扶正消瘤颗粒抗卵巢癌作用的体外实验研究*

□贾 彤 张 献 (黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040)
张广美** (哈尔滨医科大学附属第一临床医学院 哈尔滨 150001)

摘 要:目的:阐述扶正消瘤颗粒(CM)在体外的抗肿瘤作用。方法:制备含药血清,作用于体外培养的肿瘤细胞系 SKOV-3,分为空白组(control)、CM 组、顺铂组(DDP)和 CM+DDP 组,采用 MTT 法检测其量效关系和时效关系,用 TUNEL、透射电镜和流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡的发生,用 Westerblot 检测 PCNA、bcl-2 和 bax 的表达。结果:MMT 显示本方有一定量效关系和时效关系,浓度愈大,作用时间愈长,效果愈明显;TUNEL 和透射电镜及 FCM 均提示了细胞凋亡的发生,而 Westernblot 的结果则显示了细胞凋亡的发生与 bcl-2/bax 比率的下调有关,使细胞增殖受到抑制。结论:扶正消瘤颗粒在体外有一定的抗肿瘤作用,并有增效之功。

关键词:扶正消瘤颗粒 卵巢癌 血清药理学 细胞凋亡

扶正消瘤颗粒由党参、黄芪、白术、麦冬、枸杞、生地、补骨脂、鳖甲等组成,有益气健脾,滋阴生血功效,原意重在治疗卵巢癌术后化疗引起的一系列毒副作用,经临床观察实验证明,效果显著。以下实验旨在:从体外实验角度探讨本方是否有直接的抗肿瘤作用,并阐述与细胞凋亡间的关系,初步明确其作用机制,为扩展本方的应用范围提供实验依据。

一、材料与方法

1. 材料

(1) 实验动物及细胞系。选用体重为 180±10g 的 SD 雌性大鼠,由哈尔滨医科大学附属二院动物中心提供,普通环境饲养。人卵巢癌细胞系 SKOV-3,由哈尔滨医科大学附属三院妇科提供,12%胎牛血清 PRMI1640、37℃、5%CO_2 及饱和湿度下培养,每周传代 3 次。

(2) 实验药物。扶正消瘤颗粒由黑龙江中医药大学附属二院制药厂提供;顺铂由昆明三戊贵金属药业有限公司提供,滇卫药准字(1998)第 003359 号。

(3) 实验试剂。MTT(Sigma),DMSO(Sigma),PCNA antibody (mouse monoclonal IgG,Boster),bcl-2 antibody (mouse monoclonal IgG_1, Santa Cruz),bax antibody(mouse monoclonal IgG_{2b}, Santa Cruz),peroxidase-conjugated affinipure goat anti-mouse IgG(Santa Cruz),TUNEL kit(ROCHE),AnnexinV-FITC Apopto-

收稿日期:2006-02-20
修回日期:2006-08-16
* 国家中医药管理局资助项目(04-05JP21):中药扶正消瘤颗粒对卵巢癌术后化疗减毒增效作用机理的研究,负责人:张广美。
** 联系人:张广美,主任医师,研究方向:妇科肿瘤学,Tel:0451-88591665,E-mail:guangmeizhang@126.com。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

sis kit(BD)

(4) 实验仪器。酶标仪 (美国 Bio-Rad model 550),电泳及转膜设备(同上),流式细胞仪(美国 BD FACSORT), 透射电子显微镜 (日本电子公司 JEC-1220)。

2. 方法

(1) 含药血清的制备。将大鼠随机分为 4 组,分别为空白组(control)、顺铂组(DDP)、扶正消瘤颗粒组(CM)和顺铂+扶正消瘤颗粒组(CM+DDP),除空白组灌胃 3ml 生理盐水外,其余各组按临床等效剂量,并依据临床常规服药时间及次数给药,即 DDP 组每只大鼠每 d 定时腹腔注射 1g/kg 体重, 每 d1 次;CM 组每只大鼠每 d 灌胃 3 次, 每次 6.25g/200g 体重;CM+DDP 为上两组之联合。连续给药至第 4d 上午,末次给药 1h 后,摘眼球取血,室温静置,4℃条件下 3000rpm 离心 15min,小心吸取上清至 eppendorf 管中, 置 37℃水浴 30min, 超净工作台下 0.22μm 滤膜过滤,0.2mleppendorf 管分装,-20℃保存。

