

60

中國協和醫科大學
中國醫藥科學院
博士研究生畢業論文



中國協和醫科大學研究生院

中国协和医科大学、中国医学科学院博士学位论文

金属微量元素铜和铁

在中西医结合调控实验性肿瘤中的应用及意义

博 士 生: 高 锦

导 师: 周 舒 研究员

专 业: 中西医结合基础

入学时间: 一九九零年八月

所在院所: 中日友好临床医学研究所

一九九三年九月 于北京

目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
第一部分 铜和铁与肿瘤关系的历史回顾与分析.....	6
一. 中医学中对肿瘤的认识及铜和铁的治疗运用.....	6
1. 中医学对肿瘤的认识及治疗概况.....	6
2. 中医学对铜和铁的认识及其在肿瘤治疗中的应用概况.....	8
3. 中西医结合防治肿瘤中铜和铁联合中药的可行性及必要性.....	9
二. 铜和铁调控肿瘤的构想及渊源.....	10
1. 铜和铁微量元素结合中药调控肿瘤的提出及背景.....	10
2. 微量元素铜和铁伍用人工麝香组方的基本思想.....	11
第二部分 金属微量元素铜和铁联合中药调控肿瘤的实验研究.....	12
一. 肿瘤模型的选择及其意义.....	12
1. 移植性实验肿瘤模型在肿瘤调控评估中的价值.....	12
2. Hepatoma 22A 实体瘤和腹水瘤的特点及运用.....	12
二. 铜和铁伍用人工麝香组成铜复方调控肿瘤的实验研究.....	13
1. 材料和方法.....	13
2. 结果.....	14
三. 初步分析.....	19
第三部分 铜和铁联合中药对肿瘤作用的形态学观察.....	21
一. 实体肿瘤和腹水肿瘤细胞的大体和镜下形态观察.....	21
1. 材料和方法.....	21
2. 结果.....	21
二. 腹水中瘤细胞超微结构的观察.....	30
1. 材料和方法.....	30
2. 结果.....	30
三. 初步分析.....	37
第四部分 铜和铁联合中药对腹水型肿瘤细胞DNA及周期的影响.....	39
一. 肿瘤细胞DNA含量的MPV3分析.....	39
1. 材料和方法.....	39
2. 结果.....	39
二. 肿瘤细胞周期的FCM分析.....	40
1. 材料和方法.....	40
2. 结果.....	40
三. 初步分析.....	42

第五部分 铜及相关金属微量元素分布的变化与铜复方治疗实验性肿瘤的联系	43
一. 铜复方对腹水性肿瘤细胞及腹水中铜的影响	43
1. 材料和方法	43
2. 结果	43
二. 铜复方对荷实体瘤小鼠体内铜和铁及其它金属微量元素分布的影响	44
1. 材料和方法	44
2. 结果	47
2.1 小鼠荷瘤后对体内微量元素铜分布的影响	47
2.2 铜复方对荷瘤小鼠体内微量元素铜分布的影响	47
2.3 铜复方对荷瘤小鼠肿瘤组织内微量元素铜分布的影响	48
2.4 铜复方对荷瘤小鼠体内微量元素铁分布的影响	48
2.5 荷瘤对小鼠体内多种金属微量元素分布的影响	49
2.6 铜复方对荷瘤小鼠体内多种金属微量元素分布的影响	54
三. 初步分析	61
第六部分 讨论与结论	67
一. 铜复方调控肿瘤的作用及其途径的分析	67
二. 铜复方调整荷瘤机体金属微量元素分布在肿瘤治疗中的作用	68
三. 金属微量元素在中西医结合调控肿瘤中的可行性及其展望	70
四. 结论	71
参考文献	73
论文综述 微量元素铜、铁与肿瘤研究进展	77
论文附录	
1. 交流论文及进行中研究	92
2. 微量元素铜、铁及其不同比例配伍的急性毒性研究	93
后记	95

金属微量元素铜和铁在中西医结合调控实验性肿瘤中的应用及意义

(论文摘要)

中国传统医学对肿瘤类疾患独特认识, 在治疗上积累了丰富的临床经验。历代医家在肿瘤治疗中多采用中药复方, 现代研究表明, 传统医学治疗肿瘤的方药中, 多以破积聚、消微瘕、软坚散结等药物配合扶正固本、活血化瘀、清热解毒等药物组成, 其中有不少药物不但具有直接杀伤或抑制肿瘤细胞的作用, 而且具有调整机体, 改善病理状态的作用, 此特点在肿瘤的治疗中愈来愈引起人们的重视。为弘扬祖国医学这一优势并深入探讨其作用特点, 选用祖国医学中认为具有破积聚, 治恶疮, 镇心安五脏等功用的铜和铁两种金属化合物, 辅以具有芳香走窜, 通调全身经脉作用的人工麝香, 组成具有中西医特色的铜复方, 一方面发挥铜和铁抑制和杀灭瘤细胞等针对肿瘤的直接治疗作用, 另一方面通过调节机体各系统而改善机体的病理状况, 实现祖国医学治疗肿瘤中扶正祛邪的设想, 达到肿瘤患者康复的目的。

研究结果表明, 铜复方各成分抗肿瘤实验表明, 铜和麝香与对照组相比均具有显著的抑瘤效应($p < 0.01$), 铜强于麝香, 铁的抑瘤作用较弱, 铜与铁均未见显著的延长荷瘤小鼠存活时间的作用。由铜与铁和人工麝香组成的系列复方均具有显著抑制实体瘤 (HepA) 生长的作用 ($p < 0.01$, $p < 0.001$)。能延长实体瘤BALB/C小鼠的存活时间, 其中铜配伍麝香的R3和铜与铁配伍麝香的R7能延长腹水瘤(HepA)小鼠的存活时间($p < 0.05$)。R3在对荷HepA 实体瘤小鼠的抑瘤率和生命延长方面较 R7为佳, 多批重复实验表明, 效果稳定($p < 0.05$, 0.01), 对小鼠重要脏器未见明显的形态损害, 并能升高荷瘤小鼠的胸腺指数、脾脏指数和血红蛋白($p < 0.05$, 0.01); 形态学研究表明, 铜复方 R3和R7能显著提高坏死瘤组织的百分比($p < 0.01$), 降低活存瘤组织的百分比, 加强机体对肿瘤的反应, 可见肿瘤周围成纤维细胞显著增生, 肿瘤包膜完整, 瘤组织中有大量的淋巴细胞和中性粒细胞等炎性细胞浸润, 给R3和R7组上述变化与对照组相比较均有显著差异($p < 0.01$, $p < 0.05$), 且R3较R7组作用强; 对腹水瘤的分析表明, 铜、铁和人工麝香均使渗出的炎性细胞显著增多, 退化瘤细胞

显著增加，但作用不及R3和R7，对瘤细胞形态有一定影响，可见给予R3和R7治疗后瘤细胞形态较一致，胞浆丰富，核形态规正和染色质凝结等表现。扫描电子显微镜下可见：铜复方及各成分均可显著影响瘤细胞表面结构和形态，可见绒毛减少和消失，部分瘤细胞表面产生小泡，尤以铜和R3的影响为突出。透射电子显微镜可见铜复方及组方成分对瘤细胞线粒体，核结构有显著的影响，铜复方可使线粒体减少，瘤细胞核中出现深陷的胞浆成分等的表现，以R3作用最显著；瘤细胞内DNA含量和细胞周期分析表明，铜及铜复方R3和R7均使瘤细胞中DNA含量增加，R3和R7使G1和S期的瘤细胞减少 ($p < 0.05$, 0.01)，G2M期的细胞显著增多 ($p < 0.01$)；用原子吸收光谱对腹水瘤腹水及瘤细胞中铜含量测定表明，铜及铜复方R3和R7能显著升高瘤细胞中铜的含量 ($p < 0.01$)，对腹水中的铜含量无显著影响。

随着医学微量元素研究的深入发展，愈来愈多的研究表明，体内存在着多种微量元素具有重要的生理功能，正常状态下微量元素之间存在着特定的相互联系和协调平衡，与传统医学中五行相生相克和胜复调节的学说类同。本文采用仪器中子活化、离子色谱和X线荧光等分析测试手段，对荷瘤小鼠毛、脑、肺、心、肝、脾、肾、肌肉、骨骼、血浆、血球及肿瘤等组织内铜等多种金属微量元素进行测定，结果表明，BALB/C小鼠接种HepA瘤株三周后，体内铜及其它多种金属微量元素的分布发生变化，特别是肝组织与肿瘤组织中的变化较显著，各组织中铜与铁含量的变化令人注目。给予铜复方R3和R7后，机体内部多个组织器官中不仅未见微量元素铜铁及其它金属微量元素的蓄积，而且使荷瘤后小鼠各组织中微量元素的分布发生较明显的逆转，有向正常恢复的趋势。目前，虽然对各金属微量元素在体内变化的生理及生化意义和相互作用的具体机制尚不清楚，但从维持机体生命系统稳定的角度来分析，铜复方R3和R7具有对机体多种金属微量元素分布趋向正常的作用，可能是调节荷瘤机体病理状态的物质基础，是治疗肿瘤的一个重要环节。

关键词:

铜复方 小鼠移植肿瘤 抗肿瘤 形态学
金属微量元素分布 中西医结合

Applications and Prospects of Trace Metals, Copper and Iron, in Integrated Traditional and Western Medicinal Tumor Therapy

— — — Experimental study on the antitumor effects of recipes made of copper, iron and artificial moschus in mice bearing HepA

Abstract

Malignant tumors were known by Chinese medical practitioners thousands years ago. There were lot of useful therepeutic experiences collected from practice and some guidelines about malignant tumor treatment had been established. In traditional Chinese medicine, recipes, made of herbs, minerals and products of animals, played a very important role and had a predominant position in the treatments of malignant tumors. The components of recipes for treatment of malignant tumors not only included the agents for inhibiting the tumor growth and acting against the tumor cells directly which was described as Po Ji Ju (破积聚), Xiao Zheng Jia (消徵瘕) and Ruan Jian San Jie (软坚散结) etc promoted by some kinds of traditional drugs such as copper and iron minerals etc., but also included the biological response modifiers to make various dysfunctions in host due to malignant tumors recovered which played the actions as Fu Zheng Gu Ben (扶正固本), Huo Xue Hua Yu (活血化瘀), Qing Re Jie Du (清热解毒) etc considered by Chinese traditional practitioners.

In this paper, recipes was made of cupric and ferric compounds, in stead of natural copper and iron minerals used in traditional Chinese medicine, and artificial moschus in stead of the natural moschus which was one of powerful Yin Jing (引经) agents which was considered as a leading - carrier for other companier in traditional recipes. Two recipes composed of cupric and artificial moschus as R3 and cupric, ferric and artificial moschus as R7 were raised. In these two recipes, the components could be considered that not only had the actions against tumor itself directly, but also had the effects on recovering dysfunction

of the body. The recipes would have both the action of Fu Zheng and Qu Xian (扶正祛邪) as described in traditional Chinese medicine.

The experimental results indicated that our recipes played significant roles in inhibiting solid HepA tumor growth in BALB/C mice ($p < 0.01$, $p < 0.001$). Especially, R3 and R7 had remarkable action on prolonging lifespan of mice with ascite HepA ($p < 0.05$). In all recipes R3 was the strongest in inhibiting HepA solid tumor growth and prolonging lifespan. Copper and artificial moschus had predominant inhibiting tumor growth effects ($p < 0.01$), copper acts more obviously in inhibiting tumor growth than artificial moschus, but the inhibiting tumor growth effects of iron was not significant in our work. It was also showed that R3 and R7 had the effects on elevating thymus index, spleen index and hemoglobin without any hazard action at main organs. In mice exposed to R3 and R7 for three weeks, it was showed on histological study in mice bearing solid HepA tumor that:

- 1) increased in necrosis ratio and decreased in survival ratio of the tumor tissues;
- 2) promoted the proliferation of fibroblasts and connective tissues around the tumor and increased in numbers of lymphocytes and PMN, both had invaded into the tumor tissues;
- 3) inhibited in proliferation of tumor cells.

All effects mentioned above were stronger in R3 than R7 in BALB/C mice bearing ascitic HepA. After exposed to R3 and R7, it was indicated that

- 1) increased in ratios of lymphocytes, PMN and degenerative tumor cells in ascites;
- 2) melt, lost even disappeared in microvilla of tumor cells and belbed in some tumor cell surface under observation by SEM;
- 3) decreased in nuclear cytoplasm ratio and in numbers and malformations of mitochondrial, appeared some special involved bodied in neclei of tumor cells;
- 4) increased in tumor cells DNA content and obviously changed in

tumor cell cycle dynamics that were decreased in G1 and S phase ($p < 0.05$, $p < 0.01$), and increased in G2M phase ($p < 0.01$); 5) copper level was increased remarkably in tumor cells and without the any change in ascites.

More and more research works indicated that trace elements in the body play important roles in various physiological functions. The trace elements are coordinated and balanced each other which might be considered as the trace elements homeostasis. While the subjects were bearing malignant tumor, the distribution of trace elements was changed obviously, discoordination and imbalance between trace elements was occurred. In our works, trace metals was analysed by neutron activation analysis, ion chromatograph and X-ray fluorescence. The results indicates that there were mass changes of trace metals distribution such as Cu, Fe, Zn, Ca, Mn, Mg, Co, Cs, Sr, Rb, Sb, Se, Hg, Sc and Cr in various organs and tissues of mice bearing HepA three weeks such as wool, brain, lung, heart, liver, spleen, kidney, muscle, bone, plasma, blood cells and tumor tissues, especially in liver and tumor tissues are more remarkable. After exposed to R3 and R7, the trace metals distributions were reversed, especially both copper and iron had not accumulated in any organs at all, but only had the traces recovered to normal levels.

Though the mechanism and biological sense of distribution changes of various trace metals in various tissues was not yet clear but it might be important in treatment of malignant tumors. Malignant tumors could be considered as both the local significant changes and overall imbalanced in trace metals of the subjects. The treatment of malignant tumor could be known as removing local tumor lesion and regulating the whole host trace elements homeostasis.

Key words:

anticancer recipes; HepA; antitumor effects; morphologic analysis; trace metals analysis; traditional integrated western medicine

第一部分 铜和铁与肿瘤关系的历史回顾与分析

一. 中西医学中对肿瘤的认识及铜和铁的治疗运用

1. 中西医学对肿瘤的认识及治疗概况

当今肿瘤以其对人类健康的极大威胁早已引起人们的关注。随着人类对急性病诸如感染等等的成功防治, 而慢性疾病, 特别是对人类健康威胁较大的恶性肿瘤目前已成为现代医学的热点之一。

两千多年前, 我们的祖先对现代医学称之为“肿瘤”的疾病便有了初步的认识, 在其后的历代医学著作中, 可见诸如: 肿疡、癰瘤、癰贅、贅瘤、肠覃、徵瘕、积聚、噎膈、舌疳、胃反、恶疮、翻花疮、失荣、岩、癌, 等等多种良恶性肿瘤病理病机和临床表现的记述^[1-3], 其中已包含了现代恶性肿瘤, 有的病如翻花疮、乳岩等等实际上就是专指现代恶性肿瘤, 并在丰富的医疗实践中逐步形成了祖国医学对肿瘤的独特认识和治疗法则。祖国医学虽没有象现代医学那样从整体结构分类学、组织学、细胞学及目前飞速发展的分子生物学等等方面阐明肿瘤的病因和病机, 甚至包含着现代医学科学尚未认同的地方, 但其中很多精辟的见解已逐步引起关注。如肿瘤的病因中述及: 精神情绪的过度紧张, 忧郁或外邪的侵犯, 以及衰老、饮食起居的影响等致体内气血瘀滞而致肿瘤。此外, 人体内部所产生的某些不正常的物质或物质的异常滞留, 致内脏功能失调和紊乱均可成为诱发肿瘤的病因等, 并认识到肿瘤这类疾病成因的复杂性, 很早便形成了肿瘤发生的多因素综合作用说。祖国医学对肿瘤的治疗也独具特色, 因对肿瘤的认识是和肿瘤的治疗实践紧密结合的, 虽然认为肿瘤属于难治之症, 然而对肿瘤的治疗探索从未放弃, 在肿瘤的治疗上积累了丰富的临床经验和一系列行之有效的法则。在肿瘤治疗实践中不仅非常重视对患者的整体调整治疗, 同时也注重针对肿瘤病变的治疗措施探索, 如内服或外敷的药物治疗和局部的手术切除等等, 强调肿瘤类疾患的综合治疗。早在《黄帝内经》中对现代恶性肿瘤这类疾患便指出: “坚者削之” “结者散之” 等治法, 嗣后在丰富的肿瘤治疗实践上形成了“扶正攻邪”、“活血化瘀”、“软坚散结”, 等等系列肿瘤治疗大法, 逐步形成了肿瘤疾患辨证论治的原则, 对肿瘤患者既增

强身体内在的机能与抗病力，又针对肿瘤的病变进行攻伐，达到调整机体整体阴阳平衡及失调脏腑平衡，控制局部病变的发展，而达治疗肿瘤的目的。这些思想已成为当今临床肿瘤治疗的重要指导原则^[4-6]。

近年来，随着中医学队伍的发展和受当代哲学思想、新科技的影响，祖国医学中关于肿瘤的认识大大升华，将历代对肿瘤的认识从宏观和初步的描述推测不断发展，提出了对肿瘤认识的系统观点，发掘了很多治疗肿瘤宝贵经验，为我们深入认识和治疗肿瘤提供了宝贵的素材和有益的启示。在目前中医临床的肿瘤治疗中，中草药占有非常重要的位置，以辨证论治为指导，采用活血化瘀法、扶正培本法、软坚散结法、清热解毒法、利湿逐水法等调整机体阴阳，恢复脏腑平衡的法则来治疗；其次根据民间的传统经验来治疗；目前，常以中西医结合的方法为主，对肿瘤患者进行诊断和治疗，以达到标与本兼治、调理整体失常机能与消灭或控制局部肿瘤发展兼顾的目的。

近百年来，随着物理、化学、生物学以及临床医学的发展，对肿瘤的发生、发展以及诊断、治疗等不同层次的研究，在基础理论和临床应用等方面都已取得了很大的发展。特别是近20年，随着分子生物学的发展，人类对肿瘤的认识有了长足的进步。

在西方文化中Cancer(癌)较Medicine(医学)出现的早，前者为拉丁文螃蟹(Krebs)之意。癌这一疾病的名称是由Galen偶然发现乳腺硬癌时癌性淋巴管炎的形状有些象螃蟹而提出来的。在大约公元前3000年的古代印度和埃及的医学中已经提到这一疾病，古代医生不仅认识到这一疾病的症状，而且也有一些治疗方法。早在16世纪，瑞士籍传统炼金术的鼻祖 Paracelsus 基于生命是一个化学过程的设想指出：盐平衡的破坏是恶性肿瘤的原因，并认为肿瘤是体内存在的三种“基本物质”盐、硫和汞不再互相协调，从而盐就具有了“砷”的特性致恶性肿瘤的^[7]。

当今，随着现代科技的进步，对生命现象的认识虽远非Paracelsus所处的炼金术时代可比，但现代医学科学的发展证明，生物体是由各种元素组成的，其中包含有生物大分子的主要结构元素——宏量元素和占生物体比重极小的微量元素，而微量元素的平衡与否对生物体的状态影响很大^[8-11]，国内外学者大量的研究发现，肿瘤的发生、发展

和转归与体内金属微量元素如铜、铁、硒、砷等等的分布和代谢密切相关^[7, 12-16]，虽然不象堪称为生命化学先驱的 Paracelsus 所设想的那样，肿瘤是由体内存在的三种“基本物质”盐、硫和汞不再互相协调之故，但他提出的这种观点对现代医学从微量元素角度认识肿瘤仍具有指导意义。

现阶段在肿瘤的临床治疗中，虽然外科手术和放射治疗等非药物治疗占有显著的位置，但由于更有效的化疗、免疫治疗、生物信息治疗、基因治疗和元素医学疗法等等方法的出现给人类征服肿瘤又迎来新的希望。

2. 中医学对铜和铁的认识及其在肿瘤治疗中的应用概况

我们的祖先将铁和铜类物质药用历史悠久，据载在公元前约2735年便开始用铁来治疗各类疾病，较欧洲将铁用于临床 (B.C.1500) 早1200多年。在中医历代文献中，关于铜和铁的论述较多，用途极为广泛。

《神农本草》记载铜具有轻身，延年，利九窍，通血脉，养精神、通关节、不老，明目的作用，常用于青盲、风痹、微坚、积聚、目痛、泪出、折跌、疤肿、金疮、心下邪气等等；铁具有坚肌，耐痛，轻身、除邪气、明目、恶鬼等作用，适用于恶疮、瘍疽、疮痂疥，微瘕、血痹、烦满、周痹、肢节痛、耳聋等等。铜和铁类矿物在祖国医学中抗肿瘤类疾患的作用已被历代医家公认，除《神农本草》记述具有破微坚、破积聚、坚肌、耐痛、除邪气而治疗恶疮、瘍疽、疮痂疥，微瘕外，《新修本草》、《千金翼方》、《证类本草》、《本草纲目》及《本草拾遗》中均有大量关于抗肿瘤类疾病的记述，如自然铜具有散血、止痛、消瘀血、安心的作用，从而用于积聚等证。铜矿石用于丁肿和恶疮。铜青用于息肉、金疮、恶疮和瘡疮，空青、曾青、绿青、扁青等均能破积聚，治恶疮。关于铁的种类较多，诸如生铁、铁粉、铁落、铁精和铁浆等等，记述有坚肌、耐痛、镇心、安五藏、破积聚、治恶疮、金疮、止痛、生肌肉和祛瘀等功用，这些宝贵的经验至今仍指导中医临床。

西方医学中用铜和铁治疗疾病可上溯到16世纪，据文献考证铜和铁在疾病中应用是由Paracelsus及其追随者们创导并发展的^[17-18]，在用单纯的铜或铁等等金属治疗疾病的过程中，幸运的是病人在服用这

些药品时往往还没来得及吸收足以致死的剂量就引起呕吐而免于一死。采用金属治疗疾病的效果不象在其它方面令人鼓舞。约于1681年, 英国内科医生Sydenham将铁与糖和葡萄酒制成合剂用于治疗疾病, 可谓第一个成功地将铁运用于人类疾病治疗的人, 被治疗的疾病后来悉知是由缺铁引起。自18世纪人们发现血液中含有铁并从1832年第一例缺铁性贫血病人通过口服铁剂得到成功的治疗起, 世界范围内用铁剂治疗贫血开始流传。随着化学等学科的发展, 人们不仅认识到铜和铁属于过渡金属, 并在一定程度上对其一系列理化性质有所了解, 同时也逐步认识到铜和铁在生物体内的存在及其对健康的影响^[19]。现代医学中大量的文献表明, 铜和铁是人体不可缺少的必需微量元素, 参与了机体一系列的重要生理生化过程, 是生物体内多种重要物质的组成成分^[20]。

近年来, 随着医学微量元素研究的日益深入, 发现微量元素与各种疾病的关系非常密切。做为机体必需微量元素的铜和铁, 在肿瘤的发生、发展和防治中的地位和作用逐步引起重视, 很早便发现某些肿瘤患者的血液中铜含量升高, 血铁也有变化, 且血中铜与铁含量可作为疗效及判断预后的指标之一^[21]。流行病学研究发现, 铜和铁的不适当摄取与肿瘤的发病相关, 如铜的摄取不足, 铁的负载会增加某些肿瘤的发生。多年来人们试图将铜和铁用于肿瘤的治疗, 本世纪初, 化疗尚未问世, 某些学者试图用重金素化合物如金、砷、铜、铁、汞等治疗肿瘤, 但均未能收到满意的效果。嗣后, 将重点转移到合成抗肿瘤化合物的研究上, 合成一些具有抗实验肿瘤活性的化合物, 并与特定活性物质组成某些复合物用于抗肿瘤研究, 均取得一定的效果^[22-27]。成为探索铜和铁治疗肿瘤的重要尝试。

3. 中西医结合防治肿瘤中铜和铁联合中药的可行性及必要性

中西结合是我国特有的医学研究和临床实践方向和方法。把中医中药的知识和西医西药的知识结合起来。换言之, 即是运用近代科学的知识和方法来整理研究我国旧有的中医和中药^[28]。这无疑会推动我国医药学的发展, 创造出我国独特的医药学体系, 在肿瘤治疗中也不例外。

我们的祖先在用中药(包括铜和铁)来治疗肿瘤和其它各种疾病中

积累了丰富的临床经验。如上所述，历代医方和医案中选用铜和铁来治疗肿瘤的记述很多^[1-2]。现代研究发现，中医中常用富含铜和铁等金属微量元素的药材组成多种方剂用于肿瘤的治疗^[29]，丰富的中医临床实践证明对多种肿瘤治疗有效。究其医理可能与组方对体内多个系统的多模式作用有关。由于医学发展模式的差异，铜和铁的抗肿瘤效应尚未引起西方医学的重视，可能与铜或铁各自针对肿瘤的直接作用不及某些化疗药之故。随着微量元素研究在医学领域的进展，微量元素在体内动态平衡并相互作用的规律逐步被认识。从微量元素的角度来认识肿瘤，有大量的基础研究和临床观察提示：肿瘤是以局部微量元素分布代谢明显紊乱，整体微量元素代谢失调的疾患之一，若运用现代医学铜和铁具有抗肿瘤作用的研究成果，依据中医数千年运用铜和铁复方治疗包括肿瘤在内各种疾病的丰富经验，寻找治疗肿瘤的有效方药并探讨其机制，将有一定的理论意义和实用价值，这一思路可望为治疗肿瘤和战胜各种疾病开辟一条有效途径。

二. 铜和铁调控肿瘤的构想及渊源

1. 铜和铁微量元素结合中药调控肿瘤的提出及背景

自1988年以来，本室在运用传统中草药抗癌研究中作了大量而深入的研究，其中也对刘氏兄弟用铜和铁及中药治疗肿瘤收到一定效果的方药进行了实验研究，并发现这一含铜和铁的民间验方具有抗实验性肿瘤的效应和一定的临床效果。据此，我们系统地收集祖国医药学中铜和铁在治疗肿瘤中的历代详细记述和现代医药学对医学微量元素铜和铁及其抗肿瘤的研究成果，我们构想：即铜和铁微量元素在一定条件下不但对肿瘤细胞的生长起到控制作用，而且可以改善机体的病理状态，合理地配伍具有协同作用的传统中药，可一方面加强铜和铁的控制肿瘤作用，另一方面可调整失衡的机体更有利于局部病变的恢复。因为中医药防治疾病的理论基础重在调整失调机体的故有平衡，并有充分可靠的临床经验为佐证。因此，我们选定微量元素铜和铁，并根据传统中医用药规律选用具有协同作用的中药组成方剂，使之既能控制和消灭局部肿瘤，又能调整机体的失衡，这种治疗作用简言之称为“调控肿瘤”作用。

2. 微量元素铜和铁伍用人工麝香组方的基本思想

传统中医用药非常注重药物的配伍，主张药物的君、臣、佐、使，据目前中西医学对铜的认识，它不仅是机体的组成成分，有重要的生理调节作用，然而随着用量的增长可由生理的调节作用转化为对病理状态的治疗作用。摄入到一定剂量，具有较强的抗肿瘤作用和对机体的广泛调整作用，可为君药；铁也为身体的组成成分，主要起到对机体的调整作用，是否具有抗肿瘤作用尚待研究，但与铜的协同作用已被人们重视，可为臣药；中医理论认为，肿瘤疾患可发生在身体各个部位，用药时应重用入本经之药或选用引经药使药入病所，发挥药物的最佳疗效。据此选用中医认为既具芳香走窜通全身十二经、活血化淤又具除百病、调理周身的麝香为佐使，使整个组方既能很好的控制和杀灭异常的肿瘤细胞，又能全面调理整个机体而有利于肿瘤疾患的康复。因铜在方剂中占有的重要位置，我们将铜与铁配伍中药麝香组成的有效抗肿瘤方剂在本研究中定名为“铜复方”。

