

片仔癀体外抗肿瘤作用研究

郭珮蕾, 刘吉华, 余伯阳*

中国药科大学 中药复方研究室, 江苏 南京 211198

摘要: 目的 研究片仔癀对体外肿瘤细胞增殖的影响, 以及对鸡胚尿囊膜血管生成的抑制作用。方法 采用 MTT 法检测片仔癀对体外培养肿瘤细胞 (肝癌 SMMC-7721 细胞、胃癌 SGC-7901 细胞、宫颈癌 HeLa 细胞) 的抗肿瘤作用; 以鸡胚尿囊膜血管生成 (CAM) 实验, 研究片仔癀对新生血管生成的抑制作用。结果 片仔癀在 0.2~1.0 mg/mL 对各种肿瘤细胞的增殖有显著抑制作用, 1.0 mg/mL 片仔癀对肝癌细胞增殖抑制率达到 81.55%; 片仔癀在 0.1~1 000 $\mu\text{g/mL}$ 对鸡胚尿囊膜血管生成有显著抑制作用, 给药鸡胚的新生血管数减少, 血管变细, 其中 10 $\mu\text{g/mL}$ 抑制率最高, 一级血管抑制率为 61.1%, 二级血管抑制率为 59.1%。结论 在实验给药浓度下, 片仔癀对受试肿瘤细胞的增殖具有较强抑制作用, 对鸡胚尿囊膜血管生成有显著抑制作用。

关键词: 片仔癀; 抗肿瘤; 抑制血管生成; 鸡胚尿囊膜; MTT 法

中图分类号: R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2011)03-0171-03

Study on antitumor effect of Pien Tze Huang *in vitro*

GUO Pei-lei, LIU Ji-hua, YU Bo-yang

Department of Complex Prescription of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract: Objective To study the effect of Pien Tze Huang (PTH) on tumor proliferation *in vitro* and chorioallantoic membrane (CAM) angiogenesis. **Methods** The effect of PTH on the proliferation of cancer cells (SMMC-7721, SGC-7901, and HeLa) were evaluated by MTT assay. The CAM angiogenesis model was established to determine the inhibitive effect of PTH against angiogenesis. **Results** PTH had significant inhibitive effect on tumor cells proliferation at doses of 0.2—1.0 mg/mL. With the dose of 1.0 mg/mL, the inhibition ratio of PTH was 81.55% on hepatoma carcinoma cell SMMC-7721; PTH significantly affected chick embryonic angiogenesis in doses range of 0.1—1 000 $\mu\text{g/mL}$ and induced a reduction in the capillary plexus of the CAM. The central and secondary capillaries were reduced by 61.1% and 59.1% respectively, at the dose of 10 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusion** PTH showed significant inhibition effect on tumor proliferation and chorioallantoic membrane angiogenesis in the doses of this study.

Key words: Pien Tze Huang (PTH); antitumor; anti-angiogenesis; chicken chorioallantoic membrane; MTT assay

恶性肿瘤是危害人类健康最严重的疾病之一, 且其发病率呈逐年上升趋势。片仔癀是我国传统名贵中成药, 主要由三七、麝香、牛黄、蛇胆等天然药材组成, 具有清热解毒、消肿散结、活血化瘀的显著功效^[1], 广泛用于热毒血瘀所致急慢性病毒性肝炎、痈疽疔疮、无名肿毒及各种炎症的治疗^[1-2]。临床应用显示片仔癀对肿瘤患者具有治疗或辅助治疗的作用, 能够减轻癌症症状, 延长患者生存期^[1,3], 对中晚期肝癌患者缓解症状具有积极作用^[4], 研究表明片仔癀对 CCl_4 引起的肝损害有显著的保护作用^[5], 对骨肉瘤及人结肠癌细胞的生长有显著

