论著

文章编号:1000-5404(2008)16-1568-04

# 当归补血汤联合环磷酰胺抗肿瘤实验研究

陈鹊汀[1],刘智勤[2],朱惠学[3],徐 妍[1],王海波[1],胡庚坤[1],李 勇[4],蒋玉凤[5],黄启福[5] (河北大学:[1]附属医院肿瘤科,河北 保定 071000,[2]药学院中药学教研室,河北 保定 071002;[3]河北省唐县人民医院外科,河北 唐县 072350;[4]河北医科大学第四医院外三科,石家庄 050017;[5]北京中医药大学病理教研室,北京 100029)

**摘 要:目的** 探讨当归补血汤对化疗药物环磷酰胺(cyclophosphamide,CTX)抗S180小鼠的增效减毒作用。**方法** 将接种S180瘤细胞的小鼠分为荷瘤对照组、CTX组、当归补血汤(高、中、低剂量)+CTX组。给药10 d,进行抑瘤率计算,以及外周血常规、骨髓有核细胞计数、脾脏、胸腺质量、肝肾功能、免疫球蛋白等的检测。**结果** 当归补血汤联合CTX各组肿瘤生长明显低于荷瘤对照组($P<0.01$),当归补血汤高剂量+CTX组肿瘤生长低于CTX组($P<0.05$)。与荷瘤对照组相比,CTX组脾脏和胸腺指数、IgG、IgM水平明显降低($P<0.05$,$P<0.01$);而当归补血汤高、中剂量+CTX组与CTX组相比,脾脏和胸腺指数、IgG、IgM水平明显升高($P<0.05$,$P<0.01$)。与荷瘤对照组相比,CTX组ALT升高,WBC、PLT和骨髓有核细胞计数降低;而当归补血汤高、中剂量+CTX组相对于CTX组,ALT降低,WBC、PLT和骨髓有核细胞计数升高($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** 当归补血汤对化疗药物CTX抗S180小鼠具有增效减毒的作用。

**关键词:** 当归补血汤;环磷酰胺;S180小鼠;肿瘤化疗

**中图法分类号:** R289.5;R73-361;R979.1 **文献标识码:** A

# Anti-tumor efficacy of *Angelicae Sinensis* decoction for supplementing blood combined with cyclophosphamide

CHEN Que-ting[1], LIU Zhi-qin[2], ZHU Hui-xue[3], XU Yan[1], WANG Hai-bo[1], HU Geng-kun[1], LI Yong[4], JIANG Yu-feng[3], HUANG Qi-fu[3] ([1]Department of Tumor, The Affiliated Hospital, Baoding Hebei 071000, [2]College of Pharmacy, Hebei University, Baoding Hebei 071002; [3]Department of Surgery, Hebei Tangxian People's Hospital, Tangxian Hebei 072350, [4]Department of Surgery, The Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, [5]Department of Pathology, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**Abstract: Objective** To observe the effect of *Angelicae Sinensis* decoction for supplementing blood (AS) in enhancing the efficacy of chemotherapy and against its side-effect in mice loaded with S180 murine sarcoma cells. **Methods** The mice inoculated with S180 murine sarcoma cells were divided into 5 groups: S180 control group, 0.02 g·kg$^{-1}$·d$^{-1}$ cyclophosphamide (CTX) group, AS (24, 12, 6 g·kg$^{-1}$·d$^{-1}$ as high, moderate and low dose) + CTX groups. After 10-day treatment, the tumor inhibition rate, the counting of peripheral blood cells and bone marrow karyocytes, the weight of spleen and thymus were calculated, and the liver and renal function and immunoglobulin (Ig) were evaluated. **Results** The tumor inhibition rate was higher in each AS + CTX group than that in the S180 control group ($P<0.01$). The tumor inhibition rate of high-dose AS + CTX group was higher than CTX group ($P<0.05$). The indexes of spleen and thymus as well as the levels of IgG and IgM in CTX group were lower than those of S180 control group and high- and moderate-dose AS + CTX groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). ALT level was higher and WBC, PLT and BMC were lower in CTX