第二部分 金属微量元素铜和铁联合中药调控肿瘤的实验研究

一. 肿瘤模型的选择及其意义

1. 移植性实验肿瘤模型在肿瘤调控评估中的价值

肿瘤的控制和最终的彻底征服依赖于对肿瘤深入而正确的认识, 医学基础科学的发展是医学科学进步的标志。动物实验肿瘤模型在肿瘤的基础研究中占有重要位置。

近20年在肿瘤认识和治疗上的巨大进步, 与研究中采用的方法直接相关, 实验肿瘤模型的运用在了解肿瘤与机体以及药物与肿瘤和机体相互作用方面发挥了极大的作用。特别是在临床上对肿瘤的治疗有效的药物绝大多数是经动物实验肿瘤模型筛选而来。国内外学者大量的研究表明, 移植性肿瘤作为药用物质的“筛选系统”已证明是有效的, 几乎所有临床上对人体肿瘤有抑制作用的物质对移植性肿瘤也有作用, 虽然动物实验研究有局限性, 但在寻找有效抗癌药时, 在移植性肿瘤得到的结果, 经常作为对药物进行临床验证的基础^[30]。

目前动物实验肿瘤模型在肿瘤研究中的作用已取得较一致的认识。选用恰当的研究模型不但能深入了解肿瘤的实质, 而且可在实验中阐明对人类肿瘤有治疗作用药物的作用机制, 并在一定程度上预测最好效果的肿瘤类型和肿瘤部位。移植性肿瘤模型除了能证明药物的治疗作用以外, 同时在预期药物副作用方面也有很大的意义。

自50年代以来, 我国中西医结合学术界曾利用移植性肿瘤模型, 模拟祖国医学中由肿瘤积症、臌症等病证所致的气滞血瘀, 痰结湿聚, 邪毒郁热和脏腑失调等病理状况, 并对传统医学中记述用于治疗肿瘤类疾病的各种抗肿瘤方药研究表明, 其抗肿瘤效应除对肿瘤细胞的直接作用外, 还可通过调整循环血液系统, 免疫系统, 造血系统, 内分泌等系统的功能来实现对肿瘤细胞的损伤、抑制和促分化^[2]。由于中医药体系的多模式和复杂性, 以实体和腹水型肿瘤模型并用, 对分析其病理规律、药物效果和作用机制有一定益处。

2. Hepatoma 22A 实体瘤和腹水瘤的特点及运用

Hepatoma 22A (HepA) 属于小鼠肝细胞肿瘤, 本世纪50年代由苏联

学者用化学物质在小鼠体内诱发成功并建成瘤细胞系，定名为 H22。后分别由中国医学科学院和中国科学院上海药物所引进，并在昆明系小鼠体内移植成功。可形成腹水瘤和实体瘤，移植成功率为100%，是国内实验肿瘤学研究较为常用的模型之一。本研究室将 HepA移植于 BALB/C纯系小鼠体内，复制成实体和腹水型肿瘤模型。数年的研究表明，该瘤株不仅对多种化疗药的作用敏感，而且用于中药抗肿瘤研究有较高的临床符合率。特别是该瘤株制作的移植性实体瘤模型，血液中某些微量元素如铜的变化与临床上肝癌及其它肿瘤相似。且血浆中铜的动态变化和临床病人一致。本研究选用 HepA 腹水瘤和实体瘤不仅可对研究的药物组方进行筛选和恰当的评估，而且可作为探讨微量元素与肿瘤关系的研究模型之一。

二. 铜和铁伍用人工麝香组成铜复方调控肿瘤的实验研究

1. 材料和方法

1.1 动物模型

雄性BALB/C 小鼠，体重 18-22g，腹腔或右腋后皮下接种小鼠肝癌 (HepA) 细胞 7×10^6 /只(0.2ml/只)，分别造成小鼠肝癌实体瘤或腹水瘤模型。

1.2 有效组方筛选及给药方法

药品 Cu (Cupric Acetate, Beijing Chemical Factory); Fe (Ferric Citrate, sigma company) 人工麝香(Artificial Moschus, M, Institute of Materia Medica, CAMS)

参照微量元素铜、铁及其不同比例配伍的半数致死量，以其 1/3和 1/9 选定给药剂量（见表1），观察其效应。并以此为主辅以人工麝香（剂量参照人的常用量）配伍成各种实验方药，如表2所示；人工麝香 M先用 Tween 80 乳化后制成分散均一药效稳定的水剂。从接种肿瘤细胞后给药，给药量按 0.2ml/10g体重，每日连续灌胃给药，观察小鼠的荷瘤存活期和测量肿瘤的体积。筛选既能显著延长荷瘤小鼠活存时间又能显著抑制肿瘤生长的组方。

1.3 荷瘤小鼠存活期、肿瘤体积、抑瘤率及生命延长率的计算

小鼠荷瘤的存活期的计算：从接种瘤细胞当天至死亡时的生存天数

肿瘤体积 $v = x_1 \times x_2 \times x_3 \times \pi \div 6$ (x_1 、 x_2 、 x_3 为肿瘤的三个径)

抑瘤率 = 对照组瘤体积 - 实验组瘤体积 / 对照组瘤体积 $\times 100\%$

生命延长率 = 实验组生存期 - 对照组生存期 / 对照组生存期 $\times 100\%$

表1. 拟筛铜和铁抗肿瘤实验方剂的组成及含量

组 成 (mg/kg)	组 方									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Cu ION	—	—	28.2	9.4	35.5	11.8	41.2	13.7	11.1	3.7
Fe ION	34.3	11.4	—	—	35.5	11.8	10.3	3.4	44.5	14.8
Cu:Fe	1:∞	1:∞	∞:1	∞:1	1:1	1:1	4:1	4:1	1:4	1:4

表2. 拟筛铜和铁配伍人工麝香抗肿瘤实验方剂的组成及含量

组 成 (mg/kg)	组 方						
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
Cu ION	—	—	28.2	35.5	11.8	41.2	11.1
Fe ION	—	34.3	—	35.5	11.8	10.3	44.5
M	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0

2. 结果

2.1 铜、铁对荷腹水癌小鼠存活期的影响.

2.1.1 单纯铜或铁对荷腹水癌小鼠存活期的影响

生理盐水灌胃对荷瘤小鼠存活期无明显的影响，单给不同剂量的铜或铁对荷腹水癌的小鼠的存活期延长无显著的影响。见表3.

表3. 铜、铁对荷腹水型肝癌小鼠存活期的影响

组 别	第一批实验		第二批实验	
	样 本	平均存活时间(天)	样 本	平均存活时间(天)
-	8	18.0 ± 2.1	11	17.2 ± 1.3
N S	10	17.5 ± 1.6	10	16.3 ± 2.2
Fe(A)	11	15.9 ± 2.6	9	15.5 ± 1.3
Fe(B)	9	16.7 ± 2.5	10	16.3 ± 1.4
Cu(C)	12	18.6 ± 2.2	9	15.4 ± 2.3
Cu(D)	13	18.5 ± 2.5	10	15.7 ± 1.9

2.1.2 铜、铁不同比例配合后对荷腹水型肝癌小鼠存活期的影响

铜、铁不同比例联合后对荷腹水型肿瘤小鼠的存活时间无延长作用见表4.

表4. 铜、铁不同比例配合后对荷腹水型肝癌小鼠存活期的影响

组 别	Cu (mg/kg)	Fe (mg/kg)	样 本	存活时间 (天)
N S	-	-	10	16.3 ± 2.2
E	35.5	35.5	10	16.2 ± 2.4
F	11.8	11.8	10	17.0 ± 1.6
G	41.2	10.3	8	14.6 ± 1.3
H	13.7	3.4	9	16.9 ± 1.6
I	11.1	44.5	8	14.9 ± 1.6
J	3.7	14.8	11	15.8 ± 1.8

2.2 铜、铁配伍人工麝香组方对荷腹水癌小鼠存活期的影响

2.2.1 组方中单一组成成分对荷腹水肿瘤小鼠存活期的影响

组方中成分铜、铁和麝香及相应的剂量均无显著延长小鼠存活期的作用。见表5.

表5. 单纯铜、铁和人工麝香对荷腹水癌小鼠存活期的影响

组 别	药物剂量	样本	存活时间(天)
N S	20.0ml/kg	6	16.6 ± 2.3
Fe	34.3mg/kg	7	17.4 ± 4.5
Cu	28.2mg/kg	7	18.7 ± 1.9
M(R1)	80.0mg/kg	7	18.7 ± 3.2

2.2.2 铜、铁配伍人工麝香组方对荷腹水癌小鼠存活期的影响

由铜与人工麝香组成的方剂R3和铜、铁之配伍人工麝香组成的方剂R7具有显著延长荷腹水癌小鼠存活期的作用($P<0.05$)。结果见表6。

表6. 铜、铁配伍人工麝香组方对荷腹水癌小鼠存活期的影响

组 别	样 本	存活时间 (天)
N S	6	16.7 ± 2.3
Fe+M(R2)	7	17.7 ± 2.6
Cu+M(R3)	6	19.6 ± 2.2*
Fe+Cu+M(R4)	7	17.3 ± 3.4
Fe+Cu+M(R5)	7	17.7 ± 3.2
Fe+Cu+M(R6)	7	17.9 ± 1.5
Fe+Cu+M(R7)	6	20.5 ± 2.6*

t 检验: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

2.3 铜、铁配伍人工麝香组方对荷HepA实体瘤小鼠的影响

2.3.1 铜、铁或人工麝香对小鼠实体瘤生长的影响

组方中铜与人工麝香对实体瘤的生长具有显著的抑制作用,其中以铜和铁组方抑瘤作用最强($P<0.01$)。见表7。

表7. 组方中铜、铁和人工麝香对小鼠实体瘤生长的影响

组别	样本	肿瘤体积(cm^3)					
		5天	8天	11天	15天	18天	21天
N S	7	0.486 ±0.162	0.903 ±0.337	1.500 ±0.489	2.592 ±0.985	3.412 ±1.211	4.463 ±1.649
Fe(A)	7	0.457 ±0.265	0.657 ±0.208	1.127 ±0.386	1.730 ±0.632	3.019 ±1.101	4.778 ±1.757
Cu(C)	6	0.519 ±0.245	0.774 ±0.321	0.762*** ±0.265	0.937**** ±0.280	1.265**** ±0.396	1.638**** ±0.532
Cu+Fe (E)	7	0.403 ±0.115	0.681 ±0.104	0.806*** ±0.245	1.192*** ±0.309	1.454**** ±0.489	1.760**** ±0.606
R1 (M)	5	0.538 ±0.080	0.669 ±0.080	0.948** ±0.095	1.404** ±0.165	2.972 ±0.526	4.430 ±1.557

t 检验: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $p<0.005$ **** $p<0.001$ ***** $p<0.0001$

2.3.2 铜、铁和人工麝香对荷瘤小鼠存活期的影响

组方中铜和人工麝香均具延长荷实体肿瘤小鼠存活期的作用，其中人工麝香具有显著的延长小鼠存活期的作用($p < 0.05$)。见表8。

表8. 组方中铜、铁和人工麝香对小鼠存活期的影响

组别	样本	存活时间(天)		存活延长率(%)
N S	7	28.9	± 8.4	
Fe(A)	6	29.7	± 7.2	2.8
Cu(C)	6	33.3	± 6.7	15.2
Cu+Fe(E)	7	37.0	± 8.0	28.0
R1	5	41.0	$\pm 6.6^*$	41.9

t 检验: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

2.3.3 铜、铁配伍人工麝香组方对小鼠实体瘤生长的影响

铜或铜联合铁配伍人工麝香的各组方对小鼠实体肿瘤的生长均有显著的抑制作用，其中由铜和人工麝香配伍的组方 R3 抑瘤作用最佳($p < 0.001$)。见表9。

表9. 铜、铁配伍人工麝香组方对荷瘤小鼠实体瘤生长的影响

组别	样本	肿瘤体积(cm^3)					
		5天	8天	11天	15天	18天	21天
N S	7	0.486	0.903	1.500	2.592	3.412	4.463
		± 0.162	± 0.337	± 0.489	± 0.958	± 1.211	± 1.649
R2	6	0.394	0.685	0.789***	1.317***	1.622***	3.213
		± 0.199	± 0.183	± 0.241	± 0.398	± 0.444	± 0.945
R3	6	0.470	0.613	0.717****	0.864*****	0.930*****	1.096*****
		± 0.102	± 0.098	± 0.146	± 0.233	± 0.307	± 0.304
R4	5	0.181****	0.648	0.768**	1.174***	1.514***	1.749****
		± 0.048	± 0.344	± 0.366	± 0.452	± 0.538	± 0.595
R6	7	0.394	0.416**	0.692***	0.995****	1.247*****	2.497**
		± 0.168	± 0.182	± 0.262	± 0.344	± 0.492	± 0.769
R7	7	0.225***	0.404**	0.617****	0.997****	1.800***	1.962***
		± 0.084	± 0.148	± 0.187	± 0.306	± 0.306	± 0.585

t 检验: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $p < 0.005$ **** $p < 0.001$ ***** $p < 0.0001$

2.3.4 铜、铁配伍人工麝香组方对荷瘤小鼠存活期的影响

各组方均具延长荷实体瘤小鼠存活期的作用,其中R3 对生命延长作用显著($p < 0.05$), 在全部组方中 R3既具有较强的抑瘤作用, 又具有显著的延长荷瘤小鼠存活期的作用。见表10.

表10. 铜、铁配伍人工麝香组方对荷瘤小鼠存活期的影响

组别	样本	存活时间(天)	肿瘤体积(cm^3)	抑瘤率(%)	生命延长率 (%)
N S	7	28.9 ± 8.4	4.463 ± 1.649		
R2	5	30.0 ± 7.1	3.213 ± 0.945	28.0	3.8
R3	6	$42.0 \pm 12.2^*$	$1.096 \pm 0.304^{*****}$	75.4	45.3
R4	7	34.4 ± 5.6	$1.749 \pm 0.595^{****}$	60.8	19.0
R6	7	39.0 ± 12.9	$2.497 \pm 0.769^{**}$	44.0	34.9
R7	7	33.1 ± 8.7	$1.962 \pm 0.585^{***}$	56.0	14.5

t 检验: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $p < 0.005$ **** $p < 0.001$ ***** $p < 0.0001$

2.4 确定显效和最佳抗肿瘤组方

根据组方对荷瘤小鼠存活期的延长作用及抑瘤效果,以微量元素铜与人工麝香的组方R3为最佳。以微量元素铜和铁与人工麝香配伍组方R7次之,二者不仅具有很好的抑瘤和延长存活期的作用,而且又无长期连续给药所致的主要组织器官的损害及体重下降。不同剂量多次重复实验表明,抗肿瘤效果肯定。见表11.及表12.

表11. 抗肿瘤方剂R3 和R7 对小鼠实体瘤生长的影响

批 次	接 种 瘤细胞数 $a \times 10^6$	观察 时间 天	给药 时间 天	肿瘤体积/重量(cm^3 .or g)				
				NS	R3	TIR%	R7	TIR%
I	7.00	21	20	4.463 ± 1.649	$1.096 \pm 0.304^{***}$	75.44	$1.962 \pm 0.585^{***}$	56.04
II	7.00	23	20	6.573 ± 3.397	$2.261 \pm 2.102^{***}$	65.60	$2.552 \pm 2.157^{***}$	61.18
III	7.00	23	17	6.790 ± 1.740	$3.100 \pm 1.560^{***}$	54.35	$4.140 \pm 1.690^{**}$	39.03
IV	3.34	25	18	6.896	3.463^{***}	49.78	—	—

t 检验: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $p < 0.005$ TIR:Tumor Inhibiting Rate

表12. 抗肿瘤方剂R3 和R7 对小鼠体重和瘤重的影响

组别	样本	剂量	瘤重(g)	体重(g)
N S	8		4.32 ± 3.09	22.4 ± 3.2
R3	7	常量	1.52 ± 1.17*	23.3 ± 2.8
R3	8	1/2量	2.42 ± 1.93	23.8 ± 2.6
R7	8	常量	2.55 ± 2.16	21.9 ± 3.3
R7	7	1/2量	3.34 ± 2.76	23.2 ± 2.9

t检验: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 方剂对荷 HepA实体瘤小鼠血红蛋白(Hb), 白细胞(WBC), 胸腺指数(TI)和脾指数(SI)的影响

给 R3和 R7可以升高小鼠由于荷瘤所致的血红蛋白和胸腺指数下降($P < 0.01$), 能抑制小鼠荷瘤所致的白细胞升高($P < 0.01$), 与荷瘤组比较, 可升高脾指数($P < 0.01$)。见表13.

Tab.13 Effects of recipes on Hb,WBC,TI and SI of mice bearing Hep A

Groups	No	Hb(g%)	WBC(/ml)	TI (mg/g)	SI (mg/g)
Normal	17	14.14 ± 0.87	12407 ± 2460	2.50 ± 0.14	7.88 ± 1.01
Control	17	12.21 * *	14133 * *	1.82 * *	9.48 * *
		± 0.76	± 3171	± 0.26	± 2.16
Exposed to R3	17	13.21**	11748**	2.89**	11.44**
		± 0.69	± 2214	± 0.21	± 2.47
Exposed to R7	16	13.61**	12870**	1.98*	11.93**
		± 0.64	± 1175	± 0.42	± 2.51

t test : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. * NS compared to R3 and R7

* NS compared to Normal

三. 初步分析

在选定的研究剂量下, 铜对小鼠移植性肿瘤有明显抑制作用, 若与铁联合运用, 抑瘤作用加强。单纯微量元素铁未见显著的抑瘤效应。铜或铜与铁联合应用, 对腹水型肿瘤小鼠生存时间未见显著延长效应。人工麝香能延长荷实体肿瘤小鼠存活时间, 但对腹水型小鼠未见显著的延长效应。人工麝香具有一定的抑制实体肿瘤生长作用。

从组方筛选中发现，无论铜或铁单独配伍麝香，还是铜铁不同比例联合运用配伍麝香，均有显著抑制实体瘤生长的作用。其中铜复方R3和R7不仅能抑制实体瘤的生长，延长荷瘤小鼠的存活时间，而且能显著延长腹水型荷瘤小鼠的存活时间。重复和不同剂量研究表明，药效稳定。同时发现二方均能翻转由于小鼠荷瘤所致的血红蛋白和胸腺指数的下降和血液中白细胞的升高，且能增加实体荷瘤小鼠的脾指数。这些在肿瘤化学治疗中少见的作用，可能与铜复方既能控制局部肿瘤的生长又能对病理状态下的机体发挥调整作用有关。

第三部分 铜和铁联合中药对肿瘤作用的形态学观察

一. 实体肿瘤和腹水肿瘤细胞的大体和镜下形态观察

1. 材料和方法

实体肿瘤与腹水肿瘤模型：取生长旺盛的 HepA 肿瘤细胞，接种于 BALB/C 小鼠（雄性，体重为 18-22g）右腋后皮下或腹腔内，接种 HepA 瘤细胞量为 7×10^6 个/只，分别制成 HepA 实体肿瘤和腹水型肿瘤模型。

将 18 只接种实体肿瘤之小鼠随机分为三组，自接种之日计第三日分别灌服 NS，R3 和 R7，连续给药 21 天后剖取肿瘤称重，观察其外表并沿长轴自正中剖开，测量肿瘤的坏死面积；然后将肿瘤切片，HE 染色，光镜观察。

将 42 只接种腹水瘤之小鼠随机分为六组，于接种后次日起分别给与 NS、铜、铁、麝香、R3 和 R7，连续给药两周后取腹水涂片，将涂片于摄氏 4 度下用 Carnoy 液固定，HE 染色，光镜观察。

2. 结果

2.1 实体肿瘤的大体形态观察

给予抗肿瘤铜复方 R3 和 R7 后，与对照组相比瘤重显著下降，瘤体积小，方剂 R3 作用较方剂 R7 强，见附图 (Fig.1)。从剖面可见给方剂 R3 和 R7 后，肿瘤坏死范围所占的百分比与对照组比较明显升高，活存瘤组织百分比较对照组明显减少，即给方剂 R3 和 R7 组小鼠实体瘤的正中截面中坏死面积与截面的比值升高，测量值见下表 1。

表 1. 治疗后肿瘤重量和正中截面中坏死面积与截面积之比

组别	样本	瘤重	截面积	坏死面积	坏死面积/截面积
N S	6	6.79	4.549	0.915	0.188
		± 1.74	± 2.176	± 0.519	± 0.067
R3	6	3.10**	1.635 **	0.623	0.392 **
		± 1.56	± 1.354	± 0.587	± 0.078
R7	6	4.14**	3.169	0.888	0.252 *
		± 1.69	± 2.384	± 0.627	± 0.049

