

五福饮对荷瘤小鼠抑瘤率和免疫调节作用的影响

张红玉¹, 杨锋², 王波波², 陈宇² (1.杭州市肿瘤医院药剂科, 杭州 310002; 2.浙江省中医药研究院, 杭州 310007)

摘要: 目的 观察五福饮对荷 S₁₈₀ 移植瘤小鼠免疫功能的影响及抑瘤作用。方法 荷瘤小鼠随机分为模型组、环磷酰胺对照组(80 mg·kg⁻¹), 五福饮低、中、高剂量组(分别含生药 5.25, 10.5, 21.0 g·kg⁻¹, 相当于人体临床用量的 10, 20 和 40 倍)及正常对照组。结果 与模型组比较, 五福饮高、中 2 个剂量组均可明显提高荷瘤小鼠 ConA 诱导的脾淋巴细胞转化、小鼠 NK 细胞活性和血清 IFN- γ 、TNF- α 水平, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。五福饮各组对 S₁₈₀ 移植瘤抑制率为 11%~16%, 但与模型组比较无明显差异($P>0.05$)。结论 五福饮对 S₁₈₀ 移植瘤的抑制作用不显著, 但可增强荷 S₁₈₀ 移植瘤小鼠的免疫功能。

关键词: 五福饮; 调节免疫; 抗肿瘤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)09-0949-04

Effects of Wufu Decoction on Tumor Inhibition Rate and Immune Regulation of Tumor-burdened Mice

ZHANG Hongyu¹, YANG Feng², WANG Bobo², CHEN Yu² (1. Pharmacy Department, Hangzhou Cancer Hospital, Hangzhou 310002, China; 2. Zhejiang Institute of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effects of Wufu decoction on the immune regulation and tumor inhibition rate of tumor-burdened mice. **METHODS** Mice were randomly divided into six groups: model group, cyclophosphamide group, low, middle and high dose of Wufu decoction groups (5.25, 10.5, 21.0 g·kg⁻¹, equivalent to 10, 20 and 40 times of human clinical dosage), normal control group. **RESULTS** High and middle dose of Wufu decoction groups could significantly increase T lymphocyte transformations capacity induced by ConA ($P<0.05$), improve NK cell activity ($P<0.05$), and raise serum IFN- γ , TNF- α level ($P<0.05$). The tumor inhibition rates of three Wufu decoction groups were 11%~16%, but had no obvious difference compared with model group ($P>0.05$). **CONCLUSION** Wufu decoction has no significant inhibition to S₁₈₀ transplantation tumor, but can significantly improve the immunological function of tumor-burdened mice.

KEY WORDS: Wufu decoction; immune regulation; antitumor

五福饮处方来源于明代名医张景岳的《景岳全书》, 主要由人参、熟地黄、当归、白术、炙甘草组成, 主治五脏气血亏损, 中医临床上常用于治疗痘收靥而痂不落, 昏昏欲睡, 胎动不安, 日晡潮热, 阴虚盗汗, 脾胃不香, 疟疾反复, 经久不愈, 怔忡心悸, 遗精滑脱等; 宜温者, 加姜、附; 宜散者, 加升麻、柴、葛^[1]。五福饮现代研究的文献报道甚少, 但组成该方的五味中药均分别有较多关于免疫调节作用的文献报道^[2-6], 由于组成五福饮的 5 味中药均可用于保健食品原料, 其配方又来源于明代, 应用的历史悠久, 所以, 有必要采用现代药理手段观察其免疫调节作用, 可为五福饮的研发和临床应用提供实验依据。目前, 关于五福饮对免疫功能的调节作用尚未见报道, 本实验选用小鼠肿瘤模型作为免疫低下模型, 观察五福饮对肿瘤的抑制作用和对模型小鼠的免疫

