

至生胶囊对食管癌 Eca-109 细胞作用的 体内外实验研究

王祥麒^{1*} 杨 峰² 蒋士卿³ 王一博⁴

(1. 河南中医学院第三附属医院, 河南省郑州市金水路 1 号, 450008; 2. 河南省肿瘤医院;

3. 河南中医学院; 4. 河南中医学院肿瘤研究所)

基金项目: 河南省科技厅 2008 年度重点科技攻关项目(082102310017)

* 通讯作者: wangxiangqi777@163.com, (0371) 65680126

[摘要] **目的** 探讨至生胶囊在体内、体外对食管癌 Eca-109 细胞的作用及作用机理。**方法** 体内实验: 将 BALB/c 裸鼠 50 只随机分为至生胶囊低、中、高剂量组、环磷酰胺注射液 (CTX) 组、空白组 5 组, 每组 10 只。造模成功后, 低、中、高剂量组分别灌服至生胶囊 0.25 g/kg、0.5 g/kg、0.75 g/kg; CTX 组按 40 mg/kg 给 CTX; 空白组给等容积生理盐水, 各组均每日 1 次, 连续 10 天, 观察各组小鼠体重及瘤重的变化。体外实验: 将日本大耳白兔 10 只随机分为至生胶囊低、中、高剂量组、CTX 组及空白组 5 组, 每组 2 只, 制备含药血清, 分别加入 Eca-109 细胞悬液中, 培养 72 h, 测 OD 值, 显微镜下观察细胞的形态学及细胞数目改变。**结果** 体内实验: 至生胶囊低、中、高剂量减轻瘤重的作用随浓度的增加而增强 ($P < 0.05$), 呈一定的量效关系, 至生胶囊中剂量组在抑制肿瘤的同时能增加小鼠体重。体外实验: 至生胶囊高剂量组对 Eca-109 细胞的抑制作用与 CTX 相当 ($P > 0.05$); 至生胶囊对 Eca-109 细胞的抑制作用呈明显的量效关系 ($P < 0.05$); 镜下观察, 各至生胶囊组及 CTX 组见部分细胞出现皱缩、变小变圆、折光性降低、脱壁死亡等。**结论** 至生胶囊在体内、体外实验中, 均对食管癌 Eca-109 细胞有明显的抑制作用, 呈量效关系, 其抗肿瘤作用可能与引起肿瘤细胞凋亡有关。

[关键词] 至生胶囊; 食管癌 Eca-109 细胞; 体内实验; 体外实验; 抑制率

In Vivo and in Vitro Study on the Effect of Zhisheng Capsule on Human Esophageal Cancer Eca-109 Cells

WANG Xiangqi¹, YANG Feng², JIANG Shiqing³, WANG Yibo⁴

(1. The Third Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450008; 2. Tumor Hospital of Henan Province;

3. Henan University of TCM; 4. Cancer Institute, Henan University of TCM)

ABSTRACT **Objective** To observe the inhibition of the Zhisheng Capsule (To-life Capsule) in vivo and in vitro on human esophageal cancer Eca-109 cells and to study its functional mechanism. **Methods** *In vivo*: Fifty BALB/c mice were randomized into five groups, i. e. Zhisheng Capsule small, medium, large dosage group, cytoxan (CTX) group and blank control group, 10 mice for each group. After modeling, Zhisheng Capsule small, medium and large dosage group were given Zhisheng Capsule 0.25 g/kg, 0.5 g/kg and 0.75 g/kg respectively, CTX group was given CTX 40 mg/kg, and blank control group was given normal saline. All groups were treated once per day for 10 days to observe changes of body weight and tumor weight. *In vitro*: Ten Japanese white rabbits were equally divided into small, medium, and large dose of Zhisheng Capsule groups, CTX group, and blank control group. The medicine-contained serum was added into the Eca-109 cells suspension. After cultured for 72 hours, the optical density (OD) value was measured. The microscopic observation on the changes in morphology and number of cells were carried out. **Results** The effect of Zhisheng Capsule on tumor weight was stronger with the increase of concentration ($P < 0.05$), showing dosage-effect relation, body weight was increased accompanied with the inhibition of tumor weight in Zhisheng Capsule medium dose group. The inhibition effect on Eca-109 cell was equal in Zhisheng Capsule large dose group and CTX group ($P > 0.05$). Zhisheng Capsule significantly inhibited Eca-109 cells with dose-effect relation ($P < 0.05$). The microscopic observation showed that some cells became shrunken, changed to smaller in size and round in shape, decreased in refraction, and died of off-wall in all treated groups. **Conclusion** Zhisheng Capsule significantly inhibits human esophageal cancer Eca-109 cells with a dose-effect relationship. Its anti-tumor effect may be related to the cause of apoptosis of tumor cells.

