

六味地黄汤对诱变和自发肿瘤的抑制作用

中国中医研究院中药研究所(北京 100700)

赵良辅 严述常 张玉顺 李兰芳 武桂兰 姜廷良

内容摘要 由小鼠的微核及对自发性肿瘤影响试验,发现六味地黄汤能够降低正常的和化学诱变的动物骨髓多染细胞微核出现率;连续投药60周后,动物肿瘤的自发率随用药剂量增大而降低。其中,大剂量组的自发率明显低于对照组($P<0.01$)。说明该方药对突变和癌变皆具有一定的防护作用。

关键词 微核 出现率 诱变 癌变 自发性肿瘤 自发率

六味地黄汤(丸)为中医临床治疗肝肾阴虚的经典名方。一些实验和临床研究表明,六味地黄汤(LWDHd)对小鼠的化学诱癌有明显的抑制作用^[1]。能改善荷瘤机体的免疫、代谢、造血及甲状腺的功能,延长荷瘤动物的存活时间等^[2]。它还能够有效地阻断人食管上皮细胞重增的癌变^[3]。但由于预防食管癌的用药周期长,是否也有化疗药样的毒副作用?本实验就该方对诱变和自发肿瘤的影响作了观察。

材料与方法

LWDHd 的制备:所用熟地、山萸肉、山药、丹皮、茯苓及泽泻等六味药购自北京市药材公司,并经专家作生药鉴定。上述药味按原方配比(8:4:4:3:3:3)水提3次,每次煮沸1h,合并滤液,并浓缩备用。

实验动物:除微核试验中一次昆明种小鼠外,其余实验皆用封闭群 LACA 小鼠,由本院动物饲养场提供。

给药方法:一般采用混入饲料中供小鼠自由摄食。根据对小鼠日进食量的观测,决定饲料中的药物浓度。以原饮片计,即每公斤饲料面中分别含 LWDHd 120、12及2.4g,其剂量相当于30.0、3.0及0.6g/kg。同时,给食普通料块为对照。

微核试验参照有关报道方法进行^[4]。各实验结果,均进行统计学处理。

结 果

一、LWDHd对化学诱变的影响

以小鼠骨髓中多染细胞的微核出现率来观测致突变作用。用昆明种雄性小鼠,随机分成八组,对照组为20只,其余各组为10只。先给小鼠以10g/kg LWDHd 灌胃3天,于第4天腹腔注射三种不同剂量的环磷

酰胺(CY),24h取双侧股骨骨髓涂片、染色。然后,在油镜下计数微核出现率(表1)。CY诱变的阳性对照动物和先经LWDHd防治的动物的微核出现率,皆表现为随CY剂量增加上升,并且,对应组间无明显差异。但是,防治后的动物微核出现率,随CY剂量降低而下降的幅度比阳性对照要大。另外,只给 LWDHd 的微核出现率为 $2.8\pm1.8(\%)$,而对照组为 $5.0\pm2.2(\%)$,两者 t 检验, $P<0.05$ 。

表1 给药3天各组的微核出现率

组 别	六味地黄汤 (g/kg)	环磷酰胺 (mg/kg)	微核出现率(%) ($\bar{x}\pm S$)
对 照	—	—	5.0 ± 2.2
六味地黄汤	10	—	$2.8\pm1.8^*$
(1)	—	100	30.1 ± 16.5
环磷酰胺(2)	—	50	21.3 ± 12.6
(3)	—	25	17.1 ± 9.7
六味地黄汤(1)	10	100	38.9 ± 21.8
+ (2)	10	50	18.1 ± 4.1
环磷酰胺(3)	10	25	11.6 ± 4.2

