

# 养阴清热理气方及其拆方对食管癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用

司 富 春

(河南中医学院中医药分子生物学实验室, 河南省郑州市金水路 1 号, 450008)

**[摘 要]** **目的** 研究养阴清热理气方及其养阴、清热、理气 3 个拆方对食管癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用。 **方法** 将 57 只 BALB/c 雌性裸鼠随机分为模型组、全方组、清热组、理气组、养阴组各 10 只, 空白组 7 只, 用人食管癌细胞株 EC<sub>9706</sub> 细胞植入裸鼠右胁皮下制造荷瘤裸鼠模型, 造模后第 2 天开始灌胃, 各用药组分别给予养阴清热理气方及其拆方, 每日 1 次, 共 90d。观察各组裸鼠饮水量、体重及移植瘤体积的变化; 实验结束后称量各组移植瘤重量并计算抑瘤率。 **结果** 各用药组与模型组比较均可增强荷瘤裸鼠精神和活动状态, 增加体重 ( $P < 0.01$ ), 全方组、清热组和养阴组还可提高动物食量 ( $P < 0.05$ )。各用药组对裸鼠皮下移植瘤生长均有不同的抑制作用, 瘤体体积、重量与模型组比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。各组抑瘤率依次为全方组 > 养阴组 > 清热组 > 理气组, 全方组、养阴组抑瘤率与清热组、理气组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 养阴清热理气方及其拆方具有改善荷瘤裸鼠生存状态和抑制肿瘤生长的作用。

**[关键词]** 养阴清热理气方; 食管癌; 荷瘤裸鼠

## Inhibition of Yangyin Qingre Liqi Formula and Its Constituents on Tumor Growth of Esophageal Carcinoma Transplanted in Nude Mice

SI Fuchun

(Laboratory of Molecular Biology on Chinese Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008)

**ABSTRACT** **Objective** To study the effect of Yangyin Qingre Liqi Formula (Formula for nourishing yin, clearing heat and regulating qi) and its 3 constituents on tumor growth of esophageal carcinoma cells transplanted in nude mice. **Methods** Totally 57 BALB/c female nude mice were randomized into model group, whole formula group, clearing heat group, regulating qi group and nourishing yin group, 10 mice in each, and blank group of 7 mice. The human esophageal carcinoma EC<sub>9706</sub> cells were transplanted in nude mice to make models. On the second day, gastric perfusion was given with the ethanol extract diluent of whole formula and its constituents to nourish yin, clear heat, and regulate qi respectively to the medicinal groups, once per day, totally 90 days. The quantity of food intake, body weight, and tumor size were observed. The tumor weight of all groups was measured after the experiment for calculating the tumor inhibitory rate. **Results** In all medicinal groups, the general life condition such as spirit and activities of the nude mice was improved and body weight increased, compared with the model group ( $P < 0.01$ ). In whole formula group, clearing heat group and nourishing yin group, the quantity of food intake was also increased ( $P < 0.05$ ). The tumor growth was inhibited in all medicinal groups with a significant difference in tumor size and weight, compared with the model group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The tumor inhibitory rate was in an order of whole formula group > nourishing yin group > clearing heat group > regulating qi group. The difference in tumor inhibitory rate of whole formula group and nourishing yin group was significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Yangyin Qingre Liqi Formula and its separated constituents improve the general life conditions and inhibit the growth of esophageal carcinoma in nude mice.

