

中药土大黄煎剂及含药血清对食管癌细胞增殖反应的影响

任金荣¹/孙丽霞¹/单保恩¹/刘丽芝¹/
李元振²/何兰欣¹/艾 军¹

(1. 河北省肿瘤研究所免疫室; 2. 河北医科大学第四医院药剂科, 河北 石家庄 050011)

Rhubarb and Its Effects on Esophageal Carcinoma Cell Proliferation

REN Jin-rong¹, SUN Li-xia¹, SHAN Bao-en¹, LIU Li-zhi¹,
LI Yuan-zhen², HE Lan-xin¹, AI Jun¹

(1 Department of Immunology, Hebei Cancer Institute; 2 The Department of Pharmacy, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

【摘要】背景与目的: 探讨中药土大黄煎剂及其含药血清的抗肿瘤及免疫调节作用。材料与方法: 土大黄干燥的根茎, 用传统方法制备高、中、低3个不同浓度(分别含土大黄生药为100、50和10 mg/ml)的煎剂及其含药血清。以MTT法测定土大黄煎剂及其含药血清对癌细胞株和原代食管癌细胞及外周血淋巴细胞的抑制作用。结果: 土大黄煎剂在含生药量0.1 mg/ml时对食管癌细胞株有较明显的抑制作用, 抑制率为51.9%; 对食管癌患者癌细胞抑制作用相对较弱, 抑制率为37.9%; 对外周血淋巴细胞增殖抑制率为30.1%。而煎剂在5 mg/ml和10 mg/ml时, 对外周血淋巴细胞有促进增殖作用; 1 000 mg/kg含药血清对食管癌细胞株有抑制作用, 抑制率为36.7%, 与100 mg/kg含药血清作用相比, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。1 000 mg/kg含药血清对外周血淋巴细胞抑制作用为33.0%, 与阴性和阳性对照相比, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 土大黄煎剂及其含药血清均能抑制食管癌细胞增殖, 土具有抗肿瘤作用并影响免疫功能, 其作用与剂量相关。

【关键词】土大黄煎剂; 含药血清; 食管癌细胞; 细胞增殖

中图分类号: R730.53

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2006)05-0392-03

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: This study was designed to elucidate Rhubarb and its anti-tumor and immune modulation functions. MATERIAL AND METHODS: The stem of Rhubarb was cooked in distilled water. It was prepared in three concentrations (100 mg/ml, 50 mg/ml and 10 mg/ml) to observe its inhibitory effect on esophageal carcinoma cell and peripheral blood lymphocytes (PBL) in patients by MTT assay. RESULTS: There were different inhibitory effects of various rhubarb doses and serum concentration. Proliferation of Esophageal carcinoma cell was strongly inhibited with 0.1 mg/ml of Rhubarb. Inhibition rate was 51.9%; while, its effects on esophageal carcinoma cell was weakened at 37.9%. Inhibition rate of patient PBL was 30.1%. The proliferation of PBL was induced with 5 mg/kg and 10 mg/ml of Rhubarb. The inhibitory rate (36.7%) of the 1 000 mg/kg serum on carcinoma cell TE13 was much higher than that the 100 mg/kg serum ($P < 0.01$). The inhibition rate (33.0%) of the 1 000 mg/kg serum for PBL was significantly different compared with negative and positive control ($P < 0.05$). CONCLUSION: Rhubarb and its serum content inhibited esophageal carcinoma cell. This suggested rhubarb had anticancer and immune modulation effect. The effects were related to rhubarb concentration.

【KEY WORDS】 Rhubarb; drug serum; esophageal carcinoma cell; cell proliferation

大黄一直是中医临床最常用药物之一, 临床用量不同药效也不一致, 以往认为大黄具有泻热通便, 凉血解毒及逐瘀通经等功效。近年来发现大黄具有抗肿瘤和免

疫调节作用^[1]。为探讨机制, 我们利用血清药理学方法和细胞培养技术观察了不同浓度的土大黄煎剂及其在体内生成的含药血清对癌细胞与淋巴细胞的作用。

收稿日期: 2005-04-21; 修订日期: 2006-03-31

基金项目: 河北省卫生厅科研基金项目(No. 04241)

