

加味四君子汤含药血清 对 B16 恶性黑色素瘤细胞增殖和凋亡的影响

周昕欣^{1,2}, 王彩霞^{1*}

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学附属第二医院, 沈阳 110034)

[摘要] 目的:研究加味四君子汤含药血清对 B16 恶性黑色素瘤细胞增殖和凋亡的影响。方法:应用血清药理学方法给药,37 ℃ 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 B16 恶性黑色素瘤细胞,收集对数期细胞,终浓度 10% 的小鼠含药血清,分别作用 12, 24, 48 h。实验分为空白对照组、血清对照组、加味四君子汤含药血清组(高、中、低 3 个剂量组)、顺铂组,每组含 5 个样本数。分别应用 MTT 法、流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 法检测加味四君子汤含药血清对 B16 恶性黑色素瘤细胞增殖和凋亡的影响。结果:加味四君子汤含药血清作用 12, 24, 48 h, 与同时段空白对照组和血清对照组相比,以剂量依赖方式抑制 B16 恶性黑色素瘤细胞增殖,中剂量加味四君子汤含药血清组 24, 48 h 抑制率为 50.22%, 53.81%, 且 48 h 与 24 h 相比没有显著性变化;与空白对照组和血清对照组相比,中、高剂量加味四君子汤含药血清组、顺铂组的凋亡率分别为(19.70 ± 0.98)%, (25.21 ± 1.03)%, (21.31 ± 1.00)%, 显著促进 B16 恶性黑色素瘤细胞的凋亡($P < 0.05$), 但顺铂组凋亡率高于中剂量中药组, 低于高剂量中药组。结论:加味四君子汤含药血清抑制 B16 恶性黑色素瘤细胞增殖;促进 B16 恶性黑色素瘤细胞的凋亡, 这可能是加味四君子汤抗恶性黑色素瘤的机制之一。

[关键词] 加味四君子汤; 血清药理学; B16 恶性黑色素瘤细胞; 细胞增殖; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0178-04

[doi] 10.11653/syjf2013100178

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130308.1046.010.html>

[网络出版时间] 2013-03-08 10:46

Effect of Jiawei Sijunzi Decoction Containing Serum on B16 Malignant Melanoma Cell Proliferation and Apoptosis

ZHOU Xin-xin^{1,2}, WANG Cai-xia^{1*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China;

2. Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of Jiawei Sijunzi decoction containing serum on B16 malignant melanoma cell proliferation and apoptosis. **Method:** Jiawei Sijunzi decoction was administrated by serum pharmacological method, which B16 melanoma cells were cultured in 37 ℃ and 5% CO₂ thermostat incubator, and logarithmic phase cells were collected and exposed to final concentration 10% mice containing serum in 12, 24, 48 h, respectively. The experimental group were divided into blank control group, serum control group, traditional Chinese medicine group (high dose, middle dose and low dose), and cisplatin group, and each group contained 5 samples. MTT and Flow cytometry Annexin V-FITC/PI assay were used to analyse the Jiawei Sijunzi decoction containing serum influence on B16 malignant melanoma cell proliferation and apoptosis respectively. **Result:** A

[收稿日期] 20121031(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973689)

[第一作者] 周昕欣, 博士, 主治医师, 从事中药方剂及单味中药对临床上皮肤疾病的治疗及减毒增效和作用机制的研究, Tel: 13840279326, E-mail: zhouxinxin@163.com

[通讯作者] *王彩霞, 博士, 教授, 从事脾虚衰老的分子机制研究, Tel: 024-31207083, E-mail: wang_cai@126.com

time-dependent increase in inhibiting B16 malignant melanoma cell proliferation by Jiawei Sijunzi decoction containing serum was observed compared to blank control group, serum control group in the same time period, and middle dose traditional Chinese medicine group inhibition rate was 50.22% in 12 h and 53.81% in 24 h respectively, and reached the half of inhibition rate, and half of inhibition rate in 48 hours period and 24 hours period were compared to no significant change. Middle dose traditional Chinese medicine group, high dose traditional Chinese medicine group and cisplatin group ($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) apoptosis rate were $(19.70 \pm 0.98)\%$, $(25.21 \pm 1.03)\%$, $(21.31 \pm 1.00)\%$ respectively, and promote significantly B16 malignant melanoma cell apoptosis compared to the blank control group and serum control group, the rate of cisplatin group apoptosis is high than middle dose traditional Chinese medicine group, and lower than high dose traditional Chinese medicine group.

