

平肺口服液对荷瘤小鼠细胞增殖的双向调节作用

朱世杰, 李佩文, 贾立群

(中日友好医院中医肿瘤科, 北京 100029)

[摘要] 目的 探讨平肺口服液抗肿瘤作用的机制。方法 将 30 只 Lewis 肺癌株模型的 C₅₇BL 小鼠,随机分成生理盐水空白组、平肺口服液组及顺铂化疗组,每组 10 只。给药 15 d 后取肿瘤组织和脾脏,用网撮法制成单细胞悬液。对瘤细胞和培养后的脾脏 T 淋巴细胞行嗜银染色,用 KL-2 型细胞图像分析系统测算细胞核银染面积与细胞核面积的比值(I.S)。结果 生理盐水空白组的瘤细胞核上可见密集的棕黑色颗粒;平肺口服液组瘤细胞核上的棕黑色颗粒明显少于空白组;化疗组瘤细胞核上的黑色颗粒更少。平肺口服液组 T 淋巴细胞的 I.S 值明显高于生理盐水空白组和化疗组,存在显著性差异;化疗组 T 淋巴细胞的 I.S 值低于生理盐水空白组。结论 平肺口服液能明显抑制肿瘤细胞的增殖,但其抑制作用小于化疗组;而平肺口服液促进 T 淋巴细胞增殖的作用则明显优于化疗组。

[关键词] 细胞增殖;中草药;肿瘤

[中图分类号] R730.52 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2003)03-0202-03

Pingfei Mixture's two-way adjustment to cell proliferation in mice with tumor

ZHU Shi-Jie, LI Pei-Wen, JIA Li-Qun

(Tumor Department of Traditional Chinese Medicine, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

[ABSTRACT] Objective To study the antineoplastic mechanism of Pingfei Mixture. Methods Thirty C₅₇BL mice bearing Lewis pulmonary carcinoma were randomly divided into 3 groups: saline control group, Pingfei Mixture group and cisplatin group. Fifteen days later, tumor tissues and spleens were taken out and made into unicellular suspension. Argyrophil staining was taken to carcinoma cells and cultured T cells. KL-2 style cell image analysis system was used to analyze the rate between AgNORs and nuclear region (I.S). Results There were dense brownish-black granules in tumor cell nuclear of saline control group. The brownish-black granules of Pingfei Mixture group and cisplatin group were less than those of saline control group. The differences of T cell I.S in these three groups were significant. The I.S of Pingfei Mixture was higher than that of the other groups, and the I.S of the cisplatin group was the lowest. Conclusion Pingfei Mixture can inhibit tumor cell proliferation, although the effect is inferior to cisplatin. Pingfei Mixture can also promote T cell proliferation and its effect was superior to cisplatin.

[KEY WORDS] cell proliferation; drugs, Chinese herbal; neoplasms

[J Chin Integr Med,2003,1(3): 202-204]

平肺口服液是中日友好医院的院内制剂。临床研究表明,该药在改善肺癌患者的临床症状、提高其生存质量、延长其生存期方面均优于单纯化疗组;而在肿瘤病灶的缓解率方面则不如单纯化疗组^[1]。本实验通过测算荷瘤小鼠的瘤细胞和 T 淋巴细胞的核仁组织区嗜银蛋白(nucleolar organizer region associated argyrophil proteins, AgNORs)的染色面积,从细胞增殖学的角度探讨平肺口服液抗肿瘤作用的机制。

1 材料与方

1.1 实验材料

1.1.1 药物及试剂 平肺口服液由沙参、百合、五味子、全栝蒌、鱼腥草、白花蛇舌草等组成,水煎醇沉后调整浓度为含生药 2.575 g/ml,4℃ 保存备用。

按照陈奇的《中药药理研究方法学》^[2]记载的方法计算小鼠的用药剂量为生药 25.75 g/kg。顺铂(山东齐鲁制药厂生产,批号:9904008)用生理盐水配制成浓度为 0.1 mg/ml 的溶液,避光保存。银染液:A 液是含 50% AgNO₃ 的水溶液;B 液是含 3% 甲酸 + 2% 明胶的水溶液。低渗液是浓度为 0.07 mol/L 的 NaCl 水溶液。固定液按照 3 份乙醇 + 1 份冰醋酸的比例配制而成。

