



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102178716 A

(43) 申请公布日 2011.09.14

(21) 申请号 201110116935.2

(22) 申请日 2011.05.08

(71) 申请人 三峡大学

地址 443002 湖北省宜昌市大学路 8 号

(72) 发明人 袁丁 张长城 王洪武 何毓敏

赵海霞 姜美杰 胡运浪 曾晓

李守操

(74) 专利代理机构 宜昌市三峡专利事务所

42103

代理人 成钢

(51) Int. Cl.

A61K 36/258(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61K 31/675(2006.01)

A61K 125/00(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页

(54) 发明名称

竹节参提取物在制备化疗药物中的应用

(57) 摘要

竹节参提取物在制备化疗药物中的应用,属于竹节参新的药物用途竹节参提取物为竹节参总皂苷或竹节参多糖或两者的组合物,化疗药物为环磷酰胺。竹节参总皂苷、竹节参多糖在环磷酰胺对 S180 肉瘤的治疗中具有增强化疗药物的抗肿瘤效应和降低化疗药物的毒副作用。由此可扩大应用人群,产生较好的社会效益和经济效益。

1. 竹节参提取物在制备化疗药物中的应用。
2. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于:所述的竹节参提取物为竹节参总皂苷或竹节参多糖或两者的组合物。
3. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于:所述的化疗药物为环磷酰胺。

竹节参提取物在制备化疗药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于竹节参新的药物用途。

背景技术

[0002] 竹节参(*Rhizoma Panacis Japonici*)为五加科(*Araliaceae*)人参属植物竹节参(*Panax japonicus* C. A. Meyer)的呈竹鞭状干燥根茎。其根茎肥厚而色白,上具多数茎节,节节相连呈竹鞭状。竹节参总皂苷,竹节参多糖是竹节参主要活性成分。近年,有报道其均具有抗肿瘤作用。

[0003] 化疗是目前治疗肿瘤的主要手段之一,环磷酰胺是目前广泛应用的抗癌药物。

[0004] 环磷酰胺(*Cyclophosphamide*, Cy),剂型,针剂,用于恶性淋巴瘤、急性或慢性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤有较好的疗效,对乳腺癌、睾丸肿瘤、卵巢癌、肺癌、头颈部鳞癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤及骨肉瘤的治疗。用法及用量,单药静脉注射按体表面积每次 500 ~ 1000mg/m²,加生理盐水 20 ~ 30ml,静脉冲入,每周 1 次,连用 2 次,休息 1 ~ 2 周重复。儿童常用量:静脉注射每次 10 ~ 15mg/kg,加生理盐水 20ml 稀释后缓慢注射,每周 1 次,连用 2 次,休息 1 ~ 2 周重复。也可肌肉注射。副作用,骨髓抑制:白细胞减少较血小板减少为常见,最低值在用药后 1 ~ 2 周,多在 2 ~ 3 周后恢复。对肝功有影响。胃肠道反应:包括食欲减退、恶心及呕吐,一般停药 1 ~ 3 天即可消失。泌尿道反应:当大剂量环磷酰胺静滴,而缺乏有效预防措施时,可致出血性膀胱炎,表现为膀胱刺激症状、少尿、血尿及蛋白尿,系其代谢产物丙烯醛刺激膀胱所致,但环磷酰胺常规剂量应用时,其发生率较低。其他反应尚包括脱发、口腔炎、中毒性肝炎、皮肤色素沉着、月经紊乱、无精子或精子减少及肺纤维化等。

[0005] 众所周知机体免疫力低下,可导致多种疾病的发生。人们在治疗肿瘤过程中,多半会伴有机体免疫功能低下,其主要原因是单纯应用化疗药物而引起的毒副作用,如白细胞下降、免疫功能降低、在抑制或杀伤肿瘤细胞的同时,给机体带来了毒性作用,最为常见的是胃肠道反应和骨髓抑制,从而影响肿瘤的治疗效果。中药不仅具有耐药性低、毒副作用和不良反应少等优点,而且具有免疫调节、抗病毒、改善血液循环、解热镇痛及抗菌消炎等功效,中草药调节机体免疫作用将得到更加广泛的重视和深入的研究。现代药理研究显示,竹节参具有抗炎、抗肿瘤等药理作用,其作用机制可能与其调节机体内的免疫功能相关。

