

热毒净对鼻咽癌细胞株 CNE₂ 抑制作用的研究

詹少兵¹, 周 玲¹, 叶树清¹, 刘晓红^{2*}

(1. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 100052;
2. 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050)

[摘要] 目的: 观察热毒净对表达 EB 病毒抗原的 CNE₂ 细胞致瘤的影响及其细胞毒作用。方法: 用 MTT 法测定热毒净对 CNE₂ 细胞的细胞毒作用, 抑瘤实验检测热毒净对 CNE₂ 细胞致瘤的影响。结果: MTT 法显示在低浓度下, 热毒净对体外培养的 CNE₂ 细胞生长没有明显的抑制作用, 但在高浓度下, 对细胞生长有抑制作用。热毒净在无细胞毒的浓度下, 能抑制 CNE₂ 细胞在 SCID 小鼠体内所致肿瘤的生长。浓度越高, 热毒净对肿瘤生长的影响越明显。结论: 热毒净能抑制 CNE₂ 细胞在 SCID 小鼠体内的致瘤作用。

[关键词] 热毒净; EB 病毒; CNE₂ 细胞; 抑瘤实验

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)03-0041-03

Inhibitory Action of Redujing to CNE₂ Cells

ZHAN Shao-bing¹, ZHOU Ling¹, YE Shu-qing¹, LIU Xiao-hong^{1*}

(1. Institute of Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China;
2. Department of Pediatrics, Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To study the impact and cytotoxicity of Redujing on CNE₂ cells which express EB virus antigen. **Methods:** Cytotoxicity and carcinogenesis of CNE₂ when Redujing presented were determined by MTT assay and antitumor assay respectively. **Results:** MTT test shows that high concentration Redujing can inhibits CNE₂ cell's growth in vitro. In the absence of cytotoxicity, Redujing can inhibit the growth of solid tumor caused by CNE₂ cell and the inhibition effect will be more obviously when a higher concentration of Redujing appears. **Conclusion:** Redujing can inhibit the carcinogenesis of CNE₂ cells in SCID mice.

[Key words] Redujing; EBV; CNE₂ cells; antitumor assay

EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)属于疱疹病毒科 γ 亚科, 在人类广泛传播, 我国 90% 以上的成人携带 EBV。EBV 可在淋巴细胞中建立起潜伏感染, 刺激细胞的增生和转化, 可引起传染性单核细胞增多

症(IM)及在免疫抑制者中诱发恶性淋巴瘤。EB 病毒是第一个被发现与人类肿瘤相关的病毒, 在鼻咽癌的病因学中, EB 病毒感染起着十分重要的作用^[1]。

热毒净是北京友谊医院长期临床使用的中药, 在治疗 EBV 引起的传染性单核细胞增多症方面起到了很好的作用, 已有多篇文献报道^[2-3]。本研究用 MTT 法检测了热毒净对体外培养的细胞毒性作用及其抑制 EBV 阳性细胞 CNE₂ 的致瘤作用, 以探

[收稿日期] 2008-09-22

[基金项目] 北京中医药科技项目资助(JJ2005-7)

[通讯作者] * 刘晓红, Tel: (010) 63138407; E-mail: Lxhong50@sina.com.cn

讨其作用机制。

1 材料

热毒净:北京友谊医院制剂室生产,批准文号:(97)京卫药制字(009)第 F-455 号(批号:2005110401),由黄芪、青黛、丹皮、莪术等组成。煎制方法:8 种饮片一起水浸泡后,煎 2 次,合并煎液,浓缩、酒沉过滤后,灌封灭菌,浓度为 $246 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, PH 值为 6.5。

CNE₂ 细胞株,人鼻咽癌细胞株,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所肿瘤室保存;SPF 级 SCID 小鼠,购自中国医学科学院实验动物研究所,合格证号:SCXK(京)2005-0013。

