

# 芪血蛭胶囊对环磷酰胺诱导 H22 肝癌小鼠血液高凝的影响

韩曼<sup>1</sup> 郭紫艳<sup>2</sup> 张宗林<sup>3</sup> 景鹏<sup>3</sup> 冯晓兰<sup>1\*</sup>

1. 陕西省中医药研究院 陕西西安 710003

2. 陕西中医药大学 陕西咸阳 712046

3. 陕西郝其军制药股份有限公司 陕西西安 710076

**摘要：**目的：本实验主要观察芪血蛭胶囊对环磷酰胺诱导 H22 肝癌小鼠血液高凝的影响。方法：将 75 只雄性 KM 小鼠按体重均衡原则分为空白组、荷瘤组、荷瘤 + 环磷酰胺组、荷瘤 + 环磷酰胺 + 芪血蛭胶囊高、中、低剂量组。建立小鼠 H22 移植瘤模型，荷瘤 + 环磷酰胺组及给药组每日腹腔注射 30mg/kg 环磷酰胺，注射容积为 0.1ml/10g，持续 13 天，同时各组给予对应药物，期间对小鼠体重及瘤体积进行测定。采用毛细管法于第 7 天、第 13 天测各组小鼠凝血时间。末次给药 24h 后，采血，取小鼠肿瘤，称重，计算抑瘤率，检测血浆中 APTT、PT、FIB 和 TT 浓度。结果：芪血蛭胶囊对小鼠体重无明显影响，与环磷酰胺协同使用，能够显著减缓瘤体积增长 ( $P < 0.01$ )、减轻瘤重 ( $P < 0.01$ )，且中剂量协同使用环磷酰胺组瘤体积增加值、瘤重显著低于环磷酰胺组 ( $P < 0.05$ )，环磷酰胺组、环磷酰胺 + 芪血蛭高、中、低剂量组的抑瘤率依此为 69.21%、66.66%、79.24%、65.93%。芪血蛭胶囊能够显著延长环磷酰胺和肿瘤小鼠的凝血时间 ( $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ )，显著降低环磷酰胺和肿瘤小鼠血浆中 FIB、PT、APTT 浓度 ( $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ )。结论：芪血蛭胶囊可缓解由环磷酰胺和 H22 肝癌介导的小鼠血液高凝状态，且能够与环磷酰胺发挥协同作用，抑制肿瘤的生长。

**关键词：**芪血蛭胶囊；环磷酰胺；肝癌

血液高凝状态又称血栓前状态，是指多种因素通过多种途径导致机体凝血异常、血液流动减慢、血黏度增高，容易形成血栓的状态<sup>[1]</sup>。研究发现，约 95% 的恶性肿瘤患者血液中存在高凝状态，高凝状态可导致炎症细胞的募集、肿瘤间质的生成和血管的形成，不仅容易触发血栓栓塞事件，还能促进肿瘤细胞的生长和扩散，与肿瘤患者的生存及预后密切相关<sup>[2]</sup>，有关文献报道，恶性肿瘤患者血液中存在的高凝状态以及易发生的血栓栓塞事件是恶性肿瘤常见的并发症和第 2 位死亡原因<sup>[3]</sup>。恶性肿瘤高凝状态的西医治疗根据美国国立综合癌症网络(NCCN)和美国胸科医师学院(ACCP)推荐的指南，所有类型住院的癌症患者存在静脉血栓栓塞症(VTE)高风险，如无抗凝禁忌证，应采用非药物或药物预防性治疗。药物预防性治疗目前主要使用低分子肝素、新型口服抗凝药以及抗血小板药物如阿司匹林等，具有较高的有效性<sup>[4]</sup>。然而，肿瘤患者院外对低分子肝素的依从性欠佳，并可引起血小板减少或肝毒性，且阿司匹林虽已被广泛应用于动脉系统血栓的防治，但仍然会出现阿司匹林抵抗现象并有一定的局限性，如对血小板的抑制效果个体之间差异较大、

