

· 综 述 ·

中药体外抗肿瘤效应血清药理学研究现状与前景

韩克起 凌昌全

体外抗肿瘤的实验方法是中药抗肿瘤机理研究的重要方法之一,但对于抗肿瘤中药及其复方来说,因粗制品含有大量杂质,如直接加入离体反应系统,其渗透压、pH 值、糖质、无机盐离子等非特异性理化因素将会严重干扰实验的结果,科学性差,难以反映药效的真实性。80 年代中期日本学者 Iwama H 等率先提出了“血清药理学方法”,它是将中药或复方经口给动物灌服一定时间后,采集动物血液,分离血清,用含药物成分的血清进行体外实验^[1]。这一方法实现了体外与体内实验较为理想的结合,不仅反映了药物中可吸收部位的直接作用,而且能反映药物成分在机体作用下所形成的代谢产物和药物诱生的机体内源性物质(如激素、干扰素、补体等)的间接效应^[2]。继王力倩等^[3]1995 年在国内采用中药血清药理学的方法研究苦参、仙鹤草的抗肿瘤作用的报道之后,近年来该方法广泛用于中药抗肿瘤药理研究,研究范围已涉及细胞、亚细胞、基因及基因产物、受体和酶活性等方面,本文就血清药理学方法用于中药抗肿瘤药理研究的现状、存在问题、应用前景综述如下。

1 研究现状 中药血清药理学方法在抗肿瘤生物学效应研究的文献报道,已涉及到肿瘤细胞的增殖与细胞周期的调节、肿瘤细胞凋亡的诱导及分化、肿瘤相关基因表达的调控及端粒酶活性的调节等方面。

在抑制肿瘤细胞增殖及细胞周期调节方面的研究相对较多,如刘胜等^[4]用 MTT 法体外观察温肾活血方含药血清对乳腺癌细胞株 MFC-7 增殖的影响,结果表明,温肾活血中药血清在培养液中浓度为 10%、20%、30% 时,对 MFC-7 体外生长抑制率分别达 22.7%、33.1%、37.4%;FCM 测定细胞周期,结果 G₀/G₁ 期细胞比率提高, S 期细胞降低,细胞的增殖指数(PI)降低。熊鹰等^[5]用中药犀黄丸含药血清对人肝癌细胞系(BEL-7402)共同孵育不同时间后,应用倒置相差显微镜、荧光显微镜观察肿瘤细胞的生长状况和药物作用后细胞核形态变化,发现含药血清作用 24~72h 后,人肝癌细胞体积缩小,部分细胞核破裂,呈大

小不等,形态不规则的荧光染色碎片或梅花状核型。殷飞等^[6]观察到肝 口服液含药血清对转化生长因子 α(TGFα)诱导 SMMC-7721 细胞增殖有抑制作用,24h 抑制率 25%,48h 抑制率为 30%;中药血清作用 24h 对 1μg·L⁻¹TGFα 诱导 SMMC-7721 细胞增殖率为 12.3%;48h 抑制率达 16%;中药血清作用 24h 对 5μg·L⁻¹TGFα 诱导 SMMC-7721 细胞增殖率为 8.0%;48h 抑制率达 17.2%;结果表明中药血清对细胞增殖效应呈时间依赖性。石世得等^[7]用参桃软肝丸含药血清处理人肝癌细胞系 bcl-7402、SMMC-7721 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,结果显示:含药血清显著抑制两种细胞增殖,且呈现血清浓度依赖性,同时能显著增强 LAK 活性。张侠等^[8]用血清药理学方法研究益肾健脾活血法(人参、附子、黄芪、莪术、白术、青皮、白芍等)含药血清对 BEL-7402 细胞增殖有抑制作用,最高抑制率达 57.5%,且相同时间点高剂量组抑制率高于低剂量组,相同剂量组长时间点高于短时间点。贾正平等^[9]研究了瑞香狼毒水提物小鼠药物血清对小鼠白血病 L1201 细胞增殖,克隆形成及 DNA 合成均有抑制作用。

