

中药长必安复方浸膏溶液对人盲肠腺癌细胞系 HCe-8693 作用的体外研究

钱丽娟¹ 凌雨田¹ 朱赤红¹ 牟瀚舟¹ 罗森飙² 沈汉澄² 杨 峰² 孙静芸²

摘要 目的:探讨中药长必安对体外培养的人盲肠未分化腺癌细胞系(HCe-8693)的影响及其机制,并为临床使用该药治疗大肠癌提供理论依据。方法:用长必安复方浸膏溶液对 HCe-8693 细胞进行了体外实验,观察了不同浓度的中药对 HCe-8693 细胞生长、细胞集落形成率、细胞增殖、细胞凋亡及细胞周期的影响。结果:中药长必安对 HCe-8693 有明显的抑制作用。作用随浓度增加而增强,并以联合用药组对细胞的抑制作用为最明显。用流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡的结果表明,该中药主要是阻滞细胞周期中 G₂+M 时相细胞。细胞凋亡现象也随中药浓度增高而凋亡率升高。结论:中药长必安能抑制人肠癌细胞的增殖,并能诱导肠癌细胞凋亡。当中药长必安与氟脲嘧啶(5-FU)联合用药时效果更佳,显示了中药长必安协同并增强了 5-FU 的抗肠癌作用。

主题词 结肠肿瘤/中医药疗法 @ 长必安复方浸膏溶液

中药长必安是一种复方中药制剂。为了探讨其抗癌作用机理,我们用长必安复方浸膏溶液稀释成不同浓度,直接作用于体外生长的人盲肠未分化腺癌细胞(HCe-8693),应用 MTT 法、细胞集落形成率、细胞增殖抑制、流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞周期的改变,探讨其用于大肠癌治疗的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料:中药长必安复方浸膏由浙江省中医药研究院研制。本制剂选用具有益气、滋阴、行气、活血等功效的龟甲、鳖甲、黄芪、白术、川芎等药组成,按一定比例配制。经粉碎,过筛,煎煮,过滤,浓缩至相对密度为 1.85(30℃测)的稠膏。每克浸膏相当于 4.27g 生药。批准文号:浙卫准字(1999)第 1217 号,国家专利号 ZL001243608。临用前过滤除菌。按实验组别不同,用培养液稀释至所需浓度。氟脲嘧啶(5-FU)注射剂,由南通制药厂生产,RPMI-1640 为 GIBCO 公司产品,MTT、碘化丙啶(PI)为 Sigma 公司产品。

1.2 仪器设备:酶标仪 CliniBio 128 美国 Sltlab-instrument 公司产品;Facsclibur 美国 BD 公司产品。

1.3 细胞培养及实验分组:HCe-8693 由浙江省肿瘤

研究所 1987 年建立,按常规培养在 RPMI-1640 培养液中,内含 15% 的胎牛血清(四季青生物工程材料公司生产),并补充必要的抗生素,在 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。实验时随机分成 6 组:(1)阴性对照组(A):只加新鲜培养液;(2)低浓度长必安组(B):培养液中加 0.5mg/ml 的长必安复方浸膏溶液;(3)中浓度长必安组(C):培养液中加 1mg/ml 的长必安复方浸膏溶液;(4)高浓度长必安组(D):培养液中加 5mg/ml 的长必安复方浸膏溶液;(5)阳性对照组(E):培养液中加 0.25mg/ml 的 5-FU;(6)联合用药组(F):培养液中加 1mg/ml 的长必安复方浸膏溶液和 0.25mg/ml 的 5-FU(pH7.0)。

1.4 方法

1.4.1 中药长必安复方浸膏溶液(以下简称中药)对肠癌细胞生长的影响:取对数生长期的细胞制成 1×10⁵/ml 的细胞悬液。用于细胞计数的,取 3ml 细胞悬液于 25ml 的培养瓶中,每组 4 瓶,共 6 组;用于计数核分裂指数的每组 3 瓶,共 6 组,取细胞悬液 7 滴滴于带盖片的青霉素小瓶中,加 1ml 新鲜培养液。培养 24 小时后,弃去培养液,按组别换入不同浓度的中药培养液。药物作用 24 小时后,消化收集各组细胞,以台盼蓝排除法进行活细胞计数,以观察中药对肠癌细胞的抑制生长作用。另取实验后的细胞盖片,经 95% 的酒精固定,HE 染色后,在光镜下随机数 2000 个细胞,计算出核分裂指数(%),重复实验 2 次以上进行分析。