Key Words Zhisheng Capsule (To-life Capsule); esophageal cancer Eca-109 cells; in vivo experiment; in vitro experiment; inhibition rate

食管癌晚期放疗的 5 年生存率低, 单用化疗效果不佳, 且放、化疗毒副作用大。至生胶囊治疗晚期恶性肿瘤有较好疗效, 与化疗合用治疗中晚期食管

癌有效率为 66.7%^[1], 其对于环磷酰胺引起的白细胞降低有一定的抑制作用, 并且可以提高机体的体液免疫及非特异性免疫能力, 可以明显增强小鼠耐

缺氧能力,延长小鼠在常压缺氧条件下的生存时间,中剂量明显延长小鼠的游泳时间,可以提高小鼠的应激能力,具有增强体能及抗疲劳能力^[2]。为了进一步探讨其作用机制,本研究观察了该制剂在体内、体外对人食管癌 Eca-109 细胞的抑制作用,现报告如下。

1 材料

1.1 药物

至生胶囊由麝香、莪术、冰片、牛黄、冬虫夏草、西洋参等中药组成,由河南中医学院肿瘤研究所提供生药粉,0.25g × 60 粒/瓶,2 粒/次,2~3 次/日,最大用量 6 粒/日。环磷酰胺注射液(CTX),批号:07011721,江苏恒瑞医药股份有限公司生产。

1.2 细胞株及试剂

人食管癌 Eca-109 细胞株:郑州大学肿瘤中心实验室提供。RPMI-1640 培养基:美国 Gibco 公司产品。二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑蓝(MTT):美国 Sigma 公司。

1.3 动物

6 周龄免疫缺陷 BALB/c 裸鼠,体重(20.0 ± 2.0)g,购自中国科学院北京实验动物中心,合格证号:SCXK(京)2005-0013。日本健康大耳白兔,雌雄各半,体重 2~3kg,动物许可证号:SCXK(疗)2009-0004,辽宁医学院动物中心提供。

2 方法

2.1 动物体内实验造模、分组与给药方法

结合文献[3]的方法,收集对数期生长 Eca-109 细胞,1000r/min 离心,无血清 DMEM 培养基洗涤 2 次,细胞计数,用不含血清的 DMEM 培养基调细胞浓度至 1×10^7 /ml,接种于小鼠右前腋皮下,0.2ml/只。应用随机数字表法将 50 只裸鼠分成至生胶囊低、中、高剂量组(简称低、中、高剂量组)及 CTX 组、空白组,每组 10 只。

低、中、高剂量组裸鼠,分别以至生胶囊临床最大用量的 10、20、30 倍给药,即 0.25g/kg、0.5g/kg、0.75g/kg;空白组给等容积生理盐水;CTX 组按 40mg/kg 给 CTX。各组均于接种 Eca-109 细胞 24h 后灌胃给药,临用前将药物以生理盐水配制成适当浓度,0.4ml/次,各组均每日 1 次,连续给药 10 日。

