

方药研究

补益方抗环磷酰胺造模小鼠脾细胞凋亡作用的研究

许冬青^{*} 王明艳^{*} 赵凤鸣^{*} 姜海英^{*} 詹臻^{*}

摘要 目的:研究六味地黄丸等5种补益方对环磷酰胺(CPP)造模小鼠脾细胞凋亡及细胞周期的影响。方法:选择ICR小鼠,采用流式细胞术检测脾细胞凋亡率及细胞周期等。结果:5种补益方中,四君子汤、六味地黄丸、生脉散、金匮肾气丸能拮抗CPP引起的脾细胞增殖抑制;六味地黄丸、四君子汤能拮抗CPP引起的脾细胞凋亡;5种补益方均能拮抗CPP所致的脾脏萎缩。结论:5种补益方均有不同程度的改善CPP所致脾脏损害的作用,其中以四君子汤、六味地黄丸效果较佳。

主题词 细胞凋亡/药物作用 脾/药物作用 @ 五种补益方

Effects of Recipes for Tonifying and Supplementing on Apoptosis of Splenocytes in Mice of Injected by Cyclophosphamide

Xu Dongqing, Wang Mingyan, Zhao Fengming, et al.

(College of Basic Medical Science, Nanjing University of TCM, Nanjing 210029)

Objective: To study effects of 5 recipes for tonifying and supplementing on apoptosis and splenocytes in mice treated with cyclophosphamide. **Methods:** Apoptosis and cellular cycles of splenocytes were detected by flowcytometric analysis. **Results:** Sijunzi Decoction, Liuwei Dihuang Pill, Shengmai Powder, Jinguai Shenqi Pill could antagonize the decline of proliferation induced by cyclophosphamide, and Sijunzi Decoction and Liuwei Dihuang Pill could resist the apoptosis of splenocytes caused by cyclophosphamide; and the recipes all could inhibit atrophy of the spleen induced by cyclophosphamide. **Conclusion:** The 5 recipes for tonifying and supplementing all can improve the injury of the spleen induced by cyclophosphamide in varying degrees, Sijunzi Decoction and Liuwei Dihuang Pill being the best.

Key Words Apoptosis/drug action; spleen/drug action; @tonifying and supplementing recipes

在癌症治疗中,放疗和化疗能直接杀伤肿瘤细胞,但同时对机体的免疫系统也造成损害。肿瘤患者经过放疗、化疗,机体免疫功能明显受到抑制,而患者的免疫状况与预后密切相关。因此,免疫疗法已成为治疗肿瘤的重要治疗手段之一^[1]。环磷酰胺(CPP)是临床上广泛应用的抗癌药,同时又是一种免疫抑制剂,患者使用CPP后出现的症状有些类似中医“虚证”的表现。在我们以往的研究中发现,很多补益方能明显抑制CPP诱发的微核及姐妹染色单体互换,具有明显的抗突变作用^[2-3]。本文通过研究5种补益方对CPP造模小鼠脾细胞凋亡抑制作用及对细胞周期、脾指数的影响,从免疫学角度进一步探讨补益方抗突变作用机理,为临床选用补益方辅助化疗提供实验依据。

1 实验材料

1.1 实验用药:六味地黄丸按《小儿药证直诀》组方:熟地黄 24g,山茱萸 12g,山药 12g,泽泻 9g,牡丹皮 9g,茯苓 9g;金匮肾气丸按《金匮要略》组方:干地黄 24g,山药 12g,山茱萸 12g,泽泻 9g,茯苓 9g,牡丹皮 9g,桂

枝 3g,附子 3g;理中汤按《伤寒论》组方:党参 15g,白术 15g,干姜 15g,炙甘草 15g;四君子汤按《太平惠民和剂局方》组方:人参 12g,白术 9g,茯苓 9g,炙甘草 4.5g;生脉散按《内外伤辨惑论》组方:人参 10g,麦冬 15g,五味子 6g。以上中药均由南京中医药大学门诊部提供,经鉴定符合《中华人民共和国药典》规定。每种方药均加适量蒸馏水浸泡2小时,加热煮沸30分钟,滤出头煎,药渣加蒸馏水适量,再煮沸30分钟,滤出二煎,将两次滤液合并,加热浓缩至100ml。

1.2 试剂:CPP购自上海华联制药公司;碘化丙啶购自Sigma公司。

1.3 实验动物:ICR纯种小鼠,体重20~22g,由南京

表1 各组小鼠脾指数及凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	鼠数	脾指数($\times 10^{-3}$)	凋亡率(%)
正常对照组	0	8	7.09 $\pm$ 1.10	1.25 $\pm$ 1.19
模型组	0.04	8	1.42 $\pm$ 0.92 [*]	36.91 $\pm$ 18.29 [*]
理中汤组	7.5	8	5.93 $\pm$ 1.71 [*]	26.48 $\pm$ 5.49
金匮肾气丸组	10.13	8	9.79 $\pm$ 1.03 ^{**}	23.39 $\pm$ 6.35
四君子汤组	4.31	8	8.06 $\pm$ 1.16 ^{**}	5.06 $\pm$ 1.09 ^{**}
六味地黄丸组	9.38	8	6.96 $\pm$ 1.08 ^{**}	19.95 $\pm$ 2.90 ^{**}
生脉散组	3.88	8	7.63 $\pm$ 1.15 ^{**}	22.17 $\pm$ 10.33

与正常对照组比较, $\Delta P < 0.01$;与模型组比较, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$

基金项目:江苏省教育厅课题(00KJB360006)

* 南京中医药大学基础医学院微生物免疫教研室,南京市汉中 路282号(210029)