**基金项目:** 河北省中医药管理局基金(2006022)

Supported by Bureau of Traditional Chinese Medicine of Hebei Province (2006022)

**作者简介:** 陈鹊汀,男,广东省潮州市人,硕士,主治医师,主要从事肿瘤方面的研究,发表论文20余篇。电话:13503382321,E-mail:liuzhiqin006007@yahoo.com.cn

**收稿日期:** 2007-11-16;**修回日期:** 2008-03-20

group than those in S180 control group and high- and moderate-dose AS + CTX groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** AS can enhance the efficacy of chemotherapy and reduce its side-effect in the mice with S180 murine sarcoma cells exposed to CTX.

**Key words**: *Angelicae Sinensis* decoction for supplementing blood; cyclophosphamide; S180 mice; tumor chemotherapy

当归补血汤出自《内外伤辨惑论》,是金元四大家之一李东垣所创造的益气补血方剂。研究表明,此方有增强免疫、促进造血功能、保护脏器免受有害毒物损伤的作用[1]。当前中医药在肿瘤放化疗中的增效减毒作用已被确定,但对当归补血汤在肿瘤化疗中的增效减毒作用报道较少,缺乏系统性和规范性。本研究通过建立 S180 荷瘤小鼠模型,探讨当归补血汤联合化疗药物环磷酰胺(cyclophosphamide,CTX)治疗肿瘤是否具有增效减毒作用,以期为当归补血汤的临床应用提供一定的实验依据。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

1.1.1　动物和瘤株　　清洁级昆明小鼠 60 只, 8 ~ 12 周龄,雌雄各半,体质量 18 ~ 22 g,许可证号:SCXK(冀)2003-1-003。小鼠在实验前适应性驯养 1 周,实验期间自由采食饮水。小鼠、饲料及腹水型 S180 瘤株均由河北医科大学实验动物中心提供。

1.1.2　药物　　当归补血汤由黄芪和当归组成(由河北大学附属医院中药房提供,药品均经中药专家鉴定),将药物加水浸泡 20 min 后,煎煮 3 次,每次约 30 min,混合过滤,取汁 300 ml,离心取上清,80 ℃水浴浓缩至每毫升含生药 1.2 g,分装,高温消毒后置于 4 ℃冰箱保存备用。化疗药物:注射用环磷酰胺,江苏恒瑞医药股份有限公司(批号:06112021)。

1.1.3　仪器　　雅培 C8000 型全自动生化分析仪(美国),KX-21 血细胞自动分析仪(日本西森美康公司),Nikon YS2 双目生物显微镜,AE240 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),SW-CJ-1F 超净工作台(苏净集团安泰公司),恒温水浴箱(天津市中环实验电炉有限公司),CD4-2A 离心机(北京医用离心机厂)。

### 1.2　方法

1.2.1　S180 荷瘤小鼠模型的建立　　无菌条件下抽取 6 ~ 7 d 生长良好的 S180 小鼠的腹水,按 1∶3用生理盐水稀释,反复冲打,充分混匀,在显微镜下计数,用生理盐水调整细胞数为 $1.5 \times 10^7 ml^{-1}$,取 0.2 ml 于每只小鼠右侧腋窝下碘酊消毒后皮下接种。瘤株接种前,均用 0.2% 台盼蓝染色,计算活细胞数为 95% ~98%。从抽取腹水时开始,到移植完最后 1 只小鼠的总时间控制在 2 h 内。

