

龙泉复方制剂的抑瘤作用及其作用机制

陈焕朝^{1,3}, 贺兰湘², 高小海², 李广灿², 周济兰², 刘惠兰², 甘宁³

Effect of Chinese Medicine Longquan Fufang on Tumor Growth and Its Mechanism

CHEN Huan-chao^{1,3}, HE Lan-xiang², GAO Xiao-hai², LI Guang-can², ZHOU Ji-lan², LIU Hui-lan², GAN Ning³

1. Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China; 2. Hubei Cancer Institute; 3. Department of Traditional Chinese and Western Medicine, Hubei Cancer Hospital

Abstract: **Objective** To study the effect of Chinese medicine Longquan Fufang on tumor growth and its mechanism. **Methods** Lewis Lung cancer line was inoculated subcutaneously in DBA/2 mice. S180 cells was inoculated intramuscularly in BALB/c mice. The supernatant of herbs (0.5ml/day, each mouse) was given into mouse stomach for ten times. Cytotoxicity of CTL in vitro was measured with MTT colorimetry. The expression of mRNA was analyzed with RT-PCR. **Results** Longquan Fufang can inhibit significantly the growth of two cancer cell lines in mice. Its effect is dependant on dosage of herbs supernatant used. The same dosage of herbs is more effective on Lewis lung cancer cells than on S180. After treatment with herbs, CTLs from mice spleen have stronger toxicity for tumor cells in vitro. The mRNA expression of IL-2 and IFN- γ was up-regulated by administration of herbs. The mRNA expression of B7-1 did not changed significantly. **Conclusion** Longquan Fufang is a promising Chinese medicine for tumor therapy. Its mechanism could be direct toxicity for tumor cells and indirect inhibition by immune regulation.

Key words: Longquan Fufang; Chinese medicine; IL-2; IFN- γ ; Cancer; Immunoregulation

摘要: **目的** 探讨中药验方“龙泉复方制剂”的抑瘤作用及其作用机制。 **方法** Lewis 肺癌接种于 DBA/2 小鼠。S180 肉瘤接种于 BALB/C 小鼠。将各味中药成分煮沸煎制, 过滤后备用, 每只鼠 0.5 ml/d, 共 10 次。体外细胞毒性实验: MTT 比色法。脾细胞细胞因子 mRNA 表达水平分析: RT-PCR。 **结果** (1) 本方对两种肿瘤都有明显的抑制作用, 抑瘤作用与药量大小呈正比。同量的药对 Lewis 肺癌的作用更强一些。(2) 用药后小鼠脾细胞对肿瘤细胞的杀伤率明显高于对照组; 随着效靶比例的增加小鼠脾细胞对肿瘤细胞的杀伤率逐渐上升。(3) 用药组脾细胞的 IL-2 和 IFN- γ 的表达水平均明显增高。B7-1 的表达比对照组有所降低, 但差异没有统计学意义。 **结论** 龙泉复方制剂是一种非常有前景的治疗肿瘤的复方中药, 其作用机制可能是, 对肿瘤细胞直接的毒性作用和通过促进免疫反应的间接抑瘤作用。

关键词: 龙泉复方; 中药; IL-2; IFN- γ ; 肿瘤; 免疫调节

中图分类号: R730.52 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2006)04-0255-03

0 引言

“龙泉复方制剂”是湖北省肿瘤医院中西医结合科用于治疗肺癌、肝癌等多种肿瘤的一个中药验方。在三十几年的临床应用中该验方被证明不仅可以改善症状, 提高患者的生存质量, 而且可以减少复发, 延长患者的生存期^[1-3]。由于方中有几味主药如马钱子等有一定的毒性, 对免疫功能也许会有一些的

影响, 而另几味药如黄芪、灵芝等可以促进免疫功能, 这些药组成的复方对于免疫系统的作用目前尚不清楚。本研究中通过小鼠肿瘤模型研究该复方的抑瘤作用, 并探讨其作用机制, 希望能为更有效地进行肿瘤的中药治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 BALB/c 鼠, 购于湖北省医学科学院实验动物中心。DBA/2 小鼠, 购于中科院北京实验动物研究中心。雌雄各半, 每只 18~20 克, 每组 10 只。

