

中药伍铜铁复合制剂对癌细胞恶性程度影响的研究

迟永春 周 舒 万 方 徐 梅 杜皓萍

内容提要 BALB/c 小鼠荷腹水型肝癌, 连续灌喂中药伍铜铁复方制剂(CHCF)10 天, 流式细胞光度分析结果表明: CHCF 可使癌细胞 DNA 含量降低; 增殖指数(PI)下降(对照组 83.4 ± 2.6 , 给药组 78.8 ± 1.5 或对照组 67.2 ± 1.3 , 给药组 64.2 ± 1.6 , $P < 0.05$); G_1 期细胞数明显增多, 而 $S+G_2M$ 期细胞数明显减少($P < 0.05 \sim 0.01$); DNA 组方图中二倍体峰明显增高变大, 而多倍体峰变小。再移植实验证明: 经 CHCF 处理过的癌细胞再移植的动物有 2/10 不长肿瘤, 肿瘤抑制率为 71.7%~88.3%; 再移植动物存活期明显延长, 从 26.1 ± 11.8 天延长至 38.1 ± 9.6 天或延长至 39.6 ± 7.2 天, 生命延长率(T/C)分别为 46% 和 52%。因而证明: 该制剂降低了小鼠肝癌细胞的恶性程度, 其作用机理可能是激活癌细胞膜的氧化磷酸化过程。

关键词 中药伍铜铁 腹水肝癌细胞 流式细胞计分析 再移植 恶性程度降低

Study of Effects of Chinese Herbal Prescription Combined with Copper, Iron on Malignancy of Cancer Cells Chi Yong-chun, Zhou Shu, Wan Fang, et al Institute of Clinical Medical Sciences, China-Japan Friendship Hospital, Beijing (100029)

BALB/c mice bearing ascitic liver cancer were used, and Chinese herbal prescriptions combined with Cu and Fe (CHCF) was given by gavage continuously for 10 days, and some cell biological parameters were measured; furthermore, the ascitic cancer cells (control and treated group) were removed, and retransplanted to another mice and observed. The results showed that in CHCF treated group, DNA content of the cancer cells was decreased; and the proliferation index (PI) was reduced (control: 83.4 ± 2.6 , CHCF group: 78.8 ± 1.5 ; or control: 67.2 ± 1.3 , CHCF group: 64.2 ± 1.6 , $P < 0.05$). The number of the cancer cells in G_1 phase increased obviously, but, those of $S+G_2M$ phases decreased considerably ($P < 0.05 \sim 0.01$); on the DNA histogram, the diploid peak became higher and bigger, but multiploid peaks became smaller. Furthermore, retransplanted experiments showed that in 2/10 animals, the tumor did not grow, the growth inhibition rate was 71.7%~88.3%; and the survival period of retransplanted animals was prolonged significantly (from 26.1 ± 11.8 days to 38.1 ± 9.6 days, or to 39.6 ± 7.2 days, $P < 0.01$); the increase in life span was 46%~52% respectively. These results suggested that CHCF could decrease the malignancy of liver cancer cells in mice.

Key words Chinese herbal prescription combined with Cu and Fe, ascitic liver cancer cells, flow cytometric analysis, retransplantation, malignancy decrease

以往的研究已经证明, 中药伍铜铁复合制剂(简称 CHCF)有较强的抗癌作用, 对小鼠肝癌和肺癌等均有较高的抑瘤率, 并能延长荷瘤动物的生存期, 抬高存活曲线。细胞学研究发现, 本制剂对癌细胞有明显的抑制作用, 可使癌细胞的有丝分裂指数下降, 癌细胞的 DNA 含量明显降低, 倍体数明显减少,

DNA 组方图明显左移^①。最近, 通过流式细胞光度分析又发现, 该制剂不仅可以降低癌细胞的 DNA 含量, 而且导致癌细胞滞留于 G_1 期, 表明它抑制了 DNA 合成^②。上述结果提示该制剂有降低癌细胞恶性程度之可能, 故对此作进一步研究, 现报告如下。

