

苏木与扶正药物配伍对 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌生长及转移的影响

张和韡 田 甜 赵丹丹 段宇航 高思华 马淑然 张淑静

(北京中医药大学基础医学院,北京,100029)

摘要 目的:观察苏木配伍不同扶正药物对 Lewis 肺癌生长和转移的影响。方法:建立 Lewis 肺癌 C57BL/6 小鼠肿瘤模型,随机分为 6 组:对照组、苏木组、苏木黄芪组、苏木当归组、苏木附子组、苏木麦冬组,连续灌胃给药 21 d。于第 21 天处死小鼠,观察各组抑瘤率、抑转移率。结果:苏木配伍不同的扶正药物对肿瘤均有抑制作用($P < 0.05$),苏木当归组、苏木麦冬组、苏木附子组抑制肿瘤效果优于苏木($P < 0.05$)。结论:苏木配伍扶正药物可抑制肿瘤生长和转移。

关键词 苏木;活血化瘀;Lewis 肺癌

The effect of lignum sappan with different tonifying drugs on Lewis lung cancer

Zhang Hewei, Tian Tian, Zhao Dandan, Duan Yuhang, Gao Sihua, Ma Shuran, Zhang Shujing

(School of Basic Medicine of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of lignum sappan with different tonifying drugs on growth and metastasis of Lewis lung cancer (LLC). **Methods:** Lewis lung carcinoma C57BL/6 mouse tumor models were randomly divided into six groups: the control group, lignum sappan group, lignum sappan + astragalus group, lignum sappan + Angelica group, lignum sappan + Aconite group, lignum sappan + Liriope group. Continuous oral administration 21 days. Mice were sacrificed on the 21th day. Inhibition rate and suppressing metastasis rate were observed. **Results:** lignum sappan with different tonifying drugs could inhibit the growth and metastases of LLC ($P < 0.05$), lignum sappan + Angelica sinensis group, lignum sappan + Liriope group, lignum sappan + Aconite group were better than lignum sappan group. ($P < 0.05$). **Conclusion:** Drugs compatibility of lignum sappan with tonifying drugs and could inhibit tumor growth and metastasis.

Key Words Lignum sappan; Blood circulation; Lewis lung carcinoma

中图分类号:R256.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.12.059

恶性肿瘤是严重危害人类生命健康的重大疾病,并且由于环境污染、食品安全、不良的生活方式等问题凸显,使得恶性肿瘤的发病率逐年上升。而单纯的手术、化疗、放疗等治疗方法也往往达不到令人满意的效果。作为肿瘤的辅助和替代治疗,中药治疗肿瘤越来越受到重视,在配合放化疗增效减毒、术后防治肿瘤转移复发、晚期肿瘤单独应用改善临床症状、提高生存质量带瘤生存,延长远期生存期等方面均积累了丰富经验^[1]。近期有研究发现,中药可通过上调 microRNAs 的表达从而达到抑制肿瘤的目的^[2]。

肿瘤与中医“症瘕”“积聚”等疾病描述内容相近,中医药治疗肿瘤的优势在于辨证论治,中医通过四诊发现,肿瘤患者普遍存在血瘀证的病机特点,认为肿瘤的发生、发展与血瘀状态关系密切,因此治疗

上经常采用活血化瘀药,但学者们对于肿瘤患者是否应该使用活血化瘀药意见不一,有学者认为活血化瘀药从多方面、多角度、多靶点抑制肿瘤的发生、发展^[3-6],研究显示具有活血化瘀相类似作用的肝素在肿瘤治疗中具有抗肿瘤血管形成、抗肿瘤生长作用,还能够降低细胞黏附能力,减少肿瘤浸润、转移^[7-8]。而另有学者认为,“血瘀”可能是机体在肿瘤疾病状态下的一种自我保护适应机制,血瘀状态能够抑制原发肿瘤的生长及转移的发生^[9],活血化瘀药物有改善血液循环、提高细胞运动能力的作用,可能在一定程度上能够促进肿瘤转移。相关研究也显示,活血化瘀药有促进肿瘤转移的作用^[10-11]。田甜等^[12]通过动物实验研究发现,水蛭、川芎、鸡血藤、苏木等不同种类的活血化瘀药对肿瘤的生长及转移的影响不尽相同,其中以活血疗伤药苏木的抑

基金项目:北京中医药大学 2015 年度基本科研业务费项目(编号:2015-JYB-JSMS006)