作者简介: 任金荣(1946~), 女, 河北省石家庄市人, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤免疫学。Tel: 0311-86033511, E-mail: rjlyz@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 中药土大黄 采购于山西省医药进出口公司,为山西省五台县的产品。

1.1.2 试验动物 雄性 SD 大鼠 20 只,清洁级,体重 220~260 g,由河北医科大学动物实验中心提供。

1.1.3 食管癌细胞 食管癌细胞株 TE13 由河北医科大学第四医院科研中心提供,本室传代培养;食管癌原代细胞是由食管癌患者的癌组织标本制备。30 例标本均取自本院胸外科手术治疗的食管癌患者。

1.1.4 外周血淋巴细胞 由经本院病理确诊的 42 例食管癌病人手术治疗前静脉血分离获得。

1.1.5 试剂及仪器 RPMI 1640 培养基 (GIBCO);胎牛血清 (杭州四季青);含中药大黄血清为本实验室制备;四氮唑蓝 MTT, (华美生物工程公司);顺铂 (齐鲁制药厂,批号: 0111034);CO₂ 培养箱 (美国 SHELDON 公司,型号: TC2323);酶标仪 (奥地利 anthos2010 型)。

1.2 方法

1.2.1 土大黄煎剂的制备 按传统中药水煎法将大黄根茎,用蒸馏水浸泡煮沸后,改文火继续煮 30 min 成煎剂。取煎剂上清液经过滤除菌后调制含生药为 100 mg/ml、50 mg/ml、10 mg/ml 的 3 个浓度,4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 含药血清的制备及其药理实验 将 SD 雄性大鼠 20 只,随机分为 A、B、C、D、E 5 组。A 组取其血清作为阴性对照;B 组给化疗药顺铂 (5 mg/kg) 制备含药血清为阳性对照;C、D、E 组为实验组,分别用制备好的 3 种剂量 (给药量按每千克体重 1 000 mg、500 mg 和 100 mg) 的煎剂,每次按 0.1 ml/kg 体重的量灌胃,每日 2 次,连灌 1 周,末次灌药 2 h 后以 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,在无菌条件下自颈动脉采血,分离出的血清各组再混合,即为制备的含药血清。以含药血清替代胎牛血清配制完全培养液,用于含药血清药理实验。

1.2.3 外周血淋巴细胞 (Peripheral blood lymphocytes, PBL) 悬液的制备 取食管癌患者静脉血 3 ml 肝素抗凝,用淋巴细胞分离液常规分离出单个核细胞,洗涤后,用 RPMI 1640 完全培养液调整细胞密度为 1×10^6 /ml 备用。

1.2.4 原代食管癌细胞和 TE13 悬液的制备 用机械法从新鲜的食管癌组织标本中分离出癌细胞,洗涤后以完全培养液调整细胞浓度为 5×10^5 /ml,制备成原代食管癌细胞 (Esophageal carcinoma cell, ECC) 悬液备用;传代培养的食管癌细胞 (TE13) 被收集、洗涤后,再用

制备的各组含药血清配制的 RPMI 1640 培养基调整细胞密度成 1×10^5 /ml 的悬液待用。

1.2.5 细胞的体外增殖实验 根据大黄临床常用量是 6~10 g/日以及小鼠急性毒理试验得出 LD₅₀^[1],设计出体外实验的 9 种煎剂浓度,即 0.01、0.025、0.05、0.1、0.25、0.5、1、5、10 mg/ml。取传代的 TE-13 细胞株、原代食管癌细胞及淋巴细胞的悬液分别接种于 96 孔培养板,每孔加细胞悬液 100 μl。然后再向各孔内分别加入 9 种不同浓度的煎剂及化疗药物顺铂各 10 μl,并以加生理盐水组为空白对照。各组均设 3 个复孔。培养板放置于含 5% CO₂、37 ℃ 孵育箱中培养,48 h 后向每孔加 MTT (5 mg/ml) 10 μl 继续培养 6 h。二甲基亚砜 100 μl 裂解细胞。用酶联免疫检测仪测定 570 nm 光密度 (OD) 值,按公式计算抑制率。

