



毛蚶提取物辅助 NP 化疗的增效减毒作用

王作军¹, 马玉奎², 贾玉萍², 高 清¹

(1. 山东省临朐县人民医院, 山东 临朐 262600; 2. 山东省药学科学院, 济南 250033)

【摘要】 目的 研究毛蚶提取物和 NP 方案化疗药物合用后有无增效和减毒作用。方法 采用人肺癌 A549 细胞株制备裸鼠移植瘤模型, 通过检测抑瘤率、体重、摄食量、血液学和血液生化学等指标, 全面评价毛蚶提取物和 NP 化疗方案合用后的增效减毒作用。结果 毛蚶提取物 (125、250、500 mg/kg, i. g) 与 NP 化疗方案合用比单用 NP 化疗方案抑瘤率明显提高, 明显抑制化疗引起的体重减轻、摄食量减少、减轻化疗对血液系统和肝肾功能的毒副作用。结论 毛蚶提取物对 NP 方案化疗具有明显的增效减毒作用。

【关键词】 毛蚶提取物; 增效减毒; 抑瘤率; 化疗

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 05-0037-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 005. 009

Synergism and attenuation effects of Scapharca Subcrenata Extraction on NP chemotherapy

WANG Zuo-jun¹, MA Yu-kui², JIA Yu-ping², GAO Qing¹

(1. People's Hospital of Linqu County, Shandong Linqu 262600, China; 2. Shandong Pharmaceutical Academy, Jinan 250033, China)

【Abstract】 Objective To investigate the synergism and attenuation effects of Scapharca Subcrenata Extraction on NP chemotherapy in model mice. **Methods** The models of nude mice were induced with A549 cell line xenograft. The tumor inhibiting rates, body weight, food intake, hematology and blood biochemistry index were determined to evaluate the synergism and attenuation effects of Scapharca Subcrenata Extraction (125, 250, 500 mg/kg, i. g) on NP chemotherapy. **Results** Compared with NP chemotherapy group, the tumor inhibiting rates, body weight, food intake, white blood cell number were increased and glutamate pyruvate transaminase, glutamic oxalacetic transaminase and urea nitrogen were decreased markedly in NP chemotherapy plus Scapharca Subcrenata Extraction groups. **Conclusion** Scapharca Subcrenata Extraction has a remarkable synergism and attenuation effects on NP chemotherapy.

【Key words】 Scapharca Subcrenata extraction; Synergism and attenuation; Tumor inhibition rate; Chemotherapy

毛蚶(*arca subcrenata lischke*)俗称毛蛤、麻蛤,属双壳软体动物,我国沿海地区资源丰富。毛蚶壳和肉均具有较高的营养与药用价值,《神农本草经》及历代本草中均有记载。毛蚶提取物为毛蚶肉经低温提取纯化加工制成,其主要的活性成份为毛蚶多糖和毛蚶多肽^[1]。以往研究表明,毛蚶提取物具有抗氧化、提高免疫力、体外抗肿瘤等药理活性^[2-4]。尽管有部

分中药体外抗肿瘤活性较高,但药物的体内活性会有较大差异,另外,单味中药一般情况下直接抗肿瘤作用较弱,临床上功效多体现在减轻临床症状、提高生存质量、防止复发转移、延长生存期、预防肿瘤、提高患者免疫力、增强放、化疗敏感性和减轻放、化疗不良反应等方面发挥作用^[5]。故本文采用人肺癌 A549 裸鼠移植瘤模型初步考察了毛蚶提取物对 NP 化疗

[作者简介] 王作军(1969-),男,主管药师,本科,研究方向:药物不良反应检测。

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

的增效减毒作用,为毛蚶提取物进一步研究和开发利用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物及瘤株 裸小鼠, BALB/c nu, 雄性, 20 ~ 24 g, 由北京大学医学部实验动物科学部【SCXK(京)2011-0012】, 选取 54 只用于试验。动物饲养于山东省临朐县人民医院独立送风 IVC - II 型隔离笼具中, 实验动物使用许可证号【SYXK(鲁)2010-0004】。室温 20℃ ~ 25℃, 湿度 40% ~ 70%, 人肺癌 A549 细胞系, 济南天长商贸有限公司提供。

