

丹参注射液联合 5-氟尿嘧啶对小鼠 Lewis 肺癌细胞凋亡的影响

冯俭¹ 谢萍^{1*} 秦银花² 孙川² 张煜华²
张梦云² 杨张婧² 莫小宇² 王倩² 余晓颖²

(1. 成都中医药大学附属医院, 四川省成都市金牛区十二桥路 39 号, 610072; 2. 成都中医药大学)

基金项目: 四川省科技厅应用技术研究与开发项目(2008JY0008)

* 通讯作者: fxp2410@126.com, 18981885625

[摘要] **目的** 探讨丹参注射液联合 5-氟尿嘧啶(5-Fu)对小鼠 Lewis 肺癌细胞凋亡的作用。 **方法** 将 60 只 Lewis 肺癌荷瘤 C57BL/6 小鼠随机分为模型组、丹参高、低剂量组(丹高组、丹低组)、5-Fu 组、丹参高、低剂量联合 5-Fu 组(丹低+5-Fu 组、丹高+5-Fu 组), 每组 10 只。各组于接种第 2 日起每天腹腔注射给药 0.2ml/只, 5-Fu 组连续给药 5 天, 联合组先给 5-Fu 及丹参注射液混合液 5 天, 后继续给予丹参注射液 5 天。其余各组均连续给药 10 天。末次给药 24h 后摘眼球取血再脱颈椎处死, 观察血常规、瘤体重量、肺癌细胞凋亡指数、主要脏器转移灶数目及病理改变。 **结果** 丹参低剂量组和丹参高剂量组瘤体重量较模型组降低($P<0.05$), 5-Fu 组、丹参低剂量+5-Fu、高剂量+5-Fu 组较模型组瘤体重量明显减轻($P<0.01$)。丹参高剂量组、5-Fu 组、丹参低剂量+5-Fu 组及丹参高剂量+5-Fu 组瘤体细胞凋亡指数与模型组比均增高($P<0.05$)。 **结论** 丹参注射液能够增强 5-Fu 对肿瘤的抑制, 有增强小鼠 Lewis 肺癌细胞凋亡作用的趋势。

[关键词] 丹参注射液; 5-氟尿嘧啶; 抑瘤率; 细胞凋亡

Study on Salviae Miltiorrhizae Injection in Combination with 5-Fu for the Apoptosis of Lewis Lung Tumor Mice

FENG Jian¹, XIE Ping¹, QIN Yinhua², SUN Chuan², ZHANG Yuhua², ZHANG Mengyun², YANG Zhangjing², MO Xiaoyu², WANG Qian², YU Xiaoying²

(1. The Affiliated Hospital of Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu 610072; 2. Chengdu University of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Danshen (*Radix Salviae Miltiorrhizae*) Injection used together with 5-fluorouracil (5-Fu) on the apoptosis of Lewis lung tumor mice. **Methods** Sixty C57BL/6 mice with Lewis lung tumors were randomized into model control group, Danshen high-dose group and low-dose group, 5-Fu group, Danshen high-dose with 5-Fu group, and Danshen low-dose with 5-Fu group, with 10 in each. All mice were intraperitoneally injected 0.2ml everyday from the second day of inoculation. The 5-Fu group was injected for 5 days in succession, the united 5-Fu groups were given the mixture of 5-Fu and Danshen injection first for 5 days and then Danshen injection in continuation for 5 days, and the other groups were all given medicine for 10 days in succession. Twenty-four hours after the last administration, the eyeballs of mice were removed for collecting the orbital blood, and then were sacrificed. The routine blood test, weight of tumors, apoptosis index, the number of main organ metastases and the pathological changes were observed. **Results** Compared with the model control group, the weight of tumors of the Danshen low-dose group and high-dose group was decreased ($P<0.05$), the weight of tumors of the 5-Fu group, the Danshen low-dose with 5-Fu group and Danshen high-dose with 5-Fu group were significantly decreased ($P<0.01$); apoptosis index of tumor cells of the Danshen high-dose group, 5-Fu group, Danshen low-dose with 5-Fu group, and Danshen high-dose with 5-Fu group were all increased ($P<0.05$). **Conclusion** Danshen Injection is effective in enhancing the inhibition of 5-Fu for tumor and promoting the apoptosis of Lewis lung tumor mice.

