

加味血府逐瘀汤抗肿瘤作用的实验研究

李 延¹ 田 伟² 马中龙³

(1 黑龙江中医药大学附属第一医院, 哈尔滨和平路 24 号, 150040; 2 黑龙江中医药大学; 3 中国传统医学开发研究中心)

摘要 目的: 研究加味血府逐瘀汤对小鼠腹水型 H₂₂ 移植性肿瘤模型的抗肿瘤作用和对 VEGF 的影响。方法: 昆明种雄性小鼠 100 只, 接种 H₂₂ 肝癌细胞, 建立小鼠腹水型 H₂₂ 移植性肿瘤模型, 随机分为 10 组, 分别给予生理盐水、卡培他滨、加味血府逐瘀汤(高、中、低剂量)灌胃, 连续 10 天, 第 11 天处死, 观察抑瘤率、生命延长率的变化; 用免疫组化方法检测 VEGF 在肿瘤中的表达, SPSS13.0 软件作统计学分析。结果: 卡培他滨、加味血府逐瘀汤(高、中、低剂量)组的抑瘤率分别为 60%、49%、41%、35%, 生命延长率分别为 1.68%、157.98%、70.58%、49.57%。结论: 加味血府逐瘀汤能明显抑制荷瘤小鼠肿瘤细胞增殖, 明显延长荷瘤小鼠的生存时间, 降低肿瘤组织和瘤周组织中的 VEGF 表达。

关键词 加味血府逐瘀汤; H₂₂ 小鼠模型; 抑瘤率; 生命延长率

Anti-tumor Effect of Modified Xuefu Zhuyu Decoction

Li Yan¹, Tian Wei², Ma Zhonglong³

(1. First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Add.: No. 24, Heping Road, Haerbin, Heilongjiang Province, Post code: 150040; 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine; 3. Traditional Chinese Medicine Research and Development Center)

Abstract Objective: To investigate anti-tumor effect of Modified Xuefu Zhuyu Decoction and its impact on VEGF. **Methods:** Adult male mice (n = 100), inoculated with H₂₂ hepatoma cells, were randomized to 10 groups and administered saline, capecitabine, Modified Xuefu Zhuyu Decoction (high, medium and low dose). Tumor inhibition rate, life extension rate and the expression of VEGF in tumors were detected on Day11. **Results:** Tumor inhibition rate of Capecitabine and Modified Xuefu Zhuyu Decoction at high, medium and low dose were 60%, 49%, 41%, 35%, life extension rate: 1.68% 157.98%, 70.58%, 49.57%. **Conclusion:** Modified Xuefu Zhuyu Decoction can inhibit tumor cell proliferation in tumor bearing mice, significantly prolong the survival time of mice, and reduce expression of VEGF in the tumor tissue.

Key Words Modified Xuefu Zhuyu Decoction; H₂₂ mice model; Inhibition rate of tumor; Life extension rate

原发性肝癌(HCC)是我国常见的恶性肿瘤,由于起病隐匿,确诊时多已属中晚期,治疗效果差,预后恶劣,严重威胁人们的生命与健康。故研发安全有效的治疗 HCC 的药物和方法,是国内外广大医务工作者的重要课题。我们研究了加味血府逐瘀汤对小鼠腹水型 H₂₂ 移植性肿瘤模型的抗肿瘤作用和对 VEGF 的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 昆明种清洁级小鼠 100 只,雄性,体重 18~22g,6~8 周龄。购自黑龙江中医药大学实验动物中心,置于温度 20℃ 左右,湿度 63% 左右,室内,以普通小鼠饲料喂养。

1.2 肝癌瘤株 小鼠 H₂₂ 腹水型肝癌瘤株,购自黑龙江肿瘤病防治研究所,清洁级昆明种小鼠传代。

1.3 实验药物 加味血府逐瘀汤:由黑龙江中医药大学附属医院药厂制备,每毫升含生药 1g。然后根据所需浓度再加以浓缩。卡培他滨(希罗达):购于哈尔滨医科大学附属肿瘤医院,上海罗氏制药有限公司生产,批准文号:国药准字 H20073024。

