

固本抑瘤 II 号及其拆方对 A₅₄₉ 抑瘤及 与化疗联合用药的实验研究

张甘霖^{1,2}, 李萍¹, 王笑民^{3*}, 唐勇³, 刘欣¹, 盛巡¹

(1. 北京市中医研究所, 北京 100010; 2. 北京中医药大学中药学教研室, 北京 100029;
3. 首都医科大学附属北京中医医院肿瘤科, 北京 100010)

[摘要] 目的: 探讨益气活血中药固本抑瘤 II 号(全方)和各拆方组药物对 A₅₄₉ 肺癌细胞生长的影响及与化疗药物顺铂(DDP)联合应用的效果。方法: 固本抑瘤 II 号全方和根据功效拆分的益气组、行气活血组、培补肝肾组、散结消癥组药物, 分别制备水提物。采用 MTT 法检测各组药物对 A₅₄₉ 细胞生长的影响及与 DDP 联合应用的效果。结果: 单独应用全方和行气活血组水提物对 A₅₄₉ 细胞生长表现为抑制作用, IC₅₀ 分别为 33.21 mg 生药/mL 和 9.55 mg 生药/mL; 与 DDP 合用表现为增效作用, 增效倍数分别为 1.23 和 1.77, 合并指数为 1.05 和 0.83, 表现出协同和相加作用。结论: 固本抑瘤 II 号在体外实验中能够抑制 A₅₄₉ 细胞生长, 与 DDP 合用有一定的化疗增效作用; 行气活血组药物也具有抑瘤和增效作用, 且作用与全方接近。提示行气活血组中药为体外实验中全方抗肿瘤作用及化疗增效作用的有效组分。

[关键词] 固本抑瘤 II 号; 抑瘤作用; 增效作用

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)01-0035-04

In Vitro Studies of Gubenyliliu Prescription II and Its Functional Compositions on A₅₄₉ Lung Carcinoma Cell and Synergistic Action with Chemotherapy

ZHANG Gan-lin^{1,2}, LI Ping¹, WANG Xiao-min^{3*}, TANG Yong³, LIU Xin¹, SHENG Xun¹

(1. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Dongcheng District, Beijing 100010, China;
2. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
3. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Capital University of Medical Science, Beijing 100010, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Gubenyliliu Prescription II (Prescription II, P II) and its functional groups on A₅₄₉ lung carcinoma cell's growth and combinative effect with diamminedichloroplatinum (DDP). **Methods:** According to its functional composition, Prescription II was divided into four groups: Reinforcing vital energy group (VE), Promoting qi to activate blood group (QB), Cultivating kidney and liver group (KL) and Eliminating stagnation and removing lump group (SL). Their aqueous extracts were prepared respectively. MTT assay was used for A₅₄₉ growth and combinative effect with DDP. **Results:** Both Prescription II and QB group showed depressive effect on A₅₄₉ growth. The IC₅₀ was 33.21 mg crude drug/mL and 9.55 mg crude drug/mL respectively. Both of them had synergistic action with DDP, the multiple was 1.23 and 1.77, complicating index was 1.05 and 0.83 accordingly. **Conclusion:** P II can inhibit A₅₄₉ grow, and it has synergistic action with DDP to some extent. Among the functional groups, QB group has the similar

[收稿日期] 2006-05-17

[基金项目] 北京市科委资助(H010910190119)

[通讯作者] * 王笑民, Tel: (010) 52176568; E-mail: ntxm100@sina.com

effects with P II. It indicates that herbs in QB group play the main active effect against tumour and synergetic action in the whole prescription.

