

# 复方犀黄丸含药血清对人肝癌细胞生长及其周期影响的实验研究

熊 鹰 孔小云 陈如山

(广东省深圳市红十字会医院·深圳 518035)

**摘 要** 目的:探讨中药复方犀黄丸含药血清对人肝癌细胞系(bel-7402)生长及其细胞周期分布的影响。方法:应用MTT比色法检测肿瘤细胞活性,流式细胞仪分析细胞周期时相分布。结果:中药复方犀黄丸含药血清对人肝癌细胞系(bel-7402)有抑制作用。其抑制率与含药血清浓度呈直线相关;FAM结果显示含药血清处理24h,S期细胞比例增加,G<sub>2</sub>/M期细胞减少;处理48h后,G<sub>0</sub>/1期细胞增多,S期细胞减少。结论:中药复方犀黄丸含药血清可抑制人肝癌细胞系(bel-7402)细胞生长,并可干扰其细胞周期。

**主题词** 肝肿瘤/中医药疗法 犀黄丸/治疗应用 血清药理学 细胞周期

犀黄丸是清代著名医家王洪绪所创,原载于《外科证治全生集·卷四》。用于乳岩、横痃、瘰疬、痰核、流注等症,现代主要用于痈疽疮毒和各种恶性肿瘤的治疗。临床和现代药理研究<sup>[1,2]</sup>表明本方可抑制体内外肿瘤的生长。本研究采用血清药理学方法,探讨中药复方犀黄丸对人肝癌细胞增殖的抑制及对细胞周期的影响,从细胞水平探讨其抗肝癌细胞的作用机制。

## 1 材料与方

1.1 细胞与细胞培养 人肝癌细胞系(Bel-7402)由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。接种于含100u(100μg)/ml青、链霉素和10%胎牛血清的DMEM培养液中,置于含5%二氧化碳37℃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。

1.2 含中药血清的制备 中药复方犀黄丸由犀黄、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,按工艺制成每毫升相当于含生药量0.5g的浸膏备用。以日本大耳白兔5只,每日给予药液1.12g/kg灌胃,10d后,于最后一次灌药后1h(灌药前禁食12h),乙醚麻醉,颈动脉采血,无菌分离血清,经过56℃,30min灭活后,置-20℃冰箱保存备用。

1.3 主要试剂 DMEM培养液、胎牛血清、胰蛋白酶,由美国Gibco公司提供;PI染色剂,由美国BD公司提供,MTT及其它常用试剂购自华美化司。

1.4 主要仪器 包括全自动酶标仪,流式细胞仪FACSort,美国BD公司。H300透射电子显微镜,日本日立公司。

## 1.5 方法

1.5.1 噻唑蓝还原法(MTT) 将细胞接种于96孔培养板中,每孔的细胞浓度为 $2 \times 10^5$ /ml,继续培养24h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,每组5孔,继续培养。培养48h后,用MTT比色法检测细胞生长抑制率。即每孔加入MTT溶液20μl(5mg/ml),37℃孵育3h,小心吸去每孔中的培养液,每孔再加入150μl的二甲基亚砜(DMSO),在微型震荡器上震荡20min,用全自动酶标仪测定各孔OD值。测定波长为570nm。

计算公式:肿瘤细胞生长抑制率(%) = (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 × 100%

1.5.2 透射电镜细胞形态观察 刮片收集含药血清分别为10%、15%浓度培养48h及无含药血清培养48h的人肝癌细胞系(Bel-7402),分别离心,弃上清液,沉集细胞,用2.5%的戊二醛溶液前固定,1%锇酸后固定,梯度乙醇脱水,Epon812浸透、包埋、聚合,超薄切片,硝酸铀、柠檬酸铅染色,凉干,在透射电镜下观察细胞的超微结构特征。

1.5.3 细胞周期时相分析 待测细胞样品常规收集细胞,离心,弃上清液,细胞沉淀用PBS冲洗2次,在震荡状态下缓慢滴入75%乙醇2ml左右过夜,再用PBS冲洗,调至终浓度为1ml,加入0.01%RNA酶10~15μl,37℃水浴30min,加0.25%PI染色剂(避光)染色30min,作流式细胞仪检测。每份样品随机检测 $1 \times 10^5$ /ml细胞,分析软件为Modfit。