作者简介:张和韡(1988.04—),男,北京中医药大学 2015 级在读博士,主要从事中医藏象理论研究,E-mail:nzhzw@aliyun.com

通信作者:田甜(1983.03—),女,博士,北京中医药大学中医基础理论教研室讲师,主要从事中医藏象理论研究和中医药治疗肿瘤研究,E-mail:tt8324@163.com

瘤作用为著,并且发现在肿瘤早期作用明显,随着病期延长,作用逐渐减弱。根据肿瘤患者晚期多以正气亏虚为主的病机特点,本实验通过观察苏木分别配伍补气药黄芪、补血药当归、温阳药附子、滋阴药麦冬对 C57BL/6 小鼠移植性 Lewis 肺癌生长及转移的影响,以期为提高活血化瘀药抗肿瘤疗效探寻较好的配伍方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级近交系 C57BL/6 雄性小鼠,6~8 周龄,体重 18~22 g,购自中国医学科学院实验动物研究所(许可证号:SCXK(京)2011-0004)。

1.2 细胞株 具有自发肺转移潜能的高转移 Lewis 肺癌瘤株,移植率 100%,来源:国家实验细胞资源共享平台(China Infrastructure of Cell Line Resource)。

1.3 药物 单药苏木煎出液(生药浓度为 1 500 g/L),苏木黄芪煎出液(苏木黄芪比为 1:3,生药浓度为 6 000 g/L),苏木当归煎出液(苏木当归比为 1:1,生药浓度为 3 000 g/L),苏木附子煎出液(苏木附子比为 1:1,生药浓度为 3 000 g/L),苏木麦冬煎出液(苏木麦冬比为 1:1,生药浓度为 3 000 g/L)。5 组苏木基本方的稀释浓度是按照每千克体重小鼠用量相当于成人(按 60 kg 计)临床用量 10 倍推算得出,稀释液苏木生药浓度均为 0.15 g/mL。成人每日临床用量按苏木 10 g 计。药物由北京同仁堂药业提供。

1.4 肺癌细胞移植 将小鼠 Lewis 肺癌细胞从液氮中复苏,于 C57BL/6 小鼠右腋下接种,严格传代 2 次后,在接种后第 21 天将小鼠脱颈椎处死,超净工作台下无菌取出新鲜生长良好无坏死的肿瘤组织,剪碎,用玻璃匀浆器将肿瘤组织研磨成单细胞悬液(按癌细胞株:生理盐水为 1:3 的比例),过 300 目尼龙网,调整细胞数为 1×10^7 /mL,活细胞大于 95%(台盼蓝拒染试验),将癌细胞悬液接种于小鼠右腋下,0.2 mL/只^[13]。

1.5 给药方法 将 60 只小鼠随机分为 6 组,每组 10 只。对照组自接种后 24 h 给予小鼠蒸馏水灌胃,0.2 mL/d。5 个中药组:苏木组、苏木黄芪组、苏木当归组、苏木附子组、苏木麦冬组自接种后 24 h 给予小鼠中药灌胃,0.2 mL/d。

1.6 观察指标 每日记录小鼠体重,观察接种肿瘤生长情况。于接种 21 d 脱颈椎处死,剥离肿瘤组织,记录肿瘤组织重量、肺转移灶情况。计算各组抑瘤率、转移率、抑转移率。

1.6.1 抑瘤率 接种 21 d 脱颈椎处死小鼠,精密电子天平称量瘤重(精确到 0.01 g),按以下公式计算抑瘤率:抑瘤率(%) = [对照组平均瘤重(g) - 实验组平均瘤重(g)] / 对照组平均瘤重(g) × 100%

1.6.2 肺转移灶发生率 将取出小鼠肺组织用 35%~40% 甲醛溶液固定,24~48 h 后观察,正常肺组织呈黄色,白色隆起为肿瘤转移灶,肿瘤转移灶大小及数目观察均在解剖显微镜下进行。按转移灶的大小对肿瘤转移灶进行分级。I 级:直径小于 0.5 mm;II 级:直径 0.5~1 mm;III 级:直径 1~2 mm;IV 级:直径大于 2 mm。其总转移数计算公式如下:

$$\text{总转移数} = \text{I 级(结节数)} \times 1 + \text{II 级} \times 2 + \text{III 级} \times 3 + \text{IV 级} \times 4^{[14]}$$

肺转移抑制率(%) = [对照组肺转移灶数(个) - 实验组肺转移灶数(个)] / 对照组肺转移灶数(个) × 100%

1.7 统计学方法 用 SPSS 16.0 统计软件,多个样本均数比较采用方差分析,组间两两比较用 SNK-q 检验。多个率的比较用 CMH χ^2 检验。以 $\alpha = 0.05$ 作为检验标准。