[**Key words**] Gubenyliliu Prescription II; anti-tumour; synergetic action

固本抑瘤 II 号是北京市中医院治疗气虚血瘀证肿瘤患者,尤其是中晚期肺癌患者辅助放化疗的常用方药,经过长期临床观察疗效确切。该方以生黄芪、莪术为君,益气活血;以党参、茯苓、白术、鸡血藤、川芎为臣,补益气血、行气活血化瘀;佐以浙贝母、苦参、女贞子等培补肝肾、散结消癥。全方具有扶正祛邪、益气活血的功效。本实验选用人肺腺癌细胞株 A₅₄₉,通过全方及拆方研究,观察该方及方中不同组分中药对 A₅₄₉ 细胞生长的影响,寻找固本抑瘤 II 号方中抑瘤及增效作用的主要成分。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人肺腺癌细胞株 A₅₄₉,由北京市肿瘤研究所分子生物学实验室提供。

1.2 试剂 顺铂(diamminedichloroplatinum, DDP),澳大利亚 FH Faulding & Co. Limited;小牛血清(calf serum):奥地利 PAA;培养基(Dulbecco minimum essential medium, DMEM):美国 GIBCO;磷酸盐缓冲液(PBS):美国 GIBCO;二甲基亚砜(DMSO):北京化工厂;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑(MTT):美国 Sigma,华美公司分装,用 PBS 配制成 5 mg/mL,过滤,4℃保存。

1.3 仪器 酶标仪(奥地利 Digiscan SA1000)。

1.4 药物 固本抑瘤 II 号全方(Total)由党参、茯苓、白术、生黄芪等 12 味中药组成,由北京中医院中药房提供。根据功效将全方拆分为四组:益气组(VE):党参、茯苓、白术、生黄芪;行气活血组(QB):川芎、鸡血藤、莪术;培补肝肾组(KL):女贞子、枸杞子、仙灵脾;散结消癥组(SL):苦参、浙贝母。在北京市中医研究所中药室指导下完成全方及拆方组水提物的制备:药物浸泡 0.5 h 后一煎加入 8 倍药物重量的凉开水煎煮 90 min,二煎加入 5 倍量凉开水煎煮 60 min,两煎混合 200 目过滤浓缩至膏状后于真空干燥箱中干燥 6 h。全方水提取物 1 g 相当于生药量 3.83 g,益气组水提取物 1 g 相当于生药量 3.07 g,行气活血组水提取物 1 g 相当于生药量 10.20 g,滋补肝肾组水提取物 1 g 相当于生药量 4.48 g,解毒散结组水提取物 1 g 相当于生药量 9.67 g。

1.5 肿瘤细胞生长抑制实验 采用 MTT 法^[1]。

1.5.1 全方及各拆方组对 A₅₄₉ 细胞生长的抑制作用

取对数生长期细胞,常规消化,调整细胞密度为 6×10^4 /mL,接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,培养 24 h 使之完全贴壁。加入 2 倍比稀释的各组药物 100 μ L (拆方组设 7 个浓度,终浓度为 12.5~800 μ g 提取物/mL,固本抑瘤 II 号全方设 6 个浓度,终浓度为 3.125~100 mg 生药/mL)。实验分为四组:空白对照组(加培养液)、阴性对照组(细胞悬液)、调零组(不同浓度含药培养液)、给药组(加不同药物浓度),每组 4~6 个复孔。培养 68 h 后每孔加入 15 μ L MTT,继续培养 4 h。实验结束前吸弃上清,加入 150 μ L DMSO,振荡混匀,使结晶充分溶解,在酶标仪上($\lambda=492$ nm)测各孔吸光度值(A 值),实验重复 3 次以上。

根据以下公式计算药物对细胞的生长抑制率(IC)

$$IC = \left| 1 - \frac{(\text{试验组 } A \text{ 值} - \text{调零组 } A \text{ 值})}{\text{对照组 } A \text{ 值} - \text{调零组 } A \text{ 值}} \right| \times 100\% \text{ (药物有色)}$$

$$IC = \frac{\text{对照组 } A \text{ 值} - \text{实验组 } A \text{ 值}}{\text{对照组 } A \text{ 值} - \text{空白组 } A \text{ 值}} \times 100\% \text{ (药物无色)}$$

1.5.2 全方及各拆方组与化疗药物顺铂合用的合并指数及增效倍数 取对数生长期细胞,常规消化,调整细胞密度为 6×10^4 /mL,接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,培养 24 h 使之完全贴壁。次日加入倍比稀释的各组药物 50 μ L (DDP 终浓度 0.25~4 μ g/mL,固本抑瘤 II 号全方终浓度为 1.56~6.25 mg 生药/mL,其余拆方组药物终浓度为 100~400 μ g 提取物/mL),先加入中药再加入 DDP。余实验方法同上。

