ZHANG Run-lian, YUE Bin, LI Wei, et al. The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

Corresponding author: ZHANG Run-lian, E-mail: 109798530@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of Jiawei Shengyang Yiwei decoction on bone marrow and immune function after chemotherapy in tumor-bearing mice. **Methods** Transplanted tumor in mice Sarcoma S180 model was established and mice were divided into five groups. Tumor cells control group was injected with 0.2 ml saline, CTX group was injected with cyclophosphamide, and three treatment groups were injected with CTX and were gavage with different dose of Jiawei Shengyang Yiwei decoction (0.1, 0.2, 0.3 ml). **Results** White cells, hemoglobin and blood platelet level decreased in mice in CTX group. There was significant difference between tumor cells control group and CTX group ($P < 0.05$). The white cells, hemoglobin, and blood platelet level of the three treatment group was normal, and much more obvious improvement appeared in high and medium dose group. There was significant difference between the three treatment groups and CTX group ($P < 0.05$). **Conclusion** Jiawei Shengyang Yiwei decoction could be antagonistic to the bone marrow suppression and immune function decline caused by chemotherapy in tumor-bearing mice.

【Key words】 Jiawei Shengyang Yiwei decoction formula; Tumor-bearing mice; Chemotherapy; Bone marrow suppression; Immune function influence

恶性肿瘤的发病率正呈逐年上升的趋势,严重威胁着人民的身体健康及生命。对于恶性肿瘤公认的治疗方法有化疗、放疗、介入、热疗、中医中药等,中医中药贯穿于肿瘤治疗的各个环节。化疗杀伤患者残存肿瘤细胞,但杀伤癌细胞的同时,对正常细胞也有一定的损害,同时也抑制机体免疫功能^[1],故骨髓抑制及免疫功能下降是化疗常见的并发症^[2],在治疗上一直困扰着临床大夫,选择有效、经济、实用、疗效较好的药物治疗骨髓抑制,提高机体免疫力,是保证顺利化疗的重要环节。本实验重点观察加味升阳益胃汤组方对荷瘤小鼠化疗后骨髓抑制及免疫功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 61 只(其中 1 只用于接种小鼠肉瘤 S180 细胞株,其余 60 只进行实验)清洁级昆明雄性小鼠,7~8 周龄,体质量约为 24 g,购自北京实验动物繁殖中心;小鼠在实验前正常饲养环境,空调恒温室内 22℃,自由饮水,每天光照 2 小时,饲养 1 周。

1.1.2 实验药物 (1)加味升阳益胃汤组方(购自河北北方学院附属第一医院中药房)药物组成:黄芪 30 g、陈皮 10 g、清半夏 10 g、人参 15 g、茯苓 15 g、炒白术 12 g、炙甘草 6 g、羌活 10 g、独活 10 g、柴胡 10 g、防风 10 g、泽泻 15 g、黄连 6 g、当归 10 g、

花生内衣 10 g、生姜 3 片、大枣 6 个,将这些中药浸泡大约半个小时,并煎煮及过滤至少三次,每次的时间大约是半个小时。接着取出汁液 300 mL,使用 80℃ 的水进行水浴浓缩,1 mL 大约含有 1 g 生药量,使用 80℃ 进行煎煮浓缩为 30 mL,1 mL 大约含有 70 g 生药量,4℃ 中保存。(2)环磷酰胺(cyclophosphamide,CTX)购自山西振东泰盛制药有限公司,批号:H20143566。

1.2 方法

1.2.1 建立小鼠肉瘤 S180 移植性肿瘤模型 将小鼠肉瘤 S180 细胞株接种于其中一只小鼠腹腔,7 天后予颈椎脱臼处死,腹部皮肤消毒后抽取腹水,按 1:6 生理盐水稀释,将细胞浓度调整为 2×10^7 个/mL。

