

健脾和胃类方对肿瘤细胞生长抑制的比较研究

陈玉龙^{1*}, 苗艳艳², 吕翠田¹

(1. 河南中医学院, 郑州 450008; 2. 广州中医药大学, 广州 510405)

[摘要] 目的: 观察比较不同健脾和胃方药的抗肿瘤作用及探讨其作用机制。方法: 体外培养人食管癌细胞株 Eca109 和人肝癌细胞株 HepG2, 分离和培养人外周血单核细胞(PBMC), MTT 和 Alamar Blue 法测定细胞生长。观察比较六君子汤(S)、四君子汤(F)、二陈汤(T)对 Eca109 和 HepG2 细胞的生长抑制作用及对 PBMC 激活作用, 同时比较 S、F、T 激活的 PBMC 对 Eca109 和 HepG2 细胞生存的影响。结果: 3 方对 Eca109 和 HepG2 细胞的生长都有不同程度的抑制作用, 随药物浓度增高而增强, 具有明显的剂量依赖性。其中 T 作用最强, S 次之。3 方药对 Eca109 细胞的抑制作用强于对 HepG2 细胞的作用, 但两者没有显著差异。3 方对 PBMC 都有不同程度的激活作用, 其中 F 最强, S 次之。激活后的 PBMC 对 Eca109 和 HepG2 生长有明显抑制作用。结论: 健脾和胃方药六君子汤、四君子汤、二陈汤可以通过直接抑制肿瘤细胞生长和通过免疫调节两个途径发挥其抗 Eca109 和 HepG2 细胞效应。二陈汤对肿瘤细胞生长抑制最强, 四君子汤激活 PBMC 作用效果最好。

[关键词] 健脾和胃; 四君子汤; 六君子汤; 二陈汤; 抗肿瘤

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)03-0112-04

Comparative Study on Inhibitory Effect of Reinforcing Spleen and Stomach Recipes on Tumour Growth

CHEN Yu-long^{1*}, MAO Yan-yan², L Cui-tian¹

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To observe and compare anti-tumor affects of different reinforcing spleen and stomach recipes and discuss its function mechanism. **Methods:** Human esophagus cancer cell line Eca 109 and liver cancer cell line HepG2 were in vitro cultured. Peripheral blood mononuclear cells(PBMC) were isolated and cultured. MTT and Alamar Blue method were used to detect cell growth. Inhibitory effect of Liujunzi decoction (S), Sijunzi decoction (F), Erchen decoction (T) on Eca109 and the HepG2 cell's growth and activation effect on the PBMC were observed and compared. PBMC activation by S, F, T to Eca109 and the HepG2 cell survival influence were compared simultaneously. **Results:** The three recipes all can inhibit Eca109 and the HepG2 cell's growth to various degree and in a dose-dependent manner. T function is strongest, S the next best. The inhibitory action of three recipes on Eca109 cell stronger than to HepG2 cell, but there was no statistical difference. The three recipes all have activation function to PBMC in various degree, F is the strongest, S the next best. PBMC activated has the obvious inhibitory action to Eca109 and the HepG2 growth. **Conclusion:** The reinforcing spleen and stomach recipes including Liujunzi decoction, Sijunzi decoction, Erchen decoction may play its anti-Eca109 and the HepG2 cell effect through two ways, one is to suppress the tumour cell growth directly, the other is to adjust the immunity. T suppresses the tumour cell growth strongly, F activates the PBMC function significantly.