合并指数 CI_{50} : 50% 抑制时联合用药的效应,根据以下公式计算。

$$CI_{50} = \frac{\text{联合用药时抗癌药物 } IC_{50} + \text{联合用药时中药 } IC_{50}}{\text{单独用药时抗癌药物 } IC_{50} + \text{单独用药时中药 } IC_{50}}$$

当 $CI_{50} \leq 0.95$ 为协同效应; $CI_{50} \geq 1.05$ 为拮抗效应; $0.95 < CI_{50} < 1.05$ 为相加效应。

$$\text{增效倍数} = \frac{\text{单独用药的 } IC_{50}}{\text{联合用药的 } IC_{50}}$$

1.6 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析(ANOVA)。率的检验采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 固本抑瘤 II 号全方及各组药物对 A₅₄₉ 细胞的抑制作用 图 1 2 3 说明了固本抑瘤 II 号全方及各拆方组药物对 A₅₄₉ 细胞生长的影响。从图 1 中可以看出益气组、培补肝肾组、散结消癥组对细胞生长无明显影响。固本抑瘤 II 号全方(图 2)和行气活血组药物(图 3)对 A₅₄₉ 细胞生长表现出一定的抑制作用,随着剂量的增加抑制作用增强。其中全方对 A₅₄₉ 细胞生长的 IC₅₀ 为 33.21 mg 生药/mL,行气活血组 IC₅₀ 为 9.53 mg 生药/mL。

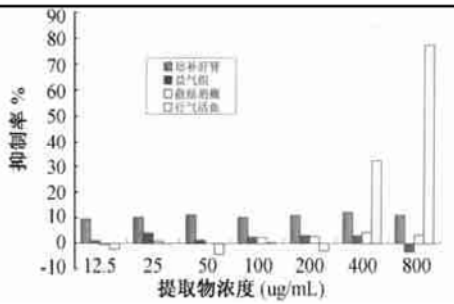


图 1 散结消癥组、益气组、培补肝肾组、行气活血组对 A₅₄₉ 细胞生长的影响

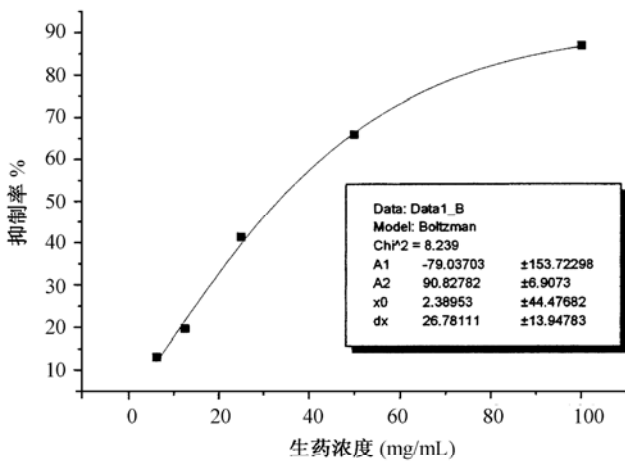


图 2 固本抑瘤 II 号对 A₅₄₉ 细胞生长的影响 (IC₅₀ = 33.21 mg 生药/mL)

2.2 固本抑瘤 II 号全方及行气活血组水提取物对 A₅₄₉ 细胞生长抑制作用的时效关系 从表 1 中可以看出,行气活血组的 IC₅₀ 值低于全方的 IC₅₀, P < 0.05; 且 48 h 即表现出一定的抑瘤作用,起效比全方快;药物作用 72 h, 达到 50% 抑制效果时,行气活血组 IC₅₀ 为全方的 22.63%,与行气活血组药物在全方中所占比例 26.57% 接近; 96 h 二组药物作用强度接近。

2.3 固本抑瘤 II 号全方及行气活血组水提取物对化疗药物顺铂的增效作用 益气组、培补肝肾组、散结消癥组中药对 DDP 的抑瘤作用没有明显影响,全方及行气活血组水提取物与 DDP 合用,有增效作用。根