收稿日期:2001-01-19;修回日期:2004-02-26

表 2 各组小鼠脾细胞的细胞周期比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	鼠数	细胞周期		
			G ₀ +G ₁ 期	S期	G ₂ +M期
正常对照组	0	8	90.21±2.96	8.70±3.51	1.98±1.06
模型组	0.01	8	96.20±0.91 [*]	1.40±1.19 [*]	2.43±1.89
理中汤组	7.5	8	96.38±1.79	3.51±1.70	0.19±0.21
金匱肾气丸组	10.13	8	90.50±2.79 [*]	8.20±2.81 [*]	0.2±0.21
四君子汤组	1.31	8	84.97±5.45 [*]	11.76±5.20 [*]	3.26±0.25
六味地黄丸组	9.38	8	89.20±3.27 [*]	10.63±3.30 [*]	0.16±0.22
生脉散组	3.88	8	79.8±6.67 [*]	17.83±5.52 [*]	2.36±1.15

与正常对照组比较,△ $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.01$

中医药大学实验动物中心提供。

2 实验方法

2.1 动物分组及处理:ICR 小鼠随机分组,每组 8 只,雌雄各半,设阴性对照组(正常对照组),阳性对照组(模型组)及用药组(理中汤组、金匱肾气丸组、四君子汤组、六味地黄丸组、生脉散组)。阳性对照组和阴性对照组连续用蒸馏水灌胃 10 天。用药组(相当于临床等效量)每天分别灌胃 0.25ml,连续 10 天,取材前 30 小时,除阴性对照组外,各组小鼠每只注射 CPP 40mg/kg。

2.2 脾指数测定:于灌胃第 10 天处死小鼠,取脾脏,称重。计算各组小鼠的脾指数。

2.3 细胞凋亡及细胞周期检测:于灌胃第 10 天处死小鼠。取脾脏,生理盐水冲洗,用眼科剪将脾脏剪碎,并用 1ml 无针头针筒吹吸 2~3 分钟,200 目筛网过滤,收集细胞悬液,用 PBS 洗涤 2 次(1000r/min,5 分钟),去上清液,滴入 70%冷乙醇固定细胞,-20℃保存。上机前 PBS 洗涤 3 次,制成约 1×10^6 个/ml 细胞悬液,加入含 RNA 酶的碘化丙啶染液混匀,4℃30 分钟,经 300 目尼龙网滤过后,流式细胞仪(FACS Calibur,BD 公司)测定各组脾细胞凋亡率及细胞周期。每个样本获取 10000 个细胞,以分析软件 CELL.Quset 及 ModFit 2.0 分析结果。

3 结果

3.1 脾指数检测结果比较:表 1 示,模型组脾指数与正常对照组相比明显降低($P<0.01$),而经理中汤、金匱肾气丸、四君子汤、六味地黄丸、生脉散用药后,脾指数均明显升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。

3.2 细胞凋亡检测结果比较:表 1 示,CPP 能明显诱导小鼠脾细胞凋亡,与正常对照组比较,差异有显著性($P<0.01$)。经用药后,六味地黄丸、四君子汤组能明显拮抗 CPP 引起的脾细胞凋亡,与模型组比较差异有显著性($P<0.01$)。

3.3 细胞周期检测结果:表 2,环磷酸胺能明显抑制脾细胞增值,与正常对照组比较,差异有显著性($P<$

0.01)。经用药后,六味地黄丸、四君子汤、生脉散、金匱肾气丸能明显拮抗 CPP 引起的脾细胞增殖抑制,表现为 G₀+G₁ 期明显减少($P<0.01$),S 期明显增加($P<0.01$)。

4 讨论

手术、放疗和化疗是癌症治疗中的三大疗法,三者往往联合应用。但放疗、化疗的毒副作用非常明显,在大量杀伤肿瘤细胞的同时,也破坏了正常组织细胞,尤其是使机体免疫功能显著下降,骨髓、胸腺、脾脏等重要免疫器官出现障碍。如何降低放疗、化疗的毒副作用,改善肿瘤患者的免疫功能,使预后良好,已经成为治疗肿瘤的关键。

传统中医药在癌症的治疗中有其独到之处,用中医药进行治疗常可改善症状,缓解病情,从而提高患者的生存质量,延长寿命。我们在以往的研究中发现,六味地黄丸、理中汤、四君子汤、生脉散、金匱肾气丸等用于治疗虚证的补益代表方具有明显的抗突变作用^[2-3],并且能够拮抗 CPP 引起的骨髓、胸腺细胞增殖抑制^[4]。本实验结果表明,5 种补益方均能拮抗 CPP 所致的脾脏萎缩。细胞周期研究结果表明,除理中汤外,其余 4 种均能明显拮抗 CPP 引起的脾细胞增殖抑制;凋亡研究结果表明,六味地黄汤、四君子汤能明显拮抗 CPP 引起的脾细胞凋亡,其余 3 种作用不明显。以上结果表明,5 种补益方都有减轻化疗药物 CPP 的毒副作用,保护免疫器官,提高机体免疫功能的作用,其中又以六味地黄丸、四君子汤效果较佳,为临床选用经典补益方辅助化疗提供了实验依据。

参考文献

- 曲卫敏,吴敏毓.四君子汤与环磷酸胺合用对荷瘤小鼠免疫功能的影响及抑瘤作用.中药药理与临床,1996,12(3):8~10.
- 王明艳,赵凤鸣,张旭,等.滋阴补阳方药的抗突变研究.中医杂志,2000,41(5):303~305.
- 王明艳,贾敏,王兴华,等.中药抗突变实验研究.中国优生与遗传杂志,1995,3(2):28~30.
- 许冬青,王明艳,姜海英,等.五种补益方对环磷酸胺造模小鼠骨髓、胸腺细胞周期的影响.中药药理与临床,2002,18(5):11~12.