[收稿日期] 2009-07-13

[通讯作者] * 陈玉龙, Tel: (0371) 65680134; E-mail: cy172621@163.com

[Key words] reinforcing spleen and stomach; Liujunzi decoction; Sijunzi decoction; Erchen decoction; anti-tumor

脾胃虚弱是肿瘤发生、发展的主要病机之一,因此历代医家多从调理脾胃论治肿瘤,并积累了宝贵的临床经验,产生了多个有效方药^[1]。近年来临床研究表明,单用健脾和胃方药或配合放、化疗治疗肿瘤,或用于放化疗和手术后的应用,能够起到增效、减毒,提高生活质量的作用^[2]。为了探讨健脾和胃方药抗肿瘤机理,我们比较了具有健脾和胃功能的经典方剂四君子汤、六君子汤、二陈汤对人食管癌细胞株 Eca109 和人肝癌细胞株 HepG2 生长的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药物 人参、白术、茯苓、甘草、陈皮、半夏饮片购于广州康美药业股份有限公司。分为六君子组 S(人参 1、白术 1.5、茯苓 1、甘草 1、陈皮 1、半夏 1.5)、四君子汤组 F(人参 1、白术 1.5、茯苓 1、甘草 1)、二陈汤组 T(茯苓 1、甘草 1、陈皮 1、半夏 1.5),煎煮、浓缩、5 000 g 离心、0.22 μm 过滤,干燥称重,置 4 ℃ 冰箱备用,用时调制所需浓度(提取物浓度)。

1.1.2 细胞株 人食管癌细胞株 Eca109 人和肝癌细胞株 HepG2 分别来源于河南中医学院中医药分子生物实验室和广州中医药大学大学生化实验室。

1.1.3 主要试剂 RPMI1640 培养基(GIBCO,批号:434348);胎牛血清(Hyclone,批号:020832);MTT(Amresco,批号:0793);Alamar Blue(Serotec Ltd,批号:020506B);人淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限公司,批号:LS1150);DMSO(Sigma,批号:D5885);EDTA(华美公司,批号:BP0961);胰蛋白酶(Amresco,批号:0458)

1.1.4 主要仪器设备 细胞培养箱(德国 Kendro);倒置显微镜(Olympus);SG-603 生物安全柜(Bake);酶标仪(Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞生长于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱,每间隔 48 h 更换 1 次培养基,试验时,细胞用消化液(含 0.02% EDTA 和 0.25% 胰蛋白酶以 1:1 比例配制)进行消化,并接种于 96 孔板中或 100 培养皿中。

1.2.2 MTT 法测定^[3] 细胞生长抑制作用 选用对数生长期的贴壁肿瘤细胞,用胰酶消化后,调至 5×10^4 个 mL⁻¹ 的细胞悬液,接种在 96 孔培养板中,200 μL/孔,37 ℃,5% CO₂,培养 24 h,分别加入六君子组 S、四君子汤组 F,二陈汤组 T 均 200 μL,浓度分为 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3 200 μg · mL⁻¹ 8 个梯度,每组 3 个复孔,继续培养 48 h。去上清液,每孔加 200 μL 新鲜配制的含 0.2 mg · mL⁻¹ MTT 的无血清培养基,37 ℃ 继续培养 4 h。小心弃上清,并加入 100 μL DMSO 溶解 MTT,摇床上摇动 15 min 后,在酶标仪上以 570 nm/630 nm,测定光密度值。计算肿瘤细胞生长抑制率(%)。

1.2.3 外周血单个有核细胞(PBMC)的诱导制备及分组 取人肝素抗凝血,等体积 PBS 液混匀,经人淋巴细胞分层液梯度分离(2 000 r · min⁻¹,离心 20 min)。吸取第 2 层白膜状细胞层,PBS 液洗涤 2 次,每次 1 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,最后 1 次离心后将沉淀的细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基配成单细胞悬液,将配置好细胞悬液分种于完全培养基,分为对照组(C)、S(200 μg · mL⁻¹)组、F(200 μg · mL⁻¹)组、T(200 μg · mL⁻¹)组共 4 组,置 6 孔板中培养,细胞浓度为 5×10^5 mL⁻¹,每孔终体积 2 mL,37 ℃、5% CO₂ 浓度的条件下培养。每隔 3 d 半量换液,并补充相应干预药物终浓度不变。

