

· 药理 ·

麦门冬汤合金钱苇茎汤提取部位对非小细胞肺癌 H460 细胞毒作用的研究

郑璐玉¹, 熊飞¹, 詹臻¹, 唐于平², 段金廛², 张旭^{1, 2*}

(1. 南京中医药大学基础医学院中西医结合基础学科, 南京 210029;
2. 江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046)

[摘要] 目的: 通过药效评价实验筛选出麦门冬汤合金钱苇茎汤(简称金方)的有效部位。方法: MTT 法观察不同浓度的金方提取出的 8 个部位对肺癌 NCI-H460 细胞和正常人胚肺成纤维细胞 HFL-I 生长增殖的影响, 初步筛选有效部位; 平板细胞克隆形成试验, 检测有效部位对肿瘤细胞克隆形成能力的影响; 同时用流式细胞仪进行细胞周期检测分析, 评价有效部位对细胞周期的影响; Hoechst33258 染色后在荧光显微镜下观察 NCI-H460 细胞凋亡的形态变化。结果: 不同浓度提取各部位中, 6 部位对 NCI-H460 细胞有显著的生长抑制作用; 作用 72 h 后, 荧光显微镜下可见 NCI-H460 细胞核固缩, 染色质凝聚等凋亡形态学特征; 流式检测显示对 NCI-H460 细胞主要抑制在 S 期, 并有凋亡细胞出现。结论: 麦门冬汤合金钱苇茎汤提取各部位中 6 部位对 NCI-H460 细胞具有细胞毒作用, 可有效抑制肺癌细胞生长, 并对人体正常细胞(胚肺成纤维细胞)无显著影响, 可以进一步分离筛选组分及单体化合物。

[关键词] 麦门冬汤合金钱苇茎汤; 肺癌 NCI-H460 细胞; 细胞毒; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)03-0060-04

The Cytotoxicity of the Effective Components of Maimendong Recipe and Qianjinweijing Recipe to Human Non-Small Cell Lung Carcinoma Cell Line H460

ZHENG Lu-yu¹, XIONG Fei¹, ZHAN Zhen¹, TANG Yu-ping², DUAN Jin-ao², ZHANG Xu^{1, 2*}

(1. College of Basic Medicine Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;
2. Jiangsu Key Laboratory for TCM Formulae Research, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Object:** To screen the effective components of Maimendong Recipe and Qianjinweijing recipe with the efficacy evaluation. **Methods:** The effective parts which were extracted from these recipes by chemical methods, lung cancer H460 cell line and HFL-I cell line were cultured as model and assayed by MTT method respectively for the preliminary screen. Cell lines colony formation capacity was measured by monoclonality as well as cell cycle was analyzed by flow cytometry to estimate the screened components. Cell apoptosis was shown by Hoechst 33258 staining in cell morphology. **Results:** Extraction 6 can inhibit the proliferation of lung cancer cells significantly without influence on fibroblast cells' activity(HFL-I). **Conclusions:** Extraction 6 of Maimendong recipe and Qianjinweijing recipe are the effective components against lung cancer cells, can be isolated and screened with further studies.

[收稿日期] 2009-06-26

[基金项目] 国家科技支撑计划“中医药诊疗技术及特色产品应用研究”重点项目(2006BAI11B08)

[通讯作者] * 张旭, Tel: (025) 85811554; Email: zhangxutcm@gmail.com

[Key words] maimendong recipe and Qianjinweijing recipe; lung cancer H460 cell line; cytotoxic; cell apoptosis

目前,肺癌无论从发病数量(120万/年)还是死亡数量(110万/年)来看,均为全球最主要的癌症^[1]。随着中医药治疗肺癌研究的深入,在对肺癌的病因病机认识、中医辨证论治、专方专药、中成药、外治法、实验研究等方面均取得了一定的进展。

有关麦门冬汤的临床和实验研究国内外已有许多报道。临床上应用麦门冬汤治疗肿瘤患者出现的阴亏燥热,常可获得较好的疗效。肺癌“局部的实不外乎气滞、血瘀、痰凝、毒聚的病理变化”^[2],而苇茎汤有清肺化痰活血化瘀之功效。并且见有用本方加味治疗肺癌有效的文献报道^[3],但其抗肺癌物质基础和作用机制尚不甚明确和统一。本实验选取两方的合煎剂,对其抑瘤作用机制进行体外实验研究,为寻找复方有效作用成份提供实验依据。

