

表 2 示,首乌益智胶囊组 Notch1 基因相对定量较脑复康组和模型组明显增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明首乌益智胶囊可明显提高 Notch1 基因表达。

2.2 各组大鼠脑组织 Jagged1 mRNA 效应表达的比较

表 3 示,首乌益智胶囊组 Jagged1 基因相对定量较脑复康组和模型组增高,但无统计学意义($P>0.05$)。可能与用药时间短有关,一个神经干细胞或祖细胞经多次有丝分裂才能生成一个神经元。

表 3 各组大鼠脑组织 Jagged1 mRNA 效应表达的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	jagged1mRNA 相对表达
假手术组	6	1.08±1.16
模型组	5	1.20±0.68
脑复康组	6	1.16±1.37
首乌益智胶囊组	6	1.49±0.89

3 讨论

VD 属中医“呆病”范畴,其病性为本虚标实,肾精亏虚为本,瘀血阻络为标,治疗当以补肾填精、化瘀通窍为法。首乌益智胶囊方中何首乌补益肝肾、益精生髓,为君药。黄芪功专补气升阳;益智补肾阳,温肾经;天麻,富含液质滋补之性,能养液开郁化痰。三药合用鼓舞肾气以生精,助阳以化阴,共为臣药。丹参、地龙共为佐药,与君

药、臣药共达益气活血、化瘀通络、推陈致新、填精益脑、开窍益智之功。川芎辛温香窜,血中之气药,走而不守,为使药。全方配伍共奏补肾填精,化瘀通窍之功能。现代药理研究表明,何首乌能降低血脂、抗动脉粥样硬化,益智能清除自由基、对抗脂质氧化活性,黄芪能扩张脑血管、增加脑血流量,上述三药均有抗衰老的作用;丹参、地龙、川芎均可增加脑血流,降低脑血管阻力,改善脑代谢。本研究结果表明,首乌益智胶囊可能通过激活 Notch/Delta 信号通路,Notch1 受体与 Jagged1 配体结合,激活了 NICD-CBF 复合体基因,促进神经干细胞向星形胶质细胞分化,从而使得星形胶质细胞增殖活化,分泌众多神经营养因子,发挥神经保护作用。这为中医药防治脑 VD 提供了新思路、新方法,有重要的使用价值和理论意义。但是星形胶质细胞的发生发育可能有多种信号途径和机制参与了这一复杂的过程,首乌益智胶囊是否仅通过 Notch/Delta 信号通路其作用还需进一步研究。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672744)

1 山东省千佛山医院中医科(250014);

2 泰安医学院预防医学系;

3 同济大学附属医院分院内科

通讯作者:李长生,lichangsheng@sdhospital.com.cn,13791120858

温阳法对 SMMC-7721 和 Hepa1-6 肝癌细胞周期的影响

陈嘉璐* 李湧健*

以肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)为主的原发性肝癌是世界第六大常见恶性肿瘤,近年来世界各地肝癌发病率均有上升趋势。HCC 病因涉及多因素、多步骤、多基因、多突变。实验证明:几乎所有的癌基因,抑癌基因的功能效应最终都会聚到细胞周期上来,许多癌基因、抑癌基因直接参与细胞周期的调控,或者本身就是细胞周期的调控机制的主要成分。肝癌组织中也发现多种细胞周期调节因子的异常。将作用于不同细胞周期时相应的药物联合使用,是肿瘤联合治疗的基础。但是当前的化疗模式存在明显副作用和剂量限制性毒性,肿瘤细胞对化疗药物存在天然耐药和获得性耐药,使用细胞毒性抗癌药物化学疗法治疗晚期恶性肿瘤,其生存益处微小。因此恶性肿瘤的多学科综合治疗中,中医药疗法已成为治疗恶性肿瘤的重要方法之一。

本实验以温阳的代表方四逆汤为研究对象,对扶正法治肝癌进行初步、系统的实验观察研究,以此探讨中医温阳法在肝癌治疗中的作用和机制,为临床应用提供理论依据,并在辨证基础上的合理选择有效方药提供临床基础。

1 实验材料

1.1 细胞株

SMMC-7721 肝癌细胞和 Hepa1-6 肝癌细胞由苏大生命科学院提供。

1.2 实验用药

1.2.1 注射用顺铂(冻干型)(齐鲁制药有限公司批号:8040051DB);取 5mg 顺铂干粉溶解于 5ml 完全培养液中,0.22μm 的微孔滤器除菌。

1.2.2 温阳方为四逆汤,制附子 10g,干姜 6g,炙甘草 6g。所有药物来自苏州春晖堂中药饮片厂。取附子 50g、干姜 30g、炙甘草 30g,加 3 倍量水,浸泡 0.5h,再加入 2 倍量水,回流提取 0.5h,过滤。取药渣再加入 3 倍量水,回流提取 0.5h,合并两次滤液。滤液浓缩适量,使得得到浓度为 1g 生药/ml 的浓缩液(110ml)。4℃ 冰箱保存。

