

· 论著 ·

慈济化癌保生汤对H22肝癌荷瘤化疗模型小鼠外周血细胞与脾脏造血因子的影响

程尧, 奚胜艳, 王彦晖, 史萌萌, 刘培, 李鹏程

(厦门大学医学院中医系, 厦门 361102)

摘要:目的: 研究慈济化癌保生汤(CHBT)对H22肝癌化疗小鼠外周血细胞以及脾脏造血生长因子红细胞生成素(EPO)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)以及造血功能的作用。方法: 将肝癌H22细胞悬液(2×10^7 /mL)接种于Kunming种小鼠右前腋下, 约7d后, 全部形成移植瘤, 环磷酰胺(CTX)按200mg/kg(0.2mL/10g)腹腔注射, 建立H22肝癌小鼠化疗模型。随机分为模型组, CTX(0.033g/kg)组, CHBT高、中、低剂量(117、58.5、29.25g/kg)组, 连续给药10d, 采用全自动血细胞分析仪检测外周血红细胞、白细胞、血小板和血红蛋白, 运用酶联免疫吸附测定法检测脾组织EPO和GM-CSF含量。结果: 与模型组和CTX组比较, CHBT高、中、低剂量组红细胞、白细胞、血小板数量明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); CHBT高、中剂量组血红蛋白升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); CHBT各剂量组EPO、GM-CSF含量升高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论: 慈济化癌保生汤能促进化疗后EPO和GM-CSF的生成并增强活性, 刺激血细胞的产生, 维持外周血象稳定性。

关键词: 慈济化癌保生汤; 化疗; 移植瘤; 外周血细胞; 促红细胞生成素; 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子
基金资助: 国家自然科学基金青年基金项目(No.81202659), 厦门市重大科技计划项目(No.3502Z20100006), 福建省自然科学基金项目(No.2014J01373), 厦门市科技计划项目(No.3502Z20153027)

Effects of Ciji Hua'ai Baosheng Decoction on peripheral blood cells and spleen hematopoietic growth factors of tumor chemotherapy model mice with H22 hepatoma carcinoma cells

CHENG Yao, XI Sheng-yan, WANG Yan-hui, SHI Meng-meng, LIU Pei, LI Peng-cheng

(Department of Traditional Chinese Medicine, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: Objective: To investigate the effects of Ciji Hua'ai Baosheng Decoction (CHBT) on peripheral blood cells, spleen hematopoietic growth factors such as erythropoietin (EPO) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), and blood-producing function of tumor chemotherapy model mice with H22 hepatoma carcinoma cells. Methods: The suspension of H22 hepatoma carcinoma cells (2×10^7 /mL) were subcutaneously injected into the right anterior armpit of Kunming mice. After 7 days, all mice formed the transplanted tumors, and then the cytoxan (CTX) at the dosage of 200mg/kg were intraperitoneally injected into the mice to establish the tumor chemotherapy model. The mice were randomly divided into model group, CTX (0.033g/kg) group, CHBT high, middle and low dose (117, 58.5, 29.25g/kg) groups. The experiment groups were treated for 10 days. The levels of red blood cells, white blood cells, platelet and hemoglobin in peripheral blood were detected by automatic blood cell analyzer. The contents of EPO and GM-CSF in spleen tissue were assayed by enzyme-linked immunosorbent assay. Results: Compared with model group and CTX group, the levels of red blood cells, white blood cells and platelet in high, middle and low dose CHBT groups were increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the levels of hemoglobin in CHBT high and middle dose groups were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the contents of EPO and GM-CSF in CHBT high, middle and low dose groups were increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion: The CHBT in given concentration could promote the production of EPO and GM-CSF after tumor chemotherapy and stimulate the hemocytogenesis to maintain the stability of peripheral haemogram, which may be the possible mechanism of CHBT ameliorating the haemogram of cancer after chemotherapy.

Key words: Ciji Hua'ai Baosheng Decoction; Chemotherapy; Transplanted tumor; Peripheral blood cell; Erythropoietin; Granulocyte-macrophage colony stimulating factor

Funding: Young Scientists Fund of the National Natural Science Foundation of China (No.81202659), Key Technology R&D Program of Xiamen City (No.3502Z20100006), Natural Science Foundation of Fujian Province (No.2014J01373), Science and Technology Plan Projects in Xiamen City (No.3502Z20153027)

