

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.06.014

实验研究

解毒散结方水提物对肺癌 A549 细胞增殖、凋亡、迁移和黏附的影响

焦丽静¹, 付艳丽¹, 郑婷婷², 许玲^{PK}

(1. 上海市中医药研究院中医肿瘤研究所, 上海市宛平南路 725 号, 200032; 2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院)

摘要 目的 探讨解毒散结方治疗肺癌的可能作用机制。方法 以 10、20、40、80、100、200 $\mu\text{g/ml}$ 不同浓度的解毒散结方的水提物分别作用于人肺腺癌 A549 细胞株, 培养 48 h, 采用 MTT 法检测解毒散结方水提物对细胞增殖的影响, 计算半数抑制浓度 (IC_{50})。选取对 A549 细胞生长影响较小不同浓度的解毒散结方干预肺癌 A549 细胞, 采用 Hoechst 荧光染色法检测细胞凋亡情况, 划痕实验检测细胞移动能力, Transwell 实验检测细胞侵袭能力以及黏附实验检测细胞黏附能力。结果 浓度为 10、20、40、80、100、200 $\mu\text{g/ml}$ 解毒散结方水提物细胞的存活率均明显低于对照组 ($P < 0.01$), 其 IC_{50} 为 25.37 $\mu\text{g/ml}$ 。不同浓度的解毒散结方组较对照组细胞凋亡率上升, 迁移率、细胞穿膜数、细胞黏附数下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且随着药物浓度增加, 作用更明显。结论 解毒散结方水提物可抑制肺癌 A549 细胞的增殖、黏附、迁移并诱导细胞凋亡, 且具有一定剂量依赖性。

关键词 肺癌; 解毒散结方; A549 细胞; 细胞增殖; 肿瘤转移

肺癌是目前发病率和死亡率最高的恶性肿瘤^[1], 我国 2015 年全国新发肿瘤病例约为 429.2 万例^[2], 其中非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 占到全部肺癌的 80% ~ 85%, 5 年生存率不足 18%^[3]。中医临床抗肿瘤多采用扶正祛邪法, 且多以扶正为主, 佐以祛邪。根据前期对临床常用的清热解毒类、活血化瘀类、活血通络类、通络散结类等几大类药物的筛选研究, 选取具有明显抗肿瘤细胞增殖的 3 味中药: 夏枯草、重楼、干蟾皮, 同时针对肿瘤痰浊、瘀血、热毒等致病因素, 佐以气香宣散、可升可降之陈皮助药之行, 以化邪实, 组成效专而力精的解毒散结方。本研究探讨解毒散结方对肺癌 A549 细胞凋亡、增殖、迁移、转移和黏附的影响, 以期临床祛邪类药物进一步的开发使用提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人肺腺癌 A549 细胞株购自于中国科学院上海

细胞研究所, 目录号 TCHu150。

1.2 药物

解毒散结方: 陈皮 50 g, 夏枯草 50 g, 重楼 50 g, 干蟾皮 50 g。中药饮片均购自上海华宇药业有限公司, 经上海中医药大学附属龙华医院药剂科鉴定。将解毒散结方各药物放入圆底烧瓶, 用高纯水 (milli-Q 纯水器) 浸过药材表面 1 ~ 2 cm, 连接回流冷凝器, 加热回流, 一般保持沸腾约 1 h。放冷过滤, 再在药渣烧瓶里加入高纯水, 第二次加热回流约 30 min, 放冷过滤, 和头煎药物合并, 使用旋转蒸发仪去掉多余水分, 定容至 1 mg/ml (含生药量 8 g), 后置于 -80℃ 冰箱过夜, 次日使用冷冻干燥机使其冻干成粉。

1.3 主要试剂及仪器

Hoechst 33258 染色液 (批号: C1026)、MTT 粉 (批号: ST316), 均购于碧云天生物技术公司; BD MatrigelTM 基质基底膜 (批号: 356234), 上海伟进生物科技有限公司; 细胞凋亡检测试剂盒 (批号: 556420), BD Pharmingen 公司; 胰蛋白酶 (批号: 27250-018), Intrinvitrogen Corporation GIB-COTM; 4',6-联脒-2-苯基吡啶二盐酸 (DAPI, 批号: 0801A16), Noble Ryder。CKX41 倒置荧光显

