

消瘤汤抗肿瘤作用的实验研究

赵洪波, 刘建国*

(华中科技大学同济医学院附属协和医院中医科, 湖北 武汉 430022)

[摘要] 目的: 探讨中药复方消瘤汤对小鼠肝癌模型的抗肿瘤作用。方法: 用腋下注射 Hep G2 细胞造成小鼠腋下皮下肿瘤移植模型, 给予小鼠消瘤汤灌胃后查看对肿瘤组织的抑制作用; 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测消瘤汤含药血清对 HepG2 细胞的生长抑制作用; 用 PCR ELISA 法测定 HepG2 细胞端粒酶的活性。结果: 药物组瘤重明显比生理盐水组小, 以大剂量组最为明显, 抑制率达 41.88%; MTT 法显示肿瘤细胞抑制率与药物剂量呈直线关系; 消瘤汤大剂量组对肝癌组织端粒酶活性有明显的抑制作用($P < 0.01$)。结论: 消瘤汤有明显的抗实验性小鼠肝癌的作用, 有可能与抑制肿瘤细胞端粒酶活性有关。

[关键词] 消瘤汤; 肝肿瘤; HepG2 细胞; 端粒酶

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)12-0051-03

Study on Antitumor Action of Xiaoliu Tang in Mice

ZHAO Hong-bo, LIU Jian-guo*

(Department of Chinese Traditional Medicine, Union Hospital, Tongji medical college
of Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430022, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of anti-implanted tumour of Xiaoliu Tang in mice. **Methods:** To make a mode of implanted tumor with injecting HepG2 cells in the axilla of mice. The inhibitory effect on tumor was observed for the mice after Xiaoliu Tang was given orally. The inhibitory effect in HepG2 by Xiaoliu Tang with the method of MTT was investigated. Telomerase activity of HepG2 cells was observed with the method of PCR, ELISA. **Results:** The tumor in the administration groups was smaller than that of the controls, especially for in the big-dosage group (the inhibitory rate is 41.88%). The results of MTT showed that the inhibitory rate of HepG2 cells was in dose dependent fashion. The high-dosage treatment group have significant inhibitory effect on telomerase activity of hepatocarcinoma. **Conclusions:** Xiaoliu Tang can inhibit hepatocarcinoma; its mechanism may correlate to inhibiting telomerase activity.

[Key words] Xiaoliu Tang; liver neoplasms; hepG2 cell; telomerase

消瘤汤是我科临床上用于治疗多种肿瘤的有效方剂, 本实验观察了其对小鼠在体肿瘤的抑制作用, 并采用血清药理学方法观察该方对肿瘤细胞生长的抑制作用, 初步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 新生牛血清(武汉三利生物技术有限公司), RPMI 1640 培养基(美国 GIBCO 公司产品), 台盼蓝染液, 二甲基亚砷(DMSO), 噻唑蓝

(MTT), 胰蛋白酶, SUNRISE 全自动酶标仪, PCR 扩增仪(Bio-Rad); DC3002A 型酶联免疫检测仪; dNTPs, Taq DNA 聚合酶(Promega); 生物素包被的微孔酶标板, 辣根过氧化物酶标记的抗地高辛抗体(Roche 公司); 7500 Real Time PCR System(Singapore)。

1.2 动物 昆明种小白鼠, (20~23)g, 雌雄各半, 我校动物中心提供。

1.3 细胞与细胞培养 人肝癌细胞 HepG2 由我院中心实验室馈赠, 接种于含 10% 小牛血清的 1640 培养液中, 置于含 5% CO₂, 37 °C 的培养箱中培养。待细胞形成单层, 常规消化, 收集细胞, 0.5% 台盼蓝染

[收稿日期] 2007-01-23

[通讯作者] * 刘建国, Tel: (027) 8572639

色,其细胞活性在 98% 以上。传代时用 0.25% 胰酶消化(1~ 2) min。

1.4 消瘤汤的制备 消瘤汤由半枝莲,石见穿,蛇舌草,龙葵,蚤休组成(各药等份),购自我校附属协和医院中药房,并经过严格鉴定。先将药物用自来水浸泡 30 min,然后熬制成汤剂。最后煎得相当于原生药材 1.1 g·mL⁻¹ 的药液。4 °C 冰箱保存备用。