通讯作者: 奚胜艳, 福建省厦门市翔安区翔安南路厦门大学医学院中医系, 邮编: 361102, 电话: 0592-2183069

E-mail: xishengyan13204@xmu.edu.cn

王彦晖, 福建省厦门市翔安区翔安南路厦门大学医学院中医系, 邮编: 361102, 电话: 0592-2183069, E-mail: yhsang@xmu.edu.cn

随着人口老龄化以及环境、社会因素等影响,恶性肿瘤发病率呈现较高的增长速度,由于其治愈率较低,因而严重影响着人们的生命与健康。目前,对于中晚期肿瘤尚缺乏疗效令人满意的治疗方法,较多患者仍然面临接受化疗产生的难以忍受的不良反应对身体的损害,其生活质量不高。中医针对化疗对机体的病理改变,注重整体调理,常能取得较好的疗效。由于中药具有高效且安全的优势,中药复方制剂的实验研究近年来不断开展,近年的一些研究表明,中药在提高机体免疫力、改善患者生活质量方面显现出了其特有的优越性。慈济化癌保生汤(Ciji Hua 'ai Baosheng Tang, CHBT)是王彦晖教授临床多年诊治癌症化疗所创立的经验方,以益气健脾、理气化痰、化痰散结为治疗原则。其组成为党参、茯苓、丹参、酸枣仁、补骨脂、橘皮、炒白术、砂仁、牡蛎、枳壳、泽兰、山楂、苏子等中药。王教授临床以其为基本方用于肿瘤化疗后,长期调理能明显改善体质、增强免疫功能和提高生活质量^[1-3]。已有研究表明该方以水煎液剂型,在不同浓度下,对抗肿瘤细胞的作用不同,总体上对肿瘤细胞产生抑制作用,具体体现在改变肿瘤组织病理形态、增加促肿瘤细胞凋亡因子、抑制抗凋亡基因等^[4]。但该方机理尚未明确,前期实验研究证实慈济化癌保生颗粒配方对H22肝癌荷瘤小鼠有抑瘤作用,且可延长生存期以及改善瘤组织病理形态^[5]。为进一步证实促血细胞生成作用,我们拟建立H22肝癌荷瘤小鼠化疗后模型,采用CHBT水煎剂,观察CHBT对外周血细胞的改变及脾脏造血生长因子的影响,为CHBT的临床应用提供更可靠的科学依据。

材料

1. 动物和肿瘤细胞 SPF级健康Kunming种小鼠60只,体质量18-22g,4周龄,雌雄各半,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号:SCXK(沪)2012-0002。采用腹水型H22肝癌小鼠腹水传代1周的H22细胞悬液,由厦门大学实验动物中心培养并于无菌条件供给接种。

2. 药品 慈济化癌保生汤组成:党参12g,批号:130914;茯苓30g,批号:140130;酸枣仁25g,批号:140130;牡蛎50g,批号:130828;丹参50g,批号:131217;炒白术12g,批号:140304;橘皮10g,批号:140213;白扁豆20g,批号:140221;厚朴5g,批号:140303;枳壳5g,批号:140306;砂仁5g,批号:140303;麦芽12g,批号:131129;山楂10g,批号:140208;益智仁5g,批号:140211;泽兰20g,批号:140120;益母草15g,批号:140305;补骨脂10g,批号:140218;平贝母30g,批号:140130;苏子25g,批

号:140225,共计中药饮片351g,购自厦门燕来福制药有限公司(中国厦门);环磷酰胺(cytoxan, CTX)注射液,规格每安瓿200mg,批号:131209,由吉林通化茂祥医药有限公司(中国通化)生产。0.9%氯化钠注射液,规格每瓶100mL,批号:1404122311,由辰欣药业股份有限公司(中国山东)生产。

3. 主要试剂 CSB-E04539m小鼠红细胞生成素(erythropoietin, EPO)酶联免疫试剂盒,批号:G13015743,CSB-E04569m小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(granular cell macrophages-colony stimulating factor, GM-CSF)酶联免疫试剂盒,批号:G15018156,购自武汉华美生物工程有限公司(中国武汉)。

4. 主要仪器 低速多管架自动平衡离心机TDZ5WS(湘仪离心机仪器有限公司),Exigo动物全自动血球仪(瑞典布尔医疗设备有限公司),莱卡RM2016组织切片机(德国LEICA公司),赛默飞MK3酶标仪(美国Thermo公司)。

