

复方犀黄丸含药血清体外抗癌作用的研究

熊 鹰 孔小云 陈如山 刘新民 金庆文

深圳市红十字会医院消化内科, 深圳 518030

摘要 目的: 探讨中药复方犀黄丸对人肝癌细胞体外生长的影响。方法: 制备中药含药血清, 采用 MTT 法检测体外培养肝癌细胞的生长抑制率。结果: 犀黄丸含药血清对肝癌细胞生长抑制率达 39%。10%、15%、20% 含药血清组对癌细胞的生长抑制率高于对照组及 2.5%、5% 组 ($P < 0.05$)。其血清浓度与抑制率呈直线相关。结论: 血清药理学方法是研究中药复方抗癌作用的有效方法, 复方犀黄丸对肝癌细胞体外生长有一定的抑制作用。

关键词 肝肿瘤, 实验性; 犀黄丸; 血清药理学

中图分类号 R735.7

Application of Serologic Pharmacologic Method in the Study of Anti-Carcinogenic Property of Chinese Herbal Mixture Xihuangwan in Vitro

XIONG Ying, KONG Xiaoyun, CHEN Rushan, et al

Department of Gastroenterology, Shenzhen Red Cross Hospital, Shenzhen 518030

Abstract Objective: To investigate the effect of chinese herbal mixture Xihuangwan on the cell growth of liver neoplasm in vitro. **Methods:** The serologic pharmacological method and MTT assay were used. **Results:** The suppress rate of cells treated with Xihuangwan was nearly 39%, which were much more higher in 10%, 15% and 20% groups than in control, 2.5% and 5% groups. There existed a line relation between the concentrations of this herbal mixture and its suppress rate. **Conclusion:** The serologic pharmacologic method is effective in anti-carcinogenic property of Chinese herbal mixture, it has some inhibitory effect on tumor cell proliferation in vitro.

Key words Liver neoplasm; Xihuangwan; Serologic pharmacology

许多研究表明^[1], 中医药治疗原发性肝癌适应范围广, 毒副作用小, 能明显延长患者生存期, 改善生存质量, 抑制肿瘤生长速度, 因而在肝癌尤其是中晚期肝癌治疗中占有重要地位, 然而多数中药治疗的确切机制尚不清楚, 加之中药复方往往杂质较多, 且多数通过口服发挥直接或间接的治疗效果, 体内外实验结果常不一致, 影响研究结果的可靠性。本研究应用血清药理学方法, 探讨复方犀黄丸体外抗肝癌细胞生长作用, 为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 含药血清制备

中药复方犀黄丸由真犀黄、麝香、乳香、没药组成, 生药由湖北省中药材公司中药分公司提供, 按工艺制成含生药量 0.5 g/ml 的浸膏备用。以日本大耳

白兔 5 只, 每日给予药液 1.12 g/kg 灌胃, 10 d 后, 于最后 1 次灌药后 1 h (灌药前禁食 12 h), 乙醚麻醉, 颈动脉采血, 无菌分离血清, 经过 56 °C, 30 min 灭活后, 置 -20 °C 冰箱保存备用。

1.2 含药血清对人肝癌细胞的增殖抑制作用

采用 MTT 法。人肝癌细胞系 (Be1-7402) 由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。DMEM 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶由美国 Gibco 公司提供; MTT 及其他常用试剂购自华美公司。

人肝癌细胞的传代培养: 用 50 ml 的塑料培养瓶, 将人肝癌细胞系 (Be1-7402) 接种于含 100 U (100 μg/ml) 青、链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中 (下称完全培养液), 细胞浓度为 2×10^4 /ml, 置于含 5% CO₂ 37 °C 的培养箱中培养。待细胞形成单层, 常规消化, 收集细胞, 0.5% 台盼蓝染色, 其细胞活性在 98% 以上。将细胞调整浓度, 接种于 96 孔

*广东省科委资助项目 (No. 9801)

培养板中,每孔的细胞浓度为 2×10^5 /ml,接种 0.2 ml 细胞悬液,继续培养 24 h 后,弃培养液,分别加入 2.5%、5%、10%、15%、20% 的含药血清,设无含药的兔血清对照组和完全培养液对照组,每组 5 孔,继续培养。培养 48 h 后,用 MTT 比色法检测细胞杀伤率。每孔加入 MTT 溶液 20 μ l (5 mg/ml), 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h,小心吸去每孔中的培养液,每孔再加入 150 μ l 的二甲基亚砷(DMSO),在微型震荡器上震荡 20 min,用全自动酶标仪测定各孔 OD 值,测定波长为 570 nm。计算公式:肿瘤细胞杀伤率(%) = (对照孔测定的平均 OD 值 - 加药组测定的平均 OD 值) / 对照孔测定的平均 OD 值 \times 100%。

