

[文章编号] 1007-385X(2005)01-0057-04

VI-28 胶囊辅助环磷酰胺治疗荷载 LLC 肿瘤小鼠的实验研究

张 玲¹, 白晓薇¹, 杨晶晶², 王立忠¹, 高晓明¹(1. 北京大学医学部免疫学系; 2. 北京大学医学部组织胚胎与解剖学系, 北京 100083)

[摘 要] **目的:** 研究复方中药 VI-28 胶囊(即卫康胶囊, 主要成分有人参、鹿茸、菟丝子) 辅助环磷酰胺体内抑制肿瘤生长的作用及其机制。**方法:** C57BL/6 纯系小鼠背部皮下接种 Lewis 肺癌细胞(LCC, 每只 10^6 个细胞), 同时按 40mg/kg 隔天腹腔注射环磷酰胺治疗。实验组灌胃 VI-28(2% 悬液, 每只 0.5 ml, 隔天给药)。第 28 天时取小鼠胸腺和肿瘤组织块, 计算肿瘤指数和胸腺指数。取脾细胞测定细胞免疫功能。组织切片观察所形成实体瘤的病理学特征。**结果:** 小鼠接种 LLC 细胞 14 d 后在接种部位开始形成实体瘤, 瘤块直径增加为 1 ~ 1.8 cm。与单纯化疗荷瘤组小鼠相比, VI-28 辅助治疗组的胸腺较大, 脾细胞对 ConA 反应性较强, 形成实体瘤的瘤块较小且分化程度较高。**结论:** VI-28 胶囊可有效地促进化疗小鼠免疫功能的恢复, 帮助化疗药物抑制肿瘤生长, 是一种有效的化疗辅助药。

[关键词] VI-28; 环磷酰胺; 肿瘤; 辅助治疗

[中图分类号] R730.5 [文献标识码] A

Beneficial Effect of Vigonic VI-28 Capsule on Cyclophosphamide-Treated C57BL/6 Mice Carrying Lewis Lung Cancer Tumor

ZHANG Ling¹, BAI Xiao-wei, YANG Jing-jing², WANG Li-zhong¹, GAO Xiao-ming¹(1. Department of Immunology, Peking University, Beijing 100083, China; 2. Department of Histology Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether Vigonic VI-28 capsule, a formulated traditional Chinese medicine containing radix Ginseng, cornu cervi pantotrichum and semen cuscuteae, can assist tumor chemotherapy in a mouse model. **Methods:** Female C57BL/6 mice were s. c. injected with viable Lewis lung cancer (LLC) cells (10^6 cells/mouse). The mice were then treated with cyclophosphamide (Cyp, 40 mg/kg bodyweight, once every other day). One group was intragastrically given 2% VI-28 (0.5 ml/mouse, every other day) during the course of the chemotherapy. By day 28, the mice were sacrificed and their thymic indices and tumor indices were calculated and compared. Splenocytes were collected for analysis of their immunological status. Histological study was carried to examine the solid tumors. **Results:** Fourteen days after the injection of LLC cells, solid tumors developed in most of the animals, reaching 1 ~ 1.8 cm diameters by 28 th day Compared with mice of the LCC + Cyp group, thymus glands from the LLC + Cyp + VI-28 group were significantly heavier. Splenocytes of the same group responded better to ConA stimulation *in vitro*. Histochemical examination of the tumor tissues revealed that tumors of the Cyp + VI-28 group were better differentiated (less aggressive) than that of the Cyp group. **Conclusion:** Vigonic VI-28 capsule can promote recovery of immune system in mice undergoing chemotherapy and help Cyp to control the growth of tumor cells *in vivo*.