基金项目: 国家自然科学基金 (81373623); 中医药行业科研专项 (201307006); 2013 年高等学校博士学科点专项 (20133107110004); 2013 年上海市博士学位点建设科研项目

* 通讯作者: xulq67@aliyun.com.cn, (021) 64385700

显微镜, OlymPus 公司; ACSCalibur 型流式细胞仪, 美国 Becton Dickinson 公司。

1.4 MTT 法检测解毒散结方水提物对 A549 细胞增殖的影响

采用四唑染色法 (MTT 法) 检测。收集对数生长期细胞, 常规胰酶消化、计数, 制成细胞悬液, 调整浓度至 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 个/ml, 接种于 96 孔培养板中, 每孔加 100 μ l, 置 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 24 h 后细胞贴壁, 换入 10、20、40、80、100、200 μ g/ml 浓度的解毒散结方水提物含药培养液, 以 RPMI-1640 培养液设立对照组, 充分混匀后置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中继续培养 48 h。实验终止前 4 h 加 5 mg/ml MTT 20 μ l/孔, 4 h 后弃上清。每孔再加入 DMSO 150 μ l, 充分震荡 10 min 后, 设 RPMI-1640 培养液为空白孔, 调零, 在酶联免疫检测仪波长 490 nm 处, 测定各孔吸光度值 (OD 值)。实验均设 5 个复孔并重复 3 次。细胞存活率 = 试验组 OD 值/对照组 OD 值 $\times$ 100%。

1.5 Hoechst 33258 荧光染色法检测解毒散结方水提物对 A549 细胞凋亡的影响

以 1×10^4 个/孔细胞接种于 96 孔板中, 24 h 后加入不同浓度的解毒散结方水提物, 作用 48 h 后, 1 $\times$ PBS 充分冲洗 3 次, 吸尽 PBS, 每孔加入 0.5 ml 预冷的多聚甲醛固定, 于冰上放置 10 min, 去固定液, 再以 1 $\times$ PBS 再次充分冲洗至少 3 次, 吸尽 PBS, 加入 0.5 ml Hoechst 33258 染色液, 室温摇床上染色 5 min。1 $\times$ PBS 再次充分冲洗 3 ~ 5 次。抗淬灭液封片后, 置荧光显微镜下观察拍照。200 倍光镜下连续数 3 个视野, 每个视野计数 200 个细胞中阳性染色细胞数, 取其平均值, 实验重复 3 次。荧光显微镜可检测到呈蓝色的细胞核, 凋亡小体颜色加深呈深蓝色或形状不规则。

1.6 划痕实验观察解毒散结方水提物对 A549 细胞迁移能力的影响

取对数生长期的细胞, 消化后制成细胞悬液, 计数, 以 5×10^4 个/孔的细胞数接种到 96 孔培养板中, 培养 24 h 后, 用手动划痕器 (无菌的 1000 μ l 移液器枪头) 沿孔的直径从孔顶划到孔底部, 划出一道痕迹, 用含 1% FBS 的培养基洗细胞 2 或 3 次, 除去细胞残骸, 加入 1% FBS 的含药物的培养液, 划痕后 0 h 和 48 h 进行拍照, 用倒置荧光显微镜观察 0 h 和 48 h 细胞迁移情况, 并利用 Image J 1.44 软件测量划痕宽度 S0 和 S48, 每孔测

量 4 处 (即十字的上、下、左、右线), 每组细胞均设 3 个平行孔。细胞迁移率 (%) = [(S48 - S0) 加药组 / (S48 - S0) 对照组] $\times$ 100%

1.7 Transwell 实验观察解毒散结方水提物对 A549 细胞转移能力的影响

将 Transwell 小室置于一空 24 孔板中, 加 100 μ l 无血清培养基到小室内, 培养箱放置 2 h, 胰酶消化处于对数生长期的 A549 细胞 5×10^4 个/孔, 用低血清培养基重悬, 同时加入不同浓度的解毒散结方水提物, 制成细胞悬液, 从小室内吸出培养基, 加 600 μ l 含 30% FBS 培养基到下室中, 加含解毒散结方的 A549 细胞悬液 100 μ l 到每个小室中, 用镊子将小室转移入含 30% FBS 培养基的下室中, 置于培养箱孵育 48 h, 取出 Transwell 小室, 用棉签将上层未穿膜细胞擦除; 下层细胞浸入 4% 的多聚甲醛常温固定 20 min, 生理盐水洗涂膜 1 次, 下层细胞浸入 0.2% 结晶紫 DAPI 中室温染色 20 min, PBS 漂洗 3 次, 将膜切除下来, 置于载玻片上, 封片后显微镜下观察和计数穿膜细胞, 用 Image J 1.44 软件统计穿膜的细胞数。

