

## 实验研究

## 中医补益法优化干预结肠癌辅助治疗阶段的实验研究

叶 晔<sup>1</sup> 阮善明<sup>2</sup> 沈敏鹤<sup>2</sup> 宋巧玲<sup>2</sup> 陈美雪<sup>1</sup> 林 红<sup>1</sup> 任函承<sup>1</sup>

(1 中国计量学院, 浙江省杭州市下沙经济开发区学源街, 310018; 2 浙江省中医院)

**摘要** 目的: 观察不同时机运用中医补益法协同化疗抗结肠癌的有效性以及可能的作用机制, 探索、评估和验证结肠癌辅助治疗阶段中医补益法干预的中西医优化治疗模式。方法: 1) 建立人结肠癌 LoVo 细胞裸鼠移植性肿瘤模型。2) 将 60 只造模成功裸鼠用随机数字表随机分为 6 组, 提前干预组、同步干预组、延后干预组、化疗组、中药组和模型组, 每组 10 只。3) 细胞移植后第 8 天开始按治疗方案干预不同的实验分组, 中医补益法采用灌胃的方法分组给药, 5-Fu 化疗采用腹腔注射给药。每天观察瘤块生长、摄食、饮水和活动状态等情况。4) 用药结束, 摘眼球法处死各组一半裸鼠, 剥取瘤块, 测量体积, 称取瘤重, 免疫组化分析凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达, 其余观察生存期。结果: 1) 平均肿瘤体积: 除中药组外, 其余不同药物干预组均与模型组比较有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且延后干预组与化疗组比较也有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。2) 平均瘤重: 除中药组、化疗组外, 其余不同药物干预组的瘤重均与模型组比较有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且延后干预组与化疗组比较也有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。3) 抑瘤率: 中药组 1.89%, 化疗组 7.55%, 同步干预组 13.21%, 提前干预组 13.21%, 延后干预组 18.87%。4) 平均生存期: 除中药组与化疗组外, 其余不同药物干预组的生存期均与模型组比较有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且提前干预组、延后干预组与化疗组比较也有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。5) Bcl-2 的平均光密度: 提前干预组、延后干预组均与模型组比较有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 延后干预组与化疗组比较也有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。6) Bax 的平均光密度: 除中药组和化疗组外, 其余不同药物干预组均与模型组比较有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 延后干预组与化疗组比较有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 中医补益法协同化疗治疗 LoVo 人结肠癌移植性裸鼠的生存期比化疗组有所延长, 延后干预组和提前干预组较之同步干预组有更大的生存获益趋势, 延后干预组较之提前干预组有更大的生存获益趋势; 中医补益法协同化疗的作用机制可能与凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达有关。

**关键词** 结肠癌/中医药疗法; 补益法

### On TCM Tonification Method as Adjunctive Therapy in Treatment of Colon Cancer

Ye Ye<sup>1</sup>, Ruan Shanming<sup>2</sup>, Shen Minhe<sup>2</sup>, et al.

(1. China Jiliang University, Add.: Xueyuan Street, Xiasha District, Hangzhou, Zhejiang Province, Post code: 310018; 2. Zhejiang Hospital of Chinese medicine)

**Abstract Objective:** To observe the clinical effectiveness and mechanism of TCM Tonification Method combined with chemotherapy for colon cancer treatment during different stages, and verify an optimized TCM Tonification regimen. **Methods:** We injected human LoVo cell tumor xenografts into immunodeficiency mice, randomized 60 mice into 6 groups: early intervention group, Simultaneous intervention group, delayed intervention group, chemotherapy group, Chinese herbal medicine group and model group. From the 8th day, the groups received respective treatments. Growth of tumor, food intake, water intake and movements of mice were observed every day. At end of treatment, the expression of Bcl-2 and Bax, and survival time were observed. **Results:** ① average size of tumor: Except the Chinese herbal medicine group, there was significantly reduction of tumor size ( $P < 0.05$ ), and the delayed intervention group and the chemotherapy group were also statistically different ( $P < 0.05$ ). ② average tumor weight: Except the Chinese herbal medicine group and chemotherapy group, the tumor weight in various groups were statistically less than model group ( $P < 0.05$ ), and the delayed intervention group and chemotherapy group had statistically differences ( $P < 0.05$ ). ③ Tumor inhibition rate: 1.89% in Chinese herbal medicine group, 7.55% in chemotherapy group, 13.21% in simultaneous intervention group, 13.21% in early intervention group, 18.87% in delayed intervention group. ④ The average survival time: Except Chinese herbal medicine group and chemotherapy group, the other groups had significantly longer survival time than that of model group ( $P < 0.05$ ), and there was significant difference between early intervention group and chemotherapy group, between delayed intervention group and chemotherapy group ( $P < 0.05$ ). ⑤ the average optical density of Bcl-2: There were significantly difference between the early intervention group and model group, between delayed intervention group and model group ( $P < 0.05$ ), and also between delayed intervention group and the chemotherapy group, ( $P < 0.05$ ). ⑥ The average optical density of Bax: Except Chinese herbal medicine group and chemotherapy group, the other different drugs intervention group and model group were significantly different ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Delayed intervention group has a greater survival benefit than early intervention group. The mechanism may be associated with expression of apoptotic protein Bcl-2, Bax.