1.2.2　分组及给药　　小鼠接种 24 h 后按体质量和性别采用“均衡随机”法分成荷瘤对照组、CTX 组、当归补血汤(高、中、低剂量) + CTX 组[2]。荷瘤对照组用生理盐水灌胃,0.4 ml/只,1 次/d,连续 10 d。单纯化疗组腹腔注射 CTX 0.02 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$,同时用生理盐水灌胃,0.4 ml/只,1 次/d,连续10 d。当归补血汤高、中、低剂量 + CTX 组的化疗药物剂量、给药途径及时间与 CTX 组相同,当归补血汤高、中、低剂量分别给予 24、12、6 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$(按生药量计算,分别为成人体质量用量的 24、12、6 倍)0.4 ml 灌胃,1 次/d,连续 10 d。各组于瘤细胞接种第 2 天开始用药,于实验第 12 天眼球采血后处死小鼠,取脾脏、胸腺、骨髓检测各项指标。

1.2.3　抑瘤率计算　　于实验第 12 天,将各组小鼠眼球采血后处死,称质量,依次用碘酊酒精消毒操作部位皮肤,于超净工作台上,以无菌操作从腋部皮下完整剥取肿瘤组织,剥离干净后于电子天平称瘤体质量并按公式计算抑瘤率[3]。

抑瘤率(%) = (1 - 治疗组平均瘤质量/对照组平均瘤质量) × 100%

1.2.4　外周血常规、免疫球蛋白和肝肾功能的检测　　小鼠处理同 1.2.3,雅培 C8000 型全自动生化分析仪检测免疫球蛋白和肝肾功能,血细胞自动分析仪检测血常规。

1.2.5　脾脏、胸腺指数　　小鼠处理同 1.2.3,以无菌操作取下脾脏、胸腺,电子天平称质量并计算脏器指数。

1.2.6　骨髓有核细胞计数　　小鼠处理同 1.2.3,剥离股骨取小鼠完整右侧股骨用 7 号针在股骨膝关节端打一小孔,抽取 3% 冰醋酸溶液反复冲洗其骨髓细胞于 10 ml 3% 冰醋酸溶液内,4 号针头过滤后,充分混匀,在血细胞计数盘上计数 4 个大方格的细胞数,然后乘以 $2.5 \times 10^4$,即得 1 根股骨中的骨髓有核细胞总数[4]。

### 1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行多组间单因素方差分析。

## 2　结果

### 2.1　当归补血汤对化疗小鼠体质量增长的影响

各组小鼠体质量均有不同程度的增加,CTX 组体质量增加量最少,当归补血汤高剂量联合 CTX 组体质量增加量与 CTX 组比较差异显著($P < 0.05$),见表 1。

### 2.2　当归补血汤对化疗小鼠瘤质量及抑瘤率的影响

CTX 组,当归补血汤高、中及低剂量组的瘤质量[分别为(1.17 ± 0.17)、(0.96 ± 0.23)、(1.00 ± 0.32)、(1.07 ± 0.19) g]与荷瘤对照组[(2.38 ± 0.45) g]相比差异显著($P < 0.01$)。CTX 组有明显的抑制肿瘤生长作用,抑瘤率达 50.67%,当归补血汤高、中、低剂量组抑瘤率分别可达 59.74%、57.99% 和 55.35%,CTX 组与当归补血汤高剂量组相比差异显著($P < 0.05$)。

**表1 当归补血汤对化疗小鼠体质量和免疫器官质量的影响($\bar{x} \pm s$)**

| 组别 | $n$ | 体质量(g) | | 体质量变化(g) | 胸腺指数(g/kg) | 脾脏指数(g/kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 实验开始 | 实验结束 | | | |
| 荷瘤对照组 | 10 | 19.98 ±0.97 | 31.99 ±3.39 | 12.01 ±3.48 | 3.16 ±0.43[b] | 7.97 ±1.10[b] |
| CTX 组 | 10 | 20.09 ±1.09 | 28.59 ±2.26 | 8.51 ±2.51 | 2.31 ±0.47 | 6.11 ±0.69 |
| 当归补血汤 高剂量 + CTX 组 | 11 | 20.16 ±1.12 | 31.51 ±3.15 | 11.35 ±3.45[a] | 3.07 ±0.49[b] | 7.79 ±1.48[b] |
| 中剂量 + CTX 组 | 11 | 20.13 ±1.03 | 30.02 ±3.15 | 9.88 ±3.47 | 2.96 ±0.67[a] | 7.24 ±1.25[a] |
| 低剂量 + CTX 组 | 11 | 19.99 ±1.00 | 29.45 ±3.10 | 9.45 ±2.82 | 2.70 ±0.60 | 6.85 ±1.38 |

