

补肾化瘀解毒复方含药血清对肺癌 A549/DDP 耐药细胞周期的影响

曹 勇 钟安朴 陈 璐 李 亮 许林利

(暨南大学医学院中医系, 广东省广州市黄埔大道西601号, 510632)

[摘 要] **目的** 探讨补肾化瘀解毒复方含药血清对肺癌耐药细胞周期的影响。**方法** 采用血清药理学及流式细胞法, 分析补肾化瘀解毒复方含药血清分别与顺铂(DDP)和维拉帕米(VRP)合用后A549/DDP耐药细胞周期的变化。**结果** 补肾化瘀解毒复方含药血清均能明显增加A549/DDP耐药细胞G₀/G₁期细胞数, 减少S期和G₂/M期的细胞比例($P < 0.05$)。**结论** 补肾化瘀解毒复方含药血清能使A549/DDP耐药细胞阻滞于G₀/G₁期, 协同增强DDP和VRP阻止A549/DDP耐药细胞DNA的合成, 抑制肺癌耐药细胞的分裂增殖。

[关键词] 补肾化瘀解毒方; 细胞周期; 肺癌耐药细胞

Effect of Chinese Medicine Containing Serum on Cell Cycle of Drug-resistant Lung Cancer Cells A549/DDP

CAO Yong, ZHONG An-pu, CHEN Lu, et al.

(Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632)

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of serum containing Recipe of Reinforcing Kidney, Dissolving Stasis and Removing Toxins(RRDR) on the cell cycle of drug-resistant lung cancer cells. **Methods** Serum pharmacology and flow cytometry methods were used to analyze the effect of combination of medicine containing serum with cisplatin(DDP) and verapamil(VRP) respectively on the cell cycle of drug-resistant lung cancer cells A549/DDP. **Results** The medicine containing serum could significantly increase the A549/DDP cells in G₀/G₁ phase and lower the cell ratio of S and G₂/M phases ($P < 0.05$). **Conclusion** The Serum containing RRDR is able to inhibit the growth of A549/DDP drug-resistant cells in the G₀/G₁ phase, and enhance DDP and VRP to prevent A549/DDP cells from DNA synthesis, and inhibit the division proliferation of drug-resistant lung cancer cells.

Key Words Recipe of reinforcing kidney, dissolving stasis and removing toxins; Cell cycle; Drug-resistant lung cancer cells

既往研究表明, 补肾化瘀解毒复方对动物移植性肿瘤有抑瘤和化疗增效作用, 其水煎浓缩剂荷瘤动物药物血清具有抑瘤和化疗增敏、增效作用, 并能抑制肺癌耐药细胞耐药基因LRP的表达和耐药细胞钙通道活性, 减少耐药细胞对化疗药物顺铂(DDP)的外排^[1,2]。为进一步明确补肾化瘀解毒复方对肺癌耐药逆转的作用机理, 本研究观察了补肾化瘀解毒复方含药血清对肺癌A549/DDP耐药细胞周期的作用, 报告如下。

1 材料

1.1 药物

补肾化瘀解毒复方醇提取物的制备, 取中药补肾化瘀解毒复方(肉桂、莪术各75g, 补骨脂、大黄、全瓜蒌、葶苈子、粉防己各50g)饮片粉碎后用90%乙醇溶液浸泡, 3小时后回流过滤, 再将残渣提取2次, 合并提取液, 置沸水浴中挥尽乙醇浓缩至膏状, 然后溶于含2%二甲基亚砜(DMSO)0.05mol/L、pH 6.5的磷酸缓冲液

中, 制成每毫升相当于2g原生药的溶液, 装入灭菌瓶, 置4℃冰箱备用。DDP, 锦州九泰药业有限公司生产(10mg/瓶, 批号: 050502); 青霉素, 哈药集团制药总厂生产(100万U/瓶, 批号: 0101002); 链霉素, 华北制药股份有限公司生产(100万U/瓶, 批号: 0101002); 维拉帕米(VRP), 上海禾丰制药有限公司生产(2ml/5mg, 批号: 4E12001)。

1.2 动物

SPF级C57BL/6J小鼠80只, 体重20~22g, 中山大学实验动物, 合格证号: 0008555, SCXK(粤)2004-0011, 粤监证字2004A086。

1.3 瘤株

Lewis肺癌, 由广州中医药大学肿瘤研究所提供。人肺腺癌耐药细胞系A549/DDP, 由第三军医大学新桥医院呼吸病研究所吴国明教授惠赠。

1.4 主要试剂及仪器

RPMI-1640细胞培养液, GIBCO。胎牛血清, 杭州四季青。胰蛋白酶, Amersco公司。超净工作台, 苏州净化设备有限公司。CO₂孵箱, Thermo Forma。96孔平底细胞培养板, Corning。FACSCalibur流式细胞仪, 美国