Keywords Danshen (*Radix Salviae Miltiorrhizae*) Injection; 5-fluorouracil (5-Fu); tumor inhibition rate; apoptosis

化疗药物的非针对性治疗及肿瘤的耐药性(MDR)常导致化疗的失败, 并产生严重的毒副反应^[1-2]。中药丹参具有活血化瘀和抗肿瘤作用, 临床上也有丹参配合化疗达到增效减副作用的报道^[3], 本研究通过丹参注射液联合 5-氟尿嘧啶(5-Fu)对 Lewis 肺癌小鼠进行实验, 观察其对细胞凋

亡和对化疗的增效减副作用的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

C57BL/6 近交系小鼠 60 只, 雌性, 3 级, 体重 16~18g, 购于四川大学动物研究中心, 实验动物许可证号: SCXK(川)-09-2006, 饲养于成都中医药大学

学病理生理实验室;Lewis 肺癌瘤株(LLC)来自美国典型物培养中心,由四川大学华西医学院基础药理室经 C57BL/6 小鼠体内传代保种。

1.2 仪器

日本 MEK-6318K 全自动血细胞分析仪,德国 EG1160 全自动石蜡包埋机, RM2165 石蜡切片机。

1.3 药物

5-Fu 注射液,规格 10ml/支,天津金耀氨基酸有限公司,批号:0812291;丹参注射液,规格 10ml/支(丹参素含量 0.067mg/ml),四川三精升和制药有限公司,批号:080835。

1.4 模型建立

取传代 14 天的 Lewis 肺癌瘤源小鼠颈脱臼处死,剥取瘤组织,用生理盐水稀释,0.4%台盼蓝计数,细胞活力大于 95%调整细胞浓度为 1×10^7 /ml,制成瘤细胞悬液。C57BL/6 小鼠常规消毒,沿小鼠右下肢皮下注射瘤细胞悬液 0.2ml。

1.5 分组及给药

于接种第 2 天,将 60 只小鼠按随机数字表法分成模型组、丹参低剂量组(丹低组)、丹参高剂量组(丹高组)、5-Fu 组、丹参低剂量+5-Fu 组(丹低+5-Fu 组)、丹参高剂量+5-Fu 组(丹高+5-Fu 组),每组 10 只。丹参注射液低、高剂量分别按小鼠体重 20、60ml/kg 给药,5-Fu 注射液按小鼠体重 25ml/kg 给药,并用生理盐水调节容量,配制成每只小鼠 0.2ml 进行腹腔注射,模型组给予等量生理盐水腹腔注射。各组均于造模次日给药,其中,5-Fu 组连续给药 5 天,丹低+5-Fu 组、丹高+5-Fu 组先给予 5-Fu 及丹参注射液混合液 5 天,后继续给予丹参注射液 5 天,其余各组均连续给予丹参注射液 10 天。

1.6 血常规检测

在末次给药 24h 后,小鼠摘眼球取血,用全自动血细胞分析仪测定血液中白细胞计数(WBC)、红细胞计数(RBC)、血红蛋白含量(HGB)及血小板计数(PLT)。

1.7 小鼠抑瘤率

小鼠取血后随即断颈处死,剥取肿瘤并精确测定肿瘤重量,计算抑瘤率。抑瘤率=(模型组肿瘤平均重量-实验组肿瘤平均重量)/模型组肿瘤平均重量 $\times 100\%$ 。

1.8 小鼠 Lewis 细胞凋亡及肿瘤转移灶数

剥取小鼠心、肝、脾、肺、肾,常规石蜡包埋,采用 TUNEL 法检测各组肿瘤细胞凋亡的情况。经荧光显微镜观察,发蓝色荧光为阳性细胞,即凋亡细胞,随机计数 5 个以上高倍视野($400\times$)不少于 1000 个细胞,用 Image-Pro Plus 软件分析阳性细胞数及总细胞数并计算细胞凋亡指数(AI);HE 染色石蜡包埋组织,在光镜下作病理组织学检查,观察脏器肿瘤转移灶数目及病理改变情况。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据统计,计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间均数差异性比较采用单因素方差分析、非参数检验。

2 结果

2.1 各组小鼠血常规比较

表 1 示,治疗后 5-Fu 组、丹低+5-Fu 组及丹高+5-Fu 组小鼠 WBC 较模型组降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。丹低+5-Fu 组较 5-Fu 组有增加 RBC、HGB 含量的趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。5-Fu 组、丹低+5-Fu 组 PLT 较模型组有显著升高($P<0.01$),且丹低+5-Fu 组及丹高+5-Fu 组与 5-Fu 组比较有减少 PLT 的趋势。

