

方药研究

参葵汤对卵巢癌患者新鲜实体瘤细胞及
细胞株 Tyk-nu 细胞增殖的影响

张 军* 程建新* 单保恩* 石文成*

摘要 目的:研究参葵汤对卵巢癌细胞增殖的影响。方法:应用中药血清药理学方法制备含参葵汤大鼠血清,应用氚(³H)掺入法观测含药血清对卵巢癌新鲜实体瘤细胞增殖的影响,应用流式细胞仪、细胞活力测定、细胞生长曲线测定、细胞集落形成率测定的方法检测了含药血清对卵巢癌细胞株 Tyk-nu 细胞增殖的影响。结果:³H 掺入法检测结果显示,含药血清可抑制卵巢癌新鲜实体瘤细胞的增殖,抑制率随含药血清浓度的增高而增高;流式细胞仪、细胞活力、细胞生长曲线、细胞集落形成率测定结果显示,含药血清可抑制卵巢癌细胞株 Tyk-nu 细胞增殖,抑制率随含药血清浓度的增高而增高。结论:含参葵汤大鼠血清可抑制卵巢癌新鲜实体瘤细胞及卵巢癌细胞株 Tyk-nu 细胞的增殖。

主题词 卵巢肿瘤/中医药疗法 细胞分裂/药物作用 @ 参葵汤

Effects of Shenkui Decoction on Proliferation of Ovarian Cancer Fresh Parenchymatous Tumor Cells and Ovarian Cancer Cell Line Tyk-nu Cells

Zhang Jun, Cheng Jianxin, Shan Baoen, et al.

(The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011)

Objective: To observe effects of Shenkui Decoction on proliferation of ovarian cancer cell. **Methods:** The Shenkui Decoction-containing rat serum was prepared by using TCM serum pharmacological method, and effects of the drug-containing serum on proliferation of ovarian cancer fresh parenchymatous tumor cells were investigated with ³H incorporation method, and effects of the drug-containing serum on proliferation of ovarian cancer cell line Tyk-nu cells were investigated by flow cytometry, cellular activity assay, cellular growth curve assay and cell colony formation rate assay. **Results:** The drug-containing serum could inhibit proliferation of both fresh parenchymatous tumor cells and ovarian cancer cell line Tyk-nu cells, and the inhibitory rate raised with the increase of drug-containing serum content. **Conclusion:** The Shenkui Decoction-containing rat serum can inhibit proliferation of ovarian cancer fresh parenchymatous tumor cells and ovarian cancer cell line Tyk-nu cells.

Key Words Ovarian cancer/TCM therapy; Cell division/drug action; @Shenkui Decoction

本研究应用血清药理学、细胞学等实验方法,探讨扶正祛邪方药参葵汤扶正培本、抗癌祛邪的作用机制。

1 材料

1.1 药物:参葵汤药味组成:苦参 20g,龙葵 30g 为君药,山慈菇 20g,墓头回 20g,莪术 6g 等为臣药,黄芪 30g,女贞子 20g,当归 12g 等为佐药,甘草 6g 为使药。全方共 12 味中药,每剂 327g,加水 500ml,普通方法煎制。终浓度为含生药 1.635g/ml,3.27g/ml,6.54g/ml 3 个浓度,分别称为低、中、高浓度。

1.2 实验动物:雄性 SD 大鼠体重(300±10)g,一级动物,河北医科大学实验动物中心提供。

1.3 细胞株:人卵巢癌细胞株 Tyk-nu 细胞由河北医

科大学第四医院单保恩教授惠赠。

1.4 研究对象:39 例均为 2001 年 10 月~2002 年 10 月在我院治疗并经病理证实的卵巢癌患者,平均年龄(47.2±13.2)岁,其中浆液性癌 14 例,黏液性癌 4 例,子宫内膜样癌 9 例,性索间质癌 3 例,生殖细胞癌 2 例,转移性腺癌 7 例。

2 方法

2.1 含参葵汤大鼠血清的制备:SD 大鼠 24 只,随机分为 4 组,分别于空腹时灌服生理盐水及不同浓度的中药汤剂 2ml,中药剂量分别相当于临床等效剂量及等效剂量的 2 倍、4 倍^[1],连续灌服 10 天,于末次给药后 1 小时股动脉取血,静置 30 分钟后,2000r/min 离心 10 分钟取血清,将同组大鼠血清混合,56℃水浴灭活 30 分钟,微孔滤膜除菌,所制得血清简称空白血清及低、中、高浓度含药血清^[2]。