1.6 统计学方法 计量资料采用t检验,计数资料采用 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 含药血清对人肝癌细胞生长的抑制作用

含药血清处理48h,肝癌细胞的生长受到抑制,且随着浓度的增加而增多。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( $p < 0.05$ )。其血清浓度与抑制率呈直线相关。

### 2.2 含药血清作用后细胞的形态学观察

透射电镜对凋亡细胞超微结构观察结果显示:凋亡细胞染色质固缩,并凝结成块,聚集在核膜周边呈新月状或肾状。细胞浆浓缩,内质网变疏松并与胞膜融合,形成一个个空泡。

### 2.3 含药血清对细胞周期的影响

对照组DNA组方图为典型肿瘤细胞的G<sub>0</sub>/1,S,G<sub>2</sub>/M峰型。10%及20%含药血清组处理24h,与对照组相比,S期细胞比例增加,G<sub>2</sub>/M期细胞减少;处理48h后,G<sub>0</sub>/1期细胞增多,S期细胞减少,见附表。

附表 含药血清对 BEL-27402 细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	时间(h)	G <sub>0</sub> /1	S	G <sub>2</sub> /M
对照组	3	24h	56.3 ± 2.81	34.5 ± 1.15	9.2 ± 0.88
		48h	60.2 ± 1.54	33.2 ± 1.08	6.6 ± 0.71
10% 血清组	3	24h	54.1 ± 2.09	40.3 ± 1.10*	5.6 ± 0.76*
		48h	71.0 ± 1.21*	22.8 ± 0.95*	6.0 ± 0.39
20% 血清组	3	24h	55.4 ± 2.15	41.5 ± 1.54*	3.1 ± 0.42*
		48h	73.2 ± 1.87*	19.7 ± 0.86*	7.1 ± 0.56

与同期的对照组相比\* P < 0.01

### 3 讨论

犀黄丸现代主要用于痈疽疮毒和各种恶性肿瘤的治疗。实验研究证实<sup>[3,4]</sup>方中犀黄(牛黄)、麝香、乳香具有抗癌及提高机体免疫力作用。但该复方的深入药理机制研究尚未见报道。本研究采用血清药理学方法探讨其对肝癌细胞的作用,避免了中药特别是中药复方的粗提物直接加入反应体系中进行体外实验所获取的实验结果的不足之处。含药血清含有中药的体内代谢成分及中药的内生性有效成分,使体外试验更能反映中药的体内效应,从而提高实验结果的可信度。

文献报道<sup>[5,6]</sup>,一些化学药物具有影响细胞周期的作用。如 NSAIDS 抑制细胞生长主要阻滞细胞周期的 G<sub>1</sub> 期,表阿霉

素具有抑制肿瘤细胞 S、G<sub>2</sub>/M 期的作用使细胞停止于 DNA 的合成期或分裂末期。本研究结果显示与对照组相比,复方犀黄丸含药血清可明显抑制肝癌细胞的增殖,并呈血清浓度依赖性。形态学也观察到细胞凋亡典型的形态改变。流式细胞仪周期分析,含药血清作用 24h,发现 S 期细胞比例增加,G<sub>2</sub>/M 期减少;作用 48h,G<sub>0</sub>/1 期细胞增多,S 期减少。说明经含药血清作用后,早期主要阻滞细胞进入 G<sub>2</sub>/M,而后期主要阻滞细胞于 G<sub>0</sub>/1 期。从而提示其作用机制主要表现在大部分细胞阻滞在 DNA 合成前期,从而抑制了癌细胞的增殖并导致其发生凋亡。由此可见复方犀黄丸可作用于肝癌细胞周期的不同时期。其抑制肝癌细胞增殖,干扰细胞周期可能是其抗癌作用的重要机制。

### 参考文献

- 1 方文贤. 中医方剂临床秘用. 中国中医药出版社, 1993: 375
- 2 谢鸣. 中医方剂现代研究. 第 1 版. 1997: 1611
- 3 刘春安,等. 抗癌中药大辞典. 湖北科学技术出版社, 1994: 200
- 4 张民庆,等. 抗肿瘤中药的临床应用. 第 1 版. 人民卫生出版社, 1998: 276
- 5 Bayer BM, et al. J Pharmacol Exp Ther 1979; 210(1): 106
- 6 Demarcq C, et al. Cell Growth Differ 1994; 5(9): 983