与 NS 组比较 (t 检验): * $P < 0.05$ ** $p < 0.01$

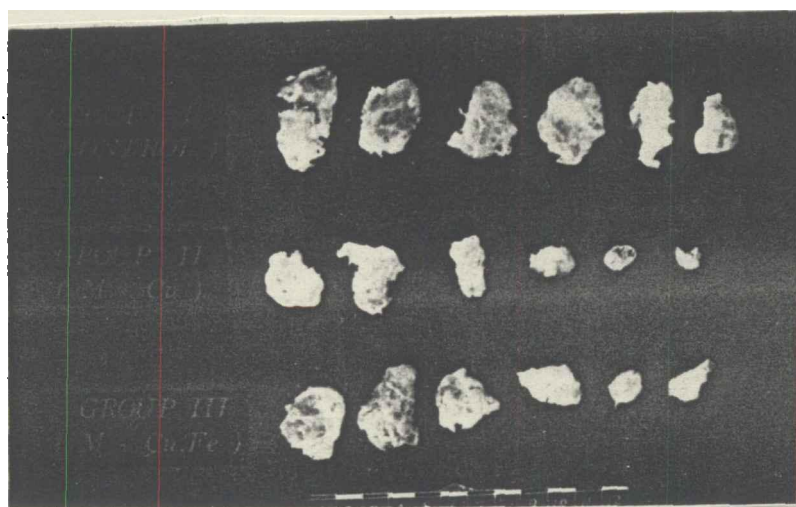


图01. 连续给予铜复方R3和R7三周对HepA实体瘤生长的影响。

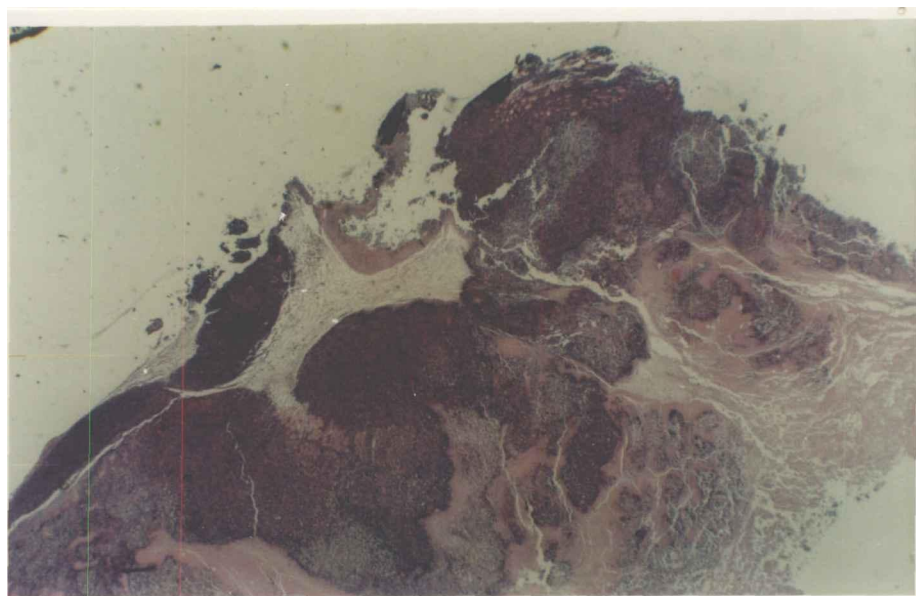


图02. NS组 H.E. 染色, $\times 3.3$
 瘤组织周边无结缔组织和炎性细胞反应性增生形成的包膜, 未见有淋巴结反应性增生。

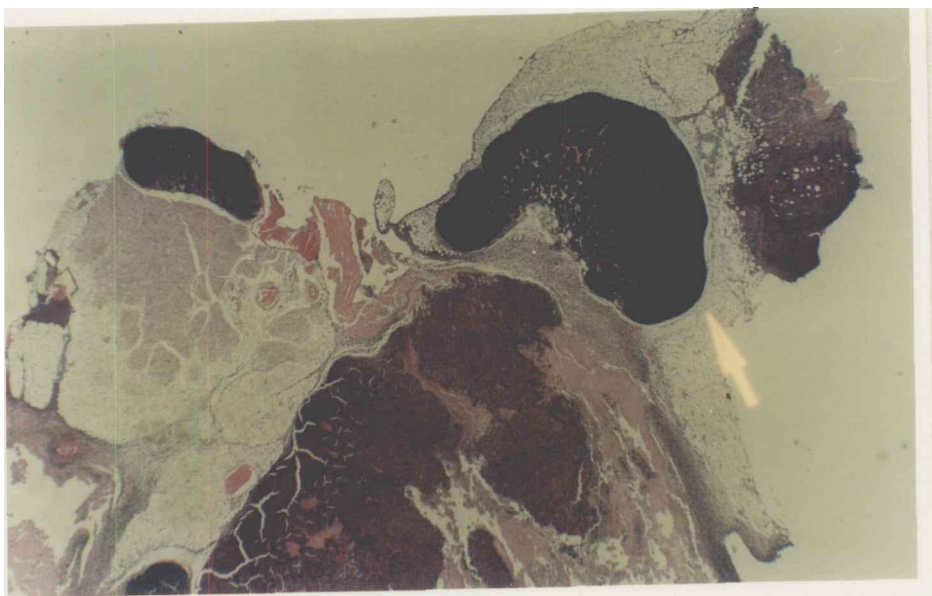


图03. R3组 H.E. 染色, ×3.3
 瘤组织周边有较厚的结缔组织和炎性细胞反应性增生形成的包膜, 周边可见淋巴结, 结内淋巴细胞增生活跃。

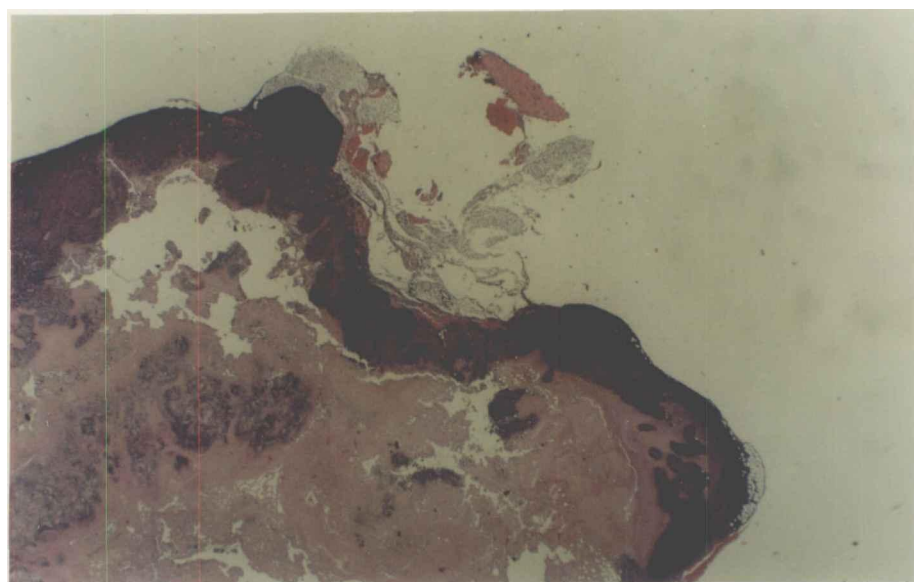


图04. R7组 H.E. 染色, ×3.3
 瘤组织周边有结缔组织和炎性细胞反应性增生形成的包膜, 周边可见反应性增生的淋巴结。

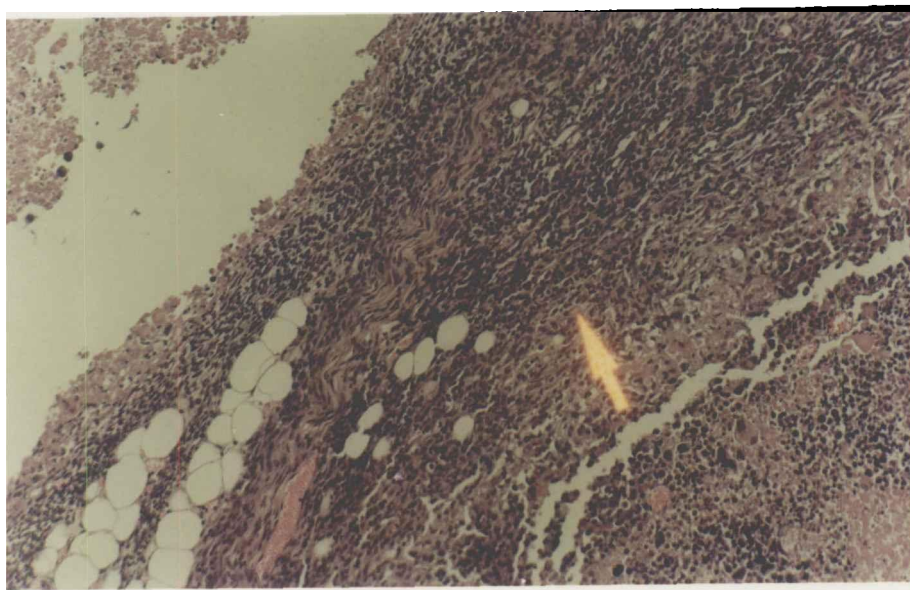


图05. R3组 H.E. 染色, $\times 3.3 \times 10$

周边瘤组织内可见大量的炎性细胞浸润, 以淋巴细胞为主; 可见成纤维细胞增生。



图06. R7组 H.E. 染色, $\times 3.3 \times 10$

周边瘤组织内可见成纤维细胞增生和淋巴细胞、中性粒细胞等在瘤组织中浸润。

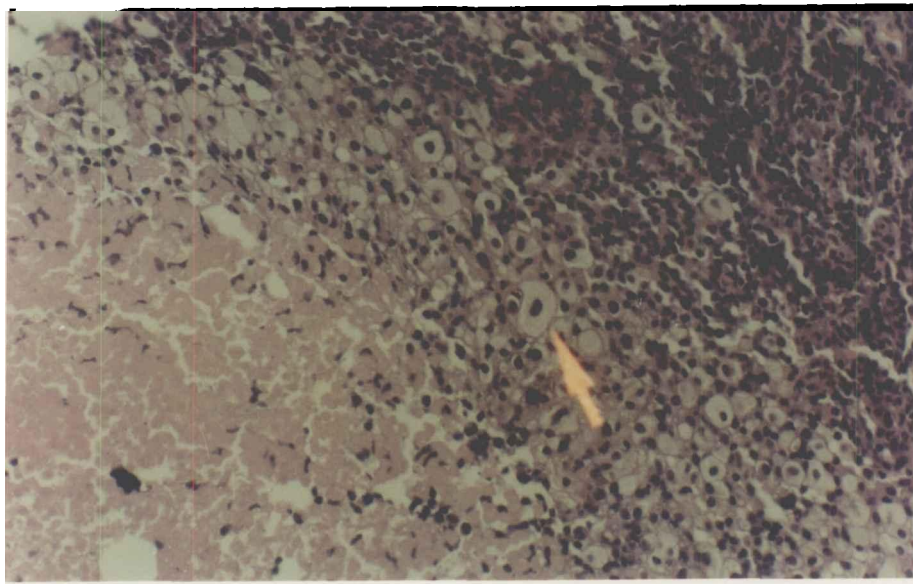


图07. R3组 H.E. 染色, $\times 3.3 \times 20$
 瘤组织内有大量的炎性细胞, 可见较多的泡沫状吞噬细胞, 成纤维细胞增生。

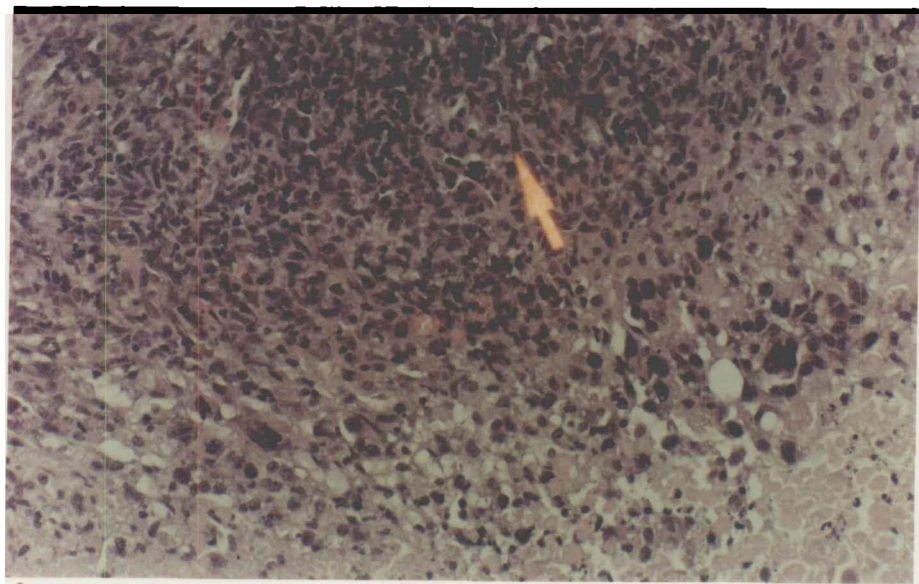


图08. R7组 H.E. 染色, $\times 3.3 \times 20$
 瘤组织内大量的炎性细胞浸润, 以中性粒细胞为主, 淋巴细胞多见。同时可见散在的成纤维细胞。

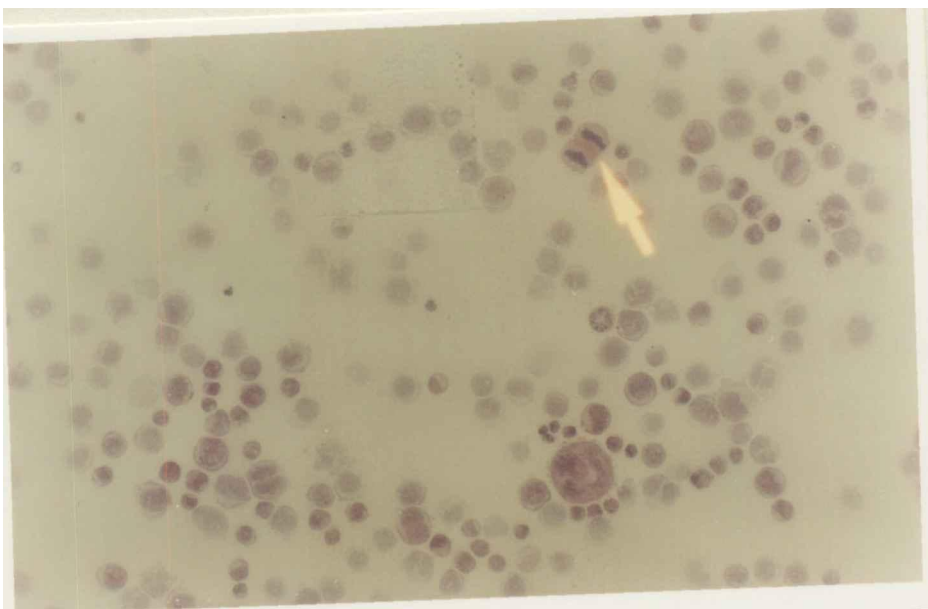


图09. NS组 H.E. 染色, $\times 3.3 \times 20$
 瘤细胞大小不均, 增殖活跃; 视野内退化瘤细胞、炎性细胞少见。

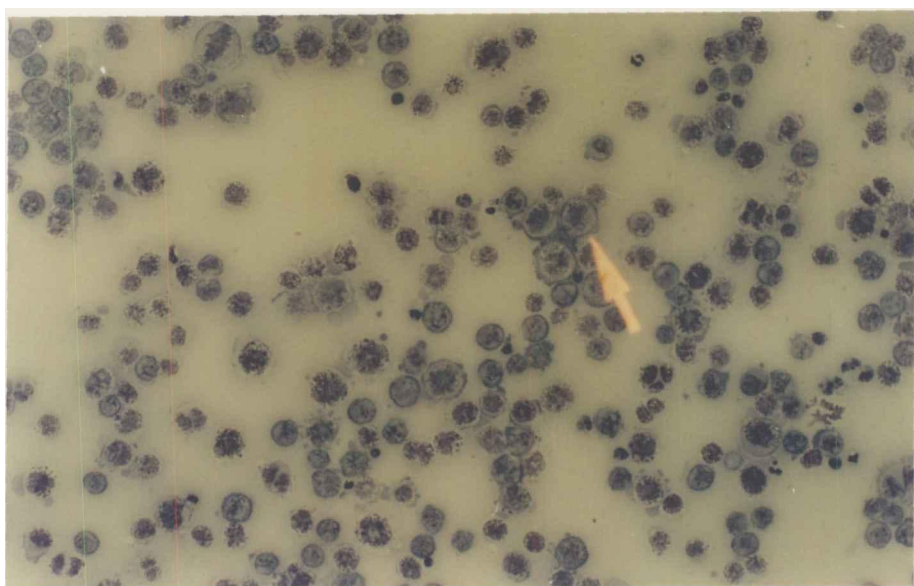


图10. Cu组 H.E. 染色, $\times 3.3 \times 20$
 视野内退化瘤细胞较多, 炎性细胞多见。

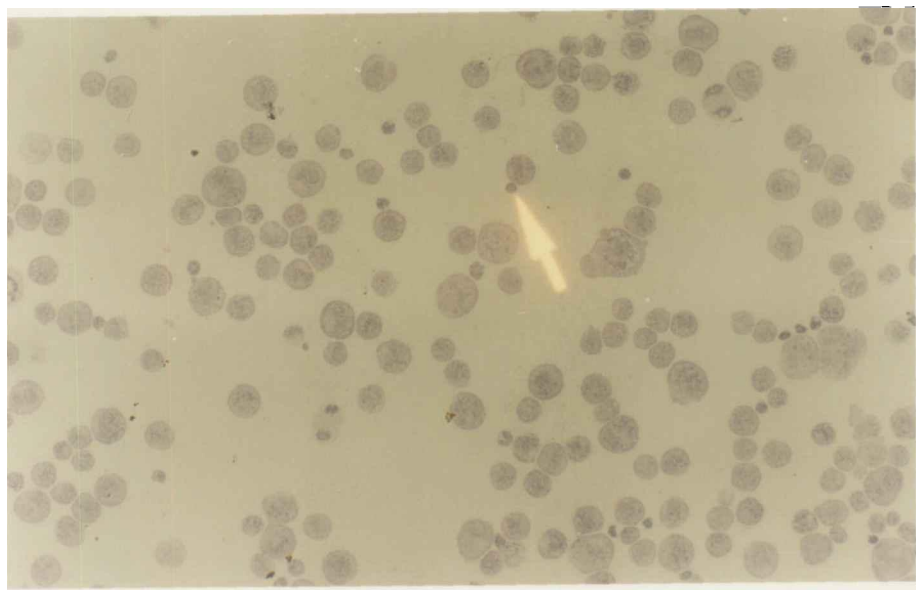


图11. Fe组 H.E. 染色, $\times 3.3 \times 20$
视野内瘤细胞有核凝结退化表现, 可见较多的炎性细胞。

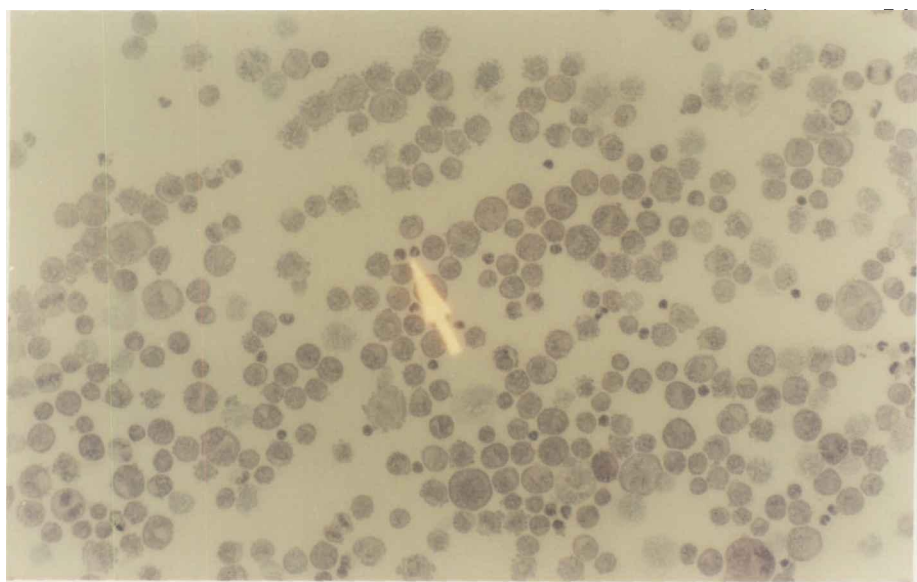


图12. M组 H.E. 染色, $\times 3.3 \times 20$
视野内瘤细胞有退化表现, 可见炎性细胞。

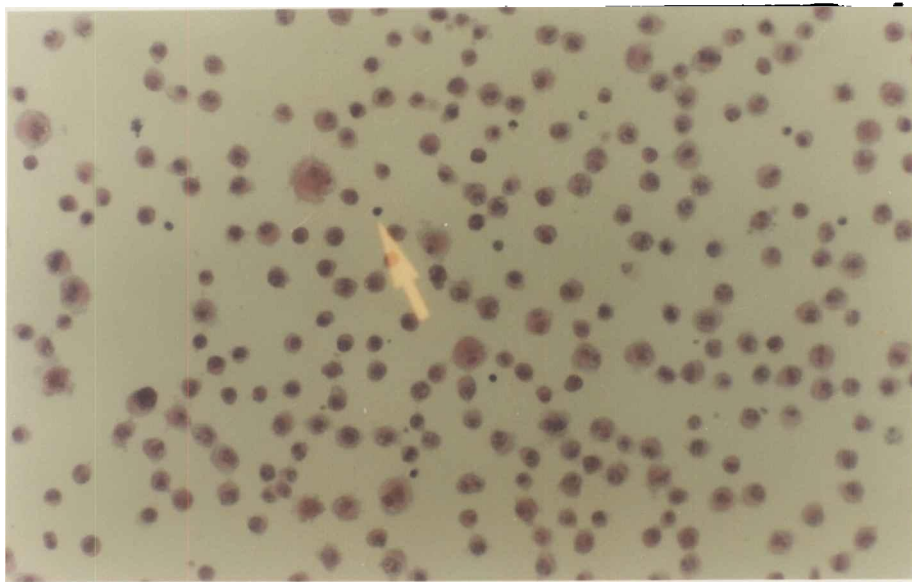


图13. R3组 H.E. 染色, $\times 3.3 \times 20$
视野内瘤细胞有核凝结退化表现, 可见炎性细胞。

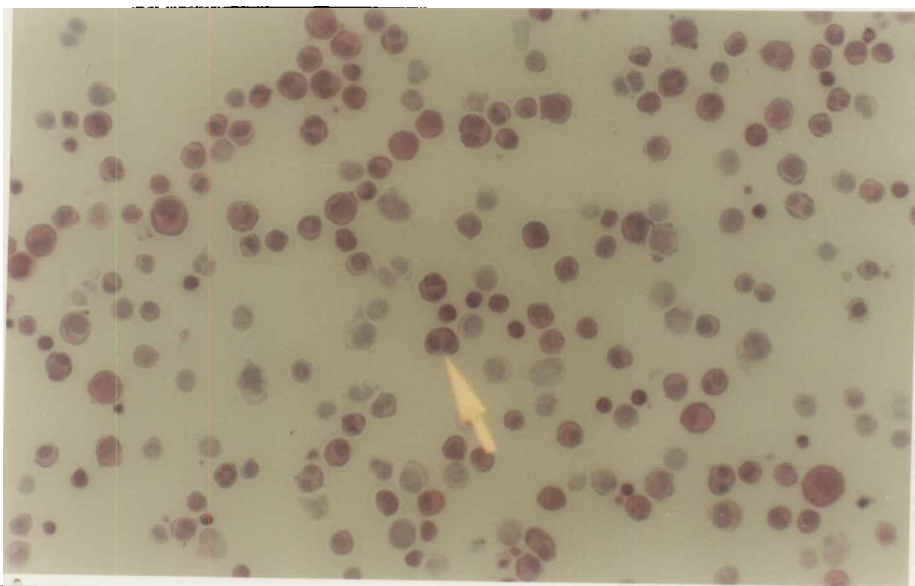


图14. R7组 H.E. 染色, $\times 3.3 \times 20$
视野内瘤细胞有核凝结退化表现, 可见炎性细胞。

2.2 对实体肿瘤的镜下形态观察

给与铜复方后肿瘤周围结缔组织增多,成纤维细胞增生活跃,在肿瘤周围形成较完整的包膜,在肿瘤周边可见明显的炎性细胞浸润。R3之浸润带较R7厚,其中R3以淋巴细胞为主,可见较多的浆细胞;R7以中性粒细胞为主。二者均可见炎细胞包绕肿瘤细胞,被包绕之瘤细胞呈退化或坏死的表现。给铜复方后,周边的瘤细胞增殖带显著减少,以给R3组更明显。各组肿瘤组织内均可见片状坏死的瘤组织。此外,R3组肿瘤周围有淋巴结的反应性增生。见下表2和附图2 - 8。

表 2. 铜复方对实体肿瘤组织形态的影响

组别	样本	包膜	成纤维增生度	炎细胞浸润度	炎细胞种类	健存的瘤细胞
N S	6	1.0 ± 1.0	1.0 ± 1.0	3.0 ± 1.0	中性粒	3.5 ± 1.5
R3	6	$6.0 \pm 1.0^{**}$	$6.0 \pm 1.0^{**}$	$7.0 \pm 1.0^{**}$	淋巴为主	$0.5 \pm 0.5^{**}$
R7	6	$3.5 \pm 1.5^*$	$3.0 \pm 1.0^{**}$	$5.0 \pm 1.0^*$	中性粒为主	$2.0 \pm 1.0^*$

对比限法: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

分级及评分标准:

以分布范围将包膜分级:

+>0, <25%; ++>25%, <50%; +++>50%, <75%; ++++>75% ;

成纤维增生度:

- 缺乏; + 增生不明显; ++ 范围广但轻微; +++ 范围广而明显;

炎细胞浸润度:

- 缺乏; + 不明显; ++ 范围广但轻微; +++ 范围广而明显;

以其占增殖带的比重将健存的瘤细胞分级:

+>0, <1/4; ++>1/4, <3/4; +++>3/4;

评分: -: 0; +: 2; ++: 4; +++: 6; ++++: 8.

2.3 腹水型肿瘤细胞的镜下观察

取各组腹水涂片,随机选择视野,高倍镜下计数100个细胞,求每组退化瘤细胞、中性白细胞和淋巴细胞的百分比,并观察各组瘤细胞的形态。结果表明:给生理盐水对照组之瘤细胞大小不均,分裂活跃,胞核

大,核浆比例严重失调,瘤巨细胞较多。计数的视野内退化的瘤细胞、中性白细胞和淋巴细胞极少见;单独给铜或铁后,与对照组比较可见到较多退化的瘤细胞和淋巴细胞或中性白细胞,视野内可见到瘤细胞核固缩,染色质凝积等退化表现,以给铁组为明显。单给麝香后瘤细胞大小不均,分裂活跃,瘤巨细胞多见,视野内退化瘤细胞、中性粒和淋巴细胞较对照组显著增多;在给铜复方后,瘤细胞形态较对照组规整,胞浆较丰富,核多居中,视野内双核瘤细胞增多,瘤巨细胞少见。其中给R3后退化细胞显著增多($p<0.01$),可见到大量的炎性细胞,以小淋巴细胞和浆细胞为主,退化瘤细胞较规整,胞浆较丰富,核固缩或凝积,在核周可见到明显的空晕等表现。给R7后退化的瘤细胞增多($p<0.01$),视野内可见到大量渗出的炎细胞,以中性粒细胞为主并有少量的淋巴细胞,可见瘤细胞核周的空晕较给R3组更明显,瘤细胞核染色质呈凝积状,视野内少见瘤巨细胞。见下表3和附图9-14。

表 3. 铜复方R3、R7及其组成成分对腹水型肿瘤细胞的影响

组 别	n	细胞形态特点	退化细胞(%)	中性白细胞(%)	淋巴细胞(%)
N S	6	多样,分裂活跃	< 1	< 1	1.5 ± 2.0
Fe	6	多样,分裂活跃	$4.5 \pm 2.5^{**}$	$4.0 \pm 1.0^{**}$	2.0 ± 2.5
Cu	6	多样,分裂活跃	$3.0 \pm 1.0^{**}$	1.0 ± 2.0	$3.0 \pm 1.5^{**}$
M	6	多样,分裂活跃	$15.0 \pm 5.0^{**}$	$7.5 \pm 3.0^{**}$	$7.0 \pm 3.0^{**}$
R3	6	较一致,双核多见	$20.0 \pm 12.0^{**} \#\#$	$5.0 \pm 2.0^{**} \#\#$	$10.0 \pm 5.0^{**} \#\#$
R7	6	较一致,双核较多	$10.0 \pm 5.0^{**} \#$	$20.0 \pm 5.0^{**} \#\#$	$6.5 \pm 3.5^{**}$

对比限法: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ * 与NS组相比 Cu相比

二. 腹水中瘤细胞超微结构的观察

1. 材料和方法

BALB/C雄性小鼠,腹水型HepA模型,接种HepA瘤细胞量为 7×10^6 /只,随机分组,分别给与铜、铁、麝香、R3和R5,连续给药14天,取腹水,用2.5%预冷的戊二醛缓冲液预固定后,按文献制作标本^[31],电镜观察。

2. 结果

2.1. 扫描电镜观察

生理盐水组瘤细胞表面有整齐的微绒毛均匀覆盖,微绒毛呈细小杆

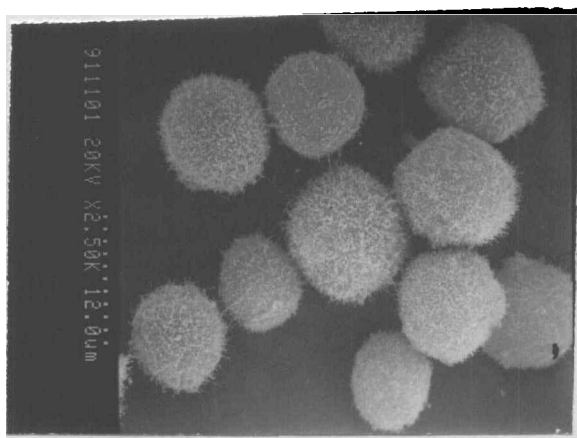


图15. NS组 SEM $\times 2500$
小鼠给NS后腹水瘤细胞表面超微结构特点



图16. Fe组 SEM $\times 2000$
小鼠给Fe后腹水瘤细胞表面超微结构特点

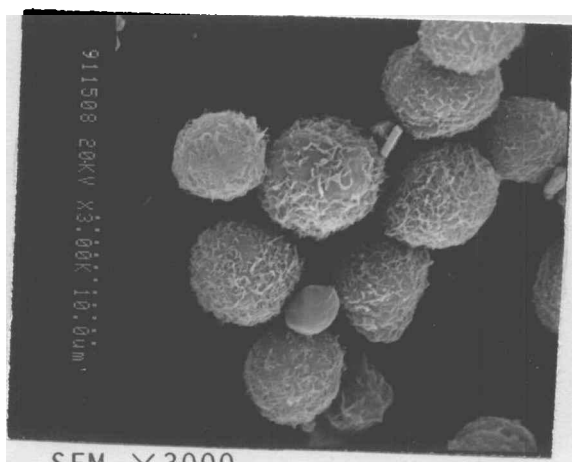


图17. Cu组 SEM $\times 3000$
小鼠给Cu后腹水瘤细胞表面超微结构特点

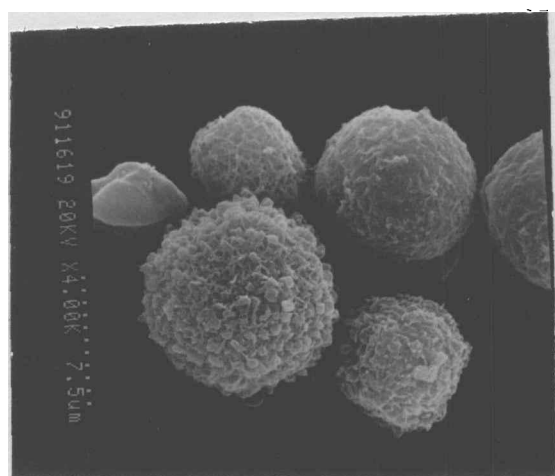


图18. M组 SEM ×4000
小鼠给M后腹水瘤细胞表面超微结构特点

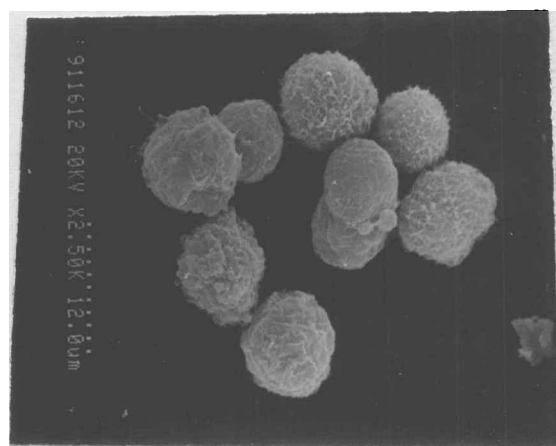


图19. R3组 SEM ×2500
小鼠给R3后腹水瘤细胞表面超微结构特点

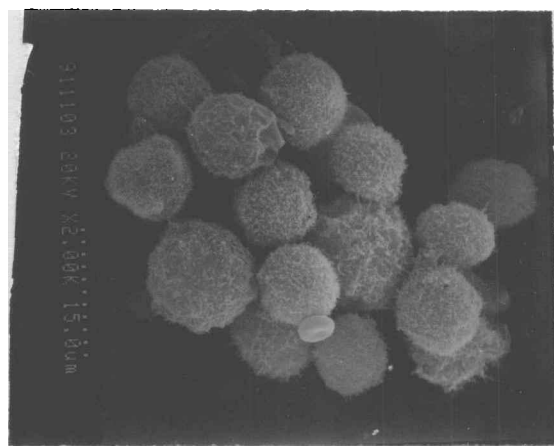


图20. R7组
小鼠给R7后腹水瘤细胞表面超微结构特点

状独立存在。单独给与铜, 铁或麝香治疗之小鼠, 对肿瘤细胞表面绒毛形态和结构均有显著的影响, 表现为肿瘤细胞表面微绒毛倒伏, 减少甚至消失, 可见小泡状突起, 等瘤细胞表面异常结构, 作用依次为: 铜> 铁> 麝香。单独给铜后, 肿瘤细胞表面绒毛显著减少, 多数完全消失并可见瘤细胞表面明显的异常, 呈凸凹不平状; 单独给铁治疗后, 瘤细胞表面微绒毛变短, 倒伏, 排列紊乱并显著减少, 偶可见绒毛完全消失之肿瘤细胞; 单独给麝香后, 瘤细胞微绒毛亦显著减少, 排列紊乱, 有绒毛融合现象, 部分瘤细胞表面出现大量的小泡状突起, 完全失去正常瘤细胞表面微绒毛特有的形态和结构。见附图15-18。