1.1.2 实验动物 采用小鼠 Lewis 肺癌株模型。C₅₇BL 小鼠(中国医学科学院实验动物所提供)共 30 只,雄性,体重(20±1)g,于每只小鼠的右腋皮下

[基金项目] 国家中医药管理局基金资助项目(00-01LP03)
[作者简介] 朱世杰(1972-),男,博士,主治医师。E-mail: zhu .s .j @263 .net

接种 2×10^6 个 Lewis 肺癌细胞。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及用药 将 30 只小鼠随机分成 3 组, 每组 10 只。(1) 生理盐水空白组, 自接种后的次日起, 每只小鼠灌服生理盐水 0.2 ml/d, 共 15 d。(2) 平肺口服液组, 自接种后的次日起, 每只小鼠灌服平肺口服液 0.2 ml(含生药 0.515 g)/d, 共 15 d。(3) 化疗组, 自接种后的次日起, 每只小鼠腹腔注射 0.2 ml 顺铂/次(按照 1 mg/kg 给药), 隔天 1 次, 共 7 次。

1.2.2 细胞悬液制备 实验进行至第 15 天时, 拉颈处死小鼠, 无菌取瘤组织和脾脏, 分别用网撮法制成单细胞悬液。取脾细胞悬液 3 ml, 缓慢加入含有淋巴细胞分离液的无菌试管中, 使标本与淋巴细胞分离液之间形成清晰的分层界面。在室温下, 以 2 000 r/min 离心 15 min 后, 可见淋巴细胞悬浮于淋巴细胞分层液和血清之间, 形成一薄层。用吸管吸出淋巴细胞置于另一试管中(注意尽量少吸出淋巴细胞分离液), 加入 0.1 mol/L PBS(pH 7.2~7.4), 用吸管吹打均匀。在室温下, 以 1 200 r/min 离心 15 min, 弃去上清液后加入 0.1 mol/L PBS(pH 7.2~7.4), 同法再洗 1 次, 弃去上清液后加入 1 ml 完全 1640 培养液, 混匀后加入含 4 ml RPMI-1640 培养液的培养瓶中, 置于 37℃ 培养箱中培养 72 h 后备用。瘤细胞悬液则直接备用。

1.2.3 检测方法 取备用的细胞悬液 5 ml 放入试管中, 以 2 000 r/min 离心 5 min。弃去上清液, 留取沉淀, 加入低渗液 5 ml, 用吸管打匀, 以 2 000 r/min 离心 5 min。弃去上清液, 留取沉淀, 加入低渗液 5 ml, 再以 2 000 r/min 离心 15 min。弃去上清液, 于沉淀中加入 0.3 ml 的固定液, 混匀后滴在预冷的载玻片上, 每片 2 滴, 自然晾干。随后, 按顺序在制好的载玻片上滴 3 滴 A 液和 3 滴 B 液, 加上盖玻片, 置于 90℃ 水浴箱的顶盖铝板上。待涂片转变成深黄色时取下玻片, 去除盖玻片用清水冲去浮色, 空气中使其自然干燥。用 KL-2 型细胞图像分析系统计算细胞核银染面积与细胞核面积的比值(I.S)。

1.3 统计方法 用 SPSS 软件进行两组数据之间比较的 *t* 检验和多组数据之间比较的方差分析。

2 结果

2.1 抑瘤率 从肿瘤的体积来看, 空白对照组要明显大于平肺口服液组和化疗组。取标本称取肿瘤重量, 并按下述公式计算: 抑瘤率 = $[1 - (\text{治疗组平均瘤重} / \text{空白对照组平均瘤重})] \times 100\%$ 。结果见

表 1。

表 1 各组的平均瘤重和抑瘤率

组别	<i>n</i>	平均瘤重(g)	抑瘤率(%)
空白对照组	10	1.13 ± 0.3	
平肺口服液组	10	0.71 ± 0.5	37.2
化疗组	10	0.45 ± 0.3*	60.2