2.2 不同浓度含药血清培养基的配制:所制得空白血清,低、中、高浓度含药血清加入每分转数指示器

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(302545),河北省科学技术研究与发展计划项目(02276103D-05)

* 河北医科大学第四医院妇产科,科研中心,中医科,石家庄市健康路 12 号(050011)

收稿日期:2004-01-09;修回日期:2004-02-25

(RPMI1640)中,使血清的浓度为20%。

2.3 含参葵汤大鼠血清对卵巢癌患者新鲜实体瘤细胞增殖的影响:卵巢癌患者手术中无菌取癌组织块 1cm^3 ,剪成 1mm^3 大小,经过胰酶消化,细胞筛过滤,Hank's清洗后,加入配制的培养基,调整细胞浓度为 $5 \times 10^5/\text{ml}$ ^[3]。加入96孔培养板中,每孔 $190\mu\text{l}$,每种血清设3个复孔。于 37°C 、5% CO_2 、100%湿度下培养60小时后,每孔加入 ^3H 标记的胸腺嘧啶核苷(^3H -TdR) $10\mu\text{l}$,继续培养12小时,将细胞收集到玻璃纤维滤纸上,利用同位素计数仪计数 ^3H 的1分钟放射脉冲量(cpm值),用来表示细胞活力。

2.4 含参葵汤大鼠血清对卵巢癌细胞株 Tyk-nu 细胞增殖的影响

2.4.1 流式细胞仪观测细胞增殖:利用配制的培养基调整 Tyk-nu 细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$,置于培养瓶中,每组6个样本,培养72小时,胰酶消化,离心收集 3×10^5 个细胞,PBS清洗,70%乙醇固定,PBS洗去固定液,采用溴化乙锭一步插入法进行细胞DNA染色,FACA-420型流式细胞仪检测DNA含量。利用B.D公司提供的DNA单组方图统计软件进行资料处理,计算细胞增殖指数(PI值)。

2.4.2 细胞活力测定:利用配制的培养基调整 Tyk-nu 细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$,加入96孔培养板中,每组设6个复孔,培养48小时后,台盼蓝计数法进行活细胞计数。细胞活力=活细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

2.4.3 细胞集落形成率测定:利用配制的培养基调整 Tyk-nu 细胞浓度为 $1 \times 10^3/\text{ml}$,加入24孔培养板中,每组设6个复孔,培养72小时后,Giemsa染色,计形成的集落数。集落形成率=集落数/ $10^3 \times 100\%$ 。

2.4.4 细胞生长曲线测定:利用配制的培养基调整 Tyk-nu 细胞浓度为 $3 \times 10^5/\text{ml}$,加入96孔培养板中,每组设24个复孔,每日每组各取3孔细胞计数,取均值描生长曲线,共8天。

2.5 统计学方法:采用SPSS 8.0统计学软件进行方差分析。

3 结果

3.1 含参葵汤大鼠血清对卵巢癌实体瘤细胞增殖的影响:表1示,各含药血清组细胞增殖cpm值明显低于空白血清组cpm值($P < 0.05$),而各含药血清组间cpm值比较亦有显著差异($P < 0.05$)。由此可见,随含药血清浓度的增高,反映癌细胞增殖状况的cpm值有下降趋势。

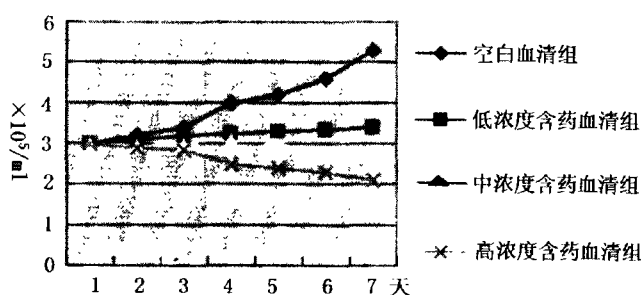
3.2 含参葵汤大鼠血清对卵巢癌 Tyk-nu 细胞增殖的影响:表2示,流式细胞仪分析结果表明,低、中、高

浓度组血清处理的细胞,PI降低,与空白血清组比较差异有显著性($P < 0.05$);细胞活力测定结果显示,各血清组间细胞活力差异均有显著性($P < 0.05$),随血清浓度的增高,细胞活力有下降趋势;细胞集落形成率测定结果表明,各含药血清组 Tyk-nu 细胞的集落形成率明显低于空白血清组($P < 0.05$)。细胞生长曲线测定结果显示,Tyk-nu 细胞受含药血清作用后,生长速度与对照组相比呈现降低趋势,见附图。

