

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.18.015

实验研究

四君子汤对结肠腺癌荷瘤小鼠癌性恶病质的影响

李 斌^{1,2}, 万丽丽², 李 颜², 杨全军², 余 奇², 郭 澄^{1,2*}

(1. 上海中医药大学研究生院, 上海市蔡伦路 1200 号, 201203; 2. 上海交通大学附属第六人民医院)

基金项目: 上海交通大学“科技创新专项资金”资助项目

摘要 **目的** 研究四君子汤对结肠腺癌荷瘤小鼠癌性恶病质的影响及可能作用机制。 **方法** 30 只 Balb/c 小鼠随机分为正常组、模型组、四君子汤组, 每组 10 只。模型组和四君子汤组予右侧前背部皮下注射结肠腺癌 CT26 细胞约 1×10^7 个, 皮下种植肿瘤细胞后第 1 天开始模型组和正常组灌胃 0.2 ml 生理盐水, 四君子汤组灌胃 0.2 ml 四君子汤药液, 相当于 $3.01 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 药粉, 各组均灌胃 15 天。记录不同时间小鼠体重、饮食总量、平均每天饮食量, 16 天后取材比较脏器重量、瘤重及生化指标、炎症因子白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量。 **结果** 与正常组比较, 模型组小鼠在第 5 天开始饮食摄入总量较正常组与四君子汤组减少, 在第 11-16 天平均进食量亦明显低于四君子汤组及正常组 ($P < 0.05$); 四君子汤组小鼠体重第 16 天时较正常组低, 但明显高于模型组 ($P < 0.05$); 模型组与四君子汤组小鼠脏器重量、瘤重、生化指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与模型组比较, 四君子汤组血清 TNF- α 、IL-6 明显降低 ($P < 0.05$)。 **结论** 四君子汤能有效减轻结肠腺癌荷瘤小鼠癌性恶病质症状, 提高体重, 抑制炎症因子 TNF- α 、IL-6 可能其作用机制之一。

关键词 四君子汤; 结肠腺癌; 恶病质; 体重; 饮食量; 炎症因子

恶病质是由潜在的消耗性疾病引起的机体代谢失调的综合症, 以体重下降为主要临床表现^[1]。恶性肿瘤极易出现恶病质, 从而导致了癌症患者体力状态的低下、生存期的缩短及对抗癌治疗敏感性的降低^[2]。目前已有临床及实验研究报道显示, 益气、温阳等中医治法对于防治癌性恶病质具有一定疗效^[3-4], 并报道扶正解毒祛瘀法改善恶病质的同时可抑制恶病质期肿瘤生长^[5]。我们认为气虚证可能是恶病质虚劳证中较早出现及主要的虚候之一, 基于此, 我们以益气健脾代表方剂四君子汤早期干预结肠腺癌诱导的小鼠癌性恶病质, 探讨其对恶病质的干预作用及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及瘤株

SPF 级 Balb/c 小鼠 30 只, 雄性, 6 周龄, 体重 $18 \sim 22 \text{ g}$, 购自上海普尔一必凯实验动物有限公司, 实验动物许可证号 SCXK 沪 2008-0016; 稳定

传代的 CT26 结肠腺癌小鼠 1 只 (4 代), 雄性, 9 周龄, 上海交通大学药学院赠送, 结肠腺癌细胞收集方法: 脱颈处死小鼠后, 用手术钳及剪刀小心剥离瘤体, 切取中心部位 $1 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ 大小瘤块, 于手动匀浆器匀浆后加入生理盐水冲洗, 200 目筛孔过滤后, 将细胞密度调整为 $5 \times 10^7/\text{ml}$ 。

