

参芪扶正注射液对荷 S₁₈₀ 小鼠肿瘤细胞凋亡的影响

丁治国¹, 史晓光¹, 李兰芳², 汪唐顺¹, 陈振宙¹, 张建松¹, 叶广铎¹, 李乃卿^{1*}

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 探讨参芪扶正注射液对荷 S₁₈₀ 小鼠肿瘤细胞凋亡的影响。方法: 将 23 只荷瘤小鼠随机分成 4 组, 分别为对照组、参芪扶正注射液高剂量组(8 g·kg⁻¹组)、中剂量组(4 g·kg⁻¹组)及低剂量组(2 g·kg⁻¹组)。对照组给予生理盐水, ip, 1 次/d, 其他 3 组 ip 给予不同剂量的参芪扶正注射液。14 d 后处死小鼠, 采集体重、肿瘤重量数据, 流式细胞仪检测肿瘤细胞凋亡率和细胞周期。结果: 参芪扶正注射液各剂量组肿瘤重量皆低于对照组, 但仅中剂量组与对照组的差异有统计学意义($P < 0.05$); 各剂量组肿瘤细胞凋亡率皆显著高于对照组($P < 0.05 \sim P < 0.01$); 各剂量组细胞周期与对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 参芪扶正注射液单独应用可以通过促进肿瘤细胞的凋亡而发挥抑制肿瘤的作用。

[关键词] 参芪扶正注射液; S₁₈₀ 细胞; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)10-0037-02

我们既往的研究^[1]证实: 参芪扶正注射液单药应用可以通过上调肿瘤的凋亡相关基因(如 PUMA 基因)而发挥抗肿瘤作用。本研究采用流式细胞仪检测技术, 分析参芪扶正注射液对小鼠在体肿瘤生长、肿瘤细胞凋亡率和细胞周期的影响, 观察凋亡基因的变化在细胞水平的表现情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 BALB/C 小鼠 23 只, SPF 级, 雄性 12 只, 雌性 11 只, 体重 18-20g, 由中国医学科学院实验动物研究所提供。合格证: SCXK(京)2004-0001。实验动物使用许可证: SYXK(京)2004-0009。

1.1.2 瘤株 S₁₈₀ 细胞株, 中国中医科学院中药研究所提供。

1.1.3 主要药物 参芪扶正注射液, 药物来源: 丽珠集团利民制药厂(批号: 071001), 规格 10 mL/支, 1 生药 g·mL⁻¹。

1.1.4 主要试剂 RNase A 核糖核酸酶(Sigmar 4875), PI(Sigmar 4170)。

1.1.5 仪器及软件 美国 BD 公司 FACSCalibur 流式细胞仪, The SAS System for Windows v6.12 软件,

ModFitLT 软件。

1.2 方法

1.2.1 肿瘤细胞悬液的制备 取生长良好的 S₁₈₀ 传代小鼠, 无菌条件下抽取小鼠腹水液, 用生理盐水将腹水液稀释, 1 500 r·min⁻¹ 5 min, 反复 2 次, 然后将细胞吹散至单个细胞, 在显微镜下将细胞调至 1×10^6 /mL。

1.2.2 分组及给药方法 将 BALB/C 小鼠 23 只按体重随机共分为 4 组, 分别为①荷瘤对照组(简称对照组), 小鼠 8 只 ip 无菌生理盐水 0.02 mL·g⁻¹; ②参芪扶正注射液高剂量组(生药 8 g·kg⁻¹, 相当于临床人用药量 2 倍), 小鼠 5 只; ③参芪扶正注射液中剂量组生药 4 g·kg⁻¹组, 小鼠 5 只; ④参芪扶正注射液低剂量组生药 2 g·kg⁻¹组, 小鼠 5 只。参芪扶正注射液高、中、低剂量各组分别取参芪扶正注射液 4, 2, 1 mL, 各加无菌生理盐水稀释至 10 mL, 混匀, 皆按照 0.02 mL·g⁻¹ ip 给药, 1 次/d, 连续注射 14 d。

1.2.3 实验操作 于第 3 次注射药物后 12 h, 右腋部皮肤常规消毒, 皮下接种 S₁₈₀ 瘤细胞液 0.2 mL/只。末次给药后 24 h, 将小鼠称重, 脱颈处死, 立即进行解剖, 取出肿瘤, 吸去血液, 去除脂肪、筋膜, 用电子天平称取其湿重, 按下列公式计算肿瘤指数及抑瘤率:

肿瘤指数(%) = 肿瘤重量/体重 × 100%;

抑瘤率(%) = (对照组瘤重 - 实验组瘤重)/对照组瘤重 × 100%

[收稿日期] 2008-05-26

[基金项目] 教育部产学研综合项目基金(2006D90504018)

