

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.11.014

健脾利湿化瘀方对人前列腺癌 C4-2 细胞雄激素非依赖性生长的影响

牟睿宇, 贾英杰, 孙彬栩, 张瑶, 刘宏根, 郭姍琦, 苏畅, 邬明歆, 李文杰, 李小江*

(天津中医药大学第一附属医院, 天津市西青区昌凌路 88 号, 300381)

摘要 目的 探究健脾利湿化瘀方治疗去势抵抗性前列腺癌的可能作用机制。方法 将健脾利湿化瘀方根据药物功效拆分为扶正药、解毒药、化瘀药。实验分为全方组、扶正组、解毒组、化瘀组, 每组设 4 个药物浓度, 分别为 10、20、100、1000 mg/ml, 另设对照组 (含培养液和细胞)。在 96 孔板加入人前列腺癌 C4-2 细胞悬液 100 μ l (细胞数约 1.5×10^4 个), 培养 24 h 后根据实验分组加入不同浓度药物继续培养 48 h。采用 MTT 实验计算各组细胞抑制率。根据结果再将全方和细胞抑制率最高的拆方组中单味药物作用于 C4-2 细胞, 筛选细胞抑制率最高的单味药物。观察健脾利湿化瘀方全方和最佳单味药物分别对 C4-2 细胞在含与不含雄激素的培养基的细胞增殖情况, 计算细胞抑制率。结果 各组药物对人前列腺癌 C4-2 细胞的抑制率呈浓度依赖关系 ($P < 0.05$), 药物浓度越高, 抑制率越高, 在不同浓度药物干预下组间比较, 抑制率由高到低分别为全方组 > 化瘀组 > 解毒组 > 扶正组, 组间两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 拆方中化瘀组是最佳药物组。在最佳单味药物细胞抑制率筛选中, 细胞抑制率由高到低依次为王不留行组 > 全方组 > 大黄组 > 姜黄组 ($P < 0.05$), 提示王不留行是抑制人前列腺癌 C4-2 细胞增殖作用最佳的中药单药。全方组不含雄激素细胞抑制率与含雄激素差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而王不留行组含雄激素细胞抑制率低于不含雄激素 ($P < 0.05$), 并且王不留行组含和不含雄激素细胞抑制率均高于相应的全方组 ($P < 0.05$)。结论 健脾利湿化瘀方对人前列腺癌 C4-2 细胞具有很好的抑制作用, 且呈剂量依赖性。其中王不留行是最佳的单味中药, 王不留行增加了人前列腺癌 C4-2 细胞对雄激素的敏感性, 可能对人前列腺癌 C4-2 细胞的雄激素非依赖性生长具有逆转作用。

关键词 健脾利湿化瘀方; 前列腺癌; C4-2 细胞; 雄激素; 非依赖性生长; 细胞抑制率

近年来前列腺癌发病率逐渐增长, 在全世界的男性所患恶性肿瘤中居第 2 位^[1]。我国前列腺癌已经超过膀胱恶性肿瘤成为男性泌尿系统恶性肿瘤首位^[2]。大多数前列腺癌患者早期都可由内分泌治疗获益, 但是绝大多数患者在经过 18~36 个月内内分泌治疗后终将逐渐进展成为去势抵抗性前列腺癌 (castration resistant prostate cancer, CRPC), 出现内分泌药物治疗的抵抗^[3]。目前新型抗雄激素药物和化疗仍为主要治法, 但新型抗雄激素药物与化疗药物之间存在交叉耐药性, 且具有一定不良反应, 可导致生活质量下降^[4]。CRPC 是一种进展快、预后差、生存期短的疾病, 有研究发现, 中医药配合

内分泌治疗可作为 CRPC 的主要治疗手段之一^[5]。我们在前期文献整理^[6]的基础上对 CRPC 本质病机进行概括, 认为其病位在前列腺, 发生发展与肝、脾、肾密切相关, 脾虚湿困、气虚毒瘀是其核心病机, 虚、毒、瘀、湿是其核心病理要素^[7]。据此提出健脾利湿、解毒祛瘀为 CRPC 基本治疗大法, 创立健脾利湿化瘀方为治疗 CRPC 的基础方^[8]。本研究选取激素非依赖性人前列腺癌 C4-2 细胞进行研究, 探究健脾利湿化瘀方对其生长的影响及可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