2 结果

2.1 各组小鼠体重的比较 各组小鼠之间体重的比较差异无统计学意义($P = 0.155 > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠体重的比较

| 组别 | 只数 | 体重(g) |
|-------|----|--------------|
| 对照组 | 10 | 24.26 ± 2.92 |
| 苏木组 | 10 | 22.44 ± 2.33 |
| 苏木黄芪组 | 10 | 23.08 ± 1.75 |
| 苏木当归组 | 10 | 21.87 ± 2.63 |
| 苏木附子组 | 10 | 22.51 ± 2.49 |
| 苏木麦冬组 | 10 | 24.14 ± 1.83 |

2.2 瘤重及抑瘤率的比较 各组之间瘤重差异无统计学意义($P > 0.05$)。对照组及苏木组 $P = 0.119 > 0.05$,2 组之间瘤重差异无统计学意义。对照组及苏木黄芪组 $P = 0.028 < 0.05$,2 组之间瘤重差异有统计学意义。对照组与苏木当归组 $P = 0.000 < 0.05$,2 组之间瘤重差异有统计学意义。对照组与苏木附子组 $P = 0.001 < 0.05$,2 组之间瘤重差异有统计学意义。对照组与苏木麦冬组 $P = 0.002 < 0.05$,2 组之间瘤重差异有统计学意义。苏木组与苏木当归组 $P = 0.021 < 0.05$,2 组之间瘤重差异有统计学意义。见表 2。

2.3 肺转移灶情况 第 21 天各组间均未见肺内转

移灶。

表2 各组之间瘤重及各组抑瘤率比较(g/%)

| 组别 | 只数 | 瘤重(21 d) | 抑瘤率(21 d) |
|-------|----|-------------|-----------|
| 对照组 | 10 | 0.98 ± 0.23 | — |
| 苏木组 | 10 | 0.75 ± 0.07 | 23.46 |
| 苏木黄芪组 | 10 | 0.78 ± 0.18 | 20.41 |
| 苏木当归组 | 10 | 0.64 ± 0.15 | 31.63 |
| 苏木附子组 | 10 | 0.63 ± 0.07 | 35.71 |
| 苏木麦冬组 | 10 | 0.69 ± 0.33 | 25.51 |

注:经CMH χ^2 检验,苏木及其复方抑瘤率差异无统计学意义。

3 讨论

与国外恶性肿瘤控制情况不同^[15],学者调查发现过去30年内中国肿瘤发病率成上升趋势,通过分析相关数据,预测未来30年内肿瘤发病率还将继续上升^[16],因此肿瘤防治迫在眉睫。

古代医学虽然没有提出恶性肿瘤的概念,但仍有相关记载。《圣济总录》中说到“瘤之为义,留滞不去也”。对于恶性肿瘤的相关表现,《素问·玉机真脏论》描述为“大骨枯槁,大肉陷下,胸中气满,喘息不便,内痛引肩项,身热,脱肉破腠,真脏见,十月之内死”。对于其治疗,明·张景岳《景岳全书》说“凡积聚之治,如经之云者,亦既尽矣。然欲总其要,不过四法,曰攻,曰消,曰散,曰补,四者而已”。从中医角度来说,肿瘤最大的特点为留滞不去,“瘀”贯穿疾病始终。回顾性研究显示^[17],诊断特发性静脉血栓的患者罹患肿瘤的风险是其他患者的4~7倍,并构成肿瘤发生的预警信号。据报道^[18],90%恶性肿瘤患者存在高凝状态。微循环功能紊乱是癌细胞转移的首要条件,恶性肿瘤患者血液流变学改变随病情加重而增加,血液流变学异常对恶性肿瘤转移可能具有促进作用^[19-20]。因此,活血化瘀治疗应贯穿疾病治疗整个过程中。由于各种肿瘤在疾病发生与发展过程中高凝状态程度有明显不同^[21],并且患者可能合并气血阴阳亏虚等不同兼证、肿瘤患者所处疾病分期不同,因此造成学者对肿瘤患者是否使用活血药物存在不同意见。有学者报道^[22],肿瘤治疗过程中活血化瘀药联合扶正、解毒类中药能明显提高患者远期生存率,而单纯使用活血类中药治疗则有增加肿瘤远处转移的可能。