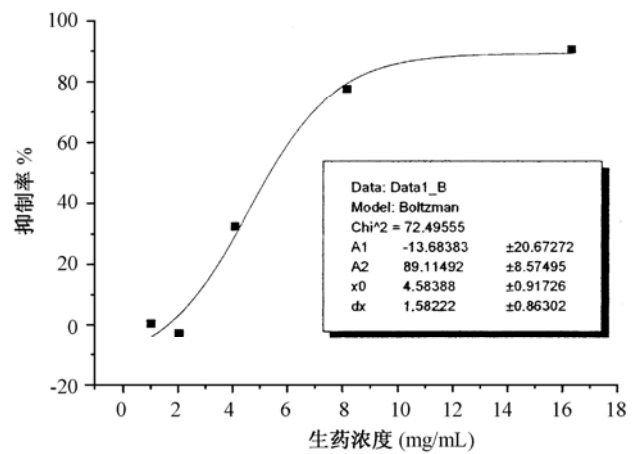


图 3 行气活血组对 A₅₄₉ 细胞生长的影响 (IC₅₀ = 9.53 mg 生药/mL)

据表 2 可以计算出, DDP、DDP+ 4 mg/mL 行气活血组、DDP+ 6.25 mg/mL 固本抑瘤 II 号对 A₅₄₉ 细胞的半数生长抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 4.89 μg/mL、2.77 μg/mL、3.99 μg/mL。二组药物与 DDP 联合应用均表现出一定的增效作用,其中 4 mg/mL 行气活血组药物对 DDP 杀伤 A₅₄₉ 细胞增效倍数为 1.77 倍; 6.25 mg/mL 固本抑瘤 II 号对 DDP 杀伤 A₅₄₉ 细胞增效倍数为 1.23 倍。

表 1 固本抑瘤 II 号全方及行气活血组对 A₅₄₉ 细胞 IC₅₀ 值的比较 (mg/mL, $\bar{x} \pm s$)

分组	IC ₅₀		
	48 h	72 h	96 h
Total	29.40 ± 1.19	32.61 ± 4.52	17.02 ± 2.74
QB	9.31 ± 2.93*	7.37 ± 3.48*	10.96 ± 2.67

注: 两组相比* P < 0.05, ** P < 0.01。

表 2 固本抑瘤 II 号全方及行气活血组药物对顺铂的增效作用 (抑瘤率%)

DDP μg/mL	抑瘤率%		
	DDP	DDP+ QB	DDP+ Total
0.25	4.42	19.72	11.56
0.5	5.05	19.17	13.76
1	14.36	38.0	23.38
2	36.92	70.70	50.08
4	89.67	95.14	88.20

2.4 全方及行气活血组药物与顺铂合用的合并指数 CI₅₀ 根据表 1, 2 的试验结果, 计算全方及行气活血组药物与顺铂合用的合并指数 CI₅₀。首先选择固本抑瘤 II 号 6.25 mg 生药/mL、行气活血组中药 4.0 mg 生药/mL 分别与 DDP (0.25~ 4.0 μg/mL) 联合

作用。Total QB 与 DDP 合用的 IC_{50} 分别为 3.99 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，DDP 单独使用的 IC_{50} 为 4.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

进一步选择 Total (1.625~25 mg 生药/mL)、QB 中药 (0.51~8.16 mg 生药/mL) 分别与 DDP 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 联合应用。结果显示单独应用 Total、QB 的 IC_{50} 分别为 33.21 mg/mL、9.55 mg/mL，联合 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DDP 后的 IC_{50} 分别为 8.59 mg/mL、2.46 mg/mL。

根据以上结果计算合并指数 CI_{50} ，表 3 显示：QB 的 $CI_{50} < 0.95$ ，与 DDP 合用表现为协同作用；Total $0.95 < CI_{50} < 1.05$ ，表现为相加作用。

表 3 固本抑瘤 II 号全方及行气活血组与顺铂合用的合并指数

分组	IC_{50}				CI_{50}
	单独使用 DDP $\mu\text{g}/\text{mL}$	联合用药时 DDP $\mu\text{g}/\text{mL}$	单独应用 中药 mg/mL	联合应用时 中药 mg/mL	
Total	4.89	3.99	33.21	8.59	1.05
QB	—	2.77	9.55	2.46	0.83