抑制率 (%) = (空白对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 空白对照组 OD 值。

抑制率值为正数表示细胞增殖被抑制,抑制率值为负数表示细胞增殖被促进。

1.3 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。成组设计两样本均数比较用 *t* 检验,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 土大黄煎剂对 PBL 的作用 煎剂在剂量为 5 mg/ml 与 10 mg/ml 时,对 PBL 的抑制率为负值,表示可促进 PBL 增殖;而在浓度低于 1 mg/ml 的剂量时对 PBL 则有抑制作用。煎剂浓度为 0.25 mg/ml 时,相当于临床常用量时的血药作用浓度,对外周血淋巴细胞有抑制作用,抑制率为 25.4%,比阳性对照 DDP 的作用 (25.7%) 略低,二者间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 土大黄煎剂对食管癌细胞的作用 土大黄煎剂在含生药量为 0.05、0.1、0.25 和 0.5 mg/ml 时对 TE13 细胞株有较明显的抑制作用,浓度为 0.1 mg/ml 时的抑制率最高;浓度为 0.25 mg/ml 时对 ECC 细胞及 TE13 细胞株的抑制率分别为 32.8% 和 45.3%。两组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 含土大黄药血清对传代的食管癌细胞株的作用 本实验制备的 C、D、E 3 组含药血清的大黄含量与其煎剂中 0.5、0.25、0.05 mg/ml 相对应。C、D 组两含药血清对传代的食管癌细胞株抑制作用明显,E 组含药血清抑制率很低为 6.9%,C、D 组与 E 组之间相比差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。另外 C 组含药血清比阳性对照顺铂组含药血清抑制作用还高,差异有统计学意义



表 1 中药土大黄煎剂对食管癌细胞及淋巴细胞的抑制作用

Table 1 Inhibition effects of tumor cells and PBL treated with rhubarb extract

Drug	dose (mg · ml ⁻¹)	TE13		ECC		PBL	
		OD($\bar{x} \pm s$)	CI(10 ⁻²)	OD($\bar{x} \pm s$)	CI(10 ⁻²)	OD($\bar{x} \pm s$)	CI(10 ⁻²)
NS	-	1.130 ± 0.020	-	0.614 ± 0.012	-	0.512 ± 0.070	-
DDP	0.01	0.602 ± 0.080 ^a	46.7	0.421 ± 0.013 ^a	31.4	0.380 ± 0.018 ^a	25.7
Rhubarb	10	1.088 ± 0.020 ^{ab}	10.8	0.603 ± 0.012 ^b	2.2	0.680 ± 0.086 ^{ab}	-32.8
(2)	5	0.896 ± 0.018 ^{ab}	20.7	0.552 ± 0.020 ^{ab}	10.1	0.565 ± 0.052 ^{ab}	-10.4
(3)	1	0.812 ± 0.166 ^{ab}	28.1	0.501 ± 0.013 ^{ab}	18.4	0.506 ± 0.052 ^b	1.17
(4)	0.5	0.708 ± 0.155 ^{ab}	37.3	0.450 ± 0.014 ^a	26.7	0.482 ± 0.039 ^b	5.86
(5)	0.25	0.617 ± 0.136 ^a	45.3	0.412 ± 0.012 ^{ac}	32.8	0.382 ± 0.041 ^a	25.4
(6)	0.1	0.543 ± 0.027 ^{ab}	51.9	0.381 ± 0.020 ^{abc}	37.9	0.358 ± 0.018 ^a	30.1
(7)	0.05	0.702 ± 0.028 ^{ab}	37.8	0.456 ± 0.013 ^a	25.7	0.368 ± 0.040 ^a	28.1
(8)	0.025	0.826 ± 0.020 ^{ab}	26.4	0.461 ± 0.012 ^a	24.9	0.377 ± 0.030 ^a	26.3
(9)	0.01	0.936 ± 0.018 ^{ab}	17.1	0.532 ± 0.012 ^{ab}	13.3	0.452 ± 0.032 ^{ab}	11.7

^acompared with vacuity control group, $P < 0.05$; ^bcompared with DDP group, $P < 0.05$; ^ccompared with Rhubarb group, $P < 0.05$.

