

体外细胞培养应用于中药复方研究的进展

黄海茵¹ 郭映华¹ 于尔辛²

纵观现代医学研究史,体内(in vivo)实验和体外(in vitro)实验是不可分割的两个方面。从各自的地位来看,由于体外实验的结果最终要通过体内实验来证实其价值,体内实验更为重要。然而,体外实验以其需时短、实验条件和因素易于控制,便于进行相对复杂的实验设计,可以避免体内实验的伦理学问题等优点,在现代医学的发展中发挥了极为重要的作用,而现代医学的许多重大突破源于体外实验的启迪。在中西医结合临床实践中,中药复方仍然是主要的用药方式。但在体外实验中,将中药复方或单方(单方本身含有多种成分,因而也可看作为1个小复方)的提取物直接加入体外细胞培养系统中的方法,易受多种因素干扰,其结果的可靠性受到怀疑。这使得用体外细胞培养来研究中药复方(或单方)的工作进展缓慢,一定程度上阻遏了中西医结合的发展。尽管存在许多困难,人们在这一领域中仍做了大量工作。近年来兴起的血清药理学方法,有希望克服中药粗制剂直接体外用药的不利因素,已成为当今中药复方研究的一个重要动向。本文就国内外对这一领域的研究进展情况作一综合述评。

1 细胞培养中药制剂的制备

制备用于细胞培养的中药制剂有较高的要求。用蒸馏水煎煮后,有的直接采用水煎液^(1,2),更多的用水提醇沉提取液⁽³⁾,过滤、浓缩、调节 pH,还需用微孔滤膜或高温除菌,最后制成供体外细胞培养用的中药原液。血清药理学方法的药物制备则是先给供体按临床用药量(志愿者),或临床等效剂量(动物)给药,一定时间后采血分离血清,含药血清被分离后,应置 56℃ 水浴中灭活补体;若需长期保存,需冷藏于 -20℃ 以下备用^(4,5)。

2 体外细胞培养系统

可采用外周血单个核细胞、血小板、巨噬细胞,也有的采用体细胞(如成纤维细胞、肾小球系膜细胞等),另一大类为肿瘤细胞。与含有一定浓度中药(或含药血清)的培养液共育一定时间后,检测自然杀伤(NK)细胞活性、淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)活性、上清液中各种细胞因子浓度以及对细胞增殖的抑制率、

细胞表面标志物的表达等指标。作用时间各家报道不一^(1,2),有与中药短时间作用(30min 或 2h),一般选择作用 1~3 天。中药的有效作用浓度依提取、制备方法的不同而变化较大。含药血清作体外细胞培养时,一般认为其浓度不应超过 20%⁽⁵⁾。

3 中药在体外细胞培养中的作用

3.1 对免疫细胞的作用 日本学者将小柴胡汤制剂(100μg/ml)加入 LAK 细胞培养系统中,发现 LAK 活性明显升高⁽⁶⁾。以黄芪、紫草、土茯苓、灵芝等组成的复方在体外与重组人白细胞介素 2 受体(rIL-2)共同诱导 LAK 细胞,可将 rIL-2 浓度降至常规浓度的 10%,与对照组比较有显著性差异,且对胃癌细胞株 SCG7901 的杀伤率与常规浓度 rIL-2 诱导的 LAK 细胞无显著性差异⁽⁷⁾。冬虫夏草醇提液在 0.1、1mg/ml 浓度下体外处理人外周血淋巴细胞,可使其 NK 细胞活性随时间依赖性增强⁽⁸⁾。0.1mg/ml 黄芪注射液预先处理效应细胞 20h,可明显提高 NK 细胞活性⁽⁹⁾。当归水提液 500μg/ml 浓度在体外可促进淋巴细胞产生 IL-2⁽¹⁰⁾。

对免疫细胞抑制作用的报告有:雷公藤体外用药可降低外周血淋巴细胞对 IL-2 的反应性,抑制 IL-2 的产生,但对 IL-2 受体数和 NK 细胞活性均无显著性影响⁽¹¹⁾。给小鼠胃饲人参水提液后可提高其体内 NK 细胞活性,但体外用药在高浓度(非毒性浓度)时,可抑制淋巴细胞增殖⁽¹²⁾。