[Key words] VI-28; chemotherapy; tumor; supplementary therapy

复方中药 VI-28 胶囊(大陆上市名: 卫康星牌卫康胶囊) 以人参和鹿茸为主, 辅以菟丝子, 具有扶正固本、增强免疫力的功能。在我们最近完成的研究中, 给老年雌性 Balb/c 小鼠喂饲含有 VI-28 药粉的饲料能够延缓其胸腺的退缩, 防止外周 T 淋巴细胞的功能衰减^[1]。

香港科技大学的工作表明, VI-28 栓剂在人体具有明显的抗氧化作用^[2]。瑞典 Karolinska 研究所的研究显示,

[作者简介] 张 玲(1974-), 女, 北京人, 医学学士, 主管技师, 主要从事基础免疫学方面的研究

VI-28 可以调节诸多细胞因子的表达^[3]。

抗肿瘤化疗药环磷酰胺 (Cyp) 具有强烈的免疫抑制作用^[4]。我们最近发现灌胃给维化灵 (VI-28 衍生物) 能够促进 Cyp 化疗小鼠免疫功能的恢复^[5]。本研究的主要目的是进一步探讨对荷瘤小鼠进行 Cyp 化疗时使用 VI-28 胶囊辅助治疗的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

VI-28 胶囊 (卫康星牌卫康胶囊) 由香港维康力 (国际) 有限公司提供, 主要成分人参、鹿茸、菟丝子等。注射用环磷酰胺及刀豆蛋白 A (ConA) 购自美国 Sigma 公司。3H-TdR 由北京原子能研究所提供。多聚甲醛 (分析纯) 购自北京化工厂。小鼠 Lewis 肺癌细胞系 (LLC) 由北京大学人类疾病基因中心提供。

1.2 荷瘤小鼠模型的建立

SPF 级 C57BL/6 种纯系小鼠 (体重 18 ~ 22 g, 雌性) 由北京联合利华公司提供。将培养的 LLC 细胞用 PBS 调整浓度至 1×10^7 /ml, 台盼兰染色活细胞比例大于 95%, 将上述细胞悬液接种于 C57BL/6 小鼠背部皮下, 0.1 ml/只。

1.3 小鼠分组及治疗

实验共分为 3 组: (I) 荷瘤 + 生理盐水对照组 (LLC 组); (II) 荷瘤 + Cyp 治疗组 (LLC + Cyp 组); (III) 荷瘤 + Cyp + 灌胃 VI-28 组 (LLC + Cyp + VI-28 组)。后两组在接种肿瘤的第 3 天开始隔天腹腔注射 Cyp (40 mg/kg, 每只 0.04 ml)。第 3 组同时开始隔天灌胃给 VI-28 药粉悬液 (2 g/100 ml), 每只每次给药 0.5 ml。每周称量体重。第 28 天后将小鼠处死并取胸腺、脾脏及肿瘤组织块。

1.4 肿瘤组织的组织化学分析

肿瘤组织用固定液固定后进行作石蜡切片, HE 染色后观察组织结构变化。取胸腺称重计算胸腺指数。对肿瘤进行称重计算肿瘤大小及抑瘤率。

1.5 增殖实验

将脾脏研磨制成单细胞悬液, 镜下计数悬成 5×10^6 /ml, 100 ml/well 加入 96 孔板中, 并加入不同浓度的 ConA 进行刺激 48 h, 掺入 ³H-TdR 8 h 后收细胞, 用 b-counter 测 CPM 值。

2 结果

2.1 荷瘤小鼠模型的建立

Lewis 废瘤肿瘤细胞系 (LLC) 经体外培养扩增后, 台盼兰染色确认其活细胞在 95% 以上并处于良好的生长状态。C57BL/6 雌性小鼠 (共 10 只) 背部皮下接

种 LLC 细胞 (1×10^6 /只)。第 14 天时, 70% 的小鼠在接种部位出现瘤块, 直径在 4 ~ 6 毫米之间, 第 26 天死亡 1 只。至第 28 天时全部形成肿块, 直径 1 ~ 1.8 厘米, 这一结果显示 LLC 接种 C57BL/6 小鼠能够建立较好的小鼠荷瘤模型。下面的实验中均按照上述条件建模。

2.2 各实验组小鼠体重的监测结果

实验共分为 3 组 (每组 10 只): ① LLC 组 (荷瘤, 无治疗); ② LLC + Cyp 组 (荷瘤加化疗); ③ LLC + Cyp + VI-28 组 (荷瘤、化疗加 VI-28 辅助)。对 3 组小鼠于接种 LLC 细胞后体重的变化做了自始至终的监测。如图 1 所示, 3 组小鼠的体重在实验过程中未出现显著的差异。

