

肝康冲剂抑瘤作用观察及机理探讨

李 杰 孙桂芝 朴炳奎 陈长怀(中国中医研究院广安门医院肿瘤科 北京 100053)
刘玉琴 顾 蓓 薛克勋 高 进(中国医学科学院基础理论研究所 北京 100005)
苑景春 李 江 陆丽珠(中国中医研究院广安门医院制剂室 北京 100053)

摘要 观察肝康冲剂对动物移植性肿瘤 S₁₈₀、H₂₂的抑瘤作用,并对肝康冲剂的作用机理进行了探讨。结果显示:肝康冲剂对 S₁₈₀、H₂₂具有一定的抑瘤作用,其作用机理与提高荷瘤小鼠的免疫功能,阻滞 G₀/G₁ 期细胞进入 S 期有关。

关键词 肝康冲剂 免疫功能 细胞周期

Studies on the Mechanism of Gankang Granules (GKG) Anti-tumor Action

Li Jie, Sun Guizhi, Piao Bingkui, Chen Changhuai

(Guanganmen Hospital, China Academy of TCM, Beijing, 100053)

Abstract: Using the flow cytometry and other techniques, we observed the effects of GKG on growth of murine transplantable tumor, and also on immunological function of tumor-bearing animals and DNA synthesis to explore the mechanism of its anti-tumor action. The results showed that GKG could exhibit antitumor effect on S₁₈₀ and H₂₂ in mice, and enhance the immunological function of animals by increasing NK cell activity and change the proportion of subgroups of lymphocytes and prevent tumor cells going from G₀/G₁ stage into S-stage.

Key words: Gankang Granules, immunological functions, cell cycle

肝康冲剂是我科多年治疗肝癌的有效方剂,临床应用取得了改善症状、稳定瘤体、延长生存期的良好效果。本文通过采用流式细胞仪动态观察了肝康冲剂对带瘤机体免疫功能及肝癌细胞 DNA 合成的影响,对肝康冲剂作用机理进行了探讨。

1 材料

1.1 动物 雄性近交系 615 小鼠及远交系昆明种小鼠 18g~22g, 4~6 周龄, 中国医学科学院医学动物研究所提供。

1.2 瘤株 小鼠肝癌(H₂₂), 小鼠肉瘤 180(S₁₈₀)。中国医学科学院基础医学研究所病理

室实验肿瘤组提供。

1.3 肿瘤细胞系 小鼠成纤维细胞 L₉₂₉ (NK 细胞敏感细胞株) 中国预防医学科学院病毒研究所提供。

1.4 药物 中药肝康冲剂(由生黄芪、白术、三七、藤梨根、八月扎、炮山甲、鳖甲组成,上方中三七粗打成渣,醇浸后回流 2 次,滤过,滤液备用;药渣与其余诸药加水煎煮 2 次,滤过,滤液浓缩后醇沉,取上清,与三七醇回流液合并,回收乙醇,浓缩至稠膏,加入适量糊精混匀,干燥后粉碎,按粉膏法制颗粒,干燥,整粒,分装,每袋 9g,相当于含生药量 44.55g,临床每次 1 袋,每日 2 次,1 个月为 1 疗程)。实验用水煎剂为褐色液体,首先将三七制成粗渣,与诸药浸泡后,水煎 2 次,合并煎液,静置后取上清液浓缩,终浓度相当生药 4g/ml,以上药物均由我院制剂室提供。化疗药物 速溶型阿霉素,意大利爱宝大药厂生产,批号:4025BA。

