

# 黄芪女贞子汤抗癌转移作用的离体实验研究

孟静岩

(天津市中医学院 300193)

片冈宽章 保岛一树 河野正

(Miyaxaki Medical College Japan)

**摘要** 目的: 探讨黄芪女贞子汤治疗消化道肿瘤作用机理。方法: 应用体外细胞培养的方法, 观察黄芪女贞子汤对各种人体消化道肿瘤细胞的抑制作用, 并分析癌细胞培养上清中的 Matrix Metalloproteinase-7 (MMP-7, matrilysin) 的分泌状况。结果: 黄芪女贞子汤对胃、大肠消化道的 9 种癌细胞有明显的抑制作用, 而对 3 种正常纤维细胞有增殖促进作用 ( $P < 0.05$ ); 黄芪女贞子汤具有减少 matrilysin 的分泌作用 ( $P < 0.05$ )。结论: 黄芪女贞子汤可能通过减少 matrilysin 的分泌而起到对肿瘤细胞的抑制作用和抗转移作用。

**关键词:** 中药 人癌细胞 Matrix Metalloproteinase-7 (matrilysin).

中图分类号: R289.96 文献标识码: B 文章编号: 1005-7145(2001)03-0032-03

## 1 材料与与方法

1.1 细胞的种类和体外培养: 本实验中使用的癌细胞株在胰腺癌细胞株 SUIT-2 克隆的 S2-020, S2-007, S2-013; 胃癌细胞株 MKN-28; 大肠癌细胞株 WiDr, CaR-1, Lovo, SW837; 直肠癌细胞株 ECM-1 分离出的向肝脏的高度转移株 L-10。正常纤维细胞株有来自胎儿肺分离出的 MRC-5-30; 皮肤分离的 SF-TY; 成人正常大肠分离的 ColonNFib 细胞株。S2-020, S2-007, S2-013, MKN-28 细胞株被使用 DMEM 培养液 5% 的胎牛血清; L-10 细胞株被培养在 RPMI1640, Ham's F-12 1:1 的混合培养液, 5% 的胎牛血清, 其余种类的细胞株被培养在 RPMI 1640, 10% 胎牛血清中, 3 种培养液中均添加 100U/ml 青霉素, 15mM HEPES (Sigma), 4mM L-谷氨酰胺 (Sigma), 调整 PH 值为 7.4。将上述 21 种细胞分别接种于 25CM<sup>2</sup> 培养瓶中, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 空气, 37℃, 饱和湿度中培养 2 天更换 1 次培养液, 使用 0.1% 胰蛋白酶消化, 传代培养, 待细胞达 80% 融合时用于实验。

1.2 中药的制备: 将黄芪女贞子汤生药浸泡于药量的 7 倍的蒸馏水中 30 分, 然后水煎 30 分钟 2 次, 将 2 次煎后的上清取出放于 4℃ 静置 1 晚, 再取上清在 3000 rpm 15 分钟离心, 将离心上清水冰冻于 -80℃, 在经过 -80℃ 真空干燥制成中药粉末, 将粉末溶于不含血清的培养液中, 0.22 μm 的筛网过筛, 调制好的药液冻存于 -20℃, 使用前配制成相应的浓度。

1.3 细胞生存状态的测定: 应用 MTT<sup>[1]</sup> 法测定了黄芪女贞子汤对各种癌细胞株和正常细胞株的抑制作用。

1.3.1 单纯细胞株生存状态的测定: 使用 9 种癌细胞

株和 3 种正常纤维细胞株, 调整细胞密度为  $3 \times 10^4$ /ml, 将这些细胞分别接种于 96 孔酶标板, 每孔分别加入细胞悬液 100 μl, 然后每组分别加入空白培养液, 含中药培养液, 中药浓度分别为 100, 200, 300, 400, 500 μg/ml, 每孔最终液量 200 μl, 每组各 10 孔, 培养 48 h 后, 每孔加入 DMSO (Sigma, 5 mg/ml PBS) 10 μl, 继续孵育 2 h, 2 h 后弃去上清, 每孔加入 DMSO (Sigma) 100 μl, 振荡 5 分钟后, 在酶联免疫检测仪 (SPECTRA) 上测定各孔的 OD<sub>570 nm</sub> 值。

1.3.2 混合细胞株生存状态的测定: 使用大肠癌细胞株 WiDr 和正常纤维细胞株 MRC-5-30, colonNFib 细胞株, 分别以 5:1, 10:1 比例调整混合的细胞悬液, 细胞密度为  $3 \times 10^4$ /ml, 后述方法与上相同。

1.3.3 计算方法:

细胞生长抑制率  $IP-1 = \frac{\text{实验组 OD 值} - \text{调零孔 OD 值}}{\text{对照组 OD 值} - \text{调零孔 OD 值}}$