(修回: 2001- 05- 25)

## 缩泉丸治疗氯氮平所致遗尿 32 例

刘淑萍 (山西省大同市市委机关门诊部·大同 037006)

**1 临床资料** 入选对象为 1998- 08~ 1999- 10 收住我院的偏执型精神分裂症患者 64 例,按 CCMD- 2- R 诊断标准进行诊断。治疗均单一口服氯氮平,连续 2W 均有遗尿现象,排除妇科或泌尿系疾患,按入院顺序随机分为中药缩泉丸组与安坦组,每组各 32 例。两组性别、年龄、病程均无显著差异(P > 0.05)。遗尿程度评分标准参照陆式法<sup>[1]</sup>:无遗尿为 0, > 7d 遗尿 1 次为 1 级(1 分), 2~ 7d 遗尿 1 次为 2 级(2 分), 每 d 遗尿 1 次为 3 级(3 分)。64 例中 1 级 8 例, 2 级 23 例, 3 级 33 例, 两组构成比大致相同(P > 0.05)。

**2 治疗方法** 在服用氯氮平出现遗尿 2W 后按照组别分别给予缩泉丸(由益智仁、乌药、山药组成,取上药各等分,过筛,取细末,炼蜜为丸,每丸重 9g。由我院制剂室提供)及安坦各 1 粒,每 d 2 次,于每日清晨起床后记录遗尿情况,观察 3W。研究期间氯氮平剂量固定不变,缩泉丸组为 367 ± 96. 25mg/d,安坦组为 369 ± 94. 13mg/d,经统计学处理无显著差异(P > 0.05)。

### 3 治疗结果

**3.1 疗效标准** 疗效评定以遗尿完全消失为痊愈,较治疗前遗尿减少 1 个等级以上为有效,遗尿无改变者为无效。

#### 3.2 结果

**3.2.1 两组遗尿疗效比较** 见表 1。

**3.2.2 两组治疗前后的遗尿评分比较** 见表 2。

**3 讨论** 氯氮平具有毒蕈碱样乙酰胆碱作用,能兴奋 M 型受体,产生副交感神经的兴奋效应,从而使逼尿肌收缩,膀胱内括约肌松弛,导致遗尿<sup>[2]</sup>。遗尿作为一个症状,祖国医学认为系脾肾气虚,肾的气化功能失常,膀胱失于固摄所致。因此,我们选用中药缩泉丸治疗遗尿,其功用补益脾肾、固摄止遗。从表 1 来看,缩泉丸的总有效率明

表 1 两组遗尿疗效比较

组别	遗尿程度	例数	痊愈	有效	无效	总有效率(%)
缩泉丸	1 级	5	5	0	0	100
	2 级	11	7	3	1	91
	3 级	16	13	2	1	94
安坦	1 级	3	3	0	0	100
	2 级	12	4	2	6	50
	3 级	17	4	1	12	29.4

按照遗尿程度的等级对应经 Ridit 分析,两组 1 级、2 级无明显差异外,3 级疗效相比有极显著性差异(P < 0.01)。

表 2 两组治疗前后的遗尿评分比较( $\bar{X} \pm s$ )

组别	n	治疗前	治疗后
缩泉丸	32	2.34 ± 0.75	0.34 ± 0.75 <sup>*Δ</sup>
安坦	32	2.44 ± 0.67	1.59 ± 1.32 <sup>*</sup>

注:自身治疗前后比较\* P > 0.05, \*\* P < 0.01;与安坦组治疗后比较 ΔP < 0.01

显优于对照组,且两组治疗 3 级遗尿的疗效经 Ridit 分析有极显著性差异(P < 0.01)。由表 2 可知,两组治疗后相比经 t 检验有极显著性差异(P < 0.01)。在临床观察的过程中,两组经过治疗前后的血常规、尿常规、肝、肾功能检查均未见有毒副作用,不降低氯氮平的治疗效果,这说明缩泉丸治疗氯氮平所致遗尿的疗效明显优于安坦,故值得精神科同道借鉴。

### 参考文献

- 1 陆小兵,等. 临床精神医学 1999; 3: 162
- 2 顾牛范,等. 上海精神医学 1991; 新 3(增刊): 28~ 35

(收稿: 2000- 10- 16)

reversing left ventricular hypertrophy and fibrosis was better than that of *Betaloc*.

