健脾化瘀复方药物血清对人肝癌细胞 BEL7402 增殖的影响※

□ 王昌俊[1*] 刘友章[2] 许鑫梅[2]

（1. 广东省人民医院 广东 广州 510080 2. 广州中医药大学第一附属医院 广东 广州 510405）

摘 要 目的：观察健脾化瘀复方药物血清对人肝癌 BEL7402 细胞增殖的抑制作用。方法：人（健康志愿者）口服不同剂量健脾化瘀复方（0.83ml/kg、1.67ml/kg、2.5ml/kg），分离血清，得到含有健脾化瘀复方有效作用成分的含药血清，处理体外培养的人肝癌 BEL7402 细胞，MTT 法检测细胞增殖。结果：与含小牛血清的 RPMI－1640 培养液比较，以含 10% 健康人血清的 RPMI－1640 培养液培养人肝癌 BEL7402 细胞，与小牛血清一样，20% 血清组，BEL7402 细胞增殖能力最强（$P < 0.01$）。人服用不同剂量的健脾化瘀复方 1 小时后采集的血清对人肝癌 BEL7402 细胞增殖具有抑制作用，剂量为 1.67ml/kg 时，增殖抑制率 30.0%，剂量为 2.50ml/kg 时，增殖抑制率为 36.1%，抑制作用呈剂量依赖性。结论：健脾化瘀复方药物血清对人肝癌 BEL7402 细胞具有显著增殖抑制作用。

关键词 BEL7402 人肝癌细胞 健脾化瘀方 细胞增殖 血清药理学

原发性肝癌的治疗一直是肿瘤的难点，寻找有效的治疗方法仍是研究重点。健脾化瘀复方 960 合剂是根据临床治疗肝癌有效方剂研制的新一代抗肝癌中药复方制剂[1,2]，体内外实验均显示出较好的抗肝癌效应[3-5]。为了进一步研究其作用机理，本实验旨在模拟中药在人体内作用于肿瘤细胞的过程，采用人体服用药物后，采集血清进行体外实验的血清药理学方法，观察该药体外对人肝癌细胞的增殖作用的影响。

※**基金项目** 本课题受中国博士后科学基金（No：2004035185）和广州市卫生局科研基金（No：200221）资助。

*作者简介 王昌俊，男，博士，博士后，主任医师。主要从事中医药防治恶性肿瘤和消化系统疾病研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物 ①健脾化瘀复方，由莪术、白术、苦参、白花蛇舌草等组成，广州市中医院提供，先将莪术、白术剪粹后用净水浸泡 30min，提取挥发油和芳香成分，其渣再与用净水浸泡 30min 的苦参、白花蛇舌草等水煎提取水溶性成分，各种有效成分混匀制成口服液，每 ml 相当于生药 1.0g。

1.1.2 细胞株 人肝癌细胞 BEL7402，引自中山大学动物实验中心。

1.1.3 *主要试剂* RPMI－1640 培养基干粉为美国 GIBCO 公司产品，胰蛋白酶（trypsin），活性 1：250U/ml，Serva 产品，华美生物工程公司分装，小牛血清（fetal calf serum，FCS）购于华美上海分公司，MTT 为 Serva 产品。

1.2 **方法**

1.2.1 *药物血清制备方法* 健脾化瘀复方（0.83ml/kg、1.67ml/kg、2.5ml/kg），分别服药前，服药后 1h 抽取外周血液（30ml/次），分离血清，得到含有 960 有效作用成分的含药血清，－20℃保存，临用时用 PRBI1640 培养液配制成所需浓度的细胞培养液。经培养实验没有微生物感染。

1.2.2 *分组与药物血清的添加* 分组：分为正常血清对照组（对照组），药物血清组（中药组），西药对照组（5－FU 组）。药物血清温育液（DSM）的制备：①药物血清组：临用前将服药后血清加入 RPMI－1640 培养液，浓度 10%。②对照组：服药前血清加入 RPMI－1640 培养液，浓度 10%。③5－FU 组：用含 10% 服药前血清的 RPMI－1640 培养液配制，DDP 终浓度为 0.3μg/ml（小）、0.6μg/ml（中）、0.9μg/ml（大）。

