

文章编号: 0529-6579 (2000) 06-0229-05

扶正抗癌方抑制人肺癌细胞增殖及增强 LAK 抑瘤活性的实验研究*

石世德¹, 郑文岭², 杨太成², 李任先¹, 周岱翰¹, 冼江²

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510407;

2. 广州军区总医院分子肿瘤学研究所, 广东 广州 510010)

摘 要: 研究中药复方制剂扶正抗癌方对人肺癌细胞 LA、肺癌原代细胞增殖的影响, 探讨其抗癌作用机制。扶正抗癌方灌胃给药后, 采集大鼠血清, 处理人肺癌细胞 LA、人肺癌原代细胞, MTT 法观察细胞增殖; 并与淋巴因子激活的杀伤细胞 (LAK) 共同处理以上 2 种细胞。扶正抗癌方具有显著抑制人肺癌细胞 LA、人肺癌原代细胞增殖的作用, 且存在不同浓度之间的差异, 提示呈现出血清浓度依赖性; 可以显著提高 LAK 抑制人肺癌细胞 LA、人肺癌原代细胞增殖的活性。抑制人肺癌细胞增殖, 提高 LAK 活性可能是扶正抗癌方抗癌的主要作用机制。

关键词: 肺癌/中医药疗法; 扶正抗癌方/治疗应用; 肺癌细胞/人肺癌细胞 LA、肺癌原代细胞; 血清药理学; 大鼠

中图分类号: Q 819 **文献标识码:** A

扶正抗癌方是广州中医药大学一附院肿瘤科在治疗原发性肝癌、肺癌等多种癌症经验方的基础上, 研制的抗癌中药复方制剂, 临床运用于肝癌、肺癌、胃癌等癌症的治疗, 取得了显著的疗效, 为进一步探讨其作用机制, 本文采用血清药理学方法, 观察了扶正抗癌方抑制人肺癌细胞 LA 及人肺癌原代细胞增殖的作用及提高 LAK 对上述两种细胞的抑瘤活性, 结果如下。

1 实验材料

1.1 实验动物

SD 大鼠, 体质量为 250 ~ 300 g, SPF 级, 广州军区总医院实验动物中心提供, 普通饲料喂养, 自由饮水。

1.2 药物

扶正抗癌方 (简称 KAF), 由人参、桃仁、半枝莲、冬虫草等组成, 实验药液由广州中医药大学一附院肿瘤研究所提供, 每 mL 相当于生药 1.0 g。羟基喜树碱注射液 (HCPT 1 mg/mL), 湖北省黄石飞云制药公司产品, 批号 003021。

1.3 人肺癌 LA 细胞株及人肺癌原代细胞

由广州军区总医院分子肿瘤学研究所细胞室提供。

* 基金项目: 广东省博士后科研基金资助项目

收稿日期: 2000-09-18; 作者简介: 石世德 (1960 ~), 男, 副主任医师; 研究方向: 中西医结合内科。

1.4 主要试剂

RPMI-1640 培养液(美国 GIBCO); 四甲基偶氮唑盐(MTT 美国 SIGMA); 二甲亚砜(DMSO 美国 SIGMA). 灭活新生小牛血清(天津生化制品厂).

1.5 主要仪器

96 孔培养板(英国 CORNING); 二氧化碳培养箱(德国 HEREUS); 倒置显微镜(日本 OLYMPUS); Σ 960 型酶标仪(台湾 ERMAINC); 微量振荡器(北京海淀电子医疗仪器厂).

2 实验方法

2.1 动物含药血清的制备

8.0 mL/kg KAF 灌胃给药, 1 次/日, 连续 3 日, 末次给药 2 h 后, 以相同剂量重复给药 1 次, 再过 1 h, 下腔静脉采血, 分离血清即为含药血清, 临用前加入 RPMI-1640 培养液. 对照组用生理盐水代替 KAF.

