

西黄丸对人肝癌细胞 SMMC7721 及小鼠宫颈癌细胞 U14 周期的影响

金沈锐¹, 祝彼得¹, 秦旭华², 陈胡兰²

(1. 成都中医药大学基础医学院, 四川 成都 610075; 2 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075)

摘要:目的 研究西黄丸抑瘤作用对肿瘤细胞周期的影响。方法 采用体内体外两方面实验进行。体外实验:将西黄丸浸提液加入人原发性肝癌细胞株 SMMC7721 培养基中,72 h 后流式细胞术测定 SMMC7721 细胞的细胞周期;体内实验:连续 10 d 给予移植性 U14 荷瘤小鼠模型西黄丸,10 d 后流式细胞术测定 U14 细胞的细胞周期。结果 在体外实验中,西黄丸 (200 μl/ml) 使 SMMC7721 中 G₀ - G₁ 期细胞比例显著低于肿瘤细胞对照组, G₂ - M 期增多;在体内实验中,西黄丸高剂量组 (0.96 g/kg) 中也导致 U14 细胞 G₀ - G₁ 期细胞比例显著低于模型组, G₂ - M 期细胞增多。结论 体内、体外研究结果显示西黄丸可特异性地将肿瘤细胞阻滞在 G₂ - M 期,提示西黄丸可以通过影响肿瘤细胞周期来发挥抑瘤效应。

关键词:西黄丸; 抗肿瘤; 细胞周期

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-0805 (2007) 11-2782-02

Effects of Xihuang Pill on Cell Cycles of Human Hepatoma Carcinoma Cell Strain (SMMC7721) and Mouse Uterine Cervix Cancer (U14)

JIN Shen-rui¹, ZHU Bi-de¹, QIN Xu-hua², CHEN Hu-lan²

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Preclinical Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan 610075, China; 2 College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan 610075, China)

Abstract Objective To study the antitumour effect of Xihuang Pill on cell cycles of cancer cells. **Methods** Leachate of Xihuang pill was used to treat human malignant tumor cell strains (SMMC7721) *in vitro*, after 48 hours the cycle of tumor cells was determined by flow cytometry. At the same time, Xihuang pill was used to treat tumor-bearing mice (U14) for 10 days *in vivo*, the cycle of U14 cells was determined by flow cytometry. **Results** Experiment *in vitro* showed that the proportion of G₂ - M of SMMC7721 treated by leachate of Xihuang pill was high ($P < 0.01$), and experiment *in vivo* showed that the proportion of G₂ - M of U14 being treated by Xihuang pill was high too ($P < 0.01$). **Conclusion** Xihuang pill can block the tumor cells in G₂ - M stage. This indicates that Xihuang pill can affect the cycle of cancer cells so as to block cancer growth.

Key words Xihuang pill; Antitumour effect; Cell cycle

西黄丸为中药抗癌名方,功效活血化淤、清热解毒、消肿止痛。临床文献报道,西黄丸用于乳腺癌、肝癌、白血病等多种恶性肿瘤的治疗,取得了肯定的疗效。在既往的研究中发现,西黄丸可抑制肿瘤细胞的生长。为了进一步研究西黄丸抑瘤的特点,笔者采用体外、体内实验的方法,考察了它对肿瘤细胞周期的影响,具体实验如下。

1 材料

1.1 药物 西黄丸,九寨沟天然药物集团有限公司生产,批号 030501。体外实验采用西黄丸低温浸提液,体内实验采用西黄丸混悬液进行。西黄丸低温浸提液制备方法:采用密闭容器,以预冷 4℃ 的 RPMI-1640 培养液浸泡西黄丸 24 h (比例为 0.1 g/ml),超声振荡助溶 2h,复以 4℃ 下继续浸泡 48 h 后取上清液,用 0.22 μm 微孔滤器过滤后,得到西黄丸低温浸提液。实验时用 RPMI-1640 培养液稀释至所需浓度使用。

1.2 试剂 RPMI Medium 1640 培养基 Gibco 公司,批号 1165062;胰蛋白酶 (Trypsin, 1:250) Serva 公司,批号 27043C;RNA 酶 (RNase) Roche 公司,批号 90436528;新生小牛血清 (Newborn Bovine Serum, NBS) 三利生物制品厂,批号 20040101;碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) Sigma 公司,广州展晨生物科技有限公司进口分装。

收稿日期:2007-01-30; 修订日期:2007-04-30

作者简介:金沈锐 (1968-),男 (汉族),四川成都人,现任成都中医药大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室副教授,博士学位,主要从事中药抗肿瘤研究工作。

1.3 细胞株 人原发性肝癌细胞株 SMMC7721,由成都中医药大学病理教研室提供。细胞株用含 10% 新生小牛血清的 RPMI-1640 培养基培养,细胞贴壁达 80% 时传代。

