

叶下珠复方 II 号对小鼠 H22 肝癌移植瘤生长的抑制作用

李常青¹, 申建柯¹, 李小翠²

摘要: **目的** 观察叶下珠复方 II 号对小鼠 H22 肝癌移植瘤生长的抑制作用, 并探讨其可能的作用机制。 **方法** 取昆明小鼠 40 只, 建立小鼠 H22 肝癌移植瘤模型, 分为模型组、叶下珠复方 II 号高剂量组(37.5g/kg)、低剂量组(18.75 g/kg)和环磷酰胺(20mg/kg)治疗组。叶下珠复方 II 号高、低剂量组均灌胃给药, 环磷酰胺组采用腹腔注射, 每日 1 次, 连续 8d。末次给药 24h 后, 测定瘤体质量, 计算抑瘤率, 检测血清 IL-2 和 TNF- α 含量。 **结果** 叶下珠复方 II 号高、低剂量组瘤重明显低于模型组, 差异均有显著性意义($P<0.01$), 但与环磷酰胺组比较, 差异均无显著性意义($P>0.05$)。叶下珠复方 II 号高、低剂量组的抑瘤率分别为 67% 和 58%, 与环磷酰胺组接近。叶下珠复方 II 号高剂量组血清 IL-2 水平明显高于模型组($P<0.05$)。叶下珠复方 II 号高、低剂量组血清 TNF- α 水平明显低于模型组, 差异有显著性意义($P<0.05$)。 **结论** 叶下珠复方 II 号有较好的抑制小鼠 H22 肝癌移植瘤生长作用, 作用机制与调节免疫, 升高 IL-2 水平和抑制 TNF- α 水平有关。

关键词: 叶下珠复方 II 号; 小鼠; H22 肝癌移植瘤; 抑制

中图分类号: R737.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2011)10-1182-03

Inhibitory action of compound phyllanthus urinaria (CPU) on the growth of transplant hepatoma (H22) in mice.
LI Chang-qing, SHEN Jian-ke, LI Xiao-hui. (1. Tropical Medicine Institute of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, Guangdong P. R. China)

Abstract: **Objective** To observe the inhibitory effects of CPU on the growth of transplant Hepatoma 22 (H22) in mice. **Methods** Forty NIH mice were established for transplation tumour model of H22, then they were randomly divided into four groups: model group (group A), high and low dosage group of CPU (group B, group C) and cyclophosphamidum as the positive control (group D). Mice in group B and group C were administrated orally with CPU at dosage of 37.5 g/kg and 18.75 g/kg daily respectively. Mice in group D were injected with cyclophosphamidum intraperitoneal at dosage of 20mg/kg daily. Eith days after treatment, the tumour-inhibition rate were calculated according to the tumour mass weight in mice, the serum levels of IL-2 and TNF- α were determined. **Results** It showed that tumour mass weight in group B and group C were obviously lower than that of group A ($P<0.01$), but without significant difference comparing with that of group D ($P>0.05$). The tumour-inhibition rate in group B and group C were 67% and 58%, resectively, closing the group D. The serum IL-2 level in group B were obviously higher than that of group A ($P<0.05$). The serum of TNF- α in group B and group C were obviously lower than that of group A ($P<0.05$). **Conclusion** CPU showed good effect of inhibiting transplanted tumour growth on H22 tumour-bearing mice. The mechanism is related to immune regulation through decreasing TNF- α level and increasing IL-2 level.

