

肺癌平诱导 Lewis 肺癌小鼠肿瘤 细胞凋亡的形态学研究

刘春英, 王 哲, 郝宏党, 蔡 硕, 蔡玉文
(辽宁中医学院, 辽宁 沈阳 110032)

摘要:目的: 观察肺癌平对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤细胞凋亡的影响。方法: 选用 Lewis 肺癌小鼠肿瘤细胞株, 制作肿瘤动物模型后, 分为盐水对照组、肺癌平组, 进行光、电镜形态学观察。结果: 实验组在 20 只受试 Lewis 肺癌小鼠中发癌数为 16 只, 而对照组 20 只全部发癌, 且与对照组比较, 肿瘤团块较小, 病理性核分裂较少, 间质血管较少, 淋巴细胞浸润。电镜下可见凋亡小体形成, 且肺癌平能刺激淋巴细胞增生, 在癌细胞间有许多淋巴细胞浸润, 可见淋巴细胞侵入癌细胞并直接攻击破坏癌细胞。结论: 肺癌平具有抗肺癌作用, 其作用机理是通过诱导肿瘤细胞凋亡及刺激淋巴细胞增生的作用而实现的。

关键词: 肺癌平; 细胞凋亡; 电镜

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)02-0046-03

Experimental Study on Feiai Ping in Inducing Cell Apoptosis of Lewis Lung Cancer Mouse

LIU Chun-ying, WANG Zhe, HAO Hong-dang, CAI Shou, CAI Yu-wen
(Liaoning College of TCM, Shenyang 110032, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of Feiai Ping on inducing cell apoptosis of Lewis lung cancer mouse. Methods: We chose the cell strain of Lewis lung cancer mouse, inoculated the cell strain subcutaneously. After building the tumor animal model successfully, we divided the animal into Saline control group and Feiai Ping treating group. Using the method of light microscope(LM) and electron microscope(EM) to observe the morphology. Results: Feiai Ping treating group has 16 episode mice, while the control group has 20 samples. To be compared with the control group, the experimental group has following characteristics: the tumor ball and the cell volum are smaller, the atypia is not evident, and the pathological karyokinesis and interstitial blood vessel are fewer. It has necrosis and infiltration of lymphocyte. Through the observation of EM, we found the formation of apoptotic body. In addition, the Feiai Ping can activate the proliferation of lymphocyte. There are many lymphocytes between the tumor cells and the lymphocytes invade the tumor cells to destroy the tumor cells. Conclusion: Feiai Ping has the function of anti-lung cancer which mechanism maybe induce the tumor cell apoptosis of the Lewis lung cancer mouse and activate the proliferation of lymphocyte.

Key words: Feiai Ping; apoptosis; electron microscope

药物对肿瘤的治疗其中一个重要的途径就是诱导肿瘤细胞凋亡, 传统的益气法和活血法在肿瘤的免疫治疗中已体现出较好的疗效^[1]。肺癌平正是我院根据肺癌患者正虚血瘀、余毒未清的病机特点, 依据益气、活血、解毒组方原则构成的。笔者以 Lewis 肺癌小鼠为模型, 研究了肺癌平对肿瘤细胞的形态学影响, 以阐明肺癌平治疗肺癌的作用机制, 为该药临床应用治疗肺癌提供可靠的实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 Lewis 肺癌小鼠肿瘤细胞株由中国医科大学免疫学教研室提供。

1.2 实验动物及分组 C₅₇BL/6 小鼠, 40 只, 体重 18 ~ 20 克, 雌雄各半, 由中国医科大学实验动物中心提供。随机分为 2 组, 每组 20 只, 即对照组、肺癌平组。

1.3 药物及试剂 肺癌平由红参、黄芪、莪术、桃仁、白花蛇舌草、天花粉、半枝莲、仙鹤草等组成, 传统方法水煎制成汤剂, 终浓度为 1.0g 生药/mL, 4℃ 冰箱保存备用。