材料与方法

1 荷瘤动物模型及分组 BALB/c 小鼠, 体重

18~22 g, 20只, 于小鼠腹腔接种小鼠肝癌细胞(Hep A)每只 1×10^6 个, 随机分为对照组和给药组。给药组每只小鼠每次灌喂CHCF 0.2 ml, 1次/日, 对照组给同体积的自来水。连续给药10天后, 分别取腹水, 调整细胞浓度 1×10^6 /ml以上, 用流式细胞光度计分析及再移植实验。CHCF含乙酸铜3 mg/ml, 枸橼酸铁17 mg/ml, 中药1 g/ml(其中生黄芪10 g, 丹参30 g, 当归15 g, 赤芍15 g, 败酱草15 g, 玄参15 g, 厚朴15 g, 枳壳15 g, 煎成100%水煎剂)。

2 流式细胞光度计分析 将取出的腹水癌细胞, 分别离心洗涤、固定和碘化丙啶染色, 并调整细胞数为 1×10^6 /ml, 每组分别取5只动物标本(每份约2 ml), 在流式细胞光度计(Becton Dickinson FACS 420)上测定分析DNA含量和细胞周期等, 方法同文献^[2]。

3 形态学研究 将腹水癌细胞分别涂片, 用May-Giemsa染色后, 在光学显微镜下进行细胞形态学观察。

4 再移植实验 将对照组和给药组腹水癌细胞分别计数, 调整细胞数至 5×10^5 /ml, 然后, 分别分组接种于健康的BALB/c小鼠, 每组10只, 每只于右腋后皮下接种0.2 ml, 从第7天开始, 每隔3天准确测量每只动物的肿瘤短径(a)和长径(b), 直至25天, 按公式 $W(\text{瘤重, g}) = a^2 \times \frac{1}{2} b$, 计算瘤重, 并计算10只动物的平均瘤重, 对照组和给药组均取第21天的平均瘤重计算抑瘤率; 连续观察45天, 逐日观察记录存活数和存活天数, 计算平均存活时间和生命延长率(T/C); 根据测量的瘤体大小绘制肿瘤生长曲线。

结 果

1 式细胞光度计分析

1.1 对癌细胞增殖指数(PI)的影响 见表1。结果显示, 给CHCF后癌细胞的增殖指数明显降低, 表明癌细胞的增殖分裂受到抑制。

表1 CHCF对癌细胞PI值的影响 ($\bar{x} \pm S$)

组别	标本数	PI值	
		实验1	实验2
对照	5	83.4 ± 2.6	67.2 ± 1.3
给药	5	$78.8 \pm 1.5^*$	$64.2 \pm 1.6^{**}$

注: 与对照组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

1.2 对癌细胞周期的影响 见表2。两批结果均显示, CHCF可使G₁期癌细胞数明显增加($P < 0.05 \sim 0.01$), 而S+G₂M期细胞数明显减少($P < 0.05 \sim 0.01$), 说明该制剂使癌细胞滞留于DNA合成前期, 即阻断或抑制癌细胞的DNA合成。

表2 CHCF对癌细胞的细胞周期的影响
(%, $\bar{x} \pm S$)

实验	组别	标本数	细胞周期	
			G ₁ 期	S+G ₂ M期
I	对照	5	16.6 ± 2.6	83.4 ± 2.6
	给药	5	$21.6 \pm 1.9^*$	$78.8 \pm 1.5^*$
II	对照	5	32.6 ± 1.7	67.2 ± 1.3
	给药	5	$35.6 \pm 2.1^\Delta$	$64.2 \pm 1.6^\Delta$

注: 与实验I对照组比较, $^*P < 0.01$; 与实验II对照组比较, $^\Delta P < 0.05$

1.3 组方图分析 见附图。给CHCF使癌细胞近二倍体峰增高变大, 而三倍体、四倍体以及超四倍体峰变小。

2 癌细胞形态学变化 显微镜下可见, 对照组癌细胞体积较大, 胞核亦大, 常见瘤巨细胞, 核浆比例亦大, 细胞增殖活跃, 分裂相多; 而给CHCF组的癌细胞, 胞体普遍较小, 核亦小, 胞浆较多, 增殖不活跃, 未见分裂相, 有类似浆细胞样分化。