1 材料与方

1.1 材料及仪器 旋转蒸发仪(南京金正教学仪器有限公司);1002升降恒温水浴锅;水循环式真空泵(河南巩义市英峪予华仪器厂);数显调温电热套(通州市张芝山镇);HH-S数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂);

1.2 细胞株 肺癌细胞株 NCI-H460 和人胚肺成纤维细胞 HFL-I 均购自中科院上海生物细胞所;DMEM培养基为美国 GIBCO 公司产品;优级新生牛血清为兰州民海生物工程有限公司产品;胰蛋白酶为 AMRESCO 公司产品;二甲基亚砷(DMSO)和(MTT)为 AMRESCO 公司产品;PI 染液[(PI(SIGMA, USA), NaCl, RNase(AMRESCO, USA) TritonX-100, 枸橼酸钠, 双蒸水。)]、Hoechst 33258 染色剂为碧云天生物技术研究产品;顺铂注射液(DDP,批号 071201)为江苏豪森药业股份有限公司产品,药用乙醇、乙酸、乙酯、环己烷等其余试剂均为国产分析纯。

1.3 麦门冬汤与《千金》苇茎汤提取物的制备 称取麦冬 200 g,法半夏 100 g,生晒参 200 g,甘草 80 g,苇茎 200 g,薏苡仁 200 g,冬瓜子 200 g,桃仁 100 g 组成全方共 1 280 g,粉碎后置于 20 000 mL 圆底烧瓶中,加药材量 10 倍量纯净水,振摇混合后,浸泡 30 min;连接回流冷凝装置,置电热套中缓缓加热至 110 ℃ 沸腾,并保持微沸 2 h 后,停止加热,放置至溶

液温度降为室温,拆掉回流冷凝装置,倾出烧瓶中的溶液,用纱布过滤。药渣再加入纯净水至与第 1 次相同刻度,同样方法再提取 1 次,合并提取液,分次用 10 000 mL 圆底烧瓶进行减压浓缩,得到水提浓缩液(MW-01);如此反复提取药材 21.60 kg,共得到水提浓缩液(MW-02) 5.37 kg。将上述浓缩液加 95% 乙醇至含醇量为 80% (v/v),静置 24 h,取出上清液,减压浓缩后得到醇沉沉淀(MW-02) 3.85 kg 和 2 700 mL 的醇沉浓缩液;将醇沉浓缩液减压回收溶剂,得到醇回收溶剂后沉淀(MW-03) 0.05 kg,醇浓缩液(MW-04) 1.4 kg;将醇浓缩液平均分成两份,分别倒入两个 5 000 mL 的分液漏斗中,各加入 1 500 mL 环己烷,摇匀后静置,待分层后分出上层环己烷溶液,下层水溶液再用环己烷同样比例相同方法萃取两次后,减压回收溶剂,得到环己烷萃取部分(MW-05) 0.18 kg;水层再各加入 1 500 mL 乙酸乙酯,摇匀后静置,待分层后分出上层乙酸乙酯溶液,下层水溶液再用乙酸乙酯同样比例相同方法萃取两次后,合并上层乙酸乙酯溶液,减压回收溶剂后得到乙酸乙酯萃取部分(MW-06) 0.13 kg;水层再各加入 1 500 mL 正丁醇,摇匀后静置,待分层后分出上层正丁醇溶液,下层水溶液再用正丁醇同样比例相同方法萃取两次后,合并上层正丁醇溶液,减压回收溶剂后到正丁醇萃取部分(MW-07) 0.46 kg 和水溶性部位(MW-08) 0.65 kg。

2 实验方法

2.1 细胞培养 取对数生长期细胞 NCI-H460 用含小牛血清的 DMEM(含 8% 小牛血清、青霉素 1×10^5 U · L⁻¹、链霉素 1×10^5 U · L⁻¹, pH7.4) 培养液,置于 5% CO₂、37 ℃ 培养箱中培养。待细胞铺展至培养瓶的 80%,用 0.25% 胰酶消化进行传代培养。HFL-I 细胞用 alfa-MEM 培养液(含体积分数 10% 已灭活的胎牛血清、青霉素 1×10^5 U · L⁻¹、链霉素 100 mg · L⁻¹) 培养,其他方法相同。

2.2 细胞增殖抑制实验(MIT 法) 取对数生长期的 NCI-H460 细胞和 HFL-I 细胞,调整细胞浓度为 1×10^4 · mL⁻¹,接种于 96 孔培养板,每孔 200 μL,培养 24 h,吸弃上清,各孔换无血清培养基 200 μL,12 h 后,吸弃培养液,实验组分别将 1~8 部位按终