细胞培养瓶,96 孔细胞培养板,Costar 公司产品;MTT, DMSO, Invitrogen 公司产品;DMEM 培养基, Gibco 公司产品。

2 方法

2.1 细胞培养 50 mL 培养瓶中加入 10 mL DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)37 °C、5% CO₂、常规培养 CNE₂ 细胞, CNE₂ 细胞贴壁生长。CNE₂ 细胞生长至对数生长期用不同浓度的 DMEM 稀释的热毒净处理, DMEM 培养基倍比稀释后作用浓度分别为 123, 61.5, 30.75, 15.4, 7.7 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 保持液体体积仍为 10 mL/瓶, 37 °C 处理 2 h 之后吸尽处理液, DMEM 培养基洗涤 1 次, 加 DMEM 培养基继续培养 48 h。镜下观察 CNE₂ 细胞。

2.2 MTT 法检测热毒净对细胞的毒性作用 参考文献方法^[4], CNE₂ 细胞浓度调至 5×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 100 μL 接种于 96 孔细胞培养板内, 37 °C 培养 24 h。细胞贴壁生长至平铺占 80% 孔底面积, 吸出上清, 在各孔分别加入 DMEM 培养基倍比稀释的不同浓度热毒净 200 μL (热毒净作用浓度依次为 246, 123, 62, 30.75, 15.4, 7.7, 3.8, 1.92, 0.96, 0.48, 0.24 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 第 12 孔以培养基 200 μL 为阴性对照, 13 孔为 PBS 空白对照, 每 1 浓度设 3 个复孔, 继续培养 72 h。每孔加入 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 20 μL , 再培养 4 h, 吸出孔内上清, 加入 100 μL DMSO 使结晶充分溶解, 450 nm 测 OD 值。计算细胞生长抑制率 = $(1 - \text{处理组吸光度} / \text{对照组吸光度}) \times 100\%$ 。

2.3 抑瘤实验 同 2.1 方法培养细胞至对数生长期, 用浓度分别为 246, 15.4, 7.7, 3.8, 1.92 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (DMEM 倍比稀释)的热毒净, 及 DMEM 培养基对照, 37 °C 作用 CNE₂ 细胞 1 h; 之后吸去药物, DMEM 培

养基洗 3 遍, 加入培养基继续培养; 48 h 后, 调节细胞浓度为 2.0×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 注射 SCID 小鼠。每 1 药物浓度处理组用 SCID 小鼠 5 只, 每只小鼠注射 200 μL 细胞, (4×10^5 个细胞/只)于背侧皮下。以后每周 1 次, 于细胞注射点周围注射相应浓度的 PBS 稀释的热毒净(246, 15.4, 7.7, 3.8, 1.92 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 与培养瓶中的细胞作用浓度相一致)及 PBS 对照, 4 周后处死动物, 取肿瘤称重。计算抑瘤率 = $(1 - \text{实验组瘤重均值} / \text{对照组瘤重均值}) \times 100\%$, 比较各组抑瘤作用的差异。

2.4 统计方法 SPSS13.0 软件进行方差分析, 两组间用 *t* 检验。

3 结果

3.1 镜下观察热毒净处理的 CNE₂ 细胞 123 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 61.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理瓶中细胞未见生长, 30.75 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组可见大量死亡细胞, 15.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 7.7 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理组则未见异常。可见较高浓度的热毒净对体外培养的 CNE₂ 肿瘤细胞有明显生长抑制作用, 而低浓度下则不明显。

3.2 MTT 法检测 结果见表 1。

表 1 MTT 法检测不同浓度的热毒净对 CNE₂ 细胞的作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

热毒净作用浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	OD ₄₅₀ 值	抑制率 (%)
—(空白孔对照)	0.003 ± 0.001 0	—
246	0.064 ± 0.017 0	86.90
123	0.100 ± 0.007 0	79.60
61.5	0.115 ± 0.009 0	76.50
30.75	0.153 ± 0.011 5	68.80
15.4	0.178 ± 0.006 6	63.70
7.7	0.259 ± 0.028 6	47.10
3.8	0.307 ± 0.006 0	37.30
1.92	0.348 ± 0.016 0	28.70
0.96	0.399 ± 0.018 5	18.60
0.48	0.424 ± 0.001 7	13.40
0.24	0.444 ± 0.016 26	9.40
0(培养基对照)	0.490 ± 0.022 8	—

方差分析结果显示, $F = 355.150, P < 0.001$, 各孔 OD 值有明显差异, 表明不同浓度的热毒净对 CNE₂ 细胞生长的影响有明显差异, 高浓度热毒净对 CNE₂ 细胞的生长有明显抑制作用, 呈现剂量效应。