给R3和R7后, 肿瘤细胞表面形态和结构均有显著的变化, 尤以给R3为甚。给R3后, 腹水中瘤细胞表面绒毛明显减少, 排列紊乱, 部分瘤细胞绒毛相互融合并出现小泡状突起, 在微绒毛完全消失的瘤细胞, 胞膜凹凸不平, 呈皱缩状; 给R7后, 瘤细胞表面微绒毛呈倒伏状, 排列紊乱, 部分瘤细胞绒毛全部消失, 胞膜裸露, 呈皱缩状。见附图19-20。

2.2. 透射电镜观察

给生理盐水之瘤细胞, 可见膜完整, 微绒毛排列有序而致密, 胞浆中细胞器丰富, 线粒体大小不等, 数量较多, 以球形为主, 同时可见线粒体有肿胀和轻度的空泡变。胞浆中还可见到包涵体, 散在的空泡、溶酶体、内质网和高尔基氏体, 核糖体散在而多, 瘤细胞核较大, 核形不规则, 有凹陷, 核膜较清晰, 异染色质较多, 可见核仁。见附图21。

给铜组之瘤细胞, 与对照组比较, 外形不规整, 部分胞膜表面凹凸呈锯齿状或小丘状突起, 绒毛极少。胞浆中细胞器较少, 可见胞浆内陷形成胞浆内泡状包涵物, 可见大小较一致的线粒体, 线粒体内有程度较重的空泡变, 高尔基氏体较丰富且发育较完善, 胞浆中可见散在的核糖体, 细胞器多集中分布在核周围, 瘤细胞核较大, 核膜清晰, 核形不规整, 可见浓集的核质, 异染色质较少, 核仁数目较少。见附图22。

给铁组, 瘤细胞胞膜完整, 与对照组比较绒毛不发达且排列乱。胞浆中细胞器少, 线粒体数量较少, 以球形为主, 内质网多呈泡状, 高尔基氏体少见, 胞浆中可见溶酶体和散在的核糖体, 细胞器多集中分布在核周围, 瘤细胞内可见数个核, 核不规整。见附图23。

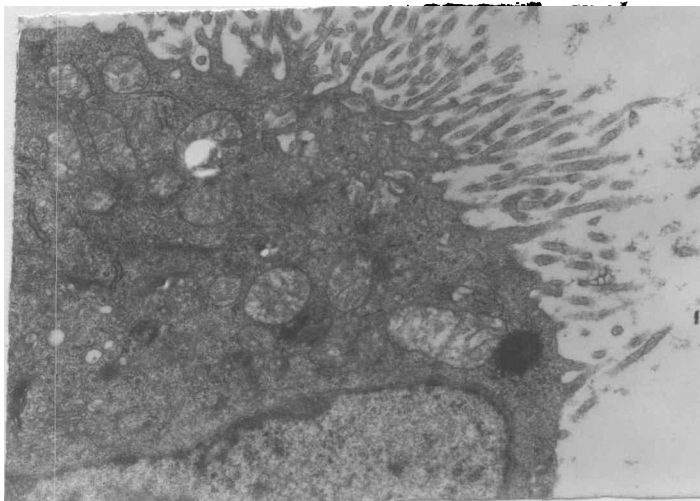


图21. NS组 TEM $\times 10000$

小鼠给NS后腹水瘤细胞的超微结构特点

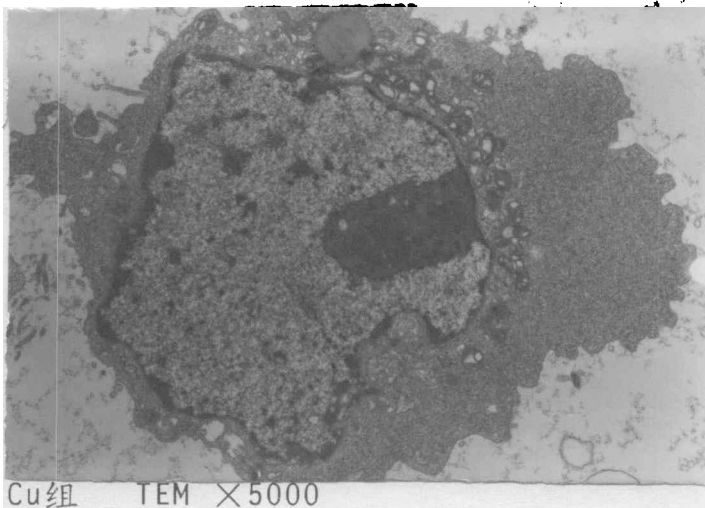


图22. Cu组 TEM $\times 5000$

小鼠给Cu后腹水瘤细胞的超微结构特点

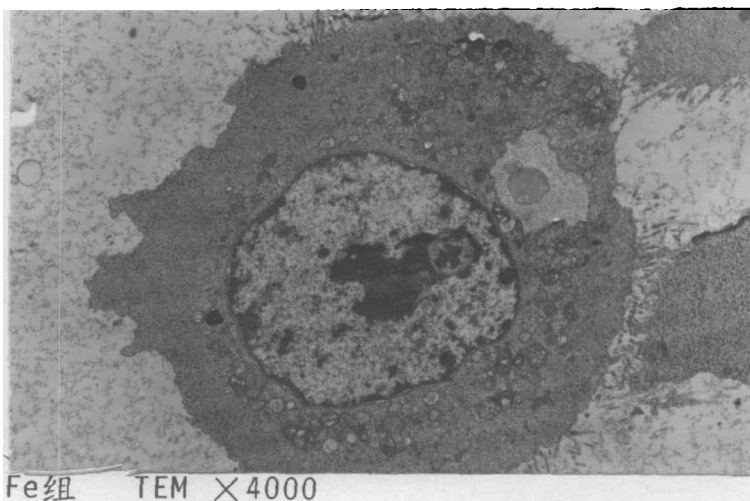


图23. Fe组 TEM $\times 4000$

小鼠给Fe后腹水瘤细胞的超微结构特点

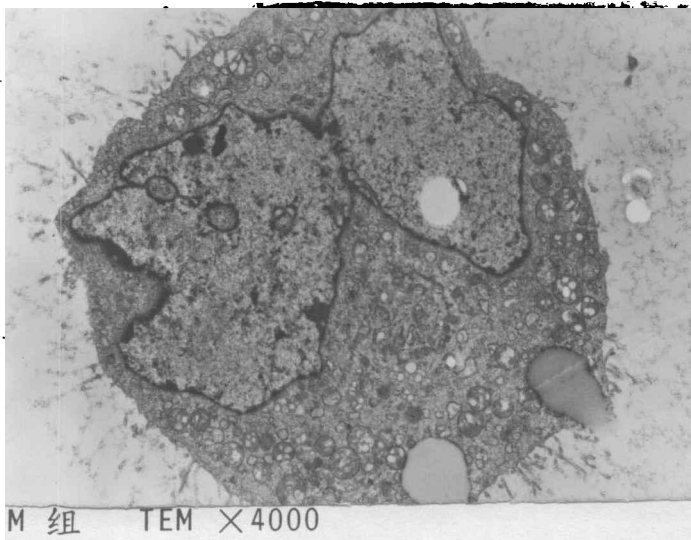


图24. M组 TEM $\times 4000$
小鼠给M后腹水瘤细胞的超微结构特点

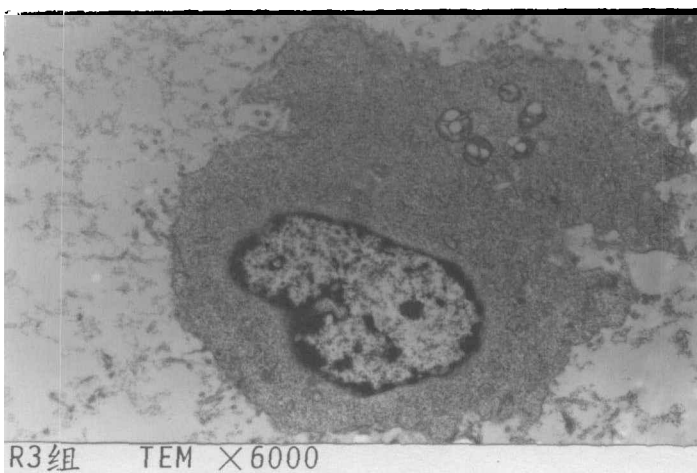


图25. R3组 TEM $\times 6000$
小鼠给R3后腹水瘤细胞的超微结构特点

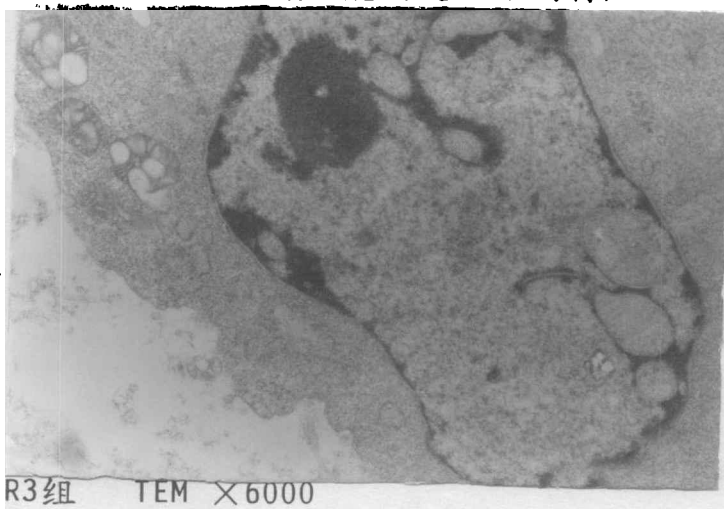


图26. R3组 TEM $\times 6000$
腹水瘤细胞核仁数较少,核膜内陷形成核内胞浆包涵体。

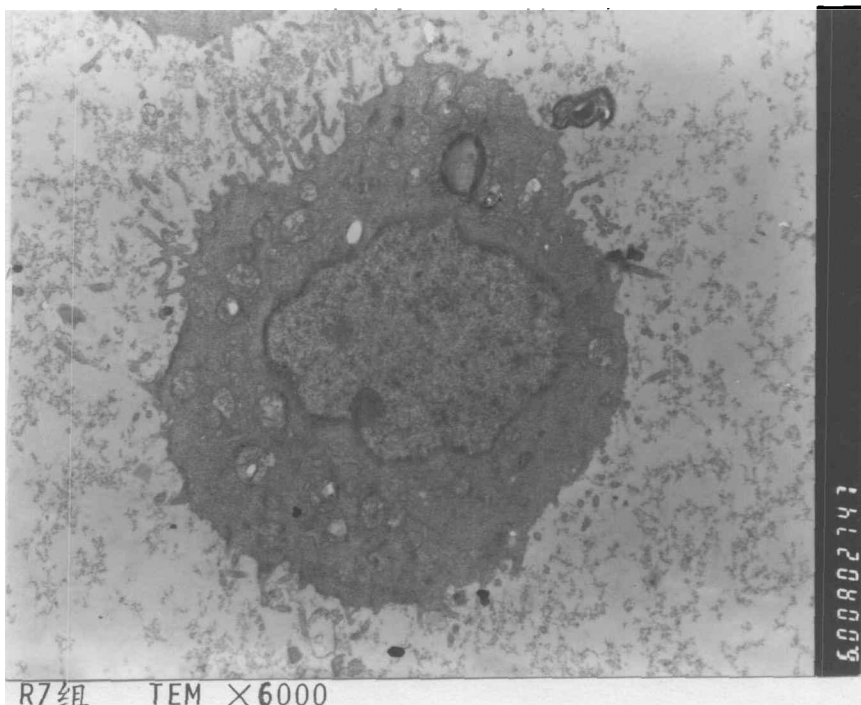


图27. R7组 TEM $\times 6000$
小鼠给R7后腹水瘤细胞的超微结构特点

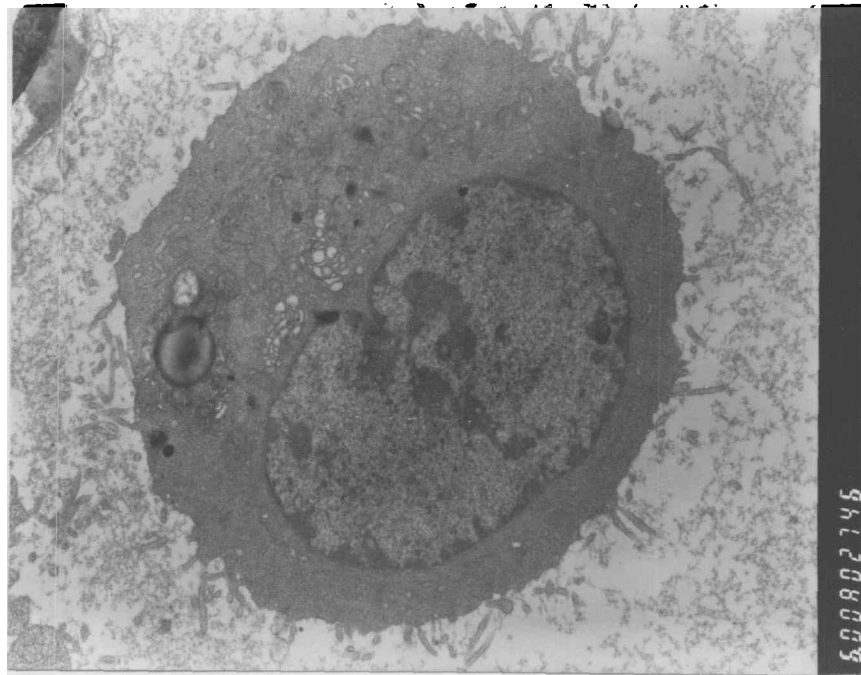


图28. R7组 TEM $\times 6000$
小鼠给R7后腹水瘤细胞的超微结构特点

核周围，瘤细胞内可见数个核，核不规整。见附图21。

给麝香后，与对照组相比，瘤细胞绒毛排列不规整，胞浆中细胞器丰富，线粒体多呈球状，肿胀较轻，嵴较清晰，胞浆中内质网和高尔基氏体发育不良，可见溶酶体，有较多呈小泡状的内质网。双核瘤细胞较多，核不规整，染色质和核仁数目较少，核膜明显内陷，在核区内形成包涵体。见附图 24。

给铜复方R3后，与对照组相比，可见胞膜不完整，绒毛完全消失，胞浆丰富，线粒体较多，核位于中心，染色质少，趋于退化的瘤细胞。多数瘤细胞胞膜完整，与对照组相比绒毛明显减少，胞浆丰富，细胞器少，线粒体成泡状，内质网和溶酶体少见，瘤细胞核较小，位置近中，异染色质和核仁数较少，显著的特点为核膜内陷，在切面可核内有胞浆的包含物。见附图 25-26。

给铜复方R7后，与对照组相比瘤细胞表面绒毛少而排列乱，胞浆丰富，细胞器较少，线粒体大小较一致，呈球形和杆状，嵴较清晰，肿胀较轻，其内空泡变较少。胞浆中空泡少见，部分瘤细胞高尔基氏体发育较好，内质网丰富，瘤细胞异染色质少，核仁数目较少，亦可见核膜内陷。见附图 27-28。

三. 初步分析

形态学观察表明，铜复方R3和R7均具有显著的抗肿瘤作用。对腹水型肿瘤细胞的作用表明，单纯铜、铁或麝香虽然对瘤细胞的形态有影响，但作用不够明显，组方后作用显著加强。对实体瘤有显著的抑制作用，使健存瘤组织比例明显减少，坏死面积百分比增加。肿瘤的包膜较对照组完整且厚度增加，瘤组织周边炎性细胞反应明显，肿瘤组织外周可见反应性增生的淋巴结；在腹水型肿瘤小鼠体，给铜复方治疗后，腹腔渗出的炎性细胞增多，瘤细胞胞浆丰富，核分裂象不活跃，较多的瘤细胞有核周空晕，胞核有凝结等退化现象。上述作用R3强于R7；电镜观察表明，单纯铜，铁或麝香对肿瘤细胞的超微结构均有显著的影响，铜铁的作用表现为对肿瘤细胞的直接损害，以铜为强。而铜对瘤细胞的影响以表面绒毛最为显著，麝香不仅使表面形成大量的小泡状突起，还可使核

膜内陷，可形成核内包涵体，胞浆结构深入核内，使核内部与胞浆的接触面积增大，可能使瘤细胞更易受药物的影响。铜复方R3和R7对肿瘤细胞作用表现为使瘤细胞表面固有微绒毛受到明显影响，如减少和排列紊乱。胞浆中细胞器和核形态结构呈现特殊的铜、铁与麝香复合作用的改变，为铜复方调控肿瘤的结构基础。这一结果体现了复方在抗肿瘤过程中的协同性和互补性，其多模式作用是铜复方中西医结合治疗肿瘤的一大优势。

第四部分 铜和铁联合中药对腹水型肿瘤细胞DNA及周期的影响

一. 肿瘤细胞DNA含量的MPV3分析

1. 材料和方法

BALB/C小鼠, 雄性, 体重为18-22g, 腹腔接种HepA 7×10^6 /只, 连续给药14天, 取腹水肿瘤细胞涂片, Carnoy 液固定, Hoechst 33258 荧光染色, 用 MPV3(OPTOM Co.)细胞光度荧光显微镜计量瘤细胞DNA荧光染色强度, 每个标本计数50个肿瘤细胞, 然后求其平均值, 测得瘤细胞DNA的相对含量^[32]。

2. 结果

2.1. 各组对肿瘤细胞DNA含量的影响

给与铜, 铁或麝香后, 瘤细胞 DNA的含量均有不同程度的升高, 以单独给铜后DNA升高最明显, 与对照组相比, 有显著性差异 ($P < 0.05$)。见下表。

方剂中单一成分对瘤细胞DNA荧光强度影响

组 别	样本数	DNA荧光强度
N S	3	989.6 ± 226.0
Cu	4	1352.4 ± 19.0 *
Fe	3	1171.8 ± 208.4
M	5	1141.1 ± 252.0

t检验: * $P < 0.05$ ** $p < 0.01$ * 与NS组比较

2.2. 铜复方对肿瘤细胞DNA含量的影响

给与方剂R3或R7后, 瘤细胞中DNA的荧光强度增加, 其中方剂 R3对瘤细胞 DNA荧光强度的影响具有显著意义 ($p < 0.05$)。见下表。

方剂对瘤细胞中DNA荧光强度的影响

组 别	样本数	DNA荧光强度
NS	3	989.6 ± 226.0
R3	4	1317.0 ± 90.3 *
R7	4	1167.5 ± 70.9

t检验: * $P < 0.05$ ** $p < 0.01$ * 与NS组比较

二. 肿瘤细胞周期的FCM分析

1. 材料和方法

BALB/C小鼠, 雄性, 体重为18-22g, 腹腔接种瘤细胞 7×10^6 /只, 随机区三组, 分别给与生理盐水、R3和R7连续14天, 取腹水0.5ml (约含瘤细胞 1×10^6), PBS 1000Gx10min洗三次, 然后用预冷到4度的75%酒精5ml固定, 按文献的方法荧光染色^[33], 待测瘤细胞悬液然过200目尼龙网后, 在FACS420型FCM上 ($\lambda = 540\text{nm}$) 测定, 得到细胞周期分布的组方图及细胞在G1、S、G2M各期所占的百分比。

2. 结果

2.1 铜配伍麝香对细胞周期的影响

给方剂R3治疗后腹水瘤细胞的二维点图如下图, 由图可见经方剂R3治疗后的腹水肿瘤细胞与对照组比较引起早中期的下降和晚期的积累。分析结果表明, 周期中 G1期和 S期细胞减少且 G1期具有统计学意义 ($P < 0.01$), G2M期极显著增加 ($P < 0.01$)。见下表。

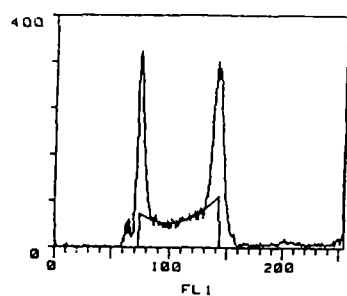
方剂R3对腹水型HepA肿瘤细胞周期的影响

组 别	样本	细胞周期(%)		
		G1	S	G2M
N S	7	23.7 ± 8.6	38.3 ± 7.0	39.7 ± 7.7
R3	7	$12.4 \pm 3.1^{**}$	34.6 ± 4.7	$53.0 \pm 5.5^{**}$

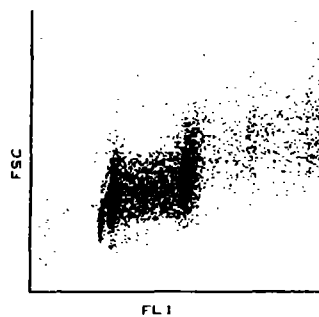
t检验: * $P < 0.05$ ** $p < 0.01$

2.2 铜和铁配伍麝香对细胞周期的影响

给方剂R7治疗后腹水瘤细胞的二维点图如下图, 由图可见经方剂R7治疗后的腹水肿瘤细胞与对照组比较引起早中期的下降和晚期的积累。分析结果表明, G1期和S期细胞减少明显 (分别为 $P < 0.01$, $P < 0.05$), G2M 期细胞极显著增加 ($P < 0.01$)。见下表及附图1-3。

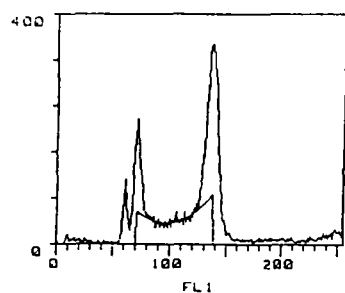


DNA 组方图

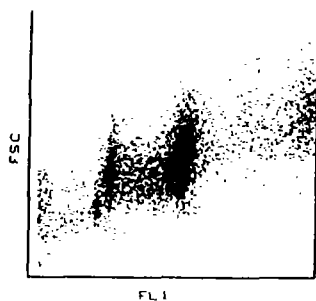


DNA 散点图

图1. NS 组瘤细胞

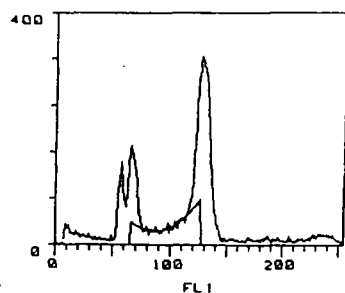


DNA 组方图

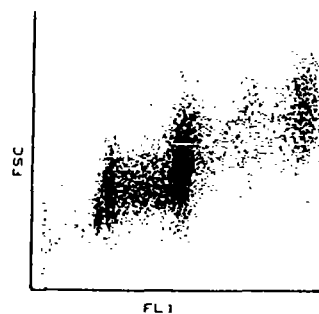


DNA 散点图

图2. R3 组瘤细胞



DNA 组方图



DNA 散点图

图3. R7 组瘤细胞

方剂R7对腹水型HepA肿瘤细胞周期的影响

组 别	样本	细胞周期(%)		
		G1	S	G2M
N S	7	23.7 ± 8.6	38.3 ± 7.0	39.7 ± 7.7
R7	7	14.8 ± 3.5**	31.4 ± 4.1*	53.6 ± 5.4 ***
t检验: * P<0.05 ** p<0.01				

三. 初步分析

瘤细胞 DNA含量测定表明, 铜复方 R3和 R7可增加瘤细胞中 DNA的含量, 其中R3对瘤细胞 DNA含量的增加具有统计学意义($p<0.05$)。铜复方R3和R7对肿瘤细胞增殖的控制可能与此有关。铜复方中各成分对瘤细胞DNA含量的作用表明, 单纯的铜、铁或麝香都可使瘤细胞中的DNA含量增加, 作用以铜为显著, 具有统计学差异($p<0.05$)。铜复方R3对DNA含量的影响与铜相似, 具有显著的增加 DNA含量的作用, 而R7、铁和麝香在对瘤细胞 DNA含量的影响, 作用均不显著, 由此可见, 铁与麝香均无较强的协同铜升高瘤细胞中DNA含量的作用, 瘤细胞中DNA含量的变化主要与铜的作用相关, 而铜复方R3和R7对瘤细胞的作用可能与其对瘤细胞中DNA 含量的增加相联系。

肿瘤细胞周期分析研究表明, 铜复方 R3和R7能使瘤细胞G1期, S期细胞减少, 其中R3对G1期减少显著 ($p<0.05$), R7使G1和S期均显著的减少($p<0.05$, $p<0.01$)。R3和R7均使 G2M期之瘤细胞显著增加($p<0.01$), 证明铜复方可影响 DNA的正常代谢, 使瘤细胞增殖分裂停滞在 DNA合成后期。

第五部分 铜及相关金属微量元素分布的变化与铜复方 治疗实验性肿瘤的联系

一. 铜复方对腹水性肿瘤细胞及腹水中铜的影响

1. 材料和方法

BALB/C小鼠, 雄性, 体重为18-22g. 腹腔接种HepA瘤细胞 7×10^6 个/只, 随机分组后分别给与微量元素铜、铁、麝香和不同组方, 连续14天, 取腹水及肿瘤细胞, 定容或计数后用分析纯硝酸和双氧水完全消化后再定容, 按常规用原子吸收光谱仪, 火焰法测定铜的含量。

2. 结果

2.1 铜复方中各组分对腹水及瘤细胞中铜含量的影响

给铜、铁或麝香后, 腹水中铜含量均有一定的增加, 作用强度为铁>麝香>铜, 且给铁可显著升高腹水中铜的浓度 ($p < 0.01$)。能增加瘤细胞中铜的含量, 作用程度依次为铜>铁>麝香, 且给铜能显著增加瘤细胞内铜的含量。如下表1。

表1. 铜、铁与麝香对腹水及瘤细胞中铜含量的影响

组别	样本数	腹水中铜含量 (ug/ml)	瘤细胞中铜含量 (ug/10 ⁷)
N S	5	0.4871 ± 0.0078	0.03453 ± 0.01239
Fe	5	0.6280 ± 0.0841**	0.06221 ± 0.03792
Cu	5	0.4964 ± 0.0400	0.13518 ± 0.06143**
M	5	0.5379 ± 0.1648	0.04288 ± 0.01716

组间t检验: * $P < 0.05$ ** $p < 0.01$ * 与NS组比较

2.2 铜复方对腹水及瘤细胞中铜含量的影响

组方对腹水及瘤细胞中铜的含量均有影响, 方剂R3能使瘤细胞内铜含量显著增加; 方剂7能使腹水中铜含量降低, 而使瘤细胞内的铜升高, 与对照组比较, 均有显著的统计学差异 ($p < 0.05$, $p < 0.01$)。见下表2。

表2. 组方对腹水及瘤细胞中铜含量的影响

组 别	样本数	腹水中铜含量 (ug/ml)	瘤细胞中铜含量 (ug/10 ⁷)
N S	5	0.4871 ± 0.0078	0.03453 ± 0.01239
R3	5	0.4980 ± 0.0443	0.21758 ± 0.13197**
R7	5	0.4485 ± 0.0358*	0.13968 ± 0.02609**