Conclusion: Jiawei Sijunzi decoction containing serum can inhibit the proliferation of B16 malignant melanoma cells, and promote the apoptosis of B16 malignant melanoma cells, which could be the therapy mechanism of Jiawei Sijunzi decoction antitumor.

[Key words] Jiawei Sijunzi decoction; serum pharmacology; B16 malignant melanoma cell; cell proliferation; apoptosis

四君子汤出自宋代《太平惠民和剂局方》,由人参、白术、茯苓、甘草组成,是健脾益气的基础方,具有“调补正气,扶正固本,适应原样”的作用^[1]。近年来四君子汤显著增强机体的免疫和抗肿瘤作用越来越受到学者的重视^[2-4]。有学者已证实四君子汤可以治疗肺癌且疗效显著^[4-5],基于“肺主皮毛”理论,以及人参、茯苓、甘草、半枝莲、贝母和莪术等单药均具有抗恶性黑色素瘤增殖、迁移、侵袭等作用^[6-10],笔者推测加味四君子汤具有抗小鼠 B16 恶性黑色素瘤的作用。本研究首先建立体外 B16 恶性黑色素细胞瘤模型,利用血清药理学方法给药,MTT 法检测加味四君子汤对 B16 恶性黑色素瘤细胞增殖的影响,明确加味四君子汤的最佳作用时间和最佳作用剂量;流式细胞仪检测加味四君子汤对 B16 恶性黑色素细胞凋亡的影响,明确加味四君子汤抗恶性黑色素瘤增殖和凋亡的机制。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,由中国医科大学实验动物中心提供,体重 18 ~ 22 g,许可证号 SCXK(辽)2003-0009。

1.2 细胞培养 小鼠 B16 恶性黑色素瘤细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。RPMI-1640 培养基,10% 胎牛血清,置于 37 °C,5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。

1.3 药物制备 加味四君子汤根据《方剂学》和《中国药典》由人参 9 g,白术 9 g,茯苓 9 g,炙甘草 6 g,半枝莲 20 g,浙贝母 9 g,莪术 9 g 组成,以上药材由辽宁中医药大学附属第二医院药局提供。加 10 倍量水浸泡 1 h 后文火煎煮 2 h,滤出上清后再加

8 倍量水煎煮 1 h,合并 2 次上清液,静置,3 000 r·min⁻¹离心 15 min。上清在水浴上浓缩为 2.0 g·mL⁻¹的贮存液,置 4 °C 保存备用。

1.4 药物与试剂 噻唑蓝(MTT, Sigma 公司),二甲基亚砜(DMSO,批号 200-664-3, Sigma 公司);RPMI-1640(批号 09/2011, Gibco 公司)、胰蛋白酶(批号 08/2011, Gibco 公司)和胎牛血清(批号 09/2011, Gibco 公司);Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒(批号 110302,北京宝赛生物技术有限公司)。

