

益肺抗瘤饮抑制肺癌细胞增殖的实验研究*

许 玲¹ 刘嘉湘²

内容提要 本研究应用人肺腺癌 LAX-83 裸小鼠模型观察益肺抗瘤饮对癌细胞增殖的抑制作用,发现其抑瘤率为 45.59%。并且益肺抗瘤饮组的 Ki-67 阳性率低、细胞周期中 S 期细胞数减少,有统计学差异。益肺抗瘤饮组 c-myc 蛋白表达、P53 蛋白表达发生了改变。说明益肺抗瘤饮的抑瘤作用可能是通过改变癌基因的表达,直接影响癌细胞增殖而实现的。

关键词 益肺抗瘤饮 肺癌 细胞增殖

Experimental Study on Inhibitory Effect of Yifei Kangliu Decoction on Cell Proliferation of Lung Cancer XU Ling, LIU Jia-xiang *Department of Traditional Chinese Medicine of Changzheng Hospital, Shanghai (200003)*

In this study, the inhibitory effect of Yifei Kangliu Yin (YFKL) was observed on growth of LAX-83 human lung adenocarcinoma in naked mice. It was found that the YFKL could suppress the tumor growth significantly with a suppression rate of 45.59%. It was also found that positive expression of Ki-67 and cell proliferation significantly decreased, c-myc changed from positive to weak positive and P53 from positive to negative in the YFKL treated group. It suggested that the inhibitory effect of YFKL on proliferation of cancer cells might be realized by way of changing the oncogenetic expression of cancer, so as to influence the cell proliferation directly.

Key words Yifei Kangliu Decoction, lung cancer, cell proliferation

晚期肺癌发病率及病死率高,生存期短,目前国内尚无较好的疗法。刘嘉湘教授根据中医“养正积自除”的理论,经多年临床实践,认为中医“扶正法”治疗晚期肺癌,在稳定病灶,延长生存期,改善生存质量等方面有较好的疗效,并在此基础上,研制出了益肺抗瘤饮。本研究就益肺抗瘤饮对肺癌细胞增殖的影响作一些探讨。

材料与方 法

1 动物 裸小鼠 30 只,雌雄各半,6~8 周龄,体重 16~20 g,购自中国科学院上海实验动物中心。

2 瘤株及移植方法 在每只裸小鼠右腋部皮下接种细胞浓度为 $1.5 \times 10^7/\text{ml}$ LAX-83 人肺腺癌细胞(购自中国科学院上海分院药物研究所)。接种后次日开始用药,第 22 天处死小鼠进行检测。

3 实验动物分组 造模后随机分成 3 组,每组 10 只,雌雄各半。(1)空白荷瘤对照组:生理盐水 0.2 ml 灌胃 21 天;(2)益肺抗瘤饮组:益肺抗瘤饮由

黄芪、北沙参、天冬、女贞子、七叶一枝花等中草药组成,由上海中医药大学龙华医院肿瘤实验室提供,每毫升含生药浓度 3.22 g,用生理盐水稀释,使 0.2 ml 相当于 60 g/kg 的药量^①,0.2 ml 灌胃 21 天;(3)顺铂组(DDP)组:由齐鲁制药厂生产,批号(91)861-82,20 mg/瓶,用生理盐水稀释成 0.2 mg/ml,参照张素胤^②用量,以 1 mg/kg,每日腹腔注射 1 次,共 21 天。

4 人肺腺癌 LAX-83 染色体鉴定 根据文献^③方法操作,并进行染色体配对,排列。40 倍光镜下,所见染色体无一端着丝点染色体,证明是人的染色体。每个细胞的染色体数目超过了 46 条,说明是恶性肿瘤细胞。