1.1.2 肿瘤细胞株 Lewis 肺癌由中科院北京药物研究所提供。S180 肉瘤 (Sarcoma 180) 由湖北省

收稿日期: 2005-07-29; 修回日期: 2006-01-26

基金项目: 湖北省科委科研基金资助项目 (鄂科计 [2000] 4 号)

作者单位: 1. 430079 武汉, 湖北省肿瘤医院; 2. 湖北省肿瘤研究所; 3. 湖北省肿瘤医院中西医结合科

作者简介: 陈焕朝 (1951-), 男, 主任医师, 主要从事肿瘤的中医药治疗及作用机制研究

肿瘤研究所保存。

1.1.3 引物 β -actin、B7-H1、IL-2 和 INF- γ 的特异性引物由上海博亚公司合成。引物序列为:产物大小(bp)上游引物下游引物 IL-2: 5'-ctccatgagctttgtacaagg-3', 5'-cagtcaccgccatacttag-3'; INF- γ : 5'-agcggctgactgaactcagattgtag-3', 5'-gtcacagtttcagctgtatagg-3'; B7-H1: 5'-gtgaaacctgagctttatcc-3', 5'-gaccattctgagacaattcc-3'; β -actin: 5'-atctctgctcgaagtctagag-3', 5'-atgggtcagaaggactcctatg-3'。

1.1.4 方中主药及其煎制方法 马钱子、山慈姑、喜树果、龙葵、黄芪、石上柏、灵芝、青黛、紫菀。将各味优质的中药成分浸泡半小时后煮沸煎制约 30min, 纱布过滤后文火煎制, 浓缩滤液, 使每毫升药液分别相当于生药 1g、0.8g 和 0.6g。滤液保存于 4℃ 冰箱中。

1.2 方法

1.2.1 肿瘤接种 Lewis 肺癌: DBA/2 小鼠右腋窝皮下注射 0.1ml 细胞 (5×10^5); S180 肉瘤: 在 BALB/c 小鼠右后腿肌肉注射 0.1ml 细胞 (5×10^5)。

1.2.2 给药方式 肿瘤接种后次日开始中药灌胃, 每次 0.5ml, 每日一次, 共 10 次。对照组给予同量的生理盐水。4 周后杀死小鼠, 称瘤重。

1.2.3 CTL 的细胞毒性反应 采用 MTT 比色法检测 CTL 的细胞毒性反应: 取接种了 S180 肉瘤细胞后的小鼠脾细胞, 调细胞浓度为 1×10^6 个/ml, 24 孔板中 (2 ml/孔) 培养 3d (37℃, 5% CO₂)。培养液为 RPMI1640 培养液 (10% 小牛血清, mL 2500 U/ml)。按不同的效靶比例加入 S180 细胞, 混合培养 24h 后, 轻轻吸弃上清, 加入 20 μ l MTT, 室温 4h 后, 加入 100 μ l DMSO 溶解结晶, 在酶标仪上 (波长为 570nm) 比色测定吸光度, DMSO 调零点。

1.2.4 细胞因子的 mRNA 表达水平检测 (RT-PCR 法) 用 Trizol 提取荷瘤小鼠脾脏细胞中的总 RNA, 再将总 RNA 逆转录成 cDNA, 并以 cDNA 为模板, 加入特异性引物进行 PCR 扩增, 同时扩增 β -actin 作为内参照。扩增条件为: 95℃ 5s; 95℃ 20s, 55℃ 50s, 72℃ 60s, 30 个循环; 最后一个循环延伸 5min。扩增产物电泳后 (1.5% 琼脂糖凝胶), 用凝胶成像系统进行半定量分析, 即以目的基因和 β -actin 的扩增产物量的比值来分析其 mRNA 相对表达量。