1.2.4 健脾和胃方药对 PBMC 生长的影响 PBMC 生长的测定采用 Alamar Blue 法。将 PBMC 种于 96 孔板中培养,分为对照组 C(完全培养基)、S(200 μg · mL⁻¹)组、F(200 μg · mL⁻¹)组、T(200 μg · mL⁻¹)组共 4 组,每组 3 个复孔,每孔终体积 200 μL。于培养后 6 d 加 20 μL Alamar Blue,酶标仪测定加 Alamar Blue 后 0, 24, 48, 72 h A570、A630 值,按说明书中公式计算各组还原率。

1.2.5 健脾和胃方药干预 PBMC 对肿瘤生长的影响 健脾和胃方药各组干预后的 PBMC 为效应细胞,干预方法如上 1.2.3;Eca109、HepG2 为靶细胞,将培养 5 d 的各组效应细胞离心去上清,细胞沉淀用完全培养基悬浮,将 2×10^4 各组效应细胞与 4×10^3 的靶细胞(96 孔板培养 24 h)混合培养于 96 孔板中,此时效靶比为 5:1,与干预各组效应细胞对

应, 设对照组 C(完全培养基)、S 组、F 组、T 组, 单独培养的靶细胞组(A 组), 每组设 3 个复孔, 共 5 组。在 37 ℃、5% CO₂ 浓度条件下共同培养 24 h, 弃上清, 用 PBS 洗 2 次, 加 MTT, 孵育 4 h, 去上清, 加 DMSO, 酶标仪检测。抑制率 = (靶细胞 A 组 - 效应细胞组) / 靶细胞 A 组 × 100%

1.2.5 统计学方法 计量数据应用软件 spss11.0 进行统计。

2 实验结果

2.1 健脾和胃方药对 Eca109 细胞生长的抑制作用 见表 1。

表 1 健脾和胃方药对 Eca109 细胞生长的抑制作用
($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | 抑制率 / % | | |
|---|----------------------------|----------------------------|--------------|
| | S | F | T |
| 25 | 1.73 ± 1.10 | 1.11 ± 0.98 | 1.02 ± 1.03 |
| 50 | 1.68 ± 1.15 | 1.65 ± 1.23 | 1.74 ± 1.25 |
| 100 | 10.61 ± 2.56 | 3.37 ± 1.58 ¹⁾ | 14.31 ± 3.10 |
| 200 | 16.77 ± 3.46 | 14.86 ± 3.12 | 22.64 ± 3.89 |
| 400 | 19.86 ± 4.10 | 19.12 ± 4.52 | 30.12 ± 5.86 |
| 800 | 26.68 ± 5.26 | 22.43 ± 4.65 | 32.58 ± 6.10 |
| 1 600 | 46.15 ± 6.12 ¹⁾ | 38.43 ± 6.45 ¹⁾ | 60.89 ± 6.83 |
| 3 200 | 50.93 ± 7.34 ¹⁾ | 48.95 ± 6.67 ¹⁾ | 65.23 ± 7.21 |

注: 与 T 相比较, $P < 0.05$

表 1 显示, 各组对 Eca109 细胞生长抑制随剂量增高而增强, 从浓度 1 600 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 开始, T 组抑制作用明显强于 S 组和 F 组。

2.2 健脾和胃方药 HepG2 细胞生长的抑制作用 见表 2。

表 2 健脾和胃方药对 HepG2 细胞生长的抑制作用($n=3, \bar{x} \pm s$)

| 浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | 抑制率 / % | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | S | F | T |
| 25 | 1.42 ± 1.02 | 3.41 ± 1.68 | 1.64 ± 1.05 |
| 50 | 1.47 ± 1.10 | 3.04 ± 1.58 | 1.30 ± 1.23 |
| 100 | 12.98 ± 2.84 | 10.15 ± 2.94 | 11.10 ± 3.2 |
| 200 | 13.07 ± 3.54 | 11.24 ± 3.21 | 16.73 ± 3.01 |
| 400 | 20.10 ± 3.35 | 16.67 ± 3.94 | 22.33 ± 4.85 |
| 800 | 27.62 ± 4.20 | 26.06 ± 4.08 | 31.96 ± 5.13 |
| 1 600 | 38.53 ± 4.36 | 35.68 ± 4.25 | 41.60 ± 4.69 |
| 3 200 | 41.89 ± 5.12 | 38.94 ± 4.78 | 45.23 ± 5.26 |