方法

1. 模型建立 实验小鼠由厦门大学实验动物中心SPF级动物房饲养3d,自由饮食和饮水。无菌条件下抽取H22肝癌小鼠乳白色腹水,置于倒置显微镜下计数($\times 100$)。在细胞房内,用0.9%氯化钠溶液稀释成单细胞肿瘤悬液 2×10^7 /mL。抽取瘤细胞悬液0.2mL(约 4×10^6),无菌条件下接种于小鼠右前肢腋窝皮下。接种7d,60只小鼠全部形成皮下移植瘤。以CTX注射液200mg/kg(0.2mL/10g)行小鼠腹腔注射,建立H22肝癌荷瘤小鼠化疗后模型。

2. 药物配制 中药水煎液:中药饮片按1 8加蒸馏水浸泡20min,煮沸30min,8层纱布过滤;药渣按1 6加蒸馏水煮沸30min,8层纱布过滤。将两次药液混合,水域蒸发浓缩,分别配置成浓度为5.85、2.925、1.4625g/mL的药液,置4 冰箱保存备用。用0.9%的氯化钠注射液稀释CTX,浓度达到1.66mg/mL。

3. 分组与给药 建模后,60只小鼠随机分为5组:模型组,CHBT高、中、低剂量组,CTX组。每组12只。模型组给予0.9%氯化钠溶液灌胃,0.2mL/10g,1次/d;CHBT高、中、低剂量组分别给予117、58.5、29.25g/kg中药复方灌胃,0.2mL/10g,1次/d;CTX组给予33.33mg/kg CTX注射液腹腔注射0.2mL/10g,隔日1次,连续10d。

4. 外周血细胞检测 末次给药24h后经眼球摘除取外周血0.5-1.0mL,使用全自动血细胞分析仪计数红细胞(red blood cell, RBC)、白细胞(white blood cell, WBC)、血红蛋白(hemoglobin, HGB)和血小板(platelet, PLT)。

表1 慈济化癌保生汤对H22肝癌荷瘤化疗模型小鼠外周血细胞的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	RBC($\times 10^{12}/L$)	PLT($\times 10^9/L$)	WBC($\times 10^9/L$)	HGB(g/L)
模型组	9	8.57 \pm 1.10	756.66 \pm 110.88	4.38 \pm 1.03	146.77 \pm 6.72
CTX组	10	7.84 \pm 0.47	720.90 \pm 225.56	4.09 \pm 0.96	144.30 \pm 8.56
CHBT高剂量组	10	10.41 \pm 0.73**	1 063.20 \pm 181.29**	6.25 \pm 1.83**	160.80 \pm 9.61**
CHBT中剂量组	10	9.90 \pm 0.71**	934.70 \pm 165.43*	5.69 \pm 1.59*	155.80 \pm 9.69*
CHBT低剂量组	9	9.89 \pm 0.83**	923.77 \pm 105.43*	5.57 \pm 0.91	149.00 \pm 9.16

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与CTX组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。下表同。

5. 酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)含量 末次给药24h后,常规消毒后解剖小鼠,剥离脾脏,在1 \times PBS液中清洗血污。组织裂解液:取100mg组织,用1 \times PBS洗去血污。剪成小块放入组织研磨器(匀浆管)中,加入1mL 1 \times PBS,制成匀浆,然后置于-20 $^{\circ}$ C过夜。经过反复冻融2次处理破坏细胞膜后,将组织匀浆于4 $^{\circ}$ C 5 000g离心5min取上清液,取适量上清液立即进行实验。加样:分别设标准品孔、待测样本孔。每孔分别加标准品或待测样本100 μ L,轻轻晃动混匀,覆上板贴,37 $^{\circ}$ C温育2h;弃去液体,甩干,不用洗涤;每孔加生物素标记抗体工作液100 μ L,覆上新的板贴,37 $^{\circ}$ C温育1h;弃去孔内液体,甩干,洗板3次。每次浸泡2min,200 μ L/每孔,甩干;每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液100 μ L,覆上新的板贴,37 $^{\circ}$ C温育1h;弃去孔内液体,甩干,洗板5次。每次浸泡2min,200 μ L/每孔,甩干;依序每孔加底物溶液90 μ L,37 $^{\circ}$ C避光显色15-30min;序每孔加终止溶液50 μ L,终止反应;在反应终止后5min内用酶标仪在450nm波长依序测量各孔的光密度(OD值)。将标准品及样本值减去S0孔数值后绘制曲线,如果设置复孔,则应取其平均值计算。以标准品的浓度为纵坐标(对数坐标)OD值为横坐标(对数坐标),在对数坐标纸上绘出标准曲线。根据样本OD值,用标准品的浓度与OD值计算出标准曲线的回归方程式,将样本的OD值代入方程式,计算出样本浓度。若样本检测前进行过稀释,最后计算时需乘以相应的稀释倍数,即为样本的实际浓度。

