

实验研究

892 号药液血清诱导人肺癌细胞凋亡的初步研究

杨勤建* 指导:涂晋文*

摘要 通过血清药理学方法,选择不同浓度的含 892 号药液的兔血清,与人肺癌细胞共同孵育不同时间后,应用倒置相差显微镜、荧光显微镜、流式细胞仪对细胞生长状况和凋亡形态,细胞周期分布及凋亡率进行观察、检测。结果:人肺癌细胞经含中药兔血清作用后,由贴壁生长而逐渐脱落,外形变圆,体积缩小,折光性增强;荧光镜下见细胞核破碎,裂解为大小不等的凋亡小体,流式细胞仪检测显现典型的细胞凋亡峰,以 5% 含药血清作用 48 小时后凋亡峰最为明显,凋亡率为 42.82%。提示:中药复方 892 号药液通过血清药理学方法可诱导人肺癌细胞的凋亡,这可能是其抗肿瘤的分子机制之一。

主题词 肺肿瘤/病理学 肿瘤细胞,培养的/药物作用 @ 892 号药液

细胞凋亡与肿瘤的发生、发展密切相关,诱导肿瘤细胞凋亡将是寻找抗肿瘤药物的新靶点^[1]。有研究资料表明^[2],许多中药具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用,但均为单味中药某一成分提取物,而且是直接与肿瘤细胞作用,并不能完全反映中药的抗肿瘤作用的复杂过程。本实验在已证实 892 号药液具有提高荷瘤小鼠 NK 细胞活性、TNF 含量及杀伤肺腺癌细胞作用的基础上^[3],又通过血清药理学方法,初步观察了其诱导的人肺癌细胞(SPC-A1)凋亡的过程。结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物和药物:纯种新西兰家兔,雄性,体重 2.5~3kg,由湖北省医药工业研究所提供。人肺癌细胞株(SPC-A1)由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。892 号药液由半夏、天南星、马钱子、三七等中药组成,生药由湖北省药材公司饮片厂提供,按工艺制成每毫升含生药 1g 的浸膏备用。DMEM 培养液、胎牛血清、胰酶,由美国 Gibco 公司提供;二苯胺胺 Hoechst 33258、硫柳汞 thsmersol,由美国 Sigma 公司提供。

* 湖北中医学院,湖北省武汉市武昌区云架桥 110 号(430061)

收稿日期:1998-07-14

DAPI、SR101 染色剂,由德国 Partec 公司提供。

1.2 仪器:倒置相差显微镜、荧光显微镜(日本 Olympus)、流式细胞仪 PAS-I (德国 Partec)、CO₂ 培养箱 DODEL2300 型(美国 Shellab)。

1.3 含药血清制备:以纯种雄性新西兰家兔 5 只,每日给予 892 号药液 7g/kg 灌胃,10 日后,于最后 1 次灌药后 1 小时(灌药前禁食不禁水 12 小时),乙醚麻醉,颈动脉采血,无菌分离血清,经 56℃,30 分钟处理后,置-20℃冰箱保存备用。

1.4 含药血清药物成分的定性检测:为了解药物灌胃后是否经胃肠吸收入血液,取 892 号药液中代表性成分马钱子(含土的宁)作含药血清定性检测。取含药血清样本 2 份,空白兔血清样本 1 份各 50ml,分别用 250ml 甲醇超声提取 30 分钟,离心,上清液回收溶剂,蒸干,用 1ml 甲醇溶解。892 号药液制剂对照组:取制剂 20ml,用氯仿提取 2 次,每次 20ml,提取液回收溶剂,蒸干,用 1ml 甲醇溶解;马钱子对照药材:取马钱子药材 1g,破碎,用 20ml 甲醇冷浸 48 小时,过滤,回收溶剂,蒸干,用 1ml 甲醇溶解。用硅胶 G 加入 9ml 0.5% CMC-Na 溶液,研匀,均铺在一块洁净的 10cm×20cm 玻璃板上,晾干,于 105℃活化 30 分钟,置干燥器中冷却备用。分别取含药血清样 1、样 2,空白兔血清、892 号药液制剂、马钱子对照药材供试液各 10ml,点于同一块备好的硅胶 G 薄层板上;向双槽层析缸的一槽中加入 20ml 展开剂(苯、乙酸乙酯、二乙胺),另一槽中加入 10ml 浓氨水,然后将点好样的薄层板置于展开剂槽中,盖好层析缸盖,上行展开,展距 10cm,取出晾干,喷改良的 Dragendorff 试剂显色。

1.5 人肺癌细胞培养:将传代的人肺癌细胞(SPC-A1)接种于含 1%青霉素、链霉素和 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中(下同),细胞浓度为 2×10^5 /ml,置于含 5%CO₂、37℃度培养箱中培养。培养 24 小时至细胞生长旺盛后,去培养液,加入含药血清 5%、10%浓度的培养液各 5ml(另设一无含药血清对照组),置培养箱中培养 24 小时,去含药血清培养液,再加入不含药血清培养液分别培养 24 小时、48 小时(简称 5%24 小时、