*与对照组比较, $P<0.05$

当 LWDHd 的给药时间延长为10天,并加大其剂量(34.5g/kg),以及进一步减小CY的剂量时,再观察动物的微核出现率(表2)。动物为雄性LACA小鼠,对照组为10只,其余7组为5~6只。所得结果与前次基本一致。当CY剂量降为12.5mg/kg时,微粒出现率为 $9.2\pm4.4(\%)$,给予 LWDHd 防治后为 $3.4\pm3.0(\%)$,组间有显著差别($P<0.05$)。只给 LWDHd 的动物微核出现率较对照亦有降低趋势。

根据两次微核试验的结果,进行回归分析(表3)。其中单给CY的两条曲线的回归方程为 $\hat{y}_1=12.7+0.174X$, $\hat{y}_2=9.4+0.094X$,其截距分别为12.7和9.4;给LWDHd防治后,其回归方程为 $\hat{y}_1^*=1.2+0.317X$ 和 $\hat{y}_2^*=3.2+0.130X$,截距分别为1.2和3.2。

表 2 给药10天各组动物的微核出现率

组 别	六味地黄汤 (g/kg)	环磷酰胺 (mg/kg)	微核出现率(‰) ($\bar{x} \pm S$)
对 照	—	—	3.5±1.5
六味地黄汤	34.5	—	2.8±0.8
(1)	—	100	17.8±15.2
环磷酰胺(2)	—	50	16.5±7.1
(3)	—	12.5	9.2±4.4
六味地黄汤(1)	34.5	100	15.2±8.8
+ (2)	34.5	50	12.4±7.6
环磷酰胺(3)	34.5	12.5	3.4±3.0*

* 与单给等剂量环磷酰胺比较, $P < 0.05$

表 3 两次微核试验结果的相关回归分析

试验 次数	组 别	截距 (a)	斜率 (b)	相关系数 (r)
1	环磷酰胺	12.7	0.174	1.000
	六味加环磷酰胺	1.2	0.317	0.995
2	环磷酰胺	9.4	0.094	0.894
	六味加环磷酰胺	3.2	0.130	0.930

两次实验结果表明, LWDHd对正常小鼠的自发性突变和化学诱变皆具有一定的抑制作用。随着CY作用剂量的降低, LWDHd抑制小鼠的突变作用会有所增强。

二、LWDHd对小鼠自发性肿瘤的影响

将3~4周龄LACA小鼠按体重均分4组, 每组100只, 雌雄各半。对照组给食普通料块, 其他3组给食含不同浓度LWDHd的料块, 连续60周。

1. 投药期间动物的一般情况

投药期间, 3个给药组的动物体重, 除中剂量组的个别时点波动较大外, 体重的增长都较平稳, 一直持续到第13个月。对照组则于第9个月出现峰值, 以后趋于下降。第13个月时, 3个给药组的雌性动物体重皆明显大于对照组($P < 0.01$), 小剂量组雄性动物也大于对照组($P < 0.05$)。各给药组中的两性小鼠生长回归直线精度($Sy \cdot x$)皆优于对照组(表4)。各组动物于投药期间皆陆续出现一些死亡现象。其原因多在于肠炎、肺炎及其它感染性疾病。组间无明显差异。

2. 病理形态学检查

动物的心、肝、脾、肺、肾、胃、肠等脏器和部分腺体, 经病理组织形态学检查, 结果见表5。对照组和各给药组的肿瘤在发生部位上, 经Ridit检验无明显差异。病理检查认为, 未见因药物引起的肿瘤。

3. 自发肿瘤的比较

在三个给药组中, 共有15只动物患有肿瘤, 占5%。

表 4 各组动物的生长曲线精变分析

性别	组别	剂 量 (g/kg)	相 关 数 (r^{**})	截距 (a)	斜率 (b)	残 差 ($Sy \cdot x$)
雄	对照	—	0.84	24.5	0.87	2.49
	给药(1)	30.0	0.91	23.6	0.83	1.67
	(2)	3.0	0.94	23.6	0.88	1.41
	(3)	0.6	0.97	23.2	1.13	1.25
雌	对照	—	0.88	29.7	1.06	2.54
	给药(1)	30.0	0.92	28.8	1.17	2.19
	(2)	3.0	0.92	28.4	1.12	2.12
	(3)	0.6	0.95	28.6	1.27	1.84