细胞凋亡是生理或病理条件下,在受体介导过程中诱导且在生长调节信号的控制下发生的单细胞死亡,通过抑制每个癌细胞的生长的一种先天性抗癌机制^[10]。王昌俊等^[11]研究了中药复方 960 的含药血清对人肝癌细胞凋亡有诱导作用,见肿瘤细胞皱缩、深染、荧光染色(AO)后细胞呈致密浓集的黄绿色荧光;DNA 电泳见典型的“梯形带”;DNA 直方图上见典型凋亡峰(0.95%~27.77%),标记率为 64.12%~70.02%。杨勤建等^[12]对 892 号中药诱导人肝癌细胞凋亡进行了初步研究,发现人肝癌细胞株 bcl-7402 经含中药血清孵育处理后,由贴壁生长逐渐脱落,外形变圆,体积缩小,折光性增强,荧光显微镜下见细胞核破碎,裂解为大小不等的凋亡小体。李秀荣等^[13]采用消瘤平移合剂的含药血清对肝癌细胞株 H-7402 有诱导凋亡作用,显微镜下见典型的凋亡形态学改变,流式细胞仪检测可见亚 G₁ 峰,凋亡呈含药血清浓度、时间依赖性的特点,对照组及 5%、10% 含药血清作用 24h,其凋亡率分别为 0.49%、5.58%、8.46%。药物血清对

人肝癌细胞系(bcl-7402)的凋亡情况,应用透射电子显微镜观察到肝癌细胞染色质固缩,凝结成块,聚集在核膜周边呈新月状或肾状,且凋亡细胞数随血清浓度增加和作用时间延长而增多,而对照组无上述改变。周建锋等^[14]研究了不同治则的中药血清对 SMMC-7721 人肝癌细胞有诱导分化作用,结果表明:益气养阴、温阳养阴、补肾养阴 3 种治法均具有诱导肝癌细胞分化的作用。黎丹戎等^[15]研究发现金蒲抑瘤片含药血清对 BEL-7402 细胞有诱导凋亡作用,表现为肿瘤细胞荧光染色增强,胞核碎裂,凋亡小体形成等形态学变化。

抗肿瘤中药的含药血清对于调控肿瘤细胞基因表达及端粒酶活性研究报道近年有增多趋势。如李秀荣等^[13]采用消瘤平移合剂的含药血清对肝癌细胞 H-7402 细胞有下调其 bcl-2 基因的作用。徐力等^[16]观察三物白散加味方对胃癌相关基因表达的影响,用三物白散加味方含药血清加入人胃癌 SGC-7901 细胞,观察 p53、bcl-2、P21Ras、CD44 基因表达的变化,结果表明该方可降低胃癌 SGC-7901 细胞 p53、bcl-2、P21Ras、CD44 基因表达率。王昌俊等^[17]用复方 AC960 中药血清观察人肝癌细胞系 SMMC-7721 的 p53、bcl-2、P21Ras 基因均有不同程度的表达,经 AC960 处理后, p53 基因表达增强, bcl-2、P21Ras 基因表达下降。殷飞等^[6]用免疫组化法分别观察肝 口服液含药正常和病理血清 TGF α 诱导 SMMC-7721 细胞外调节蛋白激酶(ERK)蛋白的表达,结果表明,中药血清能抑制 ERK 蛋白在细胞核中的表达,且正常含药血清和病理含药血清相比差异显著。郭伟剑等^[18]采取免疫组化法观察健脾理气中药血清对 SMMC-7721 肝癌细胞 p53、P21WAF1/CIP1mRNA 及蛋白的表达有下调作用。孟志强等^[19]采用端粒重复序列扩增(TRAP)结合非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染法观察该方含药血清对 SMMC-7721 细胞端粒酶活性的影响,发现中药血清第 4 天开始对肿瘤细胞端粒酶活性有抑制作用。此外,抗纤灵^[20]药物血清也有上调人肝癌细胞(HepG2)的 P21WAF1/CIP1 蛋白表达的作用。

2 存在问题

2.1 含药血清的供体动物与肿瘤细胞供体动物非同种属性。中药抗肿瘤效应的血清药理学研究文献中,几乎均选用大鼠、兔等正常动物来制备含药血清。但因动物种属不同、血清成分就不同。用异种动物的正常血清加入异种肿瘤细胞,可能会因免疫反应而影响实验效果。肿瘤实验研究中使用的瘤株分为自发性建系的瘤株和诱发建系的瘤株。瘤株在传代过程中,都有其固定的宿主,进行体外药理学实验时,若改变动