(2) MTT 法测定含药血清抗 SKOV-3 的时效性及量效关系。将值对数生长期的 SKOV-3 接种于 96 孔板中,每孔 5000 个细胞(0.1ml),细胞贴壁后,小心吸出孔内液体,加入无血清 1640 继续培养 24h。设 3 个浓度梯度, 即 10%、15%和 20%, 每个浓度设 5 个复孔,每孔液体总体积为 0.15ml,培养 48 小时后终止;以 15%为药物浓度,设 3 个时间段,即 24h、48h 及 72h, 准时终止培养。加入 MTT15μl (5mg/ml),继续培养 4h,吸去液体,加入 0.2mlDMSO,振荡至甲臜完全溶解, 上机检测。探测波长 490nm,校正波长 620nm。以上实验连续 3 次,取数值均数,excel 作图,以吸光度值(存活率)为纵轴,时效关系以小时为横轴, 量效关系以药物血清浓度百分比为横轴。

(3) wetern blot 检测含药血清干预后的 SKOV-3 中 PCNA、bcl-2 及 bax 的表达。取对数生长期的 SKOV-3,弃原培养液,无血清 1640 继续培养 24h,加入含 15%药物血清的 RPMI1640,48h 后终止培养,提取总蛋白供 wetern blot 用。本次实验蛋白上样 40μg, 采用 15%分离胶, 甘氨酸缓冲液电泳 2h, 转膜 60min,化学发光法检测。

(4) 流式细胞术检测含药血清诱导 SKOV-3 的凋亡率。细胞干预方法同 1.2.3,培养终止后,收获细胞,按试剂盒说明书上机检测。

(5) TUNEL 法检测含药血清干预后 SKOV-3 的凋亡发生。将对数生长期细胞 SKOV-3 接种在置于 24 孔板中的盖玻片上,干预方法同 1.2.3,终止培养后,TUNEL 检测步骤按说明书进行。复染时用伊红,以显示细胞形态。

(6) 透射电镜观察含药血清干预后 SKOV-3 的形态学改变。细胞干预方法同 1.2.3,收获细胞后,4℃ 3%戊二醛磷酸缓冲液固定 24h 后, 常规制作上镜样本观察。