**Key Words** Colon cancer/ Chinese medical therapy; Tonification method

结肠癌(Colon Carcinoma)是一种常见的消化道肿瘤,其发病率居恶性肿瘤的第 4 位<sup>[1]</sup>。由于当前临床应用的结肠癌化疗方案均存在疗效差、缓解率低、毒副反应重和患者耐受性差等问题,ⅢC、IV 期结肠癌五年生存率分别仅为 44.3% 和 8.1%<sup>[2]</sup>,目前公认的治疗方法是手术为主的综合治疗。近年来,中医药在结肠癌的辅助治疗中有较好的疗效,尤其是在化疗增敏减毒<sup>[3]</sup>,治疗结肠癌并发症<sup>[4-5]</sup>、控制症状<sup>[6]</sup>、延长疾病进展时间、生活质量<sup>[7]</sup>等方面均有显著疗效,但是目前国内外在对中医药在化疗期间介入时机的选择中,尚未有明确的方案。益元汤为浙江省中医院沈敏鹤主任医师在长期临证中总结改进的补益法验方,由黄芪、生晒参、猪苓、茯苓、枸杞子、女贞子等组成,我们通过建立人结肠癌 LoVo 细胞裸鼠移植性肿瘤的实验模型,初步评价及探讨中医补益法优化协同化疗治疗结肠癌的有效性及作用机制。

## 1 实验材料

1.1 实验动物 Balb/c - nu 裸鼠,雄性,体重 22 ~ 24g,5 ~ 6 周龄,购于上海西普尔 - 必凯实验动物有限公司,实验动物使用许可证号:syxk(沪)2008 - 0058。饲养于浙江中医药大学动物实验中心无特定病原体动物(SPF)级环境下,室内定期进行紫外线照射,笼具、垫料、饮水、饲料等均严格消毒。

1.2 药物与主要试剂 中医补益法方剂:采用益元汤,由生药材黄芪 30g,生晒参 30g,猪苓 30g,茯苓 30g,枸杞子 15g,女贞子 15g 组成。先用 10 倍生药重量的蒸馏水浸泡 1h,武火煮沸后改文火煎 1h,用 8 层纱布过滤取出药汁,再加入 8 倍水,文火煎 30min,过滤取汁,收集两次煎剂,弃去药渣,文火浓缩成 1.25g/mL (200mL),分装至无菌玻璃瓶内,并沸水浴内煮 30min,冷却后 4℃ 冰箱冷藏。化疗药选用 5 - Fu。细胞选用购于中国科学院细胞库的 LoVo 人结肠癌细胞系,主要细胞培养试剂有购自 Gibco 公司的胎牛血清(FBS)与 F - 12K 培养基等。免疫组化试剂主要有购自 Santa Cruz 公司的兔抗鼠 Bcl - 2 抗体、Bax 抗体与购自 Diclone 公司的 DAB 染色试剂盒等。

1.3 主要仪器 细胞培养实验仪器:Thermo 公司的 5% CO<sub>2</sub> 培养箱 HEPA class100,北京医用离心机厂的自动平衡离心机 LDZ5 - 2,重庆光电公司的倒置显微镜等。动物实验仪器:手术剪、止血钳镊、眼科剪镊、注射器、小鼠灌胃器、游标卡尺等。免疫组化实验仪器:MICROM 公司的 STP120 脱水机、AP280 - 2 包埋机、HM335E 切片机,Nikon 公司的 Nikon eclipse 80i 显微镜,Carl Zeiss 公司的 Carl Zeiss Imaging Systems 等。

万方数据

## 2 实验方法

2.1 LoVo 细胞的培养 人结肠腺癌细胞系 LoVo,培养于含 10% 胎牛血清的 F - 12K 培养基中,在 37℃、CO<sub>2</sub> 体积分数为 5%、饱和湿度的细胞培养箱中培养。细胞接种 24h 后进入指数增长期。隔天换液传代。