Key words: Compound Phyllanthus Urinaria (CPU); Mouse; Transplant hepatoma-22(H-22); Inhibitory effect; Mouse

叶下珠复方 II 号由叶下珠、丹参、太子参等中药组成, 研究显示该复方具有较好的抗乙肝病毒、抗肝损伤和抑制肝癌癌前病变 - 肝硬化形成的作用^[1-4]。为探讨该复方抗肝癌的作用效果, 本实验采用小鼠 H22 肝癌移植瘤模型, 观察叶下珠复方 II 号对肿瘤生长的抑制作用, 并探讨其作用机制, 为该复方的临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物组成及制备方法 叶下珠复方 II 号由叶下珠、丹参、太子参等药物组成, 以上药物购自广州大翔药业有限公司, 采用低温提取技术后制备成 2.6g/mL 含药液体。

1.1.2 实验动物 SPF 级昆明种小鼠, 雄性, 6~8 周龄, 体重 (20 ± 2) g, 购自广东省医学实验动物中心。动物质量合格证号: 0060983, 许可证号: SCXK (粤) 2008-0002。动物饲养室温为 (23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 40%~75%, 采用标准饲料和水饲养。

1.1.3 肿瘤细胞株 小鼠 H22 肝癌细胞株购自中山大学医学院动物中心细胞库, 经小鼠腹腔接种 7~8d 后, 在无菌条件下抽取腹水, 作为传代的瘤种。

1.1.4 试剂及仪器 血清 IL-2、TNF- α 放免法检测试剂盒由北京普尔伟业生物科技有限公司提供 (20100225); SN-695B 型放免测量仪 (上海日环仪器一厂)、TLL-C 台式冷冻离心机 (北京四环科学仪器厂)、GB303 电子分析天平。

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (No.2010B030700026)

作者单位: 1. 广州中医药大学热带医学研究所, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510405

作者简介: 李常青 (1965~), 男, 汉族, 研究员, 医学博士, 主要从事感染性疾病及新药开发研究工作。

1.2 方法

1.2.1 造模方法 瘤株接种方法按照 1989 年第三届全国肿瘤药理及化疗学术会议规定的方法并优化改进。取 H22 腹水肝癌荷瘤小鼠之乳白色癌性腹水,以生理盐水 1:3 稀释;并计数癌细胞,含 1×10^7 个细胞/ml,每只小鼠右侧腋窝皮下接种 0.2ml,制备 H22 肝癌荷瘤小鼠。

1.2.2 抑瘤实验 40 只昆明种雄性小鼠,按上述方法制备肝癌荷瘤小鼠小鼠模型,造模 24h 后将小鼠随机分为 4 组,每组 10 只,分别为:模型组、叶下珠复方 II 号高剂量组(37.5g/kg,换算后相当于临床用药剂量)、低剂量组(18.75g/kg,换算后相当于 0.5 倍临床用药剂量)和环磷酰胺 20mg/kg,换算后相当于临床用药剂量)治疗组。叶下珠复方 II 号高、低剂量组均灌胃给药,环磷酰胺组采用腹腔注射,每日 1 次,连续 8d,模型组予等体积生理盐水灌胃。末次给药 24h 后,小鼠称体重,眼眶取血,离心分离血清,-20℃冻存待检。断颈处死小鼠,取皮下瘤块称重,摘取脾脏和胸腺称重。

1.2.3 血清 IL-2、TNF- α 水平检测 采用放免法,按试剂盒说明书操作。

1.3 疗效评价

1.3.1 实体瘤疗效评价 实体瘤的疗效以抑瘤率表示:
 $\text{抑瘤率}(\%) = [(\text{模型组平均瘤重} - \text{相应给药组平均瘤重}) / \text{模型组平均瘤重}] \times 100\%$

1.3.2 胸腺指数与脾脏指数 胸腺指数 = 胸腺重量(mg) / 体重(g);脾脏指数 = 脾脏重量(mg) / 体重(g)。

1.4 统计学分析 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示,采用 SPSS10.0 软件进行统计分析,多组计量资料分析采用 One way ANOVA,多重比较采用 LSD,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 小鼠一般状况变化 造模前小鼠活动、饮食、毛色均无异常。实验第 5d 小鼠腋下可触及肿瘤,环磷酰胺组小鼠毛色较暗,易激惹,其余各组无明显变化。实验第 7d 模型组小鼠死亡 1 只。用药前期各组小鼠体重增加均较快,后期环磷酰胺组体重增加减慢。实验前各组小鼠体重差异无统计学意义($P > 0.05$),实验结束时环磷酰胺组与模型组比较,小鼠的体重差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 小鼠用药前后体重变化 ($\bar{x} \pm SD$)