二、结 果

1. MTT 结果

由图 1、2 可见, 整体趋势可认为是浓度越大、

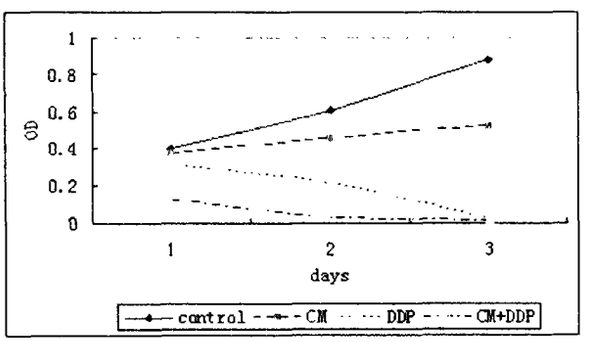

图 1 各组时效关系的变化

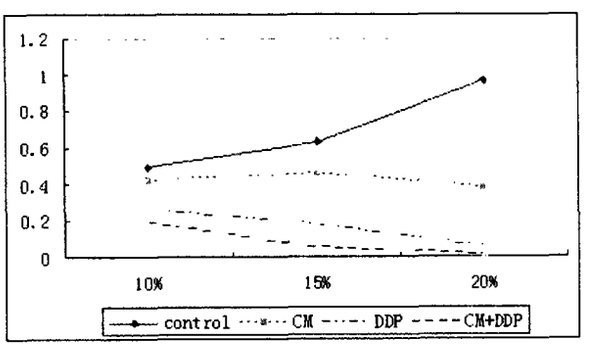

图 2 各组量效关系的变化

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

作用时间越长,对 SKOV-3 的抑制就越强。从时效关系图上看,在 15%浓度的药物血清作用下,CM 组在 72h 后,其抑制率可达 41%;DDP 组在 48h 后可达半数抑制率,而 CM+DDP 组在 24h 后即可达半数抑制,相对缩短了一倍的时间。从量效关系图上看,control 组的细胞数量在 3 种浓度的药物血清作用 48h 后,有不同数量的增长,血清浓度较高的生长状况较好。20% CM 组的细胞数是 10% CM 组的细胞数的 2 倍,20% DDP 组的细胞数是 10%DDP 组的细胞数的 8 倍,而 20% CM+DDP 组的细胞数是 10% CM+DDP 组的细胞数的 3 倍,是 20%的 DDP 组的细胞数的 6 倍。

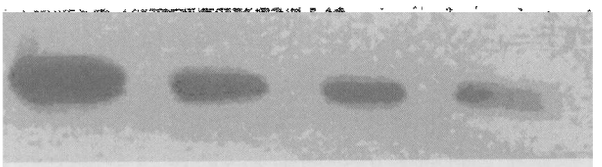

图 3 westernblot 检测各组 PCNA 的表达

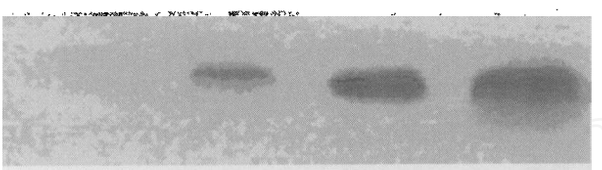

图 4 westernblot 检测各组 Bcl-2 的表达

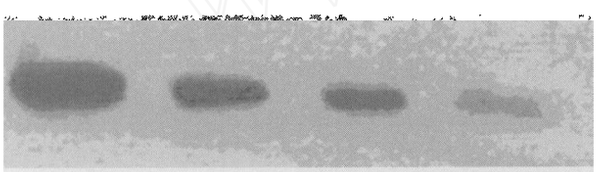

图 5 westernblot 检测各组 Bax 的表达

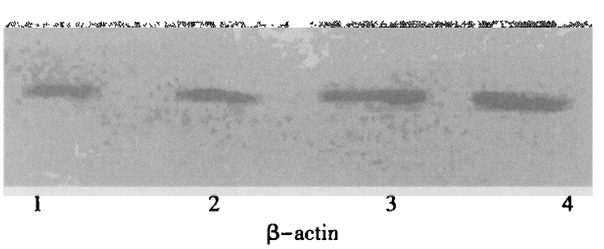

图 6 western blot 检测各组 β-actin 的表达

1.空白组(control) 2.顺铂组(DDP)
3.扶正消瘤颗粒组(CM);4.顺铂+扶正消瘤颗粒组(CM+DDP.)

表 1 各组对 SKOV-3 诱发细胞凋亡的比较(%,$\bar{x}\pm S$)

Group	The rate of apoptosis
Control	7.08±3.50
CM	10.71±1.94△
DDP	18.85±2.85
CM+DDP	30.33±4.05*

注:△与 control 比较 P<0.05,*与 CM 比较 P<0.05

2. western blot 结果

结果显示,CM 下调了 SKOV-3 中 PCNA 和 Bcl-2 的表达,上调了 Bax 的表达,这种趋势在 CM+DDP 组尤为明显。

3. TUNEL 法检测细胞凋亡的结果

control 可见 SKOV-3 细胞为圆形或椭圆形,多核,胞核比例大;CM 可见少量细胞形态完整,胞核黄染,为凋亡细胞;DDP 可见大量黄染的细胞,失去正常细胞形态;CM+DDP 可见完整细胞,胞核黄染,亦可见大量黄染失去正常形态的细胞。

4. 透射电镜检测细胞凋亡的结果

control 可见 SKOV-3 呈形态不甚规则,表面有粗短的伪足,核有切迹,核仁明显,有丰富的线粒体,粗面内质网较少,而滑面内质网丰富;CM 可见细胞体积明显变小,形态不规则,染色质呈斑块样聚集,内膜结构完整,有凋亡趋势;DDP 可见细胞体积变小,细胞器数量减少,游离核糖体分布聚集,滑面内质网扩张,粗面内质网脱颗粒,表面绒毛完全消失,呈坏死样的形态较为明显;CM+DDP 可见明显凋亡小体,亦可见较为明显的坏死样细胞。