图 1 治疗过程中小鼠体重变化

Fig. 1 Mouse body weight changes during the course of chemotherapy

2.3 各组动物胸腺指数的比较

在实验开始后第 28 天将小鼠处死, 取胸腺称重并计算胸腺指数 (胸腺重量/体重)。“荷瘤加 Cyp 组”的胸腺指数 ($0.14 \pm 0.05\%$) 显著低于“荷瘤无治疗组” ($0.25 \pm 0.05\%$) ($P < 0.05$), 可见 Cyp 化疗造成了小鼠胸腺的萎缩。而“荷瘤、化疗加 VI-28 组”的胸腺指数 ($0.23 \pm 0.1\%$) 则明显大于单纯化疗组 ($P < 0.05$), 且与无化疗组之间无显著性差异。这一结果说明 VI-28 有效地减轻了 Cyp 对胸腺的抑制。

2.4 各组动物细胞免疫功能的比较

荷瘤小鼠用 Cyp 治疗后出现明显的脾脏肿大, 而加用 VI-28 组则有缓解, 并接近于正常对照组 (结果未显示)。为了观察化疗以及 VI-28 辅助治疗后小鼠的细胞免疫功能状态, 用 ConA (T 细胞致有丝分裂原) 对来自各组小鼠的脾细胞进行活化, 并用 ³H-TdR 掺入法测定 T 细胞增殖情况。如图 (3) 所示, LLC + Cyp 组小鼠的脾细胞对 ConA 几乎丧失了反应能力, 荷瘤未化疗小鼠的脾细胞对 ConA 的反应能力亦明显低于健康对照组。相比之下, LLC + Cyp + VI-28 组的脾细胞则保

持了较好的 ConA 反应性。由此可见 VI-28 可有效地使化疗小鼠 T 淋巴细胞的功能得到了较快的恢复。

图 2 不同实验组小鼠 T 细胞功能的比较

Fig. 2 ConA-induced proliferation of splenocytes from mice of different groups

2.5 肿瘤组织的比较

在实验第 28 天时将荷瘤小鼠的瘤块取出,称重并计算肿瘤指数(肿瘤质量/体重)。荷瘤未治疗组的肿

瘤指数为 $3.8 \pm 1.0\%$,而单纯 Cyp 治疗组(LLC + Cyp)为 $1.82 \pm 0.78\%$,两者之间有显著差异($P < 0.05$)。LLC + Cyp + VI-28 组的肿瘤指数最小($0.11 \pm 0.1\%$),明显低于未治疗组($P < 0.001$)和单纯 Cyp 治疗组($P < 0.05$),可见 Cyp + VI-28 组的抑瘤率明显高于 Cyp 单独使用组。

将所获取的小鼠瘤组织甲醛固定包埋后切片,HE 染色后观察其组织形态上的改变。来自未治疗荷瘤组的瘤块为低分化腺癌,瘤细胞弥漫分布,可见血道淋巴道转移,严重出血、坏死(图 3A,3B)。来自 LLC + Cyp 组的瘤块相对较小,但是其分化程度与未治疗组相似(为低分化腺癌),伴有严重出血和坏死(图 3C,3D)。相比之下,LLC + Cyp + VI-28 组的肿瘤组织为高分化腺癌,生长较不旺盛(图 3E)。这些结果说明 VI-28 在对化疗小鼠免疫系统功能保护的基础上,还表现出与 Cyp 协同抑制肿瘤生长的作用。

图 3 实验小鼠肿瘤组织的形态学观察

Fig. 3 Histochemical examination of tumor tissues from the tumor-bearing mice undergoing chemotherapy with, or without, VI-28

A: LLC only ($\times 20$); B: LLC only ($\times 10$); C: LLC + Cyp($\times 20$); D: LLC + Cyp($\times 10$); E: LLC + Cyp + VI-28