1.4.2 中药对肠癌细胞的细胞毒作用:采用 MTT 比值法,取对数生长期的结肠癌细胞,制成 1×10⁵/ml 的细胞悬液。接种于 96 孔板上,每孔 0.2ml,实验共 6 组,另加最大释放组,每组 5 个复孔,置 37℃ 5%CO₂ 培养箱中培养 24 小时后,吸弃培养液,按组别换入不同浓度的中药培养液。药物作用 24 小时后,吸弃原培养液,加入 MTT 200μl/孔(10mg/ml),37℃ 孵育 4 小时后,吸弃上清液,加入 DMSO 200μl/孔。室温中放半小时后,在酶联免疫测定仪上检测吸光度 A 值,工作波长为 492nm,重复实验 2 次以上进行分析。

1.4.3 中药对细胞集落形成率的影响:取对数生长期的细胞,将细胞制成 1000 个/ml 的细胞悬液,取

1 浙江省肿瘤研究所,杭州市半山桥广济路 38 号(310022)

2 浙江省中医药研究院

收稿日期:2002-11-04;修回日期:2003-01-16

0.4ml(400 个细胞/皿)置培养皿中,再加 5ml 培养液。37℃ CO₂ 培养箱中培养 48 小时后弃去原培养液。按组别加入不同的药液,再培养 24 小时,弃去药液,用 H.K 液洗 2 遍后换入常规培养液,继续培养 12 天。取出后用 H.K 液洗、甲醇固定液固定 10 分钟后瑞氏染色。显微镜下观察其集落形成率。由 50 个以上细胞组成的细胞团计为 1 个集落,经重复实验 2 次以上,细胞集落形成率(CFE)按以下公式计算:

$$CFE = \frac{\text{每皿形成的集落数}}{\text{每皿接种的细胞数}} \times 100\%$$

1.4.4 流式细胞仪测定细胞 DNA 含量、细胞周期及细胞凋亡:消化收集实验后的各组 3 瓶细胞,用磷酸缓冲液(PBS)洗涤,用 75% 的冷乙醇在旋转混悬器上缓滴,使其充分分散呈单个细胞。放 4℃ 冰箱过夜。测定时离心弃去乙醇,用 PBS 液洗一次后加入 PI,染色 30 分钟后,上流式细胞仪进行 DNA 含量、细胞周期及细胞凋亡分析。结果用 Modfit 1.0 软件分析。

1.4.5 统计学处理:组间比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 中药对肠癌细胞生长和核分裂指数的影响:随着中药浓度的增高,活细胞和核分裂指数下降,以中药长必安加 5-Fu 联合作用后的细胞数下降最为明显(图略)。

2.2 中药对肠癌细胞的细胞毒作用:细胞自然杀伤率随药物浓度的增高和药物作用时间的延长而增加,中药长必安加 5-FU 联合用药时,在药物作用 24 小时的细胞杀伤率是阳性对照组(5-FU)的 1.5 倍(图略)。

从表 1 可见,对 HCe-8693 细胞作用 24 小时后,各组 OD 值经统计学比较无显著性差异,作用 48 小时后,高浓度组、阳性对照组及联合用药组与阴性对照组及低、中浓度组比较差异有显著性(*P* 均 < 0.01)。

2.3 中药对肠癌细胞集落形成率的影响:细胞集落形成率结果表明,细胞集落的形成随中药浓度的增高而下降,联合用药时细胞均抑制生长,无集落形成。

2.4 流式细胞仪检测中药对肠癌细胞周期改变及细胞凋亡情况的影响:从表 2 可见,经不同浓度的中药处理 HCe-8693 24 小时后,细胞周期分析可见 G₀-G₁ 期的细胞百分率随中药浓度的增高而逐渐下降,而 G₂+M 期的细胞百分率逐渐增高,尤以联合用药组的 G₂+M 期细胞百分率升高更为明显。细胞凋亡结果分析表明,细胞凋亡现象也随中药长必安的浓度增高而凋亡率升高,而联合用药组的凋亡率高于阳性对照组的

表 1 中药对 HCe-8693 细胞的抑制作用(OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	24 小时	48 小时
阴性对照组	5	0.033±0.021	0.089±0.036
低浓度长必安组	5	0.027±0.003	0.074±0.031
中浓度长必安组	5	0.025±0.009	0.061±0.015
高浓度长必安组	5	0.023±0.001	0.027±0.013*△
阳性对照组	5	0.023±0.004	0.016±0.005*△
联合用药组	5	0.017±0.005	0.020±0.001*△