起效时间延迟等，因此，中药因其依从性良好、多成分、多靶点、多途径等优点对治疗恶性肿瘤患者高凝状态具有独特的优势<sup>[5]</sup>。

芪血蛭胶囊用于缓解恶性肿瘤并发的血液高凝状态，为进一步研究其药效，本文采用环磷酰胺诱导 H22 肝癌小鼠血液高凝，探索芪血蛭胶囊对小鼠血液高凝状态的影响。

## 1. 材料与方法

### 1.1 动物

来源：雄性 KM 小鼠，体重 16–18g，由西安交通大学医学部实验动物中心提供，动物合格证号：NO3475，生产许可证号：SCXK(陕)2023–002。

### 1.2 药物及试剂

芪血蛭胶囊(QXZ)，由陕西郝其军制药股份有限公司提供，批号：220803；环磷酰胺(CTX)，上海毕得医药科技股份有限公司生产，批号 382DNW。

GibcoRPMI1649 培养基，赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司；1xPBS 缓冲液(细胞培养)，北京兰杰柯科技有限公司；低内毒素胎牛血清，浙江天杭生物科技有限公

司；青霉素-链霉素溶液（双抗）100×，武汉普诺赛生命科技有限公司；二甲基亚砜细胞培养级，北京索莱宝科技有限公司；BI胎牛血清（FBS），上海达特希尔生物科技有限公司；BeyoAOFM无血清细胞冻存液，碧云天生物技术有限公司；柠檬酸三钠盐，98%，上海麦克林生化科技股份有限公司；胰酶细胞消化液（0.25%胰酶），碧云天生物技术有限公司；活化部分凝血活酶时间（APTT）测定试剂盒、凝血酶原时间（PT）测定试剂盒、凝血酶时间（TT）测定试剂盒、纤维蛋白原（FIB）测定试剂盒，上海远慕生物科技有限公司。

### 1.3 主要仪器

311型CO<sub>2</sub>培养箱，赛默飞世尔科技有限公司；TS100-F型倒置显微镜，日本尼康；HH-S6A型电热恒温水浴锅，北京科伟永兴仪器有限公司；CJ-10型超净工作台，天津市泰斯特仪器有限公司；YX-18HDD型手提式压力蒸汽灭菌锅，江阴滨江医疗设备有限公司；TDZ4-WS型低速台式离心机，湖南迈克实验仪器有限公司；LT1001电子天平，常熟市天量仪器有限责任公司；SQP型电子天平，赛多利斯科学仪器（北京）有限公司。

### 1.4 H22肝癌小鼠模型的建立

-80℃冰箱取出冻存的H22肝癌细胞快速于37℃水浴锅中解冻，并转移至含有完全培养液的离心管中，1200r/min离心5min后弃去上清，在离心管中加入一定的完全培养液，转移至培养皿中于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱培养。每日观察并换液，当细胞铺满瓶底达80%~90%时传代，收集对数生长期H22细胞，用PBS缓冲液调整细胞浓度为 $2 \times 10^7$ /mL，取0.2mL H22细胞混悬液注射到小鼠腹腔中进行体内传代培养，生长六天后，于超净台上收集H22小鼠腹水细胞，PBS缓冲液清洗两次，用生理盐水调整细胞浓度为 $1.5 \times 10^7$ /mL，取0.2mL细胞混悬液注入小鼠右后肢致H22肝癌小鼠模型。

### 1.5 动物分组及给药

接种后，当基本可触及到小鼠接种部位米粒大小、活动度较差、质硬的瘤块时，按瘤体积将小鼠分为5组，分别为荷瘤组（n=13）、荷瘤+CTX（n=13）、荷瘤+CTX+QXZ-H组（n=13）、荷瘤+CTX+QXZ-M组（n=12）、荷瘤+环磷酰胺+QXZ-L组（n=12），空白组为未接种瘤细胞的小鼠（n=12）。除空白组、荷瘤组外，其余各组均腹腔注射30mg/kg环磷酰胺，注射容积为0.1mL/10g造模，造模同时

各药物组灌胃给予相对应剂量的药物，即芪血蛭胶囊大、中、小剂量分别为3.5、1.75、0.875g/kg，给药容积为0.2mL/10g。连续给药、造模时间为13天。