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与 CTX 组比较

**表2 当归补血汤对化疗小鼠血清免疫球蛋白和外周血象的影响($\bar{x} \pm s$)**

| 组别 | $n$ | IgA(g/L) | IgG(g/L) | IgM(g/L) | WBC($\times10^9$/L) | RBC($\times10^{12}$/L) | PLT($\times10^9$/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 荷瘤对照组 | 10 | 0.514 ±0.056 | 2.140 ±0.337 | 0.209 ±0.027 | 7.12 ±1.37[b] | 8.16 ±1.48 | 915.30 ±164.73[b] |
| CTX 组 | 10 | 0.489 ±0.076 | 1.750 ±0.387 | 0.175 ±0.031 | 3.99 ±0.83 | 7.90 ±1.18 | 699.60 ±94.56 |
| 当归补血汤 高剂量 + CTX 组 | 11 | 0.544 ±0.053 | 2.282 ±0.256[b] | 0.227 ±0.022[b] | 6.46 ±1.62[b] | 8.20 ±1.66 | 945.18 ±196.25[b] |
| 中剂量 + CTX 组 | 11 | 0.553 ±0.083 | 2.364 ±0.341[b] | 0.219 ±0.041[a] | 6.02 ±1.3[b] | 8.40 ±1.54 | 860.64 ±171.34[a] |
| 低剂量 + CTX 组 | 11 | 0.533 ±0.067 | 2.127 ±0.465 | 0.202 ±0.030 | 5.09 ±0.97[a] | 8.01 ±1.56 | 826.63 ±172.37 |

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与 CTX 组比较

### 2.3 当归补血汤对化疗小鼠免疫器官质量的影响

荷瘤鼠在注射 CTX 后脾脏和胸腺指数均下降,与荷瘤对照组相比差异显著($P<0.01$);而在联合应用当归补血汤治疗后,当归补血汤高、中剂量组脾脏和胸腺指数均较 CTX 组增高,差异显著($P<0.05$,$P<0.01$),见表1。

### 2.4 当归补血汤对化疗小鼠血清免疫球蛋白的影响

S180 荷瘤鼠在注射 CTX 后 IgG 及 IgM 的产生低于荷瘤对照组($P<0.05$),而在联合当归补血汤治疗后,当归补血汤高、中剂量组 IgG 及 IgM 的产生水平增高,与 CTX 组比较,差异显著($P<0.05$,$P<0.01$),见表2。

### 2.5 当归补血汤对化疗小鼠外周血象的影响

荷瘤鼠在应用 CTX 后 WBC 和 PLT 降低,而对 RBC 影响较小;在联合当归补血汤后,WBC 和 PLT 的数量有一定提高,与 CTX 组比较差异显著($P<0.05$,$P<0.01$),见表2。

### 2.6 当归补血汤对化疗小鼠骨髓有核细胞计数的影响

CTX 组小鼠骨髓有核细胞计数[$(7.55 \pm 0.88) \times 10^6$/根]明显低于荷瘤对照组[$(11.04 \pm 1.13) \times 10^6$/根],差异显著($P<0.01$);当归补血汤高、中、低剂量组骨髓有核细胞计数[分别为$(9.94 \pm 1.58)$、$(9.78 \pm 1.58)$、$(8.79 \pm 1.14) \times 10^6$/根]虽较荷瘤对照组少,但明显多于 CTX 组,差异显著($P<0.05$,$P<0.01$)。

### 2.7 当归补血汤对化疗小鼠肝肾功能的影响

S180 荷瘤鼠在应用 CTX 后血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)明显升高,与对照组相比,差异显著($P<0.01$);而 CTX 联合应用当归补血汤时可使小鼠 ALT 的水平降低,高、中剂量组与 CTX 组比较差异显著($P<0.05$)。血清白蛋白(ALB)和尿素氮(BUN)在各组间没有出现显著性差异,见表3。