3 讨论

人参为五加科人参属植物,具有极高的药用价值。它的主要化学成分为皂甙类和糖类,具有抗感染、抗肿瘤的作用,可促进免疫功能的活性^[6-8]。鹿茸为鹿科鹿属动物梅花鹿或马鹿尚未骨化的带有茸毛幼角,其主要化学成分为胆固醇、磷脂类、多胺类及多糖类化合物,有补益精血和强健筋骨的作用。现代免疫学研究表明,鹿茸能够促进巨噬细胞以及 T 和 B 淋巴细胞的功能^[9]。菟丝子是中医药中常用的滋补肝肾的常用中药,《神农本草经》列为上品,称之“养肌强阴,坚筋骨……久服明目轻身延年”。有研究表明,菟丝子的水、醇提取物及菟丝子多糖均可使幼龄小鼠的胸腺和脾脏增重,增加小鼠的吞噬功能,对非特异性免疫和特异性免疫都显示增强作用^[10-11]。

我国中医学认为:疾病的发生,取决于两个方面因

素,首先是机体阴阳失调,脏腑功能紊乱,正气虚衰;其次是外邪侵袭。在正气虚损及机能失调时(如发生肿瘤或者化疗时),应着重调整机体功能,扶正固本。VI-28 胶囊(卫康胶囊)就是以扶正固本为配方依据,以人参、鹿茸主辅以菟丝子,具有增强免疫力的作用。

从上面报告的结果可见,VI-28 胶囊能够与化疗药协同作用,抑制肿瘤在体内的生长与分化。另外,VI-28 可以辅助化疗小鼠免疫系统功能状态的恢复,这与我们此前报道的结果相一致^[1,5]。至于 VI-28 是通过增强机体的抗肿瘤免疫力还是直接参与肿瘤的杀伤和/或抑制来实现其抗肿瘤作用尚需要进一步研究。

VI-28 胶囊免疫调节作用的分子机制也已经得到了初步阐明。瑞典 Karolinska 研究所 L Hammastrom 教授的实验室用 VI-28 在体外刺激人外周血淋巴细胞,随后用 DNA 芯片技术对淋巴细胞的 800 多个免疫和炎症相关基因表达情况进行监测,发现 VI-28 可以

(1)上调干扰素、IL-2受体和MIG的表达;(2)先上调后下调IL-1,IL-6,TNF- α 和IL-1b的表达;(3)下调趋化因子(如CXC,GRO- α ,GRO-g,IL-8等)的基因表达^[3]。

VI-28胶囊的免疫增强作用不仅在实验室里反复得到证实,柬埔寨和越南也已经成为一种颇受欢迎的艾滋病辅助治疗药物。这些结果均表明,VI-28作为有效的免疫增强剂,在肿瘤化疗的辅助治疗上可能具有广阔的应用前景。

致谢:感谢北京大学医学部病理学系李新霞博士对肿瘤病理诊断上的帮助与指导。

[参考文献]

- [1] Zhang L, Wang Y, Wang LZ, *et al*. Immunopotentiating effect of a "Yang"-promoting Chinese formula [J]. *Phytother Res*, 2004, 18: 852-858.
- [2] Mak DHF, Chiu PY, Poon MKT, *et al*. A yang-promoting Chinese herbal suppository preparation enhances the antioxidant status of red cells in male subjects [J]. *Phytotherapy Research*, 2004, 18: 525-530.

- [3] Hammarstrom QP, Wen S, Hammarstrom L: Vigonic formula VF-08 (VI-28) treatment induced alteration of gene expression in human lymphocytes [J]. Manuscript preparation.
- [4] 马西艺, 乐园伟, 施用晖, 等. 肽聚糖对环磷酰胺杀瘤和免疫抑制的调节作用研究 [J]. 中国肿瘤生物治疗学杂志, 2003, 10(4): 268
- [5] 张玲, 杨鹏, 白晓薇, 等. 维化灵、对小鼠免疫系统影响的研究 [J]. 中医药学刊, 2003, 21(8): 1263-1264.
- [6] 李杰, 宋淑霞, 吕占军. 人参皂甙抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国肿瘤生物治疗学杂志, 2004, 11(1): 61-64.
- [7] 罗俊生, 顾立学, 席焕久, 等. 人参皂甙与IL-2协同诱导PB-MC对恶性脑胶质细胞杀伤活性研究 [J]. 中国肿瘤生物治疗学杂志, 2000, 7(4): 273-274.
- [8] 李欣志, 孙健宁. 补气药-人参. 沈映君. 中药药理学 [M]. 第6版, 北京: 人民卫生出版社, 2000. 861-875.
- [9] 李欣志, 洪纛. 补阳药-鹿茸. 沈映君. 中药药理学 [M]. 第6版, 北京: 人民卫生出版社, 2000. 900-903.
- [10] 李更生, 李雅妍, 李顺成. 南方菟丝子水溶性成分免疫活性的研究 [J]. 中国中医药科技, 1997, 4(4): 253-259.
- [11] 林慧彬, 林建强, 林建群, 等. 山东产四种菟丝子免疫增强作用的比较研究 [J]. 中西医结合学报, 2003, 1(1): 51-53.