1.8 黏附实验观察解毒散结方水提物对 A549 细胞黏附能力的影响

5×10^4 个/孔的细胞加入不同浓度的解毒散结方的水提物孵育 48 h 后, 胰酶消化, 在扣过胶原蛋白的 96 孔板中加入 100 μ l 细胞悬液 (约含 1 万个细胞), 每个浓度 3 个复孔。1 h 后加入 4% 多聚甲醛常温固定 20 min, 吸去孔板内液体, PBS 洗涤 3 次, 结晶紫染色 10 min, PBS 漂洗 3 次, 拍照计数, 用 Image J 软件统计黏附的细胞数。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析, 数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析进行组间比较。P < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度解毒散结方水提物对 A549 细胞增殖的影响

表 1 示, 浓度为 10、20、40、80、100、200 μ g/ml 解毒散结方水提物组细胞的存活率均明显低于对照组 (P < 0.01), 且随着浓度增大, 细胞存活率越低。解毒散结方水提物半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 25.37 μ g/ml, 故以下研究选取对 A549 细胞生长影响较小的剂量 (2.5 ~ 25 μ g/ml) 进行实验。

表 1 不同浓度解毒散结方水提物组和对照组
A549 细胞存活率比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	孔数	存活率
对照组	—	5	100 $\pm$ 21.45
解毒散结方水提物组	10	5	65.70 $\pm$ 20.57*
	20	5	52.82 $\pm$ 62.37*
	40	5	44.20 $\pm$ 22.69*
	80	5	35.02 $\pm$ 20.85*
	100	5	28.19 $\pm$ 8.12*
	200	5	20.72 $\pm$ 6.53*

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$

2.2 不同浓度解毒散结方水提物对 A549 细胞凋亡的影响

图 1 示, Hoechst 33258 染色后, 对照组细胞核形态正常, 呈圆形, 染色均匀, 明亮, 核内染色质分布均匀, 无明显的凋亡细胞。6 $\mu\text{g/ml}$ 组可见部分细胞胞体皱缩, 胞浆浓缩, 核染色体边集浓染, 12 $\mu\text{g/ml}$ 组细胞核碎裂呈碎片状, 可见新月形的凋亡小体。随着药物浓度梯度的增加, 凋亡细胞数目明显增加, 伴随出现细胞的坏死, 细胞轮廓不清, 甚至细胞解体, 尤以 25 $\mu\text{g/ml}$ 组更加显著。

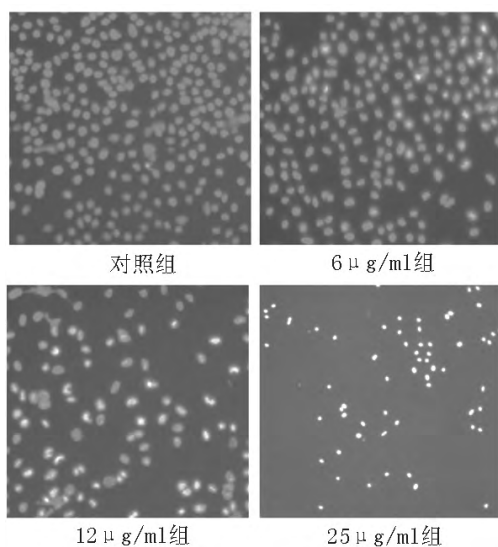


图 1 各组 A549 细胞 Hoechst 33258 染色图

表 2 各组 A549 细胞凋亡率比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	凋亡率
对照组	5	3.5 $\pm$ 3.8
6 $\mu\text{g/ml}$ 组	5	16.8 $\pm$ 6.1*
12 $\mu\text{g/ml}$ 组	5	66.3 $\pm$ 11.1**
25 $\mu\text{g/ml}$ 组	5	97.3 $\pm$ 2.5**