1.2.2 分组及给药方法 60 只昆明种小鼠的右腋下接种,每只大约 0.2 mL。将小鼠随机分成五组,荷瘤细胞对照组每只灌胃生理盐水 0.4 mL,腹腔注射生理盐水 0.2 mL。磷酰胺组每只灌胃生理盐水 0.4 mL,注射 CTX 20 mg/kg。三组治疗组分别给予不同剂量的加味升阳益胃汤组方,小剂量组每只中药灌胃 0.1 mL,注射 CTX 20 mg/kg;中剂量组每只中药灌胃 0.2 mL,注射 CTX 20 mg/kg;大剂量组每只中药灌胃 0.3 mL,注射 CTX 20 mg/kg。每只小鼠用药时间是接种瘤细胞 24 小时后,每天用药一次,持续用药 10 天。

1.2.3 标本的收集与处理 10 天后小鼠颈椎脱臼

处死,取血,EDTA_{K2} 抗凝,用全自动模块血液体液分析仪(型号 XN-2000);流式法化验血常规,摘取胸腺及脾称重,胸腺指数=胸腺重量(mg)/小鼠重量(g) 脾脏指数=脾脏重量(mg)/小鼠重量(g)。

1.2.4 自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)活性的测定^[3] 无菌摘取脾脏,按常规制备脾细胞悬液,用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液配成 1×10^7 个/mL 的细胞浓度作为效应细胞。取传代培养的 L929 细胞,用 0.25% 胰酶消化液消化 2 分钟加入 RPMI-1640 完全培养液,调节细胞浓度至 2×10^5 个/mL 作为靶细胞,在 96 孔平板上每孔加入靶细胞悬液 100 μ L, 37℃、5% CO₂ 培养 90 分钟,使其贴壁成单层细胞,然后实验孔加入 100 μ L 效应细胞悬液,做 4 个复孔,靶细胞对照孔加完全 RPMI-1640 培养液 100 μ L,然后将 96 孔板放在孵箱中孵育 20 小时,去上清,用生理盐水轻轻注满各孔,反复 3 次,以除去效应细胞和被杀伤脱落的靶细胞,在滤纸上吸干孔内水分;每孔加入 0.1% 的中性红染液 100 μ L 孵育 30 分钟,弃去染液,用生理盐水洗 3 遍,每孔加 100 μ L 细胞裂解液,使含有中性红的靶细胞溶解,摇匀,用酶标仪在 450 nm 测光密度值(optical density, OD),用以下公式计算杀伤率。

杀伤率(%) = (靶细胞 OD 值 - 实验组 OD 值) / 靶细胞 OD 值 $\times 100\%$

1.2.5 T 淋巴细胞增值能力的测定^[4] 无菌摘取脾脏,常规制作脾细胞悬液,用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液培养基重悬细胞,调节细胞浓度至 5×10^6 个/mL,加入 96 孔细胞培养板 100 μ L/孔,再分别加入 ConA 100 μ L/孔使其终浓度为 6 μ g/mL,将上述加好的培养板置 37℃、5% CO₂ 培养箱 68 小时后取出,每孔吸出 10 μ L,加入 0.5 g/L 的 MTT 10 μ g,置培养箱内培养 4 小时后取出,加 10% SDS-HCl 溶液 100 μ L/孔,振荡过夜,酶标仪测 570 nm 波长处 OD 值。以各样本 A 值代表其 T 淋巴细胞增值能力。

1.3 统计学方法

所有数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。本实验中各组小鼠血细胞值、脾脏指数、胸腺指数及 NK 细胞活性的数据均符合正态分布,且方差齐,因此采用单因素方差分析中的两两比较 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异存在统计学意义的界限。