1.1.2 药品与试剂 毛蚶提取物(青岛海慈肿瘤医院提供, 批号 100805), 淡黄棕色粉末, 味微咸、微腥, 密封、置阴凉处保存; 酒石酸长春瑞滨注射液(NVB, 江苏豪森药业股份有限公司, 批号: 110301); 注射用顺铂(CDDP, 齐鲁制药有限公司, 批号: 101003200)

1.1.3 仪器 Sysmex XT-2000IV 型全自动血球计数仪(Sysmex Corporation 制造); BS300 型生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司制造)。BC-J160S 型二氧化碳细胞培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂制造)。BDS200 型倒置生物显微镜(重庆奥特光学仪器有限责任公司制造)。JY2001 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司制造)。电子数显卡尺(广陆数字测控股份有限公司制造)。

1.2 方法

1.2.1 毛蚶提取物制备

将鲜活的毛蚶软体组织洗净后捣碎进行匀浆, 经低温提取、3000 r/min, 离心 15 min 后去沉淀、生物澄清剂吸附后进行冷冻分离、冻干后得冻干粉, 将冻干粉用硫酸铵分级沉淀、Superdex75 凝胶过滤层析、合并分子量为 3000 × 10³ 以下的洗脱峰, 得肽类化合物洗脱液, 最后冻干洗脱液、再用灭菌注射用水溶解冻干粉、经 Sephadex-G-25 脱盐柱脱盐后所得提取液经冻干即得毛蚶提取物。提取物中含总蛋白质 50% ~ 60%, 游离氨基酸 3%, 多糖 2%, 核糖核酸微量及少量的脂肪。

1.2.2 裸鼠移植瘤模型建立及动物分组

将人肺癌 A549 细胞进行常规传代, 增殖培养至所需细胞量后胰酶消化收集细胞, 取细胞悬液置显微镜下计数调整细胞数。在无菌条件下, 接种于

裸小鼠右腋下, 接种量 1.0 ~ 2.0 × 10⁷ 个细胞/0.1 mL/只。裸小鼠接种肿瘤细胞后, 定期用游标卡尺分别测量瘤体积($V = 3.14 \times \text{长径} \times \text{宽径} \times \text{高}^{[6]}$), 测得瘤体积为 100 ~ 300 mm³ 时, 随机分为正常对照组、模型对照组、NP 方案化疗对照组、毛蚶提取物组 500、250、125 mg/kg 三个剂量同时应用 NP 化疗方案组、毛蚶提取物组 500、250、125 mg/kg 三个剂量组, 每组 6 只。

1.2.3 动物给药

毛蚶提取物组给予不同剂量的药物, 分组后每天灌胃给药 1 次, 连续给药 21 d; NP 方案化疗组第 8、16 天各腹腔注射 1 次 NVB, 剂量为 3.4 mg/kg, 第 10、12、14 天各腹腔注射 1 次 CDDP, 剂量为 6.7 mg/kg。毛蚶提取物和 NP 方案化疗合用组在 NP 方案化疗的同时给予不同剂量的毛蚶提取物; 正常对照组和模型对照组灌胃给予等容积的蒸馏水和腹腔注射给予等容积的生理盐水。

1.2.4 指标检测和结果评价^[7]

试验中每 3 d 称量裸小鼠体重和摄食量, 观察裸小鼠的一般状态。末次给药后 2 h 摘眼球采血, 检测白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HB)等血液学指标和丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、尿素氮(BUN)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TB)、白蛋白(ALB)等血液生化学指标。采血后将所有动物脱臼处死后解剖瘤块称瘤重, 计算肿瘤抑制率。

肿瘤抑制率 = $(C-T)/C \times 100\%$, T 为给药组平均瘤重, C 为阴性对照组平均瘤重。得出抑瘤率后, 以 q 值评定两药合用的疗效。

$q \text{ 值} = E(AB) / [EA + (1 - EA) \times EB]$, E(AB) 为两药合用的抑制率, EA、EB 为两药单用的抑制率, $q = 0.85 \sim 1.15$ 表示两药作用相加, $q > 1.15$ 表示两药作用协同, $q < 0.85$ 表示两药作用拮抗。

