

西黄丸含药血清对人乳腺癌细胞生长的影响

梁文波, 张学梅, 宋旦旨

(大连大学医学院, 辽宁 大连 116622)

摘要:目的 研究西黄丸含药血清对人乳腺癌细胞系(MCF-7)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相对分布。结果 西黄丸含药血清对人乳腺癌细胞系(MCF-7)有较强的抑制作用,其抑制率与含药血清浓度呈直线相关。流式细胞仪周期分析结果显示含药血清处理24h,S期细胞比例增加,G₂/M期细胞减少;处理48h后,G₀/1期细胞增多,S期细胞减少。结论 西黄丸含药血清可抑制人乳腺癌细胞系(MCF-7)细胞生长,并可干扰其细胞周期。

关键词:西黄丸含药血清; 人乳腺癌细胞; 细胞周期

中图分类号:R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-0805(2007)06-1371-01

The Effects of Xihuang Pill Drug Serum on the Growth and Cell Cycle of Human Breast Carcinoma Cells

LIANG Wen-bo, ZHANG Xue-mei, SONG Dan-zhi

(College of Medicine, Dalian University, Dalian, 116622, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Xihuang pill drug serum on the growth of breast cell(MCF-7) and the cell cycle. **Methods** Activity of tumor cell was detected by MTT and cell cycle was analyzed by flow cytometry. **Results** Xihuang pill drug serum had an inhibitory effect on the tumor cell, which was positively related to the drug serum content. Typical morphological changes of apoptosis were observed under the transmission electron microscope. FCM showed that the cell cycle treated with Xihuang pill drug serum for 24 h, the ratio of cells in S phase increased, while that in G₂/M phase decreased; after 48 h treatment, the ratio of cells in G₀/1 phase increased, and S phase decreased. **Conclusion** Xihuang pill drug serum can inhibit the growth of breast carcinoma cell (MCF-7) and its cell cycle *in vitro*.

Key words: Xihuang pill drug serum; Human breast carcinoma cells; Cell cycle

西黄丸,又名犀黄丸,方出清一王洪绪所著《外科证治全生集》,为治疗“乳岩”“瘰疬”“痰核”“肺癆”之方^[1]。其成分为牛黄、麝香、乳香、没药。主要功能为消坚化结、解毒散瘀、消肿止痛。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^[2,3]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,观察西黄丸人乳腺癌细胞增殖的抑制及细胞周期的作用机制。

1 材料

1.1 细胞与细胞培养 人乳腺癌细胞系(MCF-7)由吉林省肿瘤防治研究所提供。接种于含100 μl/ml青霉素、100 mg/ml链霉素和10%胎牛血清的1640培养液中,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%苔盼蓝染色,其细胞活性在98%以上。

1.2 含药血清的制备 西黄丸按2 g/kg剂量和10 ml/kg给药液量,将西黄丸用蒸馏水配成相应悬液,以SD大鼠6只,按剂量每天灌胃给药(10 ml/kg),连续7 d,于末次给药后1 h(灌胃前禁食12 h),以20%乌拉坦,10 ml/kg腹腔注射麻醉,腹主动脉采血,无菌分离血清,经过56 °C,30 min灭活后,置-80 °C冰箱保存备用。

1.3 试剂、药品、动物 1640培养液、胎牛血清、胰蛋白酶购自A Perstop Life Sciences Company PI染色剂,购自美国BD公司,MTT及其它常用试剂购自华美公司。CV级SD大鼠,体重180~220 g,雌雄各半。购于大连医科大学实验动物中心,许可证号SCXK(辽)2002-0002。西黄丸,九寨沟天然药业集团有限责任公司生产,批号050601。顺铂,德州德药制药有限公司生产,批号050303。

1.4 仪器 全自动酶标仪,流式细胞仪FACSort,美国BD公司。

2 方法

2.1 噻唑蓝还原法(MTT) 取处于指数生长期的细胞株配成4×10⁴/ml,加入96孔板,100 μl/孔,在37 °C,5% CO₂条件下培养24 h,弃培养液,分别加入2.5%,5%,10%,15%,20%的含药血清,设不含药的血清(血清浓度20%)为阴性对照组,以0.5 mg/ml的顺铂为阳性对照组,每组5孔,100 μl/孔,继续培养。培养48 h后,用MTT比色法检测细胞生长抑制率。即每孔加入MTT溶液20 μl(5 mg/ml),37 °C孵育3 h,小心吸去每孔中的培养液,每孔再加入150 μl的二甲基亚砜(DMSO),在微型震荡20 min,用全自动酶标仪测定各孔OD值。测定波长为550 nm。