2.2 皮下移植模型的建立 取对数生长期的 Lovo 细胞,以 0.25% 胰酶消化离心后用生理盐水稀释,计数板计数将细胞浓度调整为  $1 \times 10^7$ /mL 的细胞悬液;用 1mL 注射器抽取 0.2mL ( $2 \times 10^6$ /只)细胞悬液,接种于小鼠左侧腋下皮下,共 70 只。造模结束后观察小鼠状态良好,无局部出血等。细胞移植后第 7 天观察小鼠,将未成瘤者剔除,并随机抽取荷瘤小鼠 60 只。

2.3 实验分组 将 60 只成功造模的裸鼠用随机数字表随机分为 6 组:中医补益法优化干预组(分提前干预化疗组,同步干预化疗组和延后干预化疗组),化疗组、中医补益法中药组和模型组(简称提前干预组,同步干预组,延后干预组,化疗组,中药组和模型组),每组 10 只。

2.4 给药方法与剂量 细胞移植后,模型组不使用任何药物干预,第 15 ~ 21 天以生理盐水灌胃。化疗组于第 15 ~ 21 天予 5 - Fu 腹腔注射;中药组于第 15 ~ 21 天以中药灌胃;提前干预组,于第 8 ~ 14 天以中药灌胃,第 15 ~ 21 天予 5 - Fu 腹腔注射;同步干预组于第 15 ~ 21 天予 5 - Fu 腹腔注射的同时予中药灌胃;延后干预组于第 15 ~ 21 天予 5 - Fu 腹腔注射,第 22 ~ 28 天以中药灌胃。5 - Fu:用生理盐水稀释为 1mg/mL,0.25mg/10g;益元汤:0.15mL/10g;生理盐水:0.15mL/10g。

2.5 标本采集及处理 细胞移植后第 29 天,即全部用药结束 24h 后,每组眼球放血法处死裸鼠 5 只,剥取皮下瘤块,4% 多聚甲醛固定,梯度乙醇脱水,石蜡包埋瘤块。

2.6 主要观察指标 一般情况观察;肿瘤体积、瘤重、抑瘤率和生存期;免疫组化分析凋亡相关蛋白 Bcl - 2、Bax 的表达与图象分析。

2.7 统计学方法 将收集到的数据应用 SPSS13.0 版本统计软件包进行统计学处理。

## 3 实验结果

3.1 一般情况观察 造模成功后开始每日观察其摄食、摄水、活动状态和肿瘤生长等变化。60 只小鼠接种初期活跃如常,摄食摄水等活动如常,体形无明显改变;6 周左右逐渐出现消瘦,行动迟缓,精神萎靡,摄食量少,瘤块坏死脱落;从第 75 天开始逐渐出现死亡。裸鼠接种 2 ~ 3 天可见皮下接种部位白色细胞聚集小

点,1周时已形成瘤块,可见瘤块为圆形或椭圆形,瘤径约3mm×5mm,2周后逐渐不规则,3周后瘤块表面凹凸不平,或出现局部浸润生长,第29天处死一半裸鼠时可见瘤块与局部皮肤、肌肉紧密粘连,较难分离,未见肝、肺、脾等脏器转移。第5周瘤径约为10mm×10mm,5周后可见瘤块附近皮下血管明显,新生血管形成,6周后逐渐出现消瘦、瘤块坏死脱落。晚期15周左右瘤块坏死腐烂严重。

3.2 肿瘤体积 造模成功后,即皮下注射人结肠癌细胞LoVo第8天,观察皮下瘤块生长情况,此后每天观察1次,直至第29天处死荷瘤裸鼠。采集的组织标本用游标卡尺测量瘤径,计算肿瘤体积。模型组的平均体积最大,为(507.2±14.5)mm<sup>3</sup>,其余依次为中药组、化疗组、同步干预组、提前干预组、延后干预组(见表1)。除中药组外,其余不同药物干预组的肿瘤体积均与模型组比较有统计学意义( $P < 0.05$ );且延后干预组与化疗组比较也有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表1 各组平均肿瘤体积( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	肿瘤体积(mm <sup>3</sup> )
模型组	507.2±14.5
化疗组	478.2±8.3*
中药组	505.8±19.9
提前干预组	454.8±26.7*
同步干预组	465.2±15.8*
延后干预组	446.0±20.8* <sup>△</sup>

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ;与化疗组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

