

天芝草胶囊对肿瘤细胞周期的影响

沈波^{1*}, 徐峰², 何丽钦², 杨平²

(1. 江苏省肿瘤医院肿瘤内科, 南京 210009; 2. 沈阳药科大学, 沈阳 110016)

[摘要] 目的:探讨中药天芝草胶囊对肿瘤细胞周期的影响。方法:S180 荷瘤小鼠 ig 天芝草胶囊 0.5, 1.0, 2.0 g·kg⁻¹, 阳性药组 ip 环磷酰胺 0.02 g·kg⁻¹·d⁻¹, 连续 7 d, 流式细胞仪检测动物给药后肿瘤组织细胞周期变化情况。结果:天芝草胶囊可阻滞肿瘤细胞周期的进程, 天芝草胶囊高剂量组 Sub-G₁ 期, G₀/G₁ 期比率由 (2.26 ± 0.11)% 上升为 (2.61 ± 0.04)% , 并伴有 S 期比率下降, 由 (17.05 ± 0.10)% 下降为 (12.59 ± 0.30)% 。结论:天芝草胶囊可阻滞肿瘤细胞周期在 G₀/G₁ 期, 抑制肿瘤细胞的增殖。

[关键词] 天芝草胶囊; 肿瘤细胞周期; G₀/G₁ 期; S 期

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0226-03

The Effect of Tianzhicao Capsule on Tumor Cell Cycle

SHEN Bo^{1*}, XU Feng², HE Li-qin², YANG Ping²

(1. Department of Medical Oncology, Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210009, China;
2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[收稿日期] 2011-06-17

[通讯作者] * 沈波, 硕士, 副主任医师, 从事肿瘤内科的临床研究, Tel: 13913910555, 025-83284623, E-mail: shenbo987@sohu.com

评分显著降低 ($P < 0.01$)。

本实验采用尼氏染色进行形态学观测。尼氏小体由于存在于神经元胞体内, 由粗面内质网及其间的核糖体构成, 可被碱性染料染成蓝色细颗粒或团状。它和神经元的功能极为密切, 当脑缺血缺氧导致神经元受损害变性时, 尼氏小体颗粒可出现数量及位置的变化, 呈现明显的溶解或者消失。光镜下, 可以看到模型组大鼠大脑皮质脑组织形态学结构发生改变, 说明造模后大鼠脑组织出现了明显的损伤和局部的炎症反应。通过治疗, 大鼠大脑皮质锥体细胞病变减轻, 减少, 固缩坏死的细胞数量减少。川加葛组能明显改善损伤引起的神经细胞数和形态的改变。

近年研究认为脑缺血损伤的病理生理机制是损伤级联反应, 即兴奋性毒性、梗死周围去极化、炎症和程序性细胞死亡 4 个过程。钙、谷氨酸、氧自由基、一氧化氮等涉及这些过程。祖国医学的血瘀与现代医学的血栓性疾病(包括缺血性脑血管疾病)

密切相关。中医认为, 其治则为化瘀, 而同时活血又是化瘀的前提。本实验采用中药有效成分配伍进行治疗, 一方面体现了中药配伍发挥的协同作用, 另一方面也佐证了中风急性期瘀血阻滞的理论, 同时也说明急性期活血化瘀法在治疗缺血再灌注损伤过程中的重要价值。

[参考文献]

- [1] Blass J P, Hoyer S, Nitsch R. A translation of otto binswanger's article: the delineation of the generalized progressive paralyses [J]. Arch Neurol, 1991, 48 (9): 961.
- [2] Pulsinelli W A, James B, Brierley M. A new mode of bilateral ischemia in the unanesthetized rat [J]. Stroke, 1979, 10(3):267.
- [3] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20: 84.

[责任编辑 何伟]

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Tianzhicao capsule on tumor cell cycle. **Method:** S180 tumor-bearing mice were administered with Tianzhicao capsule orally (0.5, 1.0, 2.0 g · kg⁻¹, 7 d). Cyclophosphamide, the positive control, was given at a dose of 0.02 g · kg⁻¹ · d⁻¹. The changes of tumor cell cycle after administration were detected by flow cytometer. **Result:** Tianzhicao capsule could blockade the course of tumor cell cycle. The rate of Sub-G₁ and G₀/G₁ phase of Tianzhicao high dose group were increased from (2.26 ± 0.11)% up to (2.61 ± 0.04)% and from (47.34 ± 0.70)% up to (55.23 ± 1.05)% accordingly. And the rate of S phase was decreased. **Conclusion:** Tianzhicao capsule can arrest tumor cell cycle in G₀/G₁ phase and inhibit proliferation of tumor cell.