5 观察指标

5.1 瘤重抑制率。

5.2 Ki-67 免疫组化染色 采用 ABC 法^④。Ki-67 抗体购自 DAKD 公司。

5.3 细胞周期和 DNA 指数检测 由上海细胞生物研究所协助。方法:(1)将冷藏于 -80°C 的实体瘤组织低温下取出,并快速融化;(2)用机械法将实体瘤组织剪碎,用 200 目尼龙网过滤成单细胞悬

*上海市高教局资助项目

1.上海长征医院中医科(上海 200003); 2.上海龙华医院中医肿瘤科

液,置于柠檬酸缓冲液中 1 h 以上; (3)离心后去掉上清液; (4)加入 A 溶液 1800 μ l(NP40, 胰酶, 四氯酸精胺)作用 10 min; (5)加入 B 溶液 1500 μ l(胰酶抑制酶、RNase A)作用 10 min; (6)加入 C 溶液 1500 μ l(PI-碘化丙锭)作用 15 min 以上; (7)调整细胞浓度到 1×10^6 /ml 左右; (8)用 200 目尼龙网再次过滤; (9)上流式细胞仪(FCM, 美国 Becton Dickinson 公司生产)作 DNA 细胞周期采样分析。

5.4 P53、c-erbB-2, rasP21, c-myc 癌基因蛋白表达检测 采用 ABC 法⁽⁴⁾。P53, c-erbB-2, rasP21, c-myc 单抗均购自 DAKO 公司。

5.5 数据资料统计分析均用 t 检验。

结 果

1 局部肿瘤重量和抑制率 见表 1。

表 1 中示益肺抗癌饮组与 DDP 组抑瘤率均大于 30%, 说明益肺抗癌饮具有一定的抑瘤疗效。统计学分析, 益肺抗癌饮组与空白对照组比较, 差异显著 ($P < 0.05$), DDP 组与空白对照组比较, 也有统计学差异 ($P < 0.05$), 而益肺抗癌饮组与 DDP 组比较,

表 2 益肺抗癌饮对人肺腺癌 LAX-83 细胞增殖周期及 DNA 指数影响 ($\bar{x} \pm S$)

组 别	动物数	G ₁ 期(%)	S 期(%)	G ₂ +M 期(%)	DI
空白对照	8	40.58 $\pm$ 5.57	48.69 $\pm$ 5.89	10.70 $\pm$ 2.97	1.73 $\pm$ 0.25
益肺抗癌饮	8	43.21 $\pm$ 7.71	40.31 $\pm$ 6.24*	16.48 $\pm$ 4.41**	1.94 $\pm$ 0.25
DDP	8	46.33 $\pm$ 4.09*	36.96 $\pm$ 5.11**	16.74 $\pm$ 3.95**	2.03 $\pm$ 0.15*

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

增殖期的细胞减少。

4 益肺抗癌饮对人肺腺癌 LAX-83 癌基因蛋白表达的影响 通过检测癌基因 P53、c-myc、c-erbB-2、rasP21 蛋白表达, 发现空白对照组中 P53、c-myc 蛋白呈阳性表达, c-erbB-2、rasP21 蛋白呈阴性表达。提示人肺腺癌 LAX-83 的生长与 P53、c-myc 癌基因的过度表达有关。用益肺抗癌饮治疗后发现 P53 蛋白表达转为阴性, c-myc 蛋白表达转为弱阳性。用 DDP 治疗后也得出了相似的结论: P53 蛋白表达为阴性, c-myc 蛋白表达为弱阳性。说明益肺抗癌饮和 DDP 在一定程度上减弱了 P53、c-myc 癌基因蛋白的表达, 抑制了肿瘤的生长。

讨 论

任何疾病的发生都有内因和外因两方面的因素, 肿瘤的发生也是外邪、七情、饮食不节、脏腑功能失调多种病因综合作用的结果。但是中医学对肿瘤的认识不但强调外因, 而且更重视内因。如《素问》有“邪

无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 1 益肺抗癌饮对 LAX-83 人肺腺癌细胞的抑制作用 ($\bar{x} \pm S$)

