

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.09.018

化瘀丸含药血清对 Lewis 肺癌细胞内阿霉素药物浓度的影响

高磊^{1,2}, 郝彩霞², 杨国旺², 马雪曼², 张甘霖², 于明薇², 王笑民^{*}

1. 北京中医药大学东方医院, 北京市丰台区方庄芳星园一区 6 号, 100078; 2. 首都医科大学附属北京中医医院

摘要 目的 观察化瘀丸含药血清对 Lewis 肺癌细胞内阿霉素药物浓度的影响。方法 MTT 法筛选 Lewis 细胞阿霉素给药浓度。将稳定生长的 Lewis 细胞分别加入化瘀丸含药培养基和空白培养基, 培养 48 h 后加入筛选浓度的阿霉素溶液。显微镜下观察细胞内阿霉素的分布, 多功能酶标仪定量测定细胞内阿霉素荧光信号强度变化, MTT 法测定化瘀丸含药血清对阿霉素干预 Lewis 细胞抑制率的影响。结果 筛选得出阿霉素给药浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 。阿霉素定位在细胞核中, 与空白血清组相比, 化瘀丸含药血清组促进了 Lewis 肺癌细胞中阿霉素从细胞外向细胞内转移。化瘀丸含药血清组的 Lewis 细胞内荧光强度值为 78.43 ± 1.70 , 高于空白血清组的 61.33 ± 1.71 ($P < 0.001$)。在 0.20、0.25、0.30 mol/L 阿霉素给药浓度下, 化瘀丸含药血清组细胞抑制率显著高于空白血清组 ($P < 0.05$), 且 0.30 $\mu\text{mol/L}$ 阿霉素给药浓度下细胞抑制率最高。结论 化瘀丸含药血清可提高 Lewis 细胞内阿霉素药物浓度, 具有化疗增效作用。

关键词 肺癌; 化瘀丸; 阿霉素

目前化疗在肺癌的治疗中仍占据重要地位, 能够有效杀伤肿瘤细胞, 使肿瘤患者获益, 但由于肿瘤细胞的原发性和获得性耐药、抗肿瘤药物毒性等因素, 限制了化疗药物在临床中的使用^[1]。因此, 在不增加给药剂量的情况下提高肿瘤细胞内化疗药物浓度, 既不加重全身不良反应, 同时又能够提高化疗药物的临床疗效是临床需要解决的问题。

化瘀丸是首都医科大学附属北京中医医院院国家级名老中医郁仁存存在益气活血解毒法指导下开发的内制剂, 在临床应用已 40 余年^[2-3]。前期实验研究^[4]发现, 化瘀丸具有显著的化疗增效、改善血流动力学指标的作用。本研究以化瘀丸含药血清为研究药物, 以 Lewis 肺癌细胞株为研究细胞, 借助阿霉素自发荧光属性, 通过激光共聚焦显微镜观察化瘀丸含药血清对 Lewis 肺癌细胞内阿霉素药物浓度的影响。

1 材料

1.1 细胞

Lewis 肺癌细胞系购自中国科学院上海生命科

学研究所。

1.2 药物

化瘀丸 (京药制字 Z20053296) 购于首都医科大学附属北京中医医院, 组成: 砂仁 (5.56%)、牡蛎 (11.11%)、王不留行 (5.56%)、桃仁 (5.56%)、赤芍 (5.56%)、黄芪 (16.67%)、生晒参 (5.56%)、草河车 (8.33%)、白芷 (5.56%)、西红花 (2.78%)、莪术 (5.56%)、郁金 (8.33%)、延胡索 (5.56%)、土鳖虫 (5.56%)、水蛭 (2.78%)。化瘀丸含药血清及空白血清由首都医科大学附属北京中医医院中心实验室制作。制备过程: 1) 制备化瘀丸浸膏; 2) SD 大鼠灌胃给药; 3) 血清的采集及保存。化瘀丸浸膏换算成生药浓度为 3940 mg/ml , 每只大鼠每日灌胃 3940 mg , 连续 4 天, 最后 1 次给药 1 h 后采集动脉血, 制成化瘀丸含药血清; 同时获取未给药大鼠血清作为空白血清^[5]。阿霉素 (批号: S120804), Selleck 公司。

1.3 主要试剂及仪器

四甲基偶氮唑蓝 (MTT, 批号: M5655)、Hoechst 细胞核染色液 (批号: C1022) 均为美国 Sigma Aldrich 公司产品; CCK-8 试剂盒 (批号:

基金项目: 国家自然科学基金 (81603579); 北京市自然科学基金项目 (7162083)