物的品系,则会使瘤株的生长特性、恶性行为发生系列改变而影响实验的效果。如观察健脾理气中药血清对 SMMC-7721 肝癌细胞 p53、P21WAF1/CIP1mRNA 及端粒酶活性影响的实验时使用大鼠血清比兔血清更好,因为 SMMC-7721 建系是经大鼠皮下接种成功的,这一点尚未引起有关研究者的高度重视。

2.2 用正常动物代替病理模型制作药物血清。生理状态下与病理状态下制备的含药血清不同,因为两种状态下的动物对药物的消化吸收功能不同,对药物的生物转化不同,尤其是在药物的作用下机体的反应不同,产生的内生性有效成分也不同。近年来,随着临床药理研究的逐步深入,通过多项对比研究发现,不同生理、病理条件下,不同个体对同一种药物的药代动力学参数具有不同的特点,药效是机体与药物相互作用的直接结果。如目前中药血清抗肿瘤的研究文献中,绝大多数采用的是正常动物的血清。中医药治病是针对机体的病理状态,中药进入体内后,有效成分发生变化,它不仅作用于局部,而且可以作用于多部位,多系统,通过多种途径作用于病变部位。由于机体的状态不同,血液中的物质就可能存在差别,因此研究病理状态下含药血清的作用,结果才更加真实可信。如有人用消 口服液正常含药血清和病理含药血清,观察对 TGF α 诱导 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用,结果表明两者之间存在显著差异^[6]。然而近 3 年公开发表的通过含药血清方法研究中药抗肿瘤作用及机制的文章,除 1 篇采用的是病理模型的药物血清,其余均采取的是正常动物的药物血清。因此,我们认为这是一个值得重视的问题。

2.3 抗肿瘤中药含药血清的灭活处理。供体肿瘤模型的血清中含有多种酶(如超氧化物歧化酶、过氧化物酶、透明质酸酶等),各种抗体、补体及其他生理活性物质(如白介素-2、肿瘤坏死因子- α 、干扰素等细胞因子)等,它们包括模型动物本身产生的,或药物刺激所产生的,它们对体外培养的肿瘤细胞有杀伤或抑制作用,或许正是药物的抗肿瘤作用所在。再者,一些抗肿瘤中药中常含有多糖及氨基酸等成分,在体外抗肿瘤实验中属药物的有效成分,如黄芪中的黄芪多糖、人参中的人参皂甙等。一旦进行血清灭活处理后,这些物质在数量上或功能上可能会降低抗肿瘤疗效,不能如实地反映中药的抗肿瘤效应。鉴于目前含药血清中的有效成分的定量分析检测尚存在一定困难,不同生理、病理及证型条件下的血清中所含的代谢产物及有效成分多属未知。因此,我们认为抗肿瘤中药的含药血清还是以不灭活处理为好。但在中药血清药理学方

法研究中药抗肿瘤机理的相关文献中,采用未灭活的含药血清进行实验的文献还不足 20%。

2.4 抗肿瘤中药造模时给药次数和时间给药方案的研究,既是中药血清药理学研究方法的规范化技术指标,又是体现其在制定中药复方临床给药方案研究中的实用价值。在制备中药抗肿瘤含药血清过程中,目前存在着多种给药方法,文献报告中给药时间最短为 1 天,最长为 10 天,给药次数也各不相同,有每天给药 2 次的,也有每天给药 3 次的^[3 21]。尽管已有研究表明,连续用药 5 天和 10 天,制备的含药血清的生物学效应是相似的^[13]。但这不等于说造模时给药次数和时间可以千篇一律或不予重视。每种药物在体内的代谢过程都不一样,如阿霉素静脉注射后迅速分布于各组织,血浆清除曲线呈三相曲线,分别代表分布、代谢和药物从结合部位的释放,半衰期分别为 8~25min, 1.5~10h, 24~48h。而 VP-16 的血浆峰浓度为 20 μ mol/L,血浆 t(1/2)分别为 α 30min、 β 230min、 γ 1 600min。中药血清浓度虽不像化学药物那样精确可测,但它发挥作用的起始和持续时间必然有各自的特点和规律,因此,利用每一种药物做血清药理实验前必须反复摸索给药次数和时间,不能模仿其他药物。

3 应用前景 抗肿瘤中药血清药理学通过有效成分在血中的动态变化、相互作用及药效的相互关系,较好地反映了抗肿瘤复方的配伍原则和药物的量效关系,在一定程度上可以揭示抗肿瘤中药活性成分的体内转化,为抗肿瘤复方中药的动力学研究奠定基础,尤其在目前含药血清中的有效成分的定量分析检测尚未见突破性的进展情况下,中药血清药理学方法仍不失为抗肿瘤复方研究的一条行之有效的途径。