1.5 含中药血清的制备 参考李仪奎法^[1],小鼠 20 只,雌雄各半,随机分成 4 组,即:对照组和消瘤汤大、中、小剂量组。将各组中药汤剂分别按体重以 22.5 g·kg⁻¹, 15 g·kg⁻¹, 7.5 g·kg⁻¹ (以生药量计,单次给药量)给小鼠灌胃(ig), 0.4 mL·d⁻¹, 2 次·d⁻¹, 连续 3 d,对照组 ig 等量生理盐水,于第 4 天一次给予全日剂量,1 h 后,在麻醉下快速打开胸腔,经心脏取血,静置 4 h 后离心得血清,过滤除菌,56 °C, 30 min 灭活,置- 20 °C 冰箱保存备用。

1.6 消瘤汤对小鼠肝癌的抑制作用 将接种过 HepG2 的瘤源小鼠处死,皮肤消毒后开腹,取生长良好的癌细胞,用生理盐水配成 2 × 10⁷·mL⁻¹ 浓度的瘤细胞悬液。在无菌条件下将瘤细胞悬液按 0.2 mL/只注射于 40 只小鼠皮下。小鼠在接种瘤细胞后 24 h 随机分成 4 组,每组雌雄各半,消瘤汤大、中、小剂量组分别为 18 g·kg⁻¹, 12 g·kg⁻¹, 6 g·kg⁻¹, 对照组给与同体积生理盐水,以上各组均 ig 给药,1 次·d⁻¹, 连续 14 d。末次给药后 24 h 处死小鼠,剖取瘤块并称量。

1.7 消瘤汤含药血清对肝癌细胞的生长抑制作用 采用 MTT 法,将对数生长期细胞以每孔(0.5- 1) × 10⁴ 个/mL 接种于 4 块 96 孔板,每孔接种体积为 100 μL,待细胞长满单层后,分别加入大、中、小剂量含药血清及对照组血清,设不含药的小鼠血清对照组。每组 4 孔,继续培养。分别于培养 24, 48, 72, 96 h 后每孔加入 MTT 溶液 20 μL(5 mg·mL⁻¹), 37 °C 孵育 4 h,小心吸去每孔中的培养液,再加入 150 μL 的 DMSO,在微型振荡器上振荡 30 min,用全自动酶标仪测定各孔 570 nm 吸光度 A 值。计算公式:肿瘤细胞生长抑制率(%) = (对照孔平均 A 值 - 加药组平均 A 值) / 对照孔的平均 A 值 × 100%。

1.8 癌细胞端粒酶活性测定 取在体实验动物新鲜癌组织 100 mg,剪碎,用 PBS 洗两遍,4 °C 离心 5 min,弃上清,加 TRAP2 缓冲液 500 μL,冰浴 30 min 后,于 4 °C, 16 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,收取上清液,

- 80 °C 保存。将提取物用 PCR ELISA 法测定端粒酶活性,具体操作步骤按端粒酶 PCR ELISA 试剂盒(德国 Boehringer Mannheim 公司)说明书进行。

1.9 统计方法 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用方差分析,按统计学规定 $P < 0.05$ 有显著差异。以 SPSS11.0 for Windows 完成分析。

2 结果

2.1 对小鼠肝癌模型的抑制作用 结果显示消瘤汤大、中剂量组对肿瘤均有抑制作用, $P < 0.05$; 消瘤汤小剂量组瘤重较荷瘤对照组有下降趋势,但无统计学意义。见表 1。

表 1 对小鼠肝癌模型的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(g·kg ⁻¹)	瘤重(g)	抑瘤率(%)
荷瘤对照组	—	1.724 ± 0.46	—
消瘤汤组	6.0	1.418 ± 0.37	17.74
消瘤汤组	12.0	1.229 ± 0.27 ¹⁾	28.71
消瘤汤组	18.0	1.002 ± 0.20 ¹⁾	41.88