* 通讯作者: wangxiaomin_bhtem@126.com

CK04), 日本同仁化学 Dojindo 公司。激光扫描共聚焦显微镜 (型号: LSM780, Carl Zeiss 公司); 全波长多功能酶标仪 (型号: Multiskan Sky, Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 Lewis 细胞阿霉素给药浓度筛选

取对数期生长的 Lewis 细胞制备成单细胞悬液, 将细胞以 1×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 取 4 个 96 孔板, 每板分为 5 组, 分别设置阿霉素浓度为 2、1、0.5、0.1、0.01 $\mu\text{mol/L}$, 每个浓度 6 个复孔, 将细胞在恒温培养箱中培养 0、24、48、72 h; 每个时间点取出 1 个 96 孔板, 在每孔中加入 15 μl 配制好的 MTT 溶液, 继续孵育 4 h, 然后取出 96 孔板, 吸出培养基, 加入 150 μl DMSO 溶液, 放入多功能酶标仪中, 测定 480 nm 时的样品吸光度值 (OD 值), 重复 3 次。以 OD 值代表细胞的增殖数量, 筛选标准是在 72 h 内 Lewis 细胞的数量大于接种数量的一半, 且尽可能选择阿霉素较高的浓度。

2.2 化癥丸含药血清对 Lewis 细胞内阿霉素分布的影响

配制化癥丸含药培养基 (9 ml 基础培养基 + 1 ml 化癥丸含药血清) 和空白培养基 (9 ml 基础培养基 + 1 ml 空白血清)。将稳定生长的 Lewis 细胞 (3×10^5 个/皿) 放入 2 个共聚焦培养皿中, 分别加入 2 ml 化癥丸含药培养基和空白培养基。培养 48 h 后加入阿霉素溶液 (终浓度 0.1 $\mu\text{mol/L}$)。培养 10 h 后, PBS 冲洗两遍培养皿, 向培养皿中加入 Hoechst 细胞核染色液, 继续培养 1 h。冲洗完成后在激光共聚焦显微镜下观察细胞内阿霉素的分布。根据阿霉素自发荧光属性, 确定激光共聚焦显微镜激发波长 (480 nm) 和发射波长 (580 nm)。

2.3 化癥丸含药血清对 Lewis 细胞内阿霉素荧光信号强度的影响

取稳定生长的 Lewis 细胞放入 6 孔板中 (6×10^5 个/孔), 分别加入 2 ml 含药培养基和空白培养基, 培养 48 h 后加入阿霉素溶液 (终浓度 0.1 $\mu\text{mol/L}$)。继续培养 21 h 后, PBS 冲洗两遍, 加入 1 ml 的 PBS, 然后用细胞刮单方向将黏附的细胞轻轻刮下来, 制备细胞混悬液并进行细胞计数。根据细胞计数配制等浓度的细胞悬液, 然后将等量细胞悬液 (100 μl) 加到 96 孔板中, 稳定孵育 30 min 后将其放入多功能酶标仪中进行检测。多功能酶标仪选用与荧光阿霉素对应的激发波长

480 nm, 发射波长 580 nm, 通过酶标仪能够明确分析出细胞内阿霉素荧光信号的强度, 以代表阿霉素含量。

2.4 化癥丸含药血清对阿霉素干预 Lewis 细胞抑制率的影响

取稳定生长的 Lewis 细胞放入 2 个 96 孔板中 (1×10^4 个/孔), 2 个 96 孔板分别加入化癥丸含药血清组培养基和空白培养基 (制备方法同上), 每板又根据阿霉素给药浓度分为 6 组, 每组设 4 个复孔, 依次对应阿霉素终浓度分别为: 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 。培养 24 h 后加入不同量的阿霉素, 以达到上述终浓度要求。继续培养 48 h, 加入 20 μl 的 CCK-8 工作液混匀, 1 h 后于酶标仪上测定 A450 的 OD 值。空白孔调零后, 细胞抑制率 (IR) = (空白血清组 OD 值 - 化癥丸含药血清组 OD 值) / 空白血清组 OD 值 $\times 100\%$ 。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件分析。数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用独立样本双侧 t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 阿霉素给药浓度筛选结果

图 1 为 72 h 内 5 个浓度梯度 (2、1、0.5、0.1、0.01 $\mu\text{mol/L}$) 阿霉素作用下 Lewis 细胞生长曲线, 纵坐标以 OD 值代表相对细胞数量值, 横坐标代表药物作用时间。结果显示, 在浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时, 药物作用 72 h 后细胞数量仍维持在接种数量的一半以上, 且阿霉素药物浓度相对较高。故本研究选择阿霉素给药浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 。