抑制作用^[6-8], 但其抗肿瘤作用的机制不详。本研究旨在观察片仔癀体外抗肿瘤活性以及对新生血管的影响, 研究片仔癀抗肿瘤作用并探索其作用机制。

1 材料和方法

1.1 试验药物

片仔癀 (福建漳州片仔癀制药有限公司)。

1.2 细胞株

肝癌细胞 SMMC-7721、胃癌细胞 SGC-7901、宫颈癌细胞 HeLa 购于上海细胞所, 用 10% DMEM 培养基于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 、饱和湿度条件下培养。

收稿日期: 2011-03-02

基金项目: 国家支撑计划项目 (2007BAI36B01), 江苏省“六大人才高峰”资助项目 (第五批次)

作者简介: 郭珮蕾 (1987—), 女, 陕西人, 硕士, 主要从事中药抗肿瘤方向的研究。Tel: 13675151675 E-mail: peier_115@163.com

*通讯作者 余伯阳 Tel: (025)86185157 E-mail: boyangyu59@163.com

1.3 试剂与仪器

DMEM 培养基(GIBCO 公司),小牛血清(NBS, 兰州民海生物工程有限公司),胰蛋白酶(Trypsin, 南京生兴生物技术有限公司),MTT (美国 Sigma 公司),氟尿嘧啶注射液(5-Fu, 天津金耀氨基酸有限公司),环磷酰胺(美国 Sigma 公司)。细胞培养箱(Thermo 公司),细胞培养板(美国 Costar),酶标仪 Sunrise (奥地利 Tecan 公司),倒置显微镜 XSZ-D2 (重庆光学仪器厂),Axiovert 40 CFL 倒置荧光显微镜(德国 ZEISS)。

1.4 方法

1.4.1 片仔癀对体外培养肿瘤细胞的抑制作用 MTT 法^[9]检测,将传代后处于对数增殖期的肿瘤细胞,经 0.25%胰蛋白酶消化,用含 10%小牛血清的 DMEM 培养液制成单细胞悬液,细胞以 1×10^5 /孔的密度接种于 96 孔板,每孔加入细胞悬液 100 μ L,在 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C、饱和湿度条件下培养 24 h 后,每孔加入 100 μ L 质量浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的片仔癀溶液;阳性对照组和空白对照组分别加入 100 μ L/每孔 5-Fu (100 mg/L) 和 DMEM 培养液,每组设 6 个复孔,实验重复 3 次。加药后细胞培养 24 h,然后每孔加入 MTT 溶液 10 μ L,继续培养 3 h 后,加入 150 μ L DMSO 终止。用酶标仪在 570 nm 波长处(参比波长 650 nm)测定吸光度值(A 值),计算抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = 1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{空白组}}$$

1.4.2 片仔癀对鸡胚尿囊膜血管生成的影响^[10]种蛋于 37 $^{\circ}$ C, 55%相对湿度下孵育至第 7 天。无菌条件下在蛋的钝端气室处打一小孔,小心剥去蛋壳,显露出尿囊膜。鸡胚随机分组,每组 10 只,在鸡胚尿囊膜表面远离尿囊膜血管的空白处分别加入质量浓度为 0.1、1、10、100、1 000 μ g/mL 的片仔癀溶液,以环磷酰胺(400 μ g/mL)为阳性对照。继续孵育 48 h 后,暴露加药区尿囊膜,滴加数滴固定液(甲醛-丙酮 1:1),室温固定 20 min 后,剪下鸡胚尿囊膜,于光学显微镜下观察。记数视野内的尿

囊膜血管一级与二级分支数。比较各组血管分支数,作为评价血管密度的指标。

$$\text{抑制率}(\%) = 1 - \text{给药血管数} / \text{空白血管数}$$

1.4.3 统计学处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 片仔癀对肿瘤细胞增殖的影响

片仔癀对肿瘤细胞 SMMC-7721、SGC-7901、HeLa 增殖的影响结果见图 1,在 0.2~1.0 mg/mL,随药物质量浓度的增大,各肿瘤细胞的存活率降低,药物的抑制作用增强,呈浓度依赖性,给药组与对照组比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。片仔癀对 SMMC-7721、SGC-7901、HeLa 肿瘤细胞的 IC₅₀ 分别为 524.29、647.97、598.29 μ g/mL,片仔癀对肝癌细胞 SMMC-7721 增殖的抑制作用较强。阳性对照组 5-Fu 对 SMMC-7721、SGC-7901、HeLa 肿瘤细胞的增殖抑制分别为 42.01%、52.11%、51.91%。