注:与荷瘤对照组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

2.2 含药血清对 HepG2 细胞的生长抑制作用 如表 2 所示,消瘤汤大剂量组血清作用 72 h, 96 h 后对 HepG2 细胞有生长抑制作用,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。其它各治疗组亦显示其对 HepG2 细胞生长有抑制趋势,但均无统计学意义。

表 2 含药血清对 HepG2 细胞的生长抑制作用(A 值)($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
荷瘤对照组	0.473 ± 0.005	0.664 ± 0.004	0.894 ± 0.008	0.786 ± 0.002
消瘤汤小剂量组	0.424 ± 0.005	0.623 ± 0.003	0.678 ± 0.006	0.621 ± 0.002
消瘤汤中剂量组	0.405 ± 0.005	0.502 ± 0.003	0.533 ± 0.005	0.454 ± 0.002
消瘤汤大剂量组	0.389 ± 0.006	0.518 ± 0.005	0.427 ± 0.007 ¹⁾	0.376 ± 0.003 ¹⁾

2.3 对 HepG2 细胞端粒酶活性影响 结果见表 3。消瘤汤大剂量组对 HepG2 细胞端粒酶活性有抑制作用($P < 0.01$),消瘤汤小剂量组、消瘤汤中剂量组之端粒酶活性有下降趋势,但无统计学意义。

表 3 含药血清对 HepG2 细胞端粒酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	A 值(450 nm)	抑瘤率(%)
荷瘤对照组	0.521 6 ± 0.034 3	—
消瘤汤小剂量组	0.442 6 ± 0.029 4	15.14
消瘤汤中剂量组	0.418 1 ± 0.028 8	19.84
消瘤汤大剂量组	0.385 7 ± 0.026 4 ²⁾	26.05

3 讨论

消瘤汤是我科用于治疗多种肿瘤的有效方剂,在临床上取得了满意的疗效。方中半枝莲解毒抗癌,蛇舌草凉血利尿,并显著增强机体免疫力,石见穿化瘀散结,天葵子消痈止痛,蚤休清热凉肝,诸药配伍,标本兼治,共奏解毒抗癌、化瘀散结之功效。临床实践证明,本方可以有效抑制肿瘤的生长,延长患者生存时间,但是对于其作用机理目前仍未完全明了。

本实验结果发现该方确有体内抗肿瘤作用,MTT法也验证了其对肿瘤细胞有生长抑制作用,消瘤汤大剂量组体内肿瘤抑制率达41.88%,体外实验消瘤汤大剂量组血清作用72h,96h后对HepG2细胞有生长抑制作用,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。

端粒酶,是基本的核蛋白逆转录酶,可将端粒DNA加至真核细胞染色体末端。端粒在不同物种细胞中对于保持染色体稳定性和细胞活性有重要作用,端粒酶能延长缩短的端粒(缩短的端粒其细胞复制能力受限),从而增强体外细胞的增殖能力^[2]。研

究表明肝癌组织中端粒酶表达明显高于它的癌周组织,经治疗后肝癌病人端粒酶活性明显下降^[3],因此,抑制端粒酶的功能有可能抑制肿瘤细胞的生长。端粒酶在保持端粒稳定、基因组完整、细胞长期的活性和潜在的继续增殖能力等方面有重要作用。消瘤汤对肝肿瘤组织端粒酶活性有明显的抑制作用,本实验显示大剂量组抑瘤率达26.05%。这可能是其抑制肝肿瘤生长的重要原因。至于其是否还有其它重要的作用机制(如诱导细胞凋亡方面),我们将在后续的研究中进行进一步的探讨。

[参考文献]

- [1] 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(2): 95-98.
- [2] 张火俊, 田建明, 王培军, 等. 大鼠种植性肝癌组织端粒酶活性的变化[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26(8): 940-941.
- [3] 吴玮, 姚登福, 邱历伟, 等. 肝癌组织及外周血端粒酶表达对肝癌的诊断和鉴别价值[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2004, 13(5): 498-501.