



松花粉对环磷酰胺增效减毒作用研究

巩萍¹, 孙铜², 戴晓莉³, 马玉奎^{3*}

(1. 山东省临朐县人民医院, 山东 临朐 262600; 2. 山东省食品药品检验研究院, 济南 250101;
3. 山东省药学科学院, 济南 250100)

【摘要】 目的 研究松花粉对环磷酰胺化疗有无增效和减毒作用。方法 采用腹水型 S180 小鼠为实验系统, 通过检测抑瘤率、血液学和肝功能指标, 评价松花粉对环磷酰胺化疗的增效和减毒作用; 采用免疫低下小鼠模型为实验系统, 通过检测巨细胞吞噬功能、溶血素水平和胸腺、脾脏指数, 评价松花粉的免疫调节作用。结果 松花粉(150、300、600 mg/kg) 与环磷酰胺合用后抑瘤率明显提高, 可明显抑制环磷酰胺引起的白细胞下降和肝功能的损伤, 可提高免疫低下小鼠单核吞噬细胞的吞噬功能、溶血素水平和免疫器官系数。结论 松花粉可通过调节免疫对环磷酰胺化疗起到明显的增效减毒作用。

【关键词】 松花粉; 免疫调节; 增效减毒; 环磷酰胺

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 05-0060-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.05.014

Synergism and attenuation effects of Pini Pollen on cyclophosphamide

GONG Ping¹, SUN Tong², DAI Xiao-li³, MA Yu-kui^{3*}

(1. People's Hospital of Linqu County, Linqu 262600, China; 2. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101; 3. Shandong Pharmaceutical Academy, Jinan 250100)

【Abstract】 **Objective** To investigate the synergism and attenuation effects of Pini Pollen on cyclophosphamide chemotherapy in model mice. **Methods** The models of mouse were induced with S180 tumor and cyclophosphamide. The tumor inhibiting rates, hematology, Liver function, giant cell phagocytosis, hemolysin level and indexes of thymus and spleen were determined to evaluate the synergism and attenuation effects of Pini Pollen (150, 300, 600 mg/kg) on cyclophosphamide chemotherapy. **Results** Compared with cyclophosphamide chemotherapy group, the tumor inhibiting rates, white blood cell number, giant cell phagocytosis, hemolysin level and indexes of thymus and spleen were increased, at the same time liver function damage were alleviated significantly in cyclophosphamide plus Pini Pollen groups. **Conclusions** Pini Pollen has a remarkable synergism and attenuation effects on cyclophosphamide chemotherapy through its immune adjustment functions.

【Key words】 Pini Pollen; Synergism and attenuation; Immune adjustment; Cyclophosphamide

我国恶性肿瘤的发病率和死亡率逐年上升, 每年新发肿瘤病例 300 多万, 已严重危害人类的生命与健康。目前临床上对于肿瘤的治疗多采用化疗

方式, 但是治疗过程中大部分患者往往因无法耐受化疗药物所带来的副作用而中断治疗。临床上如何减少化疗的毒副作用是亟待解决的问题, 而中医

[基金项目] 山东省自主创新及成果转化专项(2014ZZCX02104)。

[作者简介] 巩萍(1972-), 女, 主治医师, 本科, 研究方向: 临床药学。E-mail: yaoliduli@163.com

[通讯作者] 马玉奎(1975-), 男, 主任药师, 博士, 研究方向: 新药药理毒理评价。E-mail: yukuima@sina.com

药在这方面却可以发挥很好的作用。松花粉(Pini Pollen)又名松花、松黄,可药食兼用,是我国传统中药材,在我国具有悠久的药用历史,唐代的《新修本草》已有记载。松花粉的主要成分为蛋白质、磷脂、多种维生素和矿物质等^[1]。现代药理研究证明,松花粉具有抗氧化、降糖、保肝、抗衰老、提高机体免疫力和抗肿瘤作用等众多功效^[2,3]。本文采用腹水型 S180 小鼠和免疫低下小鼠模型考察了松花粉对环磷酰胺化疗的增效减毒作用并对其机制进行了初步研究,为松花粉进一步研究和开发利用提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 KM 小鼠,雌雄各半,4 周龄,体重(20 ± 2)g,由山东大学实验动物中心提供[SCXK(鲁)2014-0004]。饲养于 SPF 级屏障环境[SYXK(鲁)2014-0008],室温 20 ~ 25℃,湿度 40% ~ 70%,动物自由饮水饮食。本实验经过山东省药学院 IACUC 的批准,批准号为 2014025。