** $P < 0.001$

表 5 肿瘤发生的部位分布

组 别	剂 量 g/kg	总计	淋巴腺	胸腺	肾上腺	肺	其他
总计	—	24	8	5	4	4	3
对照	—	9	4	1	2	1	1
给药(1)	30.0	1	—	—	—	1	—
(2)	3.0	5	—	2	1	1	1
(3)	0.6	9	4	2	1	1	1

其发生率分别为1%、5%及9%, 而对照组为9%。高剂量组与对照组的发生率之间差异非常显著($P < 0.01$), 见表6。肿瘤发生率随LWDHd剂量升高而下降。这表明LWDHd的长期使用, 对动物无致癌作用, 且在一定剂量下, 似可抑制肿瘤的自发。

表 6 各组自发性肿瘤的比较

组 别	动物数 (只)	剂 量 (g/kg)	荷瘤动物数 (只/组)	发生率 (%)
对照	100	—	9	9.0
给药	100			
(1)	100	30.0	1	1.0*
(2)	100	3.0	5	5.0
(3)	100	0.6	9	9.0

*与对照比较, $P < 0.01$

讨 论

一、检测化学物质致癌性和诱变性的短期试验方法很多。但是, 一般需要一组方法来确定化合物有无致癌性和诱变性。微核试验为我国首选致突变试验系统, 一般认为尚需Ames试验加以明确。从本报告中的两次微核试验的结果看(表1、2), LWDHd对正常小鼠的自发突变率具有降低作用, 先经口给LWDHd, 再给予不同剂量的CY诱变, 使两次试验的剂量一效应曲线的截距(a)皆减少许多(表3)。尤其在给LWDHd由3天延长为10天及化学诱变剂量降至12.5mg/

kg时,其微核出现率较对照组有着明显的抑制($P<0.05$)。这说明LWDHd对化学诱变也具有一定的抑制作用。

二、小鼠致癌试验的周期确定为80周以上,本实验对多数动物仅观察到60周。在实验中,观察到肿瘤发生率与LWDHd的剂量有关,以大剂量长期给药后,肿瘤的发生率显著低于对照($P<0.01$)。如果联想到该方药还能明显抑制亚硝胺类及乌拉坦的诱发肿瘤作用^①,以及降低CY的微核出现率。这些则进一步表明其对肿瘤的防治作用。LWDHd在小鼠上,既能够抑制自发的和化学诱发的突变,也能够降低肿瘤的自发率和化学诱发率,这就从另一方面支持致突变性和致癌性相关的学说。

三、体重是动物健康状况的一个重要标志^②,也是致癌试验中的一项重要观察指标。本实验就表示动物生长回归曲线的精度的残差而言(表4),给药动物

好于对照,且小剂量优于大剂量。LWDHd的大剂量利于防癌,而小剂量则利于生长。

(本实验研究中,张惠英、刘玉兰、周爱香、王雁平、吴子伦等同志曾参加部分工作,并得到黄念君老师指导,特此致谢)

参 考 文 献

- 1.姜廷良,等.六味地黄汤对肿瘤的防治作用.中医杂志(英文)1981;4(1):59.
- 2.中药研究所肿瘤组,等.六味地黄汤对实验肿瘤发生发展影响的初步观察.新医药学杂志1977;(7):41.
- 3.中医研究院中药所肿瘤组.六味地黄汤抑制食管上皮细胞增生的临床效果初步观察.新医药学杂志1977;(7):15.
- 4.卫生部药品生物制品检定所.微核试验.药物毒理研究进展,1981:166—171.
- 5.吕伯钦,等.实验毒理学基础.北京:人民卫生出版社,1987:137.