调节作用。

1 材料与仪器

1.1 材料

五福饮浸膏由生晒参、熟地黄、当归、白术、炙甘草组成, 将以上 5 味中药材, 8 倍冷水浸泡 2 h, 加水煎煮 3 次, 每次 1.5 h, 滤过, 滤液浓缩至 1 g·mL⁻¹ 的清膏, 加乙醇使含醇量达 60%, 冷藏 24 h, 滤取上清液, 回收乙醇至浸膏, 并用蒸馏水制成 1 g·mL⁻¹ 供试样品备用。注射用环磷酰胺 (CTX, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号: 04121001, 每瓶 200 mg); γ -干扰素测定试剂盒 (美国 TPI 公司, 批号: 0713M2, 规格: 96T); 肿瘤坏死因子- α 测定试剂盒 (美国 TPI 公司, 批号: 1202M1, 规格: 96T); 小鼠 S180 移植瘤株 (中国科学院上海药物研究所肿瘤室)。

1.2 仪器

3165型CO₂培养箱(美国Forma公司); 2450型液闪仪(PerkinElmer公司); 细胞收集仪(PerkinElmer公司); GS-6R型离心机(Beckman公司); HR40-II-A2型医用净化工作台(青岛海尔特种电器有限公司); CK40-F200型倒置显微镜(日本OLYMPUS公司); MSS全波长酶标仪(Gene Company)。

1.3 动物

ICR小鼠, ♀, 清洁级, 体质量(20±2) g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 实验动物合格证号: 2008001619934。小鼠试验前在动物房环境中适应3 d。

2 方法与结果

2.1 分组及剂量

实验设五福饮低、中、高剂量组、CTX对照组、模型组和正常对照组, 每组10只。低、中、高3个五福饮组给药剂量分别为5.25, 10.5, 21.0 g生药·kg⁻¹(相当于人临床拟用量的10, 20和40倍), 3个剂量组分别称取“1.1”项下五福饮样品25, 50和100 mL, 加蒸馏水至100 mL, 配制成浓度为0.25, 0.50和1.00 g·mL⁻¹样品, 灌胃给药, 灌胃容量按0.02 mL·g⁻¹计, 1次·d⁻¹, 连续14 d。CTX对照组剂量为80 mg·kg⁻¹, 共注射2次, 在实验第3, 6天腹腔注射。模型组每日灌胃蒸馏水20 mL·kg⁻¹。除正常对照组外, 其余各组均在给药前24 h每只腋下皮下接种S₁₈₀移植瘤细胞0.2 mL, 细胞浓度为2×10⁷个·mL⁻¹。

2.2 ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验^[7]

给五福饮样品第14天, 动物摘眼球取血后颈椎脱臼处死, 每鼠无菌取脾, 制成单细胞悬液, 在200目尼龙网袋内轻轻捻压, 过滤, 制成脾细胞悬液, 用无菌Hanks液洗2次, 用RPMI 1640完全培养液调整细胞浓度为1×10⁷个·mL⁻¹, 将细胞悬液加入96孔培养板中, 一式3孔, 每孔0.1 mL, 每孔加入含ConA(10 μg·mL⁻¹)的RPMI 1640完全培养液0.1 mL。培养板置5% CO₂, 37 °C培养72 h。培养结束前16 h每孔加入³H-TdR 20 μL, 使其终浓度为3.7×10⁴ Bq·mL⁻¹。用细胞收集器收集细胞于玻璃纤维滤纸上。滤纸盒中加入闪烁液, 用液闪仪测定每分钟脉冲数(CPM)。结果用3个复孔的平均CPM表示。

2.3 NK细胞活性测定(LDH测定法)^[7]

给五福饮样品第14天, 每鼠无菌取脾, 制成

单细胞悬液, 调整细胞浓度为5×10⁶个·mL⁻¹, 试验前24 h将YAC-1细胞(靶细胞)调整细胞浓度至1×10⁵个·mL⁻¹。取靶细胞和脾细胞悬液(效应细胞)各100 μL(效靶比50:1), 加入U型96孔培养板中, 靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各100 μL, 靶细胞最大释放孔加靶细胞和2.5% Triton各100 μL; 上述各项均设3复孔, 于37 °C 5%CO₂培养箱中培养4 h, 离心, 每孔吸取上清100 μL, 置平底96孔培养板中, 同时加入乳酸脱氢酶(LDH)基质液100 μL, 反应7 min, 每孔加入1 mol·L⁻¹的HCl 30 μL, 在490 nm波长处测OD值, 按以下公式计算NK细胞活性。