1.2.3 *细胞培养* BEL7402 细胞在含 10% 小牛血清的 RPMI－1640 培养液，37℃，5% CO2 条件下培养，隔天换液，细胞长满单层用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.2.4 *细胞增殖测定* 用 MTT 法检测。1×10^6 细胞接种于 96 孔板，每孔 100μl，培养 8 小时后，去培养液，加入 DSM 作用一定时间后，去 DSM，加入 2mg/ml 的 MTT，每孔 100μl，4 小时后，加入 100μl/孔的 DMSO，于酶标仪 492nm 处比色测吸光度 A。所有检测重复 3 次，取平均值。

1.2.5 *统计学处理* 使用 SPSS11.5 处理所有数据。组间比较用 t 检验。

2 结 果

2.1 健康人血清与 BEL7402 细胞的影响

与含小牛血清的 RPMI－1640 培养液比较，以含 10% 健康人血清的 RPMI－1640 培养液培养人肝癌 BEL7402 细胞，无论灭活与否均能维持细胞正常生长，比较相差显微镜下观察细胞形态未见明显差别和改变。相同浓度人血清分别与小牛血清组比较，MTT 检测，吸光度 A 值无差异（$P>0.05$）。与小牛血清一样，20% 血清组，BEL7402 细胞增殖能力最强（$P<0.01$）。见表 1。

表 1 健康人血清与小牛血清对 BEL7402 细胞增殖的影响（$\bar{x}\pm s$）

组 别		n	A 492
小牛血清	5%	10	0.441±0.098
	10%	10	0.557±0.071
	20%	10	0.635±0.112*
人血清	5%	10	0.457±0.087
	10%	10	0.582±0.143
	20%	10	0.648±0.147Δ

注：与 5% 小牛血清组组比较，*$P<0.01$；与 5% 人血清组比较，Δ$P<0.01$。

2.2 不同药物剂量血清对人肝癌 BEL7402 细胞增殖的影响

人服用不同剂量的健脾化瘀复方 960 合剂 1 小时后采集的血清对人肝癌 BEL7402 细胞增殖作用见表 2（注：血清终浓度为 10%。对照组：服药前人血清；5－FU 组：服药前血清配制；健脾化瘀方组：口服健脾化瘀方 1h 血清）。随着剂量增大，增殖抑制增强，剂量为 1.67ml/kg 时，增殖抑制率 30.03%，剂量为 2.50ml/kg 时，增殖抑制率为 36.12%，抑制作用呈剂量依赖性。

表 2 不同剂量药物血清对人肝癌细胞增殖的影响（$\bar{x}\pm s$）

组 别	n	A492	抑瘤率(%)
对照组	10	0.576±0.0873	－
5－FU(0.3μg/ml)	10	0.371±0.1041*	35.9
5－FU（0.6μg/ml）	10	0.280±0.0935**	50.4
5－FU（0.9μg/ml）	10	0.210±0.0798**	63.4
健脾化瘀方(0.83ml/kg)	10	0.514±0.1224	10.8
健脾化瘀方(1.67ml/kg)	10	0.403±0.1147*	30.0
健脾化瘀方(2.50ml/kg)	10	0.368±0.1147**	36.1