1.2.5 统计方法 采用 *t* 检验进行组间差异的显著性分析。

2 结果

2.1 抑瘤实验 本方对两种肿瘤都有明显的抑制

作用 ($P < 0.05$), 抑瘤作用与药量大小呈正比。同量的药对 Lewis 肺癌的作用更强一些, 见表 1。

表 1 不同药量对不同肿瘤的生长抑制作用比较

	生药量 (g / 鼠 / 日)	抑制率 (%)
Lewis 肺癌	0.3	20.58
	0.4	30.22
	0.5	43.72
S180 肉瘤	0.3	13.25
	0.4	17.44
	0.5	33.58

2.2 CTL 的细胞毒性反应 如图 1 所示, 随着效靶比例的增加, 小鼠脾细胞对肿瘤细胞的杀伤率逐渐上升, 用药后小鼠脾细胞对肿瘤细胞的杀伤率明显高于对照组 ($P < 0.05$)。

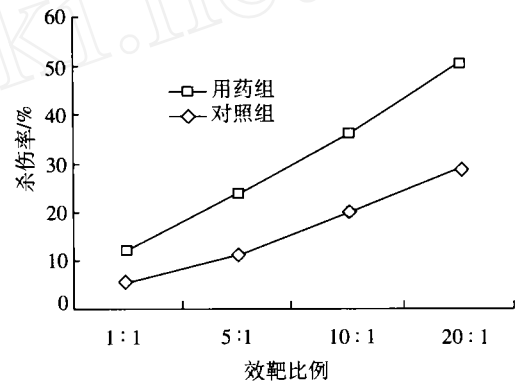


图 1 用药组和对照组 CTL 反应比较

2.3 脾细胞的细胞因子表达水平 如图 2 所示, 用药组脾细胞的 IL-2 和 INF- γ 的表达水平均明显增高 ($P < 0.05$)。B7-H1 的表达较对照组有所降低, 但差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。

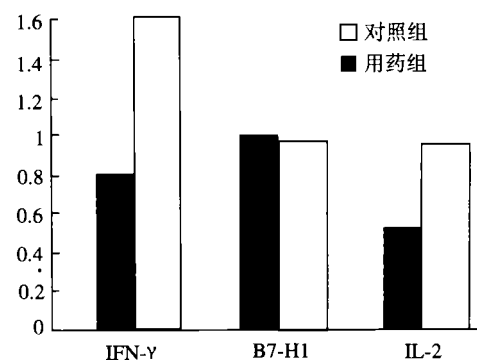


图 2 脾细胞细胞因子 mRNA 表达水平

3 讨论

虽然中西医是两种独立的体系, 对疾病的病因、病机的认识不同, 但从更深层次来理解, 两种体系是

可以融汇贯通的。以免疫系统为例,西医对肿瘤免疫的研究已经深入到了分子水平,不仅发现了许多与肿瘤发生相关的基因,而且对各种免疫调节分子所建立起来的复杂网络也有了很深刻的认识。该网络中任何一个分子的改变都可能打破机体已经建立起来的平衡,从而导致一系列的连锁反应,促进了肿瘤的免疫逃逸。这和中医所强调整体观有异曲同工之妙。而且中医所强调的“扶正”,其实是和西医的“增强免疫功能”所对应的,当免疫功能维持在正常水平,机体就可以通过多种免疫机制来杀伤肿瘤细胞,这可理解为中医所指的“消瘤”,只不过这是一种间接的“消瘤”方式,而化疗药对肿瘤细胞的杀伤是一种直接的“消瘤”方式。

从我国特有的植物—喜树分离而得的喜树碱,具有显著抑制肿瘤生长的作用。WHO 已经把喜树碱衍生物的研究,作为抗癌药物的主攻方向之一。山慈菇中含有秋水仙碱,它可以抑制细胞的分裂^[4],灵芝中的灵芝酸和灵芝多糖均被证实具有抑制肿瘤生长的作用^[5,6]。这些研究提示某些中药对肿瘤细胞的生长有直接的杀伤作用。然而,中药的优势不在于对肿瘤细胞的直接杀伤作用,而在于它对免疫系统的促进,间接地抑制肿瘤的生长,即通过“扶正”而“消瘤”。