### 1.6 检测指标

#### 1.6.1 小鼠体重及瘤体积、瘤重的测定

自小鼠成瘤之日起，每两天测定一次各组小鼠体重，单位为g。自小鼠成瘤之日起，每天用游标卡尺对小鼠肿瘤体积进行测定，记录肿瘤最长径（a）与最短径（b），计算肿瘤体积<sup>[6]</sup>： $V=1/2ab^2$ ，单位为mm<sup>3</sup>。计算小鼠给药后不同时间瘤体积变化值，瘤体积变化值=测量当天瘤体积-给药前瘤体积。末次给药24h后，取小鼠肿瘤并称重。

#### 1.6.2 凝血时间的检测<sup>[7]</sup>

在给药第7天、最后一天，采用玻璃毛细管法测定小鼠凝血时间，毛细管从小鼠眼内眦采血，自血液流入毛细管时开始计时，每隔5~30s折断毛细管约0.5cm，缓慢拉伸，观察是否有血凝丝的出现，血凝丝出现的时间即为小鼠的凝血时间。

#### 1.6.3 凝血四项检测

末次给药24h后，各组小鼠摘眼球采血，将血液与3.8%枸橼酸钠抗凝剂按9:1比例混匀，离心取血浆，严格按照试剂盒说明书测定血浆中APTT、PT、FIB和TT含量，单位为g/L。

#### 1.6.4 计算抑瘤率

末次给药小鼠采血后脱颈处死，解剖取小鼠主要脏器官、肝、脾、肺、肾以及肿瘤，称量瘤重并记录，计算小鼠抑瘤率<sup>[8]</sup>：

抑瘤率=(荷瘤组平均瘤重-给药组平均瘤重)/荷瘤组平均瘤重×100%。

### 1.7 统计学处理方法

实验数据采用SPSS26.0软件进行统计学处理，计量资料结果以均数±标准差（ $\bar{X} \pm S$ ）表示。组间比较采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 说明差异有统计学意义。

## 2. 结果

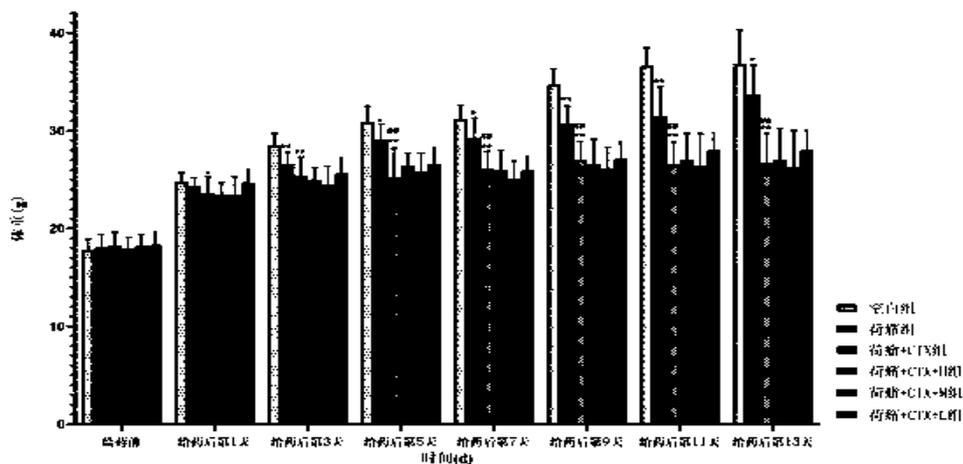
给药过程中，荷瘤+CTX组死亡1只（n=12），其余各组无动物死亡。

### 2.1 对小鼠体重的影响

小鼠接种H22细胞后第三天成瘤，成瘤后开始给药。每两天称量小鼠体重，结果如图1所示。从图1可见，与空

白组比较，荷瘤组小鼠从第3天、荷瘤+CTX组小鼠从第1天起体重显著下降 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )；与荷瘤组比较，荷瘤+CTX组小鼠体重从给药第5天起显著下降 ( $P < 0.01$ )；