人前列腺癌 C4-2 细胞 (激素非依赖性前列腺癌细胞), 购自北京北纳创联生物技术研究院。

基金项目: 天津市教委科研计划 (2018KJ037, 2018KJ011); 天津市中医内科临床研究中心 (15ZXLCZY00020)

* 通讯作者: zqxlovelxj@126.com, (022) 27986515

1.2 药物

健脾利湿化瘀方组成: 黄芪 30 g, 刺五加 15 g, 补骨脂 15 g, 姜黄 15 g, 大黄 5 g, 王不留行 30 g, 蛇六谷 15 g, 白英 15 g。将健脾利湿化瘀方根据药物功效拆分为扶正组: 黄芪 30 g, 刺五加 15 g, 补骨脂 15 g; 解毒组: 蛇六谷 15 g, 白英 15 g; 化瘀组: 姜黄 15 g, 大黄 5 g, 王不留行 30 g。各方剂蒸馏浓缩至 1 g/ml 备用。利用新鲜液体培养基 DMEM 将药物稀释至浓度为 10、20、100、1000 mg/ml 的稀释液, 由天津中医药大学第一附属医院药剂科制备。

1.3 主要试剂与仪器

含雄激素胎牛血清 (货号: 26140-079)、PRMI 1640 培养基 (货号: C22400500BT)、活性炭/葡聚糖处理的胎牛血清 (货号: 12676-029), 均为美国 GIBCO 公司产品; 胰酶 (批号: 1297729)、二甲基亚砜 (货号: 276855)、MTT (货号: V900888-1G), 均为美国 Sigma 公司产品; 青霉素 (货号: AC044-10G), 美国 GENVIEW 公司; 链霉素 (货号: GA3502), 北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

台式高速低温冷冻离心机 (型号: 3-18K), 美国 Sigma 公司; 细胞培养皿 (型号: 353003), 美国 BD Falcon 公司; 水浴锅 (型号: HH-1), 金坛市城西丽华实验仪器厂; CO₂ 恒温培养箱 (型号: 371)、酶联免疫检测仪 (型号: K3), 均为美国 Thermo FORMA 公司产品; 倒置显微镜 (型号: CKX53), 日本 Olympus 公司。

1.4 细胞复苏、培养基传代

从 -80℃ 冰箱中取出冻存的 C4-2 细胞, 迅速将冻存管放入已经预热的 37℃ 的水浴锅, 并使其摇动, 待冻存管中液体融化, 外喷酒精消毒, 放入超净台; 吸出细胞悬液放入已装有 5 ml 培养液的离心管中, 稍吹打细胞, 放入离心机 1200 r/min (离心半径 10 cm) 离心 3 min, 弃上清液, 再用 8~10 ml 培养液重新吹打细胞, 并移入培养皿, 放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。用含 10% 胎牛血清 (FBS)、1% 双抗 (青霉素-链霉素混合溶液) 的 1640 培养液, 置 37℃ 含 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 48 h。将培养皿从 37℃、5% CO₂ 培养箱小心移入超净台, 将培养皿中全部培养液吸出, 加入约 2 ml 0.25% 胰酶使之进行消化, 并在倒置显微镜下进行观察, 待细胞质回缩、细胞由梭形变成圆形时, 在培养皿中加入 8 ml 培养液使之终止消化;

用移液器反复捶打细胞使之悬浮, 然后将其装入 10 ml 离心管中, 在离心机中以 1200 r/min (离心半径 10 cm) 离心 3 min, 弃上清液, 再重新加入 8 ml 细胞培养液, 摇晃均匀, 放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。