由于中药在使用过程中的稳定性和质量的可控性不如西药,而且中药复方的有效成分多,作用机制复杂,疗效评价体系未能与国际接轨,因此阻碍了中医药发展的步伐。为了促进中医药的发展,让祖国的传统医学能更好地为广大的肿瘤患者服务,对肿瘤临床上已经被证实有明显疗效的中药验方的作用机制进行探讨是很有必要的。本研究中所用的几种主药如马钱子、山慈菇、龙葵、喜树果等,可通过不同的机制直接杀伤肿瘤细胞^[5-8];但这些药对机体的免疫系统也有一定的毒性,尤其是马钱子^[9],过量还可能致人中毒死亡;我们在动物实验中也发现本复方制剂灌胃后小鼠肺癌和 S180 的生长均被明显抑制,抑制作用的大小与所给药量呈正比;提示本复方制剂的动物实验结果和临床效应是一致的。而且没有发现明显的副作用。

黄芪、灵芝、青黛等中药都具有增强肿瘤免疫的作用,目前研究发现这些中药可以促进 T 细胞的转化、促进 NK 细胞的杀伤功能和红细胞免疫功

能^[10,11]。本研究结果提示,龙泉复方制剂不仅可以促进小鼠脾脏 T 细胞的特异性杀伤能力,还可以增加 I 型细胞因子 IL-2 和 INF- γ 的表达,从而促进了细胞因子所介导的免疫反应。

B7-1 分子是最近几年才发现的一个免疫负调控分子,它通过与活化后 T 细胞表面的凋亡受体 PD-1 结合而诱导 T 细胞凋亡,因此它在肿瘤免疫逃逸过程中起着非常重要的作用^[12]。B7-1 作为一个肿瘤免疫治疗的靶分子而倍受关注。本实验通过 RT-PCR 方法检测到用药后 B7-1 的 mRNA 表达有所降低,但差异没有统计意义。

结论,龙泉复方制剂是一种非常有前景的治疗肿瘤的复方中药,其作用机制可能是,对肿瘤细胞直接的毒性作用和通过促进免疫反应的间接抑瘤作用。

参考文献:

- [1] 胡宏莲,陈焕朝,徐少悟. 中药配合肝动脉化疗栓塞中晚期肝癌 58 例疗效观察[J]. 河南肿瘤学杂志, 2001, 14(6): 412-414.
- [2] 李泽浩,陈焕朝. 健脾通络法治疗中晚期肝癌 22 例观察[J]. 肿瘤防治研究, 1998, 25(5): 406-407.
- [3] 陈焕朝. 健脾理气中药配合经皮股动脉导管介入治疗中 3 期肝癌 32 例疗效观察[J]. 深圳中西医结合杂志, 1997, 7(1): 11-12.
- [4] 文林,元晶. 山慈菇的功用[J]. 中国民族民间医药杂志, 2003, 65: 343-344.
- [5] 周昌艳,唐庆九,杨焱,等. 灵芝中有效成分灵芝酸的抑瘤作用研究[J]. 菌物学报, 2004, 23(2): 275-277.
- [6] 赵世华,姚文兵,庞秀炳,等. 芝多糖分离鉴定及抗肿瘤活性的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(4): 173-176.
- [7] 陈汝盛,厉将斌,郭晓键,等. 猪苓龙葵水提物的抗肿瘤药效[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(5): 481-482.
- [8] 成积儒,郑裕明,汤敏中,等. 中草药石上柏阻断促癌物激活 EB 病毒抗原表达的研究[J]. 华夏医药, 2001, 14(3): 263-264.
- [9] 何敏,韩英. 马钱子的研究新进展[J]. 黑龙江中医药, 1994, 6: 46-49.
- [10] 宁安红,曹婧,黄敏,等. 灵芝多糖对荷瘤小鼠肿瘤免疫系统的影响[J]. 中国微生物学杂志, 2004, 16(1): 13-14.
- [11] 薄芯. 生化复合黄腐酸、青黛和绞股蓝总甙对 T 淋巴细胞转化的影响[J]. 中国中医药科技, 2003, 10(6): 351-352.
- [12] Dong H, Chen L. B7-1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity[J]. J Mol Med, 2003, 81(5): 281-287.

[编辑: 贺文]