

扶正抑瘤汤对肿瘤细胞周期及端粒酶影响的实验研究^{*}

戴恩来 赵健雄 朱玉真 张玉红 王学习

内容提要 目的 探讨扶正抑瘤汤抗肿瘤的作用机理。方法 用 S_{180} 瘤株接种昆明种小鼠,造成 S_{180} 实体瘤模型,扶正抑瘤汤等中药灌胃治疗,用流式细胞仪分析实体瘤的细胞周期;用端粒酶试剂盒检测端粒酶活性。结果 各治疗组肿瘤细胞 $G_{0/1}$ 期比率升高,S 期比率下降,端粒酶活性被抑制,与生理盐水(荷瘤)组相比,差异有显著性($P < 0.001$)。结论 扶正抑瘤汤能阻滞肿瘤细胞增殖的进程,阻抑肿瘤细胞 DNA 的合成和复制,而端粒酶活性被抑制是影响肿瘤细胞增殖周期进程的机理之一。

关键词 扶正抑瘤汤 肿瘤细胞周期 端粒酶

Experimental Study on Effect of Fuzheng Yiliu Decoction on Tumor Cell Cycle and Telomerase DAI En-lai, ZHAO Jian-xiong, ZHU Yu-zhen, et al *Institute of Integrated Traditional and Western Medicine of Lanzhou Medical College, Lanzhou (730000)*

Objective: To study the mechanism of anti-tumor effect of Fuzheng Yiliu Decoction (FZYLD). **Methods:** S_{180} neoplasm strain was inoculated in Kunming mice to establish model of S_{180} solid tumor. The model animals were treated with FZYLD by gastrogavage, the cell cycle of tumor were checked up by flow cytometer and the telomerase kit was used to test telomerase activity. **Results:** The stage $G_{0/1}$ ratio of tumor cells in model animals treated with FZYLD increased, while cells of S stage decreased, with telomerase activity inhibited. These changes were different significantly from those in the model animals treated with normal saline ($P < 0.001$). **Conclusion:** FZYLD could block the tumor cell proliferation procedure and inhibit the DNA synthesis and duplication in tumor cell. And the suppression of telomerase activity might be one of the mechanisms affecting the tumor cell proliferation cycle.

Key words Fuzheng Yiliu Decoction, tumor cell cycle, telomerase

我们在观察扶正抑瘤汤抗肿瘤作用⁽¹⁾的基础上,进行了扶正抑瘤汤对肿瘤细胞周期及端粒酶活性影响的实验研究,现将结果报告如下。

材料和方法

1 材料

1.1 动物与瘤株 实验动物用健康昆明种小鼠,体重(20 ± 2)g,由兰州生物制品研究所动物供应室提供。肿瘤瘤株用 S_{180} (腹水型),由北京中国医学科学院药物研究所提供。

1.2 药物 扶正抑瘤汤(FY)由红芪、当归、莪术、墓头回等中药组成;扶正汤(F)由红芪、当归组成;抑瘤汤(Y)由莪术、墓头回组成。上述方剂均按原方比例水煎浓缩成 $1g/ml$ 的药液。选用国家准字号抗肿瘤新药天仙胶囊(T,批号 990602)作为阳性对照,将药

粉研成极细末,配成 $0.1g/ml$ 的药液。以上药液均在 $4^{\circ}C$ 以下贮存备用。

1.3 试剂与仪器 端粒酶试剂盒由华美生物工程公司提供。细胞周期检测用流式细胞仪,美国库尔特公司产品,型号为 Epics-XL。PCR 扩增仪为 EP 公司产品(型号 2400)。

2 方法 昆明种小鼠 84 只,雌雄各半,随机分为 7 组,每组 12 只。分别为:生理盐水(NS)正常对照组,NS(荷瘤)阴性对照组,FY 大剂量组、FY 小剂量组、Y 组、F 组各治疗组,T 组(阳性对照组)。FY 大、FY 小、Y、F、T 各组的灌胃药物剂量分别为 24、12、12、12、 $1g/kg$ 。于灌胃第 6 天接种 S_{180} 瘤株,接种按《抗肿瘤药物体内筛选规程(草案)》⁽²⁾进行,在小鼠右前腋下的皮下接种 S_{180} 瘤株,接种肿瘤细胞数约为 2×10^6 /只。用药第 18 天,称体重,处死动物,剖取瘤块,称重,立即送检。