基金项目: 广东省科技计划项目(2006A01001) 广东省中医药管理局项目(2040030), 暨南大学自然科学基金资助项目(692001)

通讯作者: 曹勇, tcaoy@163.com, (020) 85228016

Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Beckman-Coulter 公司。倒置显微镜, Nikon。电子天平 (FA 2004型), Sartorius (德国)。

2 方法

2.1 荷瘤动物含药血清制备

取健康 C57BL/6J 小鼠, 接种 Lewis 肺癌造模, 24 小时后随机分为补肾化瘀解毒复方大、中、小剂量组和模型空白对照组, 共4组, 每组20只。补肾化瘀解毒复方大、中、小剂量组分别按 30g/kg、20g/kg、10g/kg 灌胃给药 (分别为临床成人日用量的19.2倍、12.8倍和6.4倍), 模型空白对照组以等容积的生理盐水灌胃, 每天1次, 连续10天。末次灌胃1小时, 腹主动脉采血, 无菌分离血清, 经56℃ 30分钟灭活处理后, 用0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 置-20℃保存备用。

2.2 对肺癌 A549/DDP 耐药细胞周期的影响

流式细胞仪法, 参照徐萌等介绍的方法^[3]。

2.2.1 补肾化瘀解毒复方含药血清对 A549/DDP 耐药细胞周期的影响 取对数生长期的 A549/DDP 细胞, 0.25%胰蛋白酶消化计数, 以 2×10^5 /ml 量接种于培养瓶中, 37℃ 5%CO₂ 培养24小时, 至细胞生长旺盛贴壁后, 去掉培养液, 换成不含胎牛血清的培养液。而后将细胞分为荷瘤动物含药血清大、中、小剂量组, 荷瘤动物模型血清组 (模型组), A549/DDP 组 (耐药组)。大、中、小剂量组分别加入300 μl 终浓度为10%已制备的大、中、小剂量组的荷瘤动物含药血清; 模型组加入终浓度为10%已制备的荷瘤动物模型空白对照组血清300 μl; 耐药组加入10%胎牛血清300 μl, 每瓶终体积为3ml, 不足部分加以 RPMI-1640 培养液。细胞培养液于 CO₂ 培养箱中, 继续培养48小时, 然后分别离心, 用 PBS 洗涤2次, 制成细胞悬液。

收集各级 10^6 个细胞, 离心后 PBS 液洗涤, 加入冰冷的70%乙醇固定, PBS 液洗涤, 加入 PI 荧光染液 (50 μg/ml PI, 10 μg/ml RNA 酶) 4℃避光孵育30分钟, 流式细胞仪分析 DNA 荧光强度, 在流式细胞仪测定细胞的荧光强度, 资料经计算机多正态拟合分析, 得出细胞群体在细胞周期各个时相的分布比例。

2.2.2 补肾化瘀解毒复方含药血清与 DDP 合用对 A549/DDP 耐药细胞周期的影响 细胞培养同上。而后将细胞分为模型组、DDP 组、DDP 加大、中、小剂量组。DDP 加大、中、小剂量组分别同时加入300 μl 终浓度为10%已制备的剂量组荷瘤动物含药血清和恒定浓度为1 μg/ml 的 DDP 各300 μl; 模型组加入终浓度为10%已制备的荷瘤动物模型空白对照组血清300 μl, DDP 组只加入终浓度为1 μg/ml 的 DDP 300 μl。细胞周期测定方法同上。

2.2.3 补肾化瘀解毒复方含药血清与 VRP 合用对 A549/DDP 耐药细胞周期的影响 细胞培养同上。而后将细胞分为模型组、VRP 组、VRP 加大、中、小剂量组。VRP 加大、中、小剂量组分别同时加入300 μl 终浓度为10%已制备的大、中、小剂量组荷瘤动物含药血清和恒定浓度为10 μg/ml 的 VRP 各300 μl; 模型组加入终浓度为10%的荷瘤动物模型空白对照组血清300 μl, VRP 组只加入终浓度为10 μg/ml 的 VRP 300 μl。细胞周期测定方法同上。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件分析数据。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 *t* 检验进行组间差异显著性检验。