3.3 瘤重和抑瘤率 细胞移植后第29天,即全部用药结束24h后,采集的组织标本平均重量和抑瘤率见表2。模型组的平均瘤重最大,为0.53±0.04g,其余依次为中药组、化疗组、同步干预组、提前干预组、延后干预组。除中药组、化疗组外,其余不同药物干预组的瘤重与模型组比较均有统计学意义( $P < 0.05$ ),延后干预组与化疗组比较也有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表2 各组平均瘤重和抑瘤率( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	平均瘤重(g)	抑瘤率(%)
模型组	0.53±0.04	
化疗组	0.49±0.02	7.55%
中药组	0.52±0.03	1.89%
提前干预组	0.46±0.04*	13.21%
同步干预组	0.46±0.03*	13.21%
延后干预组	0.43±0.03* <sup>△</sup>	18.87%

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ;与化疗组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

3.4 生存期 模型组于第75天逐渐出现死亡,平均生存期为89.20±8.61天;延后干预组平均生存期最长,为130.00±18.47天;其余各组生存期见表3。除中药组与化疗组外,其余不同药物干预组的生存期与

万方数据

模型组比较均具有统计学意义( $P < 0.05$ ),提前干预组、延后干预组与化疗组比较均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表3 各组平均生存期( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	平均生存期(天)
模型组	89.20±8.61
化疗组	101.40±9.01
中药组	96.60±11.93
提前干预组	116.80±12.05* <sup>△</sup>
同步干预组	112.80±12.46*
延后干预组	130.00±18.47* <sup>△</sup>

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ;与化疗组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

3.5 免疫组化分析凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax的表达水平 Bcl-2为Bcl-2蛋白家族中的抗凋亡蛋白,具有BH1-4结构域,主要存在于线粒体膜上,可以抑制细胞凋亡,但却不能促进细胞增殖<sup>[8]</sup>。模型组的Bcl-2平均光密度最大,为0.263±0.008;延后干预组平均光密度最小,为0.215±0.010;其余各组的平均光密度值见表4。提前干预组、延后干预组的Bcl-2平均光密度均与模型组比较有统计学意义( $P < 0.05$ ),延后干预组与化疗组比较也有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表4 各组凋亡相关蛋白的平均光密度( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	Bcl-2	Bax
模型组	0.263±0.008	0.182±0.010
化疗组	0.248±0.017	0.198±0.016
中药组	0.259±0.007	0.180±0.007
提前干预组	0.225±0.019*	0.224±0.023*
同步干预组	0.243±0.018	0.209±0.008*
延后干预组	0.215±0.010* <sup>△</sup>	0.249±0.035* <sup>△</sup>

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ;与化疗组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

Bax为Bcl-2蛋白家族中的促凋亡蛋白,可与抗凋亡蛋白Bcl-2形成异源二聚体,具有抑制Bcl-2的功能。模型组的Bax平均光密度最小,为0.182±0.010;延后干预组平均光密度最大,为0.249±0.035;其余各组的平均光密度值见表4。除中药组和化疗组外,其余不同药物干预组的Bax平均光密度与模型组比较有统计学意义( $P < 0.05$ ),延后干预组与化疗组比较有统计学意义( $P < 0.05$ )。

#### 4 讨论

近年来,中医药在结肠癌的辅助治疗中有较好的疗效,对其作用机理的研究与探讨不断增多。益元汤之“元”字意为元气,而沈敏鹤主任医师认为元气有三元,即上焦一身之气,中焦后天水谷之气,下焦肾精所化之气,三者构成元气,主持人体正常生理功能,缺一不可。故在益元汤组方配伍中三者兼顾。黄芪、生晒参补肺气(上焦之气,一身之气),猪苓、茯苓补脾胃之