1.5 健脾利湿化瘀方及其拆方对人前列腺癌 C4-2 细胞株细胞增殖的影响

选取生长状况良好、对数期的 C4-2 细胞, 0.01% 胰酶消化, 继而用 PRMI 1640 培养液重悬细胞, 然后进行细胞计数。在 96 孔板加进细胞悬液 100 μl (细胞数约 1.5×10^4 个), 边缘用无菌 PBS 填充, 置 37℃ 含 5% CO₂ 细胞培养箱中培养细胞 24 h (使细胞贴壁完全)。实验分为健脾利湿化瘀方全方组、扶正组、解毒组、化瘀组, 每组设 4 个药物浓度分别为 10、20、100、1000 mg/ml, 每个浓度设 4 个复孔, 另设对照组 (含培养液和细胞)。24 h 后将板中的培养液去掉, 根据实验分组加入不同浓度药物。将 96 孔板置于 37℃ 含 5% CO₂ 细胞培养箱中继续培养 48 h。给药 48 h 后, 在每个孔中加入 10 μl 浓度为 5 mg/ml 的 MTT 溶液 (终浓度为 0.5 mg/ml), 再将细胞培养 4 h。4 h 后将板中的培养基去掉, 每孔加入 100 μl 二甲基亚砜, 并将其放在摇床上进行低速振荡 10 min。采用酶联免疫检测仪, 并在其波长等于 490 nm 的地方测量各个孔的吸光度值。细胞抑制率 (%) = (对照组吸光度值 - 实验组吸光度值) / 对照组吸光度值 × 100%。实验重复 3 次, 结果取平均值。

1.6 健脾利湿化瘀方拆方中单味药对人前列腺癌 C4-2 细胞株细胞增殖的影响

根据上述研究结果得出最佳的拆方组, 在此基础上进一步探讨此拆方组中单味中药对人前列腺癌 C4-2 细胞株细胞增殖的影响, 实验方法同上。

1.7 健脾利湿化瘀方中单味药对人前列腺癌 C4-2 细胞株雄激素非依赖性生长的影响

根据上述研究结果得出最佳的中药单药, 在此基础上进一步探讨健脾利湿化瘀方全方和单味药在是否有雄激素干预情况下对人前列腺癌 C4-2 细胞株细胞增殖的影响。选取生长状况良好、对数期的 C4-2 细胞, 0.01% 胰酶消化, 继而用 PRMI 1640 培养液重悬细胞, 然后进行细胞计数。在 96 孔板加进细胞悬液 100 μl (细胞数约 1.5×10^4 个), 边缘用无菌 PBS 填充, 置 37℃ 含 5% CO₂ 细胞培养箱中培养细胞 24 h 使细胞贴壁完全。24 h 后将板中的培养液去掉, 分别用含有雄激素胎牛血清培养基

和不含雄激素培养基（活性炭/葡聚糖处理）培养，然后根据筛选到最佳单味中药和全方进行干预，另设对照组（含培养液和细胞），每组设 4 个复孔。给药 48 h 后采用 MTT 溶液实验计算细胞抑制率，方法同上。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 19.0 分析实验数据，计量资料符合正态分布用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，用单因素方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 健脾利湿化瘀方全方及拆方对 C4-2 细胞增殖抑制率比较

表 1 示，各组细胞在不同浓度药物干预下，对人前列腺癌 C4-2 细胞的抑制率呈浓度依赖关系 ($P < 0.05$)，提示药物浓度越高，抑制率越高。各组在不同浓度药物干预下组间比较，抑制率由高到低分别为全方组 $>$ 化瘀组 $>$ 解毒组 $>$ 扶正组，组间两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 健脾利湿化瘀方全方及拆方中单味中药对 C4-2 细胞增殖抑制率比较

上述实验结果显示，化瘀组是抑制人前列腺癌 C4-2 细胞增殖作用最佳拆方组，故对拆方组中大黄、姜黄、王不留行分别进行研究。实验分为全方组、大黄组、姜黄组、王不留行组，每组设 10、20、100、1000 mg/ml 4 个药物浓度，每个浓度 4 个复孔。检测各组不同浓度对人前列腺癌 C4-2 细胞株细胞抑制率。