## THE EFFECT OF INFLUENZA VIRUS ON REACTIVE OXYGEN SPECIES FROM IMMUNOCYTES IN MOUSE'S LUNG AND REGULATION OF DRUGS

Wang Yan- yun, et al

(*Guang'anmen Hospital Attached to China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100053*)

Objective: To study on effect of influenza virus on reactive oxygen species level release from immunocytes in perfusion liquid from mouse's lung and regulation of drugs. Method: Weak chemiluminescence method.

Result: *Keganliyan* Oral Liquor and SOD could decrease the enhancement of luminescence of immunocytes in the bronchialveolar lavage fluid of mice infected by influenza virus. It is thought that the enhancement of luminescence of immunocytes mainly induced by superoxide anion and hydrogen peroxide by determination and analysis with special tool drugs. Conclusion: Influenza virus can increase oxygen free radicals in mice and *Keganliyan* Oral Liquor can clear reactive oxygen species more potently than SOD.

## EXPERIMENTAL STUDY ON THE EFFECT OF *XIHUANG* PILL DRUG SERUM ON THE GROWTH AND CELL CYCLE OF HUMAN HEPATIC CARCINOMA CELLS

Xiong Ying, et al

(*Shenzhen Red Cross Hospital, Shenzhen 518035*)

Objective: To investigate the effects of *Xihuang* pill drug serum on the growth of hepatic carcinoma cell and the cell cycle. Method: activity of tumor cell was detected by MIT and cell cycle was analysed by flow cytometry.

Result: *Xihuang* pill had an inhibitory effect on the tumor cell, which was positively related with the drug content. Typical morphological changes of apoptosis were observed under the transmission electron microscope. FCM showed that the cell cycle treated with herbal medicinal mixture *Xihuang* pill for 24h, the ration of cells in S phase increased, while that in G<sub>2</sub>/M phase decreased; After 48h treatment, the ratio of cells in G<sub>0</sub>/1 phase increased, and S phase decreased. Conclusion: the herbal mixture *Xihuang* pill can inhibit the growth of hepatocellular carcinoma cells in vitro. Its interference into the cell cycle may be one of mechanisms of its antitumor activity.

## THE EFFECTS OF TCM RECIPES ON ENDOTHELIN AND CALCITONIN GENE RELATED PEPTIDE IN AGED RAT WITH SECONDARY KIDNEY INJURY TO BRAIN ISCHEMIA REPERFUSION

Li Jian- sheng, et al

(*Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003*)

Objective: To study the protective effects of *yiyanhuaxuedan* (*YHD*), *rhubarb* and *xueshuanwinmaining* (*XXN*) on kidney injury after brain ischemia reperfusion in the aged rats from the change of endothelin (ET) and calcitonin gene related peptide (CGRP). Method: Aged rats (older than 20 months) were divided into control group (ACG), model group (AMG), *nimodipine* group, *YHD* high dose group (YHDH) and *YHD* low doses group (YHDL), *rhubarb* group, *XXN* group. It was measured that the morphological changes of kidney tissue and the contents of ET and CGRP in the rats with 60 min reperfusion after brain ischemia 30 min.

Results: It was observed that the obvious pathological change in kidney tissue in the AMG, and this change was slight in the *rhubarb*'s, the *YHDH*, the *YHDL*, *XXN*'s. The ET content in the AMG was higher. The decrease of ET content in the *YHDH*, *XXN* group, *rhubarb* group and increase of CGRP in the *YHDL* were prominent compared with those in the AMG. Conclusion: The kidney injury after brain ischemia reperfusion was correlated with the dysequilibrium between ET and CGRP in which ET was dominant. *YHD*, *XXN* and *rhubarb* could alleviate this injury via regulating the CGRP- ET dysequilibrium.