[0006] 因此对于环磷酰胺等化疗药物引起的毒副作用导致肿瘤治疗的终止,加用一些能改善患者病状并恢复免疫功能的药物具有重要意义。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种竹节参提取物在制备化疗药物中的应用。

[0008] 本发明的目的是这样实现的:竹节参提取物在制备化疗药物中的应用。

[0009] 所述的竹节参提取物为竹节参总皂苷或竹节参多糖或两者的组合物。

[0010] 所述的化疗药物为环磷酰胺。

[0011] 本发明提供的竹节参提取物在制备化疗药物中的应用,将竹节参的提取物竹节参总皂苷或竹节参多糖引入到化疗药物环磷酰胺中,利用不同剂量的竹节参皂苷、竹节参多糖与环磷酰胺配伍使用均能明显提高抑瘤率,配伍使用后的抑瘤率与单用环磷酰胺比较,有比较明显的抑瘤效果,说明竹节参皂苷,竹节参多糖均能够明显增强环磷酰胺的抑瘤作用;竹节参皂苷、竹节参多糖与环磷酰胺配伍使用对环磷酰胺所致荷瘤小鼠白细胞、血小板减少和免疫器官有明显的保护作用;竹节参皂苷,竹节参多糖还能够明显调整环磷酰胺对淋巴细胞亚群造成的紊乱;竹节参的提取物与环磷酰胺的配伍,可明显降低环磷酰胺等化疗药物引起的毒副作用,扩大环磷酰胺使用周期,提高环磷酰胺对肿瘤的抵制作用。

具体实施方式

[0012] 本发明药物竹节参总皂苷或竹节参多糖可根据本领域已知的方法制备。用于此目的时,如果需要,可将活性成分与一种或多种固体或液体药物赋形剂和/或辅型结合,制成可作为人药使用的适当使用形式或剂量形式。

[0013] 实验例 1 竹节参总皂苷、竹节参多糖对化疗药物环磷酰胺(Cy)抑瘤增效作用的实验研究

材料与方法:

动物 Balb/c 小鼠,6~7 周龄,18~22g,雌雄各半,湖北省实验动物研究中心提供,动物生产许可证号:SCXK(鄂)2008-0005。

[0014] 瘤株 S180 瘤细胞株由中国典型培养物保藏中心提供。

[0015] 药品及试剂 竹节参采自湖北省恩施州宣恩椿木营竹节参种植基地,经三峡大学医学院中医系谭复成教授鉴定为五加科植物竹节参 *P. japonicus* C. A. Mey. 的根茎。从根茎提取竹节参总皂苷为黄色粉末,规格:纯度为 83.48%。从竹节参根茎提取的多糖,规格:纯度为 64.19%。注射用环磷酰胺,规格为 0.2 g,产品批号:08121021,江苏恒瑞医药股份有限公司。

[0016] 仪器 超净工作台,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;CKX41 倒置显微镜,OLYMPUS 公司;电子分析天平(L104 型):瑞士 METTELER TOLEDO 公司。

