

小半夏加茯苓颗粒含药血清体外对肝癌细胞 SMC-7721 生长增殖的影响

冯泳^{1*}, 孟庆华², 何前松¹, 陈刚³

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 天津中医药大学, 天津 300193;
3. 齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

[摘要] 目的: 采用血清药理学的方法, 观察小半夏加茯苓颗粒对肝癌 SMMC-7721 细胞的抑制作用。方法: 设空白对照组、环磷酰胺 (CTX) 组、原方汤剂组及颗粒剂不同剂量组, 分别制备成含药血清与体外培养的肝癌 SMMC-7721 细胞共孵, 倒置显微镜观察各组 SMMC-7721 细胞生长形态变化以及用 MTT 法检测其细胞增殖抑制率。结果: 与空白对照组比较, CTX 组、原方汤剂组以及颗粒不同剂量组均使 SMMC-7721 细胞生长形态发生明显改变, 细胞生长不良, 细胞数量减少; MTT 实验结果显示 CTX 组、汤剂组、颗粒不同剂量组对 SMMC-7721 细胞作用 24 h、48 h、72 h 后, 细胞增殖抑制率逐渐升高 ($P < 0.05$)。各时段内各中药组对细胞的抑制率均低于 CTX 组 ($P < 0.05$), 原方汤剂组与颗粒大剂量组无显著差异 ($P > 0.05$)。结论: 小半夏加茯苓颗粒含药血清对体外培养的肝癌 SMMC-7721 细胞具有明显的抑制作用, 且其作用呈现时间-效应关系和剂量-效应关系。

[关键词] 小半夏加茯苓颗粒; 含药血清; 肝癌 SMMC-7721; 唑蓝

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)05-0168-03

小半夏加茯苓颗粒是《金匱要略》中经典止呕方剂小半夏加茯苓汤的改良剂型^[1]。本课题组前期实验表明该方防治家鸽实验性化疗呕吐作用显著^[2]。鉴于有学者提出痰饮是肿瘤发病的重要病机之一^[3], 针对其主要病机, 本研究拟用该方进行抗肿瘤的相关研究, 观察该方颗粒含药血清对肝癌 SMMC-7721 细胞生长的影响, 为临床运用该方抗肿瘤提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康 SD 大鼠 60 只, 体重 (210 ± 10) g, 雌雄各半, 清洁级, 合格证号 0003377, 由重庆市中药研究院实验动物研究室提供。

1.2 瘤株 人肝癌 SMMC-7721 细胞株, 由中国科学院上海细胞生物学研究所提供。

1.3 药品和试剂 小半夏加茯苓汤由半夏 18 g、生姜 15 g、茯苓 9 g 组成, 按照传统方法水煎, 生药 1 g·g⁻¹, 药材由北京同仁堂有限公司提供, 小半夏加茯苓颗粒由本院制剂研究中心提供, 生药 1 g·g⁻¹; 环磷酰胺 (CTX) 由江苏恒瑞医药股份有限公司生产,

批号 07051121; RPMI-1640 培养基 (干粉) 为美国 Gibco 公司; 小牛血清 (FCS) 杭州四季青生物工程材料公司, 批号 071115, 0.25% 胰蛋白酶溶液为 Gibco 公司; D-hank s 液由贵阳医学院组织与干细胞工程中心实验室提供; 唑蓝 (MTT) 溶液为 Sigma 公司 (批号 8180); 二甲基亚砷 (DMSO) 分析纯, 上海试剂二厂 (批号 20080626)。

1.4 仪器 SW-CJ-1FD 超净工作台, 苏净集团安泰公司; CO₂ 恒温细胞培养箱, 美国 Thermo 电子; TS100-F 倒置光学显微镜, 日本尼康公司; 通用酶标仪, BIO-TEX ELX800uv, 美国产品; 脱色摇床, TS-1, 江苏海门设备厂。

2 方法

2.1 肝癌 SMMC-7721 细胞的复苏与传代培养 将冻存于液氮中的肝癌 SMMC-7721 细胞株取出, 复温, 低速离心洗涤 2 次, 将细胞悬液接种入培养瓶, 以含 10% 小牛血清及青霉素、链霉素各 100 U·mL⁻¹ 的 RPMI-1640 培养基, 在 37 ℃, 5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养, 次日倒置显微镜下观察, 待细胞完全贴壁后, 用 D-hank s 液清洗细胞 3 遍, 更换培养液。1~2 d 清洗换液 1 次。每日镜下观察, 当细胞铺满瓶底时进行传代, 先用 D-hank s 液清洗细胞 3 遍, 加入适量胰蛋白酶消化液, 置 37 ℃ 培养箱内 5 min, 镜下观察当细胞间隙增大、细胞形态变圆时, 使用含有小

