

润肺散结胶囊抗小鼠 Lewis 肺癌的实验研究

王三虎¹, 王宗仁², 王四旺³, 孙纪元³, 谢艳华³

(1. 广西柳州市中医院肿瘤科, 广西 柳州 545001; 2. 第四军医大学西京医院中医科, 陕西 西安 710032; 3. 第四军医大学药理学药物研究所, 陕西 西安 710032)

【摘要】 目的 观察润肺散结胶囊(RSC)对 Lewis 肺癌(荷瘤)小鼠的抑瘤作用。**方法** 采用动物移植性肿瘤实验法腋下接种 Lewis 肺癌制备小鼠荷瘤模型。将制模后小鼠随机分为模型对照组(给予生理盐水)、5-氟尿嘧啶注射液(5-Fu)对照组(15 mg/kg, 每周 6 d)及 RSC 1.5、3.0 和 6.0 g·kg⁻¹·d⁻¹ 治疗组, 每组 10 只。灌胃相应药物 21 d 后处死动物, 观察瘤重、抑瘤率及瘤组织病理学变化。用免疫组化法检测瘤组织中 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达; 以流式细胞仪分析脾细胞内 T 淋巴细胞的比例。**结果** RSC 1.5、3.0 和 6.0 g·kg⁻¹·d⁻¹ 组的抑瘤率分别为 30.1%、35.0% 和 36.5%; 与模型对照组比较, RSC 各剂量治疗组瘤重和肿瘤体积均显著减小, 差异均有统计学意义(P 均 <0.01)。瘤组织苏木素-伊红(HE)染色切片可见明显的炎细胞浸润和出血带, 并有大片坏死区域, 间质血管较少; 电镜下见凋亡小体出现。与模型对照组比较, 各用药组 Bcl-2 蛋白表达明显减少、染色变弱, 吸光度值均显著减小(P 均 <0.01); Bax 蛋白表达强度差异无统计学意义; RSC 各剂量组 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞比例均明显增高(P 均 <0.01)。**结论** 润肺散结胶囊对体外培养的 Lewis 肺癌细胞有明显的抑制作用, 其机制可能为诱导肿瘤细胞凋亡和提高机体免疫功能, 为临床用药提供了理论依据。

【关键词】 抗肿瘤; 肺癌; 流式细胞仪; 凋亡; 润肺散结胶囊

中图分类号: R285.5; R273 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2008)05-0289-04

An experimental study on inhibitory effects of Runfei Sanjie capsule (润肺散结胶囊) on Lewis lung cancer in mice WANG San-hu¹, WANG Zong-ren², WANG Si-wang³, SUN Ji-yuan³, XIE Yan-hua³. 1. Department of Tumor, Liuzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Liuzhou 545001, Guangxi, China; 2. Department of Chinese Traditional Medicine, Xijing Hospital Affiliated to The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shanxi, China; 3. Institute of Materia Medica, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shanxi, China

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism and inhibitory effect of Runfei Sanjie capsule (RSC, 润肺散结胶囊) on Lewis pulmonary tumor in mice. **Methods** Lewis lung tumor cultured in vitro was transplanted into subaxillas of mice to establish animal models with transplanted tumor. After the establishment of the models, the mice were randomly divided into model control group (only normal saline was given), 5-fluorouracil (5-FU) control group (15 mg/kg, 6 days in every week) and RSC 1.5, 3.0, 6.0 g·kg⁻¹·d⁻¹ treatment groups (each $n=10$). After the saline or the drug solutions were administered by gavage for 21 days into the corresponding groups, the changes of tumor weight, the rates of tumor inhibition and the pathological changes of tumor tissue were observed. The protein expressions of Bcl-2 and Bax in tumor tissue were detected by immunohistochemical method, and the proportion of T lymphocytes in splenocytes was analyzed by flow cytometry. **Results** The rates of tumor inhibition in RSC 1.5, 3.0, 6.0 g·kg⁻¹·d⁻¹ groups were 30.1%, 35.0% and 36.5% respectively; compared with the model control group, the quality of the tumor was more improved and the tumor mass was smaller in volume in the various RSC dosage groups, the differences being statistically significant (all $P<0.01$). The pathological examinations of hematoxylin and eosin (HE) sections of the tumor showed that there were marked infiltration of inflammatory cells, hemorrhagic bands, large areas of necrosis and less interstitial blood vessels; under the electron microscope, cell apoptosis was seen. Compared with the model control group, the protein expression of Bcl-2 was less obviously, staining weaker and the light absorbance value smaller markedly in various treatment groups (all $P<0.01$), but in the comparisons of the intensity of protein expression of Bax among the groups, there was no significant difference. The proportions of T cells of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ were also greater in number in various treatment groups (all $P<0.01$). **Conclusion** RSC can inhibit the growth of pulmonary tumor cultured in vitro significantly and its anti-tumor mechanism may be associated with apoptosis induced by RSC and the elevation of immune functions in the organism; the results may also provide theoretical basis for clinical application of drugs.