荷瘤+CTX+QXZ-H、M、L组同荷瘤+CTX组相比，小鼠体重无明显差异 ( $P > 0.05$ )。



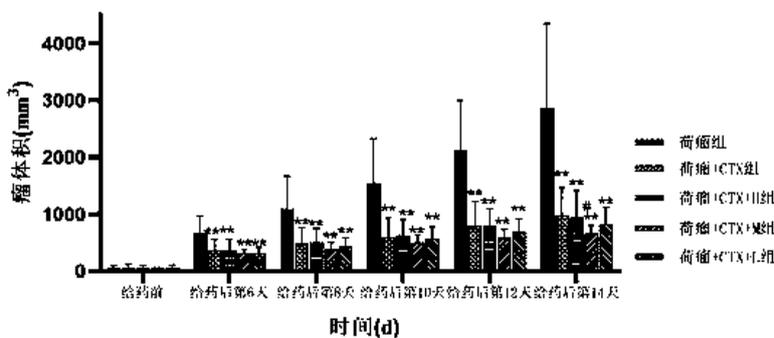
注：与空白组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ；与荷瘤组比较，## $P < 0.01$ 。

图1 对H22肝癌小鼠体重的影响

## 2.2 对小鼠瘤体积的影响

测量小鼠瘤体积，结果见图2。从图2可知，成瘤后，各组与荷瘤组比较，荷瘤+CTX组、荷瘤+CTX+QXZ-H、

M、L组从第6天起瘤体积均显著缩小 ( $P < 0.01$ )；荷瘤+CTX+QXZ-H、M、L组与荷瘤+环磷酰胺组比较，荷瘤+环磷酰胺+QXZ-M组在第14天瘤体积显著缩小 ( $P < 0.05$ )。

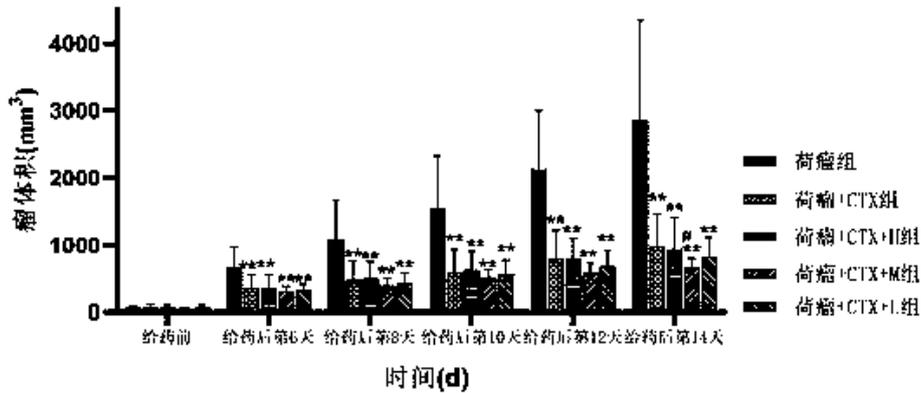


注：各组与荷瘤组比较，\*\* $P < 0.01$ ；给药组与荷瘤+环磷酰胺组比较，# $P < 0.05$ 。

图2 对H22肝癌小鼠瘤体积的影响

计算小鼠给药后不同时间瘤体积变化值，结果见图3。从图3可知，各组与荷瘤组比较，荷瘤+CTX组、荷瘤+CTX+QXZ-H、M、L组从第6天起瘤体积变化值均显著缩

小 ( $P < 0.01$ )；荷瘤+CTX+QXZ-H、M、L组与荷瘤+CTX组比较，荷瘤+CTX+QXZ-M组在第14天瘤体积变化值显著缩小 ( $P < 0.05$ )。



注：各组与荷瘤组比较，\*\* $P < 0.01$ ；给药组与荷瘤 + 环磷酰胺组比较，# $P < 0.05$ 。

图 3 对 H22 肝癌小鼠瘤体积变化值的影响

### 2.3 对小鼠瘤重的影响

称量小鼠瘤重，结果见表 1。从表中可见，与荷瘤组比较，荷瘤 + CTX 组、荷瘤 + CTX + QXZ - H、M、L 组的瘤重显著减小 ( $P < 0.01$ )；给药组与荷瘤 + CTX 组比较，荷瘤