3 细胞周期测定 取新鲜标本适量,置于 Hank 溶液中剪成 $1mm^3$ 左右小块,边剪边在 Hank 溶液中搅动,促使细胞释出;当细胞数达到 $1 \times 10^6/ml$ 以上

^{*} 甘肃省自然科学基金资助课题(ZS001-A23-056-Y)

兰州医学院中西医结合研究所(兰州 730000)

时,用 200 目和 350 目的尼龙网各过滤 1 次。滤液离心后去除上清液,加入 70% 乙醇 3ml 固定,置于 4℃ 冰箱保存。测试前,上述悬液用 PBS 洗涤 2 次,置于 37℃ 恒温箱中 30min,再加入 1% 碘化丙啶(PI)0.2ml,调整细胞数为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 后上机检测。测定前用鸡红细胞校准仪器,使变异系数(CV)在 4% 以内。测定 $G_{0/1}$ 、S、 $G_2 + M$ 期比率。

4 端粒酶活性检测 包括端粒提取、端粒酶重复序列扩增和产物杂交检测,均按试剂盒要求严格操作。端粒酶的活性值用 OD 值表示。

5 统计学方法 实验数据均采用社会科学统计软件包(SPSS)处理,两均数间的比较用 t 检验。

结 果

1 各组小鼠细胞周期检测结果比较 见表 1。阴性对照组肿瘤细胞 $G_{0/1}$ 期比率为 36.6%,S 期比率为 51.10% 与之相比,扶正抑瘤汤各治疗组及 T 组的肿瘤细胞 $G_{0/1}$ 期比率均升高,S 期比率降低,统计学处理差异有显著性($P < 0.001$)。在各治疗组中,以 FY 大组的影响最大, $G_{0/1}$ 期的比率上升至 68.80%,S 期的比率下降为 20.10%。与其他各治疗组之间存在显著差异($P < 0.001$)。Y 组与 F 组之间则无差异($P > 0.05$)。

2 各组端粒酶活性比较 见表 2。阴性对照组端粒酶活性(OD)值为 1.10,各治疗组的端粒酶活性(OD 值)均下降,与阴性对照组差异显著($P < 0.001$),以 FY 大组的 OD 值(0.57)下降显著。

表 1 各组小鼠 $G_{0/1}$ 、S 及 $G_2 + M$ 期比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	$G_{0/1}$	S	$G_2 + M$
阴性对照	12	36.60 ± 5.60	51.10 ± 5.60	12.10 ± 0.50
FY 大(24g/kg)	11	68.80 ± 5.90 *	20.10 ± 2.10	11.10 ± 0.80
FY 小(12g/kg)	10	54.27 ± 4.50 *	34.80 ± 2.27	10.30 ± 0.84
Y(12g/kg)	11	48.56 ± 5.90 *	38.95 ± 3.55	12.40 ± 1.45
F(12g/kg)	12	48.94 ± 6.60 *	40.30 ± 5.60	10.60 ± 0.90
T(1g/kg)	10	47.40 ± 7.80 *	40.30 ± 5.10	10.02 ± 1.10

注 与阴性对照组比较, * $P < 0.001$

表 2 各组小鼠肿瘤细胞端粒酶比较 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	端粒酶(OD)
正常对照	8	—
阴性对照	8	1.10 ± 0.43
FY 大(24g/kg)	8	0.57 ± 0.04 *
FY 小(12g/kg)	8	0.61 ± 0.05 *
Y(12g/kg)	8	0.70 ± 0.13 *
F(12g/kg)	8	0.66 ± 0.12 *
T(1g/kg)	8	0.63 ± 0.03 *

注 与阴性对照组比较, * $P < 0.001$

讨 论

DNA 和 RNA 是细胞繁殖和遗传的物质基础,起着遗传信息贮存、自我复制和控制蛋白质合成的重要作用。如果 DNA 和 RNA 的合成受到抑制或破坏,必然会直接影响到细胞的增殖。在细胞的增殖周期中, G_1 期即 DNA 合成前期,此间合成 RNA、蛋白质和所需前体物质。S 期即 DNA 合成期,是细胞增殖周期的关键阶段,此间将进行 DNA 遗传物质的复制,以及合成组蛋白等重要物质,DNA 含量增加 1 倍,继而进入 G_2 期即 DNA 合成后期,它为 M 分裂期作准备。肿瘤细胞有很强的增殖能力,主要体现在 S 期的 DNA 的合成活跃、复制旺盛。