计算公式:肿瘤细胞生长抑制率(%)=(对照组平均OD值-给药组测定的平均OD值)/对照组平均OD值×100%。

2.2 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2 ml左右过夜,再用PBS冲洗,调至终浓度为1 ml,加入0.01%的RNA酶10~15 μl,37 °C水浴30 min,加0.25%的PI染色剂(避光)染色30 min,作流式细胞仪检测,每份样品随机检测1×10⁵/ml细胞,分析软件为Modfit

2.3 统计学处理 运用SPSS11.5统计软件,利用单因素方差分析比较差异显著性,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 含药血清对乳腺癌细胞生长的抑制作用 含药血清处理48 h,乳腺癌细胞生长受到抑制,其作用随着含药血清浓度的增加而增强。10%,15%和20%含药血清组对细胞的生长抑制明显高于阴性对照组(P<0.01)及2.5%和5%组,其血清浓度与抑制率呈直线相关。结果见表1。

3.2 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G₀/1,S,G₂/M峰型。15%和20%西黄丸含药血清组处理24 h,与阴性对照组比较,G₂/M期细胞减少,S期细胞比例增加;处理48 h,S期细胞减少,G₀/1期细胞增多。说明西黄丸含药血清早期主要影响细胞进入G₂/M期,后期主要使细胞停滞于G₀/1期。因此,可以推断其作用机制主要表现在大部分细胞停滞在DNA合

收稿日期:2006-12-21; 修订日期:2007-03-05

作者简介:梁文波(1962-),男(汉族),吉林延边人,现任大连大学医学院药理学副教授,博士学位,主要从事免疫及肿瘤药理学研究工作。

成前期,抑制了癌细胞的增殖而导致其发生凋亡。结果见表 2。

表 1 西黄丸含药血清对人乳腺癌细胞 (MCF-7)生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	OD 值	抑制率 (%)
阴性对照	20%	0.34 ± 0.02	
顺铂	0.5 mg · ml ⁻¹	0.08 ± 0.01 ^{**}	77.88
含药血清	20%	0.15 ± 0.04 [*]	54.75
	15%	0.21 ± 0.04 [*]	38.05
	10%	0.21 ± 0.02 [*]	39.23
	5%	0.32 ± 0.06	4.42
	2.5%	0.33 ± 0.64	2.05

与阴性对照组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01

表 2 西黄丸含药血清对人乳腺癌细胞 (MCF-7)细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间 t/h	G ₀ /1	G ₂ M	S
阴性对照	24	50.3 ± 2.8	8.9 ± 0.9	30.9 ± 1.1
	48	58.7 ± 1.5	6.3 ± 0.6	33.9 ± 1.0
15%血清	24	54.5 ± 3.1	5.9 ± 0.8 [*]	40.8 ± 1.2
	48	73.2 ± 3.4 [*]	6.6 ± 0.5	19.5 ± 0.9
20%血清	24	55.2 ± 2.9 [*]	4.1 ± 0.6 [*]	39.5 ± 2.3 [*]
	48	75.3 ± 4.1 [*]	8.0 ± 1.0	22.1 ± 2.4 [*]

与阴性对照组比较, * P < 0.05, n = 5

3 讨论

现代药理学研究表明,西黄丸具有抗肿瘤、增强免疫功能、抗菌及抗炎等活性,临床上主要用于多种恶性肿瘤(如肝癌、白血病、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌等),尤其适用于晚期恶性肿瘤和乳腺增生等良性疾病的治疗^[4,5]。近些年对其抗肿瘤的实验研究有所增加,如应用血清药理学的方法对西黄丸体外抗肝癌 Bel-7402 细胞系进行了作用及作用机制的系统研究^[6-8]。本研究结果显

示,与阴性对照组比较,西黄丸能够明显抑制乳腺癌 (MCF-7)细胞的增殖,其血清浓度与抑制率呈现正相关。流式细胞仪细胞周期分析结果显示,西黄丸含血清组处理 24 h,与阴性对照组比较,G₂M 期细胞减少、S 期细胞增加;处理 48 h,S 期细胞减少,G₀/1 期细胞增多。说明西黄丸含药血清早期主要影响细胞进入 G₂M 期,后期主要使细胞停滞于 G₀/1 期。由于大部分细胞停滞在 DNA 合成前期,抑制了癌细胞的增殖而导致其发生凋亡,因此,可以推断干扰细胞周期可能是其抗癌作用的重要机制。