3 结果

3.1 补肾化瘀解毒复方含药血清对 A549/DDP 细胞周期的影响

表1示, 模型组 G₀/G₁ 期肺癌 A549/DDP 耐药细胞比例明显低于中药补肾化瘀解毒复方含药血清大、中、小剂量组 ($P < 0.01$), 大、中、小剂量组 S 期和 G₂/M 期细胞比例明显低于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与耐药组比较, 肺癌细胞 A549/DDP 大、中、小剂量组 G₀/G₁ 期比例均高于耐药组, 其差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。表明补肾化瘀解毒复方含药血清能抑制肺癌耐药细胞 A549/DDP 的增殖周期, 使细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期, 进入 S 期和 G₂/M 期的细胞减少。

3.2 补肾化瘀解毒复方含药血清与 DDP 合用对 A549/DDP 细胞周期的影响

表2示, DDP 加大、中、小剂量组的 G₂/M 期细胞比例明显低于模型组 ($P < 0.01$), S 期细胞比例以 DDP 加大、中、小剂量组尤为显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), DDP 加大剂量组不明显 ($P > 0.05$)。与 DDP 组比较, DDP 加大、中、小剂量组肺癌 A549/DDP 耐药细胞 G₀/G₁ 期比例升高、S 期比例降低, 其差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。提示补肾化瘀解毒复方含药血清与 DDP 合用后能协同增强 DDP 对肺癌 A549/DDP 耐药细胞增殖周期的抑制, 使细胞阻滞于 G₀/G₁ 期, 减少进入 S 期和 G₂/M 的细胞分布。

3.3 补肾化瘀解毒复方含药血清与 VRP 合用对 A549/DDP 细胞周期的影响

表3示, VRP 加大剂量组和中剂量组 G₀/G₁ 期细胞比例显著高于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), VRP 加大剂量组不明显 ($P > 0.05$)。S 期细胞只有 VRP 加大剂量组明显低于模型组 ($P < 0.05$), 而 VRP 加大、中、小剂量组与模型组无显著差异。

表1 补肾化瘀解毒复方含药血清对 A⁵⁴⁹/DDP 细胞周期的影响(%,*x*±*s*)

组别	样本数	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
模型组	5	43.45±8.04	49.09±5.32	7.41±1.09
耐药组	5	47.02±3.03	47.07±4.12	6.09±2.08
大剂量组	5	71.66±6.21**△	23.71±4.85**△	4.77±0.52**
中剂量组	5	69.53±3.34**△	26.38±4.82**△	4.24±0.16**
小剂量组	5	69.23±2.38**△	25.29±1.12**△	5.45±0.82*

与模型组比较,**P*<0.05,***P*<0.01;与耐药组比较,△*P*<0.01

表2 补肾化瘀解毒复方含药血清与 DDP 合用对 A⁵⁴⁹/DDP 细胞周期的影响(%,*x*±*s*)

组别	样本数	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
模型组	5	49.81±9.78	42.06±3.76	9.87±1.15
DDP 组	5	47.02±3.03	47.07±4.12	6.09±2.08
DDP 加大剂量组	5	60.67±4.37△△	33.77±9.06△	5.74±0.23**
DDP 加中剂量组	5	64.67±9.21**△	31.81±2.27**△△	4.33±0.65**
DDP 加小剂量组	5	62.40±6.26**△△	32.24±6.51*△△	5.39±0.96**

与模型组比较,**P*<0.05,***P*<0.01;与 DDP 组比较,△*P*<0.05,△△*P*<0.01

表3 补肾化瘀解毒复方含药血清与 VRP 合用对 A⁵⁴⁹/DDP 细胞周期的影响(%,*x*±*s*)

组别	样本数	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
模型组	5	51.71±9.12	37.94±9.30	11.02±4.82
VRP 组	5	52.63±9.57	39.13±5.92	8.31±2.36
VRP 加大剂量组	5	69.95±4.17**△△	26.56±5.33**△	3.69±0.48*△
VRP 加中剂量组	5	65.45±9.09*	30.70±7.29	3.91±0.44*△
VRP 加小剂量组	5	56.50±10.38	26.08±8.58△	17.42±2.27*△△

与模型组比较,**P*<0.05,***P*<0.01;与 VRP 组比较,△*P*<0.05,△△*P*<0.01

小剂量组与模型组差异无统计学意义(*P*>0.05)。VRP 加大、中、小剂量组 G₂/M 细胞比例与模型组、VRP 组比较差异均有统计学意义(*P*<0.05或*P*<0.01)。与 VRP 组比较,VRP 加大剂量组 G₀/G₁期、G₂/M 期细胞比例差异均有统计学意义(*P*<0.05或*P*<0.01)。提示补肾化瘀解毒复方含药血清与 VRP 合用后能协同增强 VRP 对肺癌 A⁵⁴⁹/DDP 耐药细胞增殖周期的抑制,使细胞阻滞于 G₀/G₁期,减少增殖细胞在 S 期和 G₂/M 的分布,抑制肺癌耐药细胞的增殖。