NK 细胞活性(%)=(反应孔 OD-自然释放孔 OD/最大释放孔 OD-自然释放孔 OD)×100%

2.4 小鼠血清 IFN-γ、TNF-α含量测定

给五福饮样品第14天, 动物摘眼球取血, 分离血清。采用ELISA法按试剂盒操作说明进行, 将测得的OD值在标准曲线上查出其IFN-γ、TNF-α浓度。

2.5 抑瘤率检测

给五福饮样品第14天, 荷瘤小鼠均剥离实体瘤, 称体质量, 计算抑瘤率。

抑瘤率=(1-给药组平均瘤重/对照组平均瘤重)×100%。

2.6 数据处理

各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较采用方差分析, 所有数据均由SPSS 17.0统计软件进行处理, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2.7 结果

2.7.1 五福饮对荷瘤小鼠淋巴细胞增殖能力及NK细胞活性的影响 五福饮高、中剂量组可明显提高荷瘤小鼠脾淋巴细胞增殖能力, 与模型组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。荷瘤小鼠的模型组淋巴细胞增殖能力明显低于正常对照组($P < 0.001$), 表明肿瘤使细胞免疫功能明显下降, 而化疗药CTX可使荷瘤小鼠细胞免疫功能下降更明显($P < 0.05$)。五福饮高、中剂量组可明显提高荷瘤小鼠NK细胞活性, 与模型组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。模型组NK细胞活性明显低于正常对照组($P < 0.001$), 表明肿瘤可使NK细胞活性明显下降。结果见表1。

表 1 五福饮对荷瘤小鼠淋巴细胞增殖能力及 NK 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of Wufu decoction on T lymphocyte transformations capacity and NK cell activity of tumor mice($\bar{x} \pm s$)

组 别	动物数/只	淋巴细胞增殖/CPM	NK 细胞活性/%
五福饮低剂量组	10	7 393±2 085	25.1±5.2
五福饮中剂量组	10	8 103±2 600 ¹⁾	30.3±10.9 ¹⁾
五福饮高剂量组	10	8 901±3 822 ¹⁾	30.0±9.2 ¹⁾
CTX 对照组	10	3 821±2 010 ¹⁾	16.1±4.6
模型组	10	5 927±1 909	20.1±5.7
正常对照组	10	13 369±5 591 ²⁾	48.2±10.6 ²⁾

注:与模型组比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.001$

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.001$

2.7.2 五福饮对荷瘤小鼠血清细胞因子的影响
五福饮高、中剂量能显著提高荷瘤小鼠血清IFN- γ 、TNF- α 含量,与模型组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。模型组荷瘤小鼠的血清IFN- γ 、TNF- α 含量明显低于正常对照组($P<0.01$),表明肿瘤使免疫细胞因子明显减少。化疗药CTX可使荷瘤小鼠免疫细胞因子减少,其中TNF- α 的下降与模型组比较有明显差异($P<0.05$),表明CTX可抑制免疫细胞分泌细胞因子。结果见表2。

表 2 五福饮对荷瘤小鼠细胞因子的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of Wufu decoction on cell factor of tumor mice($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数/只	IFN- γ /pg·mL ⁻¹	TNF- α /pg·mL ⁻¹
五福饮低剂量组	10	30.63±12.15	20.40±2.28
五福饮中剂量组	10	35.75±10.75 ¹⁾	21.80±2.30 ¹⁾
五福饮高剂量组	10	35.91±10.24 ¹⁾	22.20±2.11 ¹⁾
CTX 对照组	10	20.63±8.20	14.50±2.79 ¹⁾
模型组	10	24.13±9.53	18.10±3.84
正常对照组	10	44.13±10.03 ²⁾	24.10±3.54 ²⁾