1.4 动物 昆明种小鼠,雌性,18~22 g,成都中医药大学实验动物中心提供,批号 SCXK (川) 2004-11。

1.5 仪器 Beckman Coulter Epic XL 流式细胞分析仪; Heraeus Biofuge Stratos 低温离心机。

2 方法

2.1 体外实验

2.1.1 分组 体外实验分对照组 (含人肿瘤细胞)、实验组 (含人肿瘤细胞和西黄丸浸提液,设两个浓度 100, 200 μl/ml)。

2.1.2 方法 取对数生长期的 SMMC7721, 0.25% 胰蛋白酶消化,计数细胞,用 1640 培养基稀释成 5×10^5 /ml 浓度的单细胞悬液,然后取每孔 1 000 μl,接种到 6 孔板上,置 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度的细胞培养箱中,培养 6 h 待细胞贴壁后,设对照组、实验组,均设 4 复孔。对照组用等体积 1640 培养液代替受试药物,实验组加入不同浓度的药物,每孔 200 μl, 6 孔板置 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度的细胞培养箱中,培养 72 h 后。弃培养液,收集 6 孔板内的细胞, PBS 洗涤离心后, 70% 乙醇固定 12 h, 去乙醇,经 PBS 洗涤 2 次,加 P 染料混匀,置 4℃ 冰箱避光染色 30 min 后,上机检测细胞周期,每次测定 10 000 个细胞。

2.2 体内实验

2.2.1 小鼠移植性恶性肿瘤细胞株 小鼠宫颈癌 U14 由成都中医药大学病理教研室提供。

2.2.2 小鼠移植性肿瘤的接种与传代 根据文献方法^[1,2]将液

氮冻存昆明小鼠子宫癌瘤株进行复苏,经体外培养增殖,生长稳定后以 5×10^6 细胞量接种于昆明小鼠腹腔内,待其长出癌性腹水后传代培养至 5 代,取小鼠无血性的癌性腹水,供接种使用。实验时将第 5 代的肿瘤小鼠癌性腹水用无菌生理盐水调整细胞数至 5×10^6 ,接种于昆明小鼠右侧腋窝皮下(每只皮下注射 0.1 ml),建立移植性 U14 荷瘤小鼠模型。

2.2.3 动物分组 实验时取昆明小鼠 30 只,按体重分层随机分为 3 组,每组 10 只动物,分模型对照组、西黄丸高剂量组、西黄丸低剂量组。各组均使用移植性荷瘤小鼠。

2.2.4 给药及实验方法 模型对照组给予等体积蒸馏水灌胃;西黄丸低剂量组给予西黄丸混悬液 0.48 g/kg 灌胃给药(西黄丸每日人用量 6 g,以 50 kg 为正常人体重计算,给药量相当于人用量 9 倍);西黄丸高剂量组给予西黄丸混悬液 0.96 g/kg 灌胃给药(给药量相当于人每日用量 18 倍)1 次/d,于动物接种后 1 d 开始给药。连续给药 10 d,处死动物,剥离皮下瘤块,在 PBS 中用眼科剪将瘤块剪碎后,经 300 目筛过滤除去成团细胞,离心 800 r/min,5 min,取上层液体,经 1500 r/min 离心 10 min,弃上清,离心后得的细胞,再次经 PBS 洗涤 1 次后,70% 的乙醇固定 24 h,去乙醇,经 PBS 洗涤 2 次,加 P 染料混匀,置 4℃ 冰箱避光染色 30 min 后,上机检测细胞周期,每次测定 10 000 个细胞。

2.3 统计学方法 用《中国医学百科全书·医学统计学》统计软件包 PEMS3.1 进行。

3 结果

见表 1~2。

表 1 西黄丸对 SMMC7721 细胞周期 (72h) 的影响 (体外) ($\bar{x} \pm s$)

组别	培养液中药物浓度 C/ $\mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$	G ₀ - G ₁ (%)	S (%)	G ₂ - M (%)
模型	0	67.2	31.3	1.5
西黄丸低浓度	100	63.6*	34.6	1.8
西黄丸高浓度	200	63.3*	29.0	7.7*

与模型组比较, * $P < 0.01$; $n = 4$

表 1 可见,与肿瘤细胞对照组相比,西黄丸浸提液 100, 200 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 使 G₀ - G₁ 期细胞明显减少 ($P < 0.01$);西黄丸浸提液 200 $\mu\text{l}/\text{ml}$ G₂ - M 期细胞比例明显增高 ($P < 0.01$)。

表 2 西黄丸对 U14 细胞周期 (10d) 的影响 (体内) ($\bar{x} \pm s$)

组别	G ₀ - G ₁	S	G ₂ - M
模型	61.65 \pm 7.56	38.70 \pm 8.66	9.35 \pm 1.44
西黄丸低剂量	64.67 \pm 6.40	22.35 \pm 4.17	12.67 \pm 5.93
西黄丸高剂量	25.45 \pm 2.94**	34.25 \pm 9.64	40.35 \pm 6.76**