1.2.3 实验分组 空白对照组顺铂阳性对照组:0.5mg/ml,0.075mg/ml。温阳组各剂量组:低剂量(10mg/ml)、中低剂量(25mg/ml)、中剂量(50mg/ml)、中高剂量(75mg/ml)、高剂量(100mg/ml)。以上中药提取物,生药浓度为 1g/ml,由苏州中医医院中药研究所提供。

1.3 试剂与配剂

1.3.1 培养基 DMEM 培养液(美国 GIBCO 公司,批号 1136820),三蒸水配制,用 HEPE(华义生物工程公司)

调节 PH 值至 7.2~7.4, 经过滤除菌, 在无菌条件下分装后置于 4℃ 保存备用, 用时配制成完全培养基, 体积为 85% DMEM 加 15% 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司批号 080614)。

1.3.2 PBS NaCl 4g、KCl 0.1g、NaHPO₄ · H₂O 1.56g、KH₂PO₄ 0.2g 溶于 500ml 三蒸水, 过滤除菌, 分装置于 4℃ 保存。

1.3.3 0.25% 胰蛋白酶 (含 EDTA) (闪晶生物, 批号 2594141): 称取 0.125g 胰蛋白酶, 10g EDTA 溶于 50ml PBS 中, 过滤除菌, 分装置于 4℃ 保存。

1.3.4 MTT (美国 AMRESCO 批号 0462B32) 取 50mg MTT 粉末溶于 10ml 完全培养基中, 在磁力搅拌机上搅拌, 使 MTT 充分溶解, 0.22μm 微孔滤器过滤除菌。

1.4 仪器与器材

流式细胞仪 FACS Calibur, Becton Dickinson 公司; FACS Calibur 流式细胞仪系 Becton-Dickinson (B-D) 公司产品。使用 Cell Quest 软件自动获取 30000 细胞/样品, 使用 Mod Fit LT 软件程序分析细胞周期。

2 实验方法和观察指标

2.1 细胞培养

将 SMMC-7721 肝癌细胞及 hep1-6 肝癌细胞接种于含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养, 每 2~3 天换液 1 次, 长满后常规胰蛋白酶消化法传代培养。所有试验均采用对数生长期细胞。

2.2 MTT 法测定 OD 值

将处于对数生长期的细胞通过用 0.25% 胰酶 (含 EDTA) 消化贴壁生长良好的细胞, 收集细胞并用培养液稀释, 调整浓度为 2.5×10^4 /ml, 接种于一块 96 孔培养板, 每孔 100μl。实验分组: 调零孔、空白对照组、顺铂 0.1mg/ml、温阳方 100、75、50、25、10 (mg/ml)。培养 24h 待细胞贴壁后, 完全吸出培养液空白对照组、顺铂组、温阳各浓度组, 分别加入培养液、顺铂、温阳各浓度药液均为 100μl。每组各设复孔 5~6 个。将 96 孔板置于 5% CO₂ 培养箱培养 48h 后, 取出。实验终止前 4h 吸尽板中液体, 加含有 MTT 的完全培养液 (MTT: 完全培养液 = 1: 9, 即 MTT 为 10μl, 完全培养液 90μl) 100μl/孔, 37℃、5% CO₂ 孵箱中孵育 4 小时。用 DMSO 150μl 终止反应, 轻微振荡 10min 后于酶标仪 490nm 处测定 OD 值。抑制率 (%) = $[(1 - \text{用药组平均 OD 值} / \text{对照组平均 OD 值})] \times 100\%$

2.3 PI 单染法测定细胞周期

取细胞生长良好, 透明度大, 折旋光性强, 已几乎全部铺满瓶底的培养瓶, 弃去原液, 用 PBS 冲洗 2 遍, 用 0.25% 胰酶 (不含 EDTA) 消化, 加入少量含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 吹打刚消化的细胞, 使其分散, 离心管离心, 1000r, 5min。弃去上清液, 加入少量完全培养液, 把沉在底部的细胞吹打均匀。取以上细胞悬液稀释数倍, 计数为 2×10^5 个细胞/ml。取 6 孔板, 每孔加入 2ml 已调好浓度的细胞悬液, 在 37℃、CO₂ 5% 及饱和湿