4 讨论

肺癌属于中医“肺积”、“息贲”范畴,根据肺肾相生理论与肺癌的临床特点,其形成与肾虚关系密切。正如张景岳所说:“脾肾不足及虚弱失调之人,多有积聚之病”,并且肾为气之根,肺为气之主,肺的呼吸功能正常与否与肾气的盛衰多有联系。肺朝百脉,肾气不足,邪毒犯肺,使肺气郁滞,可致肺部血行瘀阻而成积。正如《杂病源流犀烛》所说:“邪积胸中,阻塞气道,气不宣通,为痰……为血,皆得与正相搏,邪既胜,正不得制之,遂结成形而有块”。并且临床上肺癌中晚期可同见肾虚血瘀之证,故肺癌及耐药的发生与肾虚、邪毒侵袭而致气血凝滞、瘀毒互结相关,补肾化瘀解毒方则以此

为组方依据。

本实验结果显示,补肾化瘀解毒复方含药血清能使肺癌 A⁵⁴⁹/DDP 耐药细胞 G₀/G₁期细胞增加,使 S 期和 G₂/M 期的细胞减少,当补肾化瘀解毒复方含药血清分别与 DDP 和 VRP 合用后,肺癌 A⁵⁴⁹/DDP 耐药细胞 G₀/G₁期细胞显著增加,S 期和 G₂/M 期的细胞明显减少,表明补肾化瘀解毒复方含药血清能使 A⁵⁴⁹/DDP 细胞阻滞于 G₀/G₁期,减少进入 S 期和 G₂/M 期的细胞比例,进而阻止肺癌耐药细胞 DNA 的合成,抑制癌细胞的分裂增殖,并且补肾化瘀解毒复方含药血清能协同增强 DDP 和 VRP 对 A⁵⁴⁹/DDP 细胞周期增殖的抑制。

DDP 是临床治疗肺癌常用药物之一,也是肺癌最重要的抗癌药物,但是由于瘤细胞对 DDP 耐药性的产生降低了临床疗效。本研究显示,补肾化瘀解毒复方含药血清对肺癌 A⁵⁴⁹/DDP 耐药细胞增殖周期不仅有抑制作用,而且能协同增强 DDP 对肺癌 A⁵⁴⁹/DDP 耐药细胞增殖周期的抑制,使细胞阻滞于 G₀/G₁ 期,减少进入 S 期和 G₂/M 的细胞分布。

VRP 是一种钙通道阻滞剂,能抑制细胞毒性药物外排,使细胞内化疗药物浓度升高,细胞毒效应增强^[4]。研究结果显示,补肾化瘀解毒复方含药血清能协

同增强 VRP 对肺癌 A549/DDP 细胞周期增殖的抑制。研究发现,补肾化瘀解毒复方含药血清对肺癌 A549/DDP 耐药细胞具有耐药逆转作用,由此认为,补肾化瘀解毒复方含药血清抑制肺癌耐药细胞周期增殖的机理可能与增强细胞钙通道阻滞作用密切相关。

参考文献

[1]曹勇,张丹,郑广娟,等.补肾化瘀解毒方对小鼠 Lewis 肺癌作用的研究.中华实用中西医杂志,2003,16(11):1947~1949.

[2]曹勇,张丹,郑广娟,等.补肾化瘀解毒方对肺癌耐药细胞的耐药逆转及机制研究.山东中医杂志,2004,23(2):100~103.

[3]徐萌,李金瀚.肺癌耐药发生和细胞周期改变的流式细胞术分析.中华肿瘤杂志,2000,22(9):385~387.

[4]胡江文,沈振亚,颜云鹏,等.γ2干扰素与维拉帕米逆转人肺癌细胞系 HTB-56R 多药耐药及与凋亡的关系.江苏医药,2005,31(3):203~205.