注: 与平肺口服液组比较, * $P < 0.05$; 与空白对照组比较, $P < 0.01$

2.2 平肺口服液对瘤细胞增殖的影响 各组肿瘤细胞核均被染成棕黄色, 其中空白对照组肿瘤细胞核上可见密集的细小棕黑色颗粒; 平肺口服液组肿瘤细胞核上的棕黑色颗粒要明显少于空白对照组, 并且呈斑块状; 化疗组肿瘤细胞核上的黑色颗粒更少, 形状更细小。各组肿瘤细胞核的 I.S 值见表 2。

表 2 各组肿瘤细胞和 T 淋巴细胞的 I.S 检测值

组别	<i>n</i>	肿瘤细胞 I.S	T 淋巴细胞 I.S
空白对照组	10	25.7 ± 3.1	3.1 ± 0.8
平肺口服液组	10	12.5 ± 2.3**	13.1 ± 0.5**
化疗组	10	10.8 ± 1.5**	1 ± 0.3*

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与平肺口服液组比较, $P < 0.01$

2.3 平肺口服液对 T 淋巴细胞增殖的影响 各组 T 淋巴细胞的 I.S 检测值见表 2。

3 讨论

细胞的过度增殖是恶性肿瘤细胞所具有的重要生物学特性之一。T 淋巴细胞也是具有增殖潜力的一种免疫细胞, 其增殖能力的高低反映了细胞免疫功能的强弱。肿瘤细胞的过度增殖和 T 淋巴细胞的增殖力的降低是恶性肿瘤治疗过程中普遍存在的一对矛盾。目前, 有许多指标可以反映细胞的增殖水平, 而核仁区酸性非组蛋白的嗜银染色则很早就引起了肿瘤研究者的注意。1975 年, Goodpasture 等^[3]首次报道了核仁组织区嗜银蛋白染色在肿瘤研究中的应用。此后经过不断改良, 其作为一种检测肿瘤的方法已得到国内外专家的公认。AgNORs 的变化可以作为反映 DNA 转录活动和细胞增殖的指标, 同时也是鉴别良、恶性肿瘤和进行肿瘤分级的依据。因此, 肿瘤细胞 AgNORs 数量的减少, 不仅可以说明肿瘤增殖程度的降低, 也说明了肿瘤的恶性程度也有所降低。近年来, 国内专家从相反的角度选用 T 淋巴细胞作为染色对象, 通过计算机来定

量计算 I S 值,并将其作为反映 T 淋巴细胞生物活性的指标。结果发现,恶性肿瘤组 T 淋巴细胞的 I S 值明显低于非肿瘤组及正常人组^[4]。本实验中,我们选用这种方法同时检测肿瘤细胞和 T 淋巴细胞的 I S 值,使各组之间具有可比性。

许多临床研究证实,由于化疗和放疗作用性质的单一,因此在抑制肿瘤细胞增殖的同时也抑制了 T 淋巴细胞的增殖,从而降低了机体的细胞免疫水平,直接或间接导致了恶性肿瘤术后的复发和远处转移。本次实验证明,平肺口服液具有一定的细胞毒作用,可以明显抑制肿瘤细胞的增殖,其抑制肿瘤的作用虽然不及顺铂化疗组,但和空白对照组比较仍具有统计学差异。平肺口服液还可以保护机体的免疫系统,使其免受进一步的伤害,并能调动机体的抗肿瘤能力。实验结果表明,平肺口服液组 T 淋巴细胞的增殖活性明显高于空白对照组,而化疗组则没有这种作用。

关于中医药治疗疾病的作用机制,有学者提出“双向调节理论”、“双调自稳理论”等多种解释,都在

(上接第 172 页)