[Key words] Tianzhicao capsule; tumor cell cycle; G₀/G₁ phase; S phase

天芝草胶囊由白花蛇舌草、肿节风、半枝莲、延胡索、三棱、莪术、丹参、人参、黄芪、灵芝、鸡血藤、生地黄、枸杞子、天花粉、蒲公英、山豆根、苦参、甘草药材制成,具有活血化瘀、解毒消肿、益气养血之功效,是目前广西壮族地区用于治疗恶性肿瘤的常用中药制剂,本院使用该药作为恶性肿瘤的辅助和姑息治疗多年。本实验通过动物体内抗肿瘤实验,以肿瘤组织细胞周期为主要检测指标,探讨天芝草胶囊的抗肿瘤作用机制。

1 材料

1.1 S180 瘤株 由中国医科大学提供。

1.2 动物 昆明种小鼠,6~7周龄,体质量16~18g,中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号SCXK-(军)2007-004。饲养于相同的环境中,自由摄食、饮水,至少同步化10d后用于实验。光照时间为12h/d(08:00~20:00)、12h黑暗,环境温度20~24℃,湿度为(55±5)%,动物室隔音。

1.3 药品与仪器 天芝草胶囊(广西万通制药有限公司提供,批号100409),环磷酰胺注射剂(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号05012221),RNA酶(RNAase,碧云天生物技术研究),碘化丙啶(PI,碧云天生物技术研究)。

1.4 仪器 J2-HS低温高速离心机(美国Beckman公司),BD FACS Calibur流式细胞仪(美国Becton Dickson公司)。

2 方法

2.1 分组与处理 小鼠60只,按体质量随机分为6组(10只/组),分别为正常对照组、模型组、天芝草胶囊高、中、低剂量组和环磷酰胺组(CTX)。除正常对照组外,其余5组按文献报道方法^[1]接种肉瘤S180。取传代第7天的S180肉瘤细胞腹水2mL,用

生理盐水调至 2×10^7 个/mL,在每只小鼠右腋窝瘤细胞悬液0.2mL。接种后次日开始给药,正常对照组和模型组ig蒸馏水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,天芝草低、中、高剂量ig 0.5,1.0,2.0 g · kg⁻¹,环磷酰胺ip 0.02 g · kg⁻¹ · d⁻¹。连续给药7d,第8天处死小鼠剖取肿瘤,选取无坏死的肿瘤组织,剪成1mm³左右的小块,参照文献方法制备新鲜实体瘤组织单细胞悬液^[2]。收集肿瘤细胞悬液,离心沉淀500~800 r · min⁻¹,2min,70%乙醇4℃固定过夜。弃去固定液后加入RNAase(终质量浓度 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)37℃消化30min,加入PI(终质量浓度 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)4℃避光反应30min,上机前过200目筛,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL。对每个肿瘤细胞悬液样品进行10000个细胞的检测,使用FACS Calibur流式细胞仪测出每个细胞的荧光强度。对所测细胞荧光强度采用Cellquest软件(Becton Dickson)进行分析,得出每个检测样本的细胞增殖周期(Sub-G₁, G₀/G₁, S, G₂/M期)百分比。

2.2 统计学分析 采用SPSS 13.0统计软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

天芝草胶囊对肿瘤细胞周期的影响见表1。模型组和各给药组小鼠肿瘤细胞都不同程度的出现了凋亡峰即Sub-G₁,说明肿瘤细胞为维持其细胞动力学的稳态,也存在一个自发的细胞凋亡过程;与模型组比,天芝草胶囊低剂量组中除S期分布比率明显减少外,其他各期均无明显变化;天芝草胶囊中剂量组肿瘤细胞G₀/G₁期比率升高,S期减少明显;与模型组比,天芝草胶囊高剂量组和环磷酰胺组Sub-G₁期比率均升高($P < 0.01$),提示2者给药后肿瘤细胞凋亡率增加,G₀/G₁期比率均升高($P < 0.01$),

表 1 天芝草胶囊对小鼠肿瘤细胞周期分布的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量/g·kg ⁻¹	Sub-G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	%
正常	-	-	-	-	-	
模型	-	2.26 ± 0.11	47.34 ± 0.70	17.05 ± 0.10	13.36 ± 0.28	
天智草胶囊	0.5	2.35 ± 0.12	47.72 ± 0.80	16.21 ± 0.49 ¹⁾	13.30 ± 0.71	
	1.0	2.27 ± 0.13	50.88 ± 0.32 ¹⁾	14.85 ± 0.09 ¹⁾	13.59 ± 0.21	
	2.0	2.61 ± 0.04 ¹⁾	55.23 ± 1.05 ¹⁾	12.59 ± 0.30 ¹⁾	13.18 ± 0.05	
CTX	0.02	16.27 ± 0.63 ¹⁾	51.63 ± 1.79 ¹⁾	13.30 ± 0.27 ¹⁾	11.76 ± 2.94	