3 再移植实验结果

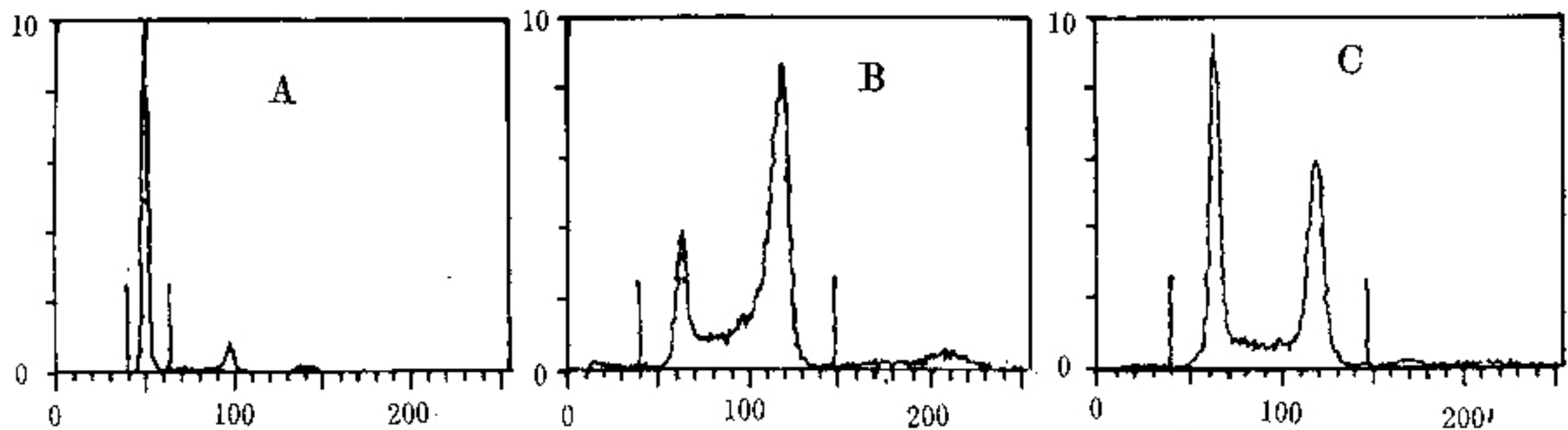
3.1 平均瘤重生长抑制率 给CHCF组的腹水癌细胞, 再移植给动物, 有2/10的小鼠未生长肿瘤; 另外的8/10的小鼠, 肿瘤生长缓慢, 瘤体很小, 平均瘤重均明显小于对照组(见表3), 两次实验的肿瘤生长抑制率分别为88.3%和71.7%, 并有统计学意义。从瘤体生长曲线可以看出, 对照组曲线很陡, 说明肿瘤持续迅速生长; 而给药组曲线很低, 意味着给药动物肿瘤生长缓慢。

3.2 荷瘤动物平均存活期 结果显示, 经给CHCF处理的腹水癌细胞再移植给动物时, 荷瘤动物的生存期比对照组明显延长, 生命延长率为46%~52%, 而且, 均有统计学意义(表3)。

表3 CHCF对小鼠腹水癌细胞再移植后的肿瘤抑制和生存期影响 ($\bar{x} \pm S$)

组别	鼠数	平均瘤重(g)		平均生存期(天)	
		实验1	实验2	实验1	实验2
对照10		2.90	2.90	26.1	26.1
		± 3.38	± 3.38	± 11.8	± 11.8
给药10		0.34	0.82	38.1	39.6
		$\pm 0.55^*$	$\pm 1.08^*$	$\pm 9.6^{**}$	$\pm 7.2^{**}$

注: 与对照组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$



附图 流式细胞光度计分析之癌细胞DNA组方图。A为正常二倍体细胞；B为小鼠肝癌细胞，未经任何处理，可见多倍体峰，近二倍体峰小，四倍体峰明显高；C中药伍用铜铁复合制剂处理之肝癌细胞，近二倍体峰明显增高，多倍体峰明显变小