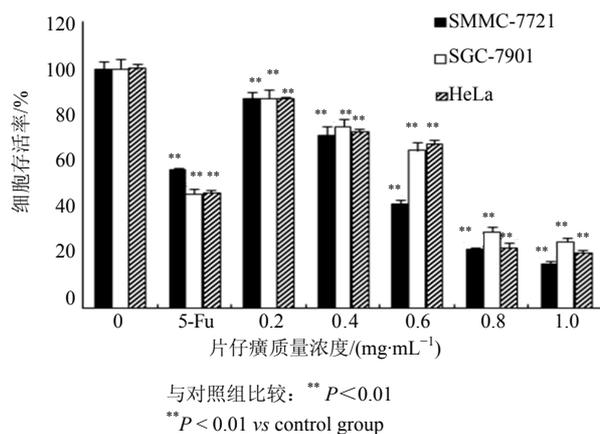


图 1 片仔癀对各肿瘤细胞增殖的影响

Fig. 1 Inhibitive effects of PTH on tumor cells proliferation

2.2 片仔癀对新生血管生成的影响

记录不同浓度片仔癀作用 48 h 后鸡胚尿囊膜的一级血管数、二级血管数。结果显示阴性对照组血管生长良好,呈树枝状分布,分支适中;片仔癀给药组及阳性对照组鸡胚尿囊膜血管数目明显少于对照组,且血管变细,血管形态异常(图 2),CAM

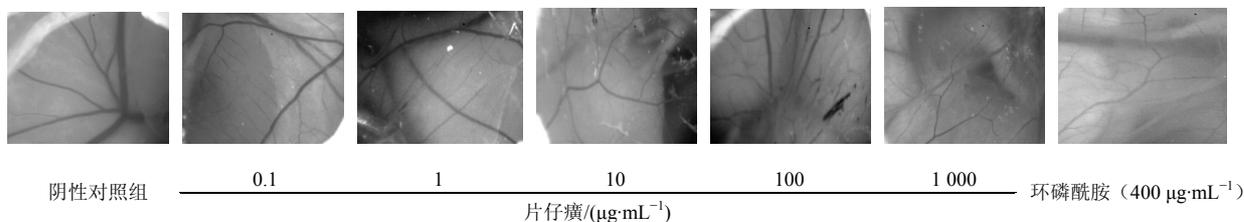


图 2 片仔癀对鸡胚尿囊膜新生血管生成的影响
Fig. 2 Effect of PTH on CAM angiogenesis

新生血管生成受到了不同程度的抑制(表1),且与空白组比较,差异具有统计学意义($P<0.01$)。本实验浓度范围内的抑制率与药物剂量无显著量效关系,给药浓度低于 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,随着药物浓度的升高,其抑制新生血管生成的作用逐渐增强, $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时药物作用最强,对一级血管的抑制率为61.1%,对二级血管的抑制率为59.1%,在100和 $1\ 000\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 给药浓度时,其抑制作用又呈下降趋势(表1)。阳性对照环磷酸胺组对CAM一级血管生成抑制率为63.2%,二级血管生成抑制率为65.4%。

表1 不同浓度片仔癀对血管生成的抑制作用($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Inhibitive effect of PTH on CAM angiogenesis ($\bar{x}\pm s$)