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.01。

同时均伴有 S 期比率下降 (P < 0.01), 提示 2 者均可将肿瘤细胞阻滞在 G₀/G₁ 期, 减少进入 S 期的细胞数及其有丝分裂, 从而抑制了肿瘤细胞的增殖。

4 讨论

在细胞的分裂过程中, DNA 和 RNA 起着遗传信息贮存、复制和蛋白质合成控制的重要作用, 是细胞繁殖和遗传信息传递的物质基础。如果 DNA 和 RNA 的合成受到抑制或破坏, 必然会直接影响到细胞增殖。在细胞的增殖周期中, G₁ 期、S 期、G₂ 期、M 期各自起到非常重要的作用, 其中 G₁ 期为 DNA 合成前期, 在此期主要合成 RNA、蛋白质和一些细胞分裂相关的前体物质。S 期为 DNA 合成期, 期间将进行 DNA 遗传物质的复制、组蛋白的合成等, DNA 含量增加 1 倍, 是细胞增殖周期的关键环节。其后则进入 DNA 合成后期 (G₂ 期), 为 M 期的有丝分裂做最后准备。在 S 期 DNA 的合成活跃、复制旺盛情况很大程度反映了肿瘤细胞的增殖能力^[1]。使用流式细胞技术检测细胞周期各时相的分布具有快速、准确、简便的特点, 已是肿瘤分子生物学研究、抗肿瘤药物作用机制等研究中的一重要技术, 成为肿瘤早期诊断、判断预后、制定临床治疗方案的重要手段。祖国的传统医学以经验总结为主, 近年来已有学者应用现代分子生物学研究技术对中药抗肿瘤的机制、中药对细胞增殖周期的影响作了研究^[3]。本实验应用流式细胞技术分析天芝草胶囊对肿瘤细胞生长周期的影响, 探讨了天芝草胶囊抗肿瘤作用的部分细胞分子机制。

天芝草胶囊由白花蛇舌草等 18 味药材制成, 临床应用具有较好的抗肿瘤效果^[4]。本次实验结果发现, 天芝草胶囊主要作用在肿瘤细胞增殖周期中的 S 期, 影响 DNA 的合成, 从而抑制在细胞增殖周期中处于 S 期的肿瘤细胞, 使 G₁ 期向 S 期转化的肿瘤

细胞 DNA 合成、复制受到抑制, S 期细胞的比率下降, G₀/G₁ 期细胞的比率上升, 减慢了肿瘤细胞的增殖速度; 由于肿瘤细胞增殖的同步化, 也有利于提高周期特异性化疗药对肿瘤细胞的杀伤。已有文献表明, 白花蛇舌草、莪术、苦参等天芝草胶囊成分可阻滞肿瘤细胞周期, 诱导其凋亡^[5-7], 本实验结果与其一致。天芝草胶囊可将肿瘤细胞阻滞在 G₀/G₁ 期, 减少进入 S 期的细胞数及其有丝分裂, 从而抑制了肿瘤细胞的增殖。

[参考文献]

[1] 张友会. 现代肿瘤学(基础部分)[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993:1117.

[2] Krishan A, Wen J, Thomas R A, et al. NASA/American cancer society high-resolution flow cytometry project-III. multiparametric analysis of DNA content and electronic nuclear volume in human solid tumors [J]. Cytometry, 2001, 43(1): 16.

[3] 黄惠风, 钱建业, 谢少茹. 黄芪多糖对人胃癌细胞 MKN45 诱导凋亡和细胞周期的影响[J]. 实用临床医药杂志, 2010, 14(19): 17.

[4] 张业伟. 超声引导经皮射频微创技术联合天芝草胶囊治疗小肝癌 90 例分析[J]. 当代医学, 2010, 16(9): 6.

[5] 高超, 刘颖, 蔡晓敏, 等. 白花蛇舌草对宫颈 HeLa 细胞周期、凋亡及端粒酶活性的影响[J]. 徐州医学院学报, 2010, 30(7): 466.

[6] 杨长福, 李亚东, 牛建昭, 等. 莪术油对肺腺癌 A549 细胞周期及组织蛋白酶 K 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8): 113.

[7] 陆丽华, 童锦禄, 冉志华, 等. 氧化苦参碱对人结肠癌细胞株 SW1116 细胞周期通路相关调控因子的影响[J]. 胃肠病学, 2008, 13(7): 398.

[责任编辑 何伟]