讨 论

在细胞生物学特性上，肿瘤(或恶性)细胞与正常细胞区别如何？据文献资料有如下几点：(1)形态异常。(2)体外培养的恶性细胞，失去接触抑制和正常生长秩序；(3)在软琼脂中易生长集落。(4)核酸代谢和增殖分裂异常，DNA含量增加，倍体数亦增多，由于DNA合成和细胞增殖活跃，因而，S期和G₂M期细胞数量明显增多，因此，异倍体和多倍体增多。(5)基因表达异常。(6)给动物移植时很易生长肿瘤，即可移植性等⁽³⁻⁷⁾。上述指标之中任何一个都可作为区别良恶以及肿瘤恶性程度的鉴别标准。如果肿瘤或癌细胞的恶性程度减低或向良性细胞方向转化时，那么，上述这些指标的某些可能减弱乃至消失。例如形态可能正常化，DNA含量下降，倍体数减少以及移植到动物身上后，肿瘤生长缓慢或不生长肿瘤等。恶性程度降低或向正常方向转化的细胞从形态到功能都接近正常细胞^(8, 9)。

本研究首先发现CHCF可使癌细胞的DNA含量下降，PI值降低，G₁期癌细胞数明显增多，S+G₂M期细胞数明显减少；在DNA组方图上观察到近二倍体峰增高变大，而三倍体、四倍体以及超四倍体峰变小。这些结果意味着该制剂可降低癌细胞的恶性程度，或称使之向正常方向转化⁽⁸⁾。为了得到更确切的证据，进行了再移植实验，即将灌喂CHCF 10天的腹水癌小鼠处死，取其腹水癌细胞，将癌细胞再移植给新的受体动物，观察其肿瘤生长和动物存活情况。结果表明，经CHCF处理的腹水癌细胞再移植给动物后，有2/10的动物不生长肿瘤，8/10的动物即使生长了肿瘤，但肿瘤生长趋势比对照组明显缓慢，平均瘤重很小，肿瘤生长曲线低平；给药组荷瘤动物存活时间明显延长，生命延长率(T/C)达46%~52%。综上所述，一系列的实验结果较充分地表明：CHCF具有

降低癌细胞恶性程度的作用，从而，进一步阐明了该CHCF的抗癌作用机理。这种减低肿瘤细胞恶性程度的作用可能通过诱发体内的某些因子，或通过癌细胞膜蛋白质的氧化磷酸化及cAMP调节而起作用⁽⁹⁾。

参 考 文 献

1. 周 舒, 迟永春, 杜皓萍, 等. 克癌7851抗癌作用的实验研究. 中日友好医院学报 1991; 5(1): 3.
2. 迟永春, 周 舒, 万 方, 等. 克癌7851对小鼠Hep A肝癌细胞DNA及细胞周期影响的流式细胞光度分析. 中日友好医院学报 1993; 7(1): 1.
3. Chen TT, synger BS, Liney JS, et al. In vitro malignant transformation of cells derived from mouse prostate in the presence of 3 methylchalanthrene. J Nat Cancer Inst 1969; 42: 915.
4. Cuvelier CA, Roels Hi. Cytophotometric studies of the nuclear DNA content in cartiliginous tumors. Cancer 1979; 44: 1363.
5. Chi Yongchun, Liu Zonghou. Microspectrophotometric measurements of DNA contents in cells of rat thyroid carcinoma. Chinese Med J 1985; 98(1): 595.
6. Bourhis J, Devathaire F, Wilson GD, et al. Combined analysis of DNA ploidy index and N-myc genomic content in neuroblastoma. Cancer Res 1991; 51 (1): 33.
7. Rua S, Comino A, Fruttero A, et al. Relationship between histologic features, DNA flow cytometry and clinical behavior of squamous cell carcinoma of the larynx. Cancer 1991; 67: 141.
8. Hoelzer D, Harriss EB, Bultmann B, et al. Functional capacity of matured leukemic cells in culture. Exp Hematol 1990; 8 (7) supplement: 67.
9. Olsson I, Brettman TR, Keene BR, et al. Mechanisms for induction of differentiation in human myeloid leukemic cell lines (HL-60 and U-937). Exp Hematol 1981; 9(9) supplement: 41.

(收稿: 1993-08-09 修回: 1994-04-20)