

中药消岩汤剂与特罗凯联合抗肿瘤的体外实验研究

贾英杰¹ 李小江¹ 陈亮¹ 赵成¹ 黄敏娜¹ 沈杰²

摘要:目的 观察中药复方消岩汤剂和特罗凯(盐酸厄洛替尼),两种药物单独使用以及联合应用后体外抗肿瘤作用,并观察这两种药物之间是否存在协同效应。方法 通过 MTT 法检测消岩汤剂和特罗凯单独及联合应用对人肺腺癌 A549 细胞株细胞增殖的影响;通过流式细胞术检测细胞凋亡。结果 单药高剂量消岩汤剂组对 A549 的抑制率较高;而单药特罗凯组及低剂量消岩汤剂特罗凯联合组未显示明显的抑瘤作用;高剂量消岩汤剂联合特罗凯组显示细胞坏死明显。经药物处理过血清作用于细胞结果显示:各剂量消岩汤剂与特罗凯联合组有一定的抑瘤作用,而各单药组均未显示出明显的抑制作用。结论 中药消岩汤剂以及消岩汤剂联合特罗凯体外实验均具有一定的抗肿瘤作用;两药联合具有较好的协同抗肿瘤作用。

关键词:消岩汤剂;特罗凯;抗肿瘤;细胞凋亡;中医实验医学;中药药理学

doi:10.3969/j.issn.1003-8914.2011.02.025 文章编号:1003-8914(2011)-02-0232-03

1 实验材料

1.1 细胞株 A549(人非小细胞肺癌细胞株)、人 LA795 非小细胞肺癌细胞株,购自中国科学院上海生命研究院细胞库。在天津环湖医院研究室传代保存,细胞株贴壁生长。

1.2 样品与试剂

1.2.1 样品:①中药消岩汤剂(组成:黄芪、太子参、夏枯草、生牡蛎、白花蛇舌草、蜂房、姜黄、郁金),剂量为 7.0g/ml,中药浸膏,水煮醇沉法,用于灌胃给药。天津中医药大学附属第一医院药厂制备。②特罗凯:化学名称:N-(3-乙炔苯基)-6,7-双(2-甲氧乙氧基)-4-喹啉胺盐酸盐,分子量:429.90,白色包衣片,购于上海罗氏制药有限公司,进口药品注册证号:H20060108。

1.2.2 主要试剂

RPMI 1640、新生小牛血清、DMSO、MTT、苦味酸、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、蛋白酶 K 等。

1.2.3 主要仪器与设备

医用净化工作台、CO₂ 培养箱、低温高速离心机、倒置相差显微镜、生物显微镜、电子分析天平、台式恒温振荡器、一次性 96 孔培养板、酶标板自动读数仪、流式细胞分析分选系统等。

2 实验方法

2.1 样品及对照品的配置 中药消岩汤剂及特罗凯浓度于实验前以生理盐水充分溶解,微孔滤膜(0.22μm)除菌,使用时以培养液稀释至所需浓度。

2.2 细胞培养 A549 实体瘤细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 完全培养基,在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。种板前取对数生长期的细胞用 0.05% 胰

蛋白酶消化后离心,用 4g/L 台盼蓝染色后计算细胞数和活率(>98%),并将细胞密度调整为 1.5×10^5 /ml 备用。

2.3 体外抗肿瘤活性测定

2.3.1 四氮唑蓝比色法(MTT 法) 将对数生长期的 A549 肿瘤细胞以每毫升 1.5×10^5 个接种于 96 孔培养板中,每孔 200μl,每组重复 3 孔。实验组加入不同剂量的消岩汤剂(30、20mg/ml)、特罗凯(600、400μg/ml)及两药联合药液(30mg/ml 中药 + 600μg/ml 特罗凯、30mg/ml 中药 + 400μg/ml 特罗凯、20mg/ml 中药 + 600μg/ml 特罗凯、20mg/ml 中药 + 400μg/ml 特罗凯),及备用的各组不用药物处理过的血清,对照组加入等体积含 0.01% 丙二醇的 RPMI-1640 溶液(贴壁细胞预培养 24h 贴壁后加药)。药物作用 48h 后加入 MTT(5mg/ml),继续培养 4h 后,小心吸弃上清液,加入 DMSO 150μl 振荡溶解完全后酶标仪检测(570nm),根据下列公式计算抑制率。并通过显微镜观察细胞形态。