气(后天之气、中焦之气),枸杞子、女贞子补肝肾之精气(先天之气、下焦元气),上、中、下三焦之气充盈,共臻外邪可御,内疾不起之效。本实验结果显示:中医补益法协同化疗治疗 LoVo 人结肠癌移植性裸鼠的生存期比化疗组有所延长,延后干预组和提前干预组较之同步干预组有更大的生存获益趋势,延后干预组较之提前干预组有更大的生存获益趋势。中医补益法协同化疗治疗 LoVo 人结肠癌移植性裸鼠的生存期比化疗组有所延长,化疗为祛邪,中医补益法为扶正,二者结合,共臻扶正祛邪而达阴平阳秘之效,延长生存期。刘铁龙<sup>[9]</sup>通过研究发现中药联合化疗治疗组生存率明显优于单纯化疗组。延后干预组和提前干预组较之同步干预组有更大的生存获益趋势,这可能与其在化疗期间,机体的脾胃功能受到损伤有一定相关性<sup>[10]</sup>,使同步干预组的裸鼠对中药的吸收有一定影响,进而影响中药协同化疗的生存获益,延后干预组较之提前干预组有更大的生存获益趋势。中医学认为,补益法的介入以纯虚无邪这一时机为最佳,王素玲等<sup>[10]</sup>也指出中药汤剂的切入,以化疗间歇期为宜,在一周期化疗结束后即据情审证求因,予以合理中药汤剂,脾胃功能恢复较快,对化疗的耐受力增强,为化疗的有序开展保驾护航。而生存期的延长与移植瘤的平均瘤重可能无关,中医中药协同化疗是通过多种途径多种靶点起到抗肿瘤作用的,重视带瘤生存。杨静<sup>[6]</sup>发现,健脾利肠汤能增强体质,有可能使宿主和肿瘤处在相对平衡的状态,从而达到长期“带瘤生存”的治疗效果。中医补益法协同化疗治疗人结肠癌主要是通过扶正来延长总生存

期和改善生存质量,并非一味的通过攻伐祛邪来达到缩小瘤块的效果。

本实验结果提示,延后干预组和提前干预组能协同 5-Fu 促进促凋亡蛋白 Bax 的表达,抑制 Bcl-2,引起细胞凋亡。中医补益法延后干预和提前干预可能通过提高肿瘤细胞对 5-Fu 的敏感性,以提高 5-Fu 对结肠癌 LoVo 细胞的杀伤性,即能协同 5-Fu 促进促凋亡蛋白的降解,促凋亡蛋白的表达。

#### 参考文献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics. CA Cancer J Clin, 2006, 56(2): 106-130.
- [2] O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. J Natl Cancer Inst, 2004, 9(6): 1420-1425.
- [3] 毛喜莲, 黄梅. 健脾益气方药减轻肠癌术后化疗不良反应的临床观察. 山东中医药大学学报, 2005, 29(2): 128-129.
- [4] 陈黎. 复方扶芳藤合剂抗大肠癌术后化疗白细胞减少疗效观察. 广西中医药, 2001, 24(5): 49-50.
- [5] 李华山, 李华宏, 唐宗江, 等. 肠癌康复汤对大肠癌患者术后免疫功能的影响. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(8): 580-582.
- [6] 杨静. 健脾导滞法联合化疗治疗晚期肠癌临床观察. 实用中医内科杂志, 2008, 22(8): 30-31.
- [7] 潘永福, 韩力, 周彩琴. 健脾法对不同病理分期的老年肠癌化疗患者生活质量的影响. 老年医学与保健, 2006, 12(3): 169-171, 176.
- [8] Letai A. Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death. J. Clin. Invest, 2005, 115(10): 2648-2655.
- [9] 刘铁龙, 田振国. 健脾解毒中药联合 FOLFOX 方案治疗结肠癌术后患者的临床研究. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(2): 105-106.
- [10] 王素玲, 郑爱萍. 调理脾胃在现代肿瘤治疗中的作用. 中医药临床杂志, 2008, 20(6): 563.

(2010-12-10 收稿)◎

国家中医药管理局主管 中国中医药行业惟一国家级权威大报



# 中国中医药报

报道中医药一切时效信息

**拥有信息 占得先机**

您想在第一时间获取最新国家中医药方针政策吗?  
 您想在第一时间了解中医药最新科研成果吗?  
 您想在第一时间掌握最新中医药临床经验吗?  
 您想在第一时间知晓中医药学术思想最新动态吗?  
 您想在第一时间学习成功医院的管理模式吗?  
 您想在第一时间研究成功中医药企业文化及研发管理营销案例吗?  
 您想在第一时间搜集中医教育及人才培养资讯吗?  
 您想快速提高自己的医疗水平早日成为名医吗?

欢迎登陆本报网址:  
[www.cntcm.com.cn](http://www.cntcm.com.cn)  
 进入中国中医药报  
 网上书店, 大量医  
 药图书供您挑选。  
 咨询电话: 010-64880746

欢迎订阅中国中医药报, 全国各地邮局全年均可订阅, 本报为周刊, 对开八版  
 邮发代号: 3-140, 每份定价: 0.5元, 全年定价: 15元, 半年定价: 7.5元

如果您错过订阅时间或在订阅方面有任何问题, 请直接与中国中医药报社发行部联系  
 电话: 010-64885367, 64854538  
 网址: [www.cntcm.com.cn](http://www.cntcm.com.cn)