组间t检验: * P<0.05 ** p<0.01 * 与NS组比较

二. 铜复方对荷实体瘤小鼠体内铜和铁及其它金属微量元素分布的影响

1. 材料和方法

肿瘤模型: 选用实体瘤模型, BALB/C雄性小鼠, 体重20-22g, 右腋后皮下接种HepA 瘤细胞 7×10^6 个/小鼠。于接种后第三日开始灌服方剂治疗, 连续给药20天, 第21日脱颈椎处死小鼠; 取材供分析测试。取材时操作在防尘的条件下进行, 所用器具全部采用中性洗涤剂清洗或稀盐酸浸泡后反复用高纯水冲洗处理, 干燥备用, 处理时防止金属元素的沾污。用高纯水配制5%葡萄糖(分析纯)溶液供漂洗组织残余血液, 分别用不锈钢剪刀剪取小鼠的毛和剖取脑, 用硬质塑料刀剖取心、肾、脾及大致等量的肺、肝、肌肉、股骨和肿瘤组织并称重。

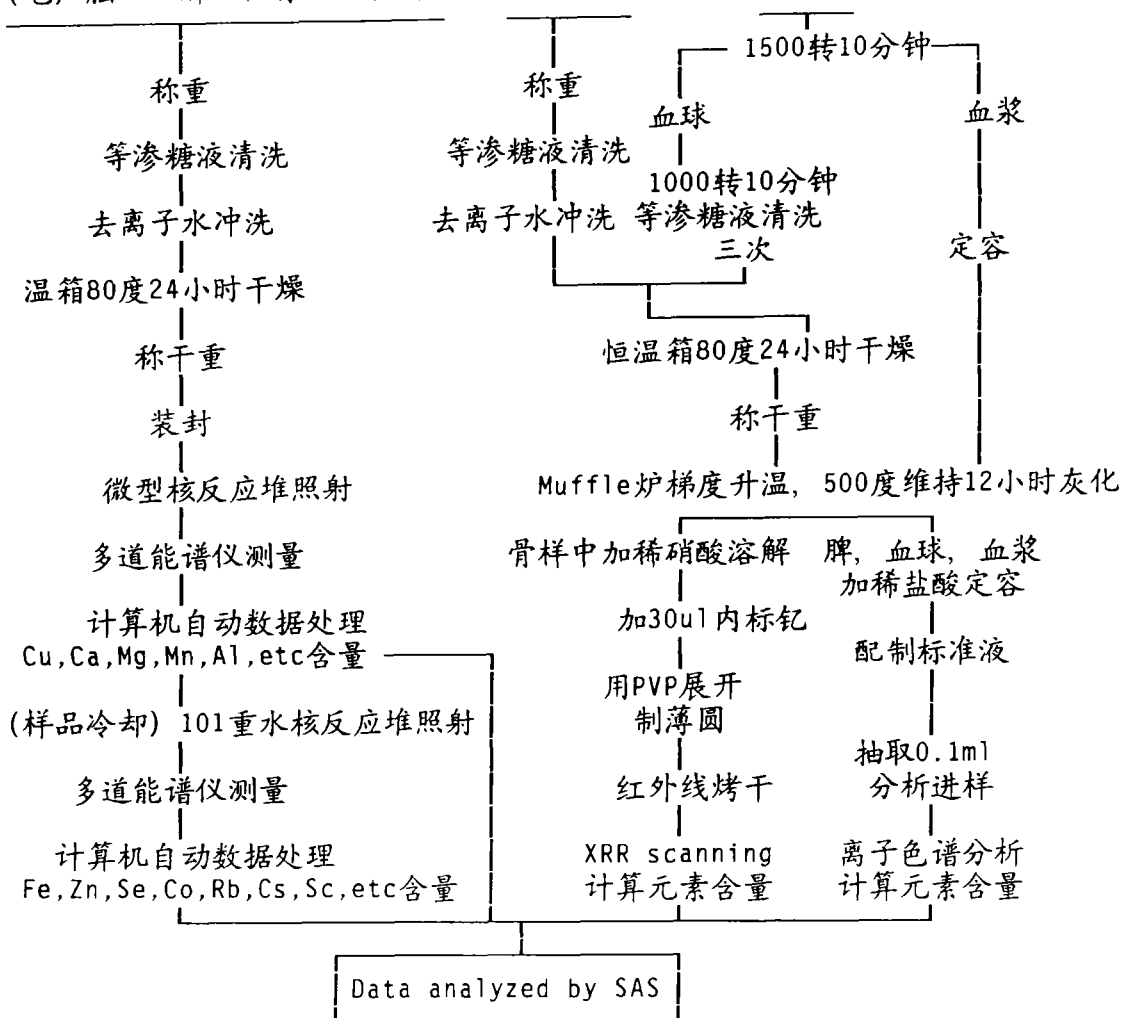
取鼠毛后先用中性洗涤剂清洗后丙酮漂洗三次, 再用去离子水反复冲洗。置备用的小培养皿内供进一步处理; 剖取的脑、心、肺、肝、肾、肌肉、脾和股骨先用5%的糖溶液将残血漂洗, 再用去离子水冲洗后置备用的培养皿内; 剖取肿瘤组织, 分离周边正常瘤组织和中心部分的组织置培养皿内; 摘眼球取血并1000转10分钟分离血浆与血球, 血球用等渗糖溶液1000转10分钟洗三次, 除血浆外, 其它样品在80度烘烤24小时, 称干重后用纯聚乙稀薄膜包扎, 干热密封待测。

样品制备及测量示意图:

(毛) 脑 心 肺 肝 肾 肌肉 肿瘤

股骨 脾

全血



主要仪器设备及试剂:

1. 中子活化法: MNRS核反应堆, 101重水核反应堆, 辐射探头, 前置放大器, 主放大器, 高压电源, 低压电源, ORTAC多道能谱分析仪, 在线微型计算机, 多功能能谱自动分析程序软件包; NBS, IAEA生物标准物质: 胎牛肝, 肌肉, 人发; 分析纯化学标准物质: 铜盐, 镁盐, 铝盐。
2. 离子色谱法: 美国Dionex series 4000 型离子色谱仪; 保护柱: HPIC-CG5; 分离柱: HPIC-CG5; 混合装置为药膜反应器, 紫外光检测器, Muffle炉, 优质小号坩埚, 防尘工作台, 分析纯盐酸; 淋洗液: 6mM PDCA, 50 mM乙酸钠; 柱后反应试剂: 0.4mM PAR, 1M乙

酸, 3M氢氧化铵; 流速: 1.0ml/min; 使用波长: 520nm; 标准物质: 铜盐, 铁盐, 锌盐, 钴盐, 镍盐。

3. X射线荧光分析法: 日本理光3070E全自动X射线光谱仪; Muffle炉, 优质小号坩埚, 防尘工作台, 分析纯硝酸, 3.3um厚聚乙烯膜靶衬, 100ul微量移液器, 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 扩展剂溶液, 供样品分析的内源性标准物质为硝酸钇。
4. 常规仪器: 恒温烤箱, 电子天平, 电热吹风器, 高纯水蒸流器, 小培养皿, 聚乙烯塑料刀, 镊子, 不锈钢手术剪刀, 丙酮, 中性洗涤剂。

样品测试条件:

MNRS核反应堆测试条件

样品	取样要求	中子通量	照射时间	冷却时间	测试时间	死时间控制
毛	200mg	6×10^{11}	8 Min	1 Min	400 Sec	< 10%
脑	完整	6×10^{11}	4 Min	1 Min	400 Sec	< 10%
心	完整	6×10^{11}	8 Min	1 Min	400 Sec	< 10%
肺	完整	6×10^{11}	8 Min	1 Min	400 Sec	< 10%
肝	200mg	6×10^{11}	4 Min	1 Min	400 Sec	< 10%
肾	完整	6×10^{11}	4 Min	1 Min	400 Sec	< 10%
肌肉	200mg	6×10^{11}	4 Min	1 Min	400 Sec	< 10%
肿瘤	200mg	6×10^{11}	4 Min	1 Min	400 Sec	< 10%

中子通量单位: $n \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$

101重水核反应堆测试条件细则

样品	取样要求	中子通量	照射时间	冷却时间	测试时间	死时间控制
脑	完整	1×10^{13}	120 Hr	40 - 45 d	> 1000 Sec	< 15%
心	完整	1×10^{13}	120 Hr	40 - 45 d	> 1000 Sec	< 15%
肺	完整	1×10^{13}	120 Hr	40 - 45 d	> 1000 Sec	< 15%
肝	200mg	1×10^{13}	120 Hr	30 - 40 d	> 1000 Sec	< 15%
肾	完整	1×10^{13}	120 Hr	30 - 40 d	1000 Sec	< 15%
肌肉	200mg	1×10^{13}	120 Hr	30 - 40 d	1000 Sec	< 15%
肿瘤	200mg	1×10^{13}	120 Hr	40 - 45 d	> 1000 Sec	< 15%
标样		1×10^{13}	120 Hr	40 d	1000 Sec	< 15%

中子通量单位: $n \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$

离子色谱法测试条件及结果计算:

柱压:750mmHg 流速:1.0ml/min 试剂流速:0.7ml/min紫外检测
选用波长: 520 nm; 用参比法根据一定浓度同种离子的标准峰高求得。

X线发射光谱法测试条件及结果计算:

铯靶X射线管的管流为 50mA, 管压为 50KV, 载气(p-10)流速为 50ml/min, 峰与背景测量时间为20秒, 脉高分布选择100 - 300。用参比法根据加入内标钇的荧光强度求得; 中子活化, 离子色谱和 X线发射光谱的具体实施见有关文献^[3 4 - 4 3]。

2. 结果

2.1 小鼠荷瘤后对体内微量元素铜分布的影响

小鼠荷瘤后体内微量元素铜的分布发生改变, 脑、肝、血球、肺、肌肉和毛等组织中的铜含量均有一定程度降低, 其中以肝组织中铜的下降较为显著($p < 0.05$)。血浆和脾脏中的铜含量明显升高($p < 0.05$)。见表1。

Tab.1 Effects of inoculated HepA on distributing of copper in mice

organs or tissues	Normal control				Bearing HepA			
	No.	Means(ppm)	std		No.	Means(ppm)	std	
Kidney	12	7.07	±	2.24	8	6.82	±	2.84
Heart	12	16.37	±	2.98	10	16.54	±	4.40
Lung	12	9.72	±	5.24	10	7.79	±	3.48
Brain	11	10.16	±	2.89	10	8.03	±	1.96
Liver	11	10.74	±	2.23	10	7.64	±	3.13*
Spleen	10	95.04	±	18.33	8	119.05	±	18.88*
Bone	10	9.32	±	6.34	8	9.10	±	2.70
Muscle	12	3.43	±	1.25	10	2.76	±	1.14
B.C.	12	49.00	±	9.90	9	40.31	±	12.21
Plasma	10	10.84	±	3.03	9	14.54	±	2.75*
Wool	8	4.06	±	2.66	9	3.25	±	1.27

SAS Analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; * 与NS组比较

2.2 铜复方对荷瘤小鼠体内微量元素铜分布的影响

给与方剂后, 荷瘤小鼠体内铜的分布发生变化, 二者对荷瘤小鼠各

组织中铜含量的影响非常相似,表现为肾、肺、肝和血细胞含铜量升高,脾、血浆和骨中的铜含量下降,其中铜配伍麝香的R3对肝、心、脾、肌肉和血浆的影响显著($p < 0.05$ 或 0.01);铜联合铁与麝香配伍的R7对肾、心、脾和骨的影响显著($p < 0.05$ 或 0.01)。见表2。

Tab.2 Effects of recipes on distributing of copper in mice bearing HepA

organs or tissues	Control(NS)			R3			R7		
	No	Means(ppm)	std	No	Means(ppm)	std	No	Means(ppm)	std
Kidney	8	6.82 ± 2.84		11	16.29 ± 27.53		11	9.81 ± 2.48*	
Heart	10	16.54 ± 4.40		12	11.10 ± 4.43**		13	25.76 ± 6.55**	
Lung	10	7.79 ± 3.48		12	9.15 ± 3.27		11	10.28 ± 3.29	
Brain	10	8.03 ± 1.96		12	6.93 ± 1.98		12	9.40 ± 3.02	
Liver	10	7.64 ± 3.13		12	57.54 ± 26.84**		12	9.33 ± 3.24	
Spleen	8	119.05 ± 18.88		8	92.44 ± 24.69**		11	96.14 ± 31.33*	
Bone	8	9.10 ± 2.70		9	7.89 ± 3.46		10	7.04 ± 1.55*	
Muscle	10	2.76 ± 1.14		12	1.74 ± 0.85*		12	3.07 ± 1.27	
B.C.	9	40.31 ± 12.21		11	46.06 ± 16.26		11	55.04 ± 23.25	
Plasma	9	14.54 ± 2.75		10	7.63 ± 3.01**		12	11.61 ± 4.77	
Wool	9	3.25 ± 1.27		12	3.90 ± 1.72		12	2.39 ± 0.91	

SAS Analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; * 与NS组比较

2.3 铜复方对荷瘤小鼠肿瘤组织内微量元素铜分布的影响

方剂对肿瘤组织内微量元素铜的分布有影响, R3使瘤组织内铜的含量降低,以肿瘤的中心组织为显著($p < 0.01$); R7使瘤组织内铜的含量升高,肿瘤周边升高具有显著的差异($p < 0.01$)。见表3。

Tab.3 Effects of recipes on distribution of copper in tumors

Groups	center			periphery		
	No	means(ppm)	std	No	means(ppm)	std
N S	8	8.56 ± 3.38		7	3.10 ± 0.67	
R3	12	4.77 ± 1.97**		9	2.75 ± 0.94	
R7	11	9.99 ± 6.29		7	11.49 ± 7.19**	

SAS Analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; * 与NS组比较

2.4 铜复方对荷瘤小鼠体内微量元素铁分布的影响

方剂对体内主要脏器中微量元素铁的分布有影响, 二者均使肾、心、肺、肌肉、血细胞和血浆的铁含量在数值上降底, 肝中的铁含量升高, 其中 R3 对肺和血浆的影响较显著, 使其含铁水平下降具有统计学意义($p < 0.05$ 或 0.01), R7 对血球和血浆中的铁含量均显著降低($p < 0.01$)。见表4。

Tab.4 Effects of recipes on distribution of iron in mice bearing HepA

organs or tissue	Control(NS)			R3			R7		
	No	Means(ppm)	std	No	Means(ppm)	std	No	Means(ppm)	std
Kidney	10	401.62±325.31		12	218.11±146.88		10	290.37±133.48	
Heart	10	416.34±129.13		12	394.70±119.98		11	372.66±237.65	
Lung	9	514.49±129.51		11	411.18± 88.13*		11	402.57±117.85	
Brain	10	79.68± 11.80		12	70.90± 14.40		10	95.32± 93.31	
Liver	9	346.09±103.09		11	788.05±623.64		12	379.83±129.66	
Spleen	9	2101.58±713.52		10	1552.83±548.17		11	2237.66±848.09	
Bone	8	26.61± 11.67		8	24.15± 16.84		10	26.96± 16.88	
Muscle	10	65.04± 46.01		10	44.23± 5.23		11	47.36± 12.95	
B.C.	10	509.56±182.99		12	488.11±203.20		11	294.32± 78.37**	
Plasma	8	4.15± 0.90		11	2.65± 1.25**		12	2.86± 0.87**	

SAS Analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$;

2.5 荷瘤对小鼠体内多种金属微量元素分布的影响

2.5.1 荷瘤对小鼠毛内多种金属微量元素含量的影响

小鼠荷瘤后毛中钙的含量显著升高($p < 0.01$), 镁的含量显著下降($p < 0.01$)。见表 5。

Tab.5 Effects of inoculating HepA on TMs in wool of mice

Trace Metals	Normal			Tumor		
	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std
Ca	8	638.425±398.670		9	1160.896± 476.651 **	
Mg	7	139.911±121.318		9	317.073± 177.664 **	
Mn	8	0.874± 0.785		9	0.871± 0.527	

SAS Analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; * 与NS组比较

2.5.2 荷瘤对小鼠脑组织中多种金属微量元素含量的影响

荷瘤后小鼠脑组织中汞、镉、镁、锰含量下降, 其中镁与汞显著下

降 ($p < 0.05$) , 钴、铈、铷、铈及钙轻度升高 ($p > 0.05$) 。见表6.

Tab.6 Effects of inoculating HepA on TMs in brain of mice

Trace Metals	Normal			Tumor		
	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std
Co	12	0.024 ±	0.005	10	0.026 ±	0.006
Cr	6	0.835 ±	0.292	8	0.993 ±	0.389
Cs	11	0.316 ±	0.057	10	0.331 ±	0.065
Hg	2	0.338 ±	0.049	7	0.287 ±	0.073
Rb	12	48.514 ±	8.806	10	51.132 ±	9.946
Sb	3	0.095 ±	0.091	2	0.033 ±	0.013
Sc	12	0.002 ±	0.0003	10	0.002 ±	0.001
Se	12	0.898 ±	0.154	10	0.905 ±	0.144
Zn	12	66.023 ±	5.025	10	68.461 ±	9.244
Ca	11	424.437 ±	435.469	10	1792.350 ±	3232.420
Mg	11	877.364 ±	113.671	10	728.040 ±	79.721**
Mn	11	1.517 ±	0.168	10	1.109 ±	0.145**

SAS Analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; * 与NS组比较

2.5.3 荷瘤对小鼠心脏组织中多种金属微量元素含量的影响

荷瘤后小鼠心脏中钙、锶、钪、镁、锰的含量增加, 其中钙、钪显著升高 ($p < 0.05$ 和 $p < 0.01$), 铬、钴、汞、铷、铈和锌均下降, 其中铬下降有统计学差异 ($p < 0.05$)。见表7。

Tab.7 Effects of inoculating HepA on TMs in heart of mice

Trace Metals	Normal			Tumor		
	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std
Co	9	0.052 ±	0.010	9	0.046 ±	0.015
Cr	8	2.408 ±	0.760	10	1.644 ±	0.524*
Cs	10	0.669 ±	0.163	9	0.692 ±	0.183
Hg	3	0.549 ±	0.288	7	0.325 ±	0.086
Rb	11	67.805 ±	14.012	8	64.834 ±	16.101
Sb	1	0.098 ±		2	1.402 ±	1.375
Sc	10	0.004 ±	0.001	9	0.006 ±	0.003*
Se	7	1.250 ±	0.245	10	1.155 ±	0.256
Zn	11	71.765 ±	7.024	10	69.675 ±	17.913
Ca	10	190.160 ±	57.008	8	396.350 ±	159.895**
Mg	12	825.533 ±	218.285	10	887.630 ±	94.825
Mn	12	1.903 ±	0.478	10	2.180 ±	0.651

SAS Analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; * 与NS组比较

2.5.4 荷瘤对小鼠肺组织中多种金属微量元素含量的影响

荷瘤后小鼠肺组织中多种金属微量元素均有变化, 其中铬、铯、铷、锑、硒和锌升高, 但无统计学意义, 汞、钷、钙、镁和锰降低, 其中钷、钙、锰降低具有统计学意义($p < 0.05$ 和 $p < 0.01$)。见表 8。

Tab.8 Effects of inoculating HepA on TMs in lung of mice

Trace Metals	Normal			Tumor		
	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std
Co	10	0.030 ±	0.008	8	0.030 ±	0.007
Cr	7	2.060 ±	1.033	8	2.461 ±	1.663
Cs	10	0.582 ±	0.208	8	0.656 ±	0.274
Hg	7	0.496 ±	0.153	6	0.422 ±	0.103
Rb	11	87.920 ±	26.281	8	92.951 ±	17.743
Sb	3	0.809 ±	0.781	4	1.261 ±	0.874
Sc	9	0.014 ±	0.008	9	0.003 ±	0.001**
Se	12	1.812 ±	0.382	9	1.956 ±	0.207
Sr	0			0		
Zn	12	78.503 ±	16.966	9	88.778 ±	9.223
Ca	12	500.766 ±	237.220	10	399.880 ±	118.723*
Mg	12	692.366 ±	167.698	10	635.560 ±	125.980
Mn	12	1.022 ±	0.314	9	0.718 ±	0.188*

SAS Analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; * 与NS组比较

2.5.5 荷瘤对小鼠肝脏组织中多种金属微量元素含量的影响

荷瘤后对小鼠肝脏中多种金属微量元素的含量有显著的影响, 钴、汞、硒、镁和锰含量下降, 铬、铷、锑、锌和钙升高, 其中钴、汞、铷、锑、硒和锌变化显著, 有统计学差异($p < 0.05$, $p < 0.01$)。见表 9。

Tab.9 Effects of inoculating HepA on TMs in liver of mice

Trace Metals	Normal			Tumor		
	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std
Co	12	0.066 ± 0.015		9	0.052 ± 0.009*	
Cr	7	0.895 ± 0.763		8	1.307 ± 0.983	
Cs	9	0.339 ± 0.110		9	0.355 ± 0.096	
Hg	11	0.717 ± 0.102		8	0.511 ± 0.170**	
Rb	11	106.749 ± 10.423		8	123.126 ± 21.932**	
Sb	5	0.132 ± 0.001		5	0.191 ± 0.035**	
Sc	12	0.001 ± 0.001		9	0.001 ± 0.0005	
Se	12	3.433 ± 0.610		8	2.642 ± 0.719*	
Sr	0			0		
Zn	12	95.149 ± 17.595		9	119.157 ± 18.857**	
Ca	11	122.879 ± 39.650		8	151.637 ± 43.173	
Mg	11	802.263 ± 99.225		10	741.650 ± 336.031	
Mn	11	3.493 ± 0.593		10	2.711 ± 1.316	

SAS Analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; * 与NS组比较

2.5.5 荷瘤对小鼠肾脏组织中多种金属微量元素含量的影响

小鼠荷瘤后肾脏中多种金属微量元素的含量有变化, 铬、铯、汞、铷、钽、硒、锌和钙升高, 其中铷和钙升高显著, 有统计学差异($p < 0.05$ 和 $p < 0.01$)。钴、镁和锰降低, 镁与锰降低具有显著的统计学意义 ($p < 0.05$ 和 $p < 0.01$)。见表 10。

Tab.10 Effects of inoculating HepA on TMs in kidney of mice

Trace Metals	Normal			Tumor		
	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std
Co	12	0.083 ± 0.044		10	0.074 ± 0.059	
Cr	6	1.262 ± 0.335		7	1.484 ± 0.920	
Cs	12	0.664 ± 0.262		10	1.104 ± 1.248	
Hg	12	1.064 ± 0.393		10	1.245 ± 1.172	
Rb	10	78.157 ± 25.323		8	100.701 ± 103.053	
Sb	1	0.291 ± .		0		
Sc	11	0.001 ± 0.001		10	0.002 ± 0.001**	
Se	12	4.761 ± 1.675		10	6.162 ± 4.862	
Sr	0			1	240.000	
Zn	12	80.927 ± 29.058		10	97.557 ± 65.656	
Ca	11	104.479 ± 32.052		8	137.240 ± 43.380*	
Mg	12	883.250 ± 353.027		8	593.487 ± 121.125*	
Mn	12	2.817 ± 0.262		8	1.824 ± 0.580**	

SAS Analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; * 与NS组比较

2.5.6 荷瘤对小鼠肌肉组织中多种金属微量元素含量的影响

荷瘤后小鼠肌肉中锑和锰下降, 而锰降低具有显著意义($p < 0.01$)。铬、铯、汞、铷、钷、硒、锌和钙均有不同程度升高, 但无统计学差异($p > 0.05$)。见表 11。

Tab.11 Effects of inoculating HepA on TMs in muscle of mice

Trace Metals	Normal			Tumor		
	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std
Co	11	0.014±	0.017	10	0.014±	0.008
Cr	9	0.896±	0.662	10	1.325±	1.326
Cs	11	0.680±	0.197	10	1.017±	1.263
Hg	9	0.148±	0.019	7	0.178±	0.039
Rb	10	52.273±	14.293	10	81.921±	109.740
Sb	3	0.125±	0.094	4	0.110±	0.085
Sc	11	0.0007±	0.0007	10	0.001±	0.001
Se	11	0.594±	0.135	10	0.809±	0.557
Sr	0			0		
Zn	11	33.293±	4.443	10	54.231±	39.785
Ca	12	1652.900±	1295.630	10	2490.550±	1571.810
Mg	12	963.325±	129.990	10	960.820±	98.377
Mn	12	0.432±	0.092	10	0.327±	0.083**

SAS Analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; * 与NS组比较

2.6 铜复方对荷瘤小鼠体内多种金属微量元素分布的影响

2.6.1 铜复方对肿瘤组织中多种金属微量元素分布的影响

方剂R3可使肿瘤中心组织中钙、锰和镁下降, 其中钙的降低有显著的统计学意义($p < 0.05$); 方剂R7可使肿瘤中心组织的钙、镁和锰升高, 锰的升高显著($p < 0.01$)。见表12。

Tab.12 Effects of recipes on TMs in tumor center of mice bearing HepA

Trace Metals	Control(NS)			R3			R7		
	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std
Ca	8	1123.990±	556.308	12	501.340±	211.905*	3	8419.000±	8451.61
Mg	8	566.112±	164.735	12	466.258±	271.460	11	1232.280±	1270.59
Mn	2	0.546±	0.066	4	0.414±	0.147	8	0.984±	0.283**

SAS Analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; * 与NS组比较

方剂R3使肿瘤周边组织中镁与锰显著降低($p < 0.05$ 和 $p < 0.01$), 钙升高, 但无统计学差异; 方剂R7可使肿瘤周边组织中镁和锰含量升高, 其中镁较对照组显著升高($p < 0.01$)。见表13。

Tab.13 Effects of recipes on TMs in tumor periphery of mice bearing HepA

Trace Metals	Control(NS)			R3			R7		
	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std
Ca	7	381.057 ± 147.146		9	503.058 ± 580.828		0	—	—
Mg	7	625.057 ± 125.174		9	434.900 ± 105.836**		7	1491.570 ± 648.661**	
Mn	6	0.244 ± 0.087		5	0.159 ± 0.038*		7	1.633 ± 2.384	

SAS Analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; * 与NS组比较

2.6.2 铜复方对肌肉组织中多种金属微量元素分布的影响

方剂R3可使肌肉组织中铬升高, 但不显著。使钴、铈、铷、锑、钪、硒、锌、钙、镁和锰降低, 其中钙、镁和锰降低与对照组比较有显著的差异($p < 0.01$); 方剂 R7可使除钴外的多种金属微量元素降低, 其中钪的降低与对照组比有显著的统计学差异($p < 0.01$)。见表14。

Tab.14 Effects of recipes on TMs in muscle of mice bearing HepA

Trace Metals	Control(NS)			R3			R7		
	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std
Co	10	0.014 ± 0.008		8	0.010 ± 0.002		10	0.015 ± 0.014	
Cr	10	1.325 ± 1.326		9	2.495 ± 4.701		8	0.650 ± 0.331	
Cs	10	1.017 ± 1.263		10	0.592 ± 0.101		10	0.523 ± 0.133	
Hg	7	0.178 ± 0.039		5	0.183 ± 0.040		6	0.167 ± 0.039	
Rb	10	81.921 ± 109.740		10	41.658 ± 9.634		11	34.940 ± 10.070	
Sb	4	0.110 ± 0.085		2	0.080 ± 0.083		2	0.098 ± 0.007	
Sc	10	0.001 ± 0.0007		8	0.0007 ± 0.0001		11	0.0006 ± 0.0002**	
Se	10	0.809 ± 0.557		10	0.624 ± 0.201		10	0.570 ± 0.136	
Sr	0			1	157.000 ±		2	193.500 ± 4.949	
Zn	10	54.231 ± 39.785		10	40.280 ± 4.733		11	38.429 ± 6.779	
Ca	10	2490.550 ± 1571.810		12	742.940 ± 704.710**		7	2031.830 ± 1621.12	
Mg	10	960.820 ± 98.377		12	674.950 ± 209.722**		12	840.735 ± 375.626	
Mn	10	0.327 ± 0.083		12	0.173 ± 0.068**		10	0.320 ± 0.148	