1.5 仪器 MCO-15AC 细胞培养箱(日本, Sanyo 公司), TMS-F 型倒置显微镜(日本, TMS 公司), 3K18 台式低温超速离心机(德国, Sigma 公司), M5 型分光光度计(美国, Bausch & Lomb 公司), TB114 电子分析天平(美国, Sartorius 公司), 702 型 -80 °C 超低温冰箱(美国, Thermo 公司), BDFACSCalibur 流式细胞仪(美国, Becton-Dickinson 公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 小鼠 32 只随机分为 4 组, 每组 8 只,雌雄各半,实验前禁食 12 h,灌胃给药,给药剂量根据陈奇提出剂量估算方法计算^[11],小鼠等效剂量为 9.22 g·kg⁻¹,其 1/2 剂量 4.61 g·kg⁻¹为低剂量组,其 2 倍剂量 18.44 g·kg⁻¹为高剂量组。另外设空白对照组和血清对照组及顺铂组(终浓度 5 mg·L⁻¹)。间隔 4 h 2 次给药,连续 3 d 给药,取血前禁食(不禁水)16 h,末次给药后 1 h 采血。所取全血于室温下静置 2.5 ~ 3 h,3 000 r·min⁻¹离心 20 min,分离血清。同组血清混匀,于 56 °C 水浴 30 min 灭活,经 0.22 μm 滤膜抽滤除菌, -80 °C 保存备用^[12-13]。

2.2 细胞增殖抑制试验 收集对数期 B16 恶性黑色素瘤细胞,调整细胞悬液密度,每孔加入 100 μL ,铺板使待测细胞调密度 $0.5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^4$ /孔,边缘孔用无菌 PBS 填充。5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 孵育,至细胞单层铺满孔底(96 孔平底板),大约培养 20 h,吸去培养液,分组加药。每组设 5 个复孔,5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 12, 24, 48 h,每孔加入 20 μL MTT 溶液,继续培养 4 h。4 h 后终止培养,小心吸去孔内培养液。每孔加入 150 μL 二甲基亚砜,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 570 nm 处测量各孔的吸光度(A)。计算细胞抑制率公式。

$$\text{细胞抑制率} = [(\text{对照组 A} - \text{空白组 A}) - (\text{药物组 A} - \text{空白组 A})] / (\text{对照组 A} - \text{空白组 A}) \times 100\%$$

2.3 细胞凋亡检测 取对数生长期的 B16 恶性黑色素瘤细胞,分组给药 24 h 后,用 0.25% 的胰蛋白酶消化,含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液制成单细胞悬液,收集 5×10^5 个细胞,加入 500 μL 的 Binding

Buffer 悬浮细胞,再加入 5 μL AnnexinV-FITC 混匀后,加入 5 μL propidium iodide,混匀。室温、避光、反应 15 min。流式细胞仪检测 A。

2.4 数据处理 应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间采用 *t* 检验,多组间采用单因素方差分析和 Bonferroni 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 B16 细胞增殖能力的影响 加味四君子汤含药血清以剂量依赖方式抑制 B16 恶性黑色素细胞增殖;与同时间段空白对照组和血清对照组相比,作用时间为 12, 24, 48 h 的低、中、高剂量组和顺铂组显著抑制细胞增殖。作用时间为 24, 48 h 的 B16 黑色素瘤细胞半数抑制率的剂量为中剂量加味四君子汤含药血清组,且 48 h 与 24 h 相比没有显著性变化,因此,选择 24 h 作为给药时间点,进行后续试验。见表 1。

表 1 加味四君子汤含药血清对 B16 细胞增殖能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	12 h		24 h		48 h	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%	A	抑制率/%
空白对照	-	0.416 \pm 0.003	-	0.421 \pm 0.004	-	0.418 \pm 0.003	-
血清对照	-	0.640 \pm 0.028	-	0.640 \pm 0.028	-	0.641 \pm 0.027	-
四君子汤血清	4.61	0.621 \pm 0.025	8.50 ¹⁾	0.612 \pm 0.024 ¹⁾	13.57	0.608 \pm 0.022 ¹⁾	14.80
	9.22	0.619 \pm 0.024	9.40 ¹⁾	0.531 \pm 0.014 ¹⁾	50.22	0.521 \pm 0.015 ¹⁾	53.81
	18.44	0.617 \pm 0.026	10.27 ¹⁾	0.512 \pm 0.016 ¹⁾	58.82	0.507 \pm 0.012 ¹⁾	60.10
顺铂 ²⁾	5	0.620 \pm 0.023	8.90 ¹⁾	0.524 \pm 0.016 ¹⁾	53.39	0.516 \pm 0.014 ¹⁾	56.05