【Key words】 anti-tumor; lung cancer; flow cytometry; apoptosis; Runfei Sanjie capsule

目前,肺癌为最常见的恶性肿瘤之一,中西医对其治疗效果均不理想。我们认为燥湿相混是肺癌的主要病机^[1],也就是阴虚与痰湿并见,滋阴则不利于痰湿,化痰则有伤阴之弊,立法用药,颇难措手^[2]。因此,以润燥并用为法,自拟润肺散结胶囊(RSC)在多年的临床实践中,通过 72 例临床应用观察,RSC 对肺癌最常见证型气阴两虚、痰浊犯肺有很好的治疗作用,本实验中通过 RSC 对荷肺癌小鼠的抑制作用,为临床用药提供进一步的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药物和仪器:经验方 RSC 由人参、海浮石、麦冬、灵芝、鳖甲等十几味中药组成(由第四军医大学药剂室合成,批号:060810)。使用前以生理盐水溶解稀释、过滤、灭菌备用;5-氟尿嘧啶注射液(5-Fu)由上海旭东海普药业有限公司生产(批号:050609)。荧光标记的抗 CD3⁺、抗 CD4⁺ 和抗 CD8⁺ 抗体购自美国 CALTAG 公司。膜联蛋白-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)凋亡检测试剂盒〔包括 Annexin V-FITC 20 mg/L、结合缓冲液、碘化丙啶(PI) 50 mg/L〕由第四军医大学免疫室分装,4℃保存;D-Hanks液用国产分析纯试剂和超纯水配制。

1.1.2 细胞株:Lewis 肺癌细胞购自中国医学科学院癌症研究所,本室传代。RPMI1640 细胞培养基(美国 Gibco 公司),新生小牛血清购自杭州四季青有限公司。

1.1.3 动物:Lewis 肺癌荷瘤 C57BL/6 小鼠,购自中国医学科学院癌症研究所,本室传代。饲养条件:SPF 级动物饲养层流架内,室温(25±3)℃,相对湿度 40%~60%。每日人工照明 12 h,严格无菌操作,垫料均经高压蒸气灭菌,饮水为纯水(稀盐酸调节),喂无菌颗粒饲料。

1.2 实验方法

1.2.1 鼠 Lewis 肺癌模型制备:待培养的 Lewis 肺癌细胞增长至对数生长期后,收集细胞,加生理盐水稀释成细胞悬液。每只用注射器按 0.2×10⁹/L 将细

胞悬液接种于 50 只裸鼠右前肢内侧皮下,当荷瘤小鼠皮下肿瘤最大径长至约 5 mm 时,按随机数字表法分为 5 组:模型组(只给予生理盐水)、5-Fu 组(给予 5-Fu 腹腔注射,15 mg/kg,每周 6 d)、RSC 组用灌胃法分别按 1.5、3.0 和 6.0 g·kg⁻¹·d⁻¹ 给予 RSC(分别为 RSC 1.5 组、RSC 3.0 组和 RSC 6.0 组)。从给药开始每 3 日用游标卡尺测量肿瘤长径(a)、短径(b),并计算肿瘤体积(V)。灌胃 21 d 后用颈椎脱位法处死小鼠,取出完整肿瘤组织称重,计算抑瘤率。瘤组织用甲醛水溶液固定,常规切片,苏木素-伊红(HE)染色;另取瘤组织用戊二醛固定,4℃冰箱保存;用锇酸溶液进行后固定,脱水,浸透,pon812包埋,超薄切片,醋酸铀-枸橼酸铅双重染色,透射电镜下观察。

$$V=1/2 ab^2$$

$$\text{抑瘤率}(\%) = \frac{1 - \text{实验组平均质量}}{\text{模型组平均质量}} \times 100\%$$

1.2.2 免疫组化检测肿瘤组织中 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达:将上述肿瘤组织分别固定于甲醛缓冲液中静置 24 h,石蜡包埋切片。采用过氧化物酶标记的链霉卵白素(SP)法行 Bcl-2 和 Bax 蛋白免疫组化染色,一抗工作浓度均为 1:100。各组标本同一批染色,以磷酸盐缓冲液(PBS,浓度 0.01 mol/L, pH7.4)代替一抗作阴性对照,相邻切片用于 HE 染色对照。显微镜下观察,胞质出现棕黄色沉淀者为染色阳性细胞。采用 Alpha Innotech 显微图像分析系统半定量分析阳性染色细胞的吸光度(A)值,对免疫组化结果进行判定。在 400 倍视野下,每张切片选取 5 个典型的 Bcl-2 和 Bax 蛋白阳性染色区域,取平均值为每张切片的 A 值,代表 Bcl-2 和 Bax 蛋白所发生的免疫反应强度,即 Bcl-2 和 Bax 的表达强度。