**Key Words** Yangyin Qingre Liqi Formula (Formula for nourishing yin, clearing heat and regulating qi); Esophageal carcinoma; Tumor transplanted nude mice

养阴清热理气方是我们通过药物筛选研制出的治疗食管癌的方剂。为了进一步研究该方在体内的作用, 本研究运用裸鼠荷瘤动物模型, 对其全方和 3 个拆方影响肿瘤生长和荷瘤鼠生存状态的作用进行了观察,

现报告如下。

### 1 材料

#### 1.1 动物

BALB/c (nu/nu) 雌性裸鼠, 5 周龄, 购自中国科学院上海实验动物中心上海斯莱克实验动物有限公司。实验动物质量合格证号: 0006939, 许可证号: SCXK(沪) 2003-0003。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30374116, 30873320) 国家  
回国留学人员基金优秀项目 [国人厅发 (2007) 170 号]

通讯作者: 司富春, sifc2000@hotmail.com, (0371) 65680049

1.2 药物

实验所用药物均购于河南中医学院第三附属医院。分为全方组(方含当归、女贞子、重楼、天花粉、旋覆花、八月札)、养阴组(方含当归、女贞子)、清热组(方含重楼、天花粉)、理气组(方含旋覆花、八月札)。单味药每人每天常用剂量分别为:当归 15g,女贞子 15g,重楼 10g,天花粉 15g,旋覆花 10g,八月札 15g,参考文献[1]换算出小鼠日给药剂量分别为:当归 1.95g,女贞子 1.95g,重楼 1.30g,天花粉 1.95g,旋覆花 1.30g,八月札 1.95g。以上中药饮片,各取 300g,加入无水乙醇 1500ml 浸泡 1 周后,过滤药液,用旋转蒸发仪浓缩药液,真空干燥,称量提取物,用超纯水溶解药物调至所需浓度。

1.3 细胞株

人食管癌细胞株 EC9706 由北京协和医科大学肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室惠赠。

1.4 主要试剂与仪器

RPMI 1640 培养基、青链霉素混合液(GIBCO 公司),胎牛血清(Hyclone 公司),胰蛋白酶(华美公司),MTT(Sigma 公司),二甲基亚砜(DMSO,分析纯,Amresco 公司);Heraeus 细胞培养箱(德国 Kendro 公司),倒置显微镜(Zeiss 公司),SG-603 生物安全柜(Bake 公司),ELX-800 型酶标仪(BIO-TEK 公司),游标卡尺(上海量具刀厂),BCM-1000A 型生物洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

EC9706 细胞以含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液在 5%CO<sub>2</sub>、37℃ 培养箱中培养,每间隔 48h 更换 1 次培养基,待细胞生长至 70%汇合率时,用胰蛋白酶溶液[用 D-Hans 液配制,含 0.25%胰蛋白酶、0.02% 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na),pH8.3]消化,用于裸鼠移植瘤接种。

2.2 裸鼠饲养

参照文献[2]改进裸鼠饲养方法,把裸鼠饲养于洁净工作台内,饲养房间 2 次/周紫外线照射,出入人员更换洁净工作衣。裸鼠食物、垫料进行湿热消毒后烘干使用,饮用水用盐酸调至 pH 值 3~4,定期喂养消毒后的黄豆。严格无菌操作。

2.3 造模方法及分组

收集对数期生长细胞,1000r/min 离心,无血清 RPMI 1640 培养基洗涤 2 次,细胞计数,调细胞浓度至 5×10<sup>6</sup> 细胞/ml,以 0.2ml/鼠右腋下接种。57 只裸鼠按照随机数字表取 7 只作为空白组,其余 50 只造模。

造模裸鼠按随机数字表分为模型组、全方组、养阴组、清热组、理气组,每组 10 只。用药组自造模后第 2 天开始灌胃饲药,每日 1 次,每只 0.2ml。

2.4 观察指标及方法

自造模后第 2 天开始,每 3 天测量各组裸鼠饮食饮水量(喂养黄豆量及灌胃剂量分别纳入饮食饮水量中),每 10 天称体重。自肿瘤长出之日起,每 10 天用游标卡尺测量肿瘤的最长径 L(mm)和垂直方向的最大横径 W(mm),按李永琦等的方法<sup>[3]</sup> $[V(mm^3) = L \times W^2/2]$ 计算肿瘤体积。90 天后脱颈椎处死裸鼠,剥离瘤块,称肿瘤重量并计算抑瘤率。抑瘤率(%)=(1-给药组平均瘤重/对照组平均瘤重)×100%。