5. FCM 检测细胞凋亡的结果

由表 1 可见,CM 组的凋亡率与 control 相比,有统计学意义(P<0.05),而 CM+DDP 组的凋亡率与 CM 相比,亦有统计学意义(P<0.05)。

三、讨 论

血清药理学自上世纪 80 年代被应用以来,20 余年的实际操作中,颇多争议,主要集中在所选动

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

物品种,造模与否,给药时间,给药浓度,采血时间,保存方法,选用实验浓度等问题上,制备合格的药物血清是实验能否进行的基础,本实验采用了学者们近年来拟定的较为常用方法[1~2]。以 DDP 为阳性对照,实验显示出阳性结果,说明本法确为有效,可以选用。实验在讨论 CM 的时效关系与量效关系时,选用了普通肿瘤细胞培养时所用 10%、15%和20%的浓度,笔者在运用血清药理学这一方法时,觉得大多关于中药复方血清药理学的文献提示的是将含药血清作用于体外培养的细胞系后,得出药效学结果,或进一步说明所用血清的药理作用,而血清中的有效成分其理化作用是不明确的,后者多是在复方中药分析实验中进行的[3~4],使读者把细胞培养中血清浓度-细胞培养中所用血清量占培养液量的百分比-当做血药浓度。经验证明当培养细胞血清低于 5%时,细胞生长受到抑制;高于 20%时,高浓度的血清对细胞产生相当毒性或使细胞原有的功能变化,且影响实验结果[5]。结果显示出浓度愈高的血清,作用亦明显,尤其是本药与 DDP 联合应用时,缩短了半数抑制率的发生时间,使抑制作用提高。

细胞死亡形式一直是肿瘤发生及治疗领域的热点,包括细胞坏死(necrosis)、细胞凋亡(apoptosis),近年来亦提出细胞肿胀(paraptosis)、失巢性细胞凋亡等概念[6],显示这一领域向精深发展。但其它的细胞死亡形式仍在探讨中,细胞凋亡仍是这一方面的经典。本实验选用 TUNEL 及透射电镜定性研究了细胞凋亡的发生,并用 FCM 进行量化分析。实验中TUNEL 法与常规方法不同,复染时未用苏木素,而选用的伊红染液,后者上色于细胞质,可以显示出整个细胞形态,与破碎的细胞可形成明显对比。考虑药物血清作用时间和所含药物浓度的不同,采用含 15%的药物血清的 RPMI1640 培养 48h 后,在透射电镜下 CM 组可见到凋亡的细胞,DDP 组可见坏死样的细胞。体外培养的肿瘤细胞,至凋亡晚期时与坏死的细胞在形态上几乎没有明显的差异,而诸多文献均提示 DDP 可以引起 SKOV-3 的凋亡发生[7],故本实验在 DDP 组可见坏死样的细胞,属于凋亡晚期的肿瘤细胞。在形态上,CM 组出现以凋亡为主细胞,DDP 组出现以坏死样为主的细胞,而联合组两者并见。FCM 结果,联合组的凋亡数量要明显增多。本实验利用 westerbblot 检测 PCNA、Bcl-2 和 bax 的表达,PCNA 是检测细胞增殖的影响指标,而 bcl-2/bax 比率被认为是调控线粒体凋亡途径发生的重要环节之一[8]。实验显示,CM 可以诱导 bax 的表达,而下调 bcl-2 的表达,使这一比率降低,从而促进细胞凋亡的发生,相应地,细胞增殖受到了抑制。

本实验结果趋势基本一致,显示了扶正消瘤颗粒在体外实验中,有一定的抗肿瘤作用,其机制与降低 bcl-2/bax 比率,促进细胞凋亡发生有关。特别与顺铂联合作用时,效果明显,可协同增效。应该指出的是,体外实验条件易于控制,适合初筛,为了全面评价本方的抗肿瘤作用,应与体内实验相结合,使实验证据更有力,更明确,这也是本课题下一步所要进行的研究。

参考文献

1 刘烨.关于中药血清药理学实验方法的讨论.贵阳中医学院学报,2004,26(1):53~57.