注:与同时间段血清对照组相比¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ 顺铂的剂量单位为 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2 对 B16 细胞凋亡的影响 不同剂量的加味四君子汤含药血清作用于 B16 细胞 24 h 后,应用 Annexin V-FITC/PI 双标记法检测细胞凋亡。各组凋亡率分别为:空白对照组 (2.97 \pm 0.62)%, 血清对照组 (3.12 \pm 0.71)%, 低、中、高剂量加味四君子汤含药血清组 (7.10 \pm 0.95)%, (19.70 \pm 0.98)%, (25.21 \pm 1.03)%, 顺铂组 (21.31 \pm 1.00)%。与空白对照组和血清对照组相比,中、高剂量加味四君子汤含药血清组、顺铂组 (5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别显著促进 B16 细胞的凋亡 ($P < 0.05$)。见图 1。

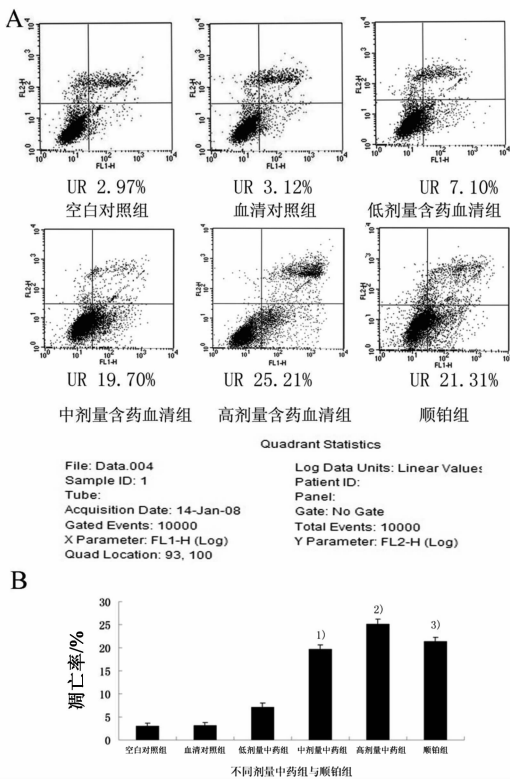
4 讨论

本研究首次证明了加味四君子汤含药血清抑制 B16 恶性黑色素瘤细胞增殖;促进 B16 恶性黑色素瘤细胞凋亡,上述结果说明加味四君子汤可能通过抑制 B16 恶性黑色素瘤细胞增殖和促进其凋亡途

径,发挥治疗恶性黑色素瘤作用。

笔者利用 MTT 实验方法证实加味四君子汤含药血清以剂量依赖方式抑制 B16 恶性黑色素细胞增殖;同样陶正鹏等利用 MTT 实验方法发现四君子汤对胃癌 SGC-7901 细胞系和肝癌 SMMC-7721 细胞系的增殖均有显著的抑制作用,且有剂量、浓度依赖性^[14],这与本实验的发现加味四君子汤含药血清可以抑制恶性黑色素细胞增殖的结果相一致。但也有学者发现,四君子汤总多糖在 MTT 体外实验中,没有直接抑制人肝癌细胞株 HepG2 的增殖,但可以促进小鼠脾淋巴细胞增殖,具有较强的免疫促进活性,提示四君子汤总多糖的抗肿瘤作用可能是通过提高免疫功能实现^[15]。

在本研究中,中剂量加味四君子汤组能达到 B16 恶性黑色素细胞增殖的半数抑制率,达到半数



A. Annexin V-FITC/PI 双标记法检测细胞凋亡;

B. 各组细胞凋亡率

与空白对照组和血清对照组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.05$

图 1 加味四君子汤含药血清对 B16 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

抑制剂量即为工作剂量,中剂量加味四君子汤含药血清对 B16 恶性黑色素细胞增殖抑制率虽然低于顺铂组,但是顺铂为纯粹的化疗药物,一般副作用明显要大于纯中药,且顺铂组和中剂量组相比没有显著性差异,所以两者相比中剂量组更为适合作为给药剂量组;高剂量组也能达到 B16 恶性黑色素细胞增殖的半数抑制率,考虑到如果药物浓度过高,抑制细胞的增殖作用可能有药物的毒副作用的参与,达到相似的实验结果时一般选用剂量小的分组,因此选择中剂量加味四君子汤含药血清作为给药剂量组。