1.4 实验仪器 医用净化工作台(苏州净化设备厂), 万方数据

电子分析天平(沈阳龙腾电子有限公司),超低温冰箱(日本三洋公司),光学显微镜(日本 Olympus 光学仪器公司),CAPP 微量加样器(丹麦产 200μL、10μL)。

1.5 实验制剂 无水乙醇、二甲苯、苏木素液、双氧水溶液、氢氧化钠溶液等试剂均购自哈尔滨万腾医疗器械化学试剂批发站。小鼠 VEGF 抗体,辣根标记抗兔 PV-6011(二抗)、辣根标记抗小鼠 PV-6002(二抗)购自北京中杉金桥生物技术有限公司生产。

1.6 实验方法 建立小鼠 H₂₂ 肿瘤模型,造模 24h 后,根据随机数字表将 50 只模型小鼠随机分成 5 组,每组 10 只。灌胃给药 10 天,每日 1 次。模型组(A 组):给予 0.9% NaCl 0.4mL/20g,阳性对照组(B 组):给予希罗达 375mg/kg,0.4mL/20g,低、中、高剂量组(C、D、E 组):分别给予加味血府逐瘀汤 12.5g/kg、25g/kg、50g/kg,0.4mL/20g。将其余 50 只模型小鼠根据体重分层随机分为 5 组,每组 10 只,组别和给药剂量同前。每日灌胃给药,连续 10 天后,改为每 3 天给药 1 次。

1.7 检测指标 抑瘤率:末次给药 24h 后,称小鼠体重,用脊髓脱臼法处死小鼠,右上肢腋下皮肤常规消毒,剥离腋窝处瘤体,分析天平称取瘤重,计算抑

瘤率。生命延长率：给药 10 天后开始记录各组动物死亡时间（以天为单位计算）。结果用平均存活天数和生命延长率表示。VEGF：制作病理切片，用免疫组化方法检测 VEGF。免疫组化实验结果判定标准：每组随机选取 10 个高倍视野（ $\times 400$ ），计数 1000 个癌细胞，计算出阳性细胞数百分比。VEGF 阳性表达为肿瘤细胞浆内出现棕黄色颗粒。计算结果后用数码相机照相。

1.8 统计学方法 统计使用 SPSS13.0 软件分析。

2 结果

2.1 抑瘤率 将肿瘤取出后，称取瘤重，计算平均瘤重及抑瘤率。结果显示，生理盐水组肿瘤明显重于其他 4 组，抑瘤率以西药组最高，加味血府逐瘀汤各剂量组也有明显的抑瘤作用，其结果见表 1。

表 1 加味血府逐瘀汤对 H₂₂ 荷瘤小鼠的抑瘤作用

组别	鼠数	瘤重(g)	抑瘤率(%)	P 值
A	10	1.96 ± 0.41	—	
B	10	0.78 ± 0.27	60	$P < 0.01$
C	10	1.27 ± 0.34 **	35	$P < 0.05$
D	10	1.16 ± 0.32 **	41	$P < 0.05$
E	10	1.00 ± 0.30 *	49	$P < 0.01$

注：与阳性对照组比较，A：模型组，B：阳性对照组，C：JW 低剂量组，D：JW 中剂量组，E：JW 高剂量组。* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

2.2 对生命延长率的影响 加味血府逐瘀汤能明显延长 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠的生存时间，与模型组和阳性对照组比较具有统计学意义（ $P < 0.01$ ），结果见表 2。

表 2 对 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠生命延长率的影响（ $\bar{x} \pm s$ ）

组别	鼠数	平均生存时间(d)	生命延长率(%)
A	10	11.9 ± 2.01	—
B	10	12.1 ± 2.83	1.68
C	10	17.8 ± 3.43 ** Δ	49.57
D	10	20.3 ± 3.71 ** Δ	70.58
E	10	30.7 ± 4.18 ** Δ	157.98

注：* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，与模型组比较； $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ ，与阳性对照组比较。A：模型组，B：阳性对照组，C：JW 低剂量组，D：JW 中剂量组，E：JW 高剂量组。