表 2 显示, 各组对 HepG2 细胞生长抑制随剂量增高而增强, T 组各剂量抑制率高于 S 组和 F 组, 但

统计学没有显著性差异, $P > 0.05$ 。

2.3 健脾和胃方药对 PBMC 生长的影响 见表 3。

表 3 健脾和胃方药对 PBMC 生长的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 还原率 / % | | | |
|----|--------------|----------------------------|--------------|---------------------------------|
| | 0 h | 24 h | 48 h | 72 h |
| C | 18.67 ± 4.50 | 56.44 ± 6.23 | 78.32 ± 8.12 | 86.41 ± 8.45 |
| S | 17.98 ± 4.68 | 68.73 ± 6.45 | 88.04 ± 8.57 | 111.32 ± 9.47 ¹⁾ |
| F | 18.23 ± 5.27 | 75.80 ± 7.96 ¹⁾ | 96.69 ± 8.89 | 122.76 ± 10.56 ^{2, 3)} |
| T | 18.56 ± 5.74 | 64.52 ± 7.12 | 82.16 ± 8.32 | 96.56 ± 8.23 |

注: 与 C 相比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 T 组比较³⁾ $P < 0.01$ (下同)

表 3 显示, 每一组还原率随时间增长而增加, 说明细胞在增殖, 用药各组在各时间段都比空白对照组还原率高, 说明都有不同程度提高 PBMC 增殖作用, 72 h 作用最强, 特别是 F 组, 与空白对照组相比 $P < 0.01$, T 组作用最差。

2.4 健脾和胃方药干预 PBMC 对肿瘤生长的影响 见表 4。

表 4 健脾和胃方药干预 PBMC 对肿瘤生长的抑制作用
($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 抑制率 / % | | | |
|--------|--------------|----------------------------|----------------------------|--------------|
| | C | S | F | T |
| HepG2 | 17.42 ± 4.51 | 25.64 ± 4.88 | 32.78 ± 5.12 ¹⁾ | 20.06 ± 4.23 |
| Eca109 | 16.65 ± 4.07 | 26.02 ± 4.17 ¹⁾ | 31.35 ± 5.15 ¹⁾ | 21.43 ± 4.09 |

表 4 显示, 用药各组干预后的 PBMC 对肿瘤细胞都有抑制作用, F 组作用最强, 与空白对照组相比, 无论是对 Eca109 细胞生长还是对 HepG2 细胞都有显著差异($P < 0.05$); T 组作用最弱。

3 讨论

肿瘤病机主要围绕“气”、“痰”、“瘀”、“虚”、“毒”5 个方面^[3, 4], 其中“气”、“痰”、“虚”与脾胃虚弱或不和有密切关系。脾胃不和也是肿瘤发生、发展的重要机制。发病初期, 由于饮食、六淫等因素导致脾胃受伤, 功能失和, 致虚、生痰, 为肿瘤发生提供了条件。发病中后期, 瘤体增大, 瘤毒戕害胃气, 致使脾胃功能失调进一步加重, 消化道肿瘤表现得更为明显。另外, 现代医学治疗肿瘤所使用的放、化疗药物也多伤害脾胃之气。基于此, 健脾和胃法治疗肿瘤一直为历代医家所推崇, 也产生了许多有效方药。其中六君子汤、四君子汤、二陈汤是临床上防治肿瘤常用的经典方剂。我们研究发现, 在古代治疗噎膈、现代治疗食管癌的方药中, 人参、白术、茯苓、陈皮、半夏、甘草处于用药前 10 位^[4 ~ 5], 也说明