+ CTX + QXZ - M 瘤重显著减小 ( $P < 0.05$ )。荷瘤 + CTX 组、荷瘤 + CTX + QXZ - H、M、L 组的抑瘤率依次为 69.21%、66.66%、79.24%、65.93%，其中，荷瘤 + CTX + QXZ - M 组小鼠抑瘤率最高。

表 1 对 H22 小鼠瘤重及抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm S$ )

组别	动物 (只) (始 / 末)	动物体重 (g) (始 / 末)	瘤重 (g)	抑制率 (%)
荷瘤	13/13	24.3 ± 0.9/35.1 ± 2.0	1.45 ± 0.63	-
荷瘤 + CTX	13/12	23.6 ± 1.7/27.2 ± 3.0	0.45 ± 0.22**	69.21%
荷瘤 + CTX + QXZ - H	13/13	23.5 ± 1.2/27.8 ± 3.4	0.48 ± 0.26**	66.66%
荷瘤 + CTX + QXZ - M	12/12	23.4 ± 1.9/26.7 ± 4.3	0.30 ± 0.07**#	79.24%
荷瘤 + CTX + QXZ - L	12/12	24.7 ± 1.4/28.3 ± 2.8	0.49 ± 0.32**	65.93%

注：各组瘤重与荷瘤组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ；各给药组与荷瘤 + 环磷酰胺组比较，# $P < 0.05$ 。

### 2.4 对小鼠凝血时间的检测

分别于给药第 7 天、第 13 天检测各组小鼠凝血时间，结果见表 2。从表中可见，与空白组比较，荷瘤 + CTX 组在第 7、13 天凝血时间显著缩短 ( $P < 0.01$ )，血液高凝状态形成，提示造模成功。各给药组与荷瘤 + CTX 组比较，荷瘤 + CTX + QXZ - M、L 组在第 7 天凝血时间显著延长 ( $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ )；荷瘤 + CTX + QXZ - H、M、L 组在第 13 天凝血时间显著延长 ( $P < 0.01$ )。提示，芪血蛭胶囊持续治疗可以延

长肿瘤 + CTX 模型小鼠的凝血时间，对抗血液高凝状态。

### 2.5 对小鼠凝血四项的检测

末次给药 24h 后，各组小鼠采血并检测血浆中的 FIB、PT、TT 和 APTT 浓度，结果见表 3。FIB、PT、TT 和 APTT 浓度越高，血液更容易凝结，呈现高凝状态。从表 3 中可见，与空白组比较，荷瘤 + CTX 组小鼠的 FIB、PT、TT 和 APTT 浓度均显著升高 ( $P < 0.01$ ， $P < 0.05$ )，提示高凝状态形成，造模成功。

表 2 对 H22 小鼠凝血时间的影响 ( $\bar{x} \pm S$ )

组别	7d (s)	动物数 (只)	13d (s)	动物数 (只)
空白	48.61 ± 7.61	6	48.50 ± 10.12	12
荷瘤 + CTX	27.06 ± 7.72**	6	34.95 ± 12.98**	12
荷瘤 + 环磷酰胺 + QXZ - H	40.44 ± 12.99	6	55.72 ± 9.45##	13
荷瘤 + 环磷酰胺 + QXZ - M	44.25 ± 13.39#	6	54.31 ± 14.40##	12
荷瘤 + 环磷酰胺 + QXZ - L	46.73 ± 5.85##	6	59.79 ± 16.15##	12

与荷瘤+CTX组比较,荷瘤+CTX+QXZ-M、L剂量组小鼠血液中FIB浓度显著降低( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ),荷瘤+CTX+QXZ-L组小鼠血液中PT浓度显著降低( $P<0.05$ ),荷瘤+CTX+QXZ-M组小鼠血液中APTT浓度明显降低

