

健脾益肺解毒方对肺癌 A549/DDP 耐药细胞周期的影响※

● 单爱云¹ 曹 勇^{2▲} 马玉玲² 曾秀娣² 刘 敏² 王莎莎²

摘 要 目的:探讨健脾益肺解毒方药物血清对肺癌耐药细胞周期的影响。方法:将细胞分为荷瘤动物药物血清大、中、小剂量组,模型组,顺铂(DDP)组,维拉帕米(VRP)组,大、中、小剂量分别加 DDP 组和加 VRP 组。采用血清药理学及流式细胞术,观察健脾益肺解毒方药物血清分别与 DDP 和 VRP 合用后,对 A549/DDP 细胞周期的作用。结果:健脾益肺解毒方药物血清合用 DDP 和 VRP 后能协同 DDP 和 VRP 增加 A549/DDP 细胞 G0/G1 期细胞数,减少 S 期细胞比例($P < 0.05$)。结论:健脾益肺解毒方药物血清能协同 DDP 和 VRP 阻滞 A549/DDP 细胞于 G0/G1 期,阻止 A549/DDP 细胞 DNA 的合成,抑制肺癌耐药细胞的分裂增殖。

关键词 健脾益肺解毒方 细胞周期 A549/DDP 细胞

健脾益肺解毒法是临床治疗肺癌的常用方法,临床发现健脾益肺解毒方药对肺癌中晚期和化疗后均有确切的疗效,具有减轻化疗药物毒副反应、提高临床疗效、改善临床症状、提高生活质量、延长生存期作用,尤其对肺癌化疗前后及康复期配合健脾益肺解毒中药,疗效尤为明显。并且实验研究证实健脾益肺化痰方对动物移植性肺癌具有抑瘤和化疗协同增效作用^[1]。为了进一步明确健脾益肺解毒方对肺癌的作用,应用药物血清法,观察由党参、黄芪、猪苓、半枝莲、仙鹤草等单味中药免煎颗粒组成的健脾益肺解毒方对人肺癌 A549/DDP 耐药细胞周期的影响,以探讨健脾益肺解毒方对肺癌耐药细胞的作用机制。

1 材料

1.1 药物 健脾益肺解毒方免煎颗粒剂(由党参、黄芪、猪苓、半枝莲、茜草、仙鹤草等单味中药免煎颗粒

剂组成),深圳三九医药股份有限公司生产。用温蒸馏水配成相当于原生药材 2g/ml 的浓缩剂,置 4℃ 冰箱备用。顺铂(DDP),锦州九泰药业有限公司生产,10mg/瓶,批号 050502;青霉素,哈药集团制药总厂生产,100 万单位/瓶,批号 0101002;链霉素,华北制药股份有限公司生产,100 万单位/瓶,批号 0101002;维拉帕米(VRP),上海禾丰制药有限公司生产,2ml/5mg,批号 4E12001。

1.2 动物 SPF 级 C57BL/6J 小鼠,广东省医学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(粤)2008-0002。

1.3 瘤株 Lewis 肺癌,由广州中医药大学肿瘤研究所提供;人肺腺癌耐药细胞系 A549/DDP,由第三军医大学新桥医院呼吸病研究所吴国明教授惠赠。

1.4 试剂 RPMI-1640 细胞培养液, GIBCO;胎牛血清,杭州四季青生物工程公司;胰蛋白酶, GIBCO。

1.5 仪器 超净工作台,苏州净化设备有限公司;CO2 孵箱, Thermo Forma;96 孔平底细胞培养板, Corning; FACSCalibur 流式细胞仪,美国 BECKMAN-COULTER(贝克曼-库尔特)公司;倒置显微镜, Nikon;电子天平, FA2004 型, Sartorius, 德国。

2 方法

2.1 荷瘤动物药物血清制备 取健康 C57BL/6J 小

※基金项目 广东省科技计划项目(No. 73062);广州市科技计划项目(No. 2007Z3-E5091)。

▲通讯作者 曹勇,男,教授。研究方向:中医肿瘤防治。E-mail: tcaoy@163.com。

•作者单位 1. 广东省深圳市福田区中医院(518034); 2. 暨南大学医学院中医系(510632)