1.4 主要仪器设备 超薄切片机(LKB-V 型), 透射

电子显微镜(JEM-1200)等。

2 实验方法

2.1 动物模型的制作 Lewis 肺癌小鼠肿瘤细胞株从冻存的液氮内取出,复苏后分别接种于 5 只 C₅₇BL/6 小鼠左后肢皮下,待瘤体长至 1~1.5cm 时,处死小鼠,选择生长良好的瘤组织,剪成瘤组织小块,用 200 目不锈钢筛网摩擦,过滤制成单细胞悬液,活瘤细胞计数为 2×10^6 个/mL 瘤细胞悬液,每只小鼠左后肢皮下接种 0.2mL。接种 24h 后开始灌胃给药,每天一次,连续 15d。盐水对照组灌喂生理盐水 0.5mL/只,肺癌平组按 25mL/kg,即 25g 生药/kg 灌喂中药汤剂,约相当于人的 25 倍,停药 24h 后取材。

2.2 普通光镜组织切片 断颈处死小鼠,剥离瘤体,取材、固定,常规制片,HE 染色。

2.3 透射电镜切片 断颈处死小鼠,迅速剥离瘤体,取材 1mm³ 小块,0.25% 戊二醛固定,4℃冰箱保存。1% 锇酸液后固定,脱水,浸透,pon812 包埋,超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,透射电镜下观察。

2.4 抑瘤率检查 终止治疗后处死动物,取瘤体称重,计算抑瘤率。抑瘤率% = (对照组平均瘤重 - 用药组平均瘤重) / 对照组平均瘤重 × 100%

3 结果

3.1 肺癌平对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤的抑制作用 见表 1。

表 1 肺癌平对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤的抑制作用

组别	n		瘤重/g	抑瘤率
	始	末		
对照组	20	20	2.56 ± 0.18	
肺癌平组	20	20	1.75 ± 0.20	31.64 ¹⁾

注: ¹⁾ 与对照组比较 $P < 0.01$ 。

结果表明,肺癌平组平均瘤重明显小于对照组,且有统计学意义。说明肺癌平对 Lewis 肺癌小鼠有抑制作用。

3.2 普通光镜观察 Lewis 肺癌小鼠肿瘤的形态学变化 实验组在 20 只受试 Lewis 肺癌小鼠中发癌数为 16 只,而盐水对照组 20 只发癌,且中药组与对照组比较,肿瘤团块缩小,病理性核分裂较少,间质血管较少(图 1 2)。提示肺癌平的抑癌作用较好。

3.3 透射电镜观察 Lewis 肺癌小鼠肿瘤细胞 与对照组(图 3)比较,肺癌平组出现凋亡细胞最具特征的变化,癌细胞膜破裂,胞质溢出呈空泡样改变,可见膜包裹的有较完整的细胞器和细胞核碎片的凋亡