2.5 统计学方法

应用 SPSS13.0 软件统计数据,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,分析方法分别采用重复测量方差分析、配对 *t* 检验、单因素方差分析和曲线拟合。

3 结果

3.1 养阴清热理气方及其拆方对荷瘤裸鼠一般情况的影响

整个实验过程各组动物都未出现死亡。模型组皮肤颜色枯槁无光泽,消瘦,精神萎靡,弓背,余各组一般情况无太大差别,动物活动灵敏度由高到低依次为:全方组=空白组>理气组>清热组>养阴组>模型组。

3.2 养阴清热理气方及其拆方对荷瘤裸鼠饮食饮水量的影响

表 1 示,荷瘤裸鼠各组饮水量和食量均明显低于空白组( $P<0.01$ );全方组、清热组和养阴组可提高动物食量,与模型组比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),但各组对饮水量提高不明显,仅养阴组较模型组有所提高( $P<0.05$ )。

表 1 各组裸鼠平均饮水量和食量比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 饮水量(ml)      | 食量(g)         |
|-----|--------------|---------------|
| 空白组 | 30.60±9.58   | 19.35±6.67    |
| 模型组 | 19.12±6.77▲  | 12.11±3.29▲   |
| 养阴组 | 21.22±5.72▲△ | 14.36±3.43▲△  |
| 理气组 | 19.19±6.67▲★ | 13.19±3.63▲   |
| 清热组 | 19.66±5.40▲  | 13.59±3.44▲△  |
| 全方组 | 19.56±5.36▲  | 14.10±3.11▲△◆ |

注:与空白组比较,▲ $P<0.01$ ;与模型组比较,△ $P<0.05$ ;与养阴组比较,★ $P<0.05$ ;与理气组比较,◆ $P<0.01$

3.3 养阴清热理气方及其拆方对荷瘤裸鼠体重的影响

表 2 示,20 日之前各组小鼠体重接近,之后模型组体重随着时间增加而逐渐减轻,而各用药组缓慢增

表 2 各组裸鼠各时间点体重变化比较(g,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 鼠数 | 20d        | 30d        | 50d        | 70d        | 90d         |
|-----|----|------------|------------|------------|------------|-------------|
| 空白组 | 7  | 19.90±0.65 | 19.12±1.16 | 20.61±0.75 | 20.65±2.08 | 20.86±2.25△ |
| 模型组 | 10 | 20.23±1.06 | 19.28±1.50 | 17.46±1.23 | 16.67±1.17 | 16.65±1.19  |
| 清热组 | 10 | 19.77±0.47 | 21.31±2.22 | 22.12±0.44 | 22.52±0.78 | 22.74±0.87△ |
| 理气组 | 10 | 18.36±1.65 | 18.35±1.17 | 18.90±1.89 | 19.40±2.88 | 19.67±2.96△ |
| 养阴组 | 10 | 20.00±0.36 | 20.50±0.33 | 20.84±0.41 | 20.46±1.27 | 20.59±1.28△ |
| 全方组 | 10 | 19.16±1.57 | 19.88±1.15 | 20.76±1.34 | 22.06±1.97 | 22.42±1.63△ |

注:与模型组比较,△ $P<0.01$

表 3 各组裸鼠各时间点皮下移植瘤体积变化比较(mm<sup>3</sup>,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 鼠数 | 20d           | 30d            | 50d             | 70d             | 90d               |
|-----|----|---------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| 模型组 | 10 | 589.71±186.02 | 1241.38±893.10 | 2577.84±964.09  | 3467.31±1090.05 | 3621.31±1138.44   |
| 清热组 | 10 | 457.94±171.78 | 636.14±217.92  | 2100.57±677.98  | 2187.93±655.96  | 2196.20±649.75▲   |
| 理气组 | 10 | 536.58±290.87 | 955.62±660.93  | 1931.36±1099.44 | 2635.77±1292.71 | 2739.80±1341.27▲  |
| 养阴组 | 10 | 548.37±245.05 | 1095.94±673.52 | 2199.35±994.00  | 2119.34±1093.74 | 2201.39±1133.99▲▲ |
| 全方组 | 10 | 664.52±331.87 | 906.74±363.67  | 1727.49±527.89  | 1968.98±722.49  | 2041.64±707.35▲▲* |