1.2 主要试剂和仪器

松花粉(烟台新时代健康产业有限公司提供,批号 14010412);注射用环磷酰胺(CTX,齐鲁制药有限公司提供,批号:20140823);血液学、血液生化学检测试剂盒均由宁波瑞源生物科技有限公司提供。

HEMAVET-950 型全自动血球计数仪(Drew Scientific 公司);日立 7180 全自动生化分析仪(日本株式会社日立高新技术);HH-CP-01W 二氧化碳培养箱(北京中科环试仪器有限公司);721-100 型可见分光光度计(上海光学仪器一厂);电子数显卡尺(杭州安恒测控技术有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 对环磷酰胺化疗的增效减毒作用^[4]

80 只小鼠接种腹水型 S180 肿瘤后 6 d 内抽取腹水,用 0.9% 氯化钠注射液稀释调整细胞数为 3.0 ~ 4.0 × 10⁷ 个细胞每毫升,在无菌条件下将肿瘤细胞接种于小鼠右腋下,0.2 mL 每只。接种后将小鼠随机分为模型组、CTX 单用组、CTX + 松花粉(150、300、600 mg/kg)三个剂量组和松花粉(150、300、600 mg/kg)单用三个剂量组。接种次日开始灌胃给予相应剂量的松花粉 20 mL/kg,模型和 CTX 单用组给予等容积的纯水。给药第 10 天,除模型和单

用松花粉组外,其余各组小鼠连续 3 d 静脉给予 CTX 50 mg/kg。末次给予松花粉后 3 h,腹主动脉采血,检测白细胞(WBC)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)等指标。采血后取每只动物的瘤块并称瘤重,计算抑瘤率和 q 值^[4]。

肿瘤抑制率 = (A-B)/A × 100%,B 为药物组平均瘤重,A 为模型组平均瘤重。

q 值 = E(ab)/[Ea + (1-Ea) × Eb],E(ab) 为两种药物合用的肿瘤抑制率,Ea、Eb 为两种药物单用的肿瘤抑制率,q 大于 1.15 表示两种药物合用具有协同作用。

1.3.2 松花粉对小鼠巨细胞吞噬功能的影响^[5]

60 只小鼠随机分为正常组、模型组、松花粉 150、300、600 mg/kg 三个剂量组,每组 10 只,雌雄各半。各组小鼠分别每天 1 次灌服不同浓度的药物溶液 20 mL/kg,正常和模型组给予等容积纯水,连续 14 d。除正常组外,其余各组小鼠于给药第 7、9、11 天分别腹腔注射 50 mg/kg CTX,14 d 给药后 2 h,静脉给予 25% 墨汁 10 mL/kg 体重后 2、10 min 各采血 20 μL,加入 0.1% Na₂CO₃ 溶液 2 mL,675 nm 下测 OD 值。剖检小鼠后采集肝脏和脾脏称重,计算碳粒廓清指数(K)和吞噬指数(α)。

廓清指数 $K = (\log OD_1 - \log OD_2) / (T_2 - T_1)$,吞噬指数 $\alpha = K^{1/3} \times \text{体重} / (\text{肝脏重量} + \text{脾脏重量})$ 。

1.3.3 松花粉对小鼠血清溶血素水平的影响^[5]

60 只小鼠,按照 1.3.2 方法分组和给予松花粉。松花粉各剂量组给药第 5 次后,腹腔注射 0.2 mL 20% 兔红细胞悬液进行免疫,免疫后第 2、4、6 天腹腔注射 50 mg/kg CTX。模型组同法进行免疫和给予 CTX。14 d 给药后 2 h 麻醉后取胸腺和脾脏,称重计算 100 g 体重的相对系数。腹主动脉采血取血清,取 10 μL 血清用生理盐水稀释至 1 mL,与 0.5 mL 20% 兔红细胞悬液和 0.5 mL 补体混匀,37℃ 水浴中保温 0.5 h,0℃ 终止反应,离心取上清液,540 nm 下测 OD 值。

1.4 统计学方法

采用 DAS2.0 统计软件,实验数据以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 t 检验进行组间比较。以 P < 0.05 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 松花粉对环磷酰胺化疗的增效作用

与模型组比较,松花粉和环磷酰胺合用后的抑

瘤率明显高于环磷酰胺或松花粉单用组,合用后 q 值大于 0.85,说明松花粉在 150、300、600 mg/kg 三个剂量下均可明显增强环磷酰胺的抗肿瘤作用。结果见表 1。