蛇药胶囊治疗蛇咬伤272例疗效观察

安徽省黄山市祁门蛇伤研究所(黄山 245600)

汪国和 黄坤成 程军权 滕 英 芮爱华

1988年3~12月,我们使用本所自制的中药制剂“蛇药胶囊”配合西药治疗毒蛇咬伤患者272例,收到满意的效果。现报告如下。

临床资料 本组共272例,其中男163例,女109例,年龄<10岁13例,10~20岁51例,21~60岁198例,>60岁10例;毒蛇种类:蝮蛇咬伤159例,竹叶青蛇咬伤54例,五步蛇咬伤42例,眼镜蛇咬伤12例,银环蛇咬伤3例,烙铁头蛇咬伤2例;根据第三届全国蛇伤学术交流会(1987年11月17日广西梧州市)制定的分型标准:本组轻型83例,重型182例,危型7例。

治疗方法 蛇药胶囊组成:半边莲、白芷各500g,木芙蓉叶、花各500g。均为中药店所购。将以上药物清洗后放在铁锅中煎熬去渣,制成膏剂,冷却后放入干燥箱进行干燥,然后加入适量淀粉,装入2号空心胶囊,每粒相当生药3g,装瓶备用。

蛇伤患者住院后分型治疗,轻型患者用蛇药胶囊每次6~8粒口服,每日4次,同时口服维生素C、复合维生素B等,伤口用法瘀散(金果榄、白芷、黄柏、川芎、黄药子等研细末)水调外敷,每天1次;重、危型患者使用蛇药胶囊6粒口服,每日4次,同时使用精制单价抗蛇毒血清4000~10000u和地塞米松20~40mg静脉滴注,抗蛇毒血清经皮试阴性后缓慢静脉注射,若皮试阳性则采用稀释分段静脉滴注法,伤口外敷法

瘀散。如同时伴有感染症状者选用抗生素治疗。如并发休克、大失血、DIC、呼吸衰竭和循环、肾功能衰竭者,采用相应的中西医结合抢救措施。

结 果 本组272例蛇伤患者全部治愈(症状消失,伤口愈合,伤肢功能活动自如,血液化验正常)。住院天数:轻型 3.0 ± 1.5 天($\bar{x}\pm S$,下同),重型 7.0 ± 2.8 天,危型 18.0 ± 6.1 天。其中有11例因伤后结扎时间过长,又未及时就医,致使伤口或伤肢局部并发溃烂,经积极的治疗均痊愈出院。

讨 论 蛇药胶囊中的半边莲具有清热解毒,利水消肿及改善临床症状的作用,解疮毒,尤其是解蛇毒的功能较好。凡蛇、虫咬伤,可捣烂外敷,重者兼内服之。经现代研究表明,半边莲含有类似生物碱样黄色结晶,称为半边莲素,能治疗风湿性神经痛。白芷含有白芷毒素,能兴奋大脑,发表祛风,消肿止痛,外敷治蛇伤;还可治乳痈发背,疮痍疥癣,止痛排脓,解砒毒蛇伤刀箭金疮,有排脓生肌止痛之功效。木芙蓉清热解毒,消肿止痛排脓,适用于一切痈肿恶疮,用于未化脓者可使之消散,用于已成脓者可使脓疮早溃。我们认为蛇药胶囊有以下优点:(1)服用方便,省去了中药的煎熬时间。(2)副作用少,无过敏反应。(3)药物资源丰富充足,市场中药店随时有售。(4)制作工艺简单,便于推广使用。

The Detection of Anti-Cancer Biological Effect of Naphthoquinone Pigment-LIII

Lu Guirong(路桂荣), Liao Jing(廖 静), et al

Beijing Institute for Cancer Research, Beijing (100034)

Naphthoquinone pigment-LIII, an extract from *Arnebia euchroma*, could apparently inhibit the proliferation of stomach cancer cell line and esophagus cancer cell line. At the effective concentration of 5 $\mu\text{g/ml}$, the mitotic index and growth curve declined without showing any damage to human normal cells. At 5~10 $\mu\text{g/ml}$, the colony efficiency of cancer cells became significantly low. The anti-cancer effect of Naphthoquinone pigment-LIII might be related to its role of influencing the amount of RNA and ultrastructure of cancer cells which was discussed in this paper.