抑制率(%) = (1 - 实验 OD 值 / 对照 OD 值) × 100%

2.3.2 流式细胞仪检测凋亡率 取对数生长期的 A549 细胞以 1.5×10^5 /ml 接种于 6 孔板,实验组加入不同剂量的消岩汤剂(30、20mg/ml)、特罗凯(600、400μg/ml)及两药联合药液(30mg/ml 中药 + 600μg/ml 特罗凯、30mg/ml 中药 + 400μg/ml 特罗凯、20mg/ml 中药 + 600μg/ml 特罗凯、20mg/ml 中药 + 400μg/ml 特罗凯),对照组加入等体积含 0.01% 丙二醇的 RPMI-1640 溶液。作用 48h 后收集各组细胞按下列步骤处理细胞。①冷 PBS 洗涤细胞 2 次(2000rpm 离心 5min);收集 1.5×10^5 /ml。②加入 500μl 的 Binding Buffer 悬浮细胞。③加入 5μl Annexin V-FITC 混匀后,加入 5μl PI,混匀。④室温,避光、反应 15min。⑤在

作者单位:1. 天津中医药大学第一附属医院肿瘤科(天津 300193);

2. 天津中医药大学(天津 300193)

1h 内进行流式细胞仪检测。

2.4 数据处理 使用 spssV13.0 统计软件包对数据进行统计学处理。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 实验结果

3.1 MTT 法测药物对 A549 的增殖的影响 A549 细胞被不同剂量的消岩汤剂、特罗凯药液分别作用 48h 后,生长抑制率通过 MTT 检测。结果见表 1。

表 1 药物作用于细胞 48h 的 MTT 结果分析 ($\bar{x} \pm s$)

组别	吸光度 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)
对照组	0.724 \pm 0.022	-
消岩汤剂 (30mg/ml)	0.250 \pm 0.032 *	65.50
消岩汤剂 (20mg/ml)	0.479 \pm 0.045 *	33.84
特罗凯组 (600 μ g/ml)	0.789 \pm 0.057	-8.98
特罗凯组 (400 μ g/ml)	0.765 \pm 0.049	-5.66
联合组 (30mg/ml + 600 μ g/ml)	0.109 \pm 0.038 *	84.94
联合组 (30mg/ml + 400 μ g/ml)	0.141 \pm 0.031 *	80.52
联合组 (20mg/ml + 600 μ g/ml)	0.786 \pm 0.019	-8.56
联合组 (20mg/ml + 400 μ g/ml)	0.805 \pm 0.058	-11.19

注:样本量 $n=8$ 。经方差分析检验, * 与空白组比较, $P < 0.05$ 。

药物直接作用于 A549 经显微镜拍照 ($\times 200$) 如图 1~4 所示:

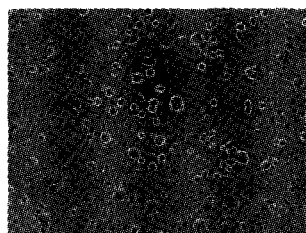


图 1 对照组 ($\times 200$)



图 2 联合组 (30mg/ml + 600 μ g/ml) ($\times 200$)

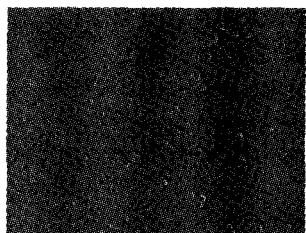


图 3 消岩汤剂 (30mg/ml) ($\times 200$)

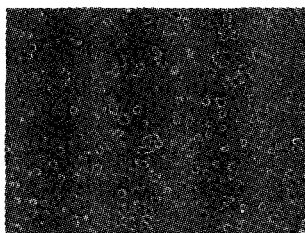


图 4 特罗凯组 (600 μ g/ml) ($\times 200$)

A549 细胞被备用的,经不同组药物作用体内后的血清分别作用 48h 后,生长抑制率通过 MTT 检测。结果见表 2。

含药血清作用于 A549 经显微镜拍照 ($\times 200$) 如图 5~6 所示:

结果显示经药物直接作用的 A549 细胞,高剂量的消岩汤剂抑制率最高 ($P < 0.05$),而经高剂量消岩汤剂

联合特罗凯作用的细胞坏死较明显,绝大部分细胞荧光减弱甚至消失,特罗凯组未能抑制肿瘤细胞生长。

表 2 血清作用于细胞 48h 的 MTT 结果分析 ($\bar{x} \pm s$)