[通讯作者] * 李乃卿, Tel: (010) 84013403; E-mail: 13301119560@163.com

1.2.4 肿瘤细胞凋亡及细胞周期检测 获得肿瘤标本后,立即4℃下充分匀浆,200目筛网过筛后,使用冰冻保存的70%乙醇溶液固定,按照Sigmar公司操作流程加入试剂,使用美国BD公司FACSCalibur流式细胞仪上机检测。

1.2.5 统计学方法 各组均数用($\bar{x} \pm s$)表示,采用The SAS System for Windows v6.12进行统计处理,多组均数比较用方差分析及LSD-*t*检验。

2 结果

2.1 对荷瘤小鼠体重的影响 分组时各组小鼠体重无显著差异($P > 0.05$),具有可比性;给药组与荷瘤对照组比较:减去肿瘤重量后各剂量组小鼠体重与对照组无显著性差异($P > 0.05$)见表1。

表1 参芪扶正注射液对荷瘤小鼠体重的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	<i>n</i>	分组时 体重(g)	第14天去瘤 后体重(g)
荷瘤对照组	—	8	19.08 ± 0.97	17.50 ± 1.24
参芪扶正注射液组	8	5	19.54 ± 1.51	16.60 ± 1.44
	4	5	19.16 ± 0.40	17.02 ± 0.80
	2	5	18.96 ± 0.74	18.33 ± 0.93

2.2 对荷瘤小鼠肿瘤重量及抑瘤率的影响 各给药组肿瘤重量皆低于荷瘤对照组,但仅4g·kg⁻¹组与荷瘤对照组的差异有统计学意义($P < 0.05$);肿瘤指数与荷瘤对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)见表2。

表2 参芪扶正注射液对荷瘤小鼠肿瘤重量及抑瘤率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	<i>n</i>	肿瘤重量 (g)	肿瘤指数 (%)	抑瘤率 (%)
荷瘤对照组	—	8	0.83 ± 0.28	4.54 ± 1.65	—
参芪扶正注射液组	8	5	0.70 ± 0.19	4.05 ± 1.20	15.7
	4	5	0.47 ± 0.16 ¹⁾	2.72 ± 0.97	43.4
	2	5	0.55 ± 0.26	2.89 ± 1.37	33.7

注:与荷瘤对照组比较:¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (下同)

2.3 对荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡及细胞周期的影响 参芪扶正注射液各剂量组肿瘤细胞凋亡率皆高于对照组($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。各剂量组细胞周期与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表3。

3 讨论

我们的研究表明:给药14d后,使用不同剂量参芪扶正注射液的荷瘤小鼠去瘤后体重保持基本一致,而各实验组的肿瘤重量皆有下降,其中尤以相当

表3 参芪扶正注射液对荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡及细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	<i>n</i>	凋亡率 (%)	G0-G1期 (%)	S期 (%)
荷瘤对照组	—	8	40.87 ± 11.44	65.49 ± 15.61	9.36 ± 6.75
参芪扶正注射液组	8	5	51.61 ± 6.79 ¹⁾	58.69 ± 13.49	4.06 ± 9.09
	4	5	52.28 ± 6.82 ¹⁾	59.91 ± 7.58	12.92 ± 11.94
	2	5	56.77 ± 2.49 ²⁾	58.11 ± 7.78	0.68 ± 1.53

于临床人用药量的中剂量组(4g·kg⁻¹组)的肿瘤重量下降显著,抑瘤率达到了43.4%,提示单独应用参芪扶正注射液也可产生抑制肿瘤的作用,但由于对对照组瘤重平均值低于1g,并且各组实验例数偏少,有待于今后通过大样本重复实验加以验证。

临床常用的抗肿瘤药物和放射治疗方法可以通过多种机制清除肿瘤细胞,但越来越多的证据表明凋亡在其中扮演了中心性角色^[2~3]。我们的研究表明:不同剂量的参芪扶正注射液皆可显著促进肿瘤细胞的凋亡,这符合我们既往研究的发现,即参芪扶正注射液可以上调重要的凋亡促进基因,从而促进了肿瘤细胞的凋亡。但我们同时发现在细胞周期方面,使用参芪扶正注射液后各细胞周期的变化并不规律,虽然高剂量(8g·kg⁻¹组)和低剂量组(2g·kg⁻¹组)处于DNA复制期的肿瘤细胞较对照组明显下降,但差异却无统计学意义,甚至中剂量组(4g·kg⁻¹组)处于DNA复制期的肿瘤细胞较对照组上升,该现象可能是由于实验例数较少导致较大偏移所致,有待于今后研究补充证实。

总之,本研究明确了参芪扶正注射液单独应用可以通过促进肿瘤细胞的凋亡而发挥抑制肿瘤的作用,该研究结果与我们既往的基因芯片研究结果相符。

[参考文献]

- [1] 丁治国,李乃卿,陶德胜,等.参芪扶正注射液对小鼠肝转移癌组织基因表达谱的影响[J].中国中西医结合杂志,2008,15(2):135-138.
- [2] Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy[J]. Cell, 2002, 108(2):153-164.
- [3] Cory S, Adams JM. The bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(9):647-656.