参 考 文 献

- 1 Iwama H. Effect of Shosaikoto, a Japanese and Chinese traditional herbal medicinal mixture, on the mitogenic activity of lipopolysaccharide: A new pharmacology testing method. J Ethnopharmacol 1987; 211:45.
- 2 王宁生,雷燕,刘平.关于中药血清学的若干思考.中国中西医结合杂志 1999; 19(5):263—266.
- 3 王力倩,余上才,李仪奎等.用中药血清药理学的方法观察苦参、仙鹤草的抗肿瘤作用.中国中医药科技 1995; 2(5):19—21.
- 4 刘胜,吴雪卿,陆德铭等.温肾活血中药对乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞株体内外生长的影响.中国中医基础医学杂志 2001; 7(1):54—57.
- 5 熊鹰,孔小云,陈如山等.中药犀黄丸(含药血清)对人肝

癌细胞凋亡影响的形态学研究.临床消化病杂志 2001; 13(2):82—84.

- 6 殷飞,姚树坤,吴新满等.肝症口服液含药血清对 TGF α 诱导 SMMC-7721 细胞增殖和 ERK 蛋白的影响.世界华人消化杂志 1999; 7(9):1017—1020.
- 7 石世得,杨太成,李任先等.参桃软肝丸抑制人肝癌细胞增殖及增强 LAK 抑瘤活性的实验研究.中西医结合肝病杂志 2001; 11(1):30—32.
- 8 张侠,陈信义,王沛.血清药理学方法研究益肾健脾活血法对 BEL-7402 细胞增殖抑制作用.实用肿瘤学杂志 1999; 14(2):87—89.
- 9 贾正平,樊俊杰,王彦广等.瑞香狼毒水提物小鼠药物血清对小鼠白血病 L1201 细胞增殖、克隆形成及 DNA 合成的影响.中草药 2001; 32(9):807—809.
- 10 Goldsworthy TL, Gonolly RB, Fransson-Steen R. Apoptosis and cancer risk assessment. Mutat Res 1996; 365:71—74.
- 11 王昌俊.扶正抗癌方药物血清对人肝癌细胞增殖的影响.中西医结合肝病杂志 1997; 7(4):214—215.
- 12 杨勤建,涂晋文.892 号人诱导人肝癌细胞凋亡的初步研究.中西医结合肝病杂志 1998; 8(3):159—160.
- 13 李秀荣,张丹,齐元富等.消瘤平移合剂含药血清对肝癌细胞 H-7402 细胞凋亡的实验研究.中国中西医结合杂志 2001; 21(9):684—687.
- 14 周建锋,刘平,刘成海等.不同治则中药诱导 SMMC-7721 人肝癌细胞分化的研究.中西医结合肝病杂志 2001; 11(1):30—32.
- 15 黎丹戎,刘宗河,侯华新等.金蒲抑瘤片诱导体外培养的人肝癌 BEL-7402 细胞凋亡的实验研究.中国临床药理学杂志 2002; 11(4):213—215.
- 16 徐力,王明艳,许冬青等.三物白散加味方影响胃癌相关基因表达的实验研究.南京中医药大学学报(自然科学版) 2002; 18(3):158—160.
- 17 王昌俊,陈伟,钱伯文.中药复方 AC960 对人肝癌细胞 P21Ras, bcl-2, p53 基因表达调控作用的研究.中国中医药科技 2000; 7(1):10—12.
- 18 郭伟剑,于尔辛,郑颂国等.健脾理气药诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡的研究.世界华人消化杂志 2000; 8(1):52—55.
- 19 孟志强,郭伟剑,于尔辛等.健脾理气方药物血清对肝癌细胞端粒酶活性及凋亡的影响.世界华人消化杂志 2000; 8(8):879—882.
- 20 朱梅菊,郭振球,张红.抗纤灵药物血清对人肝癌细胞体外生长的抑制及机理研究.中国中医药信息杂志 2001; 8(3):23—24.
- 21 程珠炉,洪浩.中药血清药理学研究方法的几点思考.安徽中医学院学报 2001; 20(2):53—54.

(收稿 2003-03-26 修回 2003-06-18)