2.2 松花粉对环磷酰胺化疗的减毒作用

与模型组比较,环磷酰胺化疗后裸鼠 WBC 数量明显减少,血清中 ALT 和 AST 水平明显升高,说明环磷酰胺化疗和引起 WBC 减少和损伤肝功能;与 CTX 组比较,化疗的同时给予松花粉 300、600 mg/kg 后以上指标明显恢复 ($P < 0.05$),说明松花粉在 300 mg/kg 以上剂量可明显抑制环磷酰胺化疗引起的白细胞减少和肝功能损伤。结果见表 2。

2.3 松花粉对小鼠巨噬细胞吞噬功能的作用

与正常组比较,模型组廓清指数和吞噬指数明显降低 ($P < 0.01$),说明造模复制成功。与模型组比较,松花粉 300、600 mg/kg 剂量组廓清指数和吞噬指数明显提高 ($P < 0.05$),说明松花粉以上剂量对免疫低下小鼠巨噬细胞的吞噬功能有明显的提高作用。

2.4 松花粉对小鼠血清溶血素水平的影响

与正常组比较,模型组小鼠溶血素水平、脾脏和胸腺系数廓清指数明显降低 ($P < 0.01$),说明造模复制成功,小鼠免疫受到抑制。与模型组比较,松花粉 300、600 mg/kg 剂量组溶血素水平、胸腺和脾脏系数明显提高 ($P < 0.05$),说明松花粉以上剂量对免疫低下小鼠的免疫功能有明显的提高作用。

表 1 松花粉对化疗的增效作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 The synergism effects of Pini Pollen on cyclophosphamide in model mice

组别 Groups	剂量/mg/kg Dosage	瘤重/g Tumor weight	抑瘤率/% Rate of tumor inhibition	p 值 p value
模型 Model	—	1.92 ± 0.49	—	—
CTX	50	0.95 ± 0.36 **	50.5	—
松花粉 Pini Pollen	600	1.32 ± 0.41 *	31.3	—
	300	1.44 ± 0.26	25.0	—
	150	1.61 ± 0.44	16.1	—
CTX + 松花粉	600 + 50	0.70 ± 0.19 **	63.5	0.96
CTX + Pini Pollen	300 + 50	0.79 ± 0.27 **	58.9	0.93
	150 + 50	0.88 ± 0.37 *	54.2	0.88

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs 模型组。

Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs model group.

表 2 松花粉对环磷酰胺化疗的减毒作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 2 The attenuation effects of Pini Pollen on cyclophosphamide in model mice

组别 Groups	剂量/mg/kg Dosage	WBC / $10^9/L$	ALT /U/L	AST /U/L
模型 Model	—	7.8 ± 1.1	62 ± 15	152 ± 23
CTX	50	4.9 ± 0.7 *	131 ± 32 **	214 ± 35 **
CTX + 松花粉 CTX + Pini Pollen	50 + 600	7.0 ± 1.2 [#]	81 ± 22 [#]	172 ± 28 [#]
	50 + 300	6.5 ± 0.8 [#]	90 ± 27 [#]	188 ± 35 *
	50 + 150	5.8 ± 1.0 *	105 ± 37 *	199 ± 39 *

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs 模型组; [#] $P < 0.05$, vs CTX 组。

Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs model group; [#] $P < 0.05$, vs CTX group.

表 3 松花粉对免疫低下小鼠巨噬细胞吞噬功能的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 3 The effects of Pini Pollen on carbon clearance rate in model mice

组别 Groups	剂量/mg/kg Dosage	廓清指数 (K) Clearance index	吞噬指数 (α) phagocytic index
正常 Normal	—	0.020 ± 0.005	4.99 ± 0.55
模型 Model	50	0.011 ± 0.003 ^{##}	3.72 ± 0.58 ^{##}
	600	0.017 ± 0.004 *	4.55 ± 0.22 *
	300	0.015 ± 0.003 *	4.39 ± 0.39 *
松花粉 Pini Pollen	150	0.014 ± 0.002	3.99 ± 0.39

注: * $P < 0.05$, vs 模型组; ^{##} $P < 0.01$, vs 正常组。

Note. * $P < 0.05$, vs model group; ^{##} $P < 0.01$, vs normal group.