与模型组比较, ** $P < 0.01$; $n = 10$

表 2 可见,与模型组相比,西黄丸高剂量组使 G₀ - G₁ 期细胞明显减少 ($P < 0.01$), G₂ - M 期细胞明显增高 ($P < 0.01$)。

4 讨论

西黄丸出自清代王洪绪所著的《外科全生集》,为治疗“乳岩”之家传秘方,由牛黄、麝香、乳香、没药 4 味中药组成,方中牛黄别名犀黄,牛黄产于西北者,又叫西黄,故西黄丸也称犀黄丸。其主要功效为活血化淤、清热解毒、消肿止痛。它组方简单,疗效确切,临床应用广泛,为中医抗癌名方。目前较多的临床研究报道:西黄丸用于肝癌、乳腺癌、白血病、肺癌等恶性肿瘤的治疗,取

得了肯定的疗效。既往的研究发现,西黄丸对肿瘤细胞具有明显的抑制作用,但抑制作用发生的细胞周期环节是本次研究的焦点,故我们采用体内、体外两方面的实验,对此环节进行了研究。

细胞从一次分裂结束到下一次分裂结束的一个周期称为细胞周期。增殖型细胞的细胞周期分为 4 期,即 G₁ 期 (DNA 合成前期)、S 期 (DNA 合成期)、G₂ 期 (DNA 合成后期)、M 期 (有丝分裂期)。有时细胞长期处于静止的非增殖状态,常称为 G₀ 期^[3,4]。流式细胞技术 (Flow Cytometer, FCM) 是细胞周期研究中常用手段,能够对细胞和细胞器及生物大分子进行高达每秒上万个染色体的分析。具有速度快、精确度高、准确性好的特点,是目前最先进的细胞定量分析技术。

在既往的文献中,有报道显示^[5,6],抗癌中药的作用是将肿瘤细胞阻滞于 G₀ - G₁,使肿瘤细胞处于相对静止状态而发挥抑瘤作用。

但本次体内、体外实验结果显示,未经药物治疗的 SMMC7721, U14 肿瘤细胞的细胞群主体分布于 DNA 合成静止的 G₀ - G₁ 期,这类细胞对药物往往不敏感^[7-10]。在体外实验中,西黄丸 (200 $\mu\text{l}/\text{ml}$) 使 SMMC7721 中 G₀ - G₁ 期细胞比例显著低于肿瘤细胞对照组, G₂ - M 期增多 ($P < 0.01$);在体内实验中,西黄丸高剂量组 (0.96 g/kg) 中 U14 细胞 G₀ - G₁ 期细胞比例显著低于模型, G₂ - M 期增多 ($P < 0.01$);体内和体外实验的这一共同现象,提示西黄丸可能具有特异性地将肿瘤细胞阻滞在 G₂ - M 期的作用,推测西黄丸可能具有使处于 G₀ - G₁ 期对药物不敏感的肿瘤细胞进入增殖周期,并将其阻滞在 G₂ - M 期,其具体作用环节还需进一步研究。

综上所述,本次研究表明西黄丸可特异性地将肿瘤细胞阻滞在 G₂ - M 期,证实西黄丸可以通过影响肿瘤细胞周期来发挥抑瘤效应。

参考文献:

- [1] 宣鸣,温玉明,王昌美,等. U14 细胞接种昆明小鼠舌体后癌周淋巴管的改变及其与淋巴道转移的研究 [J]. 华西口腔医学杂志, 2000, 18 (1): 5.
- [2] 陈少雅,陈崇宏. 褪黑激素对 U14 的抑制作用 [J]. 中国药理学通报, 2001, 17 (5): 549.
- [3] 杨抚华. 医学细胞生物学概论 [M]. 成都: 四川科技出版社, 1996: 254.
- [4] 周明华,陈思颖,李美芳,等. 细胞周期与细胞凋亡 [J]. 生理科学进展, 1996, 27 (4): 319.
- [5] 陈晓莉,王骊骊,薛克昌. 葛根提取物对肝癌细胞增殖及细胞周期的作用 [J]. 广东药学院学报, 2001, 17 (3): 183.
- [6] 梁毅,陈志雄,丘和明. 清毒饮、养正片影响白血病 K562 细胞增殖周期、细胞凋亡的实验研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10 (1): 44.
- [7] Tony Hunter, Pines. Cyclins and Cancer [J]. Cell, 1994, 79: 573.
- [8] 金秀国,方国安,刘波. 流式细胞术 DNA 分析影响因素探讨 [J]. 上海医学检验杂志, 2000, 15 (3): 148.
- [9] 徐萌,李金瀚. 肺癌耐药发生和细胞周期改变的流式细胞术分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22 (5): 385.
- [10] 卢绮萍,吴在德,王伟,等. Rxa 对 L02 细胞增殖的细胞周期分析和对 Ki-67, CyclinD1, PCNA 蛋白表达的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 1999, 16 (6): 512.