(收稿日期:2007-03-05;修回日期:2007-10-16)

[编辑:邓媛]

单味中药凤尾草颗粒剂治疗慢性前列腺炎(ⅢA型)87例

单玉喜¹ 薛波新¹ 向贵² 王益² 刘兆伟² 汪意青² 邵雪峰² 张国庆³ 颜纯海¹

(1.苏州大学附属第二医院泌尿外科,江苏省苏州市三香路1055号,215004; 2.江苏省太仓市

第一人民医院泌尿外科; 3.苏州大学附属第二医院中医科)

从1999年6月至2006年12月,我们应用自制的单味中药凤尾草颗粒剂治疗慢性前列腺炎(CP)患者87例,并与41例服前列康片组对照,现报告如下。

1 临床资料

1.1 诊断及纳入标准

诊断参照卫生部颁布的《中药新药临床研究指导原则》及美国国立卫生研究院慢性前列腺炎症状积分指数(NIH-CPSI)评分的标准。基本条件为前列腺按摩液(EPS)常规镜检白细胞(WBC) > 10个/HP,前列腺液细菌培养阴性,另外有下列3项中2项的患者为研究对象:(1)尿路刺激症状:尿频、尿急、尿痛、尿不尽、尿道滴白;(2)疼痛症状:腰骶、会阴、小腹、睾丸等部位疼痛或不适;(3)性功能异常:早泄、阳痿、性欲减退。

1.2 排除标准

(1)前列腺癌、神经源性膀胱、尿道狭窄、膀胱肿瘤、膀胱结石等疾病患者;(2)有前列腺手术史者;(3)有肝肾功能损害者;(4)2周内服用其他治疗前列腺疾病药物的患者。

1.3 一般资料

所有病例均来源于苏州大学附属第二医院泌尿外科及江苏省太仓市第一人民医院泌尿外科门诊的男性患者。随机分为两组,治疗组87例,年龄22~47岁,平均(33.72±7.43)岁;病程3个月~7年。对照组41例,年龄24~50岁,平均(34.28±8.12)岁;病程3个月~10年。两组患者年龄、病程等比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

2 方法

2.1 治疗方法

治疗组患者服用凤尾草颗粒剂(每包含生药5g,由江阴天江药业公司生产,批号:0603278),每次1包,每日2次,温开水冲服,连续服用1个月。对照组患者口服前列康片(浙江康恩贝有限公司生产,批号:0306124),每次5片,每日3次,疗程为1个月。两组治疗前后进行NIH-CPSI评估及前列腺液检查,30天后统计疗效。每组治疗前、治疗结束后1~3天内测定血、尿常规及肝肾功能。

2.2 疗效判定标准

参照《中药新药临床研究指导原则》制定。临床痊愈:NIH-CPSI评分减少95%以上,EPS镜检连续两次正常;显效:NIH-CPSI评分减少60%~94%,EPS镜检WBC减少≥60%;有效:NIH-CPSI评分减少30%~59%,EPS镜检WBC减少≥30%;无效:NIH-CPSI评分减少<30%,EPS镜检WBC减少<30%。

3 结果

治疗组87例,治愈29例,显效24例,有效20例,无效10例,愈显率为60.92%,总有效率为83.91%。对照组41例,治愈5例,显效7例,有效10例,无效19例,愈显率为29.27%,总有效率为53.66%。治疗组愈显率、总有效率均优于对照组($P<0.01$)。

治疗组NIH-CPSI症状积分于治疗前的(22.16±4.92)分下降至治疗后的(9.24±3.58)分($P<0.01$);对照组NIH-CPSI症状积分于治疗前的(21.87±5.13)分下降至治疗后的(12.54±4.86)分($P<0.01$)。两组治疗后比较,治疗组在降低NIH-CPSI症状积分方面明显优于对照组($P<0.05$)。

按EPS-WBC数(0~10)、(10~20)、(20~30)、(30~40)及满视野5个等级统计治疗前后EPS-WBC的变化,两组患者治疗后EPS-WBC数均有下降。组间治疗后比较,治疗组在减少EPS-WBC方面明显优于对照组($P<0.05$)。

所有患者服药后未有明显不良反应。治疗前后血、尿常规及肝肾功能无明显改变。

4 讨论

中医学并无前列腺炎的病名,对本病的认识比较笼统,根据临床症状及体征表现,一般将其归入“淋证”、“精浊”、“白浊”等范畴。其病因病机主要是湿热蕴结下注膀胱、肾气亏损、瘀血阻滞三个方面。治疗上以清热利湿、活血化瘀、补肾泄浊为主。单味中药凤尾草颗粒剂的成分凤尾草属凤尾蕨科类植物。凤尾草生于阴湿岩壁及墙垣、石缝处,性寒味微苦,具有消肿解毒、清热利湿、凉血止血之功效。现代研究表明,凤尾草对大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉等均有较强的抑菌作用。

(收稿日期:2007-08-27;修回日期:2008-03-21)

[编辑:李长今]