流式细胞技术是现代国际较新的技术,它能快速、准确、简便地分析细胞周期各时相的分布,已成为肿瘤的早期诊断、临床治疗方案设计、监测肿瘤预后、探索抗肿瘤药物作用的机理等最重要的一项技术⁽³⁾。国内已有一些学者应用此项技术分析一些抗肿瘤中药对肿瘤细胞增殖周期所产生的不同作用⁽⁴⁾,但复方的体内实验研究报道尚不多见。本实验是在证实 FY 确有较高的抑瘤率和小鼠生命延长率的同时,应用流式细胞技术分析其抗肿瘤机理。

端粒是位于人类线性染色体末端的重复 DNA 序列,其作用是保护染色体末端不被降解,防止染色体相互融合、重组,从而保证了细胞的正常分化与繁殖⁽⁵⁾。但细胞在增殖过程中要不断地丢失端粒,当端粒长度缩短到某一特定长度时,细胞则会停止增殖而出现衰老。肿瘤细胞的增殖与正常细胞相比异常快速,因而端粒的丢失也就更快,为了维持染色体末端的稳定,此时便激活了端粒酶。端粒酶是一种由 RNA 和蛋白质组成的核糖核蛋白酶,能以自身的 RNA 组分为模板从头合成端粒以补偿细胞分裂时染色体末端(端粒)的缩短⁽⁶⁾。在大部分正常人细胞中没有端粒酶活力,而肿瘤细胞中端粒酶却特异性地表达。因此,端粒酶活性是可靠的肿瘤标记和肿瘤细胞的增殖指标⁽⁷⁾,抑制端粒酶的活性则能达到抑制肿瘤细胞增殖速度的目的。

从实验结果可以看出,FY 对肿瘤细胞的抑制靶点是在 DNA 合成的 S 期,对处于 S 期的肿瘤细胞有抑制作用, G_1 向 S 进程的肿瘤细胞 DNA 合成和复制受到阻抑,造成了 $G_{0/1}$ 期细胞的大量堆积,S 期细胞的比率下降,从而使得肿瘤细胞的增殖速度减慢。同时各治疗组的端粒酶活性值均低于阴性对照组,尤以 FY 大组的抑制作用明显,说明肿瘤细胞的端粒酶活

性被抑制是影响上述肿瘤细胞增殖周期进程的机理之一。本实验结果揭示了 FY 抗肿瘤作用的部分细胞分子机制。

参 考 文 献

1. 李四强, 赵健雄, 朱玉真, 等. 扶正抑瘤汤抗肿瘤作用的实验研究. 中华实用中西医杂志 2001 ;(14):1060—1061.
2. 徐叔云, 卞如廉, 陈 修. 药理实验方法学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991:11.
3. Seckinger D. DNA content in human cancer. Arch pathol lab Med 1989 ;113:619.

4. 谢锦玉, 高玉民, 沈联慈, 等. 流式细胞术分析大蒜油对癌细胞 DNA 合成及细胞周期的影响. 中国中西医结合杂志 1992 ;12(2):92—94.
5. Kim N W, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 1994 ;266:2011—2015.
6. Chong L, Steensel B, Broccoli D, et al. A human telomeric protein. Science 1995 ;270:1663—1670.
7. McEachern MJ, Blackburn EH. Runaway telomere elongation caused by telomerase RNA gene mutations. Nature 1995 ;376:403—409.

(收稿 2001-01-08 修回 2001-07-30)

新癢片辅助治疗环杓关节炎 60 例

谭建国 李裕华 罗登凡

1998 年 9 月~2000 年 9 月, 我们应用新癢片辅助抗生素、激素治疗环杓关节炎 60 例, 并设 30 例对照组进行临床观察, 取得较好疗效, 现报告如下。

资料和方法

1 诊断标准 参考《喉科学》(吴学愚主编. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2000:192—194,) (1) 症状: 喉部异物堵塞感、声嘶、喉痛, 吞咽和发声时疼痛加重, 可放射至耳部。部分患者伴有全身其他关节疼痛史。(2) 检查: 喉镜下可见两侧或一侧杓状软骨区粘膜红肿或灰白色微肿胀、触痛。声带内收或外展活动略受限, 少数患者甲状软骨上角及前方有压痛。