2 结果

2.1 不同组别的化疗荷瘤小鼠白细胞、血红蛋白及血小板的对比

结果表明环磷酰胺组小鼠的白细胞、血红蛋白及血小板均降低,荷瘤对照组和环磷酰胺组对比差异存在统计学意义($P < 0.05$)。大剂量组、中剂量组、小剂量组的白细胞、血红蛋白及血小板均正常,大剂量组、中剂量组升高程度相对明显。三个治疗组和环磷酰胺组对比差异存在统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同组别对荷瘤小鼠白细胞、血红蛋白及血小板的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	白细胞 ($\times 10^9/L$)	血红蛋白 (g/L)	血小板 ($\times 10^{12}/L$)
大剂量组	12	8.09 \pm 0.96 ^{ac}	142.12 \pm 10.96 ^{ab}	310.10 \pm 30.33 ^{ac}
中剂量组	12	7.38 \pm 1.14 ^{ac}	130.28 \pm 13.27 ^{ab}	291.91 \pm 25.05 ^{ac}
小剂量组	12	6.72 \pm 0.81 ^{ab}	126.56 \pm 11.88 ^{ab}	272.72 \pm 33.33 ^{ab}
环磷酰胺组	12	2.94 \pm 0.94 ^a	100.63 \pm 15.74 ^a	76.24 \pm 36.16 ^a
荷瘤对照组	12	5.12 \pm 1.27	120.31 \pm 12.62	213.32 \pm 54.24

注:与荷瘤对照组比较,^a $P < 0.05$;与环磷酰胺组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$ 。

2.2 不同组别的化疗荷瘤小鼠脏器指数的对比

结果表明,环磷酰胺组小鼠的脾脏指数、胸腺指数均降低,荷瘤对照组和环磷酰胺组对比差异存在统计学意义($P < 0.05$)。大剂量组、中剂量组、小剂量组的脾脏指数、胸腺指数均上升,大剂量组、中剂量组升高程度相对明显。三个治疗组和环磷酰胺组对比差异存在统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同组别的化疗荷瘤小鼠脏器指数的对比($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	脾脏指数(g/kg)	胸腺指数(g/kg)
大剂量组	12	8.09 \pm 0.96 ^{ac}	3.10 \pm 0.33 ^{ac}
中剂量组	12	7.38 \pm 1.14 ^{ac}	2.91 \pm 0.25 ^{ac}
小剂量组	12	6.72 \pm 0.80 ^{ab}	2.72 \pm 0.33 ^{ab}
环磷酰胺组	12	4.94 \pm 0.94 ^a	2.16 \pm 0.36 ^a
荷瘤对照组	12	5.12 \pm 1.27	2.43 \pm 0.54

注:与荷瘤对照组比较,^a $P < 0.05$;与环磷酰胺组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$ 。

2.3 不同组别的化疗荷瘤小鼠 T 淋巴细胞增殖和 NK 细胞活性对比

结果表明环磷酰胺组的 NK 细胞活性显著降低,荷瘤对照组和环磷酰胺组对比差异存在统计学意义($P < 0.05$)。大剂量组、中剂量组、小剂量组的 NK 细胞活性均上升,大剂量组、中剂量组升高程度

相对明显,三个治疗组和环磷酰胺组对比差异存在统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 不同组别的化疗荷瘤小鼠 T 淋巴细胞增殖和 NK 细胞活性对比($\bar{x}\pm s$)

组别	n	T 淋巴细胞增殖(OD)	NK 细胞杀伤率(%)
大剂量组	12	0.317±0.047 ^{ac}	15.11±1.15 ^{ac}
中剂量组	12	0.310±0.037 ^{ac}	13.20±1.28 ^{ac}
小剂量组	12	0.287±0.029 ^{ab}	11.45±1.50 ^{ab}
环磷酰胺组	12	0.241±0.035 ^a	9.77±1.94 ^a
荷瘤对照组	12	0.261±0.054	10.22±1.20

注:与荷瘤对照组比较,^a $P<0.05$;与环磷酰胺组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

3 讨论

化疗药物均是细胞毒性药物,中医视为邪气,而这种邪气不同于一般的六淫之邪,它伤人快,肺先受邪,正气受损严重,故其病机是肺脾气虚,兼有湿热阻滞,治疗就应该采用健脾补肺、清热化湿的方法。加味升阳益胃汤组方正符合此要求,人参、茯苓、炒白术、陈皮、清半夏、炙甘草健脾益气;黄芪、防风、炒白术补益肺气;柴胡、羌活、独活祛风胜湿;茯苓、泽泻健脾渗湿;黄连清热燥湿;当归、花生内衣、生姜、大枣和胃补血,诸药合用共奏健脾补肺、清热化湿、益气和胃、补气养血之功效^[5],具有增强免疫,防治骨髓抑制的综合治疗作用^[6-11]。