与阴性对照组比较, * *P* < 0.01; 与低中浓度中药组比较, △ *P* < 0.01

表 2 对 HCe-8693 细胞周期的影响(%)

组别	细胞周期时相		
	G ₀ -G ₁	S	G ₂ +M
阴性对照组	66.26	30.83	2.90
低浓度长必安组	63.06	27.82	9.12
中浓度长必安组	63.15	28.93	7.93
高浓度长必安组	57.01	31.95	11.04
阳性对照组	47.96	25.42	26.62
联合用药组	40.95	31.88	27.17

1.5 倍,充分显示了中药长必安协同并增强了 5-FU 诱导肠癌细胞凋亡的作用。

3 讨论

应用传统中医药治疗人类肿瘤或中西医结合抗肿瘤的体内外研究已有许多报道^[1~5]。本研究观察了复方长必安浸膏溶液对人盲肠未分化腺癌细胞的影响。复方长必安浸膏主要由鳖甲、龟甲、黄芪、白术、川芎等 7 味中药组成,抗大肠癌的体内外实验已证实,鳖甲对肠癌细胞有明显的抑制增殖和抗肿瘤转移作用,且能提高免疫功能^[6,7]。龟甲具有提高虚证患者免疫功能的作用。

为探讨中药长必安抗人肠癌细胞的作用机理,我们分别采用了不同浓度的复方浸膏溶液,作用于体外培养的人盲肠未分化腺癌细胞系进行了实验研究,同时用 5-Fu 作为阳性对照。我们的研究结果显示,从活细胞计数、核分裂指数、MTT 细胞自然杀伤率及细胞集落形成率方面,中药长必安对人盲肠腺癌细胞系均有抑制细胞生长的作用,这种生长抑制作用在一定范围内与时间和浓度呈正相关,并以联合用药对肠癌细胞的抑制作用更为明显。流式细胞仪测定细胞内 DNA 含量、细胞周期及细胞凋亡结果表明,不同浓度的中药作用于细胞 24 小时后, G₂+M 期细胞随中药浓度的增高细胞百分率明显上升,联合用药时, G₂+M 期细胞百分率升高更为明显。该中药主要是阻滞细胞周期中 G₂+M 时相细胞,减少进入 G₀/G₁ 时相的细胞。细胞凋亡现象也随中药长必安的浓度增高而凋亡率升

高,联合用药组的凋亡率明显高于阳性对照组。充分显示了中药长必安协同并增强了 5-FU 诱导肠癌细胞凋亡的作用。

近年来许多研究表明药物可诱导肿瘤细胞凋亡^[8~11],而诱导凋亡是其抗肿瘤的重要机制之一。寻找一种具有协同并增强抗肿瘤药物作用的中药,将有助于提高肠癌患者的疗效。我们的研究将为临床上应用中药长必安复方制剂治疗肠癌患者提供依据。

参考文献

- 1 杨惠玲,汪雪兰,吴义方,等.小柴胡汤对荷瘤鼠 S₁₈₀ 细胞生长和结构影响的研究.中国病理生理杂志,1998,14(3):278-281.
- 2 周林,艾中立,刘志芳,等.复方苦参水溶液体外对人结肠癌细胞 SW480 的影响.癌症,2000,19(4):337-340.
- 3 许相儒,蒋征恺.苦参及其生物碱抗肿瘤活性研究进展.中国中西医结合杂志,1998,18(5):314-316.
- 4 沈汉澄,杨锋,沈翔,等.长必安胶囊抗肿瘤及抗肿瘤血道转移的实验研究.浙江中医杂志,1999,34(2):81-82.
- 5 钱丽娟,许沈华,陈旭峰,等.鳖甲浸出液对人肠癌细胞(HR-8348)的毒性作用研究.中国肿瘤临床,1995,22(2):146-149.
- 6 许沈华,钱丽娟,牟瀚舟,等.鳖甲粉对裸鼠载瘤肠癌治疗作用的初步研究.科技通报,1993,9(2):104-107.
- 7 沈汉澄,杨锋,沈翔,等.中药复方长必安胶囊对荷瘤小鼠免疫功能影响的实验研究.浙江中医杂志,1999,34(3):124-125.
- 8 涂水平,吴裕忻.细胞凋亡与胃肠肿瘤.国外医学肿瘤学分册,1995,22(1):7-10.
- 9 彭心昭,沈忠英,黎妙娟,等.平阳霉素诱导人食管癌细胞 EC-8712 凋亡的研究.癌症,1999,18(6):657-660.
- 10 陈宏,张振书,张亚力.姜黄素诱导 LOVO 细胞凋亡.中国中医基础医学杂志,1999,5(3):32-34.
- 11 杨骅,王仙平,郁琳琳,等.榄香烯抗癌作用与诱发肿瘤细胞凋亡.中华肿瘤杂志,1996,18(5):169-171.