6. 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 19.0(IBM,美国纽约)统计软件对数据进行统计分析,采用单因素方差分析,LSD检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果

1. CHBT对外周血细胞的影响 见表1。与模型组、CTX组相比较,CHBT高、中、低剂量组RBC、

WBC、PLT数量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);CHBT高、中剂量组HGB增多($P<0.05$, $P<0.01$)。

2. CHBT对H22肝癌荷瘤化疗模型小鼠脾脏造血生长因子EPO、GM-CSF含量的表达 见表2。CHBT高、中、低剂量组中EPO、GM-CSF的含量均高于模型组、CTX组($P<0.01$, $P<0.05$)。

表2 慈济化癌保生汤对H22肝癌荷瘤化疗模型小鼠脾脏造血因子含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$,pg/mL)

组别	EPO	GM-CSF
模型组	20.43 \pm 9.10	77.34 \pm 13.48
CTX组	20.70 \pm 4.76	45.81 \pm 24.07
CHBT高剂量组	40.28 \pm 8.09**	180.12 \pm 27.64**
CHBT中剂量组	33.77 \pm 8.42**	160.89 \pm 59.49**
CHBT低剂量组	30.82 \pm 6.65*	148.63 \pm 34.38**

讨论

肿瘤的化疗治疗历史已有近百年,医疗水平的不断提高,化疗水平和新药的更新,使其成为肿瘤疾病防治的经典手段。但由于其严重的不良反应,在针对肿瘤细胞的同时亦杀伤正常组织细胞,所以在很大程度上限制了化疗药的使用,并使得肿瘤治疗出现瓶颈。其中对血液系统的影响尤为常见,主要包括WBC降低、PLT减少、贫血等。CTX以其细胞毒作用抑制细胞分裂,损伤骨髓造血机能,引起HGB减少,包括RBC在内的多系细胞^[6]。外周血细胞的产生是造血干细胞在造血特定微环境和造血细胞因子的共同作用下增殖、分化为成熟细胞的结果。造血细胞因子分为造血生长因子和造血抑制因子。EPO、白细胞介素(interleukine, IL)、集落刺激因子是调控机体造血功能的三类主要造血生长因子。外周血细胞计数是一个能够反映化疗后机体血液情况的常规指标,研究报道,约90%的化疗后肿瘤患者表现出白细胞减少等的骨髓抑制症状^[7]。造血细胞的分裂、分化、成熟受多种细胞因子的影响,其中EPO发挥关键作用。促进EPO的产生及其活性,对促进造血功能、改善化疗引起血细胞减少发挥关键作用。EPO是细胞因子超家族成员,是一种造血生长因子。研究发现重组人促红

细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rh-EPO)已广泛应用于肿瘤相关性贫血的预防和治疗,多项临床实验评价rh-EPO在肿瘤相关贫血治疗中应用的益处是肯定的,分析结果表明其可使肿瘤患者生存获益^[8]。rh-EPO在临床上已广泛用于预防及治疗肿瘤相关贫血,增加HGB水平、同时改善生活质量,并有研究报道EPO治疗的肿瘤患者有生存改善的趋势^[9]。Kelleher D K等^[10]在血性腹水的贫血小鼠模型,规律注射rh-EPO可以改善肿瘤氧合作用。Ning S等^[11]在全身放疗所致的贫血大鼠模型中发现随rh-EPO的使用,贫血改善的同时放疗效应也增加,表明EPO含量能够改善贫血,提高血细胞的生成。但EPO除了能调节红细胞生成外,还参与多种非造血生物学活动。Mohyeldin A等^[12]报道了头颈癌活检标本中EPO表达与疾病进展相关, rh-EPO导致头颈癌细胞株侵袭性增加。而EPO在肿瘤血管形成中的作用尚未明确,对肿瘤的效应仍需要进一步的前瞻性、随机、对照试验来证实。GM-CSF对早期造血干细胞有增殖作用并促进活性,它是一种由T淋巴细胞、巨噬细胞、成纤维细胞等产生的糖蛋白。GM-CSF作为一种多潜能的造血生长因子,主要作用于造血干/祖细胞和骨髓基质细胞或成纤维细胞等^[13],促进骨髓造血,GM-CSF不仅能够促进红细胞以外的血细胞,还能促进IL-3的分泌,二者能够使颗粒单核细胞CFU分化成熟为中性粒细胞和单核细胞^[14]。此方面的应用,对于肿瘤化疗所致贫血、白细胞减少、骨髓抑制等血液方面不良反应有很大改善。