本研究中,环磷酰胺组小鼠出现骨髓抑制,红细胞、白细胞、血小板均有不同程度的降低。大剂量组、中剂量组、小剂量组的小鼠无骨髓抑制症状。通过这些数据对比,有理由相信加味升阳益胃汤能够升高红细胞、白细胞及血小板。环磷酰胺组的 NK 细胞活性显著降低,而大剂量组、中剂量组、小剂量组的 NK 细胞活性均上升,大剂量组、中剂量组升高程度相对明显,说明加味升阳益胃汤能提高 NK 细胞的活性。环磷酰胺组小鼠的脾脏指数、胸腺指数均降低,大剂量组、中剂量组、小剂量组的脾脏指数、胸腺指数均上升,大剂量组、中剂量组升高程度相对明显。进一步表明加味升阳益胃汤能提高脾脏指数及胸腺指数。由此可见,加味升阳益胃汤组方能拮抗化疗引起的荷瘤小鼠骨髓抑制、提高免疫功能。

本实验针对中药全方位、多靶点调节的特点^[12],进一步了解加味升阳益胃汤的组方疗效,验证了该组方对肿瘤化疗时出现的骨髓抑制不良反应的治疗作用,并有提高免疫功能的作用,在一定程度上扩大了其应用范围,使其为更好地指导临床用药提供了一定的实验依据。但是,其详细的作用机理有待进一步研究。当然,本实验也存在着样本量偏少的不足,期待今后有更大样本、更精密的实验设计,使中医药更好地服务于临床。

参 考 文 献

- [1] Sakamoto J, Teramukai S, Nakazato H, et al. Efficacy of adjuvant immunochemotherapy with OK-432 for patients with curatively resected gastric cancer: meta-analysis of centrally randomized controlled clinical trials [J]. J Immunother, 2002, 25(5):405.
- [2] Wang BK, Xing AT, Zhou JH. Effect of lycium barbarum polyacridides on the immune responses of T, CTL and NK cells in normal and cyclophosphamide-treated mice [J]. Chinese J Pharmacol Toxicol, 1990, 4(1):366-367.
- [3] 付于, 夏天. 消瘤汤治疗肿瘤及调节免疫功能的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(12):1114.
- [4] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2006:748.
- [5] 宋兴华, 司徒红林. 中医药治疗化疗后骨髓抑制研究进展 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2014, 19(5):326-328.
- [6] 瞿融. 当归补血汤对红细胞免疫功能的影响 [J]. 中药药理与临床, 2012, 4(14):366-367.
- [7] 左增艳, 柳钟勋, 李健蕊, 等. 新型生物反应调节剂、当归多糖 (ASDP) 抗肿瘤作用及对荷瘤小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(10):545.
- [8] 李传刚, 李墨林, 舒晓宏, 等. 四君子汤对小鼠膀胱癌化疗的减毒增效作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(4):354-357.
- [9] 张印, 曹科, 王海明, 等. 补血四君汤防治化疗所致骨髓抑制的临床观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(3):318-319.
- [10] 陈鹤汀, 刘智勤, 朱惠学, 等. 当归补血汤对荷瘤小鼠化疗后免疫功能的影响 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(1):120-121.
- [11] 林海燕, 于佳宁, 王斌胜. 升白汤治疗化疗后白细胞减少症的实验研究 [J]. 四川中医, 2010, 28(3):18-20.
- [12] 余清清, 陈旻. 大肠癌术后中医药临床治疗近况 [J]. 江西中医药, 2011, (10):318-321.

(收稿日期: 2018-08-10)

(本文编辑: 韩虹娟)