表 2 示，各组细胞在不同浓度药物干预下，对人前列腺癌 C4-2 细胞的抑制率呈浓度依赖关系

($P < 0.05$)，提示药物浓度越高，抑制率越高。在 10 mg/ml 浓度药物干预下，全方组和王不留行组抑制率高于大黄组和姜黄组，大黄组高于姜黄组 ($P < 0.05$)；在 20、100、1000 mg/ml 浓度药物干预下各组细胞抑制率比较，王不留行组 $>$ 全方组 $>$ 大黄组 $>$ 姜黄组，组间两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，提示王不留行是抑制人前列腺癌 C4-2 细胞增殖作用最佳的单味中药。

2.3 健脾利湿化瘀方中单味中药对 C4-2 细胞雄激素干预的影响

上述研究结果显示，王不留行是抑制人前列腺癌 C4-2 细胞作用最佳中药。本实验分为对照组、全方组、王不留行组，各组又分为含雄激素和不含雄激素干扰亚组，每亚组 4 个复孔，检测各亚组人前列腺癌 C4-2 细胞株细胞抑制率。

表 3 示，对照组是否含雄激素均对细胞几乎无抑制，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组比较，全方组和王不留行组含和不含雄激素细胞抑

表 3 全方组及王不留行组是否含雄激素干预下 C4-2 细胞抑制率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	细胞抑制率
对照组	含雄激素	4 0.00 $\pm$ 0.28
	不含雄激素	4 0.00 $\pm$ 0.37
全方组	含雄激素	4 37.16 $\pm$ 0.73 Δ
	不含雄激素	4 38.12 $\pm$ 1.41 $\#$
王不留行组	含雄激素	4 50.73 $\pm$ 0.58 $\Delta\Delta$
	不含雄激素	4 51.85 $\pm$ 0.88 $\# \Delta$

注：与本组含雄激素比较，* $P < 0.05$ ；与对照组含雄激素比较， $\Delta P < 0.05$ ；与全方组含雄激素比较， $\Delta\Delta P < 0.05$ ；与对照组不含雄激素比较， $\# P < 0.05$ ；与全方组不含雄激素比较， $\# \Delta P < 0.05$ 。

表 1 全方组及各拆方组 C4-2 细胞不同浓度细胞抑制率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	10 mg/ml	20 mg/ml	100 mg/ml	1000 mg/ml
全方组	4	23.06 $\pm$ 1.27	42.16 $\pm$ 0.92 *	95.70 $\pm$ 0.28 $^*\Delta$	98.90 $\pm$ 0.08 $^*\Delta\Delta$
扶正组	4	10.52 $\pm$ 0.80 $^{\#}$	24.96 $\pm$ 2.12 $^{\#}$	60.73 $\pm$ 0.28 $^*\Delta\#$	86.68 $\pm$ 1.32 $^*\Delta\Delta\#$
解毒组	4	16.17 $\pm$ 2.74 $^{\#}\Delta$	30.37 $\pm$ 1.92 $^{\#}\Delta$	68.47 $\pm$ 1.84 $^*\Delta\# \Delta$	90.16 $\pm$ 1.22 $^*\Delta\Delta\# \Delta$
化瘀组	4	20.24 $\pm$ 2.16 $^{\#}\Delta$	35.22 $\pm$ 0.57 $^{\#}\Delta$	94.67 $\pm$ 0.24 $^*\Delta\# \Delta$	96.96 $\pm$ 0.61 $^*\Delta\Delta\# \Delta$

注：与本组 10 mg/ml 浓度比较，* $P < 0.05$ ；与本组 20 mg/ml 浓度比较， $\Delta P < 0.05$ ；与本组 100 mg/ml 浓度比较， $\Delta\Delta P < 0.05$ ；与全方组同浓度比较， $\# P < 0.05$ ；与扶正组同浓度比较， $\Delta P < 0.05$ ；与解毒组同浓度比较， $\Delta\Delta P < 0.05$ 。