浓度为 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的含药培养液(其中 1, 2, 3, 8 部位药物以无血清培养液溶解; 4, 5, 6, 7 部位药物以 3/1 000 DMSO 加无血清培养液溶解) 200 μL 加入每孔, 阴性对照组加入等体积的培养基, 阳性对照组加入母浓度为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 体积的顺铂注射液。每组设 6 个平行孔, 作用 72 h 后, 每孔加入 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 20 μL 继续培养 4 h, 吸弃上清后, 每孔加入 200 μL DMSO, 于酶标仪 490 nm 波长条件下测 OD 值, 根据公式: 增殖抑制率% = (1 - 实验孔 OD 值/对照孔 OD 值) $\times 100\%$ 计算细胞生长抑制率。

2.3 克隆形成实验 固体表面克隆形成: 取对数期 NCI-H460 细胞, 制备细胞悬液加于 6 孔板中, 每孔 100 ~150 个细胞, 加培养液至 2 mL, 4 h 后每孔换无血清培养基各 2 mL; 12 h 后吸弃培养基, 各孔分别加 6 部位终浓度为 1, 10, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的含药培养基(3% 小牛血清) 培养, 每孔 2 mL, 另设对照组加等体积培养基。每 72 h 加药孔换新鲜含药培养液, 对照组换新鲜培养液继续培养; 培养 7 d 左右, 以对照组为标准, 当对照组可见的细胞团达到 50 个细胞时, 终止实验。拍照。计数。

2.4 流式细胞仪检测 根据 MTT 初筛结果, 收集经 6 部位 100, 10, 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 各药物浓度及顺铂注射液 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理组和对照组处理 72 h 的 NCI-H460 细胞, 各组细胞均匀打散, 用 PBS 洗涤细胞 2 次(离心 1 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 弃上清。缓慢加入 1 mL 冰乙醇(70%) 固定保存 - 20 $^{\circ}\text{C}$ 。检测时, 用 PBS 洗涤 2 次(先离心 1 800 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min, 弃上清, 再用 PBS 重悬, 离心 1 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min, 弃上清)。将细胞重悬于 PBS, 调整细胞密度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, 加入 PI 染液混合, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。上机检测。

2.5 Hoechst 33258 荧光染色 用 6 孔板培养 NCI-H460 细胞, 预先将无菌小盖玻片置于每个孔板底部, 制作细胞爬片。分别以无血清培养基和 6 部位 100, 10, 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药液处理 72 h 后, 吸弃培养液, 加入 0.5 mL 固定液, 固定 10 min; 去固定液, 用 PBS 洗 2 次, 每次 3 min, 吸弃液体; 加入 0.5 mL Hoechst 33258 染色液, 染色 5 min; 去染色液, 用 PBS 洗 2 次, 每次 3 min, 吸弃液体; 用荧光显微镜观察并拍照。结果判断: 正常细胞的细胞核呈现弥散均匀荧光, 出现细胞凋亡时, 细胞核或细胞质内可见浓染致

密的颗粒块状荧光, 甚至可见 DNA 荧光碎片。

2.6 数据处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS15.0 软件, 2 组样本均数之间比较用 t 检验, 多组样本数据用单因素方差分析。

3 结果

3.1 MTT 试验结果 0.1 ~100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的全方提取部位—6 部位作用 H460 细胞 72 h 后, (表 1) 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上的浓度具有抑制细胞生长的趋势, 且随着剂量的增加, 对细胞的抑制率上升。在高浓度时有非常显著性差异 ($P < 0.01$), 呈剂量依赖关系。同时, 6 部位不抑制正常细胞增殖(见表 2), 即无毒性作用。

表 1 6 部位各个浓度 OD 值与对 H460 细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 / 药物浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	OD 值	生长抑制率 / %
DDP 1	0.333 \pm 0.041 ²⁾	62.2
6 部位 100	0.706 \pm 0.047 ²⁾	19.9
6 部位 50	0.826 \pm 0.082	6.3
6 部位 10	0.848 \pm 0.077	3.8
6 部位 5	0.943 \pm 0.080	- 6.9
6 部位 1	0.913 \pm 0.056	- 3.52
6 部位 0.5	0.905 \pm 0.068	- 2.68
6 部位 0.1	0.858 \pm 0.062	- 2.71
对照组	0.882 \pm 0.044	0