[0017] 方法 动物随机分为 A:对照(NS 0.4ml/只),B: Cy 环磷酰胺 (20mg/kg), C: Cy+ 竹节参皂苷组 (20mg/kg+50mg/kg、20mg/kg+200mg/kg) 两个剂量组, D: Cy+ 竹节参多糖组 (20mg/kg+60mg/kg、20mg/kg+240mg/kg) 两个剂量组药,共 6 组, 每组 8 只。根据移植性肿瘤研究法,选取移植肿瘤 7 天左右,肿瘤生长良好,腹部膨隆明显的小鼠,在超净工作台内进行腹部皮肤消毒,取传代的 S₁₈₀ 肉瘤腹水型荷瘤小鼠,消毒动物腹部皮肤,用 5 mL 一次性无菌注射器穿入腹腔,吸取肿瘤细胞生长良好的腹水,所抽腹水放入无菌三角烧瓶内,放置于冰盒上。另取少量腹水进行细胞计数:用生理盐水稀释 100 倍,取稀释液 0.9 mL 加台盼兰 (0.2% 台盼兰生理盐水溶液) 0.1 mL,混匀,用细胞计数法分析肿瘤细胞总数及死细胞数 (紫或蓝色,活细胞数应 >95%)。腹水用生理盐水稀释,调整瘤细胞浓度为 5×10^7 cell/mL (整个操作在冰盒上进行,以此来保持肿瘤细胞的活性)。实体瘤移植及观测方法,取体重 20 g 左右的 Balb/c 种小鼠,将上述制备的 S₁₈₀ 瘤细胞悬液接种予小鼠右腋窝皮下,0.2 mL/只,30 min 内接种完成。各组小鼠与接种肿瘤次日随机分组并开始灌胃给药,每天 1 次,隔日称重,连续给药 10 天。给药结束后,将小鼠称重脱臼处死,剥离出皮下肿块称重,比较

各组肿瘤生长情况。

[0018] 统计学处理方法

抑瘤率(%)=(对照组平均瘤重-治疗组平均瘤重)/对照组平均瘤重×100%
所列实验数据以均数加减标准差($\bar{x} \pm S$)表示,统计学处理方法采用组间 t 检验。

[0019] 结果与讨论 竹节参总皂苷、竹节参多糖对环磷酰胺抑瘤作用结果见表 1。

表 1. 竹节参总皂苷对环磷酰胺移植小鼠肉瘤(S₁₈₀)作用的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	给药量 (mg·kg ⁻¹)	动物体重(g)		肿瘤重量 (g)	抑瘤率(%)
		给药前	给药后		
模型	-	22.03±0.87	23.08±3.28	0.66±0.13 [*]	
Cy	20	22.12±1.04	22.98±3.77	0.51±0.07 ^{△△}	23.94±5.2
Cy+多糖低	20+60	23.13±0.66	20.20±1.59	0.41±0.14 [*]	38.80±3.66 [*]
Cy+多糖高	20+240	22.85±1.47	21.30±2.09	0.35±0.07 [*]	43.94±5.56 [*]
Cy+皂苷低	20+50	22.01±1.20	22.97±1.18	0.36±0.12 [*]	39.91±5.38 [*]
Cy+皂苷高	20+200	22.04±1.05	19.78±2.46	0.35±0.13 [*]	45.46±6.38 [*]

注:与模型比较,△△*P*<0.01;与环磷酰胺组比较,^{*}*P*<0.05,^{**}*P*<0.01;

[0020] 结论 不同剂量的竹节参皂苷、竹节参多糖与环磷酰胺配伍使用均能明显提高抑瘤率,配伍使用后的抑瘤率与单用环磷酰胺比较,有比较明显的抑瘤效果,说明竹节参皂苷,竹节参多糖均能够明显增强环磷酰胺的抑瘤作用。

[0021] 实验例 2 竹节参总皂苷、竹节参多糖对化疗药物环磷酰胺减毒作用的实验研究

1. 竹节参总皂苷、竹节参多糖与环磷酰胺配伍使用对荷瘤小鼠外周血象及其免疫脏器指数的影响

材料与方法

动物 Balb/c 小鼠,6~7 周龄,18~22g,雌雄各半,湖北省实验动物研究中心提供,动物生产许可证号:SCXK(鄂)2008-0005。

[0022] 瘤株 S₁₈₀ 瘤细胞株由中国典型培养物保藏中心提供。

[0023] 药品及试剂 竹节参采自湖北省恩施州宣恩椿木营竹节参种植基地,经三峡大学医学院中医系谭复成教授鉴定为五加科植物竹节参 *P. japonicus* C. A. Mey. 的根茎。从根茎提取竹节参总皂苷为黄色粉末,规格:纯度为 83.48%。从竹节参根茎提取的多糖,规格:纯度为 64.19%。注射用环磷酰胺,规格为 0.2 g,产品批号:08121021,江苏恒瑞医药股份有限公司。