3.3 抑瘤实验 CNE₂ 细胞接种 SCID 小鼠后长出肿瘤, 取肿瘤称重并计算均值, 结果见表 2。

表 2 不同浓度的热毒净抑瘤实验结果($n=5, \bar{x} \pm s$)

热毒净作用浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	肿瘤平均质量(g)	抑瘤率 (%)
246	0.37 ± 0.052	66.9
15.4	0.62 ± 0.078	44.6
7.7	0.76 ± 0.087	32.1
3.8	0.80 ± 0.064	28.6
1.92	0.86 ± 0.055	23.2
0 (对照组, PBS 注射)	1.12 ± 0.067	—

方差分析结果显示, $F=67.199, P<0.001$, 不同组间肿瘤重量均数差异有统计学意义。进一步两两比较发现, 各处理组与对照组比较差异均有统计学意义。说明与对照组相比, 热毒净在体外可以抑制 CNE₂ 细胞所致肿瘤的生长, 且高浓度下抑制作用越明显($P<0.05$)。用药量与瘤重减少量呈一定的量效关系。

4 讨论

EB 病毒引起的最常见的急性疾病是单核细胞增多症, 主要见于儿童。本病虽多为自限性, 但可能产生严重的并发症, 至今仍无有效的特异治疗方法, 临床上一般多为对症治疗^[5]。临床使用的许多抗病毒药物毒副作用大, 应用受限。北京友谊医院生产的中药热毒净口服液的主要成分有黄芪、青黛等, 治则为清热解毒、益气养血, 多年来应用于小儿病毒感染的治疗, 取得了一定疗效。为了更深入地探讨热毒净的作用机理, 北京友谊医院与中国疾病预防控制中心病毒病所肿瘤室合作, 做一些有益的探讨, 发现热毒净在无细胞毒浓度下能抑制 Raji 细胞中 EBV 的 EA 抗原表达, 对 EBV 感染有一定的抑制作用^[6-7]。

本实验利用 CNE₂ 细胞对热毒净的作用进行了

进一步的研究。CNE₂ 细胞是病毒病所于 1980 年从低分化鼻咽癌病人活检组织中建立的鳞癌上皮细胞株^[8]。通过 MTT 法检测及抑瘤实验, 可见热毒净对 EBV 转化的 CNE₂ 细胞株的体外生长有抑制作用。抑瘤实验在 CNE₂ 细胞注射点周围注射药物, 通过预实验结果本实验选择了注射给药方式, 可以用较少的药物剂量, 并且可直接作用于瘤体, 处理组在 SCID 小鼠体内形成的肿瘤组织重量和体积均显著低于对照组($P<0.01$), 生长速度慢于对照组, 表明热毒净能明显抑制 CNE₂ 细胞在免疫缺陷小鼠体内的致肿瘤生长。

[参考文献]

- [1] 曾毅, 刘育希, 韦继能, 等. 鼻咽癌的血清学普查[J]. 中国医学科学院学报, 1979, 1(2): 123.
- [2] 张忠浩, 杨春霞. 热毒净治疗儿童传染性单核细胞增多症 35 例临床观察[J]. 中国临床医生, 2006, 34(4): 34-36.
- [3] 杨春霞, 阎田玉. 热毒净治疗流感病毒上呼吸道感染的临床研究[J]. 北京中医, 2000, (4): 17-18.
- [4] 朱立平. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 137.
- [5] 仇永, 麦智广, 古汉礼, 等. 儿童传染性单核细胞增多症的临床特点及更昔洛韦疗效评价[J]. 中国医师杂志, 2004, 6(6): 853-856.
- [6] 刘晓红, 叶树清, 周玲, 等. 热毒净及阿昔洛韦对 EB 病毒抗原表达抑制作用的对比实验[J]. 天津中医药, 2007, 24(5): 408-410.
- [7] 刘晓红, 叶树清, 张忠浩, 等. 热毒净在体外对 EB 病毒抗原表达的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(10): 62-63.
- [8] 谷淑燕, 赵文平, 曾毅, 等. 从低分化鼻咽癌病人建立鼻咽癌上皮细胞株[J]. 癌症, 1983, 2(3): 70-72.