SAS Analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; * 与NS组比较

2.6.3 铜复方对肾组织中多种金属微量元素分布的影响

方剂R3可使肾组织中的硒、钙、镁和锰含量增加, 但不显著。可使其余多种金属微量元素下降, 特别是钴、铬和钨的下降有显著的统计学意义($p < 0.05$ 和 $p < 0.01$); 铜复方R7与对照组比较钙、锰和镁轻度升高, 其余多种金属微量元素下降, 铬与钨的下降明显, 具有统计学意义($p < 0.05$ 和 $p < 0.01$)。见表15。

Tab.15 Effects of recipes on TMs in kidney of mice bearing HepA

Trace Metals	Control(NS)			R3			R7		
	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std
Co	10	0.074 ± 0.059		12	0.052 ± 0.017*		10	0.059 ± 0.014	
Cr	7	1.484 ± 0.920		6	0.688 ± 0.407*		3	0.754 ± 0.110*	
Cs	10	1.104 ± 1.248		12	0.426 ± 0.180		10	0.485 ± 0.209	
Hg	10	1.245 ± 1.172		12	0.913 ± 0.311		9	0.938 ± 0.210	
Rb	8	100.701 ± 103.053		12	46.847 ± 19.150		10	55.499 ± 15.240	
Sb	0			0			1	0.005 ±	
Sc	10	0.002 ± 0.001		12	0.001 ± 0.001**		10	0.001 ± 0.0003**	
Se	10	6.162 ± 4.862		12	11.149 ± 18.846		9	3.468 ± 1.118	
Sr	1	240.000 ±		0			0		
Zn	10	97.557 ± 65.656		12	64.743 ± 23.919		10	77.764 ± 12.852	
Ca	8	137.240 ± 43.380		10	247.535 ± 351.432		9	150.277 ± 29.702	
Mg	8	593.487 ± 121.125		11	733.390 ± 329.885		11	602.990 ± 77.057	
Mn	8	1.824 ± 0.580		11	2.329 ± 1.621		11	2.253 ± 0.537	

SAS Analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; * 与NS组比较

2.6.4 铜复方对肝组织中多种金属微量元素分布的影响

给方剂 R3 后肝组织中铬、铯、汞、铷、硒、锌和镁含量较对照组高, 但无显著差异。铷和钙降低, 其中钙下降非常显著, 有统计学差异 ($p < 0.01$); 给方剂 R7 后汞和硒升高, 其余多种金属微量元素下降, 铷与钙的降低具有显著的统计学差异 ($p < 0.01$)。见表 16。

Tab.16 Effects of recipes on TMs in liver of mice bearing HepA

Trace Metals	Control(NS)			R3			R7		
	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std	n	x	std
Co	9	0.052 ±	0.009	11	0.052 ±	0.008	12	0.045 ±	0.016
Cr	8	1.307 ±	0.983	9	1.831 ±	2.791	8	0.636 ±	0.273
Cs	9	0.355 ±	0.096	11	0.460 ±	0.441	8	0.277 ±	0.140
Hg	8	0.511 ±	0.170	10	1.078 ±	1.549	11	0.611 ±	0.152
Rb	8	123.126 ±	21.932	11	118.619 ±	147.351	12	66.349 ±	24.785**
Sb	5	0.191 ±	0.035	0			1	0.110 ±	
Sc	9	0.001 ±	0.0005	9	0.001 ±	0.003	12	0.0007 ±	0.0003
Se	9	2.642 ±	0.919	11	10.690 ±	18.847	12	10.522 ±	18.302
Sr	0			0			0		
Zn	9	119.157 ±	18.857	11	185.053 ±	221.669	12	96.174 ±	39.297
Ca	8	151.637 ±	43.173	12	74.320 ±	24.164**	11	96.441 ±	24.886**
Mg	10	741.650 ±	336.031	12	864.725 ±	207.635	12	619.983 ±	173.604
Mn	10	2.711 ±	1.316	12	2.654 ±	0.956	12	2.415 ±	1.166

SAS Analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; * 与 NS 组比较

2.6.5 铜复方对肺组织中多种金属微量元素分布的影响

给R3后,肺组织中汞、钙、镁与锰均升高,汞升高与对照组比差异显著($p < 0.05$)。 铷、钷、硒和锌显著下降, 均具显著的统计学差异($p < 0.01$ 和 $P < 0.05$); 给R7后,肺组织中汞、钙、镁和锰的变化同给R3, 钙、镁与锰的升高非常显著, 具统计学意义($p < 0.05$ 和 $p < 0.01$)。 铬、铯、铷、钷、硒和锌降低, 且铷、钷、硒和锌的降低具有显著的统计学差异($p < 0.05$ 和 $p < 0.01$)。见表17.

Tab.17 Effects of recipes on TMs in lung of mice bearing HepA

Trace Metals	Control(NS)			R3			R7		
	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std
Co	8	0.030±	0.007	3	0.031±	0.001	9	0.030±	0.008
Cr	8	2.461±	1.663	8	2.624±	2.990	8	1.576±	0.536
Cs	8	0.656±	0.274	8	0.452±	0.137	9	0.429±	0.138
Hg	6	0.422±	0.103	6	0.597±	0.083*	6	0.497±	0.092
Rb	8	92.951±	17.743	11	60.861±	15.212**	11	63.549±	13.832**
Sb	4	1.261±	0.874	0			1	0.158±	
Sc	9	0.003±	0.001	11	0.002±	0.0004*	11	0.002±	0.001*
Se	9	1.956±	0.207	10	1.499±	0.253**	11	1.580±	0.567*
Sr	0			1	319.000±		0		
Zn	9	88.778±	9.223	11	77.811±	6.854**	11	74.071±	13.622**
Ca	10	399.880±	118.723	11	444.254±	179.185	11	628.427±	97.822**
Mg	10	635.560±	125.980	12	709.533±	79.949	11	743.181±	79.587*
Mn	9	0.718±	0.188	12	0.904±	0.459	11	0.978±	0.286*

SAS Analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; * 与NS组比较

2.6.6 铜复方对心脏组织中多种金属微量元素分布的影响

方剂R3可使心脏组织中铬、汞、硒和锌升高, 铯、铷、钷、钙、镁与锰下降, 其中铷与锰降低显著($p<0.05$ 和 $p<0.01$); 方剂R7与对照组比使钴、铬、汞、镁和锰升高, 铯、铷、锶、钷、硒和锌下降, 其中镁和锰的升高与铯和铷的降低具有显著的统计学意义($p<0.05$ 和 $p<0.01$)。见表18。

Tab.18 Effects of recipes on TMs in heart of mice bearing HepA

Trace Metals	Control(NS)			R3			R7		
	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std
Co	9	0.046±	0.015	10	0.050±	0.013	10	0.084±	0.145
Cr	10	1.644±	0.524	10	3.162±	2.096	6	2.113±	1.012
Cs	9	0.692±	0.183	9	0.598±	0.182	9	0.495±	0.200*
Hg	7	0.325±	0.086	2	0.488±	0.272	4	0.455±	0.158
Rb	8	64.834±	16.101	12	48.329±	16.557*	11	43.823±	16.564**
Sb	2	1.402±	1.375	1	0.824±		1	0.542±	
Sc	9	0.006±	0.005	12	0.003±	0.001	11	0.002±	0.001
Se	10	1.155±	0.256	7	7.056±	14.983	5	0.962±	0.237
Sr	0			0			0		
Zn	10	69.675±	17.913	12	72.019±	14.492	11	62.318±	17.886
Ca	10	396.350±	459.895	11	173.968±	52.999	0		
Mg	10	887.630±	94.825	12	795.658±	231.273	13	1352.100±	217.496**
Mn	10	2.180±	0.651	12	1.392±	0.322**	13	3.327±	1.347*

SAS Analysis: * $p<0.05$, ** $p<0.01$; * 与NS组比较

2.6.7 铜复方对脑组织中多种金属微量元素分布的影响

给方剂R3后, 脑组织中铬、锑升高, 钴、铯、汞、铷、钐、硒、钙和锰降低, 其中铷、钐与锰的下降与对照组比差异显著($p < 0.05$ 和 $p < 0.01$); 给方剂R7后, 与对照组相比钴、铬、汞、锑、镁和锰升高, 铯、铷、钐和钙下降, 其中汞、镁与锰的升高和铯、铷与钐的下降较显著($p < 0.05$ 和 $p < 0.01$)。见表19。

Tab.19 Effects of recipes on TMs in brain of mice bearing HepA

Trace Metals	Control(NS)			R3			R7		
	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std
Co	10	0.026±	0.006	12	0.023±	0.007	10	0.040±	0.042
Cr	8	0.993±	0.389	6	1.172±	0.713	6	1.176±	0.270
Cs	10	0.331±	0.065	10	0.279±	0.078	9	0.254±	0.072**
Hg	7	0.287±	0.073	3	0.266±	0.016	5	0.380±	0.058*
Rb	10	51.132±	9.946	12	34.398±	5.572**	10	34.314±	7.622**
Sb	2	0.033±	0.013	1	0.060±		2	0.110±	0.090
Sc	10	0.002±	0.001	12	0.001±	0.001*	10	0.001±	0.0003*
Se	10	0.905±	0.144	12	0.888±	0.272	10	0.948±	0.423
Sr	0			0			1	321.000±	
Zn	10	68.461±	9.244	12	66.483±	7.394	10	70.054±	21.475
Ca	10	1792.350±	3232.420	12	199.703±	175.831	11	548.609±	564.795
Mg	10	728.040±	79.721	12	722.075±	77.681	11	805.800±	103.878*
Mn	10	1.109±	0.145	12	0.939±	0.117**	10	1.587±	0.213**

SAS Analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; * 与NS组比较

2.6.8 铜复方对毛中多种金属微量元素分布的影响

给方剂R3和R7后,二者均可使毛中钙、镁和锰的含量显著降低 ($p < 0.01$)。见表20。

Tab.20 Effects of recipes on TMs in wool of mice bearing HepA

Trace Metals	Control(NS)			R3			R7		
	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std	n	means(ppm)	std
Ca	9	1160.89±476.65		10	167.12±164.80**		12	302.61 191.57**	
Mg	9	317.07±177.66		3	81.17± 73.02**		11	74.25±28.63**	
Mn	9	0.87± 0.52		11	0.32± 0.18**		12	0.37± 0.12**	

SAS Analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; * 与NS组比较

三. 初步分析

1. 铜复方对小鼠腹水型肿瘤细胞及腹水中铜分布影响的分析

铜复方R3可使瘤细胞中铜的含量显著升高, R7不但能使瘤细胞中铜的含量显著升高, 而且能使腹水中铜的含量显著下降。单独给铜时, 瘤细胞中铜的含量升高, 而对腹水中铜的含量无影响。单独给铁时, 腹水中铜的含量升高, 而对瘤细胞中铜的含量无显著的影响, 这无疑是与铁可影响体内铜的再分布有关。单独给麝香时, 腹水及瘤细胞中铜的含量, 均无明显的影响。由此可见, R3升高瘤细胞中铜的含量, 主要与复方中含铜有关, 麝香起一定的辅助作用。而R7升高瘤细胞中铜的含量, 显然与铁和麝香对铜的协同作用有关。铜复方R3较R7对瘤细胞中铜含量升高的影响为强, 该结果与铜复方R3的抗肿瘤作用较强相一致, R3和R7升高瘤细胞中铜的含量为其抗肿瘤机制中的一个环节。

2. 铜复方对多种金属微量元素分布的影响与其调控肿瘤效应的分析

对金属微量元素分布的观察表明, 肿瘤组织中金属微量元素的含量与其来源组织差异明显。本实验所选用的肝肿瘤细胞株HepA, 所形成的实体瘤组织与正常小鼠肝组织相比, 在所测定的四种元素中, 铜、镁和锰含量降低, 钙含量升高。而且荷肝实体瘤小鼠的肝组织中, 这四种金属微量元素与肿瘤组织中的变化一致, 这一结果可为肿瘤局部组织微量元素紊乱的佐证之一。这四种测定元素的变化特点可由下表得知。

Tab.1 TMs distribution in different kinds of liver and tumor tissues

Trace Metals	normal		bearing HepA		HepA center		HepA periphery	
	n	means (ppm)	n	means (ppm)	n	means (ppm)	n	means (ppm)
Cu	11	10.74 ± 2.23	10	7.64 *	8	8.56 ± 3.38	7	3.10** ± 0.67
Ca	11	122.88 ± 39.65	8	151.64 ± 43.17	8	1123.99** ± 556.31	7	381.06** ± 147.15
Mg	11	802.26 ± 99.22	10	741.65 ± 336.03	8	566.11** ± 164.74	7	625.06** ± 125.17
Mn	11	3.49 ± 0.59	10	2.71 ± 1.32	2	0.55** ± 0.07	6	0.24** ± 0.09

T test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; * compared with normal group.

Tab.2 Copper distribution dynamics in various organs or tissues in mice bearing tumor and treated by R3 & R7.

Group	A	B	C	D	E	F	J	H	I	J	K	L	M
NS	=	-	--	-	++	-	=	-	-	++	-		
R3	--	+	++	+	--	-	-	-	+	--	+	--	-
R7	+	+	+	++	--	+	-	+	-	-	+	+	++

control compared with normal; R3 and R7 compared with control.

A:heart B:lung C:liver D:kidney E:spleen F:brain J:bone

H:muscle I:wool J:plasma K:blood cells L:center of tumor

M:periphery of tumor =:no change -:decrease +:increase

--:decrease markedly; ++:increase markedly.

小鼠荷瘤后,铜在机体的分布发生变化,除脾脏和血浆外,其余组织和器官均见降低,其中在肝的降低非常显著,而给予铜复方治疗后,R3能翻转由于荷瘤所致的肝、肺、肾、脾、血浆、血球和毛中铜含量的变化,R7能翻转由于荷瘤所致的肝、肺、肾、脾、脑、肌肉、血浆和血球铜含量的变化。此翻转作用提示:R3和R7对维持体内微量元素铜的平衡,从而起到防治肿瘤的作用有重要意义。见表2。

小鼠荷瘤后,铁在机体的分布有变化,可见在肺、肾、脾、脑、肌肉和血浆铁的升高,除骨外,其余组织和器官均有所降低。在给铜复方治

疗后，R3可使除心脏和血球外其余多个组织和器官中的铁分布有恢复作用，R7也具有类似作用，但不及R3。见表3；提示铁代谢的平衡与铜复方抗肿瘤有关。

Tab.3 Iron distributions dynamics in various organs and tissues of mice bearing HepA and treated by R3 & R7

Group	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
NS	-	+	-	+	++	+	=	+		++	-
R3	-	-	+	-	-	-	-	-		--	-
R7	-	-	+	-	+	+	=	-		--	--

control compared with normal; R3 and R7 compared with control.

A:heart B:lung C:liver D:kidney E:spleen F:brain

G:bone H:muscle I:wool J:plasma K:blood cells

=: no change -: decrease --: decrease markedly;

+: increase ++: increase markedly.

小鼠荷瘤后，多种金属微量元素的测定表明，不仅铜与铁在机体的分布发生变化，其余如钴、铬、铯、汞、铷、锑、钨、硒、锌、钙、镁和锰等十二种金属微量元素在小鼠脑、肺、心、肝、肾和肌肉组织和器官均有分布的变化。

在小鼠脑中，给予铜复方R3和R7治疗后，R3可使钴、铯、铷、锑、锌和钙等金属微量元素由荷瘤所致的分布变化逆转。R7可使铯、汞、铷、锑、钙、镁和锰等金属微量元素的分布逆转，R7优于R3。见表4。

Tab.4 Trace Metals distribution dynamics in brain of mice bearing Hep A and treated by R3 & R7

Group	Co	Cr	Cs	Hg	Rb	Sb	Sc	Se	Zn	Ca	Mg	Mn
NS	+	+	+	-	+	-	=	=	+	+	--	--
R3	-	+	-	-	--	+	--	-	-	--	-	--
R7	+	+	--	++	--	+	--	+	+	-	++	++

control compared with normal; R3 and R7 compared with control.

=: no change -: decrease --: decrease markedly;

+: increase ++: increase markedly.

在荷瘤小鼠心脏中，铜复方R3可使钴、铬、汞、铈、钷、硒、锌、钙、镁和锰等金属微量元素分布逆转，R7可使钴、铬、汞、铈和钷等金属微量元素分布逆转，R3优于R7。见表5。

Tab.5 Trace Metals distribution dynamics in heart of mice bearing HepA and treated by R3 & R7.

Group	Co	Cr	Cs	Hg	Rb	Sb	Sc	Se	Zn	Ca	Mg	Mn
NS	-	-	-	-	-	+	++	-	-	++	+	+
R3	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	--
R7	+	+	--	+	--	-	-	-	-		++	++

control compared with normal; R3 and R7 compared with control.
 =: no change -: decrease --: decrease markedly;
 +: increase ++: increase markedly.

在荷瘤小鼠肺脏中，铜复方R3可使钴、铈、汞、铷、硒、锌、钙、镁和锰等金属微量元素分布逆转，R7可使钴、铬、铈、汞、铷、钷、硒、锌、钙、镁和锰等金属微量元素分布逆转，R7优于R3。见表6。

Tab.6 Trace Metals distribution dynamics in lung of mice bearing HepA and treated by R3 & R7.

Group	Co	Cr	Cs	Hg	Rb	Sb	Sc	Se	Zn	Ca	Mg	Mn
NS	=	+	+	-	+	+	--	+	+	--	-	--
R3	=	+	-	++	--		--	--	--	+	+	+
R7	=	-	-	+	--	-	--	--	--	++	++	++

control compared with normal; R3 and R7 compared with control.
 =: no change -: decrease --: decrease markedly;
 +: increase ++: increase markedly.

在荷瘤小鼠肝脏中，铜复方R3可使汞、铷、钷、硒、钙和镁等金属微量元素分布逆转，R7可使铬、铈、汞、铷、钷、硒、锌和钙等金属微量元素分布逆转，R7优于R3。见表7。

Tab.7 Trace metals distribution dynamics in liver of mice bearing HepA and treated by R3 & R7

Group	Co	Cr	Cs	Hg	Rb	Sb	Sc	Se	Zn	Ca	Mg	Mn
NS	--	+	+	--	++	++	=	--	++	+	-	-
R3	=	+	+	+	-		=	+	+	--	+	-
R7	-	-	-	+	--	-	-	+	-	--	-	-

control compared with normal; R3 and R7 compared with control.
 =: no change -: decrease --: decrease markedly;
 +: increase ++: increase markedly.

在荷瘤小鼠肾脏中，铜复方R3可使铬、铯、汞、铷、钷、锌、镁和锰金属微量元素的分布逆转，R7可使铬、铯、汞、铷、钷、硒、锌、镁和锰等金属微量元素分布逆转，R7优于R3。见表8。

Tab.8 Trace Metals distribution dynamics in kidney of mice bearing HepA and treated by R3 & R7

Group	Co	Cr	Cs	Hg	Rb	Sb	Sc	Se	Zn	Ca	Mg	Mn
NS	-	+	+	+	+		++	+	+	++	--	--
R3	-	-	-	-	-		--	+	-	+	+	+
R7	-	-	-	-	-		--	-	-	+	+	+

control compared with normal; R3 and R7 compared with control.
 =: no change -: decrease --: decrease markedly;
 +: increase ++: increase markedly.

在荷瘤小鼠肌肉组织中，铜复方R3可使铯、铷、钷、硒、锌和钙等金属微量元素的分布逆转，R7可使铬、铯、汞、铷、钷、硒、锌和钙等金属微量元素分布逆转，R7优于R3。见表9。

Tab.9 Trace Metals distribution dynamics in muscle of mice bearing HepA and treated by R3 and R7

Group	Co	Cr	Cs	Hg	Rb	Sb	Sc	Se	Zn	Ca	Mg	Mn
NS	=	+	+	+	+	-	+	+	+	+	=	--
R3	-	+	-	+	-	-	-	-	-	--	--	--
R7	+	-	-	-	-	-	--	-	-	-	-	=

control compared with normal; R3 and R7 compared with control.

=: no change -: decrease --: decrease markedly;

+: increase ++: increase markedly.

从铜复方 R3与R7 对荷瘤小鼠体内组织器官可调整分布紊乱微量元素的数量来分析, R7对机体的调整作用优于R3。见下表10.

表10. 铜复方R3和R7对荷瘤小鼠组织器官金属微量元素可调整的数量比较

心脏	肺脏	肝脏	肾脏	脑	肌肉
R3与R7 相比较	R3>R7	R7>R3	R7>R3	R7>R3	R7>R3

上述结果体现了铜复方对荷瘤机体分布紊乱的多种金属微量元素有调整作用, 可能为治疗肿瘤的重要作用途径之一。

第六部分 讨论与结论

一. 铜复方调控肿瘤的作用及其途径的分析

1. 铜复方对肿瘤的直接作用在肿瘤调控中的可能机制

有文献报到, 铜或铁的某些化合物具有抗实验性肿瘤的作用, 且铜有明显的量效关系^[26-27]。本文通过对小鼠实体和腹水型肿瘤模型抗肿瘤研究表明, 铜配伍人工麝香(R3)或铜与铁按 1:4联合配伍人工麝香(R7)不仅能显著的抑制实体肿瘤, 使瘤组织中活存的瘤细胞百分数下降, 实体瘤小鼠存活时间延长, 而且能显著延长腹水型小鼠存活时间($p<0.01$ 和 $p<0.05$)。单铜或麝香对实体瘤均有一定的作用, 铜的抑瘤作用较麝香显著。铜复方 R3 对实体瘤的作用较 R7 为强, 可能与铜复方 R3 的含铜量较 R7 多的原故。本研究中单铁未见显著的抑瘤效应, 可能与某些金属微量元素如铁、银或铂等抗肿瘤作用需要有特定的配体有关^[22], 铁与麝香配伍后具有显著的抑瘤作用, 说明麝香中可能含有使铁或其它金属微量元素呈现抗肿瘤活性的配体。对腹水型肿瘤的作用分析表明: 铜复方能显著延长荷瘤小鼠的存活时间, 腹水涂片镜下观察发现瘤细胞退化增加, 出现一系列趋向正常细胞形态的表现, 可能与铜复方一方面直接使瘤细胞损伤致退化, 另一方面具有调节瘤细胞向正常分化有关。扫描电镜超微结构观察表明, 瘤细胞表面绒毛出现显著的变化, 表现为绒毛排列紊乱和形成小泡, 甚至绒毛减少或消失, 有证据表明, 这些变化为瘤细胞受损伤或活力减低的形态变化^[44]。是铜复具有对瘤细胞直接损伤和调控瘤细胞使其去恶化的佐证之一。透射电镜观察表明, 瘤细胞中细胞器减少, 结构较成熟, 胞浆较丰富, 核中染色质减少, 核仁数量少, 且核区内可见胞浆包含物, 这一结构可能为铜复方通过对核中DNA的作用使瘤细胞受损或发生分化的另一形态学证据。腹水瘤细胞DNA含量和细胞周期作用分析表明, 铜复方能使瘤细胞中DNA含量增加, 使G1期和S期的瘤细胞下降, G2M期的瘤细胞增加, 这些结果进一步表明铜复方对瘤细胞的一系列作用与影响了肿瘤细胞的核有关。腹水及其瘤细胞中铜含量分析表明, 铜复方R3和R7均可使瘤细胞中的铜含量显著升高, 有文献指出, 细胞核为富铜分布区^[45], 铜对细胞DNA

的代谢有密切关系,从铜复方及其各组成成分对肿瘤的作用来分析,铜在铜复方调控瘤细胞中发挥着不可替代的作用,铁与铜在复方中具有一定的协同作用,麝香在方剂中占有特殊的位置,可能与其调节瘤细胞对铜和铁的反应性相关。由此可推测,铜复方的一系列作用从元素的角度来看可能是由铜促发的,从分子生物学的角度来分析,瘤细胞核中的DNA可能为铜复方作用的重要位点之一。

2. 铜复方对荷瘤机体的作用在肿瘤调控中的意义

祖国医学对肿瘤疾患的认识和治疗重整体的邪正盛衰、阴阳、气血和脏腑平衡。在临床上,肿瘤患者常常表现为正虚等一系列病理变化。在治疗上通过纠正机体内在的紊乱,恢复机体固有的平衡来达到治疗之目的。历代医家认为:铜与铁二者无毒或有小毒,走肾经,具有轻身、延年和通神仙等以抚正固本为主的多重作用,其治恶疮、破积聚多与扶正以祛邪相关^[46]。现代研究表明,肿瘤的发生与发展与机体多个系统的功能紊乱密切相关,常表现为免疫力下降,血液动力学和流变学失常,造血功能抑制,神经-体液网络紊乱等等病理变化。动物研究表明:小鼠荷瘤后可出现类似的病理变化,在荷HepA实体瘤的小鼠模型上可见,荷瘤三周后红血球显著降低,胸腺指数下降,血液中白血球和脾脏指数反应性升高,给予铜复方治疗后,荷瘤小鼠血红蛋白和胸腺指数升高,脾脏指数进一步升高,反应性白细胞升高被抑制。促进实体瘤瘤体周围结缔组织特别是成纤维细胞增生,瘤组织内炎性细胞的浸润。这些作用表明,铜复方能调动荷瘤机体的潜在能力,特别是使机体的免疫功能升高,对肿瘤的控制起到非常重要的作用,是治疗肿瘤的另一重要途径。

二. 铜复方调整荷瘤机体金属微量元素分布在肿瘤治疗中的作用

1. 金属微量元素的平衡与肿瘤发生和发展的关系

现代科学研究表明,整个生命体是由运动着的有序排列和组合的化学元素形成的。由于生命体的进化和不断的发展,构成机体的元素也在不断的变化,一部分以生物大分子的状况存在,另一部分以简单化合和相对自由的状态存在,从其结构元素的组成来看,生物体中碳、氢、氧、氮、磷和硫占有较大的比例,某些金属离子如钠、钾和钙次之,而铜、

铁、锌、镁、锰、钴、铷等金属和非金属元素以及其微量的形式存在，并与体内的生物大分子发生联系，发挥特定的生理功能。大量的研究资料表明，微量元素在体内有着重要的生理作用，微量元素在体内的缺乏和过量都会对机体产生不利的影响^[47]。随着微量元素分析方法的发展，近年来发现，体内微量元素是相互联系和相互制约的，随机体的生理病理状态的不同，而在体内各个部位的分部和含量也发生相应的变化。具此可以设想，在正常情况下，机体内各组织和器官中微量元素的分布和含量是相对稳定的，各元素间保持着动态的平衡，病理状态即是这种固有平衡的破坏。这种设想虽未被现代医学科学所证实，但与祖国传统医学的疾病观相一致。我们研究发现，小鼠HepA肝肿瘤组织中所测定的四种元素含量表明，瘤组织中金属微量元素的含量较正常肝组织显著地降低($p < 0.05$, $p < 0.01$)，不仅如此，荷瘤小鼠的肝组织中多种金属微量元素均发生显著的变化，这表明肿瘤是局部组织微量元素紊乱的疾病之一。从全身微量元素的分布来看，小鼠荷瘤后脑、肺、心、肝、肾和肌肉组织中钴、铯、铬、铷、锶、锑、硒、钽、汞、铜、铁、锌、钙、镁和锰等多种金属微量元素含量均有一定的变化。从而可以认为肿瘤也是全身微量元素紊乱的疾病。荷瘤机体微量元素的紊乱可能是多系统功能紊乱的基础。

2. 铜复方对荷瘤机体金属微量元素的调整作用与意义

祖国医学对肿瘤疾患的治疗重在整体的调整，通过调整机体的阴阳和脏腑平衡，提高抗肿瘤能力达到控制和治疗肿瘤的目的。我们研究发现，小鼠荷瘤三周后，可见血红蛋白和胸腺指数显著下降，外周血中白细胞和脾脏指数反应性升高，这些变化是肿瘤和机体相互作用的结果，除脾脏指数反应性升高外，其它变化均为机体不利的变化。给铜复方后，荷瘤机体血红蛋白和胸腺指数均升高，外周血中反应性白细胞升高被翻转，使脾脏指数进一步增高，这些作用可作为铜复方调整机体，达到控制肿瘤的部分佐证。同时研究发现，给予铜复方治疗后，荷瘤小鼠脑、肺、肝、心、肾和肌肉组织中多种金属微量元素的分布发生变化，使其含量出现了向正常状态恢复的趋向，这种变化可能是铜复方调整机体实现控制肿瘤的物质基础所在。

三. 金属微量元素在中西医结合调控肿瘤中的可行性及其展望

1. 历史性回顾

纵观祖国医海中对肿瘤类疾患治疗的历史,中草药发挥了重要的作用,积累了极其丰富的临床经验,是人类征复肿瘤历史中可贵的尝试。现代研究发现,我们的祖先很早便使用金属类矿物或富含金属的草药来治疗包括肿瘤在内的各种疾病。历代医家认为,咸能软坚,从今天来看治疗现代肿瘤类疾病重用味咸之物,可起到较为满意的疗效。随着人们对微量元素认识的加深,发现味咸之中药富含多种金属微量元素,而金属微量元素在抗肿瘤中可能发挥了不可替代的作用。

在西方,很多学者在微量元素的生理和药理方面做了大量的工作,不仅阐明了金属微量元素在体内的一系列变化规律,而且发现了大量的具有抗肿瘤活性的金属微量元素化合物^[22],为微量元素在抗肿瘤中的深入发展奠定了基础。

近年来随着国际交流的深入发展,不仅使祖国传统医学唤发了青春,使以前不被世人所重视的宝贵经验重新大放异彩,如用微量元素的观点来诊断疾病,从调整体内微量元素的角度来用药,均取的一定的成绩,出现较好的发展趋向。而且使西方学者耳目一新,在很多方面有了长足的进步,如某些学者在用金属微量元素抗肿瘤时寻找较合适的天然配体搭配,一方面来加强金属元素化合物的抗肿瘤作用,另一方面减轻金属元素对机体的毒性等等。

2. 方法学在金属微量元素调控肿瘤研究与应用中的作用

金属微量元素调控肿瘤的关键是认识金属微量元素在肿瘤的发生、发展和转归中的运动变化规律及其内在联系,在具体研究中,多种金属微量元素的准确定性、定量和定位分析是最基本的步骤。目前,在金属微量元素的定量分析工作中可用的方法较多如:重量法,电位法,原子吸收光谱法,等离子体发射光谱法,极谱法,X线发射光谱法,电子直线加速器和核反应堆中子活化等等分析法,由于生物组织中元素含量的不均一性和生物样品本身的某些特点,多种金属元素的同步准确测定仍存在着一定的困难,在以上的分析方法中,电子直线加速器和堆中子活化是灵敏度高,探测限较低又能同步测定多种元素的分析方法,为目前较

理想的方法，但由于该二法需要特殊的设备和条件，测试费用昂贵，很难得到普及和推广。因此在多元素定量的分析中，希望有更方便，更适宜的方法出现。在金属微量元素的定位分析中，国内起步较晚，虽然我国的极少数学者在这方面有较多的研究工作，到目前，国内这方面的研究只有少数几个实验室开展，且尚属初步的工作阶段。若能在细胞和亚细胞水平观察多种微量金属微量元素的分布变化，阐明其运动的规律，将在金属微量元素调控肿瘤的研究与应用中起到积极的作用，为探索金属微量元素在生物体内的分布变化和功能状态的关系上架起一座桥梁。

3. 微量元素在中西医结合调控肿瘤研究与应用中的展望

中医学是一座伟大的宝库，已为世人所共识，金属微量元素调控肿瘤的历史与中药治疗肿瘤的历史不可分，不但具有丰富的临床经验，而且具有很多成功的验例。若运用现代的科技手段和借鉴现代医学微量元素的研究成果加以发掘并提高，不仅具有应用价值，而且具有理论意义，将会在多种疾病，特别是防治肿瘤方面开创一条新的途径。

四. 结论

1. 根据传统医学理论和实践经验设计的中西医结合方剂--铜复方具有抗肿瘤的现代实验医学依据；它具有抗实验性肿瘤的作用，不仅能显著抑制实体瘤的生长，使腹水瘤细胞损伤，瘤细胞的形态、DNA 含量和细胞增殖周期发生显著的变化，瘤细胞的增殖分化能力逆转等，而且可延长荷瘤小鼠的存活时间。以R3和R7为代表，既可显著延长荷腹水瘤小鼠的存活时间，使荷瘤机体外周血中血红蛋白、脾指数和胸腺指数升高，又具有较高的抑瘤率，是较理想的组方。

2. 铜具有显著的抑制实体肿瘤生长的作用，麝香抑制实体肿瘤生长的作用较弱，铁未见抑制实体肿瘤生长的作用。但麝香不仅可延长实体瘤小鼠的存活期，而且可加强铜和铁抑制实体肿瘤生长的作用。这些作用体现了祖国医药学理论及医疗实践的优势与特色。

3. 从微量元素医学的角度可认为肿瘤是局部金属微量元素分布代谢明

显失常，整体金属微量元素分布代谢紊乱的疾病之一，是祖国医学认识肿瘤类疾患的物质基础。

4. 铜复方具有调整肿瘤局部和全身多种金属微量元素分布，使其向正常的分布状况逆转的作用，可能是铜复方治疗肿瘤作用的物质基础，也可能为传统中医方药治疗疾病的重要途径。

参 考 文 献

1. 余桂清. 历代中医肿瘤案论选萃. 北京: 北京出版社, 1988.
2. 郁仁存 姜廷良 于尔辛. 中西医结合研究丛书 《肿瘤研究》上海: 上海科学技术出版社, 1991. 8-17
3. 傅维康. 中国古代对肿瘤的认识. 见: 中国医学百科全书《医学史》分册 上海: 上海科学技术出版社, 1986. 63-65
4. 余桂清. 有关肿瘤扶正培本研究的几个问题的探讨. 中西医结合杂志, 1985, 2(5):77
5. 应荣多. 活血化瘀治则抗肿瘤实验研究进展. 全国中西医结合防治研究肿瘤学术会议资料 1985.
6. 于尔辛 等. 中西医结合防治肿瘤的近况. 中西医结合杂志, 1985, 2(5): 72
7. Schmahl, D. 著, 林培中 唐慰慈 译. 恶性肿瘤的发生、生长和化疗. 科学出版社 1984. 1-10
8. Fiabane, A. M. and Wixliams, D. R. ed 黄仲贤 徐息良, 译. 生物无机化学原理. 上海: 复旦大学出版社, 1984.
9. Hiroshi Tomita, et al. Trace Elements in Clinical Medicine. Tokyo: Springer-Verlag, 1990. 135-426.
10. Hurley, L. S. Keen, C. L. and Lonnerdal, B. et al, ed Trace Elements in Man and Animals. New York: Plenum Press, 1988. 6
11. Gawthorne, J.M. Howell, J.McC. and White, C.L. ed. Trace Element Metabolism in Man and Animals Australian Academy of Science 1981
12. Diez, M; Arroyo, M; Cerdan, F, J et al Serum and tissue trace metal levels in lung cancer. Oncology. 1989; 46(4): 230-234.
13. Glattre, E; Thomassen, Y; Thoresen, S.O. et al. Prediagnostic serum selenium in a case-control study of thyroid cancer. Int-J -Epidemiol. 1989 Mar;18(1):45-49.
14. Fuchs, A.G.; de-Lustig, E.S. Localization of tissue copper

- in mouse mammary tumors. *Oncology*. 1989; 46(3): 183-187
15. Fuchs, A.G.; de-Lustig, E.S. Copper histochemistry of 5 murine tumors and their respective metastases., *Tumor-biol.* 1989;10(1):38-45.
 16. Gao Jin; Zhou Shu. Effects of trace metal copper and iron on HepA in mice. to be published.
 17. Pachter, H.M. ed. *Paracelsus*. New York: schumann, 1951.
 18. Lois, N. M. ed. *A History of The Life Sciences*. New York: Warcel Dekker Inc, 1979.
 19. 孔祥瑞. 必需微量元素的营养生理及临床意义. 安徽: 安徽科技出版社, 1982.
 20. Yukio Sugiura. 生体金属 Biometallochromophores 构造 and 机能 *Yakugaku Zasshi* 105 (3) 199-209, 1985.
 21. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases, *Molec. Aspects Med.*1985, vol 8:89-193
 22. 张树功, 等. 金属有机化合物的抗癌作用. 全国第三届医学微量元素学术会议论文集. 湖南, 1992. 23-33
 23. Mohan, M.et al. Synthesis, characterization, and antitumor activity of iron(II) and iron(III) complexes of alpha-N-heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones. *J. Inorg Biochem.* 1988, April; 32(4): 239-49
 24. Wieczorek, Z. et al. Oncostatic properties of the complex of bivalent copper with 3- mercapto- 2- hydroxypropyl ether of dextran(c-79). *Arch.Immunol.Ther. Exp (Warsz).* 1983; 31(5): 707-713.
 25. Treshchalina, E.M. et al. Antitumor properties of mixed coordination compounds of copper (II) and alpha- amino acids. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* 1979; 248(5):1273-6.
 26. Reiners, J.J. Jr; Colby A.B. Survey of cytotoxicities and antimutagenic and antitumor initiating activities of Cu(II) (3, 5-diisopropylsalicylate)₂ and its analogs in a keratinocyte-mediated mutation assay and the murine

- skin multistage carcinogenesis model. *Carcinogenesis*. 1988 April, 9(4): 629-32.
27. Syrkin, A.B.; Chlenova E.L. Antidotal and antineoplastic properties of copper-sulfate. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 1988 April; 105(4): 477-9.
 28. 吕维柏. 中西医结合研究方法论问题. 见: 中医学方法论研究, 济南: 山东科学技术出版社, 1985. 63
 29. 管竞环, 等. 中药无机元素与中医辨证施治关系的研究. 微量元素. 1989; 4: 30-37
 30. 韩锐 等. 恶性肿瘤的化学预防和药物治疗. 北京: 北京医科大学、协和医科大学联合出版社 1991
 31. Audrey, M. Practical methods in electron microscopy, 1974.
 32. Araki, T. et al. Hoechst 33258 fluorochrome staining for accurate determination of DNA content in single cell nuclei. *Histochemistry*. 1987; 87:331-338
 33. Ischimura, S. et al. Quantitative determination of single-stranded sections of DNA using the fluorescent probe acridine orange. *Biochim Biophys Acta*. 1971; 240: 485.
 34. 柴之芳. 活化分析基础. 北京: 原子能出版社, 1982.
 35. Howard, H. Sky-Peck. Distribution of trace elements in normal and neoplastic human tissues by energy dispersive X-ray fluorescence in XRF and PIXE application in life science. edited by Renata Moro, published by World Scientific Press, 1990. 31-42
 36. Sky-peck, H.H. Trace metals and neoplasia. *Clin Physiol Biochem*. 1986;4:99-111
 37. Valcovic, V. ed. Analysis of biological material for trace elements using X-ray spectroscopy. Boca Raton, Florida: CRC press Inc., 1980. 125-143
 38. Sky-peck, H.H. and Joseph, B.J. Determination of trace elements in human serum by energy dispersive X-ray fluorescence. *Clin. Biochem.*, 14: 126-131, 1981.
 39. Mohamed M. Molokhia, Trace elements in the lun. *Arch.*

Environ. Health. 1967; 15: 745 - 750

40. Sawicki, E. Ion chromatographic analysis of enviromental pollutants. Ann. Arbor. Science. 1978; 2: 1
41. Kage Kjellin, The determination of copper in small quantities of cerebrospinal fluid by neutron activation analysis. J. Neurochem. 1960; 6: 95 - 98
42. Olehy, D.A.; Schmitt, R.A. and Bethard, W. F. . Neutron activation analysis of magnesium, calcium, strontium, barium, manganese, cobalt, copper, zinc, sodium, and potassium in human erythrocytes and plasma. Journal of nuclear medicine. 1966; 7: 917 - 927
43. Kurt Liebscher, et al. Essential and nonessential trace elements. J.Nuclear Medicine .1968. 881 - 90
44. Smith, M.T. and Thor, H. and Jewell, S.A. et al. free radicals induced changes in the surface morphology of isolated hepatocytes. In: Donald Armstrong ed. Free radicals in molecular biology, aging and disease. New York: Raven Pree, 1984. 103-118
45. Harrison, M.F. Composition of the liver cell. Biochem J. 1953; 55:203,
46. 赤松金芳 著. 新订和汉药. P 1027-1031, P1044-1051
47. 何善元. 微量元素与健康. 见:中国医学百科全书,环境卫生学. 第一版, 上海: 上海科技出版社, 1987. 40-42

微量元素铜、铁与肿瘤研究进展

近年来,微量元素与各种肿瘤关系的研究已成为多学科中很活跃的学术领域。很多研究指出,微量元素与肿瘤的发生、发展及转归存在着极为密切的联系^[1-4]。国内外研究发现,肿瘤的发生与饮食中缺乏钼和硒有关,临床与动物研究表明,铂类和硒类的化合物具有较强的抗肿瘤活性。目前,尽管对肿瘤的发生、发展与微量元素铜和铁的相互关系以及铜和铁在肿瘤防治中的作用存在着某些争议,甚至存在着完全相反的认识,但是多数学者认为,微量元素铜、铁有如微量元素钼和硒一样,在肿瘤的发生及发展中具有重要的作用,随着多学科对铜和铁微量元素与肿瘤关系深入的研究,其复杂的生理及病理规律正逐步被阐明。

微量元素(Trace element)为占体重0.01%以下,在体内含量很低的各种元素的总称,是生物体内多种酶及其它生物活性物质的结构成份,具有重要的生理意义。目前发现人体内含有90多种元素,据其含量可分为宏量元素,如:碳、氢、氧、氮、钙、磷、镁、钠、钾、氯和硫,约占人体总重量的99.95%,其它组成元素为微量元素,如:铁、铜、锌、钴、锰、铬、钼、钒、锡、硒、碘、氟和硅等多种元素,不到总体重的0.05%,见表1。微量元素以其与人体发育的关系来分,可以分为必需微量元素,可能必需微量元素与非必需微量元素三类。按其生物学性质,目前可分为:有益元素,无害元素及有害元素三类,见表2。微量元素对生物体的作用与其作用的浓度相关,当机体缺乏时,补充缺乏的必需微量元素对维持正常生命功能的发挥非常重要。在给予超生理剂量的情况下,可干扰生命体系中存在着的固有微量元素的平衡,影响其它元素发挥正常的生理功能,形成药理效应。若剂量过大,便会对生物体产生毒性,甚至威胁到生物体的生存。其作用特点如图1所示。

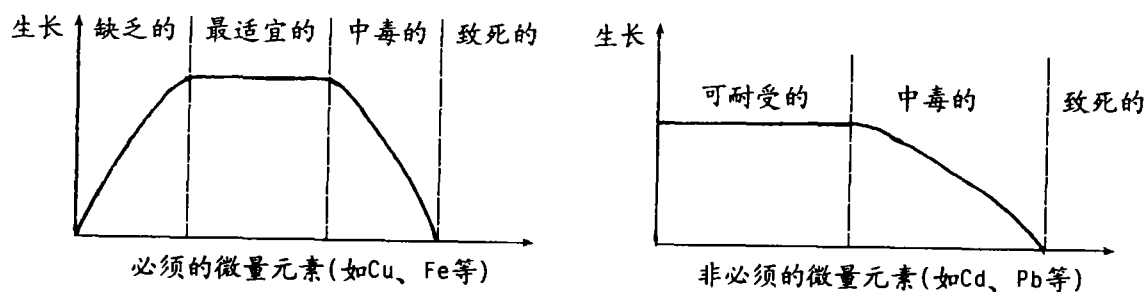


图1. 必须和非必须微量元素的缺乏和过量对有机体影响的曲线

表1. 人体内各元素的标准含量

元素	含量 (g)	占体重的比例(%)	元素	含量 (g)	占体重的比例(%)
氧	45000.000	65.0000	砷	<0.100	$<1.4 \times 10^{-4}$
碳	12600.000	18.0000	铋	<0.090	$<1.3 \times 10^{-4}$
氢	7000.000	10.0000	镉	<0.050	$<7.0 \times 10^{-5}$
氮	2100.000	3.0000	铈	<0.050	$<7.0 \times 10^{-5}$
钙	1050.000	1.5000	钛	<0.015	$<2.1 \times 10^{-5}$
磷	700.000	1.0000	镍	<0.010	$<1.4 \times 10^{-5}$
硫	175.000	0.2500	硼	<0.010	$<1.4 \times 10^{-5}$
钾	140.000	0.2000	铬	<0.006	$<8.6 \times 10^{-5}$
钠	105.000	0.1500	钒	<0.006	$<8.6 \times 10^{-5}$
氯	105.000	0.1500	铊	<0.006	$<8.6 \times 10^{-5}$
镁	35.000	0.0500	钴	<0.006	$<8.6 \times 10^{-5}$
铁	4.000	0.0057	钼	<0.005	$<7.0 \times 10^{-6}$
锌	2.300	0.0033	钴	<0.003	$<4.3 \times 10^{-6}$
铷	1.200	0.0017	铍	<0.002	$<3.0 \times 10^{-6}$
锶	0.140	2.0×10^{-4}	金	<0.001	$<1.4 \times 10^{-6}$
铜	0.100	1.4×10^{-4}	银	<0.001	1.4×10^{-6}
铝	0.100	1.4×10^{-4}	锂	$<9.0 \times 10^{-4}$	1.3×10^{-6}
铅	0.080	1.1×10^{-4}	铀	$<3.0 \times 10^{-4}$	4.3×10^{-7}
锡	0.030	4.3×10^{-5}	钒	$<1.0 \times 10^{-5}$	1.4×10^{-7}
碘	0.030	4.3×10^{-5}	铀	$<2.0 \times 10^{-5}$	3.0×10^{-7}
镉	0.030	4.3×10^{-5}	铈	$<1.0 \times 10^{-5}$	1.4×10^{-7}
锰	0.020	3.0×10^{-5}	镓	$<2.0 \times 10^{-6}$	3.0×10^{-8}
钡	0.016	2.3×10^{-5}	镭	1.0×10^{-12}	1.4×10^{-9}

表2 人体内微量元素的分类和含量

作用		金属元素	从食物及水中的摄入量 mg/日	从空气及环境的摄入量 ug/20M3	每日排泄量 mg/日	平衡结果
必需元素		铁	15.0(6.5%)*	266.00(1.74)*	接近摄入量	=
		锌	14.5(31-51)	33.80(0.23)	接近摄入量	=
		铜	1.325(32-60)	23.00(1.74)	接近摄入量	=
		锰	4.400(3-4)	28.80(0.65)	接近摄入量	=
		铬	0.245(10)	3.60(1.44)	接近摄入量	-
		钼	0.335(40-60)	0.60(0.18)	接近摄入量	=
		钴	0.390(63-97)	0.12(0.03)	接近摄入量	=
		硒	0.068(60)	0.07(0.1)	接近摄入量	=
		镍	0.600(5)	2.40(0.4)	接近摄入量	=
		钒	0.116(5)	40.00(25.6)	接近摄入量	=
		锡	7.300(2)	0.60(0.008)	接近摄入量	=
		氟	2.400(80-90)		2.380	+
		碘	0.205(100)		接近摄入量	=
		锶	1.900(17-38)		接近摄入量	=
非必需元素	可能必需	铷	1.500(90)		接近摄入量	=
		砷	1.000(5?)		<1.000	+
		硅				
	可能无害	硼	1.300(99)		接近摄入量	=
		铝	17.0 (0.1)	50.00(0.29)	接近摄入量	=
		钡	0.735(1-15)	30.00(3.90)	接近摄入量	=
有害元素		钛	1.375(1-2)	3.80(0.27)	接近摄入量	?
		铌	0.620(40-60)		接近摄入量	=
		锆	4.200(0.01)		接近摄入量	=
		铋	0.02(80)	0.76(3.66)	接近摄入量	?
		锑	<0.150(少量)	1.76(<1.67)	接近摄入量	+
		铍	0.012(0.01)	0.04(0.33)	接近摄入量	+
		镉	0.160(25.0)	7.40(4.40)	<0.160	+
		汞	0.020(5-10)	14.80(42.50)	<0.020	+
		铅	0.300(5-10)	144.00(32.50)	0.293	+

* 括号内的数字系指吸收的百分率。平衡结果：= 表示有能力保持平衡，
- 表示随年龄增加含量减少，+ 表示有蓄积倾向。

现代生物与医学的研究提示, 自由基代谢与生物体的生理和病理状态有非常密切的联系, 越来越多的证据提示: 肿瘤的发生和发展是体内自由基代谢异常的结果, 作为自由基代谢密切相关的微量元素, 特别是金属微量元素在肿瘤的发生和发展中具有明显的病理意义。自五十年代人们发现金属化合物具有抗病毒作用以来, 便开始有目的地开展金属治癌的研究。到目前金属微量元素在肿瘤发生、发展、预防和治疗中的研究及应用非常活跃, 进展很快, 不仅发现许多金属微量元素可影响肿瘤的发生与发展, 同时发现某些金属微量元素具有预防和治疗肿瘤的作用, 金属微量元素在肿瘤发生、发展及预防和治疗中的作用与影响自由基的代谢相关。大量基础和临床的工作证明, 金属微量元素铜、铁和肿瘤具有非常密切的联系, 现就微量元素铜、铁及其与肿瘤研究的近况作一介绍。

一、微量元素铜和铁的一般生理特点

1. 铁的生理特点

成年男性体内平均含铁量为4.5g, 每日从饮食中摄取大约1mg的铁, 在体内正常铁平衡状况下, 大约有与吸收同等的铁量排出体外。在哺乳动物体内, 大多数的铁以血红素与蛋白结合的形式存在, 如具有输送氧能力的血红蛋白和贮存氧的肌球蛋白, 同样也存在于多种过氧化物酶和呼吸链的细胞色素之中。在体内具有多种含铁的非血红素蛋白, 它们包括铁硫蛋白, 黄嘌呤氧化酶, 琥珀酸脱氢酶, 脂氧化酶和一些加氧酶, 这些酶类均与体内的自由基代谢关系密切。铁在细胞内以铁蛋白(Ferritin)的形式存在, 铁蛋白有24个亚单位, 形成一个外壳, 其内含有由4500个铁原子形成的氧化态水合铁微晶体核心^[5]。铁蛋白也可沉积于细胞外, 如在类风湿性关节炎患者的滑膜中可见铁蛋白沉积^[6]。当体内铁负荷过量时, 可引起含铁血黄素(hemosiderin)的堆积, 含铁血黄素为铁蛋白聚合后经溶酶体蛋白酶部分降解的产物^[7]。由于铁对组织细胞存在着潜在的毒性作用, 而且 Fe^{3+} 在水中的溶解度极低, 组织中铁含量正常生理状况下维持在一个稳定的水平。从肠道来的铁在血中与血浆糖蛋白即转铁蛋白(Transferrin)结合, 每个转铁蛋白分子具有2个与 Fe^{3+} 高度亲合的结合位点。通常转铁蛋白仅为30%左右的饱和。当低于16%时具有病理意义。此外, 体内有一种与转铁蛋白结构非常相似的乳铁蛋白, 这种蛋白只有在PH极低的条件下与铁结合, 存在于分泌

物如乳汁，泪液和中性球中^[8]。乳铁蛋白所含的铁只有在炎症部位或当中性球消化微生物时被释出，参与机体的防御反应。

机体各类组织细胞中的转铁蛋白是经受体介导，通过细胞内吞作用进入细胞，在胞浆内被转送到酸性非溶酶体泡状结构的亚细胞器中^[9]，低PH值环境易于使铁解离，解离后的铁可结合到新合成的蛋白质上或以铁蛋白贮存在细胞内。到目前关于在细胞内是否存在一个低分子量铁的贮存池，且低分子量的铁在不同池内如何转递的情况尚不完全明了^[6, 10, 11]。一些研究指出，可能有一个贮存低分子量铁的池，其内铁可能与如ADP或枸橼酸等物质以结合状态存在^[12, 13]。这个设定常常用来解释细胞毒的自由基反应过程。低分子量的铁在体内铁过量负荷时可在细胞外发现，如血色素沉积症^[14]，但它在细胞外的存在是不确定的。Halliwell, Gutteridge及其合作者，采用博来霉素结合分析法测定了细胞外液中摩尔浓度的铁。但这些结果所反映的问题较复杂，这些铁是低分子量铁还是促酶活性物质中的铁尚不能定论。

近年来随着自由基医学的发展，铁在自由基反应过程中的作用受到重视。研究表明，乳铁蛋白和转铁蛋白的生理学意义主要是羟自由基(.OH)产物的生理催化剂。铁蛋白虽然认为是一个安全的铁贮存形式，但铁蛋白能促使 O_2^- 和 H_2O_2 形成.OH自由基^[15]。若铁蛋白沉积组织细胞周围产生较多的 O_2^- 和 H_2O_2 ，可引起广泛的组织损伤。含铁血黄素也参与.OH的生成，但其活性较铁蛋白为弱，机体内存在使铁蛋白变成含铁血黄素的机制，可能是生物体自我保护机制的完善。血红素是Fenton反应的催化剂，也参与机体自由基的生成^[15]。

铁的各种形式在体内参与各类氧化还原反应，有些反应属于正常的生理过程，但某些反应能引起组织损害和细胞死亡。自由基反应在体内可由低分子量铁介导产生，也可由体内各种含铁蛋白引发。血色素蛋白和铁或铜催化的自氧化反应是生物体内自由基的主要来源，自氧化产生的自由基可与铁和过氧化氢进一步反应，生成羟自由基和活性铁产物或引起大分子不饱和脂质的过氧化。转铁蛋白和乳铁蛋白结合的铁是无活性的，在控制铁介导的自由基反应方面很重要。在细胞内的铁以铁蛋白形式存在，虽然被铁蛋白的壳所包被，但自由基反应体系仍能使铁从铁

蛋白中释放出来，参予进一步的自由基反应^[16]。

2. 铜的生理特点

成人体内含有 80mg 的铜，来源于饮食中的铜主要在胃和十二指肠与氨基酸或小分子肽结合后被吸收，铜吸收到体内后，经血液中能和铜和氨基酸二种物质特异结合的白蛋白结合后一起转运到肝脏。再与血浆铜兰蛋白结合后释放到循环中。有研究指出，循环中除血浆铜兰蛋白 (Ceruloplasmin) 结合铜外，白蛋白，转铜蛋白和一个低分子蛋白均具有结合和输送铜的作用^[17]。人血浆铜兰蛋白是一个主要含铜蛋白，每分子能结合 6-7 个铜原子，结合的铜原子在 PH 较低和一个还原物质存在时可从血浆铜兰蛋白中释出。血浆铜兰蛋白是机体组织细胞的主要供铜体。人体组织中，铜是某些酶的重要组成，目前发现在细胞色素氧化酶，过氧化物歧化酶，多巴胺-β-羟化酶等十二种酶中均含有铜。