( $P<0.05$ )。提示,芪血蛭胶囊可降低环磷酰胺和肿瘤引起小鼠FIB、PT、APTT浓度的升高,从而缓解小鼠血液的高凝状态。

表3对H22小鼠凝血四项的影响( $\bar{x} \pm S$ ) $\delta$

组别	动物鼠(只)	FIB (g/L)	PT (pg/mL)	TT (pg/mL)	APTT (pg/mL)
空白	12	16.24 $\pm$ 1.02	488.31 $\pm$ 41.74	461.94 $\pm$ 30.98	370.04 $\pm$ 43.39
荷瘤+CTX	12	18.53 $\pm$ 1.87**	538.99 $\pm$ 52.68*	490.90 $\pm$ 31.91*	420.22 $\pm$ 64.19*
荷瘤+CTX+QXZ-H	13	17.14 $\pm$ 1.53	492.40 $\pm$ 151.52	483.21 $\pm$ 26.19	390.58 $\pm$ 34.68
荷瘤+CTX+QXZ-M	12	16.46 $\pm$ 2.54#	519.82 $\pm$ 77.09	482.36 $\pm$ 29.67	368.59 $\pm$ 47.12#
荷瘤+CTX+QXZ-L	12	14.26 $\pm$ 2.02##	483.03 $\pm$ 58.95#	491.79 $\pm$ 30.24	380.45 $\pm$ 35.77

注:荷瘤+环磷酰胺与空白组比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;给药组与荷瘤+环磷酰胺组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ 。

### 3. 结果与讨论

恶性肿瘤引起血液高凝状态的原因主要有肿瘤细胞自身促凝、肿瘤细胞与止血相关细胞相互作用促凝及肿瘤治疗相关促凝三方面<sup>[3]</sup>。肿瘤细胞自身可分泌和表达促凝物质引起血液高凝状态,包括组织因子(tissuefactor, TF)和癌促凝物质(cancerprocoagulant, CP)等,可与血管内皮细胞(VEC)、血小板(PLT)、单核巨噬细胞等相互作用引起血液高凝状态。恶性肿瘤患者高凝状态还与肿瘤相关的治疗关系密切,如长期卧床导致血流淤滞,血液动力学下降;肿瘤组织坏死,炎性细胞浸润和继发感染引起血液高凝;治疗过程中的创伤,如化疗药物、手术、中心静脉置管、穿刺等。其中,化疗药物在诱导恶性肿瘤患者的高凝状态中起着十分重要的作用。化疗药物主要分为六大类,包括①烷化剂:环磷酰胺等;②抗代谢类药物:氨甲蝶呤、阿糖胞苷、吉西他滨等;③抗肿瘤抗生素:蒽环类、博来霉素等;④抗肿瘤的植物类药物:长春碱类、紫杉醇类等;⑤激素:肾上腺皮质激素、雌激素、雄激素及其拮抗药;⑥杂类:铂类和酶等。以上药物尤其是细胞毒性药物如环磷酰胺(Cyclophosphamide, 环磷酰胺)<sup>[9]</sup>,可引起血液高凝状态而诱发血栓形成,文献报道门诊接受化疗12个月以上的肿瘤患者的静脉血栓栓塞症(Venousthromboembolism, VTE)发生率为12.6%,远高于对照组1.4%的发病率<sup>[10]</sup>。故本研究选择使用环磷酰胺诱导肿瘤小鼠血液高凝。

凝血四项为反映机体凝血功能的关键指标,包括APTT、PT、TT和FIB,临床上经常用于抗凝药物出血倾向

的评估、出血性疾病的诊断以及凝血功能的检查。也是实验室常用的血液高凝状态检测指标,试剂盒检测FIB、PT、TT和APTT浓度越高,血液更容易凝结,呈现高凝状态。凝血时间也可反映血液高凝状态,凝血时间缩短提示血液更容易凝结,呈现高凝状态。故本研究以此为主要的检测指标。