[0024] 仪器 超净工作台,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;CKX41 倒置显微镜,OLYMPUS 公司;电子分析天平(L104 型):瑞士 METTELER TOLEDO 公司。KX-21N 型全自动生化分析仪,日本东亚。

[0025] 方法 动物随机分为 A:对照(NS 0.4ml/只),B: Cy 环磷酰胺(20mg/kg),C: Cy+竹节参皂苷组(20mg/kg+50mg/kg、20mg/kg+200mg/kg)两个剂量组,D: Cy+竹节参多糖组(20mg/kg+60mg/kg、20mg/kg+240mg/kg)两个剂量组药,共 6 组,每组 8 只。根据移植性肿

瘤研究法,选取移植肿瘤 7 天左右,肿瘤生长良好,腹部膨隆明显的小鼠,在超净工作台内进行腹部皮肤消毒,取传代的 S₁₈₀ 肉瘤腹水型荷瘤小鼠,消毒动物腹部皮肤,用 5 mL 一次性无菌注射器穿入腹腔,吸取肿瘤细胞生长良好的腹水,所抽腹水放入无菌三角烧瓶内,放置于冰盒上。另取少量腹水进行细胞计数:用生理盐水稀释 100 倍,取稀释液 0.9 mL 加台盼兰 (0.2% 台盼兰生理盐水溶液) 0.1 mL,混匀,用细胞计数法分析肿瘤细胞总数及死细胞数 (紫或蓝色,活细胞数应 >95%)。腹水用生理盐水稀释,调整瘤细胞浓度为 5×10⁷ cell/mL (整个操作在冰盒上进行,以此来保持肿瘤细胞的活性)。实体瘤移植及观测方法,取体重 20 g 左右的 Balb/c 种小鼠,将上述制备的 S₁₈₀ 瘤细胞悬液接种予小鼠右腋窝皮下,0.2 mL/只,30 min 内接种完成。各组小鼠与接种肿瘤次日随机分组并开始灌胃给药,每天 1 次,隔日称重,连续给药 10 天。给药结束次日,自小鼠眼眶静脉丛取血,测血象,指标为白细胞总数 (WBC),红细胞 (RBC),血小板 (PLT) 计数。称重后处死动物,剖取脾脏,计算脏器指数。

表 2. 竹节参总皂苷、竹节参多糖配伍应用对荷瘤小鼠外周血象的影响($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	给药量 (mg · kg ⁻¹)	WBC (×10 ⁹ · L ⁻¹)	RBC (×10 ¹² · L ⁻¹)	PLT (×10 ⁹ · L ⁻¹)
模型		7.65±1.65 ^{ΔΔ}	8.82±0.56	1327.67±66.49 ^{**}
Cy	20	3.63±0.22	9.00±0.65	1064.00±63.36 ^{ΔΔ}
Cy+皂苷低	20+50	4.08±0.19 [*]	8.80±0.29	1288.80±149.99 [*]
Cy+皂苷高	20+200	4.18±0.18 [*]	9.31±0.49	1258.80±239.37 [*]
Cy+多糖低	20+60	4.63±0.29 [*]	9.39±0.80	1213.58±87.12 [*]
Cy+多糖高	20+240	4.94±0.49 ^{**}	9.82±0.55	1268.40±199.81 [*]

注:与模型比较, ^{ΔΔ}P<0.01; 与环磷酰胺组比较, ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01;

表 3. 竹节参总皂苷、竹节参多糖对荷瘤小鼠免疫脏器指数的影响($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	给药量 (mg · kg ⁻¹)	脾脏指数 (mg/10g)
模型	-	7.47±1.50 ^{**}
Cy	20	4.39±0.78 ^{ΔΔ}
Cy+皂苷低	20+50	4.59±1.02 [*]
Cy+皂苷高	20+200	5.23±0.48 [*]
Cy+多糖低	20+60	4.66±0.60 [*]
Cy+多糖高	20+240	5.46±1.12 [*]