(Original article on page 422)

The Adjustable Action of Pi-Shen Recipe(脾肾方) on Immune Function of Mice with L₁₂₁₀ Ascites

Duan Shaojin(段绍瑾), et al

Dept. of Basic Medicine, Guang-An-Men Hospital, China Academy of TCM, Beijing (100053)

Proliferation of Con A stimulated splenic lymphocyte was examined by incorporation of ³H-thymidine. Fluorescence polarization of DPH labelled splenic lymphocyte and bone marrow cells was measured. Proliferation of Con A stimulated splenic lymphocyte in DBA inbred healthy mice was higher than that of L₁₂₁₀ mice but fluorescence polarization of DPH labelled splenic lymphocyte in same healthy mice was lower than that of L₁₂₁₀ mice, ie. membranous lipid lymphocyte fluidity of lymphocyte in the healthy mice was smaller than that of L₁₂₁₀ mice. 9 days after administration of Pi-Shen recipe by tube stomach proliferation of Con A-lymphocyte in the healthy mice has been increased. The recipe-adjusted splenic lymphocyte membrane lipid fluidity of L₁₂₁₀ mice to level of those in healthy mice. Effects of Pi-Shen recipe on lipid fluidity of bone marrow cell membrane of L₁₂₁₀ mice were almost similar to that in splenic lymphocytes. These studies suggest that the mechanism on adjustable role of Pi-Shen recipe on T-lymphocyte function related to lymphocyte membrane lipid fluidity.

(Original article on page 426)

Study on Anti-Cancer Effects of Sanjie Pellet(散结片)

Liu Jinfang(刘今方), Tuo Chaowei(脱朝伟), et al

*Chinese PLA No. 202 Hospital, Shenyang (110003) **

In the present paper, the authors applied Sanjie pellet in the anti-cancer study on the animals. The results indicated that in the extracorporeal experiment, stomach perfusion with Sanjie pellet 12.5g/kg daily for 10 successive days, the inhibitory rate for the substantive liver cancer was 84%. For ascites liver carcinoma, it could raise the average rate of prolonging life span to 76%. Lethal dose (LD₅₀) was 25 g/kg. The pathological observations indicated that Sanjie pellet acted directly on the cell membrane and organelle of the liver cancer cells and causing lysis and clasis of the cell membrane, dilation of rough surface endoplasmic reticulum, the swelling of mitochondria and disintegration and clasis of the liver cancer cells body. The authors concluded that these were the main pharmacological efficacies of Sanjie pellet.

(Original article on page 429)

The Inhibitory Effect of Liuwei Dihuang Decoction(六味地黄汤)

on Induced Mutation and Spontaneous Tumor

Zhao Liangfu(赵良辅), Yan Shuchang(严述常), Jiang Tingliang(姜廷良), et al

Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of TCM, Beijing (100700)

Anti-mutagenic activity was evaluated with micronuclear test. It appeared to be same between the result of mice treated with 10 g/kg Liuwei Dihuang decoction (LWDHd) for 3 days and that with 34.5 g/kg for 10 days. All the permillages of micronuclear appearance of treated groups were less than that of controls. The intercept (A) value of dose-effect curve were 12.7 and 9.4 as treated with cyclophosphamide (Cy) alone, but 1.2 and 3.2 as orally administered with LWDHd before injecting Cy. It showed that LWDHd could inhibit mutagenic activity of Cy. The affection of LWDHd on spontaneous tumorigenesis was observed in LACA mice. The tumor incidence rate was 9.0% in the control mice observed for 60 weeks, but 5.0% in the animal feeding LWDHd in food. The tumor incidence rate of big dose group was 1.0% and the difference was significant between it and that of the control ($P < 0.01$).

(Original article on page 433)