1.2.5 统计学处理

各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 毛蚶提取物对 NP 方案化疗小鼠体重的影响

与模型对照组比较, NP 方案化疗后小鼠体重逐渐减轻, 而同时给予毛蚶提取物后, 随着给药时间延长, 裸小鼠体重逐渐恢复, 给药 21 d 后体重稍低于模型对照组, 而明显高于化疗组(表 1)。

表 1 毛蚶提取物对裸小鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 1 The effects of Scapharca Subcrenata extraction on body weight of model nude mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Group	剂量 Dose /mg/kg	体重 Body weight(g)				
		0 d	6 d	12 d	18 d	21 d
正常对照 Normal	—	22.8 ± 2.2	23.1 ± 2.2	23.5 ± 1.7	24.3 ± 1.2	25.5 ± 2.2
模型对照 Modle	—	23.1 ± 1.4	24.2 ± 2.2	24.5 ± 1.4	24.7 ± 1.8	25.3 ± 2.0
NP 化疗 NP chemotherapy	3.4/6.7	23.8 ± 1.5	23.5 ± 1.9	21.9 ± 1.6*	21.4 ± 1.7*	21.0 ± 1.6*
毛蚶提取物 + NP 化疗 Scapharca Subcrenata Extraction + NP chemotherapy	500 + 3.4/6.7	23.7 ± 1.8	23.2 ± 1.9	22.1 ± 0.9	23.5 ± 2.0#	24.0 ± 1.9#
	250 + 3.4/6.7	22.6 ± 1.2	22.5 ± 1.8	20.2 ± 1.8	21.5 ± 2.2	23.2 ± 1.7#
	125 + 3.4/6.7	23.6 ± 1.2	23.2 ± 1.9	21.5 ± 0.6	22.0 ± 0.9	23.8 ± 1.0#

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs 模型组; # $P < 0.05$, vs NP 化疗组。

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

2.2 毛蚶提取物对 NP 方案化疗小鼠摄食量的影响

与模型对照组比较, NP 方案化疗后小鼠摄食量明显减少, 而同时给予毛蚶提取物后, 随着给药时间延长, 裸小鼠摄食量逐渐增多, 其中 NP 方案化疗和毛蚶提取物 250、500 mg/kg 合用给药 21 d 后摄食量稍低于模型对照组, 而明显高于化疗组(表 2)。

与模型对照组比较, NP 方案化疗和毛蚶提取物合用后对肿瘤的抑制率明显高于单用 NP 方案化疗或者单用毛蚶提取物, 其中 NP 方案化疗和毛蚶提取物 250、500 mg/kg 合用后 q 值大于 0.85, 具有明显的协同作用, 说明毛蚶提取物在 250 mg/kg 剂量以上对 NP 方案化疗的抗肿瘤作用具有明显的增强作用(表 3)。

2.3 毛蚶提取物对 NP 方案化疗的增效作用

表 2 毛蚶提取物对裸小鼠摄食量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 2 The effects of Scapharca Subcrenata extraction on food intake of model nude mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Group	剂量 Dosage /mg/kg	摄食量 Food intake(g/只/d)				
		6d	12d	15d	18d	21d
正常对照 Normal	—	5.07	5.36	5.59	5.77	5.97
模型对照 Modle	—	4.88	4.77	4.87	4.94	5.11
NP 化疗 NP chemotherapy	3.4/6.7	4.84	2.82	2.12	2.35	2.01
毛蚶提取物 + NP 化疗 Scapharca Subcrenata Extraction + NP chemotherapy	500 + 3.4/6.7	4.71	3.69	3.95	4.02	4.61
	250 + 3.4/6.7	4.78	3.12	3.35	3.40	4.28
	125 + 3.4/6.7	4.24	2.82	2.18	2.43	3.31

表 3 毛蚶提取物对 NP 方案化疗的增效作用($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 3 The synergism effects of Scapharca Subcrenata extraction on NP chemotherapy in model nude mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Group	剂量 Dosage /mg/kg	瘤重 Tumor weight(g)	抑瘤率 Rate of tumor inhibition (%)	q 值 q Value
模型对照 Model	—	1.46 ± 0.54	—	—
NP 化疗 NP chemotherapy	3.4/6.7	0.71 ± 0.18*	51.4	—
毛蚶提取物 Scapharca Subcrenata Extraction	500 250	0.72 ± 0.26* 0.89 ± 0.06	50.7 39.0	— —
	125	1.10 ± 0.53	24.7	—
毛蚶提取物 + NP 化疗 Scapharca Subcrenata Extraction + NP chemotherapy	500 + 3.4/6.7 250 + 3.4/6.7 125 + 3.4/6.7	0.34 ± 0.19** 0.59 ± 0.27** 0.67 ± 0.19*	76.7 59.6 51.4	1.01 0.85 0.84