本研究显示,CTX腹腔注射化疗引起造血系统障碍,慈济化癌保生汤对外周血细胞数量的提升产生了积极作用,不同浓度中药组对于WBC的提升作用、PLT减少的拮抗作用均明显优于模型组和CTX组;CTX组EPO含量低于CHBT各剂量组,略高于模型组,可能是由于反射性刺激EPO产生所致,体现了慈济化癌保生汤在改善血细胞生成、健脾益气活血的作用。CHBT高、中、低剂量组中GM-CSF的表达显著高于模型组。得出结论,该复方能够促进EPO和GM-CSF的生成并增强活性,刺激血细胞的产生,保证了外周血象的稳定性,表明CHBT促进了正常的造血。

王彦晖教授所拟慈济化癌保生汤,针对化疗后肿瘤患者,认准化疗药物造成病机虚实夹杂的性质:实就是病理产物,气滞、痰湿、血瘀、毒邪等;虚则包括肝肾不足、脾胃虚弱。在治法上强调补益、清利、化痰、行气、消导同时运用,以和为法,平调阴阳。研究表明,慈济化癌保生汤紧扣中医辨证思路,以严格的

舌象、脉象为诊断标准,已经证明了复方配伍的合理性。课题首次证实了慈济化癌保生汤对化疗药导致的外周血细胞减少具有拮抗作用。本研究从造血因子方面为中医临床治疗化疗后肿瘤方向提供了可靠的研究数据。中药复方的基因层面具体作用机制是未来研究的重点。

参考文献

- [1] 程尧,奚胜艳,王彦晖.王彦晖教授运用中医药防治肿瘤诊疗思想探讨.中华中医药杂志,2015,30(4):1098-1101
- [2] 何宽其,奚胜艳,李鹏程.王彦晖教授善用重剂治疗癌症学术经验及验案举要.中华中医药杂志,2014,29(7):2240-2242
- [3] 赖鹏华,王彦晖,李鹏程,等.王彦晖教授从“病理产物”论治肿瘤经验.中华中医药杂志,2014,29(10):3139-3141
- [4] Cheng Y, Xi S Y, Wang Y H, et al. Effects of Ciji Hua'ai Baosheng Formula(CHBF) on apoptosis correlation factors of tumor chemotherapy model mouse with H22 hepatoma carcinoma cells. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 2015, 12(4):72-78
- [5] Xi S Y, Hong R J, Huang J R, et al. Effects of Ciji Hua'ai Baosheng Granule Formula(CHBGF) on life time, pathology, Peripheral blood cells of tumor chemotherapy model mouse with H22 hepatoma carcinoma cells. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 2014, 11(4):94-100
- [6] 范启兰,许春鹃,甘祝军.四物汤对小鼠血清促红细胞生成素及其基因表达影响的实验研究.时珍国医国药,2008(7):1601-1602
- [7] Li L, Zhang P, Kang H Z, et al. Risk factors for nosocomial infections during myelosuppression period of tumour chemotherapy. Chinese Journal of Nosocomiology, 23(18):4394-4395, 4398
- [8] Bohlius J, Langensiepen S, Schwarzer G, et al. Recombinant human erythropoietin and overall survival in cancer patients: Results of a comprehensive meta-analysis. Journal of the National Cancer Institute, 2005, 97(7):489-498
- [9] 李梅,吕跃,陈晓勤.促红细胞生成素及其受体在恶性肿瘤组织中的表达及功能的研究进展.癌症,2008,27(6):667-672
- [10] Kelleher D K, Matthiensen U, Thews O, et al. Blood flow, oxygenation, and bioenergetic status of tumors after erythropoietin treatment in normal and anemic rats. Cancer Research, 1996, 56(20):4728-4734
- [11] Ning S, Hartley C, Molineux G, et al. Darbepoietin alfa potentiates the efficacy of radiation therapy in mice with corrected or uncorrected anemia. Cancer Research, 2005, 65(1):284-290
- [12] Mohyeldin A, Lu H S, Dalgard C, et al. Erythropoietin signaling promotes invasiveness of human head and neck squamous cell carcinoma. Neoplasia, 2005, 7(5):537-543
- [13] Waller E K. The role of sargramostim(rhGM-CSF) as immunotherapy. Oncologist, 2007, 12(Suppl 2):22-26
- [14] 毛华.重组人干细胞因子(rhSCF)在E.coli中的高效表达及其与重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)融合基因克隆、表达、蛋白纯化及性质的研究.北京:中国协和医科大学,1998

(收稿日期:2015年2月19日)