表 2 全方组及各单味中药组 C4-2 细胞抑制率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	10 mg/ml	20 mg/ml	100 mg/ml	1000 mg/ml
全方组	4	22.99 $\pm$ 0.62	40.50 $\pm$ 1.65 *	95.13 $\pm$ 0.24 $^*\Delta$	96.51 $\pm$ 0.37 $^*\Delta\Delta$
大黄组	4	9.41 $\pm$ 0.85 $^{\#}$	36.52 $\pm$ 1.31 $^{\#}$	75.31 $\pm$ 1.36 $^*\Delta\#$	94.75 $\pm$ 0.46 $^*\Delta\Delta\#$
姜黄组	4	5.14 $\pm$ 0.92 $^{\#}\Delta$	13.80 $\pm$ 0.62 $^{\#}\Delta$	25.98 $\pm$ 0.71 $^*\Delta\# \Delta$	70.13 $\pm$ 0.61 $^*\Delta\Delta\# \Delta$
王不留行组	4	24.15 $\pm$ 1.49 $^{\#}\Delta$	51.30 $\pm$ 2.69 $^{\#}\Delta$	97.09 $\pm$ 0.40 $^*\Delta\# \Delta$	98.26 $\pm$ 0.15 $^*\Delta\Delta\# \Delta$

注：与本组 10 mg/ml 浓度比较，* $P < 0.05$ ；与本组 20 mg/ml 浓度比较， $\Delta P < 0.05$ ；与本组 100 mg/ml 浓度比较， $\Delta\Delta P < 0.05$ ；与全方组同浓度比较， $\# P < 0.05$ ；与大黄组同浓度比较， $\Delta P < 0.05$ ；与姜黄组同浓度比较， $\Delta\Delta P < 0.05$ 。

制率均升高 ($P < 0.05$); 全方组不含雄激素细胞抑制率与含雄激素差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而王不留行组含雄激素细胞抑制率低于不含雄激素 ($P < 0.05$); 且王不留行组含和不含雄激素细胞抑制率均高于相应全方组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

我们认为, CRPC 去势抵抗阶段病位虽在下焦, 但主要责之于脾肾。虚、毒、瘀、湿相互影响, 相互交织, 肾气愈虚, 进一步加重水湿停滞, 脾亦受损, 随着患病时间延长脾肾两虚加重。此阶段, 脾虚湿困、气虚毒瘀是 CRPC 核心病机。因此提出健脾利湿化瘀方, 以黄芪健脾补益、实脾利湿为君药, 以刺五加、补骨脂温肾健脾以助利水为臣药, 以姜黄、大黄、王不留行化瘀消癥散积, 蛇六谷、白英祛瘀解毒, 共为佐药。

本研究结果显示, 健脾利湿化瘀方全方组及扶正组、解毒组、化瘀组各组药物对人前列腺癌 C4-2 细胞的增殖均有抑制作用, 且化瘀组为抑制细胞增殖作用最佳拆方组。课题组前期用人前列腺癌 PC-3 细胞建立裸鼠移植瘤模型, 实验发现化瘀组是抑瘤率最高的拆方组^[8], 与本研究结果一致。有研究显示, 化瘀组中姜黄主要成分姜黄素具有明确的抗肿瘤作用, 其可诱导肿瘤细胞凋亡、抗肿瘤侵袭及转移^[9]; 而大黄的主要成分大黄酸可以调节自噬^[10]; 王不留行不但可以降低磷酸化细胞外信号调节激酶 (p-ERK)、磷酸化蛋白激酶 (p-Akt) 的相对表达量^[12], 其王不留行环肽 A 还具有抑制血管生成的作用^[13], 由此提示化瘀组可能通过对自噬调节、血管生成、诱导凋亡等途径发挥出更加显著的抑制细胞增殖的作用。

单味中药研究结果显示, 王不留行是抑制 C4-2 细胞增殖作用最佳的中药单药。王贵民等^[14]对治疗前列腺疾病的中药进行用药规律研究, 显示王不留行是在前列腺癌治疗中的核心单味药。