通过关联分析肿瘤方药,有学者发现,临床治疗肿瘤的方药除了常用活血药物外,常配伍益气健脾、温阳散寒等药物,提示合并其他药物治疗优于单纯活血药物治疗。我们此次通过观察接种肿瘤细胞21 d的小鼠的肿瘤情况,发现单纯使用苏木抑制肿瘤效果与空白组差异无统计学意义($P > 0.05$),结

合我们以往的研究数据^[12],提示苏木抑瘤作用随着病程进展逐渐减弱,因此苏木抑瘤效果不显著可能与肿瘤处于中晚期有关。

对于肿瘤的成因,《灵枢·百病始生》云:“积之所生,得寒乃成,厥乃成积。”《诸病源候论》说道:“积聚者,由寒气在内所生也。血气虚弱,风邪搏于脏腑,寒多则气涩,气涩则生积聚也。”有学者报道温阳法运用临床治疗肿瘤及其并发症均取得良好疗效^[23];通过分析相关文献,发现温阳类中药可明显提高肿瘤微环境及化学癌环境中骨髓间充质干细胞的遗传稳定性,抑制肿瘤的发生及转移^[24]。有学者认为^[25],阳气不足则脏腑功能衰弱,津液精血停滞,且阳气虚复又易遭受寒邪侵犯,日久易成症积之症,当治以温阳之法。据报道^[26],肿瘤的治疗尤其对肺癌治疗提倡运用温补肾阳之法,处方用药多用附子,疗效明显。提示肿瘤过程中温阳的重要性,我们研究也发现,苏木联合温阳药附子抑瘤效果优于单纯苏木及空白组。

近代学者指出“癌毒”是恶性肿瘤发生发展的关键因素,有学者提出“阴虚癌瘤相关”假说,认为阴虚毒蕴是恶性肿瘤发生的基本病机^[27]。研究发现,滋阴药可以提高小鼠的抗肿瘤免疫功能和减少炎症反应因子产生来延缓肺肿瘤的发生发展^[28],临床报道也表明滋阴类中药可明显降低化疗不良反应,提高化疗疗效^[29]。我们实验结果发现苏木联合补血药当归、温阳药附子以及滋阴药麦冬与空白组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),提示苏木与补血、温阳、滋阴药配伍在抑制肿瘤方面具有协同作用。实验过程中肉眼观察并未发现肿瘤的肺部转移,但不能排除隐匿性转移的可能,我们在下一步实验中将进一步证实。

因此,单纯使用活血药物并不能改善肿瘤患者的最终结局,但结合使用其他药物则可能改善患者的远期生存率。肿瘤患者以“瘀”为病理因素贯穿疾病始终,但所处疾病阶段不同,矛盾主次有别。早期以“邪实”为突出矛盾,因此单纯使用活血药物有较好疗效;疾病后期正气渐虚,“邪实”仍在,但以“正虚”为主要矛盾,活血化瘀类药物多攻伐之品,有损正气,后期治疗单纯使用活血药物则损耗正气,不利于抗邪,可能会导致肿瘤的侵袭及转移,因此宜根据邪正关系而适当配伍。

苏木为常用的活血化瘀药,性味咸寒,能入血分,达活血散瘀、消肿止痛功效,古方多用于外伤、妇女月经病及产后血瘀疼痛、心腹疼痛、痈肿疮毒等瘀

血阻滞病证。苏木含有巴西苏木酚、挥发油(主要为水芹烯、罗勒烯)及鞣质,相关研究发现苏木具有抗肿瘤功能^[30-31]。我们通过实验发现,苏木复方制剂与单纯苏木及对照组相比具有明显抗肿瘤效果,提示附子、当归、麦冬有助于扶助正气,增强苏木的抑瘤作用。然而活血药苏木及其复方是否能提高小鼠的远期生存率及抑制肿瘤转移则需要更深入的研究方能得出可靠结论。