笔者研究发现,随着加味四君子汤剂量的增加,恶性黑色素瘤 B16 细胞凋亡率呈剂量依赖式增加。有研究发现四君子汤可以促进小鼠膀胱癌细胞和胃癌细胞凋亡来抑制肿瘤生长^[16-17],同我们发现加味四君子汤促进 B16 恶性黑色素瘤细胞凋亡实验结果相一致。

综上所述,本研究证实加味四君子汤可以抑制 B16 恶性黑色素瘤细胞增殖和促进其凋亡;这可能是加味四君子汤治疗恶性黑色素瘤的机制。

[参考文献]

[1] 许济群. 方剂学[M]. 上海:上海科学技术出版社,

1997:93.

[2] 甘雨良,焦丹,刘文峰. 四君子汤加减联合化疗治疗胃肠道恶性肿瘤多药耐药基因阳性病例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(6):253.

[3] 吴正平,周智兴,雷波. 四君子汤对衰老模型大鼠免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):128.

[4] 丁纪元,孟昭琳. 黄芪四君子汤在晚期非小细胞肺癌化疗中的应用[J]. 浙江中西医结合杂志, 2006,16(1):28.

[5] 赖义勤,陈乃杰,吴丹红,等. 温胆汤合四君子汤配合化疗治疗晚期非小细胞肺癌 29 例[J]. 福建中医药, 2011,42(6):13.

[6] 翁小刚. 人参皂苷的生物转化物抑制鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞的生长和转移[J]. 国外医学:中医中药分册, 2002,24(1):41.

[7] 马晶波,冯树芳,李锋,等. 甘草黄酮对 B16 黑色素瘤细胞代谢的影响[J]. 复旦大学学报:医学版, 2003,30(4):353.

[8] 王长秀,马润娣,于立坚. 土贝母苷甲对小鼠 B16 黑色素瘤和 Lewis 肺癌转移的抑制作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006,11(7):764.

[9] 夏卫军,程罗根,徐建亚,等. 莪术对黑色素瘤细胞转移相关能力的影响[J]. 中药药理与临床, 2007,23(2):45.

[10] 代志军,刘小旭,汤薇,等. 半枝莲提取物对 H22 荷瘤小鼠免疫功能的影响及其抑瘤作用[J]. 南方医科大学学报, 2008,28(10):1835.

[11] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:33.

[12] 杨长福,冯泳,何前松. 小半夏加茯苓方含药血清抑制 HepG2 细胞增殖及促进凋亡[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(8):168.

[13] 刘雅男,姜建石,赵振宇,等. 血清药理学方法研究复方中药对 B16 黑色素瘤细胞黑素合成的影响[J]. 中国中西医结合皮肤性病学期刊, 2005,4(3):155.

[14] 陶正鹏,冯秋珍,徐建民. 四君子汤含药血清抑癌作用的实验研究[J]. 湖北中医杂志, 2006,28(9):9.

[15] 刘玉红. 四君子汤复方总多糖的体外抗肿瘤和免疫活性研究[J]. 食品与药品, 2009,11(5):22.

[16] 李传刚,李墨林,舒晓宏,等. 四君子汤通过 Fas 受体诱导小鼠膀胱癌细胞凋亡[J]. 肿瘤防治杂志, 2005,12(20):15391.

[17] 赵爱光,杨金坤,赵海磊,等. 四君子汤诱导裸小鼠移植性人胃癌细胞凋亡的初步研究[J]. 癌症, 2001,20(2):164.

[责任编辑 聂淑琴]