注:与模型比较, ^{ΔΔ}P<0.01; 与环磷酰胺组比较, ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01;

结论 从表 2,表 3 与单独应用环磷酰胺比较,竹节参皂苷、竹节参多糖与环磷酰胺配伍使用对环磷酰胺所致荷瘤小鼠白细胞、血小板减少和免疫器官有明显的保护作用。

[0027] 实验例 3 竹节参总皂苷、竹节参多糖与环磷酰胺配伍使用对荷瘤小鼠外周血、脾

中淋巴细胞亚群、B 细胞、NK 细胞的影响

材料与方法

动物 Balb/c 小鼠, 6-7 周龄, 18-22g, 雌雄各半, 湖北省实验动物研究中心提供, 动物生产许可证号: SCXK(鄂)2008-0005。

[0028] 瘤株 S_{180} 瘤细胞株由中国典型培养物保藏中心提供。

[0029] 药品及试剂 竹节参采自湖北省恩施州宣恩椿木营竹节参种植基地, 经三峡大学医学院中医系谭复成教授鉴定为五加科植物竹节参 *P. japonicus* C. A. Mey. 的根茎。从根茎提取竹节参总皂苷为黄色粉末, 规格: 纯度为 83.48%。从竹节参根茎提取的多糖, 规格: 纯度为 64.19%。注射用环磷酰胺, 规格为 0.2 g, 产品批号: 08121021, 江苏恒瑞医药股份有限公司; 抗小鼠 CD3e (FITC 标记)、CD4 (PE Cy-5 标记)、CD8 (PE 标记)、CD19 (PE 标记)、CD49b 即 NK (PE 标记), eBioscience, San Jose CA。

[0030] 仪器 超净工作台, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; CKX41 倒置显微镜, OLYMPUS 公司; 电子分析天平 (L104 型): 瑞士 METTELER TOLEDO 公司。流式细胞仪 COULTER EPICS XL2MCL 及溶血仪, Beckman-Coulter 公司; Suprafuge22 型高速冷冻离心机, 日本 Heraeus 公司。

[0031] 方法 动物随机分为 A: 对照 (NS 0.4ml/只), B: Cy 环磷酰胺 (20mg/kg), C: Cy+ 竹节参皂苷组 (20mg/kg+50mg/kg、20mg/kg+200mg/kg) 两个剂量组, D: Cy+ 竹节参多糖组 (20mg/kg+60mg/kg、20mg/kg+240mg/kg) 两个剂量组药, 共 6 组, 每组 8 只。根据移植性肿瘤研究法, 选取移植肿瘤 7 天左右, 肿瘤生长良好, 腹部膨隆明显的小鼠, 在超净工作台内进行腹部皮肤消毒, 取传代的 S_{180} 肉瘤腹水型荷瘤小鼠, 消毒动物腹部皮肤, 用 5 mL 一次性无菌注射器穿入腹腔, 吸取肿瘤细胞生长良好的腹水, 所抽腹水放入无菌三角烧瓶内, 放置于冰盒上。另取少量腹水进行细胞计数: 用生理盐水稀释 100 倍, 取稀释液 0.9 mL 加台盼兰 (0.2% 台盼兰生理盐水溶液) 0.1 mL, 混匀, 用细胞计数法分析肿瘤细胞总数及死细胞数 (紫或蓝色, 活细胞数应 >95%)。腹水用生理盐水稀释, 调整瘤细胞浓度为 5×10^7 cell/mL (整个操作在冰盒上进行, 以此来保持肿瘤细胞的活性)。实体瘤移植及观测方法, 取体重 20 g 左右的 Balb/c 种小鼠, 将上述制备的 S_{180} 瘤细胞悬液接种予小鼠右腋窝皮下, 0.2 mL/只, 30 min 内接种完成。各组小鼠与接种肿瘤次日随机分组并开始灌胃给药, 每天 1 次, 隔日称重, 连续给药 10 天。给药结束次日, 对小鼠摘眼球取血, 加肝素抗凝, 采用流式细胞术测定外周血中 $CD3^+CD4^+CD8^+$ 、 $CD3^+CD49b^+$ 、CD19 百分比; 取小鼠脾脏, 制备脾淋巴悬液, 采用流式细胞术测定脾中 $CD3^+CD4^+$ / $CD3^+CD8^+$ 、 $CD3^+CD49b^+$ 、CD19 百分比。

