

豆根管食通口服液对人食管癌细胞多药耐药基因糖蛋白 P-170 表达的影响

马纯政^{1*}, 郑玉玲²

(1. 河南省中医院肿瘤科, 郑州 450002; 2. 河南中医学院, 郑州 450007)

[摘要] 目的: 观察豆根管食通口服液对人食管癌 109 细胞多药耐药基因糖蛋白 P-170 表达的影响。方法: 通过实验分组, 用 MTT 法(四甲基氮唑蓝法)测定药物对肿瘤细胞增殖的抑制作用, 用免疫组化法测定药物对肿瘤细胞 P-170 的作用。结果: 单用豆根管食通 100, 150, 200 mg·mL⁻¹ 组 A 值明显低于单用氟尿嘧啶(5-Fu)组, 其他组差别不大; 豆根管食通口服液 200 mg·mL⁻¹ 组及豆根管食通口服液 100 mg·mL⁻¹ 联合 25 μg·mL⁻¹ 5-Fu 组 P-170 表达均较其他低浓度组低。结论: 豆根管食通口服液对人食管癌 109 细胞增殖有明显的抑制作用, 与药物浓度呈正相关; 高浓度豆根管食通口服液可明显降低人食管癌细胞 P-170 的表达。

[关键词] 豆根管食通口服液; 人食管癌 109 细胞系; 多药耐药基因; 免疫组化法

[中图分类号] R 285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0237-03

豆根管食通口服液(以下简称豆根)是河南中医学院一附院院内制剂(批号 20030716), 具有化痰理气、逐瘀散解、止痛抗癌之效, 主要治疗各期食管癌(EC), 临床应用疗效可靠。为探讨豆根对食管癌的治疗机理, 在已进行大量体内实验之后, 对其进行体外研究。本实验在观察豆根管食通对处于对数生长期的人食管癌 109(Eca-109)细胞的抑制作用之后, 进一步观察对人食管癌细胞多药耐药基因糖蛋白 P-170 的表达的影响。

1 材料

1.1 细胞系 人食管癌 109 细胞系(Eca-109 细胞系)。

1.2 药物 豆根管食通口服液(豆根), 10 mL/支(相当于含生药 1 g·mL⁻¹), 实验前配成所需浓度; 5-氟尿嘧啶注射液(5-Fu), 上海旭东海普药业有限公司(250 mg·mL⁻¹), 批号 031002, 实验前配成所需浓度。

1.3 试剂 鼠抗人 P170 蛋白单抗工作液, 美国 Santa cruz 公司, 过氧化物酶标记的链霉卵白素(SP)免疫组化染色试剂盒(HistostainTM-Plus kits)及 DAB 显色试剂盒(ZLI-9032/9033 DAB kit), 北京中

杉金桥生物技术有限公司。其他试剂略。

1.4 器材及仪器 96 孔培养板、一次性塑料培养皿; 微量移液器, 超净工作台, 倒置显微镜, 光学显微镜, DG3022A 型酶联免疫检测仪, 80-2 离心沉淀器等。

2 方法

2.1 MTT 法(四甲基氮唑蓝法)测定药物对肿瘤细胞的增殖抑制作用

2.1.1 分组 随机分 4 组: ①单药实验组加入豆根管食通口服液, 终浓度为含生药 25, 50, 100, 150, 200 mg·mL⁻¹; ②阳性对照组加入氟尿嘧啶(5-Fu), 终浓度为 100 μg·mL⁻¹; ③联合用药组两个剂量的豆根管食通口服液(终浓度为 25, 50 mg·mL⁻¹)和终浓度为 25 μg·mL⁻¹ 的 5-Fu 按 1:1 合用; ④空白对照组加入等体积的生理盐水。

2.1.2 过程 取对数生长期 Eca-109 细胞常规消化配制成 5 × 10⁴ · mL⁻¹ 单细胞悬液, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL。培养 24 h 后, 弃去旧液, 加入 10% 培养液, 每孔 170 μL, 并分别加入不同浓度的实验药物, 每孔 30 μL, 每孔终体积为 200 μL。每组设 4 个平行孔, 重复实验 5 次(n = 20)。置 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 每孔加入 MTT 液(5 mg·mL⁻¹) 20 μL, 继续培养 4 h, 弃去孔内培养液, 加入 DMSO 200 μL, 振荡器振荡 10 min, 用酶联免疫检测仪于 570 nm 波长处测定各孔的光吸收值(OD 值), 按下式求出生长抑制率。细胞抑制率 = (1 - 实验组 OD