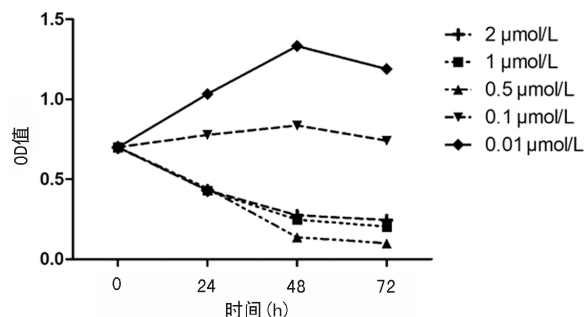


图 1 不同浓度阿霉素干预下 Lewis 细胞增殖情况

3.2 Lewis 细胞内阿霉素的分布情况

图 2 示 (彩图见前插三), Hoechst 染色可见细胞核呈蓝色荧光, 阿霉素显示红色荧光, 共定位染色后可见阿霉素定位在细胞核中。与空白血清组相比, 化癥丸含药血清组促进了 Lewis 肺癌细胞中

阿霉素从细胞外向细胞内转移。

3.3 Lewis 细胞内阿霉素荧光信号强度

化瘀丸含药血清组的 Lewis 细胞内荧光强度值为 78.43 ± 1.70 ，高于空白血清组的 61.33 ± 1.71 ($P < 0.001$)，提示化瘀丸含药血清促进了阿霉素向 Lewis 细胞内转移。

3.4 不同浓度阿霉素对 Lewis 细胞的抑制率比较

根据图 1 结果设定了阿霉素给药浓度为 $0.05 \sim 0.30 \mu\text{mol/L}$ 。表 1 示，在 0.20 、 0.25 、 $0.30 \mu\text{mol/L}$ 阿霉素给药浓度下，化瘀丸含药血清组细胞抑制率显著高于空白血清组 ($P < 0.05$)，且 $0.30 \mu\text{mol/L}$ 阿霉素给药浓度下细胞抑制率最高。

表 1 不同浓度阿霉素干预下两组血清对 Lewis 细胞抑制率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

阿霉素浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	化瘀丸含药 血清组	空白血清组	P 值
0.05	5.50 ± 2.07	14.69 ± 8.69	0.09
0.10	30.43 ± 5.28	28.09 ± 3.94	0.50
0.15	51.93 ± 4.45	49.28 ± 7.57	0.57
0.20	82.07 ± 2.40	53.51 ± 18.10	0.02
0.25	88.55 ± 1.45	64.10 ± 7.38	<0.01
0.30	91.50 ± 0.67	68.67 ± 3.28	<0.01

4 讨论

中医学认为，肿瘤的发生是由于正气不足、脏腑功能失调、气滞痰凝血瘀。王清任《医林改错》云“肚腹结块，必有形之血”，血瘀气滞，不通则痛；血瘀形成瘀血积聚，发为肿块而成癌瘤，故以肿块、疼痛、出血、消瘦、舌质紫暗或瘀斑为共同特点，故血瘀证贯穿于肿瘤发生、发展的全过程。现代研究^[6]发现，恶性肿瘤患者的血液常处于浓、黏、聚的高凝状态，这些血流成分和流态的异常所致的血流缓慢，甚或淤滞，虽然不能完全等同中医学的血瘀证，但在一定程度上反映了血瘀证的本质。因此，恶性肿瘤的治疗离不开活血化瘀法的运用，活血化瘀法与其他治疗大法并用可贯穿于治疗恶性肿瘤的始终。

郁仁存教授在多年临证基础上，根据肿瘤患者气虚血瘀毒结的病机特点提出了益气活血解毒法作为治疗中晚期恶性肿瘤的主要法则，据此开发出化瘀丸。化瘀丸重用活血药物，同时辅以益气药，取“气行则血行”“气为血之帅”之意，另外佐以适量解毒散结之品，以达到标本兼顾的效果。临床研究^[6,7]证实，化瘀丸联合化疗可降低肿瘤患者血瘀证候积分，改善血液高凝状态，并有提高化疗疗效、减少化疗毒副反应、提高患者生存质量的作用。