[0032] 统计学处理方法: $CD4^+ / CD8^+ = CD4^+ (\%) / CD8^+ (\%)$ 。

所列实验数据以均数加减标准差 ($\pm S$) 表示, 统计学处理方法采用组间 t 检验。

[0033] 结果与讨论 竹节参总皂苷、竹节参多糖对外周血 T 细胞亚群、B 细胞、NK 细胞的影响 见表 4-6。

表 4 竹节参总皂苷、竹节参多糖对外周血 T 淋巴细胞亚群百分比的影响
($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	给药量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
模型		43.48±6.86	17.15±3.93**	2.47±0.42**
Cy	20	80.89±3.84 ^{ΔΔ}	14.41±1.25 ^{ΔΔ}	5.64±0.63 ^{ΔΔ}
Cy+皂苷低	20+50	72.90±6.14*	17.21±2.76**	4.25±0.66**
Cy+皂苷高	20+200	78.97±3.92	16.38±2.21	4.55±0.48**
Cy+多糖低	20+60	84.95±1.19*	12.80±0.95	6.71±0.60**
Cy+多糖高	20+240	80.20±1.35	17.02±1.10*	4.74±0.33 ^{ΔΔ**}

注：与模型比较，^Δ $P<0.05$ ，^{ΔΔ} $P<0.01$ ；与环磷酰胺组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；

表 5 竹节参总皂苷、竹节参多糖对外周血 B 淋巴细胞百分比的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	给药量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	CD19 ⁺ (%)
模型		25.13±4.07
Cy	20	1.68±0.97 ^{ΔΔ}
Cy+皂苷低	20+50	3.95±0.89*
Cy+皂苷高	20+200	6.35±1.79*
Cy+多糖低	20+60	3.46±0.41*
Cy+多糖高	20+240	7.24±5.35*

注：与模型比较，^{ΔΔ} $P<0.01$ ；与环磷酰胺组比较，** $P<0.01$ ；

表 6 竹节参总皂苷、竹节参多糖对外周血 NK 淋巴细胞百分比的影响
($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	给药量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	NK (%)
模型		3.44±4.42*
Cy	20	0.22±0.26 ^Δ
Cy+皂苷低	20+50	1.57±0.36*
Cy+皂苷高	20+200	2.49±0.74*
Cy+多糖低	20+60	1.61±0.01*
Cy+多糖高	20+240	2.83±4.85*

注：与模型比较，^Δ $P<0.05$ ；与环磷酰胺组比较，* $P<0.05$ ；

结论 不同剂量的竹节参皂苷、竹节参多糖与环磷酰胺配伍使用均能明显提高荷瘤小鼠外周血中 CD4⁺/CD8⁺ 比值，配伍使用与单用环磷酰胺比较，比值有比较明显的升高 ** $P<0.01$ ，说明竹节参皂苷、竹节参多糖能够明显调整环磷酰胺对淋巴细胞亚群造成的紊乱；对外周血中 B 细胞的影响，外周血中配伍用药与单用环磷酰胺比较没有明显差异；对 NK 细胞的影响，外周血中配伍后作用与单用环磷酰胺比较不是很明显。