分组	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	一级血管		二级血管	
		血管数	抑制率%	血管数	抑制率%
阴性对照	-	4.11 \pm 0.73	-	4.89 \pm 0.52	-
片仔癀	0.1	2.36 \pm 0.57**	42.6	2.75 \pm 0.42**	43.8
	1	2.00 \pm 0.47**	51.3	2.22 \pm 0.39**	54.6
	10	1.60 \pm 0.50**	61.1	2.00 \pm 0.70**	59.1
	100	2.13 \pm 0.35**	48.2	2.61 \pm 0.43**	46.6
	1 000	2.66 \pm 0.31**	35.3	3.07 \pm 0.62**	37.2
环磷酸胺	400	1.51 \pm 0.42**	63.2	1.69 \pm 0.55**	65.4

与对照组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group

3 讨论

片仔癀是具有400多年历史的传统名贵中成药,其处方、工艺均属国家秘密,其传统功效主要为清热解毒、凉血化瘀、消肿止痛,近年来的临床应用显示片仔癀对肿瘤具有治疗或辅助治疗作用。本研究结果显示, $600\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 片仔癀对SMMC-7721细胞增殖的抑制作用(56.40%)强于 $100\ \text{mg}/\text{L}$ 5-Fu(42.01%)的抑制作用, 800 和 $1\ 000\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 片仔癀对各肿瘤细胞增殖抑制作用均强于阳性对照组,表明片仔癀具有较好的体外抗肿瘤作用。在实验给药浓度下,片仔癀能剂量依赖性地显著抑制体外培养的3种肿瘤细胞的增殖,提示片仔癀的细胞毒作用可能是其抗肿瘤的途径之一。

血管生成抑制剂通过抑制肿瘤血管生长从而起到抗肿瘤作用^[11-13],对片仔癀抑制新生血管生成的

研究结果显示, $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 给药组对鸡胚血管生成的抑制作用与 $400\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 环磷酸胺对照组(63.2%)作用相当,表明片仔癀对鸡胚尿囊膜新生血管生成有显著的抑制作用,提示抑制新生血管生成可能是其发挥抗肿瘤作用的途径之一。但研究中也发现片仔癀浓度与抑制新生血管生成作用不呈浓度依赖性,在实验各剂量组中 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的片仔癀抑制新生血管生成作用最强,对一级血管的抑制率为61.1%,对二级血管的抑制率达到59.1%,其原因尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] 刘丛盛. 片仔癀药理及临床应用综述 [J]. 医药世界, 2006, (7): 64-66.
- [2] 徐武英, 阎庚飞. 片仔癀治疗病毒性肝炎的疗效观察 [J]. 黑龙江医药, 2003, 16(6): 542-543.
- [3] 陈国栋. 片仔癀对肿瘤的阻抑作用 [J]. 健康大视野, 2005, 5: 39.
- [4] 徐益语, 于尔辛. 以片仔癀为主治疗中晚期肝癌42例临床分析 [J]. 上海中医药杂志, 1994, 12: 4-5.
- [5] 洪 绯. 片仔癀对 CCl_4 肝损害的保护作用研究 [J]. 海峡药学, 2004, 16(2): 40-42.
- [6] 张 俐, 于 波, 林建华. 中药片仔癀胶囊对骨肉瘤U-20S细胞诱导凋亡的作用 [J]. 中国骨伤, 2009, 22(4): 265-267.
- [7] 张 俐, 曾启清, 林建华. P27基因联合中药片仔癀对人骨肉瘤抑制作用观察 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(4): 511-515.
- [8] 魏丽慧, 林久茂, 彭 军. 片仔癀对人结肠癌细胞增殖的影响 [J]. 福建中医药, 2010, 41(1): 56-57.
- [9] 司徒振强. 细胞培养 [M]. 北京: 世界图书出版社, 2007.
- [10] Richardson M, Wong D, Lacroix S, et al. Inhibition by doxycycline of angiogenesis in the chicken chorio-allantoic membrane (CAM) [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005, 56(1): 1-9.
- [11] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease [J]. *Nature Med*, 1995, 1(1): 27-31.
- [12] Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis [J]. *N Engl J Med*, 1995, 333(26): 1757-1763.
- [13] Boehm-Viswanathan T. Is angiogenesis inhibition the Holy Grail of cancer therapy? [J] *Curr Opin Oncol*, 2000, 12(1): 89-94.