鼠 40 只,体重 18~22g,每鼠右前肢腋部皮下注射 0.2ml 小鼠 Lewis 肺癌组织悬液,24h 后随机分为健脾益肺解毒方大、中、小剂量组和模型空白对照组,每组 10 只。健脾益肺解毒方大剂量组、中剂量组、小剂量组分别按 $30\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $20\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $10\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药(分别为临床成人日用量的 19.0 倍、12.8 倍和 6.4 倍),模型对照组以等容积的生理盐水灌胃,每天 1 次,连续 10d,末次灌胃 1h,腹主动脉采血,无菌分离血清,经 56°C 30min 灭活处理后,用 $0.22\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌,置 -20°C 保存备用。

2.2 细胞培养 复苏后的人肺腺癌耐药细胞系 A549/DDP,接种于 50ml 培养瓶,加入 RPMI-1640 培养液(含 10% 胎牛血清,青霉素、链霉素各 $100\text{IU} \cdot \text{ml}^{-1}$)6ml,置于 37°C 、饱和湿度含 5% CO_2 和 95% 空气的 CO_2 孵箱中无菌培养,细胞呈单层贴壁生长,每 2~3 天更换培养液。

2.3 细胞悬液的制备 取对数生长期 A549/DDP 细胞,加入适量的 0.25% 胰蛋白酶液消化,PBS 洗涤 2 次,离心,弃上清,用 RPMI-1640 培养液配制成 $2 \times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ 细胞悬液。

2.4 肺癌耐药细胞周期测定 采用流式细胞术法。取对数生长期的 A549/DDP 细胞,0.25% 胰蛋白酶消化计数,以 $2 \times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ 的量接种于培养瓶中, 37°C 5% CO_2 培养 24h,至细胞生长旺盛贴壁后,去掉培养液,换成不含胎牛血清的培养液。而后将细胞分为荷瘤动物药物血清大剂量组(简称大剂量组),荷瘤动物药物血清中剂量组(简称中剂量组),荷瘤动物药物血清小剂量组(简称小剂量组),荷瘤动物模型血清组(简称模型组),A549/DDP 组(DDP 组),维拉帕米(VRP)组,大、中、小剂量分别加 DDP 组和大、中、小剂量分别加 VRP 组。大、中、小剂量组分别加入 $300\mu\text{l}$ 终浓度为 10% 的不同剂量组含中药荷瘤动物血清;模型组加入终浓度为 10% 的荷瘤动物模型血清 $300\mu\text{l}$;DDP 组只加入终浓度为 $1\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 DDP $300\mu\text{l}$;大、中、小剂量分别加 DDP 组,同时加入 $300\mu\text{l}$ 终浓度 10% 的不同剂量组含中药荷瘤动物血清和恒定浓度为 $1\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 DDP 各 $300\mu\text{l}$;VRP 组只加入终浓度为 $10\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 VRP $300\mu\text{l}$;大、中、小剂量分别加 VRP 组,同时加入 $300\mu\text{l}$ 终浓度 10% 的不同剂量组含中药荷瘤动物血清和恒定浓度为 $10\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 VRP 各 $300\mu\text{l}$;每瓶终体积为 3ml,不足部分加以 RPMI-1640 培养液。细胞培养液于 CO_2 培养箱中,继续培养 48h,然后分

别离心,用 PBS 洗涤 2 次,制成细胞悬液。

收集不同因素处理的 106 个细胞,离心后 PBS 液洗涤,加入冰冷的 70% 乙醇固定,PBS 液洗涤,加入 PI 荧光染液($50\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ PI, $10\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ RNA 酶) 4°C 避光孵育 30min,流式细胞仪分析 DNA 荧光强度,在流式细胞仪测定细胞的荧光强度,资料经计算机多正态拟合分析,得出细胞群体在细胞周期各个时相的分布比例。