组别	小鼠数	用药前体重(g)	用药后体重(g)
模型组	9	22.84 \pm 0.81	27.16 \pm 2.60
低剂量组	10	22.43 \pm 1.22	25.65 \pm 2.02
高剂量组	10	22.96 \pm 0.38	26.54 \pm 1.35
环磷酰胺组	10	22.83 \pm 1.22	25.21 \pm 1.29*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$

2.2 叶下珠复方 II 号对 H22 肝癌移植瘤小鼠瘤重、脾脏指数、胸腺指数的影响 与模型组比较,叶下珠复方 II 号高、低剂量组瘤重明显减小,差异均有统计学意义($P < 0.01$),与环磷酰胺组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。叶下珠复方 II 号高、低剂量组胸腺指数与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),但与环磷酰胺组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。叶下珠复方 II

号高、低剂量组脾指数与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),与环磷酰胺组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 叶下珠复方 II 号对 H22 肝癌移植瘤小鼠瘤重、脾脏指数、胸腺指数的影响 ($\bar{x} \pm SD$)

组别	小鼠数	瘤重(g)	抑瘤率(%)	胸腺指数(mg/g)	脾指数(mg/g)
模型组	9	1.20 \pm 0.16	0.0	2.86 \pm 1.61 $^{\Delta}$	5.12 \pm 1.44 $^{\Delta}$
低剂量组	10	0.51 \pm 0.18**	58.0	3.30 \pm 0.63 $^{\Delta}$	4.25 \pm 1.08** $^{\Delta}$
高剂量组	10	0.39 \pm 0.18**	67.0	3.14 \pm 0.37 $^{\Delta}$	4.24 \pm 0.60** $^{\Delta}$
环磷酰胺组	10	0.34 \pm 0.10**	71.0	1.65 \pm 0.60*	2.80 \pm 0.79**

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与环磷酰胺组比较, $^{\Delta}$ $P < 0.01$ 。

2.3 叶下珠复方 II 号对 H22 肝癌移植瘤小鼠血清 IL-2、TNF- α 含量的影响 叶下珠复方 II 号高剂量组血清 IL-2 水平明显高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。叶下珠复方 II 号高、低剂量组血清 TNF- α 水平明显低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。叶下珠复方 II 号高剂量组血清 IL-2 水平明显高于低剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$),但与环磷酰胺组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 叶下珠复方 II 号对 H22 肝癌移植瘤小鼠血清 IL-2、TNF- α 含量的影响 ($\bar{x} \pm SD$)

组别	小鼠数	IL-2 (ng/ml)	TNF- α (ng/ml)
模型组	9	1.88 \pm 0.37 $^{\Delta}$	3.19 \pm 0.41
低剂量组	10	1.98 \pm 0.43 $^{\Delta}$	2.83 \pm 0.49* $^{\Delta}$
高剂量组	10	2.70 \pm 0.88**	2.85 \pm 0.30*
环磷酰胺组	10	3.13 \pm 1.21**	3.16 \pm 0.27

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与低剂量组比较,# $P < 0.05$ 。与环磷酰胺组比较, $^{\Delta}$ $P < 0.05$ 。

3 讨论

叶下珠复方 II 号是在叶下珠复方^[5]的基础上加入苦参、桃仁等药物组成,临床上主要应用于肝纤维化和肝癌的治疗。本研究结果显示叶下珠复方 II 号高、低剂量组对小鼠 H22 肝癌移植瘤的抑瘤率分别为 67%和 58%,显示叶下珠复方 II 号有较好的抑制肿瘤生长作用。