[收稿日期] 2009-10-22

[基金项目] 贵州省优秀科技教育人才省长资金课题 (黔省专合字 (2006) 50 号)

[通讯作者] * 冯泳, Tel: 13984013391; E-mail: fy668@sina.com

牛血清的培养液终止消化,用吸管吹打细胞使之完全脱落,1 000 r·min⁻¹离心后,加入新鲜培养液混悬,平均分装入 2 个培养瓶中。

2.2 含药血清的制备 60 只健康 SD 大鼠,适应性饲养 1 周后随机分为 6 组,每组 10 只,空白对照组 ig 生理盐水 2.4 mL/只, Bid, CTX 组: ip CTX 注射液 0.55 mL, 1 次/d (50 mg·kg⁻¹), 原方汤组 ig 原方汤药剂 2.4 mL, Bid; 原方颗粒大、中、小剂量组(分别 ig 原方颗粒药液 2.4, 1.2, 0.6 mL/只, Bid, 相当于剂量 20, 10, 5 g·kg⁻¹·d⁻¹)。连续给药 3 d, 末次给药 1 h 后大鼠股动脉取血^[4]。离心分离血清, 同组血清混合, 56 ℃, 30 min 灭活, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 获得 6 组含药血清, 置 -20 ℃ 冰箱保存备用。

2.3 倒置显微镜下观察细胞形态变化 选择生长状态较好, 处于对数生长期的 SMMC-7721 细胞, 用 D-hank's 液洗涤 3 遍后, 加入适量胰蛋白酶消化液, 至 37 ℃ 培养箱内 5 min, 镜下观察当细胞间隙增大、细胞变圆时, 加入含 10% 小牛血清的培养液终止消化。用吸管吹打细胞使之脱落, 转移细胞至离心管, 经 1 000 r·min⁻¹离心后, 用培养液制成细胞悬液并调浓度至 1 × 10⁵·mL⁻¹, 取 96 孔平底培养板, 各孔加入 200 μL 细胞悬液, 入 CO₂ 培养箱培养, 待细胞完全贴壁后, 将细胞分为 6 组, 每组 12 个复孔, 每孔加入相应含药血清, 使终浓度为 10%, 继续培养 24

h 后, 取出培养板于倒置显微镜下(×400)观察细胞形态变化并拍照。

2.4 MTT 法检测细胞增殖抑制率 SMMC-7721 细胞的选择、浓度、培养均同 2.3。分别于 24 h、48 h、72 h 后, 每板各组取出 4 孔进行 MTT 检测(按常规方法进行)。

在酶标仪 570 nm 波长处测定各孔光吸收值(OD 值), 重复 3 次, 取其平均值, 并计算细胞增殖抑制率。

2.5 数据处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析。组间比较采用单因素方差分析 LSD 法或 Tukey's C 检验法(用于不满足方差齐性的数据处理) $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

3 结果

3.1 细胞形态变化 与空白对照组比较, CTX 组、原方汤剂及颗粒剂组等各组含药血清作用后的细胞形态发生明显改变, 呈现出生长受阻状态, 甚至有些细胞脱落, 细胞数目减少, 如图 1 所示。

3.2 细胞增殖抑制率 与同时段空白对照组比较, 各给药组 OD 值均显著下降($P < 0.01$)。各时段各中药组对细胞的抑制率均低于 CTX 组($P < 0.05$), 原方汤剂组与颗粒大剂组无显著差异($P > 0.05$)。同时段内颗粒大、中、小剂量组比较, 均表现为随剂量的加大, 抑制率逐渐升高($P < 0.05$) (见表 1)。