2.3 免疫组化实验结果 A 组 VEGF 表达明显高于其他 4 组，组间比较具有统计学意义（ $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ），加味血府逐瘀汤中、高剂量组与希罗达组比较无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。具体结果见表 3。

3 讨论

原发性肝癌（HCC）是我国最常见的恶性肿瘤之一，其发病率和死亡率呈逐年上升的趋势，目前仍以手术治疗为主，但术后复发率高，5 年生存率较低，且多数患者发现时已经失去了手术治疗的机会，其他治疗

手段也不甚理想。近年来中医药治疗肿瘤越来越受到国内外同仁的关注和认同，我们将血府逐瘀汤加入山慈菇、人参、蜈蚣，组成加味血府逐瘀汤，对 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠进行了抗肿瘤作用的研究。

表 3 对 H₂₂ 肝癌腹水瘤荷瘤鼠 VEGF 表达率的影响

组别	鼠数	VEGF(%)	P 值
A	10	77.3 ± 12.01	
B	10	38.4 ± 4.10	$P < 0.01$
C	10	55.6 ± 7.70 *	$P < 0.05$
D	10	36.3 ± 4.80	$P < 0.01$
E	10	37.1 ± 5.70	$P < 0.01$

注：* $P < 0.05$ ，与 B 组比较，A：模型组，B：阳性对照组，C：JW 低剂量组，D：JW 中剂量组，E：JW 高剂量组。

本课题研究结果显示加味血府逐瘀汤能明显抑制 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠的肿瘤生长，低、中、高剂量组的抑瘤率分别为 35%、41%、49%，虽然作用弱于卡培他滨组（60%），但本实验显示加味血府逐瘀汤的抑瘤作用与剂量呈正相关，如果加大剂量，其作用还会有所增强，我们将进一步研究。

评价一个抗肿瘤药物的优劣，最主要的是看其疗效和对生活质量的影响，疗效中应以生存时间为首位。本实验结果显示加味血府逐瘀汤低、中、高剂量组对 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠的生命延长率分别为 49.57%、70.58%、157.98%，与阳性对照组（卡培他滨组为 1.68%）比较均具有统计学意义（ $P < 0.01$ ），说明加味血府逐瘀汤能明显延长 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠的生存时间。结果表明加味血府逐瘀汤组对荷瘤小鼠体重无明显影响，且精神状态较模型组和阳性对照组均佳。

VEGF（血管内皮生长因子）是促进血管新生最重要的生长因子，是现今为止所知的作用最强的促血管生成因子，可促进血管内皮增殖、迁移，调节内皮细胞的凋亡通路，阻碍内皮细胞凋亡过程，它是一种选择性促内皮细胞有丝分裂原，通过与 VEGF 受体结合，增加血管通透能力，引起一系列信号传导，促进内皮细胞的增殖，对肿瘤的浸润转移具有重要的意义。VEGF 可促进血管内皮分裂，促进血管新生，增加血管通透性，促进血浆纤维蛋白的外渗，产生纤维网格，有利于毛细血管网及肿瘤间质的形成^[1]。肝癌的血管生成对于肝癌的发生、侵袭、转移具有重要的作用^[2-3]。有研究表明，实体瘤达到 2~3mm³ 时，如果没有新的血管生成，肿瘤将不再生长且不会发生转移，一直处于“冬眠状态”^[4]。肝癌是典型的多血管肿瘤，因而抗血管治疗是一种最有希望的治疗方法。因此，通过观察药物对瘤体中 VEGF 的表达的影响可以探讨其作用机制。

实验结果显示 A 组 VEGF 表达明显高于其他 4

组,组间比较具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),加味血府逐瘀汤中、高剂量组与希罗达组比较无统计学意义($P > 0.05$)。本研究结果表明:加味血府逐瘀汤能明显抑制 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠的肿瘤生长,延长其生存期,对血管内皮生长因子具有抑制作用,值得进一步研究。

参考文献

[1] Inoshima N, Nakanishi Y, Minami T, et al. The influence of dendritic cell

infiltration and vascular endothelial growth factor expression on the prognosis of non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res, 2002, 8(11): 3480-3486.