组 别	动物数 始 终	瘤重(g)	抑制率(%)
空白对照	10 9	2.75 $\pm$ 0.89	—
益肺抗癌饮	10 8	1.50 $\pm$ 0.50	45.59*
DDP	10 8	1.57 $\pm$ 0.57	42.95*

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$

2 益肺抗癌饮对人肺腺癌 LAX-83 细胞 Ki-67 表达的影响 空白对照组(8 只)Ki-67 阳性率为 (0.560 $\pm$ 0.018)%, 益肺抗癌饮组(8 只)为 (0.340 $\pm$ 0.041)%, 两组比较有显著性差异 ($P < 0.001$); DDP 组(8 只)的 Ki-67 阳性率为 (0.330 $\pm$ 0.050)%, 与空白对照组比较也有显著性差异 ($P < 0.001$), 说明益肺抗癌饮和 DDP 均能抑制肿瘤细胞的增殖。

3 益肺抗癌饮对人肺腺癌 LAX-83 细胞增殖周期及 DNA 指数的影响 见表 2。

表 2 可见, 益肺抗癌饮组和 DDP 组治疗后 S 期细胞数减少, G₂+M 期细胞增多, 提示用药后处于

之所凑, 其气必虚”之说, 《医宗必读·积聚篇》有“积之成也, 正气不足, 而后邪气踞之”之论。都说明正气不足是肿瘤发生的主要原因, 而邪气入侵则是重要条件。益肺抗癌饮正是以扶正为主, 祛邪为辅为治疗原则由多年临床实践总结而成的中药制剂。方中黄芪、北沙参、天冬、女贞子为主药, 意在益气养阴, 符合临床肺癌以阴虚和气阴两虚为多见的临床特征⁽⁵⁾, 且临床应用取得了延长患者生存期, 提高生存质量, 稳定病灶, 防止癌瘤转移的效果⁽⁶⁾。

本研究应用人肺腺癌 LAX-83 裸小鼠模型观察益肺抗癌饮抑制实体瘤生长的情况, 发现益肺抗癌饮的抑瘤率为 45.6%, 显示出了其抑瘤疗效。

细胞增殖是指细胞通过分裂生成和本身相同的细胞群体, 细胞从一次分裂结束到下一次分裂结束为 1 个周期, 其中 S 期是细胞增殖周期中反映 DNA 复制的阶段。DNA 含量的变化可以作为直接反映肿瘤增殖生长能力的重要生物学指标⁽⁷⁾, 处于 S 期的细胞数也可在一定程度上反应细胞的增殖能力。本研究应用

流式细胞仪分析益肺抗瘤饮治疗后裸小鼠体内 LAX-83 人肺腺癌细胞的增殖周期, 结果显示益肺抗瘤饮组 S 期细胞数明显少于空白对照组 ($P < 0.05$)。Ki-67 单抗⁽⁴⁾能标记除 G₀ 期以外的细胞周期内任何一期的细胞, 其表达与细胞增殖高度相关。本研究的结果显示, 益肺抗瘤饮组 Ki-67 的阳性率明显低于空白对照组, 有统计学差异。表明益肺抗瘤饮具有抑制 LAX-83 人肺腺癌细胞增殖的作用。

肿瘤进展过程的根本原因是基因的改变, 表现为许多基因的丢失、失活、突变或过度表达的结果。与肺癌有关的基因很多, 其中显性基因有 c-myc、L-myc、N-myc、K-ras、H-ras、N-ras、c-erbB-2/neu 等, 隐性基因有 rb 基因、P53 基因等。肺癌的发生可能不仅仅是一种基因的改变, 而是几种基因改变的综合结果。本研究对裸小鼠 LAX-83 人肺腺癌细胞中突变型 P53、c-myc、rasP21、c-erbB-2 蛋白表达进行了测定, 发现空白对照组中 P53、c-myc 蛋白呈阳性表达, 而 rasP21、c-erbB-2 呈阴性表达, 说明 LAX-83 人肺腺癌的发生与 c-myc 基因和突变型 P53 基因的过度表达有关。