表 1 含药血清对 SMMC-7721 细胞 OD 值及抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	24 h		48 h		72 h	
		OD 值	抑制率/%	OD 值	抑制率/%	OD 值	抑制率/%
空白对照	—	2.020 ± 0.053	—	2.156 ± 0.014	—	2.186 ± 0.002	—
CTX	0.05	1.613 ± 0.022 ¹⁾	20.12	1.416 ± 0.007 ¹⁾	34.33	1.394 ± 0.013 ¹⁾	36.22
原方汤剂	20	1.666 ± 0.027 ¹⁾	17.53 ²⁾	1.616 ± 0.010 ¹⁾	25.05 ²⁾	1.603 ± 0.006 ¹⁾	26.69 ²⁾
颗粒	20	1.706 ± 0.019 ¹⁾	15.55 ^{2,3)}	1.658 ± 0.014 ¹⁾	23.08 ^{2,3)}	1.669 ± 0.025 ¹⁾	23.65 ^{2,3)}
	10	1.810 ± 0.035 ¹⁾	10.37 ²⁾	1.775 ± 0.029 ¹⁾	17.68 ²⁾	1.718 ± 0.016 ¹⁾	21.40 ²⁾
	5	1.907 ± 0.012 ¹⁾	5.58 ^{2,3)}	1.880 ± 0.009 ¹⁾	12.78 ^{2,3)}	1.836 ± 0.010 ¹⁾	16.01 ^{2,3)}

注: 与同时段空白组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与同时段西药组比较, ²⁾ $P < 0.05$; 与同时段颗粒中剂量组比较, ³⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

小半夏加茯苓颗粒由半夏、生姜、茯苓组成, 有关资料报道半夏、生姜、茯苓单味药分别具有不同程度的抗肿瘤作用^[5~8], 但三味药组成的复方是否具有抗肿瘤作用, 未见报道。本研究观察表明: 环磷酰胺组、原方汤剂组及颗粒各剂量组含药血清作用后的 SMMC-7721 细胞形态发生改变, 原本呈铺路石样的细胞变为圆形, 细胞间及细胞与培养瓶之间的连接受影响甚至被破坏, 细胞间隙加大, 其中环磷酰胺组、原方汤剂组、颗粒大剂量组细胞形态改变较明

显, 可见脱落悬浮于培养液内的细胞, 细胞数目减少。由此说明原方汤剂及颗粒大剂量组含药血清对体外培养的肝癌 SMMC-7721 细胞有明显抑制作用。

MTT 检测结果表明原方汤剂及其颗粒对肝癌 SMMC-7721 有抑制增殖的作用, 且其抑制作用呈现时间-效应关系。MTT 检测结果还表明同时段内各中药组对细胞的抑制率均低于 CTX 组($P < 0.05$), 原方汤剂组与颗粒大剂量组无显著差异($P > 0.05$)。同时段内颗粒不同剂量比较, 显示出剂量-效应关系。