($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 含药血清对传代食管癌细胞及外周血淋巴细胞的抑制作用

Table 2 Inhibition effects of TE13 and PBL treated with drug serum ($\bar{x} \pm s$)

Group	(mg · kg ⁻¹)	TE13		PBL	
		OD	CI(10 ⁻²)	OD	CI(10 ⁻²)
A	-	0.916 ± 0.077	-	0.321 ± 0.061	0.018 ^{ab}
B	5	0.600 ± 0.071 ^a	34.4	0.221 ± 0.061 ^a	31.2
C	1 000	0.580 ± 0.017 ^{abc}	36.7	0.215 ± 0.026 ^{ab}	33.0
D	500	0.690 ± 0.071 ^{abc}	31.0	0.238 ± 0.030 ^{ab}	25.8
E	100	0.853 ± 0.072 ^b	6.9	0.298 ± 0.018 ^{ab}	7.2

Note: ^acompare with vacuity control group, $P < 0.05$; ^bcompared with DDP group, $P < 0.05$; ^ccompared with E group, $P < 0.01$.

2.4 含土大黄药血清对 PBL 的作用 C、D、E 3 组含药血清对 PBL 均有抑制作用。与煎剂组中含量为 0.5、0.25、0.05 mg/ml 的 3 个相对应组的结果一致,说明含药血清与相应组的煎剂对 PBL 都有抑制作用。见表 2。

3 讨论

大黄是中国特产药材,因其产地不同具有许多别名,土大黄是部分地区对河套大黄、华北大黄的习称。

中药剂量是许多有效秘方的不传之秘,是中药功效发挥作用的关键,已有报道临床使用中药川芎剂量不同其功效不一样^[2]。为了挖掘临床疗效,避免药源性副作用,本文根据传统临床常用量,结合小鼠急性毒理试验结果以土大黄煎剂为原液,比较了不同浓度的土大黄煎剂对细胞增殖反应的影响。结果显示煎剂对 PBL 增殖反应的影响作用与 Kuo 等^[3]报道的单体大黄素能抑制活化的 T 淋巴细胞增殖作用结果相似,其研究显示大黄素可调节影响初级淋巴细胞的增生,高度抑制淋巴细胞的增殖。刘剑波^[4]等人的研究发现大黄素在体外诱导人肝癌细胞 HepG2 发生凋亡。Chung 等^[5]报告了大黄在无致突变性的剂量下,具有显著的体外抗突变作用。本文结果表明中药土大黄煎剂在 0.1 和 0.25 mg/ml

时,对食管癌细胞株、原代瘤细胞以及 PBL 均有抑制作用。高于 0.1 mg/ml 或低于 0.25 mg/ml 浓度时,抑制率随着剂量的增减而减低,表明土大黄在一定剂量时有抗癌作用。本文又利用血清药理学实验进行验证。结果证实在含药血清与煎剂在剂量相当时的结果相一致。由于煎剂中含有大黄蒽醌衍生物、大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄多糖等多种药效成分,在不同剂量时其各种有效成分的相对含量会更显差别,所以煎剂在不同剂量时发挥出的药效会有差异。煎剂在较低的剂量时可抑制外周血淋巴细胞增殖,而在高剂量时则促进外周血淋巴细胞增殖。显示出土大黄对具有免疫功能的淋巴细胞可能有双相调节作用,但其剂量用法及临床意义有待进一步探讨。土大黄煎剂对实体瘤和食管癌细胞株的抑制作用不尽相同,可能与其具有免疫调节作用有一定关系。

参考文献:

- [1] 孙丽霞,任金荣,单保恩等. 大黄煎剂对小鼠的急性毒性和自然免疫调节作用 [J]. 癌变·畸变·突变, 2006, 18(1): 35-37.
- [2] 李远,贾波. 浅谈剂量对川芎功效的影响 [J]. 四川中医, 2005, 23(1): 25-27.
- [3] Kuo YC, Meng HC, Tsai WJ. Regulation of cell proliferation, inflammatory cytokine production and calcium mobilization in primary human T lymphocytes by emodin from *Polygonum hypoleucum* Ohwi. [J]. *Inflamm Res*, 2001, 50(2): 73-82.
- [4] 刘剑波,高学岗,连涛,等. 大黄素在体外诱导人肝癌细胞 Hep G2 发生凋亡的初步研究 [J]. 癌症, 2003, 22(12): 1 280-1 283.
- [5] Chung JG, Li YC, Lee YM, et al. Aloe-emodin inhibited N-acetylation and DNA adduct of 2-aminofluorene and arylamine N-acetyltransferase gene expression in mouse leukemia L 1210 cells [J]. *Leuk Res*, 2003, 27(9): 831-840.