2.2 肿瘤细胞悬液制备

将冻存的人肺癌细胞 LA 按常规方法复苏, 接种于含 10% FCS 的 RPMI-1640 培养液的 50 mL 培养瓶中, 传代培养, 至细胞呈指数生长期时, 弃培养液, 加入 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 消化液 37 °C 消化 2~5 min, 离心弃上清, 重悬细胞于含 10% FCS 的 RPMI-1640 培养液中, 台盼兰染色活细胞计数, 调整细胞数为 1×10^6 /mL, 接种于 96 孔培养板, 每孔加细胞悬液 100 μ L. 人原代肺癌细胞悬液的制备, 广州军区总医院肿瘤科患者阮 XX, 男性, 62 岁, 住院号 263785, 病理诊断号 140926, 病理诊断为肺腺癌, 经皮肺穿刺取得的新鲜肿瘤组织, 无菌条件下 200 目金属网筛上用注射器针栓轻轻研磨, 肿瘤细胞滤过网孔进入含 10% FCS 的 RPMI-1640 培养液中, 台盼兰染色活细胞计数, 调整细胞数为 1×10^6 /mL, 接种于 96 孔培养板, 每孔加细胞悬液 100 μ L.

2.3 LAK 细胞悬液的制备

按文献[1]方法, 无菌取正常人外周静脉血, 用淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞, 将细胞悬浮于含 10% FCS 的 RPMI-1640 培养液的培养瓶中, 置 37 °C、5% 的 CO₂、饱和湿度的培养箱中培养 24 h, 离心弃上清, 重悬细胞于含 IL-2 1000 U/mL、10% FCS 的 RPMI-1640 培养液中培养 5 d, 即为 LAK. 抑瘤检测前, 台盼兰染色活细胞计数, 调整细胞数为 2.5×10^7 /mL, 每孔加细胞悬液 100 μ L.

2.4 药物及浓度

HCPT 质量浓度按血浆峰值(D)浓度计算

$$(\text{HCPT}) = 50 \times D / 5000 \times 2, \text{单位为 } \mu\text{g/mL}$$

HCPT 设立 10 $\mu\text{g/mL}$ 1 个浓度, KAF 含药血清根据预实验结果设立 20%、10%、5%, 分别简称 KAF1、KAF2、KAF3.

2.5 MTT 法^[2]检测

将 96 孔板置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养 24 h, 设实验孔和对照孔, 实验孔分别加入 HCPT 10 μ L 和 KAF1、KAF2、KAF3 各 10 μ L, 对照孔加入等量 PBS 液, 每组 3 孔. 检测 KAF 增强 LAK 抑瘤活性时, 实验孔分别加入 LAK 100 μ L 和 KAF1、KAF2、KAF3 各 10 μ L, 对照孔加入等量 PBS. 继续培养 48 h, 离心弃上清, 每孔加入 MTT

(5 mg/mL) 10 μ L, 继续培养 6 h, 再离心弃上清, 加入 DMSO 100 μ L, 置微量振荡器 5 min, 即放入自动读数酶标仪, 以 600 nm 为检测波长, 测各孔的吸光度 (A) 值, 根据下列公式计算抑瘤率: 抑瘤率 (%) = $(\bar{A}(\text{对照组}) - \bar{A}(\text{实验组})) / \bar{A}(\text{对照组}) \times 100\%$.

2.6 统计学处理

抑瘤率结果比较用方差分析, 并行两两比较的 q 检验, 以 $P < 0.05$ 作为显著性差异, 全部数据处理均在微机上用 SAS6.04 软件完成.

3 结 果

3.1 正常大鼠血清对人肺癌细胞增殖的影响

3.1.1 与小牛血清比较 以含 10% 的正常大鼠血清的 RPMI-1640 培养液培养细胞, 无论灭活与否, 均能维持细胞正常生长, 相差显微镜下观察细胞形态未见明显差别和改变, 正常大鼠血清 (灭活) 组 $\bar{A}$ 为 $0.468 \pm 0.02 (n = 8)$, 与小牛血清组 $0.465 \pm 0.02 (n = 8)$ 比较, 无显著性差异 ($P > 0.05$).

3.1.2 含药血清灭活与否对细胞增殖的影响 同批灭活血清与不灭活血清比较, 灭活组 $\bar{A}$ 为 $0.336 \pm 0.02 (n = 8)$, 高于未灭活血清组 $\bar{A}$ 为 $0.296 \pm 0.01 (n = 8)$, 差异显著 ($P < 0.05$).