3.2 对肿瘤细胞的作用 日本学者对古典名方小柴胡汤在体外对人肝癌细胞株(KIM-1)和胆管细胞癌株(KIC-1)的抑制作用进行了详尽的研究。发现这两种癌细胞株在体外与不同浓度的小柴胡汤作用 3 天后,其生长受到不同程度的抑制。其 50% 抑制浓度分别为 $(353.5 \pm 32.4) \mu\text{g/ml}$ 和 $(236.3 \pm 26.5) \mu\text{g/ml}$ 。中药培养液的渗透压和 pH 值皆属于正常范围,并且该浓度范围内的小柴胡汤对健康人的外周血淋巴细胞和鼠肝细胞无抑制作用。以小柴胡汤的各种主要成分以及另一种中药复方作为试剂对照,表明小柴胡汤的抑制作用明显强于其各种主要成分($P < 0.05$)和另一种中药复方($P < 0.01$),说明小柴胡汤的作用具有协同性和特异性。其抑制癌细胞增殖的可能机理是:在作用早期诱导凋亡以及在晚期使癌细胞阻滞于 G_0/G_1

1. 上海市肺科医院(上海 200433);2. 上海医科大学附属肿瘤医院

期⁽¹³⁾。运用流式细胞仪对临床治疗原发性肺癌的有效复方进行了拆方研究,24 味中药的水提醇沉法制剂(10mg/ml)处理肺腺癌细胞株 24h,其中对细胞增殖指数抑制率在 20% 以上的 4 味中药中,有 3 味药是扶正药(绞股蓝、北沙参、人参),提示扶正法治疗肿瘤并不一定意味着传统意义上的“补”,一些补益药亦能直接抑制肿瘤细胞增殖⁽¹⁴⁾。从 32 种中药制剂中筛选出的 Ams-11、FW-13、Tul-17 等 3 种中药逆转剂,在非毒性浓度下,能明显增强多药耐药细胞对抗癌药物的敏感性,其逆转作用呈剂量依赖关系⁽¹⁵⁾。

用扶正抗癌方(莪术、白术、苦参、白花蛇舌草)给大鼠灌胃,分离血清,处理人肝癌细胞 SMMC7721 一定时间后,发现癌细胞活力明显减弱,细胞内 cAMP 明显升高,细胞分泌白蛋白量增多,甲胎蛋白减少。说明扶正抗癌方对人肝癌细胞具有诱导分化作用⁽¹⁶⁾。

当归(500 μ g/ml)加脂多糖(LPS)与肺泡巨噬细胞(AM)共育 24h 后,用流式细胞仪分析其 CD_{11c}和 CD₁₄表达的百分率,发现当归可明显抑制 LPS 对慢性支气管炎(简称慢支)患者 AM 膜上 CD_{11c}表达的刺激作用及对 AM 胞浆游离钙水平的升高作用,提示当归对于慢支缓解期气道内非特异性炎症可能具有抑制作用⁽¹⁷⁾。丹参注射液(10 μ g/ml)处理的肝癌细胞 SMMC7721 细胞株表达细胞间粘附分子-1(ICAM-1)的能力明显降低,其侵袭、粘附能力亦降低,与体内实验丹参能防治肝癌转移的结果相吻合⁽¹⁸⁾。以血府逐瘀汤方制成的水煎剂与血小板和人脐带内皮细胞共育,在 40mg/ml 及 80mg/ml 浓度时可明显抑制二磷酸腺苷诱导的血小板膜表达糖蛋白(GP) II b/III a 复合物分子表达,因而可抑制 ADP 对血小板的激活⁽¹⁾。清心饮(由人参、麦冬、丹参、赤芍、栝蒌皮、金银花、苦参等组成)的水煎醇沉液与大鼠心肌细胞培养 3~5 天,在 2.5~10mg/ml 浓度范围内能够剂量依赖性地减少感染心肌细胞乳酸脱氢酶、天冬氨酸氨基转移酶的释放,降低上清液中的病毒滴度,对心肌细胞搏动异常及细胞病变均有保护作用,且通过斑点杂交发现清心饮可抑制感染心肌细胞中病毒核糖核酸的复制⁽¹⁹⁾。

王伟等给动物胃饲精制血府胶囊(由柴胡 3g 赤芍 9g 红花 9g 桃仁 12g 组成)后,取含药血清(浓度 200~800ml/L)与缺氧缺糖的心肌细胞共育,发现对心肌有保护作用⁽⁴⁾。含中药复方肾衰宁(由大黄、丹参、红花等组成)对人系膜细胞的增殖及 IL-1 分泌有明显抑制作用,该作用具有一定的量效关系。提示肾小球系膜细胞是肾衰宁发挥治疗作用的重要靶细胞,这可能是该方防治慢性肾功能衰竭的机制之一⁽²⁰⁾。