健脾和胃法及六君子汤、四君子汤、二陈汤在肿瘤防治中的重要性。

四君子汤具有健脾益气之功;二陈汤有和胃化痰之效;六君子汤有健脾益气,和胃化痰之效。此 3 方都来源于《太平惠民和剂局方》,关系密切,六君子方是四君子汤和二陈汤合方。为了探讨健脾和胃药物抗肿瘤的药理作用机制,我们观察比较了它们对人食管癌细胞株 Eca109 和人肝癌细胞株 HepG2 生长的影响。

有报道健脾和胃药物很多具有直接抑制肿瘤细胞生长的作用^[6],本研究也发现具有健脾和胃功能的六君子汤、四君子汤、二陈汤有类似作用。3 方对人食管癌细胞株 Eca109 和人肝癌细胞株 HepG2 的生长都有不同程度的抑制作用,随药物浓度增高而增强,具有明显的剂量依赖性。其中二陈汤作用最强,六君子汤次之。3 方药食管癌细胞株的抑制作用强于对肝癌细胞株作用,但两者没有显著差异。

中药抗肿瘤效应具有多环节、多靶点特点。研究表明,健脾和胃药物具有调节机体免疫力作用,并可能是其发挥抗肿瘤作用的重要途径^[7]。外周血单个有核细胞(PBMC)含有淋巴细胞、NK 细胞、巨噬细胞等多种免疫细胞,是机体发挥肿瘤免疫监视主要效应细胞。PBMC 经过体外刺激后可激活、增殖,具有杀灭和抑制肿瘤细胞作用。目前体外多应用 IL-2、CD3 抗体进行刺激,我们研究发现,体外单独应用中药也具有刺激激活 PBMC 作用^[8]。为了进一步探讨六君子汤、四君子汤、二陈汤的抗肿瘤机制,我们观察了 3 方对 PBMC 激活作用及激活后对肿瘤细胞的抑制效应。3 方对 PBMC 都有不同程度的激

活作用,其中四君子汤最强,六君子汤次之。激活后的 PBMC 对 Eca109 和 HepG2 生长有明显抑制作用,对两者作用效果相近,说明激活后的 PBMC 对肿瘤细胞作用没有特异性。

综上所述,健脾和胃方药六君子汤、四君子汤、二陈汤可以通过直接抑制肿瘤细胞生长和通过免疫调节两个途径发挥其抗 Eca109 和 HepG2 效应。直接对肿瘤细胞生长抑制,二陈汤最强,激活 PBMC 作用四君子效果最好。但三者抗肿瘤作用综合效应及其作用机制需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 杨素芳. 健脾固本法治癌的源流略探[J]. 中医药学刊, 2005, 23(7): 1295.
- [2] 刘嘉湘. 中医药维护癌症患者生存质量的作用[J]. 中华肿瘤, 2002, 24(3): 309.
- [3] 陈玉龙, 苗艳艳. 肿瘤病机研究思路[J]. 新中医, 2007, 39(4): 91.
- [4] 司富春, 陈玉龙. 古方治疗噎膈用药分析[J]. 山东中医杂志, 2004, 23(7): 385.
- [5] 陈玉龙, 司富春. 中医药治疗食道癌方药分析[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(2): 401.
- [6] 杨素芳, 纪立金. 中药健脾抗癌的机理研究进展[J]. 福建中医学院学报, 2003, 13(3): 51.
- [7] 裘维焰, 杨锋, 戴关海. 四君子汤合重组白细胞介素-2 对抑瘤率和免疫调节作用的影响[J]. 山东中医杂志, 2007, 26(3): 184.
- [8] 苗艳艳, 黄兆胜, 禄保平, 陈玉龙. 芦荟多糖干预的 PBMC 对肝癌细胞生长的影响[J]. 中医研究, 2008, 21(6): 10.