组别	吸光度 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)
对照组	0.737 \pm 0.029	
高消组	0.705 \pm 0.056	4.34
特罗凯组	0.691 \pm 0.046	6.24
低联组	0.651 \pm 0.039 * *	11.67
中联组	0.326 \pm 0.040 *	44.23
高联组	0.361 \pm 0.049 *	51.02

注:样本量 $n=8$ 。经方差分析检验, * 与对照组相比 $P < 0.05$, * 与特罗凯组相比 $P > 0.05$ 。

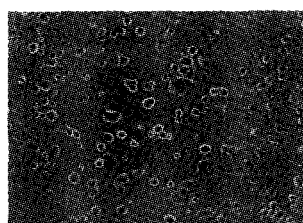


图 5 血清特罗凯组 ($\times 200$)

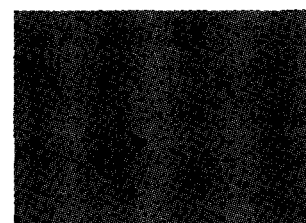


图 6 血清高联组 ($\times 200$)

而经含药血清作用的肿瘤细胞出现了不同的结果,中联组及高联组的抑制率最高 ($P < 0.05$),而高消组及特罗凯组无明显的抑制作用。

3.2 流式细胞术检测 A549 的凋亡 根据 MTT 结果,选取药液消岩汤剂组 (30mg/ml)、联合组 (30mg/ml + 600 μ g/ml),血清高联组、特罗凯组及对照组 5 组,分别作用 A549 细胞 48h 后,检测凋亡细胞结果见表 3,图 7 (第一象限为坏死细胞,第二象限为中晚期凋亡细胞,第三象限为活细胞,第四象限为早期凋亡细胞。凋亡细胞为第二象限 + 第四象限之和)。

表 3 各组药物诱导细胞凋亡发生率 (%) ($n=8$)

组别	对照组	药液组		血清组	
		消岩汤剂组	联合组	特罗凯组	高联组
凋亡	6.57 \pm 0.18	27.1 \pm 0.25	3.06 \pm 0.07	9.58 \pm 0.18	31.8 \pm 0.89

注:血清高联组与消岩汤剂药液组比较, $P < 0.05$ 。

3.3 结果显示:消岩汤剂药液组在诱导细胞中晚期凋亡明显;经高剂量消岩汤剂联合特罗凯处理血清组对细胞早期及中晚期凋亡均有一定的诱导作用;高剂量消岩汤剂联合特罗凯药液组对细胞的杀伤作用较强,细胞处于死亡状态较明显,未显示出明显的诱导凋亡的作用;经特罗凯处理血清组未显示出明显的诱导凋亡的作用。

4 讨论

近年来,靶向治疗的新策略已使肿瘤的治疗发生了革命性的变化,正如美国国立癌症研究所主席

Eschenbach 在 2002 年 ASCO 会议上所指出,肿瘤治疗手段在 20 世纪是“寻找和破坏(Seek and Destroy)”,而 21 世纪将是“靶向和控制(Target and Control)”。进入 21 世纪,分子靶向治疗已加速从实验室走向临床,厄罗替尼就是其中的一个代表药物,作为肿瘤综合治疗中新的组成部分,非常有必要对其不断深入、广泛的进行临床与实验研究^[1]。

中医药在肿瘤的防治中以其确切的疗效特点,越来越受到人们的关注,具有较好的临床应用疗效及良好的临床应用前景。中药抗肿瘤作用除了与特定药物性质有关,还与药物浓度和时间有关。大量研究证实^[2,3],中医药联合放、化疗治疗非小细胞肺癌能够减轻症状,提高病灶稳定率和生活质量,延长生存期,减轻对正常组织损伤,提高机体免疫的作用,其疗效已得到充分肯定。中药还能部分逆转肿瘤的多药耐药,提高疗效,这也为不适宜放、化疗的 TKI 治疗不敏感的患者,采用新方式即靶向药物与中药联合治疗提示了新思路。