1.2 药物与试剂

四君子汤由人参 (产地: 辽宁; 批号: 20120620)、白术 (产地: 安徽; 批号: 130304)、茯苓 (产地: 安徽; 批号: 130314)、甘草 (产地: 甘肃; 批号: 130103) 按 9: 9: 9: 6 组成, 白术、茯苓、甘草购自上海虹桥中药饮片公司, 人参购自陕西天士力植物药业有限责任公司。四君子汤煎煮方法: 按上述比例的药物的总量, 加入 6 倍生药体积的自来水, 浸泡 30 min, 于 200°C 恒温至沸腾, 温度调至 100°C 恒温煎煮 40 min, 倒出药液后再加入 5 倍体积的自来水同上述方法煎煮, 两煎药液混合, 旋转蒸发至黏稠状液体, 倒出药液于真空干燥箱干燥成粉末状, 干燥保存, 每 1 g 粉末相

* 通讯作者: guoc66@gmail.com, (021) 24058089

当于生药材 2.92 g。肿瘤坏死因子- α (TNF- α , 批号: DKW12-2720)、白细胞介素 6 (IL-6, 批号: DKW12-2026) ELISA 试剂盒购自达科为生物有限公司。

1.3 实验仪器

全自动生化分析仪 (日本日立公司), 酶标仪 (美国 BioTek 公司), EYEL4 旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司); DLSB-5125 低温冷却液循环泵、SHE-D 循环水式真空泵 (上海东玺制冷仪器有限公司), DZF-6050 型真空干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司)。

1.4 动物分组及给药方法

30 只 Balb/c 小鼠按照随机数字表法分为正常组、模型组、四君子汤组, 每组 10 只。参考文献 [6-7] 建立恶病质动物模型, 小鼠体重下降超过开始基线的 5% 即模型成功。模型组和四君子汤组每只小鼠于第 0 天在右侧前背部皮下注射鼠 CT26 细胞约 1×10^7 个 (含 PBS 的 0.2 ml 细胞), 正常组皮下注射 PBS 0.2 ml。自皮下种植肿瘤细胞后第 1 天开始灌胃, 模型组和正常组灌胃 0.2 ml 生理盐水, 四君子汤组灌胃 0.2 ml 药液 [剂量相当于 3.01 g/(kg·d) 药粉], 各组均灌胃 15 天。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 一般状态 于皮下种植肿瘤开始第 0、7、9、11、13、16 天称重小鼠体重, 各组小鼠第 5、7、9、11、13、16 天饮食量总量及第 11~16 天平均饮食量, 并观察精神状态等情况并记录。

1.5.2 脏器重量及瘤重 第 16 天禁食水 4 h 后眼眶取血, 颈椎处死小鼠后取小鼠肝、心、脾、肺、肾及腓肠肌、附睾脂肪、瘤体称重。

1.5.3 生化指标检测 血液标本采集后 4℃ 静置 2 h 后 3000 r/min、4℃ 离心 20 min, 移液枪吸取上清液储存于 -80℃ 待检测, 采用全自动生化分析仪检测总蛋白、白蛋白、胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、血糖。

1.5.4 血清 IL-6、TNF- α 检测 采用 ELISA 试剂盒检测, 所有操作均按照试剂盒说明书进行操作。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析, 计数资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析后, 方差齐性用 Tukey *s-b* 检测, 方差未齐用 Tamhane's 检测; 两组间的计数资料比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组小鼠一般状态的变化

正常组小鼠喂养期间毛色光润, 摄食、饮水正常, 活动状态佳, 无明显消瘦; 模型组小鼠在第 9 天左右开始毛色晦暗、倒毛, 摄食、饮水明显减少, 肿瘤生长迅速, 躯干及四肢开始消瘦, 蜷卧, 活动明显减少; 四君子汤组小鼠于第 11 天左右时开始出现模型组在第 9 天开始出现的症状, 但程度较模型组稍轻。

2.2 各组小鼠饮食总量及平均每天饮食量比较

表 1 示, 模型组小鼠在第 5 天开始饮食总量较正常组减少, 在第 11 天时饮食总量较正常组减少更加明显, 而四君子汤组在各时间点饮食总量均高于模型组。在第 11~16 天平均进食量的比较中, 四君子汤组及模型组均较正常组明显降低 ($P < 0.05$), 但四君子汤组明显高于模型组 ($P < 0.05$)。