2.2 各组小鼠肿瘤重量、抑瘤率比较

表 2 示,5-Fu 组、丹低+5-Fu 组和丹高+5-Fu 组较模型组瘤体重量明显减轻($P<0.01$),抑瘤率分别为 54.06%、58.99%、62.88%。5-Fu 组、丹低+5-Fu 组和丹高+5-Fu 组组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),而丹低+5-Fu 组和丹高+5-Fu 组较 5-Fu 组相比有降低瘤体重量的趋势,与 5-Fu 组相比丹低+5-Fu 组和丹高+5-Fu 组抑瘤率分别增

表 1 各组小鼠血常规比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	WBC($\times 10^9$ /L)	RBC($\times 10^{12}$ /L)	HGB(g/L)	PLT($\times 10^9$ /L)
模型组	10	8.80 $\pm$ 1.35	7.25 $\pm$ 1.62	90.10 $\pm$ 18.56	145.20 $\pm$ 54.40
丹低组	10	7.34 $\pm$ 2.11	8.70 $\pm$ 1.03	103.90 $\pm$ 9.63	133.60 $\pm$ 55.45
丹高组	10	5.97 $\pm$ 1.83*	8.93 $\pm$ 2.34	105.90 $\pm$ 27.32	175.90 $\pm$ 31.02
5-Fu 组	10	3.69 $\pm$ 2.87**	5.68 $\pm$ 1.82	66.90 $\pm$ 20.47	434.40 $\pm$ 54.35**
丹低+5-Fu 组	10	2.44 $\pm$ 1.32**	6.33 $\pm$ 1.26	77.10 $\pm$ 15.32	419.80 $\pm$ 115.81**
丹高+5-Fu 组	10	2.09 $\pm$ 1.65**	5.57 $\pm$ 3.67	66.50 $\pm$ 44.63	346.10 $\pm$ 192.13

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

加了 10.73%、19.21%。

计算 Q 值并判断两药的联合效应^[4], $Q = E(A+B) / [EA + (1-EA) \times EB]$ 。其中, $E(A+B)$ 为两药合用的抑制率, EA 、 EB 为两药单用的抑制率。Q 在 0.85~1.15 之间表示两药作用相加, $Q > 1.15$ 表示两药作用协同, $Q < 0.85$ 表示两药作用相互拮抗。丹低+5-Fu 组的 Q 为 0.93; 丹高+5-Fu 组的 Q 为 0.92。

2.3 各组小鼠 AI 比较

表 2 示, 丹高组 AI 较模型组增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。5-Fu 组、丹低+5-Fu 组及丹高+5-Fu 组与模型组相比凋亡指数明显增高 ($P < 0.01$)。5-Fu 组、丹低+5-Fu 组及丹高+5-Fu 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但丹低+5-Fu 组较 5-Fu 组 AI 有增加的趋势。

表 2 各组小鼠瘤体重量、抑瘤率及 AI 比较

分组	鼠数	瘤体重量 (g, $\bar{x} \pm s$)	抑瘤率 (%) (与模型 组比较)	抑瘤率 (%) (与 5-Fu 组比较)	AI 值 (%, $\bar{x} \pm s$)
模型组	10	1.99±0.56	0		2.56±2.32
丹低组	10	1.57±0.59*	21.02		3.06±2.17
丹高组	10	1.38±0.54*	30.75		4.96±2.58*
5-Fu 组	10	0.91±0.25**	54.06	0	19.76±5.07**
丹低+ 5-Fu 组	10	0.82±0.31**	58.99	10.73	21.11±5.43**
丹高+ 5-Fu 组	10	0.74±0.29**	62.88	19.21	18.12±4.75**

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 各组小鼠主要脏器肿瘤转移灶数目及病理观察

Lewis 肺癌小鼠在给药 10 天后, 丹高组有 2 处肺脏肿瘤转移灶, 其他脏器尚未发现转移。其余各组均未见肿瘤转移灶。其中丹高组转移灶被结缔组织包裹, 镜下可见明显肿瘤细胞增生, 体积增大, 细胞呈圆形或多边形, 排列紧密, 胞质染色较浅, 嗜伊红, 细胞核核分裂多见, 异型性明显, 周围组织未见增生的胶原纤维, 外周无明显炎性反应区。

3 讨论

崔勇安等^[5]认为, 大多数肿瘤患者都有不同程度的血瘀证。现代药理研究表明^[6], 活血化瘀药能降低血液黏稠度和周围血管阻力, 抗凝和促进纤维蛋白的溶解, 改善微循环, 改善肿瘤局部缺氧状态, 直接增加肿瘤富氧细胞, 使抗癌药物更易进入肿瘤细胞内发挥治疗作用。刘鲁明等^[7]观察到活血化瘀药在一定程度上能抑制原发肿瘤的生长及转移。丹参作为活血化瘀常用中药, 具有活血祛瘀、清心安神、消癥止痛功效。据报道, 丹参能改善患者血液高