[收稿日期] 2005-02-15

[修回日期] 2005-02-29

[本文编辑] 韩丹, 王莹

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2005)01-0060-01

贝复济防治急性放射性黏膜炎和皮炎的临床观察

李贞, 赵维萍, 邵震宇, 张为, 马洪娥(山东大学齐鲁医院肿瘤中心放疗科, 济南市 250012)

放射治疗(放疗)是目前治疗恶性肿瘤的主要手段之一,但放疗是损伤性治疗,在杀灭肿瘤细胞的同时,对正常的组织细胞也有不可避免的损伤,急性放射性黏膜炎和皮炎即是头颈部肿瘤放疗中最常见的并发症,头颈部肿瘤患者在常规分割放疗中,严重的口腔黏膜炎发生率高达33%~49%。该并发症的发生不仅给患者带来极大的痛苦,严重者可导致放疗中断,疗程延长,从而影响肿瘤的放疗疗效。贝复济为碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),可活化巨噬细胞,促进成纤维细胞、血管内皮细胞、表皮细胞的有丝分裂,促进新血管生成,改善微循环,达到快速促进创面愈合的目的,为此我们在头颈部肿瘤患者放疗中,应用贝复济对放射性黏膜炎和皮炎进行防治,观察其临床效果。2002年1月~2004年6月间在我院行放射治疗的120例头颈部肿瘤患者,采用随机配对法对其进行了贝复济的临床用药与对照组观察。治疗组及对照组患者均在出现I级放射性黏膜炎和放射性皮炎时开始用药。用药组将贝复济喷于放疗区域内非肿瘤部位的黏膜或皮肤,4次/天;黏膜炎常规处理组用多贝尔氏液漱口,西瓜霜局部喷涂,皮炎常规处理组用维斯克局部喷洒。根据RTOG急性损伤的分级标准进行临床评价。结果:治疗用药组III、IV级急性放射性黏膜炎及皮炎的发生率均低于相应对

照组,两组有显著性差异($P < 0.05$);本研究对照组因严重重复黏膜炎而中断疗程的患者有6例,而用药组在出现I级黏膜反应时,应用贝复济,按时多次用药,吞咽疼痛明显减轻,进食改善,一般情况好转,而没有间断放疗。放射性皮炎治疗组用贝复济后1~2d创面渗出物减少,局部瘙痒、疼痛及烧灼感减轻,3~4d创面干燥,结痂,愈合,创面愈合时间为3~15d,平均 9.21 ± 4.05 d。对照组创面愈合时间为7~30d,平均 18.23 ± 7.34 d,两组有显著性差异($P < 0.05$)。总之在头颈部肿瘤放疗过程中,同时应用贝复济,可显著降低III、IV级急性放射性黏膜炎和皮炎的发生率,并可起到止痛止痒,促进创面愈合等作用,从而可以防止放疗的中断,配合加速超分割放疗或放化疗结合,对提高肿瘤控制率有重要意义。本组临床观察发现贝复济使用安全方便,无异味,无刺激性,易被患者所接受,未发现任何副作用及肝、肾功能损害,而且价格低廉,值得临床推广使用。

[关键词] 放射性黏膜炎;放射性皮炎;贝复济

[中图分类号] R730.55

[文献标识码] D

[收稿日期] 2004-10-20

[修回日期] 2005-01-18

[本文编辑] 王莹, 韩丹