[2] Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin Oncol, 2002, 29(6 Suppl 16): 15-18.

[3] Cha C, Dematteo RP. Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2005, 19: 25-37.

[4] N. Ferrara, VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. Nat. Rev. Cancer, 2002, 2: 795-803.

(2010-06-06 收稿)

祛风止痛胶囊治疗腰椎间盘突出症 150 例

张明坤

(甘肃临夏中国人民解放军七医院心内科, 731100)

关键词 祛风止痛胶囊; 腰椎间盘突出症/中医药疗法

腰椎间盘突出症(LDH)是由于椎间盘变性,纤维环破裂,髓核突出刺激或压迫神经根、马尾神经所表现出的一种综合征。80%~90%的患者治疗以非手术治疗为主。为探讨和观察祛风止痛胶囊治疗腰椎间盘突出症功效和作用机理,疗效和安全性,笔者于2009年2月-2011年3月,对250例LDH患者通过临床随机对照试验进行了系统的临床试验研究,现将试验结果报道如下。

1 一般资料

250例患者,均经CT或MRI检查阳性,符合LDH的诊断。其中男150例,女100例;年龄17~55岁,平均42岁;病程3天~9年,平均病程1年2个月;其中L₄~L₅椎间盘突出150例,L₅~S₁椎间盘突出100例,首次发病146例,反复发作104例。分组采用随机原则,各150例。全部病例符合中西医诊断标准,按照中华人民共和国卫生部制定发布的《中药新药临床指导原则》,1997年第三辑中的“中药新药治疗腰椎间盘突出症的临床研究指导原则设计”。

2 治疗方法

对照组150例单纯行腰椎理疗,每日1次,每次理疗30min。治疗组150例除牵引及理疗外加祛风止痛胶囊(陕西步长制药有限公司产品),每粒装0.3g,每次服6粒,每日2次,另外2组患者均卧床休息10天,疗程均为1个月。

3 疗效观察

观测指标:1)安全性观测:包括一般体检项目检查、血尿粪常规检查、心电图和肝肾功能检查、可能出现的不良反应。2)疗效观测:疗效评定标准是根据《中医病证诊断疗效标准》。治愈:腰腿痛消失,直腿抬高

70度以上,能恢复原工作。好转:腰腿痛减轻,腰部活动功能改善。未愈:症状、体征无改善。3)2组的比较:分别对患者治疗前及治疗后14天及30天的腰痛和下肢放射痛程度评估及直腿抬高试验度数进行比较和观察变化。应用模糊视觉疼痛评分(VAS)对疼痛程度进行评估,0分完全改善无疼痛;1~3分症状明显好转,仍有轻微疼痛;4~6分症状有所好转,有中度疼痛;7~10分症状无改善,有明显疼痛。数据以均数±标准差表示。4)安全性评价:所有患者行血、尿、大便常规,肝、肾功能和心电图检测,治疗前后均无异常变化,服药期间无明显不良反应,治疗组少数患者初次服药时有胃部不适,但可耐受。

统计学方法:组间比较采用 t 检验, $P < 0.01$ 为有统计学意义。

4 结果

治疗组治愈率36.2%,显效率54.2%,总有效率90.4%,对照组分别为23.3%、32.0%、55.3%,2组比较差异有统计学意义。

5 讨论

腰椎间盘突出症是骨科常见病、多发病之一。主要表现为腰腿疼痛、麻木、活动受限,临床上以L₄~L₅、L₅~S₁椎间隙为最多见,严重者往往疼痛剧烈,坐卧不宁。腰椎间盘突出症属于中医学“腰痛”“痹证”的范畴。病机为本虚标实,本虚为肝肾不足,标实为外感风寒湿邪,气血瘀滞,不通则痛。治疗以祛风散寒除湿,活血行气通滞,舒通筋络为原则。祛风止痛胶囊具有祛风止痛,舒筋活血,强壮筋骨等功能,镇痛、活血化瘀、消炎等作用,并能提高免疫功能。本组数据显示,祛风止痛胶囊治疗腰椎间盘突出症疗效肯定,服用方便、安全可靠,无不良反应。

(2011-08-29 收稿)◎