2.5 统计学分析 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用 t 检验,多组间比较用方差分析,统计结果 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 健脾益肺解毒方荷瘤动物药物血清对肺癌 A549/DDP 耐药细胞周期的影响 结果显示,DDP 组及健脾益肺解毒方荷瘤动物药物血清大剂量组 A549/DDP G1 期细胞比例明显高于模型组($P < 0.01$),而中、小剂量组无明显变化($P > 0.05$)。DDP 组及健脾益肺解毒方荷瘤动物药物血清各剂量组 A549/DDP S 期细胞比例均明显低于模型组($P < 0.01$);与 DDP 组相比,健脾益肺解毒方大剂量组 G1 期比例无明显变化($P > 0.05$),中、小剂量组 G1 期比例明显低于 DDP 组($P < 0.01$),而健脾益肺解毒方各剂量组 S 期比例均明显高于 DDP 组($P < 0.01$),且健脾益肺解毒方在 S 期细胞分布高于 G0/G1。见表 1。

表 1 健脾益肺解毒方药物血清对 A549/DDP 耐药细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	G_0/G_1 (%)	S (%)	G_2/M (%)
模型组	38.1 ± 1.25	57.5 ± 0.51	4.4 ± 0.76
DDP 组	$48.9 \pm 1.58^{1)}$	$43.7 \pm 2.14^{1)}$	$7.4 \pm 1.26^{1)}$
大剂量组	$47.8 \pm 3.04^{1)}$	$50.6 \pm 2.62^{1)2)}$	$1.6 \pm 1.00^{1)2)}$
中剂量组	$40.3 \pm 1.83^{2)}$	$52.4 \pm 1.06^{1)2)}$	$7.3 \pm 0.39^{2)}$
小剂量	$40.2 \pm 1.58^{2)}$	$52.9 \pm 1.72^{1)2)}$	$6.9 \pm 0.89^{2)}$

注:与模型组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与 DDP 组比较,²⁾ $P < 0.01$

3.2 健脾益肺解毒方荷瘤动物药物血清与 DDP 合用时对肺癌 A549/DDP 耐药细胞周期的影响 结果显示,健脾益肺解毒方药物血清各剂量组与 DDP 合用后,肺癌耐药细胞 A549/DDP G1 期比例均明显高于模型组和 DDP 组($P < 0.01$),S 期细胞比例均明显低于模型组和 DDP 组($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 健脾益肺解毒方药物血清与 DDP 合用时对 A549/DDP 耐药细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)
模型组	38.1 ± 1.25	57.5 ± 0.51	4.4 ± 0.76
DDP 组	48.9 ± 1.58 ¹⁾	43.7 ± 2.14 ¹⁾	7.4 ± 1.26 ¹⁾
大剂量 + DDP 组	66.0 ± 1.66 ¹⁾²⁾	27.3 ± 0.89 ¹⁾²⁾	6.7 ± 1.15
中剂量 + DDP 组	59.4 ± 2.91 ¹⁾²⁾	32.8 ± 1.92 ¹⁾²⁾	7.8 ± 1.07 ¹⁾
小剂量 + DDP 组	57.3 ± 1.40 ¹⁾²⁾	32.9 ± 0.98 ¹⁾²⁾	9.8 ± 1.07 ¹⁾

注:与模型组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与 DDP 组比较,²⁾ $P < 0.01$

3.3 健脾益肺解毒方荷瘤动物药物血清与 VRP 合用时对肺癌 A549/DDP 耐药细胞周期的影响 结果显示,VRP 及健脾益肺解毒方荷瘤动物药物血清合用 VRP 后,各组 A549/DDP G₀/G₁ 期细胞比例均明显高于 DDP 组($P < 0.01$),S 期细胞比例均明显低于 DDP

组($P < 0.01$);健脾益肺解毒方荷瘤动物药物血清大、中、小剂量组合用 VRP 后,大、中剂量组 A549/DDP G₁ 期细胞比例均高于 VRP 组($P < 0.05$),健脾益肺解毒方荷瘤动物药物血清各剂量组 S 期细胞比例均明显低于 VRP 组($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 健脾益肺解毒方荷瘤动物药物血清与 VRP 合用时对 A549/DDP 耐药细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)
DDP 组	48.9 ± 1.58	43.7 ± 2.14	7.4 ± 1.26
VRP 组	64.3 ± 3.56 ¹⁾	31.8 ± 1.70 ¹⁾	3.9 ± 1.89
大剂量 + VRP 组	69.5 ± 1.36 ¹⁾²⁾	25.2 ± 1.18 ¹⁾³⁾	5.3 ± 0.67
中剂量 + VRP 组	67.6 ± 0.92 ¹⁾²⁾	25.9 ± 1.55 ¹⁾³⁾	6.5 ± 0.93
小剂量 + VRP 组	66.8 ± 66.8 ¹⁾	25.8 ± 1.55 ¹⁾³⁾	7.4 ± 0.47

注:与 DDP 组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与 VRP 组比较,²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$

4 讨论

化疗耐药是肺癌治疗不理想的原因之一。临床观察发现,肺癌中晚期和化疗后均有肺脾虚损的表现,尤其是肺癌化疗后尤为突出。我们根据中医五行相生理论,脾属土,肺属金,对肺癌化疗和中晚期采用健脾益肺为主以达培土生金,化痰解毒为辅以治肺之癌瘤,收到了较好的临床效果。健脾益肺解毒方由党参、黄芪、猪苓、半枝莲、仙鹤草等药组成。现代药理学研究证明黄芪多糖可预防及减轻化疗后骨髓抑制,党参多糖具有免疫调节、抗肿瘤、抗病毒等作用,黄芪可明显抑制人肺癌细胞增殖,减少肺癌小鼠肺部转移,延长生存期,提高体内免疫功能^[2-4]。猪苓多糖主要通过抗氧化、清除自由基,抑制肿瘤细胞增殖,诱导凋亡,影响肿瘤基因表达和增强免疫功能等方面发挥抗肿瘤作用^[5]。中药半枝莲有抗突变、抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、免疫增强、抗氧化、抑制端粒酶活性、抑制肿瘤血管生成等作用^[6]。仙鹤草不论是对体外培养的肿瘤细胞,还是实验动物移植性肿

瘤均有抑制或杀伤作用,尤其是在抑制瘤体增殖,促进癌症患者康复,改善临床症状,减轻放化疗的毒副作用,提高生存质量,阻止癌前病变,以及提高机体免疫功能等诸多方面,均有明显的效果^[7]。表明健脾益肺解毒方的药物组成不但符合中医的组方原则,而且具有现代药理基础。

细胞周期反映了细胞的增殖过程,细胞周期长短主要决定于 G₁ 期,G₁ 期阻滞可使细胞周期延长,增殖分裂减慢。恶性肿瘤的本质在于细胞周期的调节失控,出现无限制细胞增殖和分裂。现代医学研究表明,细胞周期的调控异常导致细胞的失控性增殖,是肿瘤发生和发展的重要特征,几乎所有的肿瘤都有细胞周期调控机制的破坏导致细胞生长失控、分化受阻、凋亡异常的特征^[8]。

本研究结果显示,健脾益肺解毒方在 S 期细胞分布高于 G₀/G₁,表明单用健脾益肺解毒方荷瘤动物药物血清不能阻滞 A549/DDP 细胞于 G₀/G₁,从而使进入 S 期的细胞增加,对肺癌耐药细胞 A549/DDP 增殖无抑制作用。但是健脾益肺解毒方药物血清与 DDP

合用后,A549/DDP G1 期比例均明显高于 DDP 组,S 期细胞比例均明显低于 DDP 组,表明健脾益肺解毒方荷瘤动物药物血清与 DDP 合用后,具有协同 DDP 阻滞肺癌 A549/DDP 耐药细胞于 G0/G1 期,减少增殖细胞在 S 期的分布,从而减少肺癌细胞在 S 期 DNA 的合成,抑制肺癌耐药细胞增殖,逆转肺癌 A549/DDP 耐药细胞的耐药性,增强化疗敏感性。

维拉帕米(VRP)是一种钙通道阻滞剂,能与 P-糖蛋白(P-gp)结合,抑制细胞毒性药物外排,使细胞内化疗药物浓度升高,细胞毒效应增强,对多药耐药具有逆转作用,极大地增加了肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[9]。研究结果显示,健脾益肺解毒方药物血清与 VRP 合用后,A549/DDP G1 期比例均明显高于 VRP 组,S 期细胞比例均明显低于 VRP 组。说明健脾益肺解毒方荷瘤动物药物血清与 VRP 合用后,能协同增强 VRP 阻滞肺癌耐药细胞 A549/DDP 于 G0/G1 期,减少增殖细胞在 S 期的分布,从而抑制肺癌耐药细胞周期的增殖。由此认为健脾益肺解毒方药物血清抑制肺癌耐药细胞周期增殖的机理可能与增强细

胞钙通道阻滞作用密切相关。

参考文献

- [1]孟 华,曹 勇,夏清华.健脾益肺化痰方对小鼠 Lewis 肺癌作用的研究[J].时珍国医国药,2007(1):11-12.
- [2]郑召鹏,杨卫兵,李 宁,等.注射用黄芪多糖预防非小细胞肺癌化疗后骨髓抑制的疗效观察[J].中草药,2013,44(2):208-209.
- [3]杨 瑾,袁德培,陈龙全,等.党参多糖类成分抗肿瘤活性的研究进展[J].湖北民族学院学报(医学版),2011,28(3):67-68.
- [4]吴朝妍,张莹雯,叶太生,等.NF- κ B 抑制介导的黄芪多糖抗人肺癌细胞效应[J].武汉大学学报(医学版),2013,34(2):174-177.
- [5]刘洪超,蔡林衡,王淑英.猪苓多糖抗肿瘤机制研究进展[J].河南科技大学学报(医学版),2011,29(3):236-238.
- [6]牛国晓,李 洁.半枝莲抗肿瘤机制研究进展[J].肿瘤防治研究,2012,39(2):231-233.
- [7]巴晓雨,何永志,路 芳,等.仙鹤草研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2011,13(5):258-261.
- [8]王 昕.细胞周期调控与肿瘤发生的研究[J].中国民康医学,2010,22(16):2135-2136.
- [9]李小兵.靶动脉灌注维拉帕米联合化疗药物介入治疗晚期肺癌的临床疗效分析[J].实用心脑血管病杂志,2013,21(12):130-131.

中医故事

郎中对对子

民国时期,有个县太爷自以为是天下奇才,喜欢与人比咏诗作对。有一天下雨,县太爷硬要一个看病的郎中与他他对对子。郎中无奈,也只好硬着头皮,等着县太爷出题。

县太爷以郎中打着的雨伞为题,道出一联:黑柄双雨伞;

郎中不会对对子,只好顺口打哇哇:银翘八宝盘。

县太爷说:“我出的上联是物件,你对的下联是药名,药名对物件……,嗯,马马虎虎。好!我再出一联你对对看。”说完,眼一瞄,见前面裁缝铺里师傅正拿着尺量布,就以其为题,道出一联:三尺天青缎;

郎中三句不离本行,又随口对出:六味地黄丸。

县太爷说:“你又是对的药名吧?你光对药名,我又不晓得到底有这些药名没有。这样吧,我再出一联,我以什么为题,你就以什么来对。”他说罢,头一偏,见路旁一户人家有个丫头正倚在门旁歪着脑袋朝外看人,就以这个丫头为题,摇头晃脑道出一题:小女子,红光满面,定知三从四德;

郎中心想:我对药,你又说不行;你看见人就出题,我又到哪里去找人来对呀?他愁眉苦脸地望着县太爷,蓦地心里一亮,有了,面前这位县太爷不是人吗?只见他盯着县太爷,察言观色,一字一句地说:大老爷,面黄肌瘦,必有五劳七伤。

县太爷正要发作,但转念一想,是自己出题要他对的,而且对得又工稳,真是哑巴吃黄连,有苦说不出。可他还是忍不住骂了声:小奴才!

郎中以为这又是县太爷出的上联,便脱口而出:大老爷!

县太爷面红耳赤,恼羞成怒,朝郎中大声呵斥:该死!

郎中还是以为县太爷在出对,又连忙对出下联:无救!