1.2.3 荷瘤小鼠脾细胞表型分析:取各组小鼠脾脏制备单细胞悬液,去除红细胞后,用直接荧光标记的抗 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ 单克隆抗体标记 30 min 后,流式细胞仪分析脾细胞内 T 淋巴细胞的比例。

1.3 统计学处理:采用 Origin 7.0 统计软件进行数据统计处理,计量结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析和 t 检验,率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 瘤组织生长及病理结果(表 1):模型组肿瘤体

基金项目:广西壮族自治区医药卫生科研基金资助项目(Z2005191)

作者简介:王三虎(1957-),男(汉族),陕西省人,医学博士,教授,硕士生导师,主任医师,广西壮族自治区中医药专家学术经验继承工作指导老师,主要从事肺癌的中医诊疗方法研究,Email: wshwxrwh@fmmu.edu.cn.

积增长迅速;实验组灌胃 9 d 肿瘤生长开始受到明显抑制($P<0.05$),且随时间延长受抑越明显。实验结束时除 5-Fu 组小鼠体重有所下降(但与模型组比较差异无统计学意义, $P>0.05$)外,其余各组鼠的体重无明显变化。随 RSC 使用剂量的增加,抑瘤率逐渐增加,表明 RSC 能显著抑制 Lewis 肺癌的生长。与模型组比较,实验组瘤重和肿瘤体积均显著降低(P 均 <0.01)。

表 1 RSC 对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤的抑制作用($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	体重(g)	瘤重(g)	肿瘤体积(mm ³)	抑瘤率(%)
模型组	10	19.8±3.6	2.66±0.25	412±48	
5-Fu 组	10	18.3±3.9	1.72±0.19 ^b	236±39 ^b	35.3
RSC 1.5 组	10	20.5±2.7	1.86±0.17 ^{bc}	301±40 ^{bc}	30.1
RSC 3.0 组	10	20.7±2.8	1.73±0.13 ^b	248±33 ^b	35.0
RSC 6.0 组	10	21.2±2.3	1.69±0.16 ^b	217±36 ^b	36.5

注:与模型组比较,^b $P<0.01$;与 5-Fu 组比较,^c $P<0.05$;空白为无此项

观察瘤组织 HE 切片发现,模型组瘤组织颜色鲜红,无明显出血坏死带,少量炎细胞浸润,间质血管较多。RSC 组则见明显的炎细胞浸润和出血带,并有大片坏死区域,间质血管较少。电镜下观察 RSC 组瘤组织出现凋亡细胞特征性的变化,癌细胞膜破裂,胞质溢出呈空泡样变化,线粒体髓样改变,有凋亡小体出现。

2.2 RSC 对肿瘤组织内 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响(表 2):各组 Lewis 肺癌中均有 Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达。Bcl-2 和 Bax 蛋白表达阳性的细胞染色主要位于胞质。与模型组比较,各用药组 Bcl-2 蛋白的表达明显减少、染色变弱,A 值显著减小(P 均 <0.01);而 Bax 蛋白表达强度差异无统计学意义。各剂量 RSC 组 Bax 蛋白表达量均显著高于 5-Fu 组(P 均 <0.05)。

表 2 RSC 对 Lewis 肺癌小鼠 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$) A 值

组别	动物数	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白
模型组	10	53.4±5.7	37.3±5.6
5-Fu 组	10	32.5±7.8 ^b	33.9±4.3
RSC 1.5 组	10	35.7±7.9 ^b	45.3±5.9 ^c
RSC 3.0 组	10	33.4±5.3 ^b	46.2±6.1 ^c
RSC 6.0 组	10	40.6±6.5 ^{bc}	43.5±6.5 ^c

注:与模型组比较,^b $P<0.01$;与 5-Fu 组比较,^c $P<0.05$

2.3 脾细胞表型分析(表 3):模型组 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞降低;用药后 RSC 各剂量组 CD3⁺、

CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞比例均明显增高(P 均 <0.01)。

表 3 RSC 对 Lewis 肺癌小鼠细胞表型的分析($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)
模型组	10	15.4±3.6	16.3±4.2	12.1±3.8
5-Fu 组	10	22.5±4.8	28.3±5.1 ^a	27.5±5.3 ^b
RSC 1.5 组	10	31.7±5.9 ^{bd}	35.4±5.7 ^{bc}	30.1±4.8 ^b
RSC 3.0 组	10	32.4±5.3 ^{bd}	38.5±5.3 ^{bd}	32.9±5.4 ^{bc}
RSC 6.0 组	10	35.6±5.8 ^{bd}	40.5±6.5 ^{bd}	36.5±5.9 ^{bd}

注:与模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与 5-Fu 组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$

3 讨论

RSC 是我们在经方麦门冬汤基础上结合临床经验^[3]拟定的新方。以人参气阴双补,海浮石化痰散结为君药;麦冬、百合助人参滋阴润肺,瓜蒌、半夏助海浮石化痰散结为臣药;元参、鳖甲软坚散结,白英清肺解毒,灵芝止咳平喘为佐药;炙甘草止咳化痰,调和诸药为使药。共奏益气养阴、化痰散结之功效,符合肺癌气阴两虚、痰浊犯肺的基本病机。

细胞凋亡与肿瘤发生发展有密切关系。细胞凋亡过程由众多基因共同调控,其中 Bcl-2 原癌基因家族与其关系最密切^[4-6]。Bcl-2 是抗凋亡基因,位于线粒体外膜、部分内质网及核膜上,主要生理功能是阻抑细胞凋亡,其同源基因 Bax 可拮抗 Bcl-2 的保护效应而使细胞趋于凋亡。Bax 蛋白为胞质内蛋白,与 Bcl-2 形成异源二聚体则抑制凋亡,和 Bax 形成同源二聚体则加速凋亡。目前普遍认为 Bcl-2 与 Bax 蛋白含量的比值对细胞存活或凋亡起关键作用:比值下降,则诱导细胞凋亡;比值上升,细胞则趋于存活。本实验结果表明,经 RSC 灌胃后的 C57BL/6 小鼠,肿瘤生长明显受到抑制,瘤重和肿瘤体积明显小于模型组。与模型组比较,实验组 Lewis 肺癌细胞中 Bcl-2 蛋白表达明显减少、变弱,而 Bax 蛋白表达强度未见明显变化。用药后 RSC 各剂量组 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞比例均明显增高,这说明 RSC 不仅有诱导肿瘤细胞凋亡的作用,也可提高机体免疫功能,从而杀死肿瘤细胞的作用^[7-9]。与我们前面体外实验研究结果以及部分临床患者的应用结果相类似,也为临床应用提供了一些有益的理论基础。

参考文献

[1] 王三虎.《金匱要略》与肿瘤[J].河南中医,2005,25(8):6-8.
[2] 王三虎.燥湿相混致癌论[J].山东中医杂志,2005,24(1):3-5.
[3] 王三虎,王宗仁.肺癌急症辨证论治[J].中国中西医结合急救杂志,2006,13(5):314.
[4] 马惠芳,任秀君,王小宁,等.针刺对高血脂合并脑缺血大鼠海马区 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J].针刺研究,2006,31(4):

- 212-215.
- [5] 高天,方宁远,江立生.洛沙坦对高血压大鼠血管平滑肌细胞凋亡及凋亡基因 Bax 和 Bcl-2 的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2006,4(1):46-50.
- [6] Cao XQ, Arai H, Ren YR, et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor protects against MPTP-induced dopaminergic cell death in mice by altering Bcl-2/Bax expression levels[J]. J Neurochem, 2006, 99(3):861-867.
- [7] Griffith TS, Kazama H, Van Oosten RL, et al. Apoptotic cells induce tolerance by generating helpless CD8⁺ T cells that produce TRAIL[J]. J Immunol, 2006, 178(5):2679-2687.
- [8] Wu Y, Farrell J, Pirmohamed M, et al. Generation and characterization of antigen-specific CD4⁺, CD8⁺, and CD4⁺/CD8⁺ T-cell clones from patients with carbamazepine hypersensitivity[J]. J Allergy Clin Immunol, 2007, 119(4):973-981.
- [9] 余昌胤,郑和忠,杨小艳.雷公藤内酯醇对 EAE 大鼠外周血 CD4⁺、CD8⁺ 的影响[J].山东医药,2006,46(19):6-7.
- (收稿日期:2008-03-01 修回日期:2008-03-23)
(本文编辑:李银平)