2.3 各组小鼠不同时间体重比较

表 2 示, 第 0 天各组小鼠体重比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。模型组自第 11、13、16 天与正常组比较体重明显降低 ($P < 0.05$); 四君子汤组小鼠体重第 16 天时较正常组低, 但明显高于模型组 ($P < 0.05$)。

2.4 各组小鼠血清生化指标比较

表 3 示, 模型组第 16 天血清总蛋白、白蛋白、高密度脂蛋白、血糖较模型组降低, 甘油三酯、低密度脂蛋白升高 ($P < 0.05$); 四君子汤组与正常组比较, 血清总蛋白、白蛋白、高密度脂蛋白、血糖降低 ($P < 0.05$), 胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 模型组与四君子汤组各指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠不同时间饮食总量及平均每天饮食量 (g)

组别	鼠数	饮食总量						平均每天饮食量 ($\bar{x} \pm s$) 11~16 d
		5 d	7 d	9 d	11 d	13 d	16 d	
正常组	10	177.4	245.4	313.5	379.1	441.8	533.9	31.60 $\pm$ 2.00
模型组	10	169.2	231.6	287.8	341.5	378.1	409.6	15.75 $\pm$ 6.62*
四君子汤组	10	191.0	247.6	308.6	365.4	411.9	462.6	21.70 $\pm$ 3.61* Δ

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 各组小鼠不同时间体重比较 (mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	0 d	7 d	9 d	11 d	13 d	16 d
正常组	10	19.77 ± 0.80	20.23 ± 0.73	20.91 ± 1.14	21.41 ± 0.91	21.89 ± 1.10	22.48 ± 0.98
模型组	10	20.15 ± 0.71	20.55 ± 0.96	20.51 ± 0.97	20.51 ± 0.86*	20.50 ± 1.31*	17.31 ± 1.83*
四君子汤组	10	20.47 ± 0.93	21.35 ± 1.06	20.84 ± 1.25	21.14 ± 1.14	20.92 ± 1.41	18.88 ± 1.64* [△]

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

表 3 各组小鼠生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	正常组 (6 只)	模型组 (5 只)	四君子汤组 (5 只)
总蛋白 (g/L)	53.83 ± 1.72	46.00 ± 1.41*	43.80 ± 2.17*
白蛋白 (g/L)	34.17 ± 1.33	29.00 ± 1.00*	27.80 ± 1.30*
胆固醇 (mmol/L)	3.18 ± 0.12	4.00 ± 1.5	73.12 ± 0.20
甘油三酯 (mmol/L)	0.83 ± 0.17	4.09 ± 3.25*	2.64 ± 0.90
高密度脂蛋白 (mmol/L)	2.14 ± 0.11	1.13 ± 0.21*	1.40 ± 0.14*
低密度脂蛋白 (mmol/L)	0.16 ± 0.03	0.51 ± 0.29*	0.37 ± 0.06
血糖 (mmol/L)	5.64 ± 1.60	2.51 ± 0.15*	3.37 ± 0.74*

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$

2.5 各组小鼠瘤重、脏器重量及腓肠肌、附睾脂肪重量比较

表 4 示, 模型组、四君子汤组心、脾、腓肠肌及附睾脂肪重量较正常组明显减少 ($P < 0.05$), 而四君子汤组与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。四君子汤组和模型组瘤重比较差异亦无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 4 各组小鼠瘤重、脏器重量及腓肠肌、附睾脂肪重量比较 (mg, $\bar{x} \pm s$)