注:与模型组比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

2.7.3 五福饮对S₁₈₀移植瘤的抑制作用 五福饮各组对S₁₈₀移植瘤的抑制率在11%~16%,但与模型组比较均无明显差异($P>0.05$)。而CTX对S₁₈₀移植瘤有明显的抑制作用($P<0.001$)。五福饮对荷瘤小鼠体质量无明显影响,而CTX可使荷瘤小鼠体质量明显下降($P<0.05$)。结果见表3。

表 3 五福饮对荷瘤小鼠体质量及抑瘤率的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effects of Wufu decoction on body weight and tumor inhibition rate of tumor mice($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数/只	体质量/g	瘤重/g	抑瘤率/%
五福饮低剂量组	10	36.2±2.8 ¹⁾	8.1±3.8	11
五福饮中剂量组	10	36.5±2.2 ¹⁾	7.7±2.3	15
五福饮高剂量组	10	36.9±2.6 ¹⁾	7.6±3.0	16
CTX 对照组	10	32.9±3.6	2.1±3.3 ²⁾	77
模型组	10	35.9±2.9	9.1±2.5	/

注:与CTX对照组比较,¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较,²⁾ $P<0.001$

Note: Compared with CTX group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.001$

3 讨论

五福饮处方来源于明代中医(公元1563年—1640年)经验方,收编于《景岳全书》,张景岳是明代杰出的医学家,为温补学派的代表,有温补大家之称。五福饮主要由人参、熟地黄、当归、白术、炙甘草组成,主治五脏气血亏损,具有补益气血、扶正固本的作用。关于五福饮现代研究的文献报道甚少,但组成该方的五味中药均分别有较多关于免疫调节作用的文献报道。如现代药理学证明人参具有提高机体细胞免疫功能^[2],增强NK细胞活性^[3],提高巨噬细胞吞噬功能^[4]。地黄具有增强体液免疫和细胞免疫功能^[5]。当归具有提高人淋巴细胞转化功能,对小鼠T淋巴细胞功能有明显的促进作用,可提高小鼠单核吞噬细胞吞噬功能^[6]。白术具有促进T淋巴细胞转化,显著增强NK细胞活性,提高淋巴因子IL-2的产生,增强巨噬细胞吞噬功能,促进血清溶血素生成的作用^[8-9]。甘草具有提高小鼠免疫能力的作用,张泽生对实验动物进行碳粒廓清实验、淋巴细胞增殖实验、血清溶血素水平测定实验,研究甘草多糖对非特异性和特异性免疫系统的影响,结果表明,与空白对照组比较,低、中、高剂量甘草多糖给药组小鼠的免疫能力均有显著提高($P<0.05$),并呈现一定剂量依赖关系^[10]。还有报道证明甘草能升高血中IL-2、TNF- α 含量。五福饮中人参、熟地黄、当归、白术均可用于保健食品原料,甘草可作为食品原料。基于五福饮由免疫增强作用的中药组成,作者曾设计该方用于增强免疫力功能的保健食品开发,而五福饮全方对免疫的调节作用又未见报道,为此,本实验采用肿瘤小鼠免疫低下模型,观察了五福饮对肿瘤抑制率及免疫功能的影响,

结果表明:五福饮以生药 $10.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $21\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (体重)灌胃荷瘤小鼠,可明显提高小鼠的脾淋巴细胞增殖反应($P<0.05$)、NK细胞活性($P<0.05$)、血清IFN- γ 、TNF- α 含量($P<0.05$),提示五福饮可增强荷瘤小鼠的免疫功能。五福饮各组对S₁₈₀移植瘤的抑制率在11%~16%,但与模型组比较均无明显差异($P>0.05$)。因此,笔者认为五福饮本身并不具有直接抑制肿瘤的作用,而是通过增强免疫功能起到一定的辅助抗肿瘤作用。这一结果将为中药五福饮的保健食品开发和肿瘤辅助治疗提供实验依据。