肿瘤免疫学证实机体的免疫状况与恶性肿瘤的发生和发展有密切联系,当机体免疫机能低下或受抑制时,肿瘤发生率高,而在肿瘤进行性生长时,机体免疫功能受抑制,研究证实 T 细胞介导的细胞免疫在机体抗肿瘤免疫中起主导作用。

IL-2 是细胞免疫系统的重要因子,由 CD4⁺T 细胞中的 Th1 亚群细胞分泌,具有显著的免疫增强作用,能够激活 T 细胞,促进 T 细胞生长、分化,促进 B 细胞增殖、分化和合成抗体,诱导其他细胞因子产生和受体表达,刺激自然杀伤细胞(NK 细胞)增殖等。IL-2 不仅可增强 NK 细胞等非特异的免疫反应,而且可增强主要组织相容性抗原复合物限制的特异细胞毒性淋巴细胞反应。IL-2 本身具有直接抗癌作用,还可通过诱导其他细胞因子(如肿瘤坏死因子和干扰素等)产生抗癌效应;另外,IL-2 可活化血管内皮细胞,促进 T 细胞表面黏附分子的表达,从而有助于 T 细胞迁移到肿瘤局部,更有效地诱导抗肿瘤免疫及介导肿瘤杀伤^[6,7]。

TNF- α 是一种由单核巨噬细胞产生的内(下转第 1189 页)

工作量及难度非常大,为了工作方便(白天方便下村,群众在家)下村发药一般安排在中午,当时正好是农忙季节,有部分农民刚回家还未吃午饭空腹,发药人员很难有时间等待饱饭后再服药(看服),这时因气候炎热,劳动出汗又较多,血容量较低,血药浓度较高的原因,出现的头晕眼花相对要多一些;在 66 例服药后失访的病例中,有部分病例因服药后出现头晕眼花而产生情绪,影响了后面研究而失访。此后改在晚间睡前服药,不良反应相对较少。此外,有一例 22 岁妇女做博赛孕检试纸为阳性,诊断为早孕阳性,作者已将其剔除,并在服药表中注明剔除病例;但在下村发药时,由于发药人员的疏忽及该患者的强烈要求服药(患者认为自己刚分娩 3 个月而检查早孕有误),发药员给哺乳期妇女服药也是失误,服药后即冒着烈日参加田间劳动而出现一过性晕厥,后经输注葡萄糖后症状消失,该患者未完成粪便复检。因此,建议使用三苯双胍肠溶片治疗钩虫感染者时,最好安排在晚饭后至睡前的时间服药,从而有效的减少及减轻不良反应的发生。

经过多年多次的调查和监测报告显示,海南省土源性肠道线虫感染还很高,特别是中部地区农村居民钩虫感染在 40% 以上的地方很普遍,主要以单纯美洲钩虫感染占绝对优势。因此,在今后土源性肠道线虫防治工作中,应把美洲钩虫作为优先防治的虫种,加大加强对美洲钩虫感染的防治力度,在药物选择上应首选对美洲钩虫病安全高效的药物。本研究与三苯双胍的其他临床试验结果相一致,即三苯双胍对美洲钩虫感染的

治疗效果是目前驱治土源性肠道寄生虫药物所无法比拟的,是较为理想的驱钩虫、蛔虫药物^[1,2,6]。建议在进一步控制土源性肠道线虫特别是美洲钩虫病传播工作中,考虑对钩虫感染严重的地区(50%以上),增加顿服三苯双胍剂量,从而达到更好的疗效。三苯双胍治疗钩虫感染的疗效显著,不良反应率低,是非常值得推广的驱虫药物。

参考文献:

- [1] 肖树华,吴惠敏,王翀.三苯双胍一种新的广谱抗肠道蠕虫新药[J].国寄生虫学与寄生虫病杂志,2004,22:312-315.
- [2] 吴中兴,方悦怡,刘宜升.新药三苯双胍肠溶片治疗肠道线虫感染的效果观察[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2006,24(1):23-26.
- [3] 张剑辉,肖树华,吴中兴.三苯双胍肠溶片治疗 1 292 例肠道线虫感染者 期临床试验[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2004,22:312-315.
- [4] 林绍雄,王善青,胡锡敏,等.海南省中部地区人体重要寄生虫病现状调查分析[J].中国热带医学,2005,9(7):1417-1419.
- [5] Horton J. Albendazole: a review of ant helminthic efficacy and safety in human[J]. Parasitol, 2000, 121(Suppl): S113-132.
- [6] 郑葵阳,吴中兴,刘宜升,等.三苯双胍肠溶片治疗肠道线虫感染的效果观察[J].实用寄生虫病学杂志,2002,10:149-151.

收稿日期 2010-04-30 编辑 符式刚

(上接第 1183 页)

源性细胞因子, TNF- α 的生物学作用与其体内的水平高低密切相关,对肿瘤免疫有双向调节作用。在正常情况下, TNF- α 具有抗肿瘤作用,通过增强免疫效应功能、介导靶细胞凋亡、血管炎症反应等途径而发挥抗肿瘤作用,对机体有利。但如持续释放或产生过多,又会严重破坏细胞因子之间正向的协调作用,造成细胞因子网络功能紊乱,引起机体的发热、脂肪降解、恶液质、血管渗漏、内源性致热等病理损伤等^[8]。文献报道原发性肝癌患者 AFP 未升高之前或 CT 和超声检查未能发现肝癌时, TNF- α 已显著升高,肿瘤复发时 TNF- α 升高更明显^[9]。

本研究结果显示叶下珠复方 II 号高剂量组小鼠血清 IL-2 水平明显高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$),显示叶下珠复方 II 号可通过提高 H22 肝癌移植瘤小鼠体内 IL-2 水平发挥抗癌作用。

叶下珠复方 II 号高、低剂量组血清 TNF- α 水平明显低于模型组,差异有显著性意义($P < 0.05$)。显示叶下珠复方 II 号具有抑制 H22 肝癌移植瘤小鼠体内升高的 TNF- α 水平的作用,从而使其维持在一定水平而发挥抗肿瘤、调节机体免疫功能等积极作用。

至于叶下珠复方 号抗肝癌的其它相关作用机制,有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 李常青,李小月,张俊丽,等.叶下珠复方 号抗乙型肝炎病毒的体外实验研究[J].中国热带医学,2009,9(2):217-218.
- [2] 李小月,何金洋,李常青,等.叶下珠复方 号体内抗鸭乙肝病病毒的实验研究[J].广州中医药大学学报,2010,28(2):129-131.
- [3] 盛扬,李常青,刘妮,等.叶下珠复方 号对 HSC-T6 增殖及 TIMP-1 mRNA 表达的影响[J].中国热带医学,2008,8(2):204-205,215.
- [4] 李常青,李钢,苏俊芳,等.叶下珠复方 II 号对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化形成的抑制作用[J].辽宁中医杂志,2009,36(8):1413-1415.
- [5] 李常青,王新华,李广谦,等.叶下珠复方治疗慢性乙型肝炎的临床观察[J].新中医,1998,30(6):45,62.
- [6] 赵武述,陈仁,卞志强.现代临床免疫学[M].北京:人民军医出版社,1994,158-183.
- [7] 彭贵勇,庞政.白细胞介素 2 对入肝癌细胞侵袭力及转移力的调节作用[J].中华肝脏病杂志,2001,5:303-305.
- [8] 吕志敢,郭政.肿瘤坏死因子的研究进展[J].山西医科大学学报,2006,37(3):311-314.
- [9] Nakazaki H. Preoperative and postoperative cytokines in patients with cancer[J]. Cancer, 1992, 70(3):709-713.

收稿日期 2011-03-21 编辑 符式刚