刘静芳等发现含益气活血补肾方药(黄芪、当归、生地、淫羊藿及大黄)的大鼠血清能明显抑制大鼠肾小球系膜细胞(MC)增殖;用中药血清处理 MC 1h 后,MC c-myc 基因表达活性明显降低,说明其机理可能与抑制 MC 原癌基因 c-myc 表达有关⁽²¹⁾。该方中的黄芪、当归及大黄制剂已被证明能在体外抑制 MC 增殖^(22,23)。提示该方药中某些有效成分可直接和(或)作用于机体后,引起体内代谢变化,某些代谢产物间接地抑制 MC 增殖。

4 体外细胞培养对于中药复方研究的价值

中药复方或单方制剂用于体外细胞培养由来已久,但目前占主导地位的观点是:直接将中药复方制剂加入到体外细胞培养体系中,易于受到制剂的杂质、pH 值、渗透压、电解质等因素影响。中药的一些成分需吸收并在体内转化后才产生活性,一些活性大分子不能经消化道吸收入血,而一旦代谢后作用消失,因而体外实验极易出现假阴性和假阳性的结果^(5,24)。多篇中药单方或复方直接加入进行体外细胞培养的文献发现大多为阳性结果,阴性结果少见,且多与体内试验结果吻合。其中日本学者研究小柴胡汤对肝癌细胞株抑制作用的一篇文章,设计严谨,有正常细胞和其他中药制剂作对照,颇具说服力。以上实验结果似乎与目前占主导地位的观点不太一致。

近几年发展起来的中药血清药理学(不少作者意见,应改为含药血清法)方法,避免了中药复方制剂直接体外用药的一系列干扰因素,其特点为不但能反映中药(母体药物)及其可能的代谢产物的药理作用,而且还能反映有可能由药物诱导机体内源性成分所产生的作用,已成为当今中药复方研究的一个重要动向。但作为一种新兴的实验方法,在技术上还需探讨、规范和完善。例如,由于技术原因,含药血清在培养液中的浓度一般不能超过 20%,这使得体外培养难以达到体内的真实血药浓度。迄今为止,用含药血清法进行的实验研究文章,大多采用含药动物血清,鲜见采用含药人血清的研究报告。我们知道,理想的体外实验模型应当最大限度地模拟体内环境,因此,通过含药血清法来研究中药复方,许多问题仍有待解决。

尽管在某些方面意见尚不统一,利用体外实验来研究中药复方正越来越受到重视。体外细胞培养是医学研究的重要手段,对于中西医结合研究同样是不可缺少的。目前,研究目的多限于验证临床有效的复方,或探索其可能机理,这是不够的。希望能充分发挥体外实验的优势(如本文前言所述),深入研究中药复方在组方、剂量、辨证论治上的奥妙,进而推陈出新,给临