表 4 松花粉对小鼠血清溶血素水平、胸腺和脾脏系数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)
 Tab. 4 The effects of Pini Pollen on hemolysin level, thymus and spleen coefficient in model mice

组别 Groups	剂量/mg/kg Dosage	溶血素水平/OD 值 Hemolysin level	胸腺系数/g/100 g Thymus index	脾脏系数/g/100 g Spleen index
正常 Normal	—	0.53 ± 0.05	0.33 ± 0.05	0.48 ± 0.11
模型 Model	50	0.29 ± 0.03 ^{##}	0.21 ± 0.05 [#]	0.30 ± 0.08 ^{##}
	600	0.42 ± 0.04 ^{**}	0.29 ± 0.04 [*]	0.43 ± 0.09 [*]
松花粉 Pini Pollen	300	0.38 ± 0.04 ^{**}	0.26 ± 0.04 [*]	0.40 ± 0.07 [*]
	150	0.35 ± 0.06	0.24 ± 0.05	0.35 ± 0.09

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs 模型组; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, vs 正常组。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs model group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, vs normal group.

3 讨论

目前恶性肿瘤发病率和死亡率逐渐上升,正严重危害着全人类的生命与健康,世界卫生组织预测全球肿瘤发病率每年以 10% 的速度递增,每年新发病例约 1500 万。而我国每年新增肿瘤病人 200 多万,因癌症死亡约 150 万人,已成了各类死因之首^[6]。目前对于肿瘤的治疗,仍以化疗为主,但化疗的毒副作用太大,且易出现耐药性,这些弊端严重制约着化疗药物的使用,降低了肿瘤患者用药的依从性。因此如何提高化疗药物的治疗效果,降低化疗带来的毒副作用是临床上急需解决的问题。而中药因其多成分、多靶点和多环节效应以及副作用小等优点在辅助化疗药物抗肿瘤方面可起到优势互补作用。中药可通过改善机体的内环境和调节机体免疫力等多个方面来缓解肿瘤病人症状,提高患者的生存质量^[7]。

环磷酰胺是广泛应用的抗癌药物之一,对恶性淋巴瘤、肺癌、多发性骨髓瘤、宫颈癌、乳腺癌等均有较好的疗效,本药也作为免疫抑制剂治疗非肿瘤疾患。骨髓抑制、胃肠道反应、脱发和肝功能损伤是其主要的不良反应。本研究采用 S180 腹水型小鼠肿瘤模型,通过检测抑瘤率研究其对化疗药物的增效作用,选用环磷酰胺最常见的白细胞减少和肝功能损伤副作用,研究其对化疗药物的减毒作用。研究结果表明,小鼠给予 CTX 后出现 WBC 减少、AST 和 ALT 肝功能指标升高,提示出现明显肝功能损伤,与临床肿瘤病人使用 CTX 化疗后出现的血液和肝功损伤副作用基本一致。CTX 化疗的同时给予松花粉后 WBC 数量显著增多,血清中 AST 和 ALT 含量显著降低,说明松花粉对 CTX 化疗因其在

血液系统和肝功能损伤副作用有显著保护作用。抑瘤试验结果显示,CTX 化疗的同时给予松花粉可使抑瘤率明显提高,合用后 P 值大于 0.85,说明松花粉和 CTX 合用后疗效具有协同作用,可显著增加化疗药物的抑瘤效果。本文还采用 CTX 致免疫低下小鼠,通过检测巨噬细胞吞噬功能、血清溶血素含量和胸腺、脾脏相对系数等免疫学指标,评价了松花粉对免疫系统和免疫功能的影响,结果亦显示与免疫低下模型小鼠比较,灌胃给予松花粉后小鼠巨噬细胞吞噬能力提高,血清中溶血素水平、胸腺和脾脏系数明显提高,说明松花粉对免疫低下小鼠的免疫功能有明显的提高作用。综上所述本实验结果充分证明,松花粉对化疗药物具有明显的增效、减毒作用和免疫提高能力,但其确切的作用机制仍有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 何晓燕,孙雪园,于智洋. 松花粉的营养成分及药理作用[J]. 东北林业大学学报,2007,35(9):78-80.
- [2] 谢娇,王华,任廷远,等. 松花粉的功效及应用展望[J]. 食品与药品,2011,12(3):139-141.
- [3] 李雯雯,陈才法,李悦,等. 松花粉醇提取物抗肿瘤作用的初步研究[J]. 解放军药学学报,2011,27(3):199-201.
- [4] 王作军,马玉奎,贾玉萍,等. 毛蚶提取物辅助 NP 化疗的增效减毒作用[J]. 中国比较医学杂志,2015,25(5):37-40.
- [5] 徐淑云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 第三版. 北京:人民卫生出版社,2002:1421-1455.
- [6] 吴菲,林国帧,张晋昕. 我国恶性肿瘤发病现状及趋势[J]. 中国肿瘤,2012,21(2):81-85.
- [7] 张顺辰,要晓静. 中药抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国处方药,2015,13(5):19-20.

[收稿日期]2016-09-18