目前肺癌的化疗以含铂方案为主，而本课题选择阿霉素作为代表性化疗药，主要是基于阿霉素自发荧光属性，能够在激光共聚焦显微镜下直接观察和定位。阿霉素因其自带荧光的特性（激发波长 480 nm ，发射波长 580 nm ），Hochest 试剂因其能够标记细胞核，且激发波长和发射波长与阿霉素相差较大，在共聚焦下显示不同的颜色，通过与阿霉素的共定位，能够明确标识出细胞内荧光阿霉素的分布区域。本研究结果显示，化瘀丸含药血清促进了阿霉素从 Lewis 肺癌细胞外向细胞内转移，提高了细胞内化疗药物含量；因激光共聚焦显微镜检测结果多为定性研究，恐实验结果不精确，遂通过多功能酶标仪进一步定量分析细胞内阿霉素的含量，结果亦证实化瘀丸含药血清提高 Lewis 细胞内阿霉素药物含量。在明确了化瘀丸含药血清促进阿霉素转运入细胞内后，本研究进一步探讨了化瘀丸含药血清是否发挥了化疗增效作用。从结果可以看出，随着阿霉素浓度增大，其对细胞的抑制作用逐渐增大；当给予相同浓度的化疗药时（浓度 $\geq 0.20 \mu\text{mol/L}$ ），化瘀丸含药血清发挥了化疗协同增效作用。中药化瘀丸如何通过促进阿霉素进入细胞内发挥化疗增效作用是未来研究的方向。

参考文献

- [1] FENNEL DA, SUMMERS Y, CADRANEL J, et al. Cis-platin in the modern era: The backbone of first-line chemotherapy for non-small cell lung cancer [J]. Cancer Treat Rev, 2016, 44: 42 - 50. doi: 10.1016/j.ctrv.2016.01.003.
- [2] 罗敏. 郁仁存教授治疗肿瘤的学术思想总结 [J]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
- [3] 郁仁存. 益气活血法抗肿瘤的临床研究 [J] // 中国中西医结合学会肿瘤专业委员会. 第二届国际中西医结合、中医肿瘤学术研讨会论文汇编. 北京: 中国中西医结合学会, 2004: 4.
- [4] 于明薇, 杨国旺, 王笑民. 化瘀丸联合化疗对小鼠 Lewis 肺癌生长及血栓形成相关因子的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(12): 3179 - 3183.
- [5] 马雪曼. 化瘀丸对 4T1 乳腺癌生长转移的干预作用及其基于血小板途径的抗肿瘤机制的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [6] 富琦, 王笑民, 杨国旺. 肺癌患者化疗期间中医证型及升血汤干预作用研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(9): 17 - 19.
- [7] 杨中, 徐咏梅, 张青, 等. 化瘀丸联合化疗治疗晚期卵巢癌临床研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(7): 17 - 19.

The Effects of Drug-containing Serum of *Huayu Pills* (化瘀丸) on Doxorubicin Concentration in Lewis Cells

GAO Lei^{1,2}, HAO Caixia², YANG Guowang², MA Xueman², ZHANG Ganlin², YU Mingwei², WANG Xiaomin²

1. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100078; 2. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing, 100010, China

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of drug-containing serum of *Huayu Pills* (化瘀丸) on doxorubicin content in Lewis cells of lung cancer. **Methods** Screen the concentration of doxorubicin in Lewis cells by MTT method. The stably growing Lewis cells were added drug-containing serum of *Huayu Pills* medicated medium and blank medium, and after 48 hours of cultivation, doxorubicin solution of final concentration was added. The distribution of doxorubicin in the cells was observed under a microscope, and the multi-functional microplate reader quantitatively determined the change in the fluorescence signal intensity of doxorubicin in the cells. Effects of the drug-containing serum of *Huayu Pills* on the sensitivity of doxorubicin chemotherapy was determined by MTT method. **Results** The concentration of doxorubicin is 0.1 $\mu\text{mol/L}$. Doxorubicin is localized in the nucleus. Compared with the blank serum group, the drug-containing serum group of *Huayu Pills* promoted the transfer of doxorubicin from Lewis lung cancer cells from extracellular to intracellular. The fluorescence intensity value of Lewis cells in the serum-containing group of *Huayu Pills* was 78.43 ± 1.70 , higher than 61.33 ± 1.71 in the blank serum control group ($P < 0.001$). At 0.20, 0.25, and 0.30 mol/L doxorubicin administration concentration, the cytostatic rate of drug-containing serum of *Huayu Pills* group was significantly higher than that of blank serum group ($P < 0.05$), and 0.30 $\mu\text{mol/L}$ doxorubicin administration concentration got the highest cell suppression rate. **Conclusion** Drug-containing serum of *Huayu Pills* can increase doxorubicin content in Lewis cells and has the synergistic effect with chemotherapy.

Keywords lung cancer; *Huayu Pills* (化瘀丸); adriamycin

(收稿日期: 2019-07-13; 修回日期: 2020-02-15)

编辑: 王利芬