辨证治疗药物流产后阴道出血 66 例

李伟萍* 张卫新*

米非司酮配伍米索是抗早孕的一种安全高效的方法,具有痛苦小、对人体损伤轻等优点,深受患者欢迎。其终止孕 7 周内早孕的成功率在 93%~95% 左右,但与人工流产相比,存在着完全流产率相对较低及出血时间较长的不足。鉴于药物流产尚有少部分患者达不到完全流产,会因阴道流血多或淋漓不净而需清宫,为避免患者刮宫之苦,我们自 1998 年以来,对 66 例给予米非司酮配合米索前列醇药物流产后阴道出血 15 天以上的患者进行辨证治疗,取得了满意的效果,现报告如下。

1 一般资料

66 例均为门诊病例,经妇产科检查、尿妊娠测试阳性、B 超检查证实为宫内妊娠,停经 56 天以内的健康妇女,并且 3 个月内无药物流产史,无药物流产禁忌症者。年龄 20~42 岁,平均年龄 31 岁。给予米非司酮配伍米索前列醇药物流产后,B 超复查证实胎囊已排出,但临床主要表现为阴道出血淋漓不净在 15 天以上,最长的为 36 天。

2 治疗方法

66 例分为以下 3 型。

气血虚亏(26 例):症见阴道出血量多或淋漓不净,色淡质稀,伴疲倦乏力,面色无华,舌质淡,苔薄白,脉细弱。治宜益气养血、固摄止血,方选归脾汤合乌贼骨丸加减。药用:黄芪、党参、白术、炙甘草、当归、白芍、阿胶、煅龙骨、煅牡蛎、乌贼骨、茜草、大黄炭、炮姜、益母草等。

虚实夹杂(34 例):症见阴道出血时多时少,血紫暗有瘀块,少腹时有隐痛,面色少华,头晕乏力,稍动则腰酸,舌质红,苔薄

白,脉弦细。治宜益气补肾,化瘀止血,方选圣愈汤合生化汤加减。药用:黄芪、党参、白芍、龟甲、山茱萸、续断、焦黄柏、桃仁、红花、泽兰叶、蒲黄炭、大黄炭、制香附等。

热毒瘀滞(6 例):症见阴道出血较多,色鲜红有腥臭味,并夹有瘀块,小腹胀痛,大便秘结,舌质红,苔薄白,脉弦滑。治宜清热解毒,活血化瘀,方选红藤煎合生化汤加减。药用:红藤、焦黄柏、蒲公英、白花蛇舌草、牡丹皮、金银花、桃仁、益母草、制大黄、仙鹤草、延胡索、当归、山楂等。据临床表现不同,辨证施治,每日 1 剂,早晚分服,7 天为 1 个疗程。治疗期间停用其它药物。

3 治疗结果

疗效标准:痊愈:临床症状、体征全部消失,实验室检查尿妊娠测试阴性,B 超检查属正常子宫附件声像图。好转:临床症状、体征基本消失,但未作尿妊娠测试以及 B 超检查。未愈:临床症状、体征未改善。

治疗结果:痊愈 40 例,占 60.61%。好转 26 例,占 39.39%,总有效率为 100%,其中服药 3 剂内血止者 15 例。

4 病案举例

叶某某,女,28 岁,2001 年 11 月 16 日初诊。药物流产后阴道不规则出血 23 天,子宫附件 B 超检查提示宫腔内有 10mm×9mm×7mm 不规则液性暗区,考虑为不全流产。患者因畏惧清宫术,转来我科要求中药治疗。诊见阴道出血淋漓不净,色鲜红夹有小瘀块,下腹时有隐痛,乏力腰酸易于疲劳,舌质红,苔薄白,脉濡细。证属虚实夹杂,瘀血留滞,治拟益气补肾,活血化瘀。药用:炙黄芪、龟甲、山茱萸、乌贼骨、茜草、大黄炭、蒲黄炭、续断、鸡血藤、益母草、仙鹤草、紫草、丹参。服药 1 剂,出血量增多,并有瘀块排出,服 2 剂出血量减少,3 剂血止。上方随症加减继服 5 剂,阴道出血完全停止。

* 浙江省遂昌县中医院,遂昌县妙高镇公园路 127 号 (323300)

收稿日期:2003-10-27