有研究显示, CRPC 的发生、发展的过程中雄激素受体 (AR) 及与其存在交叉的信号通路呈现多种形式的变化^[15]。进展期前列腺癌并不是完全不依赖雄激素, 而是通过基因扩增和增强转录诱导的 AR 过表达可以使 AR 对低水平雄激素产生超敏反应^[16], 甚至在雄激素浓度最低条件下仍可以持续诱导肿瘤细胞增殖^[17], 说明在分子水平上, 肿瘤细胞仍依赖雄激素和雄激素受体, AR 过表达会促进 CRPC 的进展。AR 突变在早期、未经治疗的前列腺癌中是罕见的, 但是在 CRPC 中却是常见

的^[18], 尤其是经过系统性激素治疗后的进展性肿瘤多达 80% 的 CRPC 患者存在 AR mRNA 及蛋白水平显著增加^[19]。本研究结果显示, 王不留行组含雄激素细胞抑制率低于不含雄激素, 提示王不留行增加了 C4-2 细胞对雄激素的敏感性, 从而增加抗雄激素药物对 CRPC 的疗效。

综上所述, 化瘀组是健脾利湿化瘀方拆方组中对人前列腺癌 C4-2 细胞抑制作用最佳的药物组, 王不留行是最佳的中药单药, 王不留行增加了人前列腺癌 C4-2 细胞对雄激素的敏感性。

参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD. Cancer Statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] 曾浩, 种铁, 贺大林, 等. 去势抵抗性前列腺癌最新指南解读: 暨中国西部专家共识 [J]. 现代泌尿外科杂志, 2017, 22(2): 85-94.
- [4] VAN SOEST RJ, VAN ROYEN ME, DE MORRÉE ES, et al. Cross-resistance between zaxanes and new hormonal agents abiraterone and enzalutamide may affect drug sequence choices in metastatic castration-resistant prostate cancer [J]. Eur J Cancer, 2013, 49(18): 3821-3830.
- [5] 贾玉森, 陈小均, 张志杰. 中医药治疗前列腺癌的临床研究概况 [J]. 中医杂志, 2012, 53(24): 2142-2146.
- [6] 贾英杰, 陈军, 李小江, 等. 前列腺癌中医证候研究的文献分析 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(9): 1850-1852.
- [7] 王金秀, 李小江, 陈军, 等. 贾英杰论前列腺癌的中医病机与治疗 [J]. 新中医, 2014, 46(4): 20-23.
- [8] 牟睿宇, 李小江. “健脾利湿化瘀方”治疗晚期前列腺癌的研究 [J]. 中国中西医结合学会. 第十五届全国中西医结合肿瘤学术大会论文集. 北京: 中国中西医结合学会, 2017: 142-143.
- [9] 孙彬翔, 陈军. “健脾利湿化瘀方”对人前列腺癌 PC-3 细胞荷瘤小鼠的抑瘤作用研究 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(10): 2468-2471.
- [10] 张博, 叶丽红. 姜黄素抗癌机制研究进展 [J]. 中医药学报, 2013, 41(1): 121-123.
- [11] 涂玥, 孙伟, 顾刘宝, 等. 大黄酸调控 mTOR 信号通路活性抑制肾小管上皮细胞自噬蛋白表达的分子机制 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21): 4090.
- [12] 马丽萍, 邱丽颖, 冯磊, 等. 王不留行提取物抑制人微血管内皮细胞活性的研究 [J]. 中成药, 2013, 35(11): 2315-2319.
- [13] 花慧, 冯磊, 金坚, 等. 王不留行中抑制血管生成的活性物质研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(3): 698-670.

〔4〕 王贵民,李延保. 中医药治疗前列腺疾病用药规律的数据挖掘研究 〔J〕. 西部中医药, 2014, 27(5) : 77-80.

〔5〕 MELLADO B, CODONY J, RIBAL MJ, et al. Molecular biology of androgen-independent prostate cancer: the role of the androgen receptor pathway 〔J〕. Clin Transl Oncol, 2009, 11(1) : 5-10.

〔6〕 MONTGOMERY RB, MOSTAGHEL EA, VESSELLA R, et al. Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth 〔J〕. Cancer Res, 2008, 68(11) : 4447-4454.

〔7〕 KOIVISTO P, KONONEN J, PALMBERG C, et al. Andro-

gen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer 〔J〕. Cancer Res, 1997, 57(2) : 314-319.