表1 各血清组卵巢癌新鲜实体瘤细胞增殖的cpm值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	cpm值
空白血清组	39	528.65 ± 36.05
低浓度含药血清组	39	$459.06 \pm 38.69^*$
中浓度含药血清组	39	$392.27 \pm 39.26^{* \Delta}$
高浓度含药血清组	39	$321.05 \pm 33.03^{* \Delta \blacktriangle}$

*与空白血清组比较, $P < 0.01$; Δ 与低浓度含药血清组比较, $P < 0.01$; $\blacktriangle$ 与中浓度含药血清组比较, $P < 0.05$



附图 不同血清组 Tyk-nu 细胞生长曲线

4 讨论

卵巢癌属于中医学“石瘕”、“症瘕”的范畴,近年来发病率呈上升趋势,其5年生存率只有30%左右,单纯采用西医治疗有诸多弊端,如术后易复发,化疗易发生耐药性等。我们采用扶正祛邪方药参葵汤配合西医疗法治疗卵巢癌。参葵汤以苦参、龙葵为君药,清热解毒,利湿消肿;以山慈菇、墓头回等为臣药,破血散结,助主药攻毒;以黄芪、女贞子等为佐药,益气养血。本研究通过体外实验研究参葵汤对卵巢癌新鲜实体瘤细胞增殖的影响,相当于其体外的药敏实验,能直接了解癌细胞对抗癌药的敏感性,使实验结果更具说服力^[3]。并且本研究还观测了该方对卵巢癌细胞株 Tyk-nu 细胞增殖的影响,使研究的结果具有普遍意义。复方中药多数是通过口服起作用,用中药粗制剂直接加入离体反应系中进行实验,中药的杂质成分、各种电解质、酸碱度等会对细胞的生长造成一定的影响,有些中药成分并不能吸收入血或经体内代谢后失活或药物本身无作用,但其代谢产物却可发挥作用,从而影响了实验结果的可靠性^[2]。而采用血清药理学的实验方法则可以排

表 2 各血清组 Tyk-nu 细胞增殖情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PI	细胞活力(%)	细胞集落形成率(%)
空白血清组	6	25.99 $\pm$ 0.80	95.00 $\pm$ 2.01	90.12 $\pm$ 3.27
低浓度含药血清组	6	24.81 $\pm$ 0.49*	86.12 $\pm$ 2.31*	81.09 $\pm$ 3.18*
中浓度含药血清组	6	23.54 $\pm$ 0.58*△	73.10 $\pm$ 4.02*△	69.28 $\pm$ 2.69*△
高浓度含药血清组	6	21.40 $\pm$ 0.48*△▲	59.21 $\pm$ 4.53*△▲	54.36 $\pm$ 2.52*△▲

与空白血清组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与低浓度含药血清组比较,△ $P < 0.01$;与中浓度含药血清组比较,▲ $P < 0.01$

除上述因素的干扰^[4,5]。本研究采用与人消化吸收功能相近的大鼠制备含药血清,并严格设立了空白血清对照组,使实验具备了较强的科学性。本实验主要观测了含参葵汤大鼠血清对卵巢癌新鲜实体瘤细胞和细胞株 Tyk-nu 细胞增殖的影响。结果表明,含药血清可在一定程度上抑制卵巢癌新鲜实体瘤细胞的增殖,随含药血清浓度的增高,抑制率有增高的趋势。这表明含参葵汤血清确实一定程度上抑制了卵巢癌细胞的增殖,且随含药血清浓度的增高,癌细胞生长抑制率亦相应增高。提示手术化疗与扶正祛邪中药联合应用具有互补增效作用,可能有利于控制复发率及远处转移,参葵汤对卵巢癌的治疗有一定的作用,有待今后继续扩大病例进一步随访观察。参葵汤对卵巢癌细胞株 Tyk-nu 细胞增殖影响的实验结果表明,流式细胞仪检测显示,随含药血清浓度增高,Tyk-nu 细胞的 PI 指数下降,表明细胞的 DNA 合成被抑制,细胞被阻滞在 G₀/G₁ 期,