项目	正常组 (10 只)	模型组 (10 只)	四君子汤组 (10 只)
肝	989.9 ± 104.2	1022.1 ± 176.7	1118.7 ± 237.0
心	125.5 ± 22.1	86.5 ± 18.6*	97.2 ± 20.3*
脾	109.9 ± 21.3	247.8 ± 43.1*	265.6 ± 82.6*
肺	149.5 ± 57.0	127.9 ± 16.5	137.9 ± 12.8
肾	317.0 ± 61.2	283.9 ± 35.5	294.4 ± 26.4
腓肠肌	251.2 ± 30.8	178.1 ± 8.7*	198.3 ± 40.7*
附睾脂肪	435.5 ± 59.5	152.6 ± 71.4*	178.3 ± 68.9*
瘤重	—	4214.1 ± 938.9	3984.3 ± 1127.3

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$

2.6 各组小鼠血清 IL-6、TNF- α 比较

表 5 示, 模型组血清 TNF- α 较正常组明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 四君子汤组血清 TNF- α 、IL-6 明显降低 ($P < 0.05$)。

表 5 各组小鼠血清 IL-6、TNF- α 比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TNF- α	IL-6
正常组	10	28.66 ± 3.21	—
模型组	10	38.17 ± 6.54*	23.84 ± 7.67
四君子汤组	10	31.05 ± 5.86 [△]	16.33 ± 4.79 [△]

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 正常组小鼠 IL-6 水平低于本试剂盒下限, 均无数据

3 讨论

随着近现代中医对癌性恶病质的认识, 可将其归属为中医学“虚劳”、“羸瘦”、“痿证”等范畴^[8]。其病机为五脏阴阳气血虚损, 治疗上重视补脾益肾, 而对于恶病质前期及早期, 补益后天之益气健脾法有着举足轻重的作用; 四君子汤作为益气健脾代表方剂, 对于脾虚证有着较好的改善作用, 并且可以改善机体部分炎症因子^[9]。据此, 我们应用四君子汤来预防和治疗癌性恶病质, 方中人参甘温, 益气补中为君; 白术益气健脾燥湿, 合人参以益气健脾为臣, 二者相须为用, 增强了君药的健脾之效; 茯苓渗湿健脾为佐; 炙甘草甘缓和中为使; 全方共奏益气健脾之效。

在恶性肿瘤诱导的恶病质进展过程中, 多种因素参与其中, 导致了厌食及代谢异常的复杂症状, 也决定了其机制的复杂性。研究表明, 多种炎症因子参与了恶病质的发生发展, 血清 TNF- α 的增高能够激活 NF- κ B 炎症信号途径, 而 IL-6 可能单独或通过与 TNF- α 、IL-1 等细胞因子共同通过作用于溶酶体或蛋白酶体途径, 进而共同导致肌肉蛋白的降解^[10-12]。

本研究发现, 在皮下种植肿瘤的第 2 天就开始给予四君子汤, 较为明显地改善了小鼠的饮食量及精神状况, 四君子汤组饮食总量较模型组多, 且日均饮食量也较模型组改善明显; 体重变化趋势可见模型组小鼠体重第 11 天开始较正常组明显下降, 而四君子汤组小鼠体重呈增长及稳定趋势, 至第 16 天时体重较模型组升高, 说明四君子汤能够有

效延缓体重下降。实验结束时四君子汤组在改善附睾脂肪、腓肠肌、心、肺质量及生化指标、瘤重上与模型组比较差异无统计学意义；四君子汤组血清细胞因子 TNF- α 、IL-6 较模型组显著降低，说明四君子汤明显改善荷瘤小鼠恶病质所伴随的厌食等症状，从而延缓了体重下降，其机制可能是通过抑制血清 TNF- α 、IL-6 发挥作用，但尚需要更加深入的分子药理机制研究来证实其对恶病质前期及早期肌肉量和脂肪的改善作用，从而利于临床以四君子汤为基本方在癌性恶病质及前期患者中的广泛应用。