1.5 培养液及试剂 RPMI-1640 培养基: RPMI 培养干粉(GIBCO 产品)双蒸水配制,内含 2mM 谷氨酰胺,青霉素 100U/ml,链霉素 100μg/ml,应用时再加入 10%灭活的小牛血清。MEM 培养基: MEM 培养干粉(GIBCO 产品),双蒸水配制,内含青霉素 100U/ml,链霉素 100μg/ml,应用时加入 2mM 谷氨酰胺,12%灭活的小牛血清。四甲基偶氮唑盐(MTT): Sigma 公司,用 0.02M PBS 液配制 5mg/ml 储存液,过滤除菌,4℃冰箱保存备用。碘化丙啶(Propidium Iodide PI),RNAA 酶和吖啶橙(Acridine Orange AO) 美国 Sigma 公司产品。Anti-lyt₂(大鼠抗小鼠 CD₈ 抗原的单克隆抗体),Anti-L₃T₄(大鼠抗小鼠 CD₄ 抗原的单克隆抗体)及兔抗大鼠的荧光抗体,北京医科大学免疫教研室提供。

1.6 主要仪器 酶标仪(Microplate AUTO Reader)EL311 美国 BIO-TEK 公司生产。FACsort 流式细胞仪(美国 Becton-

Dicknson)公司生产。

2 实验方法

2.1 抑瘤作用 按常规方法^[1],在无菌条件下选择生长良好的 H₂₂,S₁₈₀ 瘤株,通过 100 目不锈钢筛网研磨成单个瘤细胞悬液,调整计数 5×10^6 /ml,取 0.2ml 接种于每只小鼠右腋皮下,其中 H₂₂ 接种于 615 小鼠,S₁₈₀ 接种于昆明种小鼠。24h 后称重随机分为 4 组:①肝康冲剂分为高、中、低 3 个剂量组,分别灌服相当于原生药量 4g/ml、3g/ml、2g/ml 的肝康冲剂水煎药液,每日 1 次,每次每只小鼠 0.3ml,连续 10d。②阿霉素组:接种次日起隔日腹腔注射阿霉素稀释液 0.2ml(1.5mg/ml),共 5 次。③肝康冲剂+阿霉素组:肝康冲剂(3g/ml)和阿霉素(1.5mg/ml)联合用药,给药方式同①、②。④对照组:每日灌服生理盐水 0.3ml/只。接种第 11d 停药,次日处死动物,剥瘤称重,计算抑瘤率,进行统计学处理。

2.2 抑瘤作用机理

2.2.1 对荷瘤(H₂₂)小鼠免疫功能的影响 按常规方法于 615 小鼠右腋皮下接种 H₂₂ 瘤株,次日称重随机分组给药,每组 20 只。荷瘤第 7、13d 每组随机取 10 只小鼠脾脏,100 目不锈钢筛网研磨成单个脾细胞悬液,低渗去除红细胞,0.01%台盼蓝活细胞计数,调整细胞浓度。MTT 法检测荷瘤小鼠 NK 细胞活性^[2],对数生长期的 L₉₂₉ 细胞,0.25%胰酶消化,MEM 培养液调整浓度为 1.2×10^6 /ml,加入 96 孔板中,每孔 100μl,常规培养 24h 后,各孔加入已经处理的脾细胞悬液 100μl (3.0×10^6 /ml),效、靶比为 25:1。每只小鼠脾细胞悬液均设 12 孔,其中 6 孔为效应细胞和靶细胞,另 6 孔为效应细胞对照,另外整批实验还设靶细胞和培养液对照各 6 孔。各孔于 37℃,5%湿化的培养箱中杀伤 4h 后,沿孔边缘轻轻吸上清 100μl,加入 MTT 储液 10μl(5mg/ml),再孵育 2h 后,加入 10%酸化的十二烷基酸钠(SDS)100μl,溶解还原的甲瓚颗粒,过夜,EL311 酶标仪测定 OD 值,按

公式计算 NK 细胞杀伤活性(%)。T 细胞亚群的测定 每只小鼠取脾细胞悬液 3ml, 分装在 3 个 Eppendorf 管中, 每管含细胞 10^6 个, 离心 2000rpm 3min, 去上清, 2 只离心管压积细胞中加入 100 μ l 单克隆抗体, 另 1 管为对照管不加单抗, 混匀 4 $^{\circ}$ C、30min 后, PBS 液洗 3 次, 去洗液, 各管加入荧光抗体 100 μ l, 混匀, 再作用 30min, 洗 3 次, 以洗去多余的单抗, 最后将细胞悬浮于 1ml 的 T 细胞亚群维持液中(含 1% 甲醛), 流式细胞仪检测。

2.2.2 对小鼠 H₂₂ 腹水肝癌 DNA 合成及细胞周期的影响^[3] 雄性 615 小鼠 45 只分别接种小鼠肝癌细胞 5×10^6 /只, 接种次日随机分为 3 组, 即: 肝康冲剂组、阿霉素组、生理盐水组, 每组 15 只。肝康冲剂组每次灌服水煎剂 0.3ml (3g 生药/ml), 每日 1 次; 阿霉素组接种第 7d 腹腔注射阿霉素稀释液 0.2ml (1.5mg/kg); 生理盐水组每日灌服生理盐水 0.3ml。接种第 8d, 各组停止用药, 每组每日断头处死小鼠 3 只, 连续 5d, 抽取腹水癌细胞: PBS 液离心洗涤 2 次, 加入 70% 冷乙醇 3ml~4ml, 4 $^{\circ}$ C 固定 18h~24h 后, 弃去乙醇, 离心洗涤, 加入 RNAA 酶 (20 μ g/ml) 及 PI (50 μ g/ml) 混合染液 1ml, 4 $^{\circ}$ C 避光染色 30min, 350 目尼龙筛网过滤, 调整细胞浓度 10^6 /ml, FACsort 流式细胞仪检测, 每只小鼠至少收集细胞 10000 个, 所得数据输入计算机, 按 FACsort 软件多正态拟合程序进行曲线拟合分析, 计算出 DNA 含量, 得出细胞周期(G₁、S、G₂+M)的百分比和 G₁ 的 CV%。

3 结果

3.1 对移植性肿瘤抑瘤作用 肝康冲剂高、

中、低 3 个剂量组对 H₂₂、S₁₈₀ 都显示出一定的抑瘤作用, 其中中剂量组较好, 抑瘤率分别为 38.6%、37.5% 优于低剂量, 与高剂量相比差异不显著, 阿霉素与肝康冲剂联用, 抑瘤率明显提高, 与单纯阿霉素组相比差异显著, 详见表 1, 2。

表 1 肝康冲剂对小鼠肝癌(H₂₂)的抑瘤作用

分组	剂量 (g/kg)	n	体重变化(g)		瘤重(g)	抑瘤率 (%)
			疗前	疗后		
对照组	0.3ml	10	18.5 \pm 0.6	24.7 \pm 1.3	1.6 \pm 0.6	—
肝康低	30	10	19.1 \pm 1.5	27.0 \pm 0.6	1.2 \pm 0.6	24.5 $\Delta\Delta$
中	45	10	20.0 \pm 1.6	26.6 \pm 0.6	1.0 \pm 0.5	38.6* Δ
高	60	10	18.5 \pm 0.6	25.1 \pm 0.5	1.0 \pm 0.5	35.4* Δ
阿霉素组	1.5mg	9	18.6 \pm 0.3	22.0 \pm 0.4	0.8 \pm 0.4	49.5**
阿+肝组	1.5mg+45	10	18.4 \pm 0.6	23.6 \pm 0.5	0.7 \pm 0.2	58.5** Δ

与对照组比较 *P<0.05, **P<0.01; 与阿霉素组比较 Δ P<0.05, $\Delta\Delta$ P<0.01; 阿+肝组=肝康冲剂中剂量组+阿霉素组(下同)

表 2 肝康冲剂对小鼠肉瘤 180(S₁₈₀)的抑瘤作用

分组	剂量 (g/kg)	n	体重变化(g)		瘤重(g)	抑瘤率 (%)
			疗前	疗后		
对照组	0.3ml	10	19.5 \pm 1.4	30.5 \pm 1.6	2.7 \pm 0.9	—
肝康低	30	10	18.6 \pm 0.6	32.2 \pm 1.3	2.0 \pm 0.4	25.6 $\Delta\Delta$
中	45	10	19.1 \pm 1.5	31.9 \pm 1.4	1.7 \pm 0.6	37.5* Δ
高	60	10	18.7 \pm 0.5	31.4 \pm 1.5	1.8 \pm 0.4	34.3* Δ
阿霉素组	1.5mg	9	18.9 \pm 0.7	28.3 \pm 1.2	1.2 \pm 0.5	56.3**
阿+肝组	1.5mg+45	10	19.1 \pm 0.8	30.6 \pm 1.1	1.0 \pm 0.4	63.5** Δ

3.2 荷瘤小鼠免疫功能的变化, 见表 3。 给药第 6d, 肝康冲剂, 阿霉素组荷瘤(H₂₂)小鼠 NK% 活性均有所升高, 其中肝康冲剂组优于对照组, 2 者合用升高趋势优于单纯化疗组, 但无显著性差异, 给药第 12d 时肝康冲剂组 NK% 活性明显高于对照组及化疗组, 单纯化疗组 NK% 细胞活性与对照组相比有所下降, 但差异不显著, 与肝康冲剂合用有所回升。

表 3 灌服肝康冲剂第 6d、第 12d 荷瘤(H₂₂)小鼠 NK 细胞及 T 细胞亚群的变化

分 组	6d				12d			
	CD ₄ ⁺	CD ₈ ⁺	CD ₄ ⁺ /CD ₈ ⁺	NK(%)	CD ₄ ⁺	CD ₈ ⁺	CD ₄ ⁺ /CD ₈ ⁺	NK(%)
对照组	44.35 \pm 3.12	45.72 \pm 2.57	0.97 \pm 0.15	15.63 \pm 1.25	37.89 \pm 3.26	32.28 \pm 2.53	1.17 \pm 0.20	14.15 \pm 1.62
肝康组	43.93 \pm 2.56	33.03 \pm 2.89*	1.33 \pm 0.23*	26.38 \pm 1.45*	56.64 \pm 3.58**	26.72 \pm 2.74	2.12 \pm 0.55** $\Delta\Delta$	42.12 \pm 2.72** $\Delta\Delta$
阿霉素组	41.29 \pm 2.62	38.23 \pm 2.15	1.08 \pm 0.13	17.90 \pm 1.36	47.45 \pm 3.15	35.15 \pm 4.25	1.35 \pm 0.59	12.24 \pm 1.73
阿+肝组	41.66 \pm 3.57	37.52 \pm 2.26	1.12 \pm 0.12	21.42 \pm 1.42	51.97 \pm 3.15**	31.12 \pm 2.24	1.67 \pm 0.43* Δ	25.72 \pm 1.58* Δ

肝康冲剂组给药第 6d CD₈⁺ 明显下降、

CD₄⁺/CD₈⁺ 上升, 阿霉素组 CD₄⁺、CD₈⁺ 均有

所下降,2者合用 CD_4^+ 、 CD_8^+ 下降, CD_4^+/CD_8^+ 略有上升,但与阿霉素组差异不显著,给药第12d,肝康冲剂组 CD_4^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 明显上升, CD_8^+ 继续下降。阿霉素组 CD_4^+ 、 CD_8^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 都有所提高,但 CD_4^+/CD_8^+ 明显低于肝康冲剂组,略高于对照组,2药合用 CD_4^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 升高, CD_8^+ 下降,优于对照组及单纯化疗组。