注：与对照组比较 *$P<0.05$，* *$P<0.01$。

3 讨 论

长期以来,中药复方抗肝癌研究主要是在整体内进行的,常用的模型有动物自发瘤及异体移植瘤等。由于人和动物属不同宿主,人肿瘤与动物肿瘤瘤株的差异,因而单一的体内实验难以确切阐明药物的抗癌效果及抗癌机理,有待体外实验以深入探讨中药复方的药理作用。体外实验条件可控性强,可在细胞、分子水平进行超微、生化、受体、基因等多方面研究中药复方对人肝癌细胞的作用,揭示药物作用较为深入。由于中药复方组成成分的复杂性,口服后在体内要经过一系列生物转化,并且在体内转化的过程中,其原有的成分或转化成活性成分,或代谢后失活、或借助于机体的神经体液调节系统而发挥药效,用粗提取物直接加入到细胞培养体系,因而常规的研究方法无法正确反映中药治疗疾病的机理。血清药理学方法——将药物给动物口服后一定时间采集动物血清,用采集的血清加入到体外培养体系,进行体外实验研究,由于模拟了药物在体内的作用过程,以广泛用于细胞生物学研究。但无论是大鼠,还是家兔,动物毕竟与人存在差异,因而我们采用人服用复方中药后,一定时间采集人血清,处理人癌细胞,更接近中药复方经口服吸收,进入血液循环而产生药理效应的真实过程,可以更好地模拟药物在人体内作用于癌细胞的模式,提高了研究结果的可靠性,在细胞学水平进行中药研究具有可行性。

健脾化瘀960合剂由莪术、白术、苦参、白花蛇舌草等组成,临床运用具有较好的抗肝癌作用。用该方给大鼠灌胃后,采集的大鼠血清培养人肝癌SMMC7721细胞,实验结果显示该方大鼠药物血清对SMMC7721细胞的增殖抑制率在22.9~42.2%。本次实验,含5~20%不同浓度的正常人血清的1640培养液处理人肝癌细胞BEL7402,均可促进细胞生长,与小牛血清比较无显著差异,且20%血清比5%和10%血清的促进BEL7402增殖作用更强($P<0.01$)。而当人体服用健脾化瘀复方960合剂后采集的含药血清处理人肝癌细胞,细胞增殖被抑制,剂量为0.83ml/kg时,抑制率为10.76%,剂量为1.67ml/kg时,抑制率为30.0%,剂量为2.50ml/kg时,抑制率达到36.1%。结果与用大鼠含药血清对SMMC7721肝癌细胞的作用[3]一致。本文采用人体服用复方中药后一定时间采集含药血清,体外处理人癌细胞的方法,更好地模拟体内药物作用过程,为深入研究中药复方的作用机理提供了较为可行的体外实验手段。

参考文献

[1]陈 伟,钱力兰,王昌俊,等.钱氏抗肝癌方加减治疗53例原发性肝癌临床观察[J].上海中医药杂志,1998,(4):14-16.
[2]王昌俊,廖子君,陈庆强,等.中药960合剂配合肝动脉栓塞化疗治疗晚期肝癌[J].中国中西医结合消化杂志,2002,10(4):211-214.
[3]王昌俊,钱伯文,陈 伟.扶正抗癌方药物血清对人肝癌细胞增殖的影响[J].中西医结合肝病杂志,1997,7(4):214-216.
[4]王昌俊,刘友章,许鑫梅,等.中药960合剂抗大鼠肝癌作用研究[J].中医药学刊,2004,8(2):1441-1442.
[5]王昌俊,钱伯文,陈 伟.中药复方960诱导人肝癌细胞凋亡的研究[J].中西医结合肝病杂志,2000,10(1):19-21.

(上接第53页)

带牵拉,改善关节运动功能,正是关刺"直刺左右尽筋上,以取筋痹"的现代阐述。实验研究表明[3]刺络拔罐具有通过血液中的钙离子浓度的变化,抑制血小板聚集有关,起到活血化瘀的作用。负压促使新鲜血液流向病灶,加强血液循环及生理代谢,致使局部无菌性炎症和水肿快速吸收或消失,迅速缓解疼痛[4]。

可见,关刺法配合刺络拔罐治疗膝关节骨性关节炎是一种多方面、多途径作用的治疗方法,标本同治,见效佳、简便可行。

参考文献

[1]倪家骧.临床疼痛治疗技术[M].2003.170.
[2]张光铂.膝关节功能评定[J].中国康复医学杂志,1991,6(2):80.
[3]崔 峻.刺络放血对实验性血瘀证血液流变学及微循环的影响[J].中国针灸,1995,15(1):37.
[4]丛 萃,金庆文.针灸结合刺络放血治疗骨性膝关节炎的临床观察[J].中国自然医学杂志,2004,6(3):172.