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 示, 6 $\mu\text{g/ml}$ 组、12 $\mu\text{g/ml}$ 组和 25 $\mu\text{g/ml}$ 组凋亡率明显高于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),

且随着药物浓度越大, 细胞凋亡越多。

2.3 不同浓度解毒散结方水提物对 A549 细胞迁移能力的影响

表 3 示, 10 $\mu\text{g/ml}$ 组和 20 $\mu\text{g/ml}$ 组 A549 细胞的迁移率均明显低于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且解毒散结方水提物浓度越高, A549 细胞的迁移率越低。

表 3 各组 A549 细胞迁移率比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	迁移率
对照组	5	80.00 $\pm$ 17.26
2.5 $\mu\text{g/ml}$ 组	5	77.92 $\pm$ 16.57
5 $\mu\text{g/ml}$ 组	5	77.89 $\pm$ 1.89
10 $\mu\text{g/ml}$ 组	5	61.34 $\pm$ 1.89*
20 $\mu\text{g/ml}$ 组	5	42.44 $\pm$ 15.94**

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

2.4 不同浓度解毒散结方水提物对 A549 细胞转移能力的影响

表 4 示, 各浓度解毒散结方组细胞穿膜数明显少于对照组 ($P < 0.05$), 且随浓度增大, 穿膜数越少。

表 4 各组 A549 细胞穿膜数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	细胞穿膜数
对照组	5	90.21 $\pm$ 3.07
5 $\mu\text{g/ml}$ 组	5	81.06 $\pm$ 4.82*
10 $\mu\text{g/ml}$ 组	5	68.74 $\pm$ 3.58**
20 $\mu\text{g/ml}$ 组	5	30.99 $\pm$ 10.42**

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 不同浓度解毒散结方水提物对 A549 细胞黏附能力的影响

表 5 示, 5 $\mu\text{g/ml}$ 组和 10 $\mu\text{g/ml}$ 组细胞黏附数较对照组显著减少 ($P < 0.05$)。

表 5 各组 A549 细胞黏附数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	细胞黏附数
对照组	5	95.39 $\pm$ 15.21
2.5 $\mu\text{g/ml}$ 组	5	90.22 $\pm$ 33.58
5 $\mu\text{g/ml}$ 组	5	55.02 $\pm$ 11.29*
10 $\mu\text{g/ml}$ 组	5	47.46 $\pm$ 11.03*

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$

3 讨论

细胞的增殖和凋亡平衡失调是肿瘤发生发展的重要原因之一^[4]。当正常细胞不受控制、出现无限、过度增殖, 而细胞的凋亡发生障碍, 不能进行正常有序的凋亡, 随着量的积累进而发生质的改变形成肿瘤。随着肿瘤细胞过度增殖后, 肿瘤细胞与

原发灶组织去黏附侵袭肿瘤周围组织,开始向周围或远处组织扩散^[6]。因此,抑制细胞的增殖和诱导凋亡、降低其黏附和侵袭转移是控制肿瘤发生、发展的根本措施。

中医学认为,肿瘤属于本虚标实。肿瘤的病因病机多因脏腑气机逆乱,或气机阻滞,不能布津行血,日久血阻为瘀,津聚为痰,气结血阻而成癖,在虚弱脏腑之处胶结成为癌毒。解毒散结方中陈皮味苦辛,性温,归肺、脾经,理气健脾,燥湿化痰;夏枯草辛苦,寒,归肝、胆经。《重庆堂笔记》言其“微辛而甘,故散结之中,兼有和阳养阴之功”;重楼苦,微寒,归肝经,可清热解毒,消肿止痛,凉肝定惊;干蟾皮性寒、味辛,功能清热解毒,利水消胀。陈皮气味芳香,长于理气,能入脾肺,调畅气机的同时运行各药使其药至病所,更好的发挥抗肿瘤效果。全方药少力精,共奏解毒化痰、理气散结抗癌肿之效。