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

表 2 6 部位对人体正常细胞人胚肺细胞的影响

组别 / 浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	OD 值
对照组	0.504 \pm 0.057
6 部位 100	0.488 \pm 0.048

3.2 流式细胞仪分析结果 流式细胞仪测定了 6 部位不同浓度作用的细胞周期和凋亡率的变化(见表 3 和图 1)。1, 10, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的 6 部位作用于 H460 细胞 72 h 后, 在浓度 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞凋亡率上升, 与对照组细胞比, 均 $P < 0.01$, 且主要抑制在 S 期, ($P < 0.01$)。从表中可以看出: 加入不同浓度的 6 部位可以诱导肺癌 H460 细胞发生细胞凋亡; 6 部位诱导细胞凋亡率与浓度呈一定的正相关, 随着浓度的增加细胞凋亡增多。

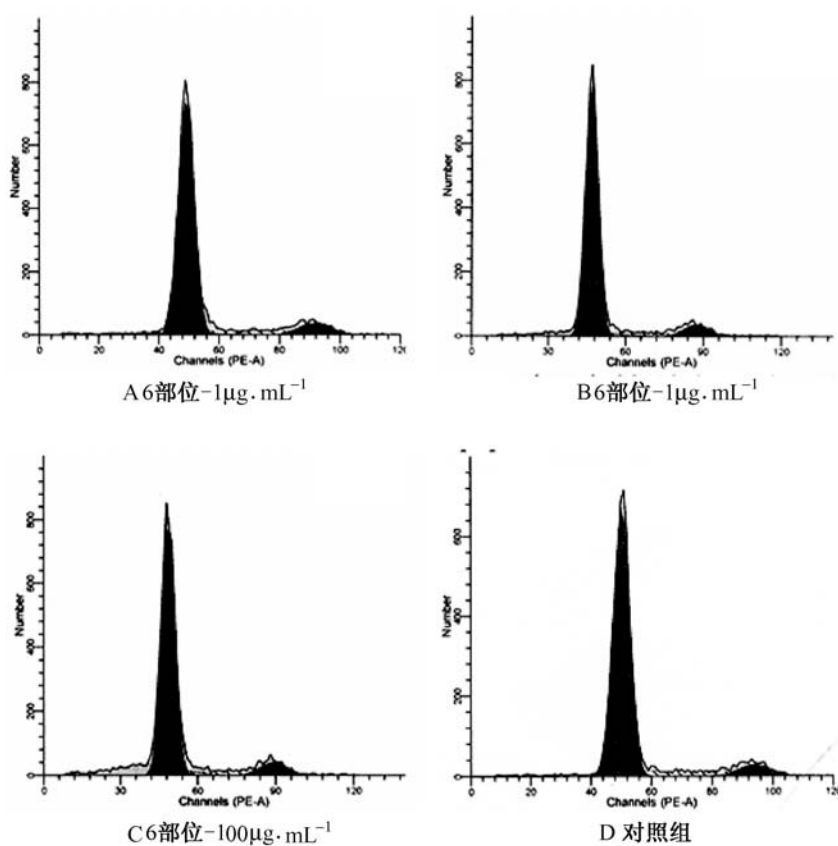


图 1 6 部位不同浓度作用细胞周期流式图

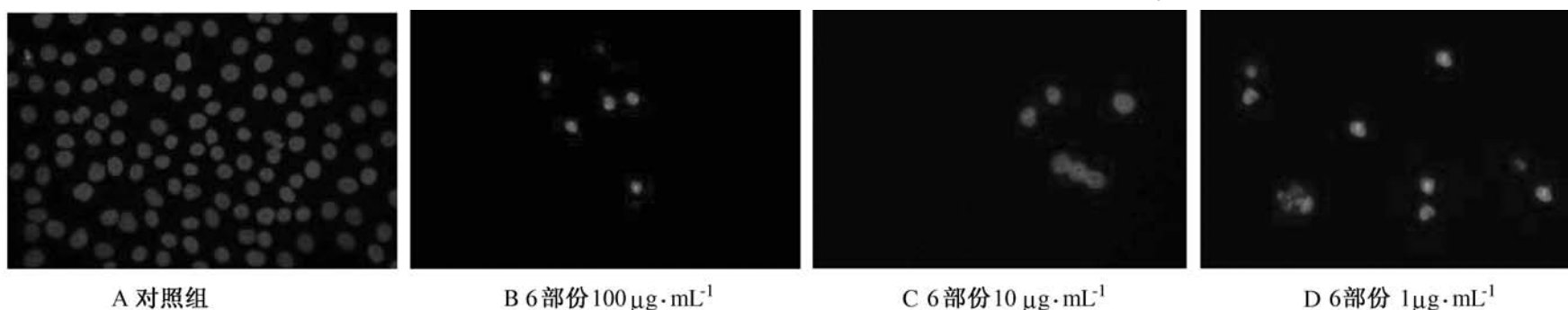


图 2 6 部位不同浓度 Hoechst 33258 荧光染色图

表 3 6 部位不同浓度作用的细胞周期和凋亡率的变化 (% , 珉±s)