REFERENCES

- [1] ZHANG J B. Jingyue Quanshu(景岳全书) [M]. Shanghai Scientific and Technical Press, 1964: 981.
- [2] XÜ B L, SUN J. Experimental study on the effect of reinforcing drugs on cellular immune function [J]. Zhejiang J Tradit Chin Med(浙江中医杂志), 1996(5): 219-220.
- [3] WANG Z F, MIAO X L, CHEN D C, et al. Effects of ginsenosides on CD19 cell and NK cell in scalded rats with sepsis [J]. Chin J Integr Tradit West Med Intensive Crit Care(中国中西医结合急救杂志), 2007, 14(4): 219-221.
- [4] JI Y B. The pharmacology and application of anticancer(抗癌中药药理与应用) [M]. Harbin: Heilongjiang science and Technology Press, 1992: 28-30.
- [5] WANG J, YU Z, LI G S, et al. Experimental study on rehmanioside A in yin and regulating immune functions [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2002, 37(1): 20-22.
- [6] LIU Z X, ZUO Z Y. Study on the immune pharmacological effect of Radix Angelicae Sinensis [J]. Chin J Integr Tradit West Med(中国中西医结合杂志), 1992, 12(6): 378-380.
- [7] MINISTRY OF HEALTH. Technical Standards for Testing and Assessment of Health Food(保健食品检验与评价技术规范) [M]. Tsinghua Tongfang Electronic Press, 2003: 22-23.
- [8] HUANG L, LI L M, TANG L Y, et al. Effects of Baishu decoction on immune function in mice [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2012, 28(1): 114-115.
- [9] YAO S J, LIU B Y, SUN Y. Effects of Rhizoma Atractylodis Macrocephalae on NK and IL-2 activity of tumor-bearing mice [J]. Bull Med Res(医学研究通讯), 2005, 34(12): 52.
- [10] ZHANG Z S, SHI S, YANG C H, et al. Research on the effect of glycyrrhiza polysaccharide on immunity [J]. Prog Mod Biomed(现代生物医学进展), 2008, 8(10): 1835-1837.

收稿日期: 2013-01-21

数据挖掘技术在动物造模中的应用

余炜, 万悦(安徽朗诺医药有限公司, 合肥 230601)

摘要: 目的 将数据挖掘技术引入动物造模的过程中,使用数据挖掘技术建立动物造模的计算机仿真模型,展示数据挖掘技术在动物造模中的价值。方法 将30只SD大鼠,♂,随机分为对照组和实验组。实验组采用完全弗氏佐剂右后足趾腱膜下注射致炎造模,对照组同部位注射等量生理盐水。第0,14,21天测量大鼠足跖部的厚度;在不同时点对关节部位进行关节炎指数(AI)的评定;第0,7,14,21天观察大鼠的体重变化;第14天和第21天分别随机选取5只大鼠,断颈处死取血测IL-1 β 、IL-17、TNF- α 含量并观察病理切片。将上述采集的指标纳入数据库,利用SPSS MODELER进行数据挖掘分析。结果 利用数据挖掘技术建立了3个模型:综合模型、C5.0决策树模型和神经网络模型,三者的正确率依次为95%,90%,100%,累计增益曲线均有不同程度的明显提升,同AI评分及病理切片结果吻合。结论 本研究通过结合佐剂性关节炎大鼠造模的实例,详细对数据挖掘技术在动物造模中应用的流程、方法、优化和评价进行了说明和阐述,新的数据处理方法的引入可以针对多种评估指标构建出不同的预测评估模型,有效地对数据进行解析并提取有意义的信息辅助决策。

关键词: 数据挖掘;动物造模;SPSS MODELER

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)09-0952-08

Application of Data Mining Techniques in the Process of Animal Modeling

YU Wei, WAN Kai(Anhui Renovo Pharmaceutical Co., Ltd., Hefei 230601, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To use data mining technology in the process of animal modeling to create a computer simulation model, and show the value of data mining technology. **METHODS** Thirty male SD rats were randomly divided into control

基金项目: 安徽省教育厅 2011 年重点项目(KJ2011Z230)

作者简介: 余炜, 男, 硕士 Tel: (0551)68778262 E-mail: YUWEI52213@163.com