[收稿日期] 2010-02-24

[通讯作者] * 马纯政, Tel: 13783521337; E-mail: mchzh666@126.com

均值/空白对照组 OD 均值) × 100%。

2.2 免疫组化法对肿瘤细胞 P-170 表达的作用

2.2.1 分组 参照该药对肿瘤细胞的增殖抑制作用结果将实验随机分为 4 组:①单药实验组加入豆根,终浓度为含生药 25,200 mg·mL⁻¹;②阳性对照组加入 5-Fu,终浓度为 25 μg·mL⁻¹;③联合用药组两个剂量的豆根(终浓度为 25m,100 mg·mL⁻¹)和终浓度为 25 μg mL⁻¹的 5-Fu 按 1:1 合用;④空白对照组加入等体积的生理盐水;每组 20 例。

2.2.2 细胞爬片(过程略)。

2.2.3 免疫组化染色 参照 S-P 试剂盒说明。①细胞爬片水化,PBS 冲洗 3 × 5 min;②用石蜡笔在培养皿中画出直径约 1 cm 的圈,每个圈中滴加一滴过氧化酶阻断剂,室温孵育 10 min,PBS 冲洗 3 × 5 min;③每个圈中滴加一滴正常山羊血清,室温孵育 15 min;④甩去山羊血清,加一滴鼠抗人第一抗体,4℃孵育过夜,PBS 冲洗 3 × 5 min;⑤加一滴生物素标记的羊抗鼠第二抗体,室温孵育 10 min,PBS 冲洗 3 × 5 min;⑥加一滴链菌素亲生物蛋白——过氧化物酶溶液,室温孵育 15 min,PBS 冲洗 3 × 5 min;⑦加两滴新鲜配制的 DAB 溶液显色 10 min(在显微镜下控制显色时间),自来水冲洗,苏木素复染 50 s,晾干后用甘油封片。P-170 为即用型抗体,同时以 PBS 代替一抗为阴性对照,用已知的食管癌组织阳性表达作阳性对照。

2.2.4 用光学显微镜观察,对图像进行拍摄。每组选用上下左右中 5 个区域,计数 500 个细胞,分 3 个级别判定细胞阳性。阳性细胞为胞膜着色淡黄及棕黄,癌细胞阳性百分率采用 0~4 级表示,0 级:0%, I 级:1%~25%, II 级:26%~50%, III 级:51%~75%, IV 级:76%~100%。0 和 I 为低表达;II 及其以上为高表达。

2.3 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *t* 检验计数资料用 χ^2 检验,应用 SPSS 13.0 分析软件进行统计分析。

3 结果

3.1 对肿瘤细胞增殖(MTT)的影响 见表 1。单用豆根各浓度组、联合用药组以及单用 5-Fu 均有明显的抑瘤作用。单用豆根 100,150,200 mg·mL⁻¹组抑瘤率优于单用 5-Fu 组($P < 0.05$),但单用豆根 25,50 mg·mL⁻¹组不优于单用 5-Fu 组。两合用组均明显优于单用 5-Fu 组($P < 0.01$)。

表 1 不同浓度的豆根管食口服液单用及联合用药对 Eca-109 细胞 48 h 的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量 /mg·mL ⁻¹	A	抑制率/%
空白对照	0	0.97 ± 0.02	-
豆根	25	0.76 ± 0.05	32.72 ± 1.00
	50	0.45 ± 0.03	42.25 ± 2.26
	100	0.28 ± 0.03	63.35 ± 3.43 ¹⁾
	150	0.16 ± 0.02	81.13 ± 2.91 ¹⁾
	200	0.19 ± 0.02	77.08 ± 2.43 ¹⁾
豆根 + 5-Fu	25 + 2.5 × 10 ⁻²	0.09 ± 0.01	91.06 ± 2.65 ²⁾
豆根 + 5-Fu	50 + 2.5 × 10 ⁻²	0.08 ± 0.01	89.17 ± 3.64 ²⁾
5-Fu	1 × 10 ⁻¹	0.37 ± 0.03	57.62 ± 2.43