2 罗焕敏."血清药理学"与"血浆药理学".中国药理学通报,2003,19(9):1075~6.

3 Lingyunbiao etc.Effect of antifibrotic herb serum on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis Chinese Journal of Pathophysiology 2003,19(12):1649~1652.

4 Lingyunbiao etc.Different effects of the antifibrotic herb sera collected from two approaches on rat hepatic stellate cells Chinese Journal of Experimental Surgery,2004,10(5).

5 赵宗江. 组织细胞分子学实验原理与方法. 北京中国中医药出版社,2003 年.

6 Sitith Douma etc.Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB.Nature,2004,430(26):1034~41.

7 Vignati S etc. Trail activity in human ovarian cancer cells: potentiation of the action of cytotoxic drugs.Eur J Cancer. 2002 ,38(1):177~83.

8 Gu JC etc. Effects of human interleukin 10 gene transfer on the expression of Bcl-2 Bax and apoptosis of hepatocyte in rats with acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis. Chin Med J (Engl). 2005,118(19):1658~60.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

In vitro Eexperimental Sstudy on Aanti- Oophoromamalignant tumor of ovary Eeffect of Fuzheng Xiaoliu Particles (Granula 扶正消瘤颗粒)

Jia Tong

(*Heilongjiang University of TCM, Haerbin 150040, Heilongjiang, China*)

Zhang Guangmei

(*The First Affiliated Hospital of Haerbin Medical University*)

Objective: To study anti-tumor effects of Fuzheng Xiaoliu ParticlesGranula (CM, 扶正消瘤颗粒 strengthen the body resisteance and resolve neoplasm) on tumor cells in vitro. Methods: Rats were divided into 4 groups randomly: control group, Fuzheng Xiaoliu Particles (扶正消瘤颗粒)(CM) group, cis-dichlorodiamine platinum (DDP) group and CMm+DDP group. The Bblood serum including containing drugs were prepared were produced and was used applied to culture tumor cells SKOV-3 incubated in vitro. MTT method was used to detected Ddose-effect relationship and time-effect relationship was measured by MTT method. Apoptosis was observed by using TUNEL, transmission electron microscope and flow cytometry(FCM). The expression of PCNA, bcl-2 and bax is were detected by Westerblot. Results: MMT results showed that this recipe possessed certain dose-effect relationship and time-effect relationship. With the higher the concentration increasing of CM and the longer the effect acting time applied lasting, the more pronounced effect wais shown obvious. TUNEL, transmission electron microscope and FCM results showed suggested the occurrence of apoptosis, which was related with the down-regulation. And the Westerblot results showed that apoptosis occurrence was related to decrease in the ratio of bcl-2 to bax as shown by Westerblot results, , which and the latter inhibited cellproliferationcell proliferation. Conclusion: The Fuzheng Xiaoliu Particlesgranula (扶正消瘤颗粒) is showed certain anti-tumor effective to anti-tumor, as well as to enhance the effect.synergic action

Keywords: Fuzhengxiaoliu granula; anti-ovarian-tumor; serum pharmacology; apoptosis

(责任编辑:李成卫,责任编审:李澎涛,责任译审:凌仰之)

(Continued from Page 52)

of the three Honghua injection groups; the renewals of mice with hemiplegia increase; S-T of 0s,30S,60s and T wave of 0s,15s,60s ,which rised by Pituitrin, depress clearly; the blood viscosity of rat with blood circulation stagnation decrease. Conclusion: The result suggest a beneficial therapeutic effect of Honghua injection on hypoxia, cerebral infarction, cardiac infarction and blood circulation stagnation in animal.

Keywords: Honghua injection; hypoxia; cerebral infarction; cardiac infarction; blood circulation stagnation; therapeutic effect

(责任编辑:付建华,责任编审:果德安,责任译审:凌仰之)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net