床以启示或指导,这才是用体外细胞培养研究中药复方的最终目的。

参 考 文 献

1. 李艳梅,汪 钟,翁 进,等.血府逐瘀液对血小板与内皮细胞功能的影响.中国中西医结合杂志 1999;19(5):289—291.
 2. 常春燕.黄芪促进小鼠 NK 细胞活性的研究.中国医学科学院学报 1983;(4):231.
 3. 李依奎.中药药理实验方法学.上海:上海科学技术出版社 1991:37—39.
 4. 王 伟,史大卓,陈可冀,等.精制血府胶囊刺激缺氧缺糖心肌细胞 RNA 及蛋白质合成的研究.北京中医药大学学报 1997;20(2):17—19.
 5. 王宁生,雷 燕,刘 平,等.关于血清药理学的若干思考.中国中西医结合杂志 1999;19(5):263—266.
 6. Mizoguchi Y, Sakagami Y, Miyajima K, et al. The effect of Xiao-chai-hu-tang on lymphokine activated killer cell activity. *Arerugi* 1986;35(11):1119—1121.
 7. 许运明,吴明生,王自安,等.扶正消瘤液增强 LAK 抗肿瘤活性的实验研究.辽宁中医杂志 1998;25(4):188—189.
 8. 徐仁和.冬虫夏草对天然杀伤细胞活性及肿瘤克隆形成的影响.湖南医学院学报 1988;(2):107—108.
 9. 金建平,林维芬,张咏南,等.人脐血 α 干扰素和黄芪对 NK 细胞毒活性的影响及其机理的初步探讨.中华微生物学与免疫学杂志 1983;3(5):293.
 10. 吴梧桐.当归及其成分阿魏酸对小鼠脾淋巴细胞的作用.中国药科大学学报 1989;20(4):219.
 11. Li XW. Radix tripterygium wilfordii—a Chinese herbal medicine with potent immunosuppressive properties. *Transplantation* 1990;50(1):82—84.
 12. Jie YH, Cammisuli S, Baggiolini M. Immunomodulatory effects of panax ginseng C. A meyer in the mouse. *Agents Actions* 1984;15(3—4):386—391.
 13. Hirohisa Y, Atsushi M, Kazunori F, et al. The herbal medicine Sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G_0/G_1 phase. *Cancer Research* 1994;54:448—454.
 14. 韩明权,刘嘉湘,高 虹,等.24 味中药对人肺腺癌细胞核酸和蛋白质及细胞周期的影响观察.中国中西医结合杂志 1995;15(3):147—149.
 15. 李大成,屈 艺,刘柏林,等.三种中药制剂 Ams-11、FW-13、Tul-17 逆转肿瘤细胞多药耐药性的研究.华西医科大学学报 1998;29(1):16—20.
 16. 王昌俊,钱伯文,陈 伟.扶正抗癌方对人肝癌细胞分化的影响.中国中西医结合杂志 1998;18(增刊):262—264.
 17. 彭 则,张珍祥,徐永健,等.当归对慢性支气管炎肺泡巨噬细胞上 CD_{11c} 和 CD_{14} 表达的影响.中国中西医结合杂志 1999;19(5):282—285.
 18. 孙婧璇,周信达,刘银坤,等.丹参对肝癌转移复发防治作用的研究.中国中西医结合杂志 1999;19(5):292—295.
 19. 程志清,刘 强,杨英珍.清心饮对培养大鼠心肌细胞感染柯萨奇 B3 病毒的影响.中国中西医结合杂志 1998;18(增刊):51—53.
 20. 刘铜华,叶传蕙.肾衰宁对体外培养的肾小球系膜细胞增殖及其分泌细胞因子白细胞介素-1 的影响.中国中西医结合杂志 1999;19(5):299—301.
 21. 刘静芳,温进坤,韩 梅.益气活血补肾方药对体外培养的肾小球系膜细胞增殖及 c-myc 基因表达的影响.中国中西医结合杂志 1998;18(增刊):105—107.
 22. 蒋工伟,陈香美,黎磊石.大黄对体外肾小球系膜细胞增殖及其分泌细胞因子白细胞介素-1 的影响.中华肾脏病杂志 1990;6(3):133—136.
 23. 李丽英,王海燕.黄芪、当归对肝脏和肾脏的保护作用.中华肾脏病杂志 1995;11(6):372—373.
 24. Kazunori FukuDa. Increase in nitric oxide synthase and cyclic GMP in vascular smooth muscle cells by treatment with aqueous extracts of astragali radix, ginseng radix and scutellariae radix. *Journal of Traditional Medicines* 1995;12:38—40.
- (收稿:1999-10-08 修回:1999-11-12)
- (上接 393 页)
24. 冯建国.针刺对支气管哮喘患者血浆皮质醇含量的影响.浙江中医杂志 1982;17(1):16—17.
 25. OCHIICBa HH(王友京译).内分泌系统在针刺过程中的作用.国外医学中医中药分册 1983;(2):1.
 26. Lian Nan. The effect of stimulation at acupoint sanyinjiao (SP-6) on corticosteroid levels and the implications for treating kidney yang deficiency. *Amer J of Acupuncture* 1995;23(2):183—184.
 27. 吴伟康,侯 灿.电针足三里预防地塞米松引起肾上腺皮质萎缩形态学研究.中医杂志 1988;29(2):98—100.
 28. 吴伟康,侯 灿.电针足三里预防地塞米松引起肾上腺皮质机能减退的研究.中医杂志 1989;30(3):27—29.
 29. 赵湘杰.针刺对注入地塞米松大鼠的中枢 5-HT 和肾上腺皮质系统的影响.中国针灸 1995;15(1):28—30.
 30. 萨藤山.针刺治疗支气管哮喘对气道阻力的影响.中华内科杂志 1961;9(5):272—274.
 31. 张笑平.针灸对呼吸机能的调整作用.新中医.1981;(10):21—23.
 32. 张压西,陈友梅,余红缨.针刺肺腧穴改善肺功能时效关系研究.中国针灸 1997;(10):581—582.
- (收稿:1999-03-27 修回:1999-12-27)