3.2 KAF 药物血清对人肺癌细胞 LA、人肺癌原代细胞增殖的影响

3.2.1 KAF 对人肺癌细胞 LA 增殖的影响 结果显示 KAF 具有明显抑制 LA 细胞增殖的作用, 3 个不同浓度组与对照组比较均有极显著性差异 ($P < 0.01$), 而且不同浓度之间存在显著性差异 ($P < 0.05$) HCPT 组抑瘤作用优于 KAF 组, 结果见表 1.

3.2.2 KAF 对人肺癌原代细胞增殖的影响 结果显示 KAF 具有明显的抑制人肺癌原代细胞增殖的作用, 3 个不同浓度组与对照组之间比较有极显著差异, 而且不同浓度组之间差异显著. HCPT 组抑瘤作用优于 KAF, 结果见表 1.

表 1 KAF 对人肺癌 LA 细胞和原代细胞增殖的影响

组 别	LA 细胞		原代细胞	
	A	抑瘤率/%	A	抑瘤率/%
PBS	0.442 ± 0.02		0.462 ± 0.02	
HCPT	$0.186 \pm 0.01^*$	57.9	$0.196 \pm 0.01^*$	57.6
KAF1	$0.238 \pm 0.02^*\nabla$	46.2	$0.252 \pm 0.02^*\nabla$	45.5
KAF2	$0.271 \pm 0.02^*\nabla\triangle$	38.7	$0.271 \pm 0.03^*\nabla\triangle$	41.3
KAF3	$0.298 \pm 0.01^*\nabla\triangle\blacktriangle$	32.6	$0.295 \pm 0.02^*\nabla\triangle\blacktriangle$	36.1

1) A 为 ($\bar{x} \pm s$); * 与 PBS 组比较 $P < 0.01$; ∇ 与 HCPT 组比较 $P < 0.01$;
 $\triangle$ 与 KAF1 组比较 $P < 0.05$; ∇ 与 KAF1 组比较 $P < 0.01$; $\blacktriangle$ 与 KAF2 组比较 $P < 0.05$

3.3 KAF 药物血清增强 LAK 对人肺癌细胞 LA、人肺癌原代细胞增殖的影响

3.3.1 KAF 增强 LAK 对人肺癌细胞 LA 增殖的影响 结果显示 KAF 具有明显的增强 LAK 抑制人肺癌细胞 LA 增殖的作用, 且存在浓度依赖关系, LAK + KAF 组的抑瘤作用优于单用 LAK 组, 结果见表 2.

3.3.2 KAF 增强 LAK 对人肺癌原代细胞增殖的影响 结果显示 KAF 可以明显地增加 LAK 抑制人肺癌原代细胞增殖的活性, 不同浓度之间存在显著差异, 提示具有浓度依赖关系,

LAK 联合 KAF 组的抑瘤作用明显优于单独运用 LAK 组, 结果见表 2.

表 2 KAF 增强 LAK 对人肺癌细胞 LA 和原代细胞增殖的影响

组 别	LA 细胞		原代细胞	
	A	抑瘤率/%	A	抑瘤率/%
PBS	0.518 ± 0.02		0.482 ± 0.02	
LAK	0.334 ± 0.02*	35.5	0.298 ± 0.01*	38.2
LAK + KAF1	0.165 ± 0.01*▼	68.1	0.126 ± 0.02*▼	73.9
LAK + KAF2	0.218 ± 0.03*▼△	57.9	0.173 ± 0.01*▼△	64.1
LAK + KAF3	0.253 ± 0.02*▼△▲	51.2	0.195 ± 0.02*▼▽▲	59.5

1) A 为 ($\bar{x} \pm s$); * 与 PBS 组比较 $P < 0.01$; ▼ 与 LAK 组比较 $P < 0.01$;

△ 与 LAK + KAF1 组比较 $P < 0.01$; ▽ 与 LAK + KAF1 组比较 $P < 0.05$;

▲ 与 LAK + KAF2 组比较 $P < 0.05$

4 讨 论

肺癌属于祖国医学积聚范畴,其病因病机多为内伤七情劳倦,外感六淫疫疠,脏腑虚损,经络气血不和,而致气滞血瘀、痰气凝聚、毒瘀内蕴日久而成,病属正虚邪实.扶正固本,活血化瘀,解毒散结为其主要治则,扶正抗癌方集上述治则于一体,由生晒参、桃仁、半枝莲、冬虫草等中药组成,既能补益正气、扶正固本,又能清热解毒、化瘀散结,故能使正气恢复,抑制肿瘤生长.