研究发现,重楼皂苷能够将 SMMC-7721 人肝癌细胞阻滞于 G1 期^[7],抑制 MGC-803 胃癌细胞的生长阻滞细胞于 S 期^[8],诱导结直肠癌 SW480 细胞产生凋亡^[9]。华蟾酥毒基、脂蟾毒配基是干蟾皮的主要活性成分,其可以抑制细胞增殖^[9-10],诱导肿瘤细胞凋亡,杀伤肿瘤细胞,抑制肿瘤血管生成,增强机体免疫力^[11-12]。迷迭香酸是夏枯草的主要活性成分,不仅发现其可以抗氧化修复,诱导肿瘤细胞凋亡,抑制增殖^[13],同时发现其有修复中波紫外线诱导辐射的氧化应激的细胞损伤作用^[14],同时也具有很好的预防皮肤癌等的作用^[15]。

本研究发现,解毒散结方的水提物作用于 A549 细胞 48 h 后,其 IC₅₀ 为 25.37 μg/ml。Hoechst 荧光染色结果表明随着药物浓度梯度的增加,浓度为 25 μg/ml 的解毒散结方凋亡的诱导效果更加显著,凋亡细胞数目明显增加,伴随细胞的坏死,细胞轮廓不清,甚至细胞解体。采用划痕实验检测药物作用后细胞移动的能力,解毒散结方干预后 A549 细胞向划痕中部移动减少,划痕中部细胞分布浓度随着解毒散结方浓度增加而逐渐减少,浓度为 20 μg/ml 时抑制效应最佳。Transwell 实验检测药物作用 A549 细胞穿过基底膜的侵袭能力,研究发现解毒散结方浓度为 20 μg/ml 时穿膜细胞数明显减少,抑制侵袭效应最佳。黏附实验结果显示解毒散结方水提物浓度为 10 μg/ml 时能显著抑制 A549 细胞的黏附能力。

综上所述,解毒散结方可能通过降低肿瘤细胞

的黏附、侵袭力,从而抑制肿瘤细胞的转移活性,通过诱导肿瘤细胞的凋亡,抑制其增殖,降低肿瘤细胞的生长活性。解毒散结方对肿瘤增殖、凋亡、侵袭、转移的抑制效应可能为肿瘤治疗提供新的选择,但是其深层的作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2016 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADDE PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] ALLEMANI C, WEIR HK, CARREIRA H, et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2) [J]. Lancet, 2015, 385(9972): 977-1010.
- [4] EVAN GI, VOUSDEN KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer [J]. Nature, 2001, 411(6835): 342-348.
- [5] YILMAZ M, CHRISTOFORI G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion [J]. Cancer Metastasis Rev, 2009, 28(1/2): 15-33.
- [6] 萧梅芳,戴霞红,贺新春,等. 重楼皂苷对肝癌细胞的增殖及凋亡的影响 [J]. 生命科学研究, 2011, 15(6): 519-523.
- [7] 滕文静,周超,曹晓靖,等. 重楼皂苷影响 JAK/STAT3 通路诱导结直肠癌细胞凋亡 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(4): 808-811.
- [8] 贾科,吴庆琛,张成. 重楼总皂苷对胃癌细胞株 MGC-803 生长的抑制作用 [J]. 中国生化药物杂志, 2011, 32(4): 284-286.
- [9] 李雅琳,焦振山,张玉环,等. 栀子苷、黄芩苷、华蟾酥毒基对体外培养的 B16 恶性黑色素瘤细胞增殖的抑制作用 [J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2007, 16(4): 206-209.
- [10] 戴彩华,周蔚. 华蟾酥毒基对肝癌 HepG2 细胞 c-Src 基因表达的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(4): 390-391, 395.
- [11] 韩欣汝,吴世福,张超,等. 脂蟾毒配基、华蟾酥毒基、蟾毒灵配伍对 BEL-7402 人肝癌细胞的抑制作用 [J]. 山东中医药大学学报, 2014, 38(3): 266-269.
- [12] 舒勇攀,周慧,韩玉梅. 华蟾酥毒基抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国当代医药, 2010, 17(13): 15-16.
- [13] 任为,牟宜双,许可,等. 迷迭香酸通过诱导凋亡及抑制 NF-κB 信号通路发挥抗肝癌作用的机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(2): 31-35.
- [14] SHARMILA R, MANOHARAN S. Anti-tumor activity of rosmarinic acid in 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced skin carcinogenesis in Swiss albino

mice [5]. Indian J Exp Biol, 2012, 50(3):187-194.