参考文献:

- [1] 《中医辞典》编辑委员会. 简明中医辞典 [M]. 北京:人民卫生出版社,1979:900.
- [2] 唐曦,胡娅,胡国清. 西黄丸与氟尿嘧啶联合应用的抗肿瘤作用 [J]. 医药导报,2005,24(9):757.
- [3] 李莉芳,陈如山,刘新民,等. 犀黄丸诱导人肝癌细胞凋亡及其机制的研究 [J]. 中医学刊,2004,22(1):125.
- [4] 卢雯平. 晚期乳腺癌的综合治疗 [J]. 中国肿瘤,1999,8(10):445.
- [5] 杨宇飞. 晚期非小细胞肺癌中西医结合治疗 [J]. 中国临床医生,2001,29(12):9.
- [6] 李莉芳,陈如山,刘新民,等. 犀黄丸诱导 Bel-7402 细胞凋亡及其细胞内钙离子浓度的变化 [J]. 临床肝胆病杂志,2003,19(6):362.
- [7] 熊鹰,孔小云,陈如山,等. 犀黄丸 (含药血清) 对人肝癌细胞凋亡的形态学研究 [J]. 临床消化病杂志,2001,13(2):82.
- [8] 熊鹰,孔小云,陈如山. 复方犀黄丸含药血清对人肝癌细胞生长及周期影响的实验研究 [J]. 中国中医药科技,2001,8(4):217.

高效液相色谱法测定灵芝孢子粉软胶囊中多糖含量的研究

陈亮¹, 彭雅娟¹, 钱一帆^{1*}, 张磊²

(1. 南京中科集团股份有限公司, 江苏 南京 210008; 2 南京中山制药有限公司, 江苏 南京 210012)

摘要:目的 建立灵芝孢子粉软胶囊中多糖含量的 HPLC 测定方法。方法 采用 ShodexSH1011 (苯乙烯-二乙烯苯共聚物键合磺酸基)糖柱,流动相 0.6% 硫酸溶液,检测波长 200 nm。结果 灵芝多糖在 0.266~8.51 mg/ml 范围内线性关系良好, r=0.9998,平均加样回收率为 100.4% (n=9), RSD=1.57%。结论 该方法简便快捷,无干扰,重复性好,可用于灵芝孢子粉软胶囊的质量控制。

关键词:灵芝孢子粉软胶囊; 灵芝多糖; 高效液相色谱

中图分类号: R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-0805 (2007) 06-1372-03

Content Determination of Polysaccharides of Ganoderma lucidum in Spore Powder Capsule by HPLC

CHEN Liang¹, PENG Ya-juan¹, QIAN Yi-fan¹, ZHANG Lei²

(1. Nanjing Zhongke Biochemical Technological Co Ltd, Nanjing 210008, China; 2 Nanjing Zhongshan Pharmaceutical Factory, Nanjing 210012, China)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for determination of *Ganoderma lucidum* Polysaccharide in spore powder capsule. **Methods** A Shodex SH1011 column was used with 0.6% sulphuric acid solution. The detection wavelength was set at 200nm. **Results** The linear relationship of the concentrations and peak areas was good in range of 0.266~8.51 mg/ml (r=0.9998). The average recovery was 100.4% (n=9), RSD=1.57%. **Conclusion** The method is simple, rapid and accurate and can be used for quality control of the capsule.

Key words: Spore powder of *Ganoderma lucidum* ganoderma capsule; Polysaccharides; HPLC

收稿日期: 2006-11-28; 修订日期: 2007-02-27

作者简介: 陈亮 (1981-), 男 (汉族), 江苏南京人, 现为南京中科集团股份有限公司工程师, 主要从事中药质量标准和保健品开发工作。

*通讯作者简介: 钱一帆 (1974-), 男 (汉族), 浙江宁波人, 现为南京中科集团股份有限公司工程师, 学士学位, 主要从事中药质量标准和保健品开发研究工作。

灵芝孢子粉软胶囊是由灵芝孢子粉胶囊 [WS-5026 (B-0026)-2004] 改剂型而成, 具有健脾益气, 养心安神功效。用于心脾两虚, 病后体弱以及肿瘤患者的辅助治疗。其有效成分有灵芝多糖类、三萜类化合物等, 其多糖的含量约为 0.75%^[1]。测定多糖含量常用硫酸-萘酮^[2]和硫酸苯酚分光光度法^[3,4]。上述方