血清药理学方法^[3],即整体动物给药一定时间后,取其含有药物成分的血清代替中药粗制剂进行体外实验的新方法,由于客观地模拟了药物与机体相互作用过程,提高了结果可信度,其结果更具有确定性、真实性和鲜明的说服力.实验结果表明;正常大鼠血清对人肺癌细胞增殖促进作用与小牛血清比较无显著性差异,而扶正抗癌方经灌胃后,采集的大鼠血清(含药血清)对人肺癌细胞 LA 及人肺癌原代细胞的增殖具有明显的抑制作用,20%含药血清的抑瘤率分别为 46.2%和 45.5%,且存在血清浓度依赖性差异,说明运用含药血清处理细胞后的一系列变化为药物作用所致.

淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)过继免疫治疗是目前国内外临床上应用最为广泛的肿瘤过继免疫方法^[4].自 80 年代 LAK 被描述以来,研究者进行了大量的研究,积累了丰富的实验和临床资料.无论动物试验还是人体试验都表明,LAK 过继免疫治疗是一种有一定疗效的方法,特别是作为恶性肿瘤综合治疗的一种手段,在提高疗效,清除残留癌细胞,改善晚期肿瘤患者生存质量等方面发挥着重要作用.LAK 具有以下特点:选择性地只对肿瘤细胞产生细胞毒性,而对正常细胞无影响或损伤轻微;无毒副作用;不依赖荷瘤者免疫功能;不影响其他疗法的施用;无免疫抑制作用.实验结果显示 LAK 具有显著的抑制人肺癌细胞 LA 及人肺癌原代细胞增殖的作用,抑瘤率分别为 35.5%和 38.2%,而加用不同浓度的扶正抗癌方含药血清后,可以明显提高 LAK 的抑瘤活性,经加入 $\rho = 20\%$ 含药血清后其抑瘤率分别为 68.1%和 73.9%,且存在血清浓度依赖性差异.从而说明扶正抗癌方通过抑制人肺癌细胞增殖,增强 LAK 抑瘤活性而发挥其抗肿瘤作用的,也是其重要治疗机理所在.

参考文献:

- [1] 杨镇.肿瘤免疫学[M].武汉:湖北科学技术出版社,1998. 136~137.
- [2] 徐建明,宋三泰,汤仲明,等.MTT 体外药敏试验指导下的乳癌预见性化疗[J].中华肿瘤学杂志,1997, 19:153.
- [3] 李仪奎,吴健宇.中药的血清药理研究方法[M].北京:人民卫生出版社,1998.35~48.
- [4] 巴德年,王志华,李晓滨,等.LAK 细胞的抗肿瘤抗转移作用[J].中国免疫学杂志,1986,2(1):25.

Experimental Research of the Surpression in the Proliferation of Human Pulmonary Carcinoma Cell and the Improvement in Anticancer Activity of LAK Cell of Fuzhengkangaifang

SHI Shi-de^{*}, ZHENG Wen-ling, YANG Tai-cheng, LI Ren-xian, ZHOU Dai-han, XIAN Jiang

Abstract: The intention is to observe the influence of Fuzhengkangaifang (a kind of traditional Chinese medicine) in the proliferation of human pulmonary carcinoma cell LA and cell, so as to discuss its anticancer mechanisms. The method applied is to obtain the blood serum of the rats douched with the drug, then mix the serum with human pulmonary carcinoma cell LA and primary culture cell and finally observe their proliferation by MTT. Furthermore these two kinds of cells are treated together with LAK cells. The outcome is that Fuzhengkangaifang can suppress the proliferation of human pulmonary carcinoma cell LA and primary culture cell markedly, which indicates a serum-concentration dependence to which extent the cells are suppressed. The conclusion is that the main pharmacologic mechanisms of Fuzhengkangaifang are perhaps the suppression of the proliferation of human pulmonary carcinoma cell LA and primary culture cell and the activation of LAK cells.

Keywords: pulmonary carcinoma/therapy with traditional Chinese medicine; Fuzhengkangaifang/treatment; pulmonary carcinoma cell/human pulmonary carcinoma cell LA/primary culture cell; blood serum pharmacology; rat

^{*} The 1st Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510407, China