度条件下培养 24 小时后, 将配制好不同浓度的温阳药物溶液每孔加 2ml, 空白组加完全培养液, 培养 48h。(制备单细胞悬液: 将正常培养和诱导凋亡的细胞加 0.25% 胰蛋白酶消化。置 37℃ 孵箱消化, 镜下观察细胞, 待其变圆, 细胞间分离但尚未脱落时倒去胰酶, 加入原培养液终止消化, 吹打瓶壁, 使细胞脱落。将细胞悬液转移至离心管, 1000r/min 离心 5min。加 PBS 洗涤细胞二次 (1000r/min 离心 5min), 调整细胞浓度为 5×10^5 /ml。周期操作步骤: 固定, 向流式管内缓慢加入 -20℃ 预冷的 70% 乙醇, 重新悬浮细胞, 避光 30min 吹散细胞, 离心, 1000r/min, 5min 弃酒精。4℃ PBS (1~2ml) 洗, 离心 1000r/min, 5min 弃液。将细胞重悬于 500μl PI 染液, 室温避光 30min 后上机检测。

2.4 统计方法

数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各药物浓度组与对照组的比较采用 Dunnett 检验, 以 $\alpha = 0.05$ 和 $\alpha = 0.01$ 为检验标准。

3 实验结果

3.1 MTT 法检测温阳法对肝癌细胞的抑制作用

结果显示, 与空白组比较, (1) 顺铂组在对 SMMC-7721 肝癌细胞作用 48 小时后具有抑制 SMMC-7721 肝癌细胞增殖的作用 ($P < 0.01$); (2) 温阳方低剂量组 (10mg/ml) 与空白组比较未显示抑制作用, 中到高剂量组 (50mg/ml, 75mg/ml, 100mg/ml) 对 SMMC-7721 肝癌细胞均有一定的抑制增殖作用, 并且这种抑制作用随着剂量的增大而逐渐增强, 均具有统计学差异 ($P < 0.05$)。 (3) 高浓度 (100mg/ml) 温阳方抑制率与顺铂相当 ($P > 0.05$), 显著强于滋阴和益气组 ($P < 0.05$)。提示中医温阳法对 MMC-7721 肝癌细胞具有增殖抑制作用, 其抑制作用呈浓度依赖性。

3.2 PI 单染法测定温阳法对肝癌细胞周期的影响

体外实验结果提示 (1) 中医扶正治法对肝癌细胞具有不同程度的抑制作用, 且这种抑制作用在一定范围内呈浓度依赖性。 (2) 温阳法对两种肝癌细胞的抑制作用具有优势, 对 Hep1-6 肝癌细胞在 50mg/ml 以上达到平台。 (3) 各法均能阻滞细胞周期于 G2/M 期, 益气 and 养阴一定浓度可以促进细胞进入增殖周期, 益气法对 S 期 SMMC-7721 肝癌细胞有阻滞作用。

4 讨论

“肝癌”可归属于中医学“肝积”、“癥瘕”、“积聚”、“臌胀”等范畴。肝癌的形成与发展与痰、湿、气、瘀等因素有关, 现代研究认为正气虚损所致的癌毒内侵与肝癌的形成关系更为密切, 因此祛邪和扶正是治疗肝癌的两大基本原则。目前, 临床扶正治疗肝癌应用较多的是益气、养阴法。本实验则提示温阳法在抑制小鼠肝癌方面有明显作用, 因此从中可以得到启示, 临床辨治肝癌更应注重人体阳气的作用, 扶阳也是扶正治癌的一个不可忽视的重要治法。

①抑瘤作用 现代医学对温阳药物的实验研究认为, 温阳散寒药抗肿瘤的作用机制可能包括参与机体免疫调

节,抑制肿瘤细胞增殖与微血管形成,诱导肿瘤细胞分化与凋亡以及逆转肿瘤细胞的生物学行为等多方面,为温阳法治肿瘤提供科学依据。

②对肝癌细胞增殖周期的影响:在本实验中,同种药物作用于不同的细胞株之间,或同一细胞株的不同环境之间(体内和体外)所引起的周期阻滞是不同的。体外部分的细胞周期测定中,温阳各浓度组对两种不同的肝癌细胞有不同程度的 G2/M 期阻滞作用。对 SMMC-7721 肝癌细胞周期的影响中,温阳组 G0/G1 期的比例下降不

明显,温阳 S 期比例有下降趋势。对 Hepa1-6 肝癌细胞周期的影响中,G0/G1 期的比例有一定程度下降,G2/M 期比例上升,提示温阳法阻滞细胞于 G2/M 期。本实验的初步结果提示,在扶正法的研究中,扶阳是一个重要的法则,亦是目前临床研究较为薄弱的环节,从事中医临床研究的中医工作者更应重视温阳法的临床与实验研究。

* 江苏省苏州市中医医院肿瘤科(215003)