参考文献

- [1] 吴万垠. 中医药在恶性肿瘤治疗中的“替代”与“补充”作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(1): 111-114.
- [2] Ming Hong, Ning Wang, Hor Yue Tan, et al. MicroRNAs and Chinese Medicinal Herbs: New Possibilities in Cancer Therapy [J]. *Cancers (Basel)*, 2015, 7(3): 1643-1657.
- [3] 王朋, 张慧玲. 活血化瘀治法在肿瘤治疗中的应用[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(24): 2735-2736.
- [4] 赵莉莉, 王国平, 任连生. 苏木抗癌活性成分的研究[J]. 肿瘤研究与临床, 2012, 24(3): 157-160.
- [5] 孙艳, 李琦. 活血化瘀中药对癌转移影响的最新进展[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(9): 1663-1665.
- [6] 储真真. 活血化瘀中药对恶性肿瘤形成和转移影响机制探讨 [A]. 2009 年国际中医肿瘤大会中国天津, 中华中医药学会(中华中医药学会肿瘤分会) [C]. 2009: 386-389.
- [7] 马琳艳, 刘浩, 蒋志文. 肝素与硫酸乙酰肝素相关抗肿瘤药物的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(9): 1193-1196.
- [8] 陈楠, 徐昆. 肝素、抗凝血酶Ⅲ在肿瘤治疗中的应用与展望[J]. 重庆医学, 2011, 40(20): 2062-2064.
- [9] 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.
- [10] 丁荣杰, 唐德才. 三棱、莪术对移植性肝癌大鼠 VEGF 的影响 [J]. 中华实用中西医杂志, 2005, 18(18): 1047-1048.
- [11] 黄兆明, 何小琴. 丹参、赤芍、莪术对小鼠 Lewis 肺癌血管生成的影响[J]. 实用中西医结合临床, 2006, 6(1): 74-75.
- [12] 田甜, 张培形, 于明薇, 等. 苏木对 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌不同时间生长和转移的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(7): 733-737.
- [13] 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997: 370.
- [14] 高进. 癌的侵袭与转移[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1996: 62.
- [15] Brenda K. Edwards, Elizabeth Ward, Betsy A. Kohler, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2006, Featuring Colorectal Trends and Impact of Interventions (Risk Factors, Screening, and Treatment) to Reduce Future Rates [J]. *Cancer*, 2010, 116(3): 544-573.
- [16] 徐宁志, 董志伟. 中国肿瘤流行状况与防治对策述评[J]. 肿瘤防治杂志, 2003, 10(1): 5-8.
- [17] Prandoni P, Lensing AWA, Buller HR, Buller HR, et al. Deep-vein thrombosis and the incidence of subsequent symptomatic [J]. *Cancer*, 1992, 327: 1128-1133.
- [18] Falanga A, Rickles FR. Pathophysiology of the thrombophilic state in the cancer patients [J]. *Semin Thromb Hemost*, 1999, 25: 173-182.
- [19] Sørensen HT, Møllekjær L, Steffensen FH, et al. Incidence of cancer after primary deep venous thrombosis or pulmonary embolism [J]. *Lakartidningen*, 2000, 97(16): 1961-4.
- [20] 邓媛. 恶性肿瘤患者血液流变学诊疗意义分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(6): 589-595.
- [21] 郑洋, 孙霏, 董青, 等. 恶性肿瘤高凝状态发病机制与诊断标准探讨[J]. 中国医刊, 2014, 49(5): 16-20.
- [22] 张永琴, 韦艾凌. 活血化瘀法治疗恶性肿瘤的思考[J]. 广西中医药大学学报, 2014, 17(2): 73-75.
- [23] 王轶辉, 沈敏鹤. 温阳法辨治肿瘤概况 [J]. 浙江中医杂志, 2012, 47(6): 456-457.
- [24] 高卓越, 刘永琦, 何建新, 等. 温阳益气法对肿瘤微环境中骨髓间充质干细胞炎性平衡及遗传稳定性的调控[J]. 中国组织工程研究, 2015, (14): 2267-2272.
- [25] 黄金昶. “以毒攻毒”“温阳”“破淤”“通利二便”四法治疗肿瘤之我见[J]. 中国临床医生, 2005, 33(10): 51-52.
- [26] 李雁. 刘嘉湘在肺癌治疗中温肾法的运用[J]. 中医杂志, 2003, 44(11): 818-820.
- [27] 孙有志, 刘红宁, 朱卫丰, 等. “阴虚癌瘤相关”假说的提出及其意义[J]. 江西中医学院学报, 2008, 20(4): 1-5.
- [28] 郭慧君, 朱金华, 刘春花, 等. 不同滋阴中药对小鼠诱发性肺肿瘤发生及抗肿瘤免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 226-229.
- [29] 王广占, 赵静梅, 窦永起. 益气滋阴固本方联合 DP 方案治疗中晚期肺癌的临床研究[J]. 现代仪器与医疗, 2013, 19(3): 38-40.
- [30] 赵莉莉, 王国平, 任连生. 苏木抗癌活性成分的研究[J]. 肿瘤研究与临床, 2012, 24(3): 157-160.
- [31] 客蕊, 华东, 孟涛, 等. 苏木乙酸乙酯提取物结合针刺对 Lewis 肺癌小鼠 TGF- β 表达影响[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(4): 66-67.

(2016-03-29 收稿 责任编辑: 王明)