而 S 和 G₂/M 期的细胞减少,从而抑制了肿瘤的生长。细胞活力、细胞生长曲线、细胞集落形成率测定结果显示,与空白血清组细胞比较,含药血清组细胞的增殖受到了不同程度的抑制,含药浓度越高,抑制率越高。这表明参葵汤经口服有效成分入血后,可在一定程度上抑制卵巢癌细胞株 Tyk-nu 细胞增殖,为传统中药治疗卵巢癌提供了一定的理论依据,但本药通过何种途径抑制卵巢癌细胞增殖尚需进一步探讨。

参考文献

- 1 陈奇.中药药理研究方法学.北京:人民卫生出版社,1994:33.
- 2 周明眉,杨奎,姜远平,等.中药血清药理学的方法学研究.中药药理与临床,1999,15(3):43~44.
- 3 司徒镇强.细胞培养.西安:世界图书出版公司,1996:69,136~137.
- 4 李仪奎.中药血清药理学实验方法的若干问题.中药新药与临床药理,1999,10(2):95~98.
- 5 马骏,唐灿,李增强,等.中药血清药理学的方法学研究.中药药理与临床,1999,15(3):44~45.

中华中医药学会继续教育部 中医杂志社 北京东方中医药培训中心 第四届全国名老中医治疗疑难病经验专修班

招 生 通 知

中医杂志社北京东方中医药培训中心,依托中华中医药学会、中国中医研究院在科研、临床、教学及学术上所具有的独特优势,采取以面对面的讲座形式直接传授名老中医的临床经验,拟于 2005 年举办“第四届全国名老中医治疗疑难病系列高级专修班”。北京东方中医药培训中心将以其良好的信誉,诚邀广大医务工作者前来学习与交流。

1. 2005 年 5 月 10 日~5 月 15 日“全国手穴诊疗培训班”。主讲内容:以望诊、触诊、压诊的手穴诊病方法,数分钟可概知家族遗传性疾病及自身健康状况,方法独特,直观明了,易学易用。主讲人:刘浩兴教授。2. 2005 年 5 月 26 日~31 日“全国中医治疗常见病、多发病高级培训班”。主讲内容:三高症、气管炎、急性肠胃炎、失眠等。主讲人:林兰、徐幼卿、李国勤、韩学杰等教授。3. 2005 年 6 月 6 日~11 日“全国中医治疗风湿病高级专修班”。主讲内容:强直性脊柱炎、类风湿性关节炎、骨性关节炎、脉痹、痛风的治疗方法经验等。主讲人:房定亚、周乃玉、闫小萍等教授。4. 2005 年 6 月 25 日~30 日“中西医结合治疗肾病高级专修班”。主讲内容:治疗肾病的最新方法、进展及名老中医经验与专方传授。5. 2005 年 8 月 25 日~30 日“全国不孕不育症高级专修班”。主讲内容:急慢性前列腺炎、男性内分泌疾病、男性功能障碍、月经失调、女性不孕症等。主讲人:王琦、李曰庆、蔡莲香、沈明秀等教授。6. 2005 年 9 月 8 日~13 日“全国中西医结合治疗肝病、肿瘤高级专修班”。主讲内容:慢性重型肝炎、乙型肝炎、黄疸、脂肪肝等。主讲人:汪承柏、沈绍功、陈立华、韩学杰等教授。7. 2005 年 10 月 15 日~20 日“全国中西医结合治疗心血管病、脑病高级专修班”。主讲内容:心律失常、老年性痴呆、肺心病、高血压等。主讲人:谢海洲、沈绍功、周玉萍、罗侃等教授。8. 2005 年 10 月 28 日~11 月 2 日“中西医结合治疗糖尿病、肾病高级专修班”。主讲内容:临床常见的糖尿病并发症、慢性肾炎等。主讲人:林兰、王洪忠等教授。

以上各班第 1 天为报到时间,报到时需交 3 张 1 寸免冠照片。每班每人学费 880 元。欲参加学习者请将报名费 10 元和个人基本情况及联系方法寄回,我中心收到报名费后即做排名安排,在开班前 1 个月内发入学通知书。学习结业后颁发中英文对照结业证书(盖钢印)和国家继续教育学分证书(16 学分)。凡参加学习班学员的优秀论文,符合标准者,《中医杂志》将优先发表或在当年增刊中发表。

联系地址:北京东城区南小街 16 号中国中医研究院内中医杂志社东方中医药培训中心,邮政编码:100700,联系电话:(010)64013009,传真:(010)64050201,联系人:梅丽。学习地点:中国中医研究院内。