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

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

表 4 毛蚶提取物对 NP 方案化疗血液学副作用的减毒作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Tab. 4 The attenuation effects of Scapharca Subrenata extraction on hematological toxicity caused by NP chemotherapy in model nude mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Group	剂量 Dosage /mg/kg	WBC($10^9/L$)	RBC($10^{12}/L$)	HB(g/L)
正常对照 Normal	—	7.30 ± 0.65	10.92 ± 0.91	15.03 ± 0.81
模型对照 Model	—	7.20 ± 0.83	12.29 ± 1.92	15.77 ± 2.44
NP 化疗 NP chemotherapy	3.4/6.7	4.62 ± 0.54**	10.55 ± 0.85	14.35 ± 1.11
毛蚶提取物 + NP 化疗 Scapharca Subrenata Extraction + NP chemotherapy	500 + 3.4/6.7	6.91 ± 2.06 [#]	11.56 ± 1.52	15.03 ± 3.00
	250 + 3.4/6.7	7.20 ± 1.75 [#]	10.70 ± 1.49	14.72 ± 2.15
	125 + 3.4/6.7	5.70 ± 0.94 ^{#*}	10.59 ± 1.28	14.40 ± 0.75

注: ** $P < 0.01$, vs 模型组; [#] $P < 0.05$, vs NP 化疗组。

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

表 5 毛蚶提取物对 NP 方案化疗血液生化学的减毒作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Tab. 5 The attenuation effects of Scapharca Subrenata extraction on blood biochemical toxicity caused by NP chemotherapy in model nude mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Group	剂量 Dosage /mg/kg	ALT (U/L)	AST (U/L)	TP (g/L)	ALP (U/L)	BUN (mmol/L)
正常对照 Normal	—	70.3 ± 28.0	177.5 ± 35.4	54.0 ± 3.5	165.0 ± 22.6	8.5 ± 0.8
模型对照 Model	—	72.3 ± 10.3	175.0 ± 26.6	54.3 ± 3.9	163.3 ± 25.0	8.0 ± 1.8
NP 化疗 NP chemotherapy	3.4/6.7	138.8 ± 30.8*	248.5 ± 20.6**	58.2 ± 3.3	161.7 ± 44.0	11.8 ± 1.9*
毛蚶提取物 + NP 化疗 Scapharca Subrenata Extraction + NP chemotherapy	500 + 3.4/6.7	87.8 ± 16.5 [#]	195.2 ± 26.3 [#]	55.5 ± 3.8	161.7 ± 37.6	9.0 ± 1.2 [#]
	250 + 3.4/6.7	90.0 ± 21.5 [#]	195.5 ± 31.2 [#]	55.7 ± 4.1	168.3 ± 47.1	9.4 ± 1.5 [#]
	125 + 3.4/6.7	102.7 ± 27.1	213.0 ± 39.9	58.8 ± 5.3	161.7 ± 28.6	9.5 ± 2.2

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs 模型组; [#] $P < 0.05$, vs NP 化疗组。

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

2.4 毛蚶提取物对 NP 方案化疗后血液学副作用的减毒作用

与模型对照组比较, NP 方案化疗后小鼠的白细胞数量明显减少, 而和毛蚶提取物合用后白细胞数量明显增多, 与单纯 NP 方案化疗组比较均有显著性差异 ($P < 0.05$), 说明毛蚶提取物可明显抑制 NP 方案化疗引起的白细胞减少。各个剂量组对红细胞和血红蛋白无明显影响 (表 4)。

2.5 毛蚶提取物对 NP 方案化疗后血液生化学副作用的减毒作用

与模型对照组比较, NP 方案化疗后小鼠血清中 ALT、AST 和 BUN 明显升高, 说明 NP 化疗可以引起小鼠肝肾功能的损伤, 而和毛蚶提取物 250、500 mg/kg 合用后以上指标升高幅度减少, 与单纯 NP 方案化疗组比较均有显著性差异 ($P < 0.05$), 说明毛蚶提取物对 NP 方案化疗引起的肝肾功能的损伤