恶性肿瘤属中医“积聚”、“癥瘕”、“癌”等范畴,与瘀血关系密切,根据中医血瘀证诊断标准<sup>[11]</sup>可见,中医“血瘀论”与恶性肿瘤血液高凝状态有着密切的关系<sup>[12]</sup>。芪血蛭胶囊由炙黄芪、血竭、水蛭三味药组成,方中炙黄芪益气补中,血竭祛瘀定痛、活血生肌,水蛭破血、逐瘀、通经,三者共奏益气活血,散瘀定痛之效,从中医理论出发,芪血蛭胶囊具有活血化瘀的功效,对恶性肿瘤引起的血液高凝状态有治疗作用。

本研究通过检测给与芪血蛭胶囊后小鼠血液凝血时间及凝血四项,发现芪血蛭胶囊能明显延长凝血时间,明显降低由H22肝癌细胞及环磷酰胺介导的小鼠高凝血液中的FIB、PT、APTT浓度,此外,芪血蛭胶囊协同使用环磷酰胺,会进一步缩小瘤体积,减轻瘤重,结果说明,芪血蛭胶囊不仅能够缓解因肿瘤和环磷酰胺引起的血液高凝状态,与环磷酰胺协同使用,会进一步抑制肿瘤生长。研究结果与芪血蛭胶囊治疗恶性肿瘤血液高凝状态的中医理论相符。

综上所述,芪血蛭胶囊能够缓解肿瘤及化疗药物引起的血液高凝状态,同时抑制肿瘤生长。通过本研究,以期为芪血蛭胶囊的临床使用,提供参考。

### 参考文献:

- [1] 刘颖, 韩坤余, 何宛霖等. 中药干预恶性肿瘤患者高凝状态方药规律研究 [J]. 中国民族民间医药, 2023, 32(16): 89-93.
- [2] Tas F, Kilic L, Serilmez M, et al. Clinical and prognostic significance of coagulation assays in lung cancer [J]. Respiratory medicine, 2013, 107(3): 451-457.
- [3] 郑洋. 芪龙颗粒、芪蛭颗粒治疗非小细胞肺癌高凝状态的比较性研究 [D]. 北京中医药大学, 2014.
- [4] 李晓晓, 马云飞, 李光达等. 恶性肿瘤血液高凝状态的发病机制及中西医治疗进展 [J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(11): 1619-1623.
- [5] 江羽琪, 胡守友. 晚期胃癌高凝状态的中西医治疗进展 [J]. 中医临床究, 2021, 13(29): 143-145.
- [6] Hashemzaei M, Delarami Far A, Yari A, et al. Anticancer and apoptosis inducing effects of quercetin in vitro and in vivo [J]. Oncol Rep, 2017, 38(2): 819-828.
- [7] 徐红娟, 关建红. 降脂宁胶囊对凝血时间、血栓形成影响的实验研究 [J]. 山西中医学院学报, 2018, 01: 10-11+14.
- [8] 韦大文, 贾玉梅, 李中正. 紫金散对 H22 小鼠肝癌实体瘤及腹水瘤抑瘤率的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 17: 1346-1348.
- [9] 李芳萍. 乌贼墨多糖及其衍生物对环磷酰胺介导血液高凝的缓解作用 [D]. 广东海洋大学, 2022.
- [10] Khorana A A, Dalal M, Lin J, et al. Incidence and predictors of venous thromboembolism (VTE) among ambulatory high - risk cancer patients undergoing chemotherapy in the United States [J]. Cancer, 2013, 119(3): 648-655.
- [11] 中华医学会. 临床诊疗指南·肿瘤分册 [M]. 北京: 人民卫生出版社. 2005. 11.
- [12] 王珺. 恶性肿瘤合并血液高凝状态的研究现状 [A]. 中华中医药学会. 中华中医药学会第二届岐黄论坛——血液病中医药防治分论坛论文集 [C]. 中华中医药学会. 2014: 10

### 作者简介:

韩曼, 女, 陕西西安, 汉族, 硕士研究生学历, 现为陕西省中医药研究院中药所主管中药师, 研究方向: 中药药理。

通讯作者: 冯晓兰, 女, 副研究员, 中药药理。

### 基金项目:

陕西省中医药管理局科研课题 (SZY-KJCYC-2023-096)