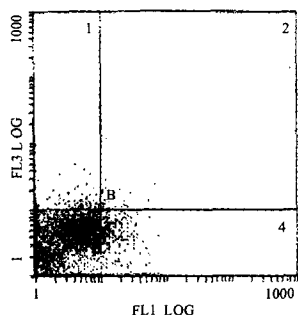


图 7 对照组

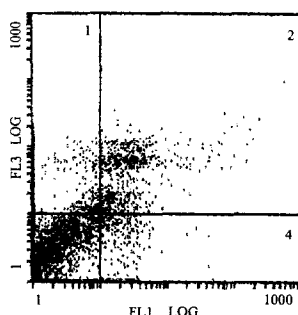


图 8 药液消岩汤剂组

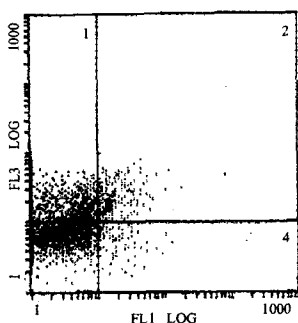


图 9 药液联合组

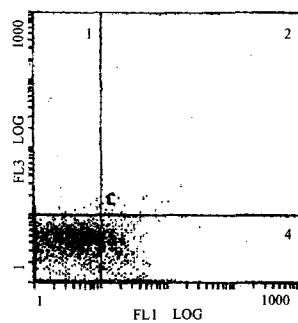


图 10 血清特罗凯组

但是,中医药与靶向药物治疗肿瘤的研究还处于起步阶段,为了进一步揭示中医药与靶向药物联合治疗肿瘤的机理,本课题对其初步的探索性研究,试图从新的视角进行中西医结合的尝试。

通过体外实验,我们采用 MTT 法检测两种药物的药液及血清对 A549 的增殖的影响,消岩汤剂与特罗凯联合的各组血清均有一定的抑瘤作用,而单药各组

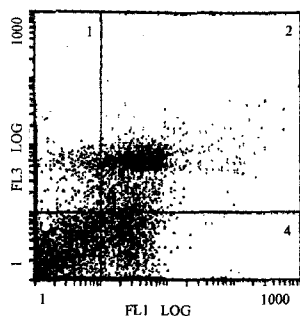


图 11 血清高联组

血清未显示出明显的抑瘤作用,此结果与直接药液处理细胞所得出的结果有一定的差异,可能由于药物在体内的吸收、分布和代谢的影响所致。

细胞凋亡是生物体主动清除与维持生理状态不相适应的各种多余成分的过程。近年的研究表明凋亡缺陷是肿瘤发生的先决条件,研究细胞凋亡与肿瘤之间的关系对肿瘤的治疗有一定的指导意义。因此,我们还进行了两种药物以及两者药物联合,对细胞凋亡的影响,实验结果显示消岩汤剂在诱导细胞中晚期凋亡明显;而经高剂量消岩汤剂联合特罗凯处理的血清对细胞早期及中晚期凋亡诱导作用更加明显,高剂量消岩汤剂联合特罗凯药液对细胞的杀伤作用明显,未显示出明显的诱导凋亡的作用,可能由于药液中药物的有效成分较高,超过细胞的渗透压,导致细胞死亡。无论是单纯特罗凯药液还是经特罗凯处理过的血清均未显示出明显的诱导细胞凋亡的作用。

通过研究证实消岩汤剂联合特罗凯在体外具有较强的抗肿瘤活性,其效果应强于单药使用消岩汤剂或单药特罗凯。

参考文献

- [1] 贾英杰,黄敏娜,孙一予.厄洛替尼联合消岩汤加减治疗非小细胞肺癌的临床观察[J].临床肿瘤学杂志,2009,14(7):622-624.
- [2] 张淑香.中药辨证治疗加化疗治疗中晚期非小细胞肺癌疗效分析[J].辽宁中医杂志,2010,37(4):659-660.
- [3] 胡峰生.中药配合放疗治疗晚期非小细胞肺癌疗效观察[J].现代医药卫生,2008,24(3):405-406.

(本文校对:陈军 收稿日期:2010-07-14)

悲甚偏伤气,思多太损神。神疲心易悸,气弱病相萦。勿使悲欢极,当令饮食均。再三防衰醉,第一戒晨熇。重寝鸣云鼓,寅兴激玉津。收邪难犯己,精气自全身。若要无诸病,常当节五辛。安神易悦乐,惜气保和纯。寿夭休论命,修行本在人。若能遵此理,年底可朝真。

——宋·张果《医说》