癌细胞的作用,能改善血液流变学的特性,降低血黏度、抑制血小板活性、促进纤维蛋白溶解、抗血栓形成以及消除微循环障碍,进而起到抑瘤及抗肿瘤转移的作用。(3)诱导肿瘤细胞凋亡。细胞凋亡是受基因控制的一种主动性的细胞自杀过程。当凋亡基因发生失活、突变,或者抑制凋亡的基因过度表达,肿瘤细胞便可通过其中的某种途径逃避凋亡而发生转移。榄香烯是从中药莪术中提取的有效成分。钱军等^[8]研究发现,榄香烯通过抑制肺癌细胞 DNA、RNA 及蛋白质的合成,干扰肺癌细胞的糖脂代谢,并通过诱导癌细胞的分化和凋亡发挥抑瘤和抗转移的作用。(4)改变淋巴结的微环境。肿瘤淋巴结微转移灶的转归与淋巴结内的微环境有关,若微转移灶不能适应淋巴结内的微环境,则肿瘤细胞发生死亡。随着分子生物学的迅速发展,今后的研究重点将放在淋巴结内的微环境或微生态系统上,即肿瘤微转移灶与淋巴结内微环境之间的相互作用,这将是一个富有挑战性的新领域。在此研究过程中,可能会发现许多新的作用靶点,而中医药的特点正是有效部位多及作用的多靶点,因此在改变淋巴结微环境方面可能具有更大的优势。

综上所述,肿瘤的发生发展是一个多步骤、多因素参与的复杂的生物学过程。如果能利用中药复方

一定程度上阐明了中药的作用特点^[5]。平肺口服液既能抑制肿瘤细胞的增殖,又可促进 T 淋巴细胞的增殖,探讨其原因可能是由于此方中既含有扶正的药物,又含有清热解毒的药物。中药复方中所含的相对立成分使其具有双向调节的作用。

[参考文献]

- 1 李佩文,张代钊,郝迎旭,等.平肺方治疗非小细胞肺癌 109 例临床观察[J].中医杂志,1995,36(2):87-89.
- 2 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:中国医药科技出版社,1996.96-97.
- 3 王瑞年,胡丹毅.肿瘤研究的一项新指标[J].国外医学·肿瘤学分册,1989,12(1):22-24.
- 4 林其燧,陈立奇,吴卫,等.外周淋巴细胞脱氧核糖核酸核蛋白体转录活性分析[J].中华医学检验杂志,1996,19(4):220-224.
- 5 刘铜华,吕仁和,王永炎.论中医药防治疾病的内在规律——双调自稳规律[J].中国中医基础医学杂志,1998,4(12):3-5.

[收稿日期] 2003-03-02 [本文编辑] 黄文华 周庆辉

成分多样性、作用多靶点的特点,开发出针对肿瘤淋巴结微小转移灶的中药复方制剂,将其应用于肿瘤的治疗之中,发挥其抗肿瘤细胞转移的优势,那么中医药在杀灭癌肿淋巴结微小转移灶方面将会有突破性的进展,必将开创中医药防治肿瘤的新天地。

[参考文献]

- 1 肖卫东,袁波.胃癌淋巴结微转移的研究进展[J].实用癌症杂志,2002,17(4):443-444.
- 2 梁元姣.肿瘤微转移的检测及临床意义[J].医学研究生报,2000,13(2):114-117.
- 3 黄弘伟,张显岚.腹腔化疗和静脉化疗对胃肠道癌术后患者免疫功能的影响[J].华夏医学,2001,14(4):413-414.
- 4 闫石,王学谦.输血相关的免疫调节改变及其预防[J].中国输血杂志,2000,13(4):276-278.
- 5 张天泽.肿瘤学[M].天津:天津科学技术出版社,1998.2646.
- 6 李小军,任午生.反复输血对大肠癌患者预后的影响[J].内蒙古医学杂志,2001,33(3):213-214.
- 7 程晓东,郭峰,刘嘉湘,等.中药扶正方对小鼠 Lewis 肺癌的疗效及其免疫学机理的研究[J].中国中西医结合杂志,1997,17(2):88-90.
- 8 钱军,秦叔逵,杨爱珍,等.榄香烯乳逆转人肺癌细胞的实验研究[J].肿瘤防治研究,1996,23(5):299-301.

[收稿日期] 2003-06-25 [本文编辑] 黄文华 周庆辉