[0035] 实验例 4 竹节参总皂苷、竹节参多糖对脾脏 T 细胞亚群、B 细胞、NK 细胞的影响 见表 7-9。

表 7 竹节参总皂苷、竹节参多糖对脾脏中 T 淋巴细胞亚群百分比的影响
($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	给药量 (mg · kg ⁻¹)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
模型		26.73±8.83**	18.10±6.75**	1.50±0.21
Cy	20	46.39±5.69 ^{ΔΔ}	27.10±4.57 ^{ΔΔ}	1.75±0.33 ^{ΔΔ}
Cy+皂苷低	20+50	37.03±9.10 ^{ΔΔ*}	21.49±6.16 ^{ΔΔ}	1.72±0.48 ^{ΔΔ}
Cy+皂苷高	20+200	50.00±7.68 ^{ΔΔ}	29.44±1.41*	1.68±0.27 ^{ΔΔ}
Cy+多糖低	20+60	44.19±3.74 ^{ΔΔ}	29.51±3.82 ^{ΔΔ}	1.50±0.21 ^{ΔΔ}
Cy+多糖高	20+240	45.23±2.82 ^{ΔΔ}	32.33±3.63 ^{ΔΔ*}	1.41±0.16 ^{ΔΔ*}

注：与模型比较，^{ΔΔ}*P*<0.01；与环磷酸胺组比较，**P*<0.05，***P*<0.01；

表 8 竹节参总皂苷、竹节参多糖对脾脏中 B 淋巴细胞百分比的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	给药量 (mg · kg ⁻¹)	CD19+ (%)
模型		41.06±14.72
Cy	20	16.81±9.65 ^{ΔΔ}
Cy+皂苷低	20+50	25.92±8.45*
Cy+皂苷高	20+200	36.65±6.10*
Cy+多糖低	20+60	20.55±2.43*
Cy+多糖高	20+240	33.45±5.68*

注：与模型比较，^{ΔΔ}*P*<0.01；与环磷酸胺组比较，**P*<0.05 ***P*<0.01；

表 9 竹节参总皂苷、竹节参多糖对脾脏中 NK 细胞百分比的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	给药量 (mg · kg ⁻¹)	NK (%)
模型		4.43±1.34
Cy	20	1.04±0.73 ^{ΔΔ}
Cy+皂苷低	20+50	2.42±1.15**
Cy+皂苷高	20+200	3.54±0.34*
Cy+多糖低	20+60	2.27±0.25*
Cy+多糖高	20+240	3.60±0.67*

注：与模型比较，^{ΔΔ}*P*<0.01；与环磷酸胺组比较，**P*<0.05 ***P*<0.01；

结论 竹节参总皂苷、竹节参多糖对脾中的 T 细胞亚群 CD4⁺、CD8⁺ 没有明显影响,但是

[0036]

Cy+ 多糖高剂量组与环磷酰胺组比较有显著性差异 $*P < 0.05$; 对脾中 B 细胞的影响, 配伍用药组 Cy+ 皂苷低, Cy+ 多糖低与单用环磷酰胺组比较有显著性差异 $*P < 0.05$; 对脾中 NK 细胞的影响, 配伍用药组 Cy+ 皂苷低与环磷酰胺组比较有显著性差异 $**P < 0.01$ 。

[0037] 实验例 5 竹节参总皂苷、多糖与环磷酰胺配伍使用对荷瘤小鼠血清中 IL-2 及 IFN- γ 的含量的影响

材料与方法

动物 Balb/c 小鼠, 6~7 周龄, 18~22g, 雌雄各半, 湖北省实验动物研究中心提供, 动物生产许可证号: SCXK(鄂)2008-0005。

[0038] 瘤株 S₁₈₀ 瘤细胞株由中国典型培养物保藏中心提供。

[0039] 药品及试剂 竹节参采自湖北省恩施州宣恩椿木营竹节参种植基地, 经三峡大学医学院中医系谭复成教授鉴定为五加科植物竹节参 *P. japonicus* C. A. Mey. 的根茎。从根茎提取竹节参总皂苷为黄色粉末, 规格: 纯度为 83.48%。从竹节参根茎提取的多糖, 规格: 纯度为 64.19%。注射用环磷酰胺, 规格为 0.2 g, 产品批号: 08121021, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 小鼠 IL-2 试剂盒及 IFN- γ 试剂盒, Rndsystems company。