10%24 小时、5%48 小时、10%48 小时),将培养皿在倒置相差显微镜下作细胞生长状态的观察。

1.6 荧光染色细胞的制备:将培养 24 小时、48 小时的细胞去培养液,用胰酶消化培养皿,离心去胰酶液,将二者细胞收集合一。一部分加入含甲醇、冰乙酸的固定液固定,反复 2 次,每次 5 分钟,离心去固定液后,取细胞沉淀液玻璃涂片,干燥,加二苯酰胺荧光液染色 1 小时(避光),三蒸水反复冲洗 3 次,置常温下自然干燥,甘油封片,Olympus 荧光显微镜(10×20 倍)下作细胞核凋亡的形态学观察。

1.7 流式细胞仪检测细胞的制备:将另一部分细胞沉淀液用 PBS 冲洗 2 次,在震荡状态下缓慢滴入 75%乙醇 2ml 左右,过夜,用 DAPI、SR101 染色剂染色 30 分钟,滤网过滤,作流式细胞仪检测。每份样品测 10000 个以上细胞。

2 结果

2.1 含药血清中药物成分的薄层定性检测结果:含药血清样 1、样 2、制剂样品色谱中,与马钱子对照药材色谱相应的位置上显现出 3 个相同的棕黄色斑点;空白兔血清样品未见相应棕黄色斑点。表明兔血清中含有 892 号药液的药物成分(照片略)。

2.2 人肺癌细胞生长性状观察:经含药血清处理 24 小时,再加培养液培养 12~24 小时,即可见细胞由贴壁脱落,悬浮于培养液中,细胞形态变圆,体积缩小,核固缩出现,核颜色加深,折光性增强,24~48 小时的脱落细胞更加增多;无含药血清培养液培养的细胞贴壁生长,几乎无脱落,胞浆饱满,舒展生长,相邻细胞生长融合成片。

2.3 荧光染色后的细胞核形态观察:油镜下见含药血清处理的细胞核在 24 小时、48 小时时间段中均有破裂,呈大小不等、形态不规则的碎片或呈梅花状,此即为较典型的细胞凋亡形态,其中以含药血清 5%48 小时的凋亡细胞最多;无含药血清培养液培养的细胞核完整,未见有凋亡形态的细胞核(照片略)。

2.4 流式细胞仪检测凋亡细胞:不同含药浓度血清和不同时间处理的人肺癌细胞均有凋亡,其中以 5%48 小时的凋亡峰在 DNA 组图上表现最为典型,而空白对照组细胞无凋亡峰(图略)。各组凋亡率 5%24 小时为 18.7%,10%24 小时为 12.15%,5%48 小时为 42.82%,10%48 小时为 18.86%;空白对照为 2.61%。

3 讨论

日本学者发明了血清药理学的实验方法^[4],即将中药复方制剂通过动物灌胃,药物有效成分经胃肠吸收进入机体血液循环,在一定时间内采取血液,分离其

血清,再以此血清加入到体外细胞培养体系,观察其药理作用,分析其所含药物的有效成分。这种方法排除了在体外实验中药物直接与细胞作用的各种干扰因素,较接近药物在体内环境中产生的药理效应的真实过程。本实验选用具有化痰散结、活血化瘀等作用的半夏、天南星、三七、马钱子等组成复方 892 号药液,通过血清药理学方法成功地诱导了人肺癌细胞的凋亡,从形态学和流式细胞仪检测均呈现明显的凋亡特征。作用环节主要是影响细胞周期 S 期向 G₂M 期的转变过程,将肿瘤细胞阻滞在 S 期,抑制其增殖并诱导其凋亡,表明中药复方也具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用。同时还发现:细胞接触含药血清 24 小时,去含药血清培养基后,再在无含药血清培养基中培养 24~48 小时,细胞发生凋亡改变更明显,提示 892 号药液诱导的人肺癌细胞凋亡作用是非药物浓度依赖的。

中药复方的药物成分较复杂,经口服由胃肠吸收进入机体血液循环的过程中,也可出现一些不同的反应。血清中是否含有某些药物的成分是该药物诱导细胞凋亡的关键。选择药剂中具有代表性且易于检测的马钱子(含士的宁)作为阳性样品,通过薄层检测方法证明兔血清中含有 892 号药物的某些药物成分。提示该含药血清诱导的人肺癌细胞凋亡,与中药复方中的药物有密切关系。

892 号药液是根据肿瘤临床所见多为“痰瘀浊气凝结”的病理特点而组方选药,方中半夏、天南星虽有抗肿瘤作用^[5],但均未见到其可诱导肿瘤细胞凋亡的报道。本实验结果表明,根据肿瘤的病理特点而组方用药,诱导人肺癌细胞凋亡,证明了中医辨证论治的科学性,复方中药的作用也不同于单味中药作用的叠加。但诱导凋亡的药物成分为何?是药物直接作用还是通过提高 NK 细胞活性或 TNF 含量而间接诱导细胞凋亡,或其它因素作用,尚有待深入研究。

4 参考文献

- 1 黄镜,孙燕.肿瘤药物治疗的新靶点:凋亡.中国新药杂志,1997,6(6):412.
- 2 杨勤建.中药诱导肿瘤细胞凋亡的研究进展.湖北中医杂志,1998,20(1):53.
- 3 杨勤建,雷良蔚,潘希雄,等.892 号药液治疗支气管肺癌的临床和实验研究.中国中西医结合外科杂志,1998,4(2):68.
- 4 张君豪,陈可冀.血清药理学在中药及复方研究中应用的评价.中国中西医结合杂志,1996,16(3):131.
- 5 杨仓良,程方,高泳纹,等.剧毒中药古今用.北京:中国医药科技出版社,1991,191.