2 临床资料 符合以上标准确诊患者 90 例, 按就诊顺序随机(2:1)分为两组, 治疗组 60 例, 男 15 例, 女 45 例; 年龄 24~68 岁, 平均 47 岁; 病程 3~35 天, 平均 12 天。对照组 30 例, 男 8 例, 女 22 例; 年龄 26~66 岁, 平均 46 岁; 病程 3~32 天, 平均 11 天。两组资料比较, 差异无显著性($P>0.05$)。

3 治疗方法 治疗组和对照组, 均采用阿莫西林 0.25g, 每天 3 次口服, 连服 5 天。强的松 15mg, 每天 3 次, 连服 3 天后减量至 10mg, 每天 3 次, 连服 3 天后逐渐减量至 5mg, 每天 1 次维持。治疗组共服强的松 10 天, 对照组共服 20 天停药。治疗组在上述服药基础上加用新癢片(每片含生药 1.01g, 厦门中药厂生产), 每次 3 片, 每天 3 次, 饭后口服或含服。对照组加用抗风湿类药(蔡丁美酮 1g, 每天 1 次或芬尼康 1 片, 每天 3 次, 饭后服)。两组均观察 20 天, 均于与治疗结束后第 7 天进行复查, 以症状与体征消退情况判定疗效。

4 血沉及类风湿因子检测 治疗组 30 例, 对照组 15 例, 治疗前、后分别检测血沉(魏氏法)和血清类风湿因子(乳胶凝集试验, 试剂为德国生产)。

5 统计学方法 采用 χ^2 检验和 t 检验。

结 果

1 疗效评定标准 痊愈: 喉部异物堵塞感、声嘶、喉痛、咽喉不适等症状全部消失, 喉部检查无异常体征。好转: 喉部异

物堵塞感及喉痛轻微, 发音及吞咽正常, 杓状软骨区粘膜仅轻微肿胀, 声带活动度闭合均正常。无效: 症状、体征无改变。

2 两组疗效比较 治疗组 60 例, 痊愈 39 例, 好转 16 例, 无效 5 例, 总有效率 91.7%。对照组 30 例, 痊愈 13 例, 好转 14 例, 无效 3 例, 总有效率 90.0%, 两组总有效率比较, 差异无显著性($P>0.05$), 但治疗组基本痊愈率明显高于对照组, 差异有显著性($P<0.05$)。

3 两组治疗前后血沉和血清类风湿因子检测比较 血沉 $\geq 30\text{mm/h}$ 者, 治疗组治疗前 8 例, 治疗后 0 例; 对照组治疗前 4 例, 治疗后 0 例。血清类风湿因子阳性者, 治疗组治疗前 7 例, 治疗后 4 例; 对照组治疗前 3 例, 治疗后 2 例。两组比较差异无显著性($P>0.05$)。

4 复发率 对两组痊愈患者均作了为期 6 个月以上的随访观察。治疗组 39 例, 复发 3 例(7.7%)。对照组 13 例, 复发 6 例(46.2%)。两组复发率比较, 差异有显著性($P<0.01$)。

5 副反应 治疗组有 11 例用药 10~12 天出现轻度恶心、胃不适反应, 2~3 天后自行消退, 余未发现其他不良反应。对照组有 19 例用药 5~7 天出现恶心、呕吐、腹痛等胃肠道不适反应, 8 例需对症治疗得以缓解。

讨 论 环杓关节炎与风湿及类风湿性关节炎、感染、创伤等因素有关(吴学愚主编. 喉科学. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社出版, 2000:192—194)。临床上常用抗生素、激素、抗风湿类药物及理疗等治疗。

环杓关节炎属中医学“痹证”中的“热痹”范围。环杓关节固涩不利, 局部充血红肿, 致声门开合不良, 发声功能障碍。治宜清热利湿, 疏风通络, 治利关节而开音(周继福主编. 实用嗓音病治疗学全书. 北京: 学术书刊出版社, 1990:297)。

新癢片由九节茶、三七、牛黄、珍珠层粉等药组成。九节茶又名肿节风, 性苦、平, 有清热祛风、活血散瘀作用。三七有疏通经络气血, 祛瘀消肿止痛, 消除关节僵硬; 牛黄有清热解毒、镇静之功效; 珍珠层粉性甘、咸、寒, 能平肝清热、安神定痛。诸药配伍有清热祛风利湿、抑菌消炎、活血消肿止痛之功效。

(收稿 2001-04-11 修回 2001-07-12)