凝状态, 阻止循环内微血栓的形成, 减少肿瘤病灶的纤维蛋白沉着, 提高化疗效果, 减少肿瘤的转移^[8]。诱导肿瘤细胞凋亡是肿瘤治疗的又一新途径^[9], 大多数细胞毒性抗癌药物能使敏感的细胞产生凋亡, 从而达到抗癌作用。丹参可通过对肿瘤细胞的增殖抑制作用、诱导肿瘤细胞凋亡和分化从而产生抑制肿瘤细胞侵袭和转移作用^[10]。

化疗药物导致骨髓抑制是最常见的副作用, 往往引起化疗中断, 直接影响治疗效果及患者的生存期。本实验中, 荷瘤鼠在单独应用 5-Fu 后出现 WBC 数量降低, 联合应用丹参注射液后, 外周血白细胞数量减少未见降低, 且有加重趋势, 说明丹参注射液联合 5-Fu 未减轻 5-Fu 对骨髓抑制的副作用。本研究结果显示, 丹参注射液联合 5-Fu 对肿瘤抑制率明显高于单用 5-Fu, 提示丹参注射液对 5-Fu 的抗肿瘤生长具有一定的增效作用。

在 TUNEL 染色实验中发现, 各用药组在治疗后的 AI 高于模型组, 其中丹参低剂量联合 5-Fu AI 明显高于 5-Fu 单用, 而丹参高剂量联合 5-Fu AI 未见明显增高, 说明丹参注射液与 5-Fu 合用有增强肿瘤细胞凋亡的作用, 且与丹参用药剂量有关系。同时还发现, Lewis 肺癌小鼠用药后, 丹高组出现 2 处肺脏肿瘤转移灶, 其他用药组均未发现转移, 说明丹参高剂量对 Lewis 肺癌有促进转移的作用。

综上所述, 丹参注射液与 5-Fu 合用对抗肿瘤生长具有增效作用, 其机制可能是通过增强诱导肿瘤细胞凋亡, 且与丹参注射液用药剂量有关, 但并未减轻 5-Fu 对骨髓抑制的副作用, 丹参高剂量组对 Lewis 肺癌有促进转移的作用。因此, 丹参注射液与 5-Fu 联合用药的最佳剂量和对 5-Fu 抗肿瘤增效减副作用机理还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 张娜, 曹勇. 恶性肿瘤化疗毒副反应从脾肾论治[J]. 新中医, 2010, 42(10): 1-2.
- [2] 张德玉, 胡昕. 化疗药物的不良反应及护理[J]. 全科护理, 2010, 8(9): 2387-2388.
- [3] 于庆生, 王汉明, 卢业才, 等. 丹参注射液联合 5-氟尿嘧啶腹腔化疗抗鼠胃肿瘤的实验研究[J]. 安徽中医学院学报, 2007, 26(5): 37-41.
- [4] Yamaguchi Y, Ohshita A, Kawabuchi Y, et al. Adoptive immunotherapy of cancer using activated autologous lymphocytes—current status and new strategies[J]. Hum Cell, 2003, 16(4): 183-189.

(下转第 258 页)

移率分别为 60.0% 和 73.3% 及 93.3%，治疗 I 组与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。表明长必安胶囊在人肠癌转移模型中具有抗肿瘤和抗转移效果。

3 结语

中医药在防治大肠癌复发转移方面的研究逐渐增多,尤其是一些以健脾为主的复方配合化疗能有效地减低大肠癌患者术后的复发转移率,延长生存期。但存在以下问题:①以中西医结合治疗尤其中药辅助化疗的多,以中药为主者少。②缺少多中心、大样本、双盲随机的临床研究。③研究设计和实施过程中缺乏严谨性。④大多从中药固定复方或中成药等方面进行研究,不能体现中医药整体辨证思想及治则、治法的优势。实验研究相对于临床研究具有明显的可重复性,在一定程度上证实了临床研究中健脾复方配合化疗可以抑制肿瘤的复发转移。中药复方或中成药的体外实验和体内实验也显示出一定的抗肿瘤和抗转移作用,并对其可能的机制进行了探讨,但数量仍然较少,尚未深入系统地分析其分子生物学机制。希望今后能采用科学的研究方法开展更广泛的临床研究,以充分证实中医药在防治大肠癌复发转移方面的作用。同时加强临床研究与实验研究的联系,从分子水平研究中医药抗复发转移方面的机制,更好地发挥中医药抗复发转移方面的优势。