注:与模型组比较,▲ $P<0.05$ ,▲▲ $P<0.01$ ;与养阴组比较,\* $P<0.05$

加,以全方组作用最强。结果运用重复测量方差分析,本组数据符合球形检验( $P=0.250$ ),所取各时间点因素交互作用有统计学差异( $P=0.002$ ),各组与模型组比较差异均有统计学意义( $P<0.01$ ),其余各组之间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

3.4 养阴清热理气方及其拆方对荷瘤裸鼠移植瘤体积及重量的影响

3.4.1 各组裸鼠各时间点皮下移植瘤体积变化比较

表 3 示,养阴清热理气方及其拆方对裸鼠皮下移植瘤生长均有不同的抑制作用,其作用强度依次为:全方组>养阴组>清热组>理气组,全方组与养阴组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。所得结果使用重复测量方差分析,本组数据符合球形检验( $P=0.250$ ),所取各时间点因素交互作用有统计学差异( $P<0.01$ ),各组与模型组比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。

3.4.2 各组肿瘤体积与时间的关系

各组肿瘤体积与时间的曲线估计结果显示,二者呈二次相关或对数相关,各组拟合曲线方程分别为模型组: $y = -0.557x^2 + 107.181x - 1429.947$ ,  $F = 328.286$ ,  $Rsq = 0.992$ ,  $P = 0.000$ ;清热组: $y = -0.634x^2 + 96.23x - 1379.0$ ,  $F45.40$ ,  $Rsq = 0.948$ ,  $P = 0.001$ ;理气组: $y = -0.464x^2 + 84.890x - 1028.989$ ,  $F = 202.283$ ,  $Rsq = 0.988$ ,  $P = 0.000$ ;养阴组: $y = -0.566x^2 + 84.527x - 900.831$ ,  $F = 54.069$ ,  $Rsq = 0.956$ ,  $P = 0.000$ ;全方组: $y = -0.337x^2 + 57.73x - 424.78$ ,  $F = 158.82$ ,  $Rsq = 0.985$ ,  $P = 0.000$ 。第 20 天各组肿瘤体积分别为模型组 589.71mm<sup>3</sup>、清热组 457.94mm<sup>3</sup>、理气组 536.58mm<sup>3</sup>、养阴组 548.37mm<sup>3</sup>、全方组 664.52mm<sup>3</sup>。

随时间的增加,模型组肿瘤生长迅速,用药各组肿瘤与模型组相比生长缓慢,清热组和养阴组增长速度相近,理气组肿瘤生长速度比清热组和养阴组稍快,全方组肿瘤生长明显慢于其他各组,肿瘤体积在各时间点最小,至 70 天各组肿瘤体积分别为模型组 3467.31mm<sup>3</sup>、清热组 2187.93mm<sup>3</sup>、理气组 2635.77mm<sup>3</sup>、养阴组 2119.34mm<sup>3</sup>、全方组 1968.98mm<sup>3</sup>。70 天后,模型组肿瘤生长减慢,但增长速度和体积仍明显高于各用药组;清热组和养阴组生长曲线达到平台;理气组肿瘤缓慢生长;全方组肿瘤生长基本停滞。

3.4.3 养阴清热理气方及拆方对裸鼠皮下移植瘤重量的影响

表 4 示,各组抑瘤率依次为全方组>养阴组>清热组>理气组,全方组、养阴组抑瘤率与清热组、理气组差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与模型组移植瘤重量比较,其他各组均有统计学差异( $P<0.05$ );与全方组和养阴组移植瘤重量比较,理气组与清热组均有统计学差异( $P<0.05$ ),全方组和养阴组比较无统计学差异( $P>0.05$ )。