2.2 动物体外实验(细胞实验)造模、分组与给药方法

将已贴壁融合的 Eca-109 细胞消化后制成细胞悬液,采用 96 孔培养板,接种细胞浓度约为 5×10^4

个/ml,每孔加入 180 μl 细胞悬液。10 只健康日本大耳白兔,应用随机数字表法随机分为低、中、高剂量组,CTX 组及空白组,每组 2 只。

低、中、高剂量组大耳白兔,分别以至生胶囊临床最大用量的 10、20、30 倍给药,即 0.25g/kg、0.5g/kg、0.75g/kg,每日 1 次;空白组及 CTX 组给等容积生理盐水,均每天早晚各灌胃 1 次,临用前将药物以生理盐水配制成适当浓度,10ml/次,各组均连续给药 3 日,末次给药后 2h 从耳中央动脉无菌采血 10ml,室温静置 2h,待血凝坚实,血清析出后,1500r/min 离心 10min,CTX 组于取血清后按 40mg/kg 加入 CTX。56℃、30min 灭活,-20℃保存,1 月内使用。各组 Eca-109 细胞培养 24h 后,换液,加入对应组别的含药血清各 20 μl,继续培养 72h 后,加入 20 μl MTT,培养 4h 后弃去上清液,加入 180 μl DMSO 溶液,震荡 10min,使充分溶解。

2.3 观察指标

小鼠实验前后称重,计算体重差值,于末次给药后 24h 脱颈处死,取瘤称重。体重差值(g) = 实验后体重 - 实验前体重 - 瘤重。抑瘤率(%) = (对照组平均瘤重 - 给药组平均瘤重) / 对照组平均瘤重 × 100%。

体外实验以酶标仪 492nm 处测定各组细胞 OD 值。抑制率(%) = (对照组 OD 值 - 给药组 OD 值) / 对照组 OD 值 × 100%。

2.4 统计学方法

应用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学处理,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多样本均数的比较采用方差分析。方差不齐时进行变量转换。组间对比采用 SNK 法。

3 结果

3.1 体内实验中各组对小鼠实体瘤的抑制作用比较

表 1 示,各治疗组均能减轻荷瘤小鼠的瘤重($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。低、中、高剂量组间对比,抑瘤率有统计学差异($P < 0.05$),说明其对减轻瘤重的作用随浓度的增加而增强,呈一定的量效关系。CTX 组小鼠的体重明显降低,与空白组比较均有统计学差异($P < 0.01$),中剂量组使小鼠体重明显增加,与空白组及低、高剂量组比较均有统计学差异($P < 0.05$),低、高剂量组与空白组体重差值比较有统计学差异($P < 0.05$),说明中剂量组在抑制肿瘤的同时能增加小鼠体重。

表 1 各组对小鼠实体瘤的抑制作用比较					
组别	鼠数	剂量 (g/kg)	体重差值 (g, $\bar{x} \pm s$)	瘤重 (g, $\bar{x} \pm s$)	抑瘤率 (%)
空白组	10	—	3.89±3.08	1.26±0.59	0
CTX 组	10	0.04	3.16±2.44* *	0.17±0.12* *	87
低剂量组	10	0.25	4.01±2.42*△	0.86±0.28* *	32
中剂量组	10	0.50	4.72±2.46*	0.77±0.31*	39
高剂量组	10	0.75	3.97±2.31*△△	0.54±0.27*△	57

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与中剂量组比较, $\Delta P<0.05$

3.2 体外实验中各组对 Eca-109 细胞抑制作用比较

表 2 示,至生胶囊作用 72h 后,中、低剂量组与 CTX 组比较,抑制率有统计学差异($P<0.05$),高剂量组与 CTX 组比较,抑制率无统计学差异($P>0.05$),说明高剂量组对 Eca-109 细胞的抑制作用与 CTX 相当。高、中、低组间对比显示,抑制率有统计学差异($P<0.05$),说明至生胶囊对 Eca-109 细胞的抑制作用随药物浓度增高而增强,呈明显的量效关系。

表 2 各组对 Eca-109 细胞抑制作用比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	鼠数	OD 值	抑制率(%)
对照组	2	1.334±0.047	0
CTX 组	2	0.664±0.076	50
低剂量组	2	1.101±0.061	17*
中剂量组	2	0.845±0.059	36*△
高剂量组	2	0.684±0.080	48△▲