参考文献

- [1] Evans WJ, Morley JE, Argile's J, et al. Cachexia: a new definition [J]. Clin Nutr, 2008, 27(6): 793-799.
- [2] Fearon K, Strasser F, Anker SD, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus [J]. Lancet Oncol, 2011, 12(5): 489-495.
- [3] Yae S, Takahashi F, Yae T, et al. Hochuekkito (TJ-41), a Kampo Formula, Ameliorates Cachexia Induced by Colon 26 Adenocarcinoma in Mice [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012; 976926.
- [4] 金军. 益气健脾法治疗癌症恶病质临床观察 [J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(11): 80-81.
- [5] 张蕴超, 贾英杰, 杨佩颖, 等. 消岩汤对肺癌恶病质小鼠肿瘤生长的影响 [J]. 中医杂志, 2013, 54(6): 509-511.
- [6] Tanaka Y, Eda H, Tanaka T, et al. Experimental cancer cachexia Induced by transplantable colon 26 adenocarcinoma in mice [J]. Cancer Res, 1990, 50(8): 2290-2295.
- [7] 陈思曾, 肖建东, 黄仲阳. C26 腺癌恶病质动物模型的自然发展过程 [J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(7): 1331-1334.
- [8] 刘超, 王志宏, 季旭明, 等. 基于中医传承辅助系统的治疗虚劳方剂组方规律分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17): 1-4.
- [9] 赵宁, 贾红伟, 张皖东, 等. 利血平所致脾虚大鼠脾阳虚证和脾气虚证的症候属性 [J]. 中医杂志, 2008, 49(5): 449-452.
- [10] Tisdale MJ. Mechanisms of cancer cachexia [J]. Physiol Rev, 2009, 89(2): 381-410.
- [11] Fearon KC, Glass DJ, Guttridge DC, et al. Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways [J]. Cell Metab, 2012, 16(2): 153-166.
- [12] Yeh SS, Blackwood K, Schuster MW, et al. The cytokine basis of cachexia and its treatment: are they ready for prime time? [J]. J Am Med Dir Assoc, 2008, 9(4): 219-236.

Effect of *Sijunzi Decoction* on Cancer Cachexia in Colon Adenocarcinoma-Bearing Mice

LI Bin^{1, 2}, WAN Lili², LI Yan², YANG Quanjun², YU Qi², GUO Cheng^{1, 2}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203; 2. The Sixth Affiliated People's Hospital, Shanghai Jiaotong University)

ABSTRACT Objective To study the effect of *Sijunzi Decoction* (四君子汤) on cancer cachexia in colon adenocarcinoma-bearing mice and its possible mechanism. **Methods** Thirty Balb/c mice were randomized into the normal group, model group and *Sijunzi Decoction* group, with 10 in each. The model group and *Sijunzi Decoction* group were subcutaneously injected with 1×10^7 CT26 cells. The model group and normal group were gavaged with 0. 2 ml of normal saline. The *Sijunzi Decoction* group was gavaged with 0. 2 ml of *Sijunzi Decoction* (equivalent to 3. 01 g/kg • d powder). The intragastric administration lasted for 15 days. The weight, total food intake and average daily food intake of mice were recorded. The mice were sacrificed 16 days later. The organ weight, tumor weight as well as the levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were compared. **Results** Comparing with the normal group and *Sijunzi Decoction* group, the total food intake was decreased in the model group on the 5th day and was significantly decreased from the 11th to 16th day ($P < 0. 05$). The weight of mice in *Sijunzi Decoction* group was significantly lower than that in the normal group but higher than that in the model group ($P < 0. 05$). There was no significant difference between the model group and *Sijunzi Decoction* group in the organ weight, tumor weight and biochemical indicators ($P > 0. 05$). Comparing with the model group, the levels of TNF- α and IL-6 were significantly decreased in *Sijunzi Decoction* group ($P < 0. 05$). **Conclusion** *Sijunzi Decoction* can effectively relieve the symptoms and increase weight of colon adenocarcinoma-bearing mice, which may be relevant to inhibiting TNF- α and IL-6.

Keywords *Sijunzi Decoction*; colon adenocarcinoma; cachexia; weight; food intake; inflammatory cytokines

(收稿日期: 2013-10-24; 修回日期: 2014-02-11)

[编辑: 邓媛]