注:与单用 5-Fu 相比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (下同)。

3.2 豆根对人食管癌细胞 P-170 表达的影响 见表 2。

表 2 不同浓度豆根管食口服液及联合用药对人食管癌细胞 P-170 表达的影响($n = 20$)

组别	剂量 /mg·mL ⁻¹	0 级	I 级	II 级	III 级	IV 级	高表达率/%
空白对照		7	5	5	3	0	40
5-Fu	2.5 × 10 ⁻²	1	3	6	7	3	80
豆根	25	6	5	6	3	0	45 ¹⁾
豆根	200	4	9	4	3	0	35 ^{1,3)}
豆根 + 5-Fu	25 + 2.5 × 10 ⁻²	3	5	5	6	1	60 ¹⁾
豆根 + 5-Fu	100 + 2.5 × 10 ⁻²	4	8	4	4	0	40 ^{1,3)}

注:与低浓度组比较,³⁾ $P < 0.05$ 。

表中显示,从高表达率看,豆根各组均较单用 5-Fu 组低,豆根单用高浓度组低于低浓度组,联合用药豆根高浓度组低于低浓度组,差异有意义。

4 讨论

中医认为,食管癌(噎膈)的发生乃由于忧愁思虑,积劳积郁,或酒色过度,损伤脾胃;日久导致气结痰凝,气滞血瘀,痰瘀同病或痰瘀互结,形成癌肿,留于食道,发生噎膈^[1]。《类证治裁》中云:“痰在肺则咳,在胃则呕,……在胸则癌,……”。清·李用粹《证治汇补》:“胃脘之血,为痰浊所滞,日积月累,渐成噎膈反胃。”清·高锦庭曰:“癌瘤者,非阴阳正气所结,肿乃五脏浊气痰滞而成。”分别论述了痰邪致病、瘀邪致病以及癌瘤发生的特点,为临床治疗食管癌以及如何遣方用药提供了理论基础。

豆根管食口服液由山豆根、沉香、急性子、黄

药子、姜半夏、三七、制天南星、郁金等组成。山豆根散结消肿为君,制天南星温化顽痰,急性子软坚消瘀,黄药子解毒散结消瘀,姜半夏化痰散结降逆,沉香行气降逆,郁金活血止痛共为臣药,三七化痰理气为佐使。全方以祛邪为主,方简意赅,适用于中医辨证为痰气交阻、瘀血内结或痰瘀互结等证型的食管癌患者。

前期已对豆根管食通口服液进行对干扰大白鼠食管癌细胞细胞周期、抑制肿瘤患者体内瘤灶、减轻患者症状、提高患者生存质量及生存率以及安全性观察等多项研究,均取得了较为满意的结果^[2]。本实验用 MTT 法检测不同条件下的肿瘤细胞抑制率,证明用中药各组均能抑制食管癌 109 细胞的增殖,高浓度的豆根管食通口服液抑制作用明显;高浓度

组还优于单药 5-Fu 组。免疫组化测定结果显示,高浓度的豆根无论单用还是联合 5-Fu 均可明显降低 P-170 的表达($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),浓度越高则表达越低。由此推测豆根管食通口服液对管癌 109 细胞的增殖,抑制作用是通过降低癌细胞 P-170 的表达来实现的。此实验为进一步证明豆根管食通口服液的抗癌作用,提供了实验基础。

[参考文献]

- [1] 张伯臾. 中医内科学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1988:139.
- [2] 郑玉玲,杨曦. 豆根管食通口服液防治学研究进展及临床应用前景[J]. 浙江实用医学,1999,4(3):11.

[责任编辑 何伟]

疑难杂症验方合作

您有效果神奇、应用已久、无毒副作用且功效显著的民间验方吗? 您希望它产业化吗? 您期盼它为更多人解除病痛吗? 这样的事情您自己完成有困难吗? 我们来合作好吗? 天津权健自然医学科技发展有限公司致力于民间神奇验方的收集整理使之产业化服务人民大众。

期待与您的真诚合作! 共同造福人类!

公司:天津市权健自然医学科技发展有限公司

地址:天津市武清区豆张庄乡权健道 1 号

邮编:301707

电话:022-22160850 022-22160816

传真:022-22160816

联系人:高小姐、常小姐

公司网址:www.ziranyixue.com

公司流程:

