

龙胆胶囊体内外抗肿瘤作用的实验研究

蒋素强 任中海 李新民(陕西中医学院附院肿瘤科 咸阳 712083)

龙胆胶囊(Longdan Capsule, LDC)主要采用仙鹤草、绞股兰、苦参、马钱子、八月扎为原料提取加工而成,含量为1g干粉含7.6g生药(中药材均经陕西中医学院附院王浩峰副主任药师鉴定)。我们采用小鼠肉瘤(S₁₈₀)、艾氏腹水瘤(EAC)、小鼠肝细胞癌(H₂₂)、人白血病细胞株(HL-60)、人肝癌细胞株(SMMC₇₇₂₁)进行了抗肿瘤实验。

1 方法与结果

1.1 胎盼蓝拒染法测定 LDC 对 HL-60 细胞的体外细胞毒作用 参照文献[1]进行。结果见表1,显示LDC对HL-60细胞的抑制作用具有浓度依赖性,但对时间的依赖性仅限于48h内,LDC作用48h,抑制率升至巅峰,IC₅₀降至最低点,超过48h,随作用时间延长,抑制率下降,IC₅₀升高。

表1 LDC对HL-60细胞的平均抑制率(%)

作用时间	药物浓度 $\mu\text{g/ml}$						IC ₅₀
	165	33	6.6	1.32	0.26	0.05	
24h	53.4	33.4	26.6	20.0	13.4	6.6	48.0
48h	78.6	56.0	47.7	38.1	33.3	21.4	18.9
72h	53.1	37.1	30.7	23.3	17.7	14.0	41.8

1.2 MTT 法测定 LDC 对 SMMC₇₇₂₁ 细胞的细胞毒作用 参照文献[2~5]进行。结果见表2,揭示LDC对SMMC₇₇₂₁细胞的生长抑制率,具有浓度依赖性($r=0.83$),IC₅₀为8.7 $\mu\text{g/ml}$,各浓度组与空白组比较,均有统计学意义。

1.3 定量极限稀释微孔池培养法测定 LDC 对 SMMC₇₇₂₁ 的剂量——存活率曲线 参照文献[1,6]进行。结果如图所示,该曲线随LDC浓度增加而下降,中段陡降,较前后两段斜率明显增加,IC₅₀:6.2 $\mu\text{g/ml}$,药物浓度

与瘤细胞存活分数呈高度负相关($r=-0.88$)。

表2 LDC对SMMC₇₇₂₁细胞的抑制作用

组别	药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	OD值 ($\bar{x}\pm s$)	抑制率 (%)
空白组	0.0	0.589 \pm 0.065	
5-Fu	50.0	0.096 \pm 0.066**	83.7
LDC ₁	1650.0	0.151 \pm 0.098**	74.4
LDC ₂	330.0	0.201 \pm 0.079**	65.9
LDC ₃	66.0	0.253 \pm 0.038**	57.0
LDC ₄	13.2	0.273 \pm 0.123**	53.6
LDC ₅	2.6	0.328 \pm 0.080**	44.3
LDC ₆	0.5	0.360 \pm 0.177**	38.9

注:与空白组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$

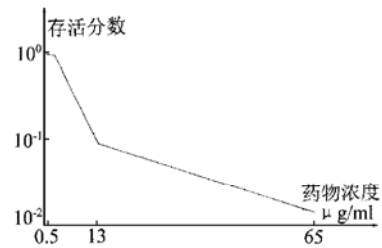


图 LDC对SMMC₇₇₂₁的剂量——存活率曲线

1.4 LDC 对小鼠 S₁₈₀、H₂₂ 实体瘤的抑制作用 结果见表3,2.5g/kg~10g/kg剂量LDC灌胃对H₂₂、S₁₈₀实体瘤有明显的抑制作用,与对照组比较,均有显著性差别,且随药物浓度的增加而显著增加,其中10g/kg灌胃对H₂₂的抑瘤率与5-Fu无显著性差异。