表 4 各组裸鼠皮下移植瘤重量及抑瘤率比较

| 组别  | 鼠数 | 移植瘤重量(mg, $\bar{x} \pm s$ ) | 抑瘤率(%)  |
|-----|----|-----------------------------|---------|
| 模型组 | 10 | 3.098±0.523△▲               | —       |
| 养阴组 | 10 | 1.651±0.628*                | 46.71△▲ |
| 清热组 | 10 | 2.266±0.618*△▲              | 26.86   |
| 理气组 | 10 | 2.341±0.761*△▲              | 24.44   |
| 全方组 | 10 | 1.422±0.466*                | 54.11△▲ |

注:与模型组比较,\* $P<0.05$ ;与全方组比较,△ $P<0.05$ ;与养阴组比较,▲ $P<0.05$

4 讨论

我国是食管癌发病率和病死率最高的国家,河南

省林州、辉县等地食管癌发病率高达 478/10 万,中晚期食管癌患者五年生存率仅 10%左右,目前临床上诊断出的食管癌患者中 80%左右均为中晚期<sup>[1]</sup>。因此,寻找食管癌治疗方法和药物仍是当今医学急需解决的问题。食管癌属中医学“噎膈”范畴,两千多年来,中医学积累了大量的治疗食管癌方药,为高效安全的食管癌药物研制打下了基础<sup>[5,6]</sup>。养阴清热理气方是通过古今治疗食管癌方药统计分析,运用人食管癌细胞株 EC9706 细胞从 221 种中药中筛选出抑制细胞生长作用最强的药物,再通过正交试验优选出最佳配伍而组成的方剂。本研究通过体内肿瘤实验表明养阴清热理气方及其拆方抑制肿瘤生长、改善荷瘤裸鼠生存状态的作用,显示出中医配伍组方的疗效优势。

肿瘤是一种全身消耗性疾病,严重影响到动物的生存状态。本研究显示,移植瘤裸鼠各组饮食饮水、活动度以及精神状态方面均低于空白组,特别是模型组动物,体重明显下降,说明移植瘤对机体有极大的损伤,“邪之所凑,其气必虚”,肿瘤毒性导致小鼠各种机能下降。而本研究结果显示,养阴清热理气方及其拆方各组动物精神状态均优于模型组,体重也比模型组有所增加;其中养阴组饮水量明显多于模型组,全方组和清热组食量也多于模型组,说明该方可以改善荷瘤裸鼠的生存状态,其中养阴组和全方组效果最好,清热组次之,理气组最差。

从养阴清热理气方及其拆方各组对肿瘤的体积和重量的影响来看,用药各组对裸鼠肿瘤具有不同程度的抑制作用。本研究结果显示,模型组肿瘤生长迅速,70 天后生长虽渐渐减慢,但体积不断增长,增长速度和体积明显比各用药组大。用药各组与模型相比肿瘤生长缓慢,清热组和养阴组增长速度相近,两者 70 天后曲线达到平台,说明 70 天后肿瘤基本停止生长,甚至有缩小的趋势;理气组肿瘤生长速度比清热和养阴组稍大,70 天后肿瘤仍有缓慢生长;全方组肿瘤生长明显慢于其他各组,肿瘤体积在各时间点最小,70 天基本处于生长停滞阶段。由此可以看出全方组的抑制肿瘤生长效果优于其各拆方组。各组肿瘤重量也证明了这一点。

“凡噎膈证不出胃脘干槁四字。”<sup>[7]</sup>由此可知,阴虚是食道癌发生发展的重要病机,特别是食道癌后期,由于肿瘤热毒对机体阴血的消耗,又不能通过饮食及时补充,阴血亏虚更加严重,并成为肿瘤后期的主要矛盾。阴血亏虚,血脉失润涩滞,可导致气血不通。同时,气机失调也是癌肿发生机制之一,肿瘤形成后气机阻滞更为明显,因其为有形之邪,可以进一步阻碍气血流