有明显保护作用 (表 5)。

3 讨论

肺癌的发病率和死亡率在恶性肿瘤中占首位, 严重危害人类的生命与健康。非小细胞肺癌属于肺癌的一种, 非小细胞肺癌约占肺癌总数的 80% ~ 85% [8]。目前临床上非小细胞肺癌常采用化疗的方式进行治疗。但是饱经癌症折磨的患者应用化疗药物后, 还要承受很大的毒副作用, 有相当一部分患者特别体质比较差的根本无法承受。所以如何提高化疗药物的治疗效果, 降低不良反应是临床上亟待解决的问题, 而中医药在这方面发挥了良好的作用。临床上常会采用中药作为辅助手段通过扶正培本和调节机体免疫功能等在降低毒副作用的同时增强治疗效果, 可以有效地改善患者的不良症状, 提高患者的生活质量, 延长生存期。

以往对中药增效减毒作用的试验研究多集中在中药与单个化疗药物合用后观察其疗效,而目前临床上多采用多种化疗药物联合应用,故研究对单个化疗药物的增效和减毒无法完全模拟临床实际情况。因此在动物模型研究中采用临床标准治疗方案,完全模拟临床治疗情况,才能更有的放矢地评价中药的功效。在非小细胞肺癌的国际治疗指南中,NP 是推荐的标准治疗方案^[9],故本文采用 A549 裸鼠移植瘤模型为实验对象,研究毛蚶提取物对 NP 方案化疗的增效和减毒作用。本实验研究证明,单纯 NP 化疗后,裸小鼠出现了体重减轻、摄食量减少、白细胞降低、肝肾功能损伤等毒副反应,与临床上体现的副作用基本一致,而同时应用毛蚶提取物后,随着给药时间的延长,以上毒副反应逐渐减轻,体重和摄食量等均逐渐恢复,白细胞数量逐渐增多,给药 21 d 时与模型组基本一致,明显高于 NP 化疗组,而血清中 AST、ALT 和 BUN 含量明显低于 NP 化疗组。同时,毛蚶提取物与 NP 方案化疗合用后对 A549 裸鼠移植瘤的抑制效果明显增强。以上研究结果充分证明毛蚶提取物具有明显的增效减毒作用,提示其具有进一步研究和开发利用的价值。

参考文献:

- [1] 徐艳,张秀国,童万平,等. 毛蚶的生物活性成分研究进展 [J]. 中国药房,2014, 25(19): 1805 - 1807.
- [2] Song LY, Li TF, Yu RM, *et al.* Antioxidant activities of hydrolysates of *Arca Subcrenata* prepared with three proteases [J]. *Mar Drugs*, 2008, 6(4): 607 - 619.
- [3] 黄演君,宋丽艳,于荣敏. 毛蚶多肽提取物的体外免疫活性 [J]. 中国生物化学杂志, 2011, 32(4): 273 - 276.
- [4] Song L, Reu S, Yu R, *et al.* Purification, characterization and in vitro anti-tumor activity of proteins from *Arca Sberenata Lischke* [J]. *Mar Drugs*, 2008, 6(3): 418 - 430.
- [5] 木拉提·扎依别克,哈木拉提·吾普尔. 抗肿瘤中药的分类及作用机理 [J]. 新疆医科大学学报, 2006, 29(11): 1102 - 1104.
- [6] 何志军,陈先祥,蔡庆和,等. 移植瘤体积不同计算方法的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(9): 47 - 50.
- [7] 宋高臣,王桂云,刘洪凤,等. 半枝莲多糖对环磷酰胺增效减毒作用的实验研究 [J]. 中医药信息, 2010, 27(4): 107 - 109.
- [8] Kurup A, Hanna NH. Treatment of small cell lung cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004, 52(2): 117 - 126.
- [9] 徐哲,李殿哲,边森. NP 与 DP 两种方案治疗晚期非小细胞肺癌疗效的比较 [J]. 医学与哲学, 2008, 29(2): 49 - 50.

[修回日期] 2015 - 03 - 31