[5] FERNANDO PM, PIAO MJ, KANG KA, et al. Rosmarinic Acid Attenuates Cell Damage against UVB Radiation-

Induced Oxidative Stress via Enhancing Antioxidant Effects in Human HaCaT Cells [J]. Biomol Ther (Seoul), 2016, 24(1):75-84.

Effect of Aqueous Extract of *Jiedu Sanjie Fang* (解毒散结方) on Proliferation, Apoptosis, Migration, Adhesion of A549 Cell

JIAO Lijing¹, FU Yanli¹, ZHENG Tingting², XU Ling¹

(1. Tumor Institute in Chinese Medicine, Shanghai Institute of Chinese Medicine, Shanghai, 200032; 2. Yueyang Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism of *Jiedu Sanjie Fang* (解毒散结方) in treating lung cancer. **Methods** Lung adenocarcinoma A549 cell lines were treated with aqueous extract of *Jiedu Sanjie Fang* in different concentration (10, 20, 40, 80, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$, respectively) for 48 hours. Then Mosmann Tetrazolium Test (MTT) was used to detect the effect on proliferation, and median inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated. Then A549 cell line was intervened with *Jiedu Sanjie Fang* in those concentrations that have smaller effects on proliferation. The apoptosis was detected with Hoechst fluorescent staining, the migration ability was detected with scoring test, the invasion ability was detected with Transwell chamber, and the adhesion ability was detected with adhesion test. **Results** The survival rates in the groups given by aqueous extract of *Jiedu Sanjie Fang* in different concentrations (10, 20, 40, 80, 100, or 200 $\mu\text{g/ml}$) were significantly lower than that in the control group ($P < 0.01$), and the IC_{50} was 25.37 $\mu\text{g/ml}$. These groups also had higher apoptosis rates, lower migration rates, smaller numbers of penetrating cells and smaller numbers of adhering cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Also, as the concentrations increase, the function became more obvious. **Conclusion** The aqueous extraction of *Jiedu Sanjie Fang* could inhibit the proliferation, adhesion and migration of lung cancer A549 cell, as well as inducing the apoptosis. The function seems to be dose-dependent.

Keywords lung cancer; *Jiedu Sanjie Fang* (解毒散结方); A549 cell; cell proliferation; metastasis

(收稿日期: 2016-08-05; 修回日期: 2016-10-25)

编辑: 王利芬

(上接第 501 页)

Clinical Study on Differences of Syndrome Differentiation and Acupuncture Protocols between Doctors

TIAN Xia¹, CHAI Qianyun¹, ZHANG Lijuan², WANG Congcong¹, XIA Ruyu¹, HUANG Na¹, FEI Yutong¹

(1. Evidence-based Medicine Center, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029; 2. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To explore the difference of syndrome differentiation and acupuncture prescription between doctors. **Methods** The study objects were the cancer patients who had nausea and vomit after chemotherapy, and acupuncture was selected as the therapeutic method. Two doctors independently differentiated syndrome of the same patient by four diagnostic methods and conducted specific acupuncture protocols, including point selection, needling depth, manipulation strength, reinforcement and reduction, and the time of retaining needle. The consistency of syndrome differentiation was measured by Kappa test, and the differences between doctors were compared. **Results**

The consistency of syndrome differentiation was low (consistency 38.5%, $k=0.22$), but the points selected were basically same. The master points were Zhongwan (RN 12), Tianshu (ST 25, bilateral), Neiguan (PC 6, bilateral), and Zusanli (ST 36, bilateral), and there was no significant difference in points selected ($\chi^2=8.746$, $P=0.724$). But there were significant differences in the manipulation strength, needling depth, time of retaining needle, and the reinforcement and reduction between the two doctors' protocols ($P < 0.05$). **Conclusion** For the cancer patients with nausea and vomit after chemotherapy, the consistency of syndrome differentiation between doctors was low, which had minimal effect on point selection. The main difference was reflected in the manipulation methods.

Keywords acupuncture program; syndrome differentiation in Chinese medicine; practitioner; cancer

(收稿日期: 2016-10-18; 修回日期: 2016-11-20)

编辑: 焦爽