〔8〕 TAYLOR BS, SCHULTZ N, HIERONYMUS H, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer 〔J〕. Cancer Cell, 2010, 18(1) : 11-22.

〔9〕 HAAPALA K, KUUKASJRVI T, HYYTINEN E, et al. Androgen receptor amplification is associated with increased cell proliferation in prostate cancer 〔J〕. Hum Pathol, 2007, 38(3) : 474-478.

Effects of *Jianpi Lishi Huayu Recipe* (健脾利湿化瘀方) on Androgen-independent Growth of Human Prostate Cancer C4 - 2 Cells

MOU Ruiyu, JIA Yingjie, SUN Binxu, ZHANG Yao, LIU Honggen, GUO Shanqi, SU Chang, WU Mingxian, LI Wenjie, LI Xiaojiang

(The First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381)

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Jianpi Lishi Huayu Recipe* (健脾利湿化瘀方) in the treatment of castration-resistant prostate cancer. **Methods** The *Jianpi Lishi Huayu Recipe* was divided into reinforcing healthy *qi* medicine, detoxification medicine and dissipating blood stasis medicine according to the actions of the drug. The experiment was divided into a whole formula group, a reinforcing healthy *qi* group, a detoxification group and a dissipating blood stasis group. Each group was given 4 drug concentrations, 10, 20, 100, 1000 mg/ml, and a control group containing culture medium and cells was set up. Human prostate cancer C4 - 2 cell suspension $100\ \mu\text{l}$ (1.5×10^4 cells) was added to a 96-well plate. After 24 hours of culture, cells were continued to culture for 48 h by adding different concentrations drugs according to the experimental grouping. The inhibition rate of each group was calculated by MTT assay. According to the results, the single drug in the whole formula group and the single drug in the split formula group with the highest total inhibition rate were applied to C4 - 2 cells, and the single drug with the highest cell inhibition rate was selected. The cell proliferation of *Jianpi Lishi Huayu Recipe* whole formula and best single drug on C4 - 2 cells in androgen-containing and androgen-free medium were observed, and the cell inhibition rate was calculated. **Results** The inhibition rate of human prostate cancer C4 - 2 cells in each group was concentration-dependent ($P < 0.05$). The higher the drug concentration was, the higher the inhibition rate was. Under different concentrations of drug intervention, the inhibition rate from high to low was listed as whole formula group, dissipating blood stasis group, detoxification group, reinforcing healthy *qi* group. The difference between the every 2 groups was statistically significant ($P < 0.05$). In the split formula, the dissipating blood stasis group was the best drug group. In the best single-drug screening, the cell inhibition rate from high to low was *Semen Vaccariae* group, the whole formula group, *Radix et Rhizoma Rhei* group, *Rhizoma Curcumae Longae* group ($P < 0.05$), suggesting that *Semen Vaccariae* was the best Chinese medicine single drug inhibitor of human prostate cancer C4 - 2 cell proliferation. There was no significant difference in the inhibition rate between androgen-containing and androgen-free in the whole formula group ($P > 0.05$), while the inhibition rate of androgen-containing in *Semen Vaccariae* group was lower than that of androgen-free ($P < 0.05$). The inhibition rate of androgen-containing and androgen-free in *Semen Vaccariae* group was higher than that in the corresponding whole formula group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Jianpi Lishi Huayu Recipe* has a good inhibitory effect on human prostate cancer C4 - 2 cells in a dose-dependent manner. Among them, *Semen Vaccariae* is the best single-flavor Chinese medicine. *Semen Vaccariae* has increased the sensitivity of human prostate cancer C4 - 2 cells to androgen, which may reverse the androgen-independent growth of human prostate cancer C4 - 2 cells.

Keywords *Jianpi Lishi Huayu Recipe* (健脾利湿化瘀方); prostate cancer; C4 - 2 cells; androgen; independent growth; cell inhibition rate

(收稿日期: 2018 - 08 - 27; 修回日期: 2019 - 03 - 11)

编辑: 邓 媛