小体形成(图 4);癌细胞破坏,线粒体呈髓样改变(图 5);可见淋巴细胞侵入癌细胞并直接攻击破坏癌细胞(图 6)。

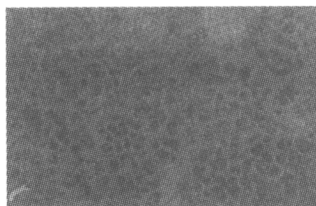


图 1 对照组 Lewis 肺癌细胞体积较大,病理性核分裂较多,间质血管较多。

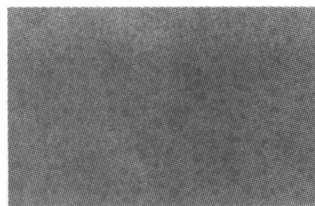


图 2 中药组 Lewis 肺癌细胞体积较小,病理性核分裂少,间质血管较少。

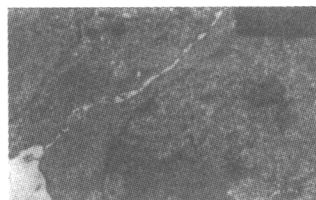


图 3 对照组 Lewis 肺癌细胞

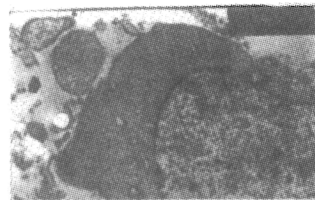


图 4 中药组 Lewis 肺癌细胞凋亡小体形成

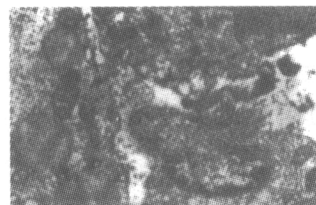


图 5 中药组癌细胞膜破裂,线粒体呈髓样改变

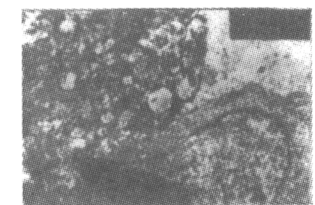


图 6 中药组淋巴细胞吞噬癌细胞

4 讨论

原发性肺癌属祖国医学“肺积”范畴,其发生多因正气虚损,阴阳失调,六淫之邪乘虚而入,导致肺脏功能失调,宣降失司,气机不畅,导致血行受阻,津液失于输布,津聚为痰,痰凝气滞,淤阻脉络,痰气瘀毒胶结日久形成肺肿块。因此,肺癌是因虚而致病,因虚而致实,是一种全身属虚、局部属实的疾病。因此我们根据肺癌的病机特点,认为治疗原则当扶正祛邪两不偏废,攻补兼施合理应用。采用益气、活血、解毒组方原则,由红参、黄芪、莪术、桃仁、白花蛇舌草、天花粉、半枝莲、仙鹤草等组成肺癌平。方中人参、黄芪益气健脾,莪术、桃仁活血化瘀,白花蛇舌草、天花粉、半枝莲、川贝清热解毒。现代医学研究证明,在本方剂中涉及的白花蛇舌草、天花粉、黄芪等均具有抑制 DNA、RNA 合成及诱导细胞凋亡作用^[2,3]。半枝莲等含有抗移码突变及抗点突变因子^[4]。莪术具有广谱抗肿瘤活性,可诱导肿瘤细胞凋亡且明显影响肿瘤细胞的分裂周期^[5],仙鹤草对

小鼠移植性肿瘤 S₁₈₀ 实体瘤有抑制作用^[6], 白花蛇舌草、半枝莲具有较好的抗病毒作用且对肺鳞癌及腺癌疗效显著^[7]等已得到充分证实。

在我们的研究中, 对照组 20 只发癌, 而实验组发癌数为 16 只, 且肿瘤团块较小。光镜下实验组与对照组比较, 细胞体积较小, 异型性不明显, 病理性核分裂较少, 间质血管较少, 淋巴细胞浸润。提示肺癌平具有抑癌作用。电镜下与对照组比较, 中药组出现凋亡细胞最具特征的变化, 细胞间隙增宽, 胞质线粒体呈空泡改变, 核固缩, 核染色质发生边集, 癌细胞膜破裂, 胞质溢出呈空泡样改变, 可见未脱离的凋亡小体。膜包裹的有较完整的细胞器和细胞核碎片的凋亡小体及多个凋亡小体形成。说明此方药抑制肿瘤的作用是通过诱导肿瘤细胞凋亡来实现的。此外可见淋巴细胞侵入癌细胞并直接攻击破坏癌细胞, 肿瘤细胞线粒体呈髓样改变。说明该方抑制肿瘤作用还可以通过使线粒体结构损伤, 造成能量供应出现障碍而实现。因此, 我们有理由相信, 以辨证论治为基础, 融合现代抗癌研究最新成果, 合理选药

组方, 扶正抗癌攻补兼施, 将使肺癌研究会有新的突破。

参考文献:

- [1] 刘春英, 董明, 蔡硕. 益气、活血、益气活血类中药复方对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠免疫抑瘤作用的比较研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(7): 48-50.
- [2] 王修杰, 王朝俊, 谭厚生, 等. 764 复方抗癌作用及其机理的实验研究[J]. 癌症, 1997, 16(3): 183-185.
- [3] 毕黎琦, 李洪军, 张玉华. 中药天花粉蛋白对黑色素瘤细胞凋亡及细胞周期的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(1): 35-37.
- [4] 殷学军, 刘德祥, 王河川. 102 种中药水溶性提取物抗诱变筛选[J]. 中国中药杂志, 1990, 15(10): 41-46.
- [5] 秦叔逵, 钱军, 杨爱珍. 榄香烯乳抗肺癌细胞的实验研究[J]. 肿瘤防治研究, 1996, 23(4): 251.
- [6] 陈曼, 宋新荣. 近 10 年来仙鹤草临床应用与药理研究进展[J]. 中医药信息, 2000, 6, 5-7.
- [7] 刘振义, 刘勇. 山龙露蜂丸治疗肺癌 120 例临床观察[J]. 新中医, 1995, 27(8): 38.