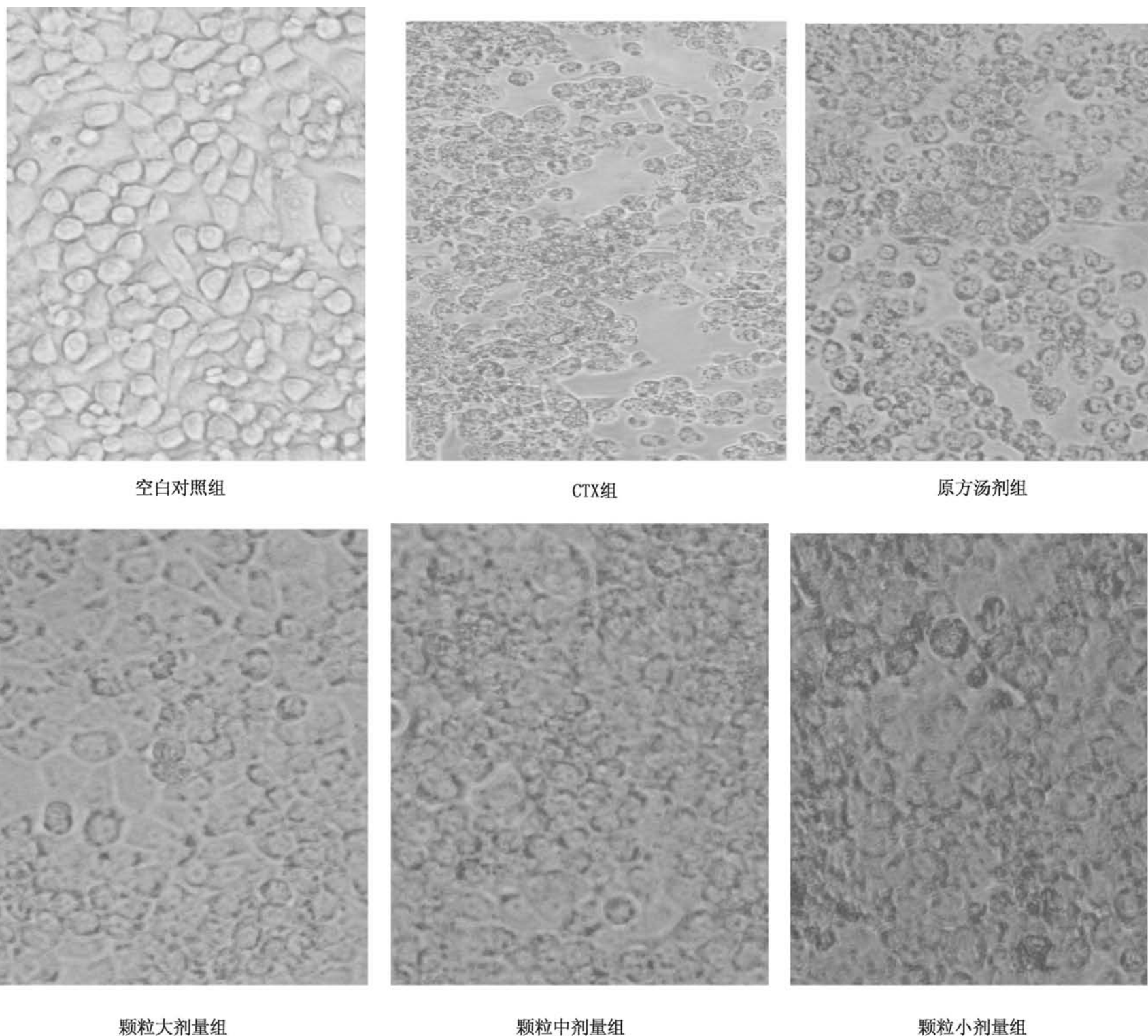


图 1 各组肝癌 SMMC-7721 细胞形态(×400)

注:空白对照组细胞呈正常贴壁细胞形态,铺路石样,贴壁牢固,细胞轮廓清晰,胞膜光滑,细胞间隙小,胞浆中无颗粒。CTX 肿瘤细胞变圆,胞浆浓缩,胞浆内颗粒增多、增粗,细胞膜边缘变粗糙,细胞皱缩,与周围细胞失去结合并脱落,可见细胞碎片及大量脱落细胞悬浮于培养液中,细胞数目减少。原方汤剂组变化与 CTX 组相似。颗粒大剂量组细胞形态明显改变,胞内颗粒沉积,细胞与细胞间失去结合并脱落,细胞数量减少。颗粒中剂量组细胞形态改变,细胞间隙加大,细胞间连接不牢固,胞内颗粒增多,细胞数量较前减少。颗粒小剂组作用 24 h 后细胞间隙加大,形态不规则,贴壁不牢固,可见胞内颗粒,细胞数量减少,仍有少量细胞形态正常。

有关小半夏加茯苓药及其颗粒抑制 SMMC-7721 细胞的作用机制尚需进一步的研究。

[参考文献]

[1] 冯泳,何前松,时京珍,等.小半夏加茯苓汤临床应用和实验研究概况[J].江苏中医药,2008,40(2):84.
[2] 何前松,冯泳,时京珍,等.小半夏加茯苓颗粒抗顺铂所致家鸽呕吐的药效学观察[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(4):209.
[3] 赵远红.恶性肿瘤“温药和之”解析[J].新中医,2008,40(7):100.

[4] 贺石林,李元建.医学科研方法学[M].北京:人民军医出版社,2003:411.
[5] 吴皓,陈龙,陆跃鸣,等.半夏及其姜制抗肿瘤细胞生长作用的比较[J].中成药,1996,18(5):20.
[6] 李电东,明秀英,甄永苏,等.茯苓素对抗癌药的增效作用[J].中国抗生素杂志,1990,15(1):63.
[7] 周立,张玮,蔺惠颜,等.茯苓素诱生肿瘤坏死因子(TNF)的作用[J].中国抗生素杂志,1994,19(5):376.
[8] 刘辉.生姜醇提物对荷瘤鼠免疫功能的影响[J].卫生研究,2002,31(3):208.