通过对 c-myc 基因产物 c-myc 蛋白功能结构区的认识和 Max 蛋白的发现, 了解到高水平 c-myc 表达, 有利于形成 c-myc/Max 二聚体, 与 DNA 结合, 激活增殖基因, 引起细胞增殖⁽⁸⁾。突变型 P53 存在于许多人肿瘤中, 过度表达突变型 P53(mp53) 可以增强体内的致癌过程, 而野生型 P53(wtp53) 具有抑制生长和抗癌的作用。缺少 wtp53 或过度表达 mp53, 可以使 G₁ → S 期不受抑制, 致使癌细胞增

殖⁽⁹⁾。本研究发现益肺抗瘤饮能降低 LAX-83 人肺腺癌细胞突变型 P53 和 c-myc 基因蛋白的表达, 从而抑制了肿瘤细胞的增殖。

总之, 益肺抗瘤饮具有较好的抑瘤作用, 这种作用可能是通过降低了癌基因的表达, 从而直接抑制了肿瘤细胞的增殖而实现的。

(感谢上海医科大学附属肿瘤医院病理科的许良中教授及其全科人员对本工作的帮助)

参 考 文 献

1. 李仪奎. 中药药理实验方法学. 第 1 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 562.
2. 张素胤, 戴志强, 受裕华, 等. 人肺腺癌裸小鼠模型的建立及此移植瘤对抗癌药物的敏感性. 中国药理学报 1987; 8(4): 366—369.
3. 刘权章. 人类染色体方法学. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1992: 55—61.
4. 倪灿荣. 免疫组织化学实验新技术及应用. 第 1 版. 北京: 北京科学技术出版社, 1993: 128—129.
5. 刘嘉湘. 肿瘤防治. 第 1 版. 北京: 中国科学技术出版社, 1989: 135—137.
6. 刘嘉湘. 辨证治疗原发性肺癌 310 例疗效分析. 上海中医药杂志 1985; (10): 3—5.
7. 丛文铭. DNA 含量定量分析在肿瘤病理学研究中的应用. 中华病理学杂志 1989; 18(3): 235—237.
8. 李士谔. 细胞分化在致癌和抑癌中的作用. 中国医学科学院学报 1993; 15(6): 455—463.
9. 李士谔. 细胞分化在致癌和抑癌中的作用. 中国医学科学院学报 1993; 16(1): 73—77.

(收稿: 1995-08-23 修回: 1995-12-22)

· 书 讯 ·

▲由余养居、张守信、胡素琴主编的《中西医结合嗓音病学》近日由上海知识出版社出版, 各地新华书店发行。该书是我国第一部中西医结合治疗嗓音病的专著, 约 45 万字。介绍了嗓音病简史、解剖生理、与脏腑经络的关系、病因病理、现代检查方法及中医辨证、治疗方法、用药要点, 并分别论述了 90 多种嗓音病和 140 多种常用中草药的性能及功用。该书是中西医结合耳鼻喉科医师的嗓音病临床参考书, 也可做为教师、演员、公关人员、营业员等的保健指南和医学顾问。精装每本 21 元。欲购者请与上海市仙霞

路 335 号知识出版社图书门市部谢爱娟女士联系。邮编: 200335。

▲由山东中医药大学附属医院郭兆安主治医师编写的《慢性肾功能衰竭的中西医治疗》一书, 已由中国中医药出版社出版。该书以现代医学对慢性肾衰研究的新认识、新方法为主, 同时又有中医对本病的认识、治疗及研究, 是具有中西医结合治疗特点的慢性肾衰专著。该书每本 20 元(含邮资), 欲购者汇款请寄: 山东中医药大学附属医院郭兆安收, 邮编: 250011。