山银花喷雾剂的制备及药效学研究

伍小燕¹ 刘凡凡² 杜兰哲³

山银花(忍冬科植物灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand. - Mazz.、红腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq. 或华南忍冬 *Lonicera confusa* DC. 的干燥花蕾或带初开的花)具有清热解毒、疏风散热之功效,2005 版《中国药典》把山银花单独列为一味常用中药。山银花是广西特产大宗药材商品,长期作为多种中成药的生产原料和临床用药,其主要成分为有机酸类、挥发油类、黄酮类、三萜皂苷类、裂环环烯醚萜苷类等化学成分,其中绿原酸是其主要有效成分和质量控制指标,具有抗菌抗病毒、抗炎解热、调节免疫系统的作用。临床主要用于治疗上呼吸道感染、急性慢性咽炎、口腔感染、流行性感冒、痈疖脓肿等疾病。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与动物

RE-52A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),101A-3E 电热鼓风干燥箱(上海实验仪器厂)。昆明种小鼠,普通级(CV),体重 16~22g,SD 大鼠,体重 150~180g,实验室室温为 25±2℃(空调),由广西中医学院实验动物中心提供,动物合格证号:桂医动字第 11004 号。

1.2 实验试剂及菌种

山银花药材采自广西忻城县,经广西中医药研究院方鼎研究员鉴定为红腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq.;薄荷脑(购自南宁市老百姓大药房);吐温 80(化学纯,天津市大茂化学试剂厂)。金黄色葡萄球菌,绿脓杆菌,溶血性甲型链球菌(广西中医学院微免教研室提供);营养琼脂(杭州天和微生物试剂有限公司);营养肉汤(北京检验检疫科学研究院,北京陆桥技术责任有限公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司);地塞米松磷酸钠注射液(天津药业集团新郑股份有限公司);氯化可的松注射液(西南药业股份有限公司)。

1.3 处方组成及制备工艺

山银花 250g,薄荷脑 6.25g,吐温 80 21.9g,蒸馏水加至 1000ml。山银花粉末(过 40 目筛)加 70% 乙醇 3000ml,加热浸提 1h,溶液滤过,7% 乙醇 1000~3000ml 继续提取 1h,连续 3 次,合并滤液,减压回收溶剂至无醇味,加入用吐温 80 溶解的薄荷脑,加入蛋白糖混匀,分装

喷雾瓶,每瓶 20ml。山银花药材采用 70% 乙醇加热提取,溶解性能较好,溶液杂质含量少,提取物可以直接用于制备喷雾剂,无需再精制。

2 药效学研究

2.1 山银花喷雾剂的体外抑菌作用

取 30g 营养肉汤干粉,加入 1000ml 的蒸馏水,121℃、0.1MPa 高压灭菌后冷却,配制成肉汤培养基。甲型溶血性链球菌营养要求比较高,将灭菌后的肉汤培养基冷却后,加入 5% 的灭活胎牛血清(50℃ 加热 30min),于 4℃ 冷藏保存备用。取 30g 营养琼脂干粉,加入 1000ml 蒸馏水,121℃、0.1MPa 高压灭菌后冷却,配制成琼脂培养基,4℃ 冷藏保存,临用时加热溶解。

取无菌小试管 11 支,除第 1 支外,第 2~11 管各加肉汤培养基 1ml;于第 1 支试管中加入山银花喷雾剂药液 2ml,取 1ml 加入第 2 管,充分混匀后再取 1ml 加入第 3 管,依次倍比稀释,自第 10 管吸出 1ml 后弃去,第 11 管加入 1ml 生理盐水作空白对照管,于第 1 管加入 1ml 肉汤培养基作无菌对照。向各管中加入金黄色葡萄球菌,绿脓杆菌,甲型溶血性链球菌的 105cfu/ml 的菌悬液 0.1ml,混匀,然后放入 37℃ 恒温培养箱中培养 18~24h,观察结果。与生理盐水空白对照管对比,不长菌的最低浓度的平均值即为山银花喷雾剂的最低抑菌浓度(MIC)。结果见表 1。

表 1 山银花喷雾剂 MIC 测定

浓度	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
金葡萄	—	—	—	—	+	+	+	+
绿脓杆菌	—	+	+	+	+	+	+	+
甲链	—	—	—	—	+	+	+	+

注:—表示无菌生长,+表示有菌生长

2.2 山银花喷雾剂的体内抗菌作用

小鼠 120 只,雌雄各半,体重在 18~22g,随机分成 4 组,每组 30 只,每种细菌感染 10 只,高剂量组 0.33g/kg,中剂量组 0.21g/kg,低剂量组 0.16g/kg。每组灌胃给予小鼠,空白对照组给予 0.2ml/10g 生理盐水,每日 2 次,连续 3 天。第 3 天给药后 60min,按 0.5ml/只腹腔注射菌液,观察 72h 内动物的死亡情况,统计死亡数。