[0040] 仪器 CO₂ 培养箱 (NU4750E 型): 美国 NuAire 公司; 超净工作台, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; CKX41 倒置显微镜, OLYMPUS 公司; 电子分析天平 (L104 型): 瑞士 METTELER TOLEDO 公司; 组织培养用倒置荧光相差显微镜 (CKX41 型): 日本 OLYMPUS 株式会社; 全波长酶标仪 (TYPE1500-458 型): 美国 THERMO ELECTRON 公司。

[0041] 方法 动物随机分为 A: 对照 (NS 0.4ml/只), B: Cy 环磷酰胺 (20mg/kg), C: Cy+ 竹节参皂苷组 (20mg/kg+50mg/kg、20mg/kg+200mg/kg) 两个剂量组, D: Cy+ 竹节参多糖组 (20mg/kg+60mg/kg、20mg/kg+240mg/kg) 两个剂量组药, 共 6 组, 每组 8 只。根据移植性肿瘤研究法, 选取移植肿瘤 7 天左右, 肿瘤生长良好, 腹部膨隆明显的小鼠, 在超净工作台内进行腹部皮肤消毒, 取传代的 S₁₈₀ 肉瘤腹水型荷瘤小鼠, 消毒动物腹部皮肤, 用 5 mL 一次性无菌注射器穿入腹腔, 吸取肿瘤细胞生长良好的腹水, 所抽腹水放入无菌三角烧瓶内, 放置于冰盒上。另取少量腹水进行细胞计数: 用生理盐水稀释 100 倍, 取稀释液 0.9 mL 加台盼兰 (0.2% 台盼兰生理盐水溶液) 0.1 mL, 混匀, 用细胞计数法分析肿瘤细胞总数及死细胞数 (紫或蓝色, 活细胞数应 >95%)。腹水用生理盐水稀释, 调整瘤细胞浓度为 5×10^7 cell/mL (整个操作在冰盒上进行, 以此来保持肿瘤细胞的活性)。实体瘤移植及观测方法, 取体重 20 g 左右的 Balb/c 种小鼠, 将上述制备的 S₁₈₀ 瘤细胞悬液接种予小鼠右腋窝皮下, 0.2 mL/只, 30 min 内接种完成。各组小鼠与接种肿瘤次日随机分组并开始灌胃给药, 每天 1 次, 隔日称重, 连续给药 10 天。给药结束次日, 摘小鼠眼球取血, 分离血清, 按 ELISA 试剂盒说明操作。

[0042] 统计学处理方法: 所列实验数据以均数加减标准差 ($\bar{x} \pm S$) 表示, 统计学处理方法采用组间 t 检验。

[0043] 结果见表 10。

表 10 竹节参多糖对血清中 IL-2 及 IFN- γ 的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 (mg/kg)	IL-2 (pg \cdot mL ⁻¹)	IFN- γ (pg \cdot mL ⁻¹)
模型		20.29 \pm 4.89**	7.44 \pm 1.18**
Cy	20	11.95 \pm 2.79 $\Delta\Delta$	5.58 \pm 0.54 $\Delta\Delta$
Cy+皂苷低	20+50	17.86 \pm 5.82**	7.23 \pm 1.03**
Cy+皂苷高	20+200	22.83 \pm 4.00**	6.93 \pm 0.89*
Cy+多糖低	20+60	24.00 \pm 1.52**	6.85 \pm 1.03*
Cy+多糖高	20+240	25.02 \pm 2.01 $\Delta\Delta$ **	7.54 \pm 0.84**

注：与模型比较， $\Delta\Delta P<0.01$ ；与环磷酰胺组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；

[0044]

结论 不同剂量的竹节参皂苷，竹节参多糖与环磷酰胺配伍使用均能够增加小鼠血清中 IL-2、IFN- γ 含量，并且作用要优于单独用药组。说明竹节参皂苷，竹节参多糖可以对环磷酰胺所致 IL-2、IFN- γ 含量减少有抑制作用。