组别/药物浓度 (1 μg · mL ⁻¹)	G ₁ 期	G ₂ 期	S 期	凋亡
对照组	83.26 ±1.01	7.01 ±1.4	9.73 ±2.2	2.11 ±0.16
6 部位 1	83.41 ±1.01	8.15 ±0.49 ²⁾	8.44 ±0.55 ²⁾	4.36 ±0.79 ²⁾
6 部位 10	85.13 ±0.67	6.86 ±1.04	8.27 ±0.89 ¹⁾	4.73 ±3.18
6 部位 100	83.01 ±0.33	8.54 ±0.17 ²⁾	8.44 ±0.49 ²⁾	12.14 ±2.29 ²⁾

3.3 Hoechst 33258 染色检测结果 在荧光显微镜下观察发现, 对照组活细胞荧光较弱, 较均匀, 经 6 部位不同浓度作用 72 h 后发生凋亡的 H460 细胞核明显变小, 并可见致密强荧光, 可见凋亡小体(见图 2)。

3.4 克隆形成实验结果 在药物作用后可见, 与对照组相比较, 6 部位高浓度 100 μg · mL⁻¹ 对 H460 细胞有明显的克隆形成抑制作用, 且无大克隆形成, 并呈现剂量效应依赖性。

表 3 6 部位不同浓度对 H460 克隆形成的影响(珉±s)

组别/药物浓度/(μg · mL ⁻¹)	克隆数	克隆形成 (%)
对照组	155 ±1.01	103
6 部位 1	83 ±1.01	55.5
6 部位 10	91 ±0.67	60
6 部位 100	17 ±0.33 ²⁾	11.3

4 讨论

麦门冬汤和千金苇茎汤合用, 具有清热养阴、润肺降气、祛痰排脓之功, 和现代中医所认为之肺癌的病机“气阴两虚、热毒痰瘀互结”基本相符。“气阴两虚、热毒痰瘀互结”是肺癌的主要病机。

实验结果显示, 用 MIT 法观察到不同浓度金方 6 部位有一定的抑制肺癌 H460 细胞生长的作用, 而对正常人胚肺细胞 HFL- 无明显作用。说明该部位对肺癌细胞有细胞毒作用而对正常细胞并无杀伤性。细胞周期失控是肿瘤发病的重要因素之一, 肿瘤治疗的中心环节是干扰肿瘤细胞的细胞周期, 从而使肿瘤细胞增殖速率减慢或诱导细胞走向死亡。本实验结果表明, 随着浓度的增加, 对肿瘤细胞的抑制主要出现在 S 期, 提示 6 部位有一定的细胞周期

阻滞作用, 同时可见细胞凋亡也随着药物浓度增加而增多, 荧光染色观察也得到相似结果。细胞克隆形成能力是评价单细胞存活和增殖的一个指标, 实验结果显示, 金方 6 部位在高浓度时对肺癌 H460 细胞有显著的克隆形成抑制作用。通过诱导细胞凋亡治疗肿瘤已成为肿瘤治疗的新途径。

综合以上结果, 金方提取部位群中, 6 部位对非小细胞肺癌 H460 细胞株有明显的细胞毒作用, 且对正常细胞人胚肺成纤维细胞 HFL- 无毒副作用。因此, 对金方有效部位群及其进一步提取组分、化合物单体对非小细胞肺癌的信号转导通路及相关作用机制值得进一步探讨。

[参考文献]

[1] 吴勉华. 原发性支气管肺癌中医药研究进展与评述 [J]. 南京中医药大学学报(自然科版), 2003, (6): 36.
[2] 刘嘉湘. 肺癌的中医药治疗进展 [J]. 中国肿瘤, 2002, 11(6): 326.
[3] 吴玉生. 肺癌的病因病机与临床治疗 [J]. 新中医, 2005, 37(8): 3.
[4] 张仲景. 金匱要略方论 [M]. 北京: 中国书店, 1993: 4.