1.5 LDC 对 EAC 腹水型小鼠生存时间的影响 结果见表4,10g/kg灌胃对EAC腹水型小鼠生命延长率与5-Fu组疗效无显著性差别,5g/kg、2.5g/kg组与对照组相比,亦有统计学意义。

表 3 LDC 对 H₂₂、S₁₈₀ 实体瘤的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	n	H ₂₂		S ₁₈₀	
			瘤重	抑瘤率	瘤重	抑瘤率
0.9%NS	0.4ml	17	2.00±0.29	—	1.21±0.27	—
LDC	2.50	10	1.48±0.40**	26.0	0.96±0.40**	28.9
LDC	5.00	10	1.24±0.19**	38.0	0.75±0.22**	38.0
LDC	10.00	10	0.94±0.17**	53.0	0.61±0.16**	49.6
5-Fu	0.025	10	0.90±0.27	55.0		
CTX	0.020	10			0.24±0.16	80.2

表 4 LDC 对 EAC 腹水型小鼠生存时间的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	n	存活时间	生命延长率
			(d)	(%)
0.9%NS	0.4ml	17	11.2±2.9	—
LDC	2.50	10	13.3±3.2*	18.8
LDC	5.00	10	16.6±1.4**	41.1
LDC	10.00	10	17.2±1.2**	53.6
5-Fu	0.025	10	18.3±2.3**	63.4

1.6 病理形态学观察 在光镜下, LDC 组 H₂₂、S₁₈₀ 实体瘤瘤组织改变基本一致, 与对照组相比, 瘤细胞核固缩、瘤细胞溶解、瘤组织坏死程度更严重, 染色质染色变淡变均匀, 分裂象减少, 且作用强度随剂量增加而增加。

2 讨论

实验结果表明, LDC 对 S₁₈₀、H₂₂、EAC 体内抑制作用达到了体内抗肿瘤药物筛选标准^[7], 在体外实验中, 粗提物 LDC 对 SMMC₇₇₂₁ 细胞的 IC₅₀ 小于 10μg/ml, 对 HL-60 细胞的 IC₅₀ 为 18.9μg/ml, 可见其抗肿瘤作用显著, 值得进一步研究。

体内外各实验结果均显示: LDC 具有浓度依赖性; SMMC₇₇₂₁ 剂量—存活率曲线还表明: LDC 2.6μg/ml~13.2μg/ml 浓度范围内量效变化最显著, 提示临床给药时, 应尽可能增加剂量, 且以不低于相当体外 13.2μg/ml 的剂量为佳。LDC 对 HL-60 细胞毒作用还提

示: LDC 体外有效作用时间不超过 48h, 维持其作用强度需在 48h 内再次给药; 但由于体内各种因素参与, 体内的量效关系及作用维持时间有待进一步研究。

MTT 法是 1983 年 mosmann 根据活细胞, 尤其是增殖细胞通过线粒体能量代谢将 MTT 代谢形成紫色甲臞沉积于细胞内或细胞周围, 且形成甲臞量与细胞增殖程度呈比例关系的原理创制; 我们利用调零孔清除培养液中药物及酚红颜色对比色测定的影响, 从而将其引入抗癌中药疗效的测定, 使实验快速省力, 结果更为客观。实验结果表明, LDC 能减少瘤细胞甲臞形成, 可见其对线粒体能量代谢有抑制作用。病理切片见 LDC 组瘤细胞分裂象减少, 瘤细胞核固缩溶解加重, 染色质染色变淡变均匀, 揭示 LDC 对染色体的复制繁殖有抑制和破坏作用。

参考文献

- 1 徐叔云. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 1423~1453
- 2 秦慧莲, 匡彦德. 四甲基偶氮唑盐比色法测定白细胞介素-2 活性及淋巴细胞增殖反应. 上海: 上海医科大学学报, 1987, 14(6): 407
- 3 邱玉华, 缪竞诚, 付强, 等. 异丙醇和 SDS 在 MTT 比色法检测 NKCF 活性中的应用比较. 上海免疫学杂志, 1994, 14(2): 128
- 4 周建军, 乐秀芳, 韩家娴, 等. 影响 MTT 方法检测结果的一些因素. 肿瘤, 1994, 14(2): 93
- 5 郑永康. 测定细胞存活和增殖的 MTT 方法的建立. 免疫学杂志, 1992, 8(4): 266
- 6 万景华, A A Morley. 极限稀释微孔池培养法测定细胞对抗癌药物的剂量反应曲线. 药学学报, 1985, 20(6): 418
- 7 全国抗癌药物筛选及专题学术座谈会. 抗肿瘤药物体内筛选规程. 医学研究通讯, 1978(4): 28

(收稿: 1997-07-23)