注:与 CTX 组比较,* $P<0.05$;与低剂量组比较, $\Delta P<0.05$;与中剂量组比较,▲ $P<0.05$

3.3 体外实验中各组细胞形态学比较

至生胶囊作用 72h 后,倒置显微镜下观察发现,对照组细胞均呈贴壁生长,细胞轮廓清楚,生长旺盛;各至生胶囊组及 CTX 组细胞集落减少,细胞中颗粒增多,随剂量增高,细胞碎片增多。部分细胞出现皱缩、变小变圆、折光性降低,脱壁死亡等。

4 讨论

食管癌属中医“噎膈”范畴。临床多见吞咽梗阻,咽食不顺,甚则不能进食,伴胸痛、消瘦、呕吐痰涎等,多属痰瘀交阻,气阴亏虚证。徐灵胎评《临证指南医案·噎膈反胃》曰:“噎膈之证,必有瘀血、顽痰、逆气阻膈胃气”。因此,气、火、痰、瘀为本病基本病机,治疗当以活血化瘀、开郁通噎为主,辅以益气养阴、培本扶正。至生胶囊由麝香、莪术、冰片、牛黄、冬虫夏草、西洋参等中药组成。方中麝香活血通经、消肿止痛;莪术行气破血、消积止痛;冰片清热止痛;牛黄

清心解毒、豁痰开窍,凉肝熄风;冬虫夏草补虚损、益精气;西洋参补气养阴、清热生津。诸药合用,共奏理气化痰、活瘀散结、消肿止痛、扶正固本之功,能对食管癌等肿瘤产生消散回缩、缓解症状的效果。药理研究发现,麝香对艾氏腹水癌、小鼠肉瘤细胞有抑制作用;莪术含有倍半萜类挥发油等活性成份,具有抗肿瘤作用,对小鼠肉瘤、腹水型肝癌细胞等均有明显的抑制或破坏作用,对特异性免疫有增强作用,并有抑制血小板聚集、血栓形成,促进微动脉血流,促进血块吸收的作用;冰片主要成分为左旋、右旋或消旋龙脑,有抗炎、止痛作用,能缓解肿瘤后期疼痛。本研究中体内实验表明,至生胶囊能明显减轻荷瘤小鼠的瘤重,且减轻瘤重的作用随浓度的增加而增强,呈一定的量效关系。高、低剂量组不引起荷瘤小鼠的体重降低,中剂量组使荷瘤小鼠的体重增加。体外实验表明,至生胶囊对 Eca-109 细胞的抑制作用随药物浓度升高明显增强,呈明显的量效关系,至生胶囊高剂量组对 Eca-109 细胞的抑制作用与 CTX 相当;光镜下观察,可见部分细胞出现皱缩、变小变圆、折光性降低、脱壁死亡等,表明至生胶囊能诱导 Eca-109 细胞凋亡,其抗肿瘤作用可能与引起肿瘤细胞凋亡有关。

参考文献

[1]王祥麒,杨峰.至生胶囊联合化疗治疗中晚期食管癌 24 例临床观察[J].现代药物与临床,2010,25(4):297-299.
[2]杨海燕,张黎莉.至生胶囊对小鼠免疫功能的影响及其升白作用和抗应激能力的研究[J].中成药,2010,32(2):293-296.
[3]司富春.启膈散及其拆方对人食管癌 Eca-109 细胞裸鼠移植瘤血管生成的抑制作用[J].世界华人消化杂志,2008,16(28):3139-3140.

(收稿日期:2010-08-01;修回日期:2010-11-25)

[编辑:侯建春]

长期销售空心胶囊

本产品严格按照国家标准和《中国药典》规定的
质量要求生产,符合药用各项指标,有 0 号、1 号、2
号等多种型号、多种颜色可供选择。本公司以合理的
价格欢迎单位和个人来电来函咨询。对用量少的单
位和个人将办理邮购业务。价格:每万粒 135 元(含
邮资)。

地址:浙江新昌县一诺胶丸有限公司,邮编:
312560,电话:(0575)86061888,013706852676,联系
人:潘炎锋