1.3 统计学处理方法

计量资料采用 *t* 检验。

2 结果

将中药制剂直接加入体外培养细胞中,导致培养液混浊不清,细胞培养 24 h 后,台盼蓝染色显示细胞大部分死亡,无法进行指标的检测。MTT 测定结果表明,含药血清对人肝癌细胞的增殖抑制率可达 39%,中药含药血清对肝癌细胞株 Bel-7402 生长有一定的抑制作用,且抑制率随含药血清浓度增加而增多,经统计学处理,10%、15%、20% 含药血清组对细胞的生长抑制率高于对照组及 2.5%、5% 组(均 $P < 0.05$)。其血清浓度与抑制率呈直线相关。

3 讨论

1984 年日本学者最早提出中药血清药理学方法。所谓中药血清药理学技术是指动物经口给药后一定时间采血,分离血清,用此含药物成分的血清进行体外实验的技术。这种血清所含有的药物成分是经过体内一系列生物转化后真正发挥作用的有效成分,同时也包括那些在药物作用下机体所产生的内生性有效成分;另外,血清的理化性质与细胞所处的生理环境基本等同,从而克服了中药制剂本身的理化性质对实验结果的干扰。因此,尤适用于中药复方的体外研究。采用血清药理学方法可反映该中药的体内效应,从而提高实验结果的可信度。我们也尝试用中药制剂直接加入体外培养细胞中。结果一方面培养液混浊不清,另一方面细胞培养 24 h 后,台盼蓝染色显示细胞大部分死亡,无法进行指标的检测。

动物给药的剂量应如何掌握?其中存在的问题是含药血清加入体外反应系统后,浓度将被稀释。例如以等效剂量给予实验动物,取其血清以 1/10 的体积加入反应系统(如 100 μ l 培养液中含有 10 μ l 含药血清),则血药浓度被稀释 10 倍。因此,如何使体外反应系统中具有与在体中可比拟的药浓度,是

第一个需要考虑的问题。李仪奎^[2]提出两种方法供参考:①血清冻干粉法;②增大给药剂量。参考公式:给药剂量 = 在体试验的给药剂量 \times 反应系统中被稀释的倍数。这一方法可以部分地弥补含药血清在体外系统中被稀释,但存在两个问题:一是血药浓度并不能与给药剂量呈等倍数的提高;二是给药剂量可以提高的倍数受到药物体积的限制,特别是中药复方体内给药剂量常较大,由于受到灌胃药物浓度和体积的限制,不可能达到公式所要求的量。我们采用人体与动物剂量转换(按体表面积计算),同时加大 5 倍量。关于采血时间根据目前掌握的大量药物的有效成分的药物代谢动力学数据,多数作者选择在最后一次给药后 1~2 h 采血^[2]。

1983 年, Mosmann 等根据细胞能量代谢水平与 DNA 合成水平相平行的原理,建立了四甲基偶氮唑盐[(MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide)]比色法。由于黄色的 MTT 能被活细胞线粒体脱氢酶(如琥珀酸脱氢酶和心肌黄酶)还原成蓝紫色的甲瓞。死细胞则无这种能力,从而可用比色法推测细胞的存活和增殖程度。该方法操作简单、快速、敏捷,明显优于染料排斥法,与掺入同位素释放法测定结果一致。因此近年来已被有效应用于生物学和医学的许多研究之中,其中在肿瘤研究中的应用日益广泛。在此方面,除应用该法测定荷瘤小鼠或肿瘤患者的自然杀伤细胞、肿瘤坏死因子活性以外,还开始进行抗癌药物体外敏感性试验。美国国立癌症研究所已用其作为常规筛选化疗药物的方法^[3]。我们应用此法来研究犀黄丸不同浓度的含药血清在相同条件下对人肝癌细胞的增殖抑制作用。实验结果发现,犀黄丸含药血清对肿瘤细胞生长有明显的抑制作用,且随着浓度的增加而增多。其血清浓度与抑制率呈直线相关。

本研究通过血清药理学方法并结合 MTT 法,结果表明含中药血清对人肝癌细胞 Bel-7402 的生长具有抑制作用,并随含药血清浓度增加而增加,进一步证实该方有一定的抑制肝癌细胞的作用,但其抗癌作用机制尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 黄立中,田 晖. 原发性肝癌中医治法的临床研究. 湖南中医学院学报, 1996, 16(3): 14.
- 2 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题. 中药新药与临床药理, 1999, 10(2): 95.
- 3 李 杰,刘玉琴. MTT 法在肿瘤研究中的改良及应用进展. 中国肿瘤临床, 1998, 25(4): 312

(收稿日期: 2000-12-21)