参考文献

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global Cancer Statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.
- [2] 钱垠, 黄欣, 刘青. 健脾中药对结直肠癌术后复发转移的干预作用[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(1): 80-81.
- [3] 雒琳, 杨宇飞, 李培红, 等. 中药扶正胶囊和祛邪胶囊减少 II、III 期大肠癌术后复发转移的队列研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(8): 677-680.
- [4] 杨宇飞, 许云, 吴煜, 等. 祛邪胶囊减少大肠癌术后复发转

移的临床随机双盲对照研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(10): 879-882.

- [5] 蒋益兰, 潘敏求, 蔡美. 健脾消癌饮配合化疗拮抗大肠癌术后复发转移 62 例总结[J]. 湖南中医杂志, 2007, 23(1): 1-3.
- [6] 顾纛, 韩颖盈, 郑坚, 等. 胃肠安治疗大肠癌临床疗效分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2006, 8(5): 6-7.
- [7] 马骏, 王国骅, 蔡定芳, 等. 健脾消瘤方预防大肠癌术后转移复发的临床观察[J]. 上海中医药杂志, 2005, 39(1): 24-25.
- [8] 高海德, 柳仲林, 陈宏生. 贞芪扶正胶囊在大肠癌术后化疗中的应用[J]. 医师进修, 2005, 28(6): 39-40.
- [9] 刘云霞, 蒋沈君, 匡唐洪, 等. 益气补肾口服液抗大肠癌术后转移复发的临床观察[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(5): 1072-1073.
- [10] 许建华, 范忠泽, 孙珏, 等. 肠胃清抗结肠癌转移的机制研究[J]. 中国中医药科技, 2006, 13(3): 148-150.
- [11] 杨彦, 杜春晓. 肠复康胶囊对结肠癌生长和转移抑制作用的实验研究[J]. 江苏中医药, 2007, 39(增刊): 84-86.
- [12] 蒋益兰, 朱克俭, 李勇敏, 等. 健脾消瘤方防止裸鼠大肠癌术后肝转移的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 19(5): 379-380.
- [13] 王文萍, 姜良铎. 中药肠安泰体外对 Co26lu 大肠癌细胞的血清药理学研究[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(4): 213-215.
- [14] 刘碧清, 钱海兵, 王毅, 等. 肠复康对人结肠癌细胞 HT-29 增殖及浸润转移的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2004, 12(6): 341-343.
- [15] 刘静, 史勤, 吕祥. 健脾复方对人大肠癌移植瘤裸小鼠肿瘤生长转移的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(8): 57-59.
- [16] 孟静岩, 应森林, 李侠, 等. 芪贞汤对人大肠癌细胞集团移动的影响[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(1): 56-57.
- [17] 罗森麒, 沈汉澄, 鱼达, 等. 长必安对结肠癌肝转移的干预作用[J]. 肿瘤学杂志, 2001, 7(6): 326-327.

(收稿日期: 2010-10-17; 修回日期: 2011-12-17)

[编辑: 李 巍]

(上接第 240 页)

- [5] 崔勇安, 左小东, 毛承飞. 活血化瘀法在肿瘤“辨法论治”中的应用[J]. 中医杂志, 2007, 48(8): 749-750.
- [6] 罗荣城, 韩焕兴. 肿瘤综合治疗新进展[M]. 北京: 人民军医出版社, 2003: 232.
- [7] 刘鲁明, 陈震, 陈培丰. 对活血化瘀中药治疗恶性肿瘤的思考[J]. 中医杂志, 2007, 48(9): 776-779.
- [8] 曹辉, 童玉梅. 丹参注射液并化疗治疗晚期非小细胞肺癌 35 例——附单纯化疗对照组 30 例[J]. 辽宁中医杂志,

2004, 31(1): 40-41.

- [9] 曾益新. 肿瘤学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 209.
- [10] Chang JY, Chang CY, Kuo CC, et al. Salvinal, a novel microtubule inhibitor isolated from Salvia miltiorrhizae Bunge (Danshen), with antimitotic activity in multi-drug-sensitive and-resistant human tumor cells [J]. Mol Pharmacol, 2004, 65(1): 77-84.

(收稿日期: 2011-03-31; 修回日期: 2011-10-16)

[编辑: 行 之]