铜在体内以离子状态存在，是重要的金属自由基。在体内可和各种氧化酶结合后形成活性中心，促进分子氧的缓慢氧化作用。血浆铜兰蛋白被认为是一个铁氧化酶，它可将 Fe^{2+} 转变成 Fe^{3+} 使铁易于和转铁蛋白结合，血浆铜蛋白所具有的铁氧化酶作用与 O_2^- 或 $\cdot\text{OH}$ 自由基的生成无关。同时它具有抑制 Fe^{2+} 依赖的自由基的生成，是细胞外一个重要的抗氧化剂。相反，铜离子与白蛋白或氨基酸结合后仍能 和 O_2^- 或 H_2O_2 发生作用，形成 $\cdot\text{OH}$ 自由基或一些相似的反应产物。与铜结合的 DNA、病毒或酶能引起位点特异的氧自由基损伤。由此可见，血浆中白蛋白结合铜离子的能力是一种重要的生物保护机制，在血中高浓度的血浆血蛋白可能防止铜离子接合到机体其它易受损害的部位，如细胞膜上，即使血中 O_2^- 或 H_2O_2 由于巨噬细胞活化后产生增加， $\cdot\text{OH}$ 自由基在结合的白蛋白上产生增加对白蛋白产生损害，但这种损害不具有重要的生物学意义，因血中含有大量的白蛋白供替补。

二、肿瘤的发生发展与微量元素铜铁的联系

1. 微量元素铜、铁与肿瘤的发生

国内引大量的研究表明，环境中微量元素铜、铁与肿瘤的发生关系密切^[18]。在南非，缺乏钼、铜和铁导致咽喉癌；我国广东某些地区为鼻咽癌高发区，发现食物中铜含量下降。在英美铁矿工人中肺癌的发

病率增高,比一般正常人肺癌的死亡率高70%。在我国江苏启东肝癌高发区土壤中含铁量增多。南冰岛胃癌高发区的土壤中含铁锌较多。在波兰居民中肿瘤和白血病的发生一方面与致癌性的不完全菌属有关,同时与环境缺乏铜,铁与镁联系在一起。

目前认为癌的发生是一个多阶段的渐进过程,在癌的形成过程中自由基起了重要的作用,环境中微量元素铜和铁的变化,含影响到体内铜和铁的平衡,铜和铁属于过渡金属元素,在体内具有广泛的生理作用,特别是参予氧代谢,与自由基的关系密切,铜、铁对癌症发病的影响中可能与铜和铁影响自由基代谢相关。

2. 微量元素铜、铁在肿瘤发展中的生物学意义

很早便有人发现血清铜在支气管癌,咽鳞状上皮癌,盆腔和其它生殖系统肿瘤,膀胱癌,乳腺癌,淋巴瘤以及白血病患者的体内升高^[19-20]。在结肠癌和乳腺癌细胞株中,血浆铜兰蛋白的基因表达增强^[21]。铜阳性染色与肿瘤的恶性程度平行^[22],在人体某些肿瘤组织中含铜量较正常组织增多^[23-24],铜在某些肿瘤中的染色可作为分化的指标之一^[25]。血浆中不仅血浆铜兰蛋白升高,而且转铜蛋白,白蛋白也升高^[17];在乳癌细胞株,转铁蛋白受体较正常少,不受体内铁过载的调节,瘤细胞中可见异型铁蛋白升高^[26]。研究发现,在某些肿瘤如恶性黑色素瘤,精原细胞瘤和急性髓巨细胞白血病可产生和分泌血清铁蛋白,这种物质可为肿瘤的监控提供帮助。在癌组织中的异型酸性铁蛋白可作为临床上肿瘤诊断的重要标志^[27]。我们的实验表明,小鼠荷瘤后三周,血浆中铜、铁的含量均升高。在血球中,铜的含量下降。全身组织铜含量除脾脏外均下降。可能与苏联学者提出的“铜饥饿代偿反应”有关。近年来人们发现除肿瘤外,在各种感染,急性心肌梗塞或手术等等应急情况下血清铜也增多,可能与机体应急有关^[28]。

目前关于肿瘤与血清及全身各组织中铜和铁变化的机制尚不十分明了,在临床上,某些学者提出血中铜、铁的变化可用来帮助诊断肿瘤,判断肿瘤的大小和治疗效果,并用于肿瘤病人的预后判定^[29-42]。同时也将体内铜铁的储存状况,特别是血铜及铁的变化作为患癌的危险因子^[42-43]。

3. 铜铁微量元素在肿瘤防治中的应用。

国内外关于金属铜和铁抗癌的研究较多^[44]。日本学术kamamote于1973年报道, cupric Acetate能预防化学物质在大鼠诱发肝癌, 山本慧指出大分铜有机化合物能预防化学物质在小鼠皮肤诱发肿瘤。铜和铁能增强某些化疗药对肿瘤的杀灭作用。苏联学者 shchepotin 和同士将血浆铜蓝蛋白首次和多项化疗合用来治疗胃癌收到一定疗效^[45]。在体内, 铜, 铁离子可加强多种细胞毒剂的杀肿瘤作用^[46-48]。

铜和铁化合物抗癌的研究自五十年代开始, 先后发现多种具有抗癌活性的化合物。如 CuDIPS, CuATP, Cu- amino acid, 羧基铁等等大分子铜和铁化合物外^[49-59], 某些小分子化合物如硫酸铜, 乙酸铜等多种低分子化合物同样具有抗实验肿瘤活性^[60-61]。低分子铁化合物到目前未见具有抗肿瘤活性的报道。

我们的研究发现, 乙酸铜具有抗肿瘤作用可能与直接的细胞毒和促肿瘤细胞分化相关。铁剂虽无抗肿瘤活性, 但能加强铜的抗肿瘤活性。此外, 传统中药中某些药物也能显著加强铜的抗肿瘤活性。铜和铁剂合用也可产生明显的抑制肿瘤生长的作用^[62]。

4. 铜和铁微量元素在防治肿瘤中的可能机制

多数癌症的发生与线粒体的异常相关, 在肿瘤起源上线粒体较细胞核更重要。线粒体被誉为真核细胞的动力站, 在哺乳动物大于90%的氧被线粒体消耗, 在线粒体丙酮酸盐, 脂肪酸, 碳水化合物, 氨基酸和辅酶被氧化, 最终产生CO₂和 H₂O伴随着释放巨大的能量。线粒体是自控细胞器, 具有自身的 DNA, 能指导合成一些线粒体蛋白。线粒体的 DNA非常易受攻击, 而修复能力较差。在线粒体膜上含有较多的多链不饱和酸, 且对自由基和亲自由基物质的代谢易惑, 细胞从正常向恶性转化起源于线粒体的损害, 氧自由基从细胞电子传递体系中外漏可为引起癌变的第一步。经过二次促癌剂使癌细胞活化, 增殖成为癌。

关于铜和铁的抗癌机制虽然研究很少, 但微量元素铜和铁在体内与线粒体关系密切。其抗癌和防癌可能与影响线粒体的功能和代谢有关。有研究表明, C-UFAS(cis-unsaturated fatty acids) 具有在体外选择杀肿瘤细胞作用, 这种作用与瘤细胞和正常细胞脂肪酸的摄取和分布不同有关, 铜和铁能够加强和促进C-UFAS的肿瘤杀伤作用, 这种作用是自

由基介导的^[63]。有研究表明,在肿瘤细胞的增殖过程中需要较多的铁,若抑制癌细胞对铁的摄取可产生明显的抑制肿瘤的作用,如果肿瘤中的铁过量,可能引发自由基的反应使肿瘤细胞被杀灭^[64]。我们的工作发现给铁与麝香或铜的合剂后,肿瘤的生长受到抑制,可能与肿瘤细胞中铁代谢紊乱有关。这可能为铜和铁抗癌一个机制。我们同时研究发现,铜、铁对癌细胞的线粒体和核有明显的影响,这种作用的详细机制尚待进一步探求。

三、展望:

微量元素铜和铁在肿瘤发生,发展中的作用,存在大量的未知和争论,我们研究表明,在肿瘤中铜和铁微量元素的变化并不是孤立存在的,在治疗肿瘤中,调整铜、铁和相关其它金属元素的分布在肿瘤的治疗中可能有价值。从分子水平、元素水平深入揭示铜、铁与肿瘤的关系,可能对今后肿瘤学的研究产生一定影响。

参 考 文 献

1. Renata Moro ed. XRF and PIXE applications in life science World scientific press 1989, 29 - 42
2. Hurley - LS, Keen - CL, Lonnerdal - B et al. Trace element in man and animals. Plenum, 1987. 239 - 280
3. 全国第四届医学微量元素及全国第二届锗的研究及应用学术会议论文集. 秦皇岛, 1993. 226 - 234
4. 高锦, 周舒铜铁微量元素与肿瘤的实验研究资料. 待发表
5. Harrison - PM. Ferritin: An iron - storage molecule. Sem. Hematol. 1977. 14: 55 - 70
6. Biemond - P, Sweak - AJG, VannEijk - HG et al. Superoxide dependent iron release from feritin by superoxide devived from stimulated poly morphonuclear leucocytes. possible mechanism in inflammation diseases. J. Clin. Invest. 1984. 73: 1576 - 1579
7. O' connell - M, Halliwell - B, Moorhouse - CP et al. Formation of hydroxyl radicals in the presence of ferritin and hemosiderin. Ishemosiderin formation a biological protective mechanism?

- Biochem. J. 1986. 234: 727 - 731
8. Aisen - P, Listowski - I. Iron transport and storage protein. Ann. Rev. Biochem. 1980. 49: 357 - 393
 9. Octare - JN, Schneider - YJ, Trouet - A; et al. Iron uptake and utilization by mammalian cells. I: Cellular uptake of transferrin and iron. Trends. Biochem. Sci. 1983. 8: 217 - 220
 10. Aust - SD, Morehouse - LA, Thomas - CE. Role of metals in oxygen radical reactions. J. Free Rad. Biol. Med. 1985. 1: 3 - 25
 11. Halliwell - B, Gutteridge - JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals, and disease. Biochem. J. 1984. 219: 1 - 14
 12. Jacobs - A. Low molecular weight intracellular iron transport. compounds. Blood. 1977. 50: 433 - 439
 13. Malligan - M, Althaus - B, Linder - MC et al. Nonferritin, Nonheme iron pools in rat tissues. Int. J. Biochem. 1986. 18: 791 - 8
 14. Hershko - C, Peto - TEA. Non - transferrin plasma iron. Br. J. Hematol. 1987. 66: 149 - 151
 15. Halliwell - B, Gutteridge - JMC. The important of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. 1985. 13: 91 - 155
 16. Monteiro - HP, Winterbourn - CC. The superoxide - dependent transfer of iron from ferritin to transferrin. Biochem. J. 1989. 256: 923 - 928
 17. Wirth - PL, Linder - MC. Distribution of copper among components of human serum. J. Natl. Cancer Inst. 1985. 75 (2): 277 - 84
 18. Gerhardsson - L, Brune - D, Nordberg - GF et al. Occupation - related cancer in a Nordic copper smelter. Arctic Med. Res. 1988. suppl 1: 628 - 31
 19. Gorodetsky - R, Fuks - Z, Sulkes - A. Correlation of erythrocyte and plasma levels of zinc, copper, and iron with evidence of metastatic spread in cancer patients. Cancer. 1985. 55 (4): 779 - 87
 20. Murphy - P, Wadiwala - I, Sharland - DE et al. Copper and zinc levels in "healthy" and "sick" elderly. J. Am. Geriatr. Soc. 1985. 33 (12): 847 - 9

21. Kunapuli – SP, Singh – H, Singh – P et al. Ceruloplasmin gene expression in human cancer cells. *Life Sci.* 1987. 40 (23): 2225 – 8
22. Fuchs – AG, de – Lustig – ES. Localization of tissue copper in mouse mammary tumors. *Oncology.* 1989. 46 (3): 183 – 7
23. Bedrick – AE, Ramaswamy – G, Tchertkoff – V. Histochemical determination of copper, zinc, and iron in some benign and malignant tissues. *Am. J. Clin. Pathol.* 1986. 86 (5): 637 – 40
24. Margalioth – EJ, Schenker – JG, Chevion – M. Copper and zinc levels in normal and malignant tissues. *Cancer.* 1983. 52 (5): 868 – 72
25. Fuchs – AG, de – Lustig – ES. copper histochemistry of 5 murine tumor and their respective metastases. *Tumour Biol.* 1989. 10 (1): 38 – 45
26. Shterman – N, Kupfer – B, Moroz – C et al. Comparison of transferrin receptors, iron content and isoferritin profile in normal and malignant human breast cell lines. *Pathobiology.* 1991. 59 (1); 19 – 25
27. Linkesch W. Serum ferritin – its diagnostic relevance and clinical significance. *Acta Med. Austriaca* 1984. 11 (3 – 4): 79 – 89
28. Molteni – A, Ward – WF, Kim – YT et al. Serum copper concentration as an index of clinical lung injury. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1989. 258: 273 – 85
29. Coates – RJ, Weiss – NS, Daling – JR et al. Cancer risk in relation to serum copper levels. *Cancer Res.* 1989. 49 (15): 4353 – 6
30. Blakley – BR. Influence of copper and zinc on urethan – induced adenoma development in mice. *Drug Nutr. Interact.* 1988. 5 (4): 395 – 401
31. Follezou – JY, Bizon – M. Cancer chemotherapy induces a transient increase of serum – iron level. *Neoplasma.* 1986. 33 (2): 225 – 31
32. Kok – FJ, Van – Duijn – CM, Hofman – A et al. Serum copper and Zinc and the risk of death from cancer and cardiovascular disease. *Am. J. Epidemiol.* 1988. 128 (2): 352 – 9
33. Sexena – SP, Shukla – VK, Sharma – SP et al. A diagnostic &

prognostic evaluation of serum copper levels in malignancies.

Indian J. Med. Res. 1988. 87: 56 – 8

34. Ebadi – M, Swanson – S. The status of zinc, copper, and metallphthionein in cancer patients. Prog. Clin. Biol. Res. 1988 259: 161 – 75
35. Dabek – JT, Hyvonen – Dabek – M, Wakabayashi – K et al. Evidence for increased non – ceruloplasmin copper in early – stage human breast cancer serum. Nutr. Cancer. 1992. 17 (2): 195 – 201
36. Beguin – Y, Bury – J, Delbrouck – JM et al. Serum zinc and copper as prognostic factors in acute nonlymphocytic leukemia. Hematol. Bluttransfus. 1987. 30: 380 – 4
37. Van – Eys – J. The pathophysiology of undernutrition in the child with cancer. Cancer. 1986. 58 (8): 1874 – 80
38. Follezou – JY, Bizon – M. Cancer Chemotherapy induces a transient increase of serum – iron level. Neoplsma. 1986. 33 (2): 225 – 31
39. Kletter – G, Parks – BR – Jr, Bhathagar – A et al. Elevated serum iron levels following administration of cisplatin. Oncology. 1988. 45 (6): 421 – 3
40. Stevens – RG, Jones – DY, Micozzi – MS et al. Body iron stores and the risk of cancer. New Engl. J. Med. 1988. 319 (16): 1047 – 52
41. Chakravarty – PK, Chowdhury – JR. Serum copper in malignant neoplasia with special reference to the cervix uteri. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1984. 108 (3): 312 – 5
42. Anastasatu – C, Morgenstern – H, Vasile – DI et al. The Cu/Fe ratio and its significance in the pathiogenesis, diagnosis and prognosis of bronchopulmonary cancer. Peumoftiziologia. 1991. 40 (1): 41 – 5
43. Weinberg – ED. Iron in neoplastic disease. Nutr. Cancer . 1983. 4 (3): 223 – 33
44. Reiners – JJ – Jr, Colby – AB. Survey of cytotoxicities and antimutagenic and antitumor initiating activities of Cu (II) (3, 5 – diisopropylsalicylate)₂ and analogs in a keratinocyte

- mediated mutation assay and the murine skin multistage carcinogenesis model. *Carcinogenesis*. 1988. 9 (4): 629 - 32
45. Shchepotin - IB, Chernyi - VA, Berdinskikh - Nk. The use of ceruloplasmin in combination with adjuvant polychemotherapy in stomach cancer. *Vrach. Delo*. 1991. 3: 24 - 27
 46. Inoue - S, Yamamoto - K, Kawanishi - S. DNA damage induced by metabolites of o - phenylphenol in the presences of copper (II) ion. *Chem. Res. Toxicol*. 1990. 3 (2): 144 - 9
 47. Halliwell - B, Aruoma - OI, Mufti - G et al. Bleomycin - detectable iron in serum from leukaemic patients before and after chemotherapy. Therapeutic implications for treatment with oxidant - generating drugs. *FEBS - Lett*. 1988. 241 (1 - 2): 202 - 4
 48. Ujjani - B, Lyman - S, Winkelmann - D et al. Enhancement of cytotoxicity of bleomycin by dithiocarbamates: formation of bis (dithiocarbamato)cu (II). *J. Inorg. Biochem*. 1990. 38 (1): 81 - 93
 49. Mohan - M, Kumar M, Kumar A et al. Synthesis, characterization, and antitumor activity of iron (II) and iron (III) complexes of alpha - N - heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones. *J. Inorg. Biochem*. 1988. 32 (4): 239 - 49
 50. Mioduszewski - JZ. Oncostatic properties of the complex of bivalent copper with 3 - mercapto - 2 - hydroxypropyl ether of dextran (C - 79).
 51. Patil - BG, Havinale - BR, Shallom - JM et al. Syntheses and spectroscopic studies of potential antitumor copper (II) complexes with 5 - phenylazo - 3 - methoxy salicylidene thiosemicarbazone and N4 substituted thiosemicarbazones. *J. Inorg. Biochem*. 1989. 36 (2): 107 - 13
 52. Elo - H, Lumme - P. Antiproliferative activity of derivatives of trans - bis (salicylaldoximato) copper (II) in vitro. some in vivo properties of the parent compound.
 53. Treshchalia - EM, Konovalova - AL, Presnov - MA. Copper (II) glycinate - L - serinate - - a representative of new class of

- antitumor preparations. Vestn. Akad. Med. Nauk. SSSR. 1986. 5: 51 – 6
54. Antholine – WE, Knight – JM, Petering – DH. Inhibition of tumor cell transplantability by iron copper complexes of 5 – substituted 2 – formylpyridine thiosemicarbazones. J. Med. Chem. 1976. 19 (2): 339 – 41
55. Crispens – CG – Jr, Sorenson – JR. Evaluation of combinations of CuDIPS, Tween 80 and cyclophosphamide as therapy for reticulum cell sarcoma in SJL/J mice. Anticancer Res. 1989. 9 (2): 357 – 9
56. Nayak – KK, Maity – P, Bhattacharyya – R et al. Antitumor activities of copper – ATP complex on transplantable murine lymphoma. Pharmacology. 1990. 41 (6): 350 – 6
57. Treshchalia – EM, Matveichuk – NV, Gudratov – NO et al. Characteristics of the mechanism of action of complex copper (II) compounds with alpha – amino acids. Biull. Eksp. Biol. Med. 1985. 99 (1): 86 – 8
58. Treshchalia – EM, Konovalova – AL, Presnov – MA et al. Antitumor properties of mixed coordination compounds of copper (II) and alpha – amino acids. Dokl. Akad. Nauk. SSSR. 1979. 248 (5): 1273 – 6
59. Pressina – A, Brambilla – P, Balzarini – D. Inhibition of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) growth by carbonyl iron. Experientia. 1978. 34 (11): 1518 – 9
60. Syrkin – AB, Chlenova – EL. Antidotal and antineoplastic properties of copper sulfate. Biull. Eksp. Biol. Med. 1988. 105 (4): 477 – 9
61. Zhou Shu, Chi Yongchun, Gao Jin. Antitumor activities of acetate cupric. to be published.
62. Gao Jin, Zhou Shu. Antitumor effects of recipes made of copper. iron and moschus in mice bearing HepA. to be published.
63. Das – UN. Tumoricidal action of cis – unsaturated fatty acids and relationship of free radicals and lipid peroxidation. Cancer Lett. 1991. 56 (3): 235 – 43

64. Fuentealba - I, Haywood - S, Foster - J. Cellular mechanism of toxicity and tolerance in the copper - loaded rat. II. Pathogenesis of copper toxicity in the liver. Exp. Mol. Pathol. 1989. 50(1): 26 - 37

提交全国会议的研究论文

1. 高锦 陈雨亭 周舒. 用ESR 观察微量元素铜伍用通经药抗癌方剂对小鼠肿瘤组织自由基代谢的影响.
第三届全国医学微量元素学术研讨会. 湖南,1992.
2. 高锦 周舒. 微量元素铜、铁方剂及其抗实验肿瘤效果的研究.
第三届全国医学微量元素学术研讨会. 湖南,1992.
3. 王珂 侯小琳 高锦 周舒. 荷瘤及治疗后小鼠各组织中微量元素分布的研究. 第三届全国医学微量元素学术研讨会. 湖南,1992.
4. 高锦 周舒 杜皓萍等. 离子色谱在微量元素铜和铁中西医结合抗肿瘤研究中的应用. 第四届全国医学微量元素学术研讨会. 秦皇岛,1993.
5. 高锦 周舒 杜皓萍,等. XRF 在荷瘤及含微量元素抗肿瘤方剂治疗后小鼠骨骼微量元素分布的研究.
第四届全国医学微量元素学术研讨会. 秦皇岛,1993.
6. 周舒 高锦 杜皓萍. 微量元素铜在中西医结合抗癌中的意义及实验研究. 第四届全国医学微量元素学术研讨会. 秦皇岛,1993.
7. 高锦 周舒. 微量元素铜、铁联合及其配伍中药麝香抗实验肿瘤效应的研究. 全国中西医结合大会. 北京,1993.
8. 周舒 迟永春 高锦,等. 微量元素铜、铁与中药结合抗癌的实验研究. 全国中西医结合大会. 北京,1993.

进展中研究:

1. 肿瘤及其来源组织亚细胞结构中多种微量元素分布的研究
2. 铜和铁微量元素联合中药对荷瘤小鼠各器官及肿瘤组织细胞亚细胞结构中微量元素分布的影响

以上课题被中科院北京电子显微镜实验室(科学院开放实验室)接纳为合作项目, 目前正在进行。

研究者: 高锦 邢力 潘东日 徐伟 周舒

微量元素铜、铁及其不同比例配伍的急性毒性研究

铜和铁与肿瘤的发生、发展与转归关系密切, 中医抗肿瘤方药中常选用富含微量元素铜与铁的药物, 为了合理地应用铜和铁微量元素, 我们观察了铜和铁微量元素对小鼠的急性毒性, 旨在为抗肿瘤组方中铜和铁微量元素的用量提供依据。

1. 材料和方法:

动物: 昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重为18-22g, 由本所动物实验室提供。

药品: 微量元素铜为 Cupric acetate (北京化工厂化学纯产品) 的离子。微量元素铁为 Ferric citrate (Sigma Co.) 的离子。

药品剂型及给药方法: 将铜、铁化合物配成水溶液, 给小鼠灌胃给药。

实验方法: 先将各种药剂的LD0 和LD100 求出后, 按孙氏改进寇氏法测定其 LD50和 LD95。 计量小鼠给药后的死亡时间。

2. 结果

2.1. 不同季节微量元素铜和铁对小鼠的急性毒性有影响。见表1.

表1. 小鼠不同季节微量元素铜和铁的 LD50 ($LD50 \pm L5, mg/kg$)

微量元素	春季(四月)	秋季(十月)	冬季(一月)
铜	153.15 ± 15.82	117.79 ± 11.99	98.25 ± 20.51
铁	163.32 ± 15.65	119.42 ± 13.20	95.42 ± 11.91

2.2. 相同季节微量元素铜和铁对小鼠的急性毒性无影响。见表2.

表2. 小鼠相同季节微量元素铜和铁的LD50 (LD50±L5,mg/kg)

微量元素	April 6,1991	March 30,1991	Feb. 6,1991	Feb. 5,1991
铜	153.15±15.82	153.22±18.18		
铁			95.42±11.91	89.24±11.21

2.3. 同一季节微量元素铜和铁多种比例配伍对小鼠的急性毒性以铜和铁比为 4:1为最高, 以 1:2为最低。见表3。

表3. 小鼠同一季节微量元素铜和铁多种比例配伍的LD50(mg/kg)

微量元素	铜: 铁						
	1:1	1:2	1:4	1:8	8:1	4:1	2:1
铜	106.53	76.29	33.35	18.37	176.00	123.20	111.92
铁	106.53	152.58	133.38	146.93	22.00	30.80	55.96
总量	213.06	228.87	166.73	165.30	198.00	154.00	167.88

2.4. 给予铜和铁微量元素及不同比例各种配伍后, 小鼠死亡时间均在12小时之内, 多数动物的死亡时间为给药后 2小时之内; 小鼠致死原因可能为对中枢神经系统的毒性而致的呼吸、循环系统衰竭。

3. 结论

- (1) 在不同季节铜和铁对小鼠的急性毒性有明显的变化, 其中冬季毒性较春秋季节为高, 春季的毒性最低。
- (2) 铜和铁配伍后对小鼠的毒性降低, 其中铜和铁1:2 配伍后的毒性最低, 4:1最高。

后 记

三年攻读博士的学习及研究生活即将结束,在此,深深感谢培育我成长的院所各位师长、领导及其在工作中给予真挚帮助的同志们,特别是我的导师,如果没有周老师在学业上的精心指导,研究工作上的竭力支持和生活上无微不至的关怀,很难想象学业的圆满完成和研究工作中的每一分成绩。

病理生理研究室全体师长和同事们在三年学习及工作中给予了很多指导和热忱帮助,特别是本组迟永春付研究员,杜浩萍、徐梅、万方技师、邵金莺老师等在学习和研究工作中的具体帮助和指导。本院病理科王泰龄教授,本所赵天德研究员,王石麟副研究员,及吴傲、陈子馨两位老师,在本题形态学研究中给予精心指导和热忱帮助。本所彭俊云研究员和李茜同志指导并协助用MPV3测量瘤细胞DNA含量。

图书馆的各位师长和同志们,特别是高琳同志在工作中给予的大力帮助和支持,得以顺利完成与本题相关的大量文献工作。本院信息中心和计算机室的各位师长和同志们给予热忱帮助,特别是王松柏同志在繁忙的工作中抽出宝贵时间指导并帮助进行了大量的数据分析和计算。

本院药学部常明同志曾指导并帮助进行腹水及肿瘤细胞中元素的原子吸收光谱测定。中国原子能科学研究院姚历农研究员,张蕴辉副研究员,王珂副研究员,陈连仲副研究员,侯小琳硕士,孙秀峰,马桂兰,李贵群,高宏等各位老师和同志们在元素的分析测试工作中给予了精心指导及帮助,使本课题微量金属元素分布的工作得以顺利完成。中科院北京电子显微镜实验室郭可信教授,徐伟教授,邢力和潘东日两位同志在本题深入研究工作中给予了大力的支持,精心指导和热忱帮助使我在学业和研究工作两方面得到严格的训练和培养,受益很深。中国中医研究院细胞室刘铭福同志在瘤细胞周期分析研究中给予一定的帮助。

在本课题的实施过程中不仅凝结了研究者本人的极大努力和发奋的工作,同时也离不开院内外大量中医、西医、和其它学科专家和同道们的支持,以及他们热忱的指导和帮助。特别令人难忘的是医学界的老前辈如辛育龄教授、鲍镇美教授等等专家在我三年学习及研究中给予的关

怀和指导，使我在学业上受益很大。药物所多位专家对本论文进行具体的指导并提出宝贵意见，使我对中西医结合工作的认识有了很大的提高。多位学友给予很多具体的帮助，在此未能一一列出。最后谨向所有指导和帮助的师长、同学和同志们表示衷心的感谢并致以崇高的敬意。