3.3 对小鼠 H_{22} 腹水肝癌DNA合成及细胞周期的影响 肝康冲剂,阿霉素对小鼠腹水型肝癌(H_{22})细胞各时相影响结果见表4。表中可以看出阿霉素作用显著,用药1次后,S期细胞下降明显为1.62%, G_0/G_1 期细胞明显上升为88.53%,肝康冲剂作用缓慢,但与阿霉素有相似的作用趋势,用药6d后S期细胞含量也已下降, G_0/G_1 期细胞含量有所上升,停药48h最为明显。S期细胞的下降原因在于阿霉素、肝康冲剂阻滞 G_0/G_1 期细胞进入S期。此外,随着停药时间的延长,S期细胞又有所回升,停药第5d接近于对照组的细胞增殖状态,这说明随着停药时间延长,药效减弱或消失。对照组随着时间的延长, G_0/G_1 期略有上升,S期细胞略有下降,可能是腹水癌细胞增殖处于饱和状态的原因。

表4 肝康冲剂对小鼠肝癌(H_{22}) G_0/G_1 期及S期的影响

组别	DNA合成前期(G_1)%					DNA合成期(S)%				
	24h	48h	72h	96h	120h	24h	48h	72h	96h	120h
对照组	45.5	47.7	53.4	53.7	53.0	49.7	45.8	42.4	42.2	45.6
肝康组	62.9	72.4	64.4	63.2	56.2	32.2	23.7	26.6	32.7	38.7
阿霉素组	88.5	66.0	54.5	60.9	47.9	1.6	27.1	30.9	33.2	45.3

4 讨论

多年的临床研究表明:中医药治疗恶性肿瘤具有改善症状、提高生存质量、延长生存期的良好作用,但对于其作用机理缺乏全面的认识。DNA是细胞繁殖遗传的物质基础,起着遗传信息储存,自我复制和控制蛋白质合成的作用。RNA是信息转录和合成蛋白质的主要物质。细胞内这两种化学物质被抑制

和被破坏势必直接影响癌细胞的生存和繁殖。本文研究显示舒肝健脾、活血化瘀、软坚散结中药肝康冲剂不但可以调整带瘤机体T细胞亚群的紊乱失衡、提高NK细胞活性,还可以抑制 G_0/G_1 期细胞进入S期。 G_1 期又称DNA合成前期,细胞开始合成DNA的前体物质,细胞一旦进入此期,如无特殊干扰,便能按细胞周期的顺序发展下去,直至重新回到 G_1 期为止。因此,目前研究认为 G_1 -S期是细胞周期中一个特殊的限制点,当这个限制点被阻断,能够最有效的限制细胞的增殖^[4]。原因在于:当细胞被阻滞在 G_1 期将会面临三种命运:(1)阻滞于 G_1 期细胞损伤的DNA被修复后,完成增殖周期。(2)损伤不能修复,启动凋亡系统,及时清除细胞。(3)细胞 G_1 -S限制点调控丧失,变异的基因组DNA不能被修复或及时清除,从而导致细胞增殖失控,为突变的积累、克隆的形成创造了契机。所以,阻滞肿瘤细胞于 G_0/G_1 期,启动凋亡系统对其进行修复或清除,对于治疗恶性肿瘤或预防肿瘤的发生都具有十分重要的意义。

肝康冲剂阻滞腹水癌 G_0/G_1 期细胞进入S期的作用机理还不十分清楚,但从观察腹水癌细胞荧光染色涂片发现:损伤细胞中有凋亡小体形成,可能与细胞凋亡有关。

参考文献

- 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学. 第二版. 北京:人民卫生出版社,1994. 1423
- 王新江,李燕,谷淑燕,等. 用MTT法检测小鼠NK细胞活性. 中华实验和临床病毒学杂志, 1991,5(1):81
- 谢锦玉,高玉民,沈联慈,等. 流式细胞仪分析大蒜油对癌细胞DNA合成及细胞周期的影响. 中国中西医结合杂志,1992,12(2):92
- 杨秉辉. 肿瘤基础理论. 上海:上海科技出版社,1986. 177

(收稿:1997-12-03)