**表3 当归补血汤对化疗小鼠肝肾功能的影响($\bar{x} \pm s$)**

| 组别 | $n$ | ALT (U/L) | ALB (g/L) | BUN (mmol/L) |
|---|---|---|---|---|
| 荷瘤对照组 | 10 | 33.40 ±4.48 | 35.10 ±1.85 | 5.92 ±1.82 |
| CTX 组 | 10 | 49.10 ±7.01[a] | 34.60 ±2.63 | 6.38 ±1.55 |
| 当归补血汤 | | | | |
| 高剂量 + CTX 组 | 11 | 42.78 ±3.77[b] | 35.09 ±1.97 | 6.31 ±1.44 |
| 中剂量 + CTX 组 | 11 | 43.00 ±4.29[b] | 35.18 ±1.99 | 5.61 ±1.39 |
| 低剂量 + CTX 组 | 11 | 44.82 ±5.98 | 34.36 ±1.96 | 6.36 ±1.93 |

a: $P<0.01$, 与荷瘤对照组比较; b: $P<0.05$,与 CTX 组比较

## 3 讨论

当前化疗是肿瘤治疗的主要手段之一,但由化疗药物带来的毒副反应如骨髓抑制、胃肠道反应、肝肾功能损害和免疫功能低下却限制了化疗药物疗效的进一步提高,因此对化疗药物增效减毒的研究具有非常重要的意义。中药在肿瘤化疗中的增效减毒作用,是目前肿瘤综合治疗研究上的热点之一,也是中医中药研究热点之一。研究的目的是希望在化疗中加用中药后,不仅可使疗效进一步提高,而且能增加肿瘤对化疗药物的敏感性,使用较低剂量的化疗药物也能产生同样的效果,并能使原对化疗不敏感的肿瘤在应用中药后有效。近年来的研究证实,中医药在化疗药物的增效减毒方面取得了较好疗效。当归补血汤由黄芪和当归两味药以5∶1组成,具有益气生血功效。现代药理学研究证实[1],当归补血汤不仅可促进造血和免疫功能,还具有强心、保护心肌细胞和保肝功能。本研究通过观察当归补血汤联合 CTX 抗 S180 荷瘤鼠发现,当

归补血汤高剂量联合 CTX 组肿瘤抑制率高于 CTX 组,提示当归补血汤对 CTX 抗移植瘤生长具有一定增效作用。

肿瘤患者的免疫功能不仅与肿瘤的发生和发展密切相关,而且对判断肿瘤患者治疗效果和评估疾病预后有重要的参考价值[5,6]。肿瘤的存在不仅抑制机体的细胞免疫功能,也抑制了体液免疫功能[7],而化疗药物的应用可加重机体的免疫抑制。因此提高肿瘤患者的免疫功能,对抗化疗后出现的严重免疫功能抑制,成为抗肿瘤治疗的一个主要方面。脾脏和胸腺是机体重要的免疫器官,二者对细胞毒剂高度敏感,在化疗药物作用下明显萎缩,其组织结构较快地发生严重损伤,从而抑制了机体的免疫和抗病能力。胸腺、脾脏质量在一定程度上反映了机体免疫功能的强弱,因而可用作药物对免疫功能影响的初步观察指标,而 IgG、IgM 的水平反映了体液免疫能力。本研究显示,荷瘤小鼠应用 CTX 后脾脏和胸腺指数、IgG 和 IgM 的水平均下降,通过联合当归补血汤可使脾脏和胸腺指数增加、促进 IgG、IgM 的分泌,提示当归补血汤可对抗化疗药物 CTX 所致的免疫抑制,提高了机体的抗肿瘤作用。