3 讨论

肺癌主要是由于脏腑虚损、血瘀痰凝毒结而成。癌症病人，尤其是中晚期癌症患者普遍存在血瘀证或气虚血瘀证，化疗是导致气虚血瘀证的主要原因之一^[2,3]。益气活血法属于“扶正祛邪”范畴，具有益气不留寇，驱邪不伤正的功效，可以改善病灶周围的微循环，有利于化疗药物的渗入，提高疗效。固本抑瘤 II 号是我院治疗气虚血瘀证肿瘤患者的有效方剂，常配合化疗应用，能够改善患者生活质量，减轻化疗的毒副作用^[4,5]。动物试验研究也表明固本抑瘤 II 号对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤、肺腺癌 (La₇₉₅)、子宫颈癌 (U₁₄) 具有一定的抑瘤作用和化疗增效作用，能够延长荷瘤小鼠的生存率，改善免疫、血液流变学指标^[6]。固本抑瘤 II 号疗效确切，值得临床推广，但此方的体外实验研究较少。

本实验采用 MTT 法检测固本抑瘤 II 号全方及各拆方组中药对 A₅₄₉ 细胞生长的影响，探讨该方的抗肿瘤作用及化疗增效作用，并筛选有效组分。本实验发现全方和行气活血组中药对 A₅₄₉ 细胞生长表现为一定的抑制作用，其中行气活血组起效快、作用强，提示为全方体外杀瘤作用的有效组分；固本抑瘤 II 号在 6.25 mg 生药/mL 时与 DDP 合用表现为一定

的增效作用，增效倍数为 1.23；行气活血组水提物在 4 mg 生药/mL 时与 DDP 合用表现为增效作用，增效倍数为 1.77；全方及行气活血组中药对 DDP 杀伤 A₅₄₉ 分别表现为相加和协同作用。进一步的拆方研究表明，行气活血组中药为全方体外抗肿瘤作用及化疗增效作用的有效组分。

行气活血组中药由鸡血藤、川芎、莪术组成，三药均具有一定的抗肿瘤^[7,8]作用，但未见三者联合应用的报道。考虑临床用药为中药水煎剂，故本实验选择水提物，但可能会使某些不易溶于水的有效成分含量减少甚至缺失，因此水提物的制备方法有一定的局限性，具体有效成分也有待于深入研究。本实验仅对 A₅₄₉ 一种肿瘤细胞进行了研究，有其局限性。由于中药成分复杂，具体的有效成分不明确，作用靶点较多，作用机制有待深入研究。

[参考文献]

[1] Marica Theiszová, Soňa Jantová, Jana Dragúňová, edc. Comparison The Cytotoxicity of Hydroxyapatite Measured By Direct Cell Counting and Mtt Test in Murine Fibroblast Nlr-3t3 Cells [J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2005, 149(2): 393-396.

[2] 郁仁存, 彭晓梅, 饶燮卿, 等. 固本抑瘤 I 号配合化疗治疗恶性肿瘤临床与实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 14(7): 392.

[3] 王笑民, 郁仁存, 饶燮卿, 等. 晚期非小细胞肺癌气虚血瘀证的研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 14(12): 724.

[4] 唐武军, 王笑民, 郁仁存, 等. 固本抑瘤 II 号联合 MVP 方案治疗晚期 NSCLC [J]. 中国中医药信息杂志, 2001, 8(7): 43-44.

[5] 张青, 郁仁存, 唐武军, 等. 固本抑瘤 II 号抗肿瘤的临床研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(7): 41-42.

[6] 张青, 郁仁存, 王禹堂, 等. 固本抑瘤 II 号对小鼠肺腺癌 (L795) 爪垫皮下移植后抑瘤作用及其术后生命延长率的试验研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 1997, 4(1): 14.

[7] 崔艳君, 陈若芸. 鸡血藤化学和药理研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 14(4): 72-78.

[8] 汪伟民, 汪波, 刘荣玉, 等. 中药莪术油对小鼠 Lewis 肺癌抑制作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2003, 10(6): 353-354.