• 经验交流 •

序贯性血液净化治疗重度有机磷农药中毒的应用体会

陶惠明,徐方林

(江西省九江市第一人民医院 ICU,江西 九江 332000)

【关键词】 血液灌流;连续性静-静脉血液滤过;有机磷农药;中毒;重度

中图分类号:R595.4 文献标识码:B 文章编号:1008-9691(2008)05-0292-01

在综合治疗基础上用血液灌流(HP)联合连续性静-静脉血液滤过(CVVH)序贯性血液净化治疗 25 例急性重度有机磷农药中毒(AOPP),报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料:50 例患者服药量 30~120 ml,中毒至血液净化时间 1~32 h,农药种类:氧化乐果 8 例,乐果 10 例,敌敌畏 10 例,对硫磷 6 例,甲胺磷 12 例,对硫磷+甲胺磷 4 例。按随机原则分为血液净化组(25 例)和对照组(25 例),两组患者性别、年龄、服药量、农药种类及中毒至治疗时间比较差异无统计学意义(P 均 >0.05),有可比性。

1.2 治疗方法:患者入院后立即清水洗胃,用阿托品及复能剂、利尿药等综合治疗。血液净化组在床旁先用 HA330 型一次性树脂血液灌流器进行 HP 1~2 次,然后再行 CVVH 序贯性血液净化治疗。平均治疗时间(56.0 $\pm$ 8.6)h。

1.3 统计学处理:采用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组比较采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 疗效(表 1):血液净化组患者昏迷

作者简介:陶惠明(1962-),男(汉族),江西省人,副主任医师,现任华东六省危重症医学学会委员。

表 1 两组患者疗效比较

组别	例数	昏迷至清醒时间($\bar{x}\pm s, d$)	机械通气时间($\bar{x}\pm s, d$)	ChE 活性恢复时间($\bar{x}\pm s, d$)	住院时间($\bar{x}\pm s, d$)	治愈率〔%(例)〕
血液净化组	25	1.76 $\pm$ 1.06*	2.02 $\pm$ 1.20*	4.87 $\pm$ 1.32*	8.92 $\pm$ 2.12*	96(24)*
对照组	25	2.50 $\pm$ 1.56	6.23 $\pm$ 3.25	8.71 $\pm$ 3.37	15.78 $\pm$ 8.23	60(15)

注:与对照组比较,* $P<0.05$

至清醒时间、机械通气时间、胆碱酯酶(ChE)活性恢复时间、平均住院时间均较对照组明显缩短,治愈率显著升高,差异有统计学意义(P 均 <0.05)。

2.2 死亡情况:血液净化组死亡 4 例,病死率(4%)显著低于对照组(10 例,40%),差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

AOPP 患者在常规综合治疗基础上采用 HP 联合 CVVH 序贯性血液净化治疗,取得显著效果,主要有以下体会:①外用树脂对有机磷具有很强的吸附性,经过数次再循环,有机磷可充分与树脂接触,从血液中被清除掉。为防止反跳现象,随后采用 CVVH 序贯性治疗,则可以连续 24 h 持续地清除毒物。②应用 CVVH 强大的对流作用,可有效清除患者体内大量中小分子炎症介质,改善多器官功能障碍综合征(MODS)患者的症状及氮质血症,维持水、电解质和酸碱平衡,并为营养支持创造条件^[1],能很快改善各受损器官功能,并能防止阿托品中毒^[2-3]。另外, CVVH 对维持血液循环动

力学稳定也有积极作用,本组 10 例低血压患者经过 CVVH 治疗大约 6~10 h 后循环开始恢复。③入住重症加强治疗病房(ICU)后在中毒 6 h 内尽快进行血液净化治疗,此时血中毒物浓度达高峰,且多以游离状态存在,清除的效能最高,对于合并多器官功能损害者应越快越好。④血液净化只能清除血中存在的有机磷农药,不能恢复 ChE 活性,更不能解除中毒症状,因此常规的解毒等综合治疗必须同时进行。

参考文献

- [1] 李笑宏,焦文建,李明娥.序贯性血液净化治疗严重急性中毒患者疗效观察[J].中国危重病急救医学,2006,18(9):565-566.
- [2] 赵景波,张宝美,张玉亮.序贯性血液净化治疗急性有机磷中毒中间综合征临床观察[J].山东医药,2004,44(19):31-32.
- [3] 朱建华.连续性血液净化在危重病中应用的几个问题[J].现代实用医学,2006,18(5):292-294.

(收稿日期:2007-12-19)

(本文编辑:李银平)