CTX 为直接破坏 DNA 并阻止其复制的抗癌药物,骨髓抑制是其剂量限制性毒性[8],此外还有恶心、呕吐和 ALT 升高等毒副反应。本研究结果表明,荷瘤鼠在单独应用 CTX 后出现 ALT 升高,WBC、PLT 和骨髓有核细胞计数明显降低,联合当归补血汤后,荷瘤鼠的 ALT 下降,外周血 WBC 和 PLT 以及骨髓有核细胞计数降低有明显改善,说明 CTX 所引起的肝功能损害与骨髓抑制状态得到改善。

综上所述,当归补血汤与化疗药物 CTX 合用可增强 CTX 抑制肿瘤生长的作用,同时减轻其所致的骨髓抑制、免疫功能和肝功能的损害,提示当归补血汤在肿瘤治疗中具有增效减毒作用,这为当归补血汤肿瘤在化疗中的应用提供了一定的实验依据。有关当归补血汤的化疗增效减毒方面的确切机制有待进一步研究。

**参考文献:**


[1] 范　颖, 陈信义. 当归补血汤的实验研究进展[J]. 中医药学刊, 2006, 24(9): 1643 - 1646.

[2] 孙瑞元, 马越鸣, 洪宗元. 药理实验设计及统计分析[M]//徐淑云, 卞如濂, 陈　修. 药理实验方法学. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 195 - 196.

[3] 丁　岩, 陈晓光. 人参皂苷 $Rh_2$ 注射液对小鼠肉瘤 S180 的抑瘤作用[M]//陈　奇. 中药药理研究方法学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1017 - 1018.

[4] 冯雪梅, 吕　艳, 祝彼得, 等. 熟地和制首乌多糖对贫血小鼠骨髓有核细胞数和细胞周期的影响[J]. 四川中医, 2006, 24(6): 17 - 19.

[5] Kastelan Z, Lukac E, Derezic D, *et al*. Lymphocyte subsets, lymphocyte reactivity to mitogens, NK cell activity and neutrophil and monocyte phagocytic functions in patients with bladder carcinoma[J]. Anticancer Res, 2003, 23(6D): 5185 - 5189.

[6] Van-Sandick J W, Boermeester M A, Gisbertz S S, *et al*. Lymphocyte subsets and T(h)1/T(h)2 immune responses in patients with adenocarcinoma of the oesophagus or oesophagogastric junction: relation to pTNM stage and clinical outcome[J]. Cancer Immunol Immunother, 2003, 52(10): 617 - 624.

[7] Hadden J W. Immunodeficiency and cancer: prospects for correction [J]. Int Immunopharmacol, 2003, 3(8): 1061 - 1071.

[8] 张如刚, 王兴旺. 烷化剂-环磷酰胺[M]//刘鲁明,杨宇飞. 肿瘤科中西药物手册. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 111 - 113.


(编辑　汪勤俭)

## 关于医学符号的使用

统计学符号不论用哪种字母,也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是字母 $\bar{x}$,卡方的符号是希腊字母 $\chi^2$,自由度的符号是希腊文“$\upsilon$”,不是拉丁文“V”。样本的相关系数是英文“$r$”,不能误为希腊文“$\gamma$”。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号,都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加“-”或“+”表示。例如 $Na^+$、$Ca^{2+}$、$P^{3-}$ 等等,不采用 $Ca^{++}$、$P^{---}$、$Al^{+3}$、$O^{-2}$ 表示。核素的核子素(质量数)应写在元素符号的左上角,例如:$^{131}I$、$^{32}P$。表示激发状态的 m 写在右上角,例如:$^{99}Tc^{m}$、$^{133}In^{m}$。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称,即不能写成$^{131}$碘、铟$^{133m}$、$P^{32}$、$Tc^{99m}$。

近几年分子生物学发展很快,并已渗透到许多学科,大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式,要对符号的来源及其内涵有深刻的了解,使用时不致发生错误,例如:RNA 有 rRNA(ribosomal RNA)、tRNA(transfer RNA)、mRNA(messenger RNA)3 类。r、t、m 是表示类型的符号应小写,RNA 应大写。

本刊编辑部