通;气机郁滞日久,又可化热成毒,灼伤阴血,如此气滞、热毒、阴血亏虚成为恶性循环,病程不断进展。养阴清热理气方着眼于阴虚、热毒、气机失调之病机,采用养阴清热理气组方,调整脏腑功能,祛除病理产物,缩小癌肿。本研究表明,虽然养阴组和清热组无论在改善动物生存状态还是抑制肿瘤生长方面都非常明显,也证明了肿瘤发展过程中阴虚和热毒是其关键病机,但如果多种治疗方法联合应用,如本研究中养阴、清热、理气联合,效果则好于单一治法。

## 参考文献

- [1]施新晋.医用实验动物学[M].西安:陕西科学技术出版社,1989:422.
- [2]李一琴,胡萍灵,甘润良,等.超净空气层流架饲养 BALB/c 系裸鼠初探[J].衡阳医学院学报,1999,22(2):170-172.
- [3]李永琦,许才斌,黄裕新,等.复方中药 CCM-T13 抗胃癌 SGC-901 细胞作用机制[J].第四军医大学学报,2001,22(9):831-834.
- [4]王立东.河南食管癌研究的理解与思考[J].郑州大学学报(医学版),2006,41(1):1-5.
- [5]司富春,陈玉龙.古方治疗噎膈用药分析[J].山东中医杂志,2004,23(7):385-387.
- [6]陈玉龙,司富春.中医药治疗食道癌方药分析[J].时珍国医国药,2008,19(2):401-402.
- [7]程钟龄.医学心悟[M].北京:科学技术文献出版社,2003:138.

(收稿日期:2009-07-08;修回日期:2009-08-19)

[编辑:崔京艳]

## 第三届中医、中西医结合暨非药物治疗防治心脑血管病、肿瘤、糖尿病高级论坛通知

由中国人健康科技促进会、中国人健康科技促进会医药科技专业委员会、《世界中医药》杂志社联合主办,北京华盛国际医药信息中心承办的此次论坛拟于 2009 年 12 月中旬在福建省福州市举办。

1. 会议内容。(1) 中医药、中西医结合治疗心脑血管病的理论研究、临床经验、新疗法、新进展及实验研究;(2) 针灸推拿等非药物治疗防治心脑血管病的体会;(3) 中医、中西医结合治疗糖尿病的理论研究及临床进展;(4) 中医药、中西医结合治疗肿瘤的基础及临床研究;(5) 中医、中西医结合抗肿瘤的理论及临床探讨;(6) 名老中医经验和民间中医验方防治心脑血管病、肿瘤、糖尿病经验总结;(7) 抗肿瘤中药的研究与开发;(8) 肿瘤止痛及晚期肿瘤患者生存质量与养生方法研究;(9) 中医非药物治疗法的基础研究、理论研究;(14) 针灸临床经验总结;(10) 推拿按摩及其他疗法的临床运用;(11) 中风后遗症的中医特色治疗经验;(12) 老年痴呆症、顽固性失眠、血管性头痛的论治精神及特色疗法;(13) 名老中医临床经验总结;(14) 临床应用经方、成方、验方的体会;(15) 中医养生保健、食疗方法介绍及理论研究;(16) 复方制剂的开发与研究。录用论文的第一、第二作者,分别授予国家Ⅱ类继续教育学分,并邀请参加会议,入选论文将安排在大会交流,参加会议者颁发证书并授予国家Ⅰ类继续教育学分。无论文者也欢迎参加会议。

会议联系地址:北京市朝阳区小营路 59 号财富嘉园 302 室《世界中医药》杂志社,邮政编码:100101,电话:(010) 58239055,传真:(010) 58239066, E-mail: wfcms2006zss@163.com,联系人:王炳岐、赵和爱、徐晖。