1.3.4 细胞培养上清中分泌的 matrilysin 的测定: 应用 Western blot 杂交法测定细胞培养上清中分泌的 matrilysin 的含量。调整大肠癌细胞株 WiDr, CaR-1 细胞密度分别为  $0.5 \times 10^5$ /ml,  $1 \times 10^5$ /ml, 接种于 24 孔培养板中, 每孔 1 ml, 培养 24 h 后, 使用非血清培养液 RPMI 1640 漂洗细胞两次, 然后用含血清培养液调制各种浓度中药, 使其成为 (0, 50, 100, 250, 500 μg/ml), 各孔中加入 1 ml 含中药培养液, 72 h 后, 收集培养上清, 用 lowry 法测定上清中蛋白浓度, 取等量蛋白的上样加 1X SDS 缓冲液裂解, 样品于 100℃ 水浴 5 min, 再进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳毕, 把蛋白转移到硝纤膜上, BSA 封闭, 加抗 matrilysin 抗体 (1:500) 孵育过夜于 4℃, 洗涤, 加二抗 (1:2000) 孵育 1 h 在常温下, 加

ECL 化学发光试剂于暗室自显影(按试剂盒说明书进行),将图象经图象处理分析系统计算,各组实验全部重复 3 次。

1.3.5 统计方法:各实验结果的判定用 one-way ANOVA 方法判定,  $P < 0.05$  为有意义水平。

## 2 实验结果

### 2.1 黄芪女贞子汤对各种癌细胞的抑制作用:

黄芪女贞子汤对 9 种人癌细胞株均有不同程度的抑制作用,并表明了明显的浓度依存性,在  $500 \mu\text{g}/\text{ml}$  浓度时,对 WiDr, L-10, Lovo3 种大肠癌细胞株的抑制作用最强,抑制率达  $40 \sim 50\%$ ,而对于 S2-020, S2-013, MKN-28, SW837 4 种细胞株的抑制作用相对较弱,对于 CaR-1, S2-007 细胞株的抑制作用最弱(如图 1 所示)。

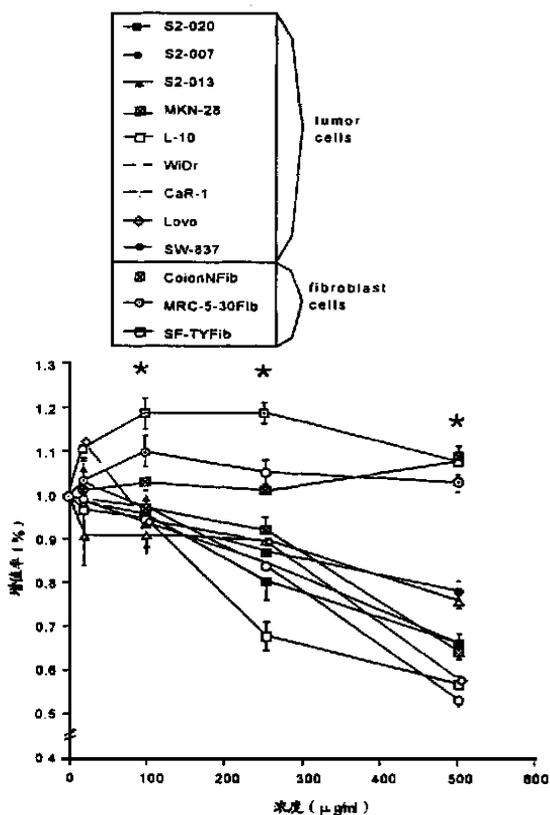


图 1 黄芪女贞子汤对 9 种人癌细胞和 3 种正常细胞的抑制效果(\*  $P < 0.05$ )

### 2.2 黄芪女贞子汤对正常纤维细胞株的抑制作用:

黄芪女贞子汤对 3 种正常纤维细胞株不但没有明显的抑制作用,也不具有浓度依存性,而且在  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  浓度时,对 3 种细胞株明显出了一定的增殖促进作用(如图 1 所示)。

### 2.3 黄芪女贞子汤对癌细胞和正常纤维细胞株混合

培养的抑制作用:

黄芪女贞子汤对癌细胞和正常纤维细胞株混合培养也有一定程度的抑制作用,且表现出了浓度依存性。黄芪女贞子汤对单独癌细胞培养的抑制作用优于混合培养的抑制作用,但两者间无显著性差别,结果如表 1 所示。

表 1 单纯培养基与混合培养的细胞增殖率比较(%)

分组	中药浓度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )			
	50	100	250	500
单纯培养	0.921	0.888	0.722	0.559
混合培养	1.187	0.991	0.855	0.71

### 2.4 黄芪女贞子汤对培养细胞的 matrilysin 分泌的影响:

2.4.1 黄芪女贞子汤对培养单纯癌细胞的 matrilysin 分泌的影响:黄芪女贞子汤对 WiDr, CaR-1 细胞株 matrilysin 分泌具有明显的抑制作用,并有明显的浓度依存性。当细胞数为  $0.5 \times 10^5/\text{ml}$  时,中药浓度从  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  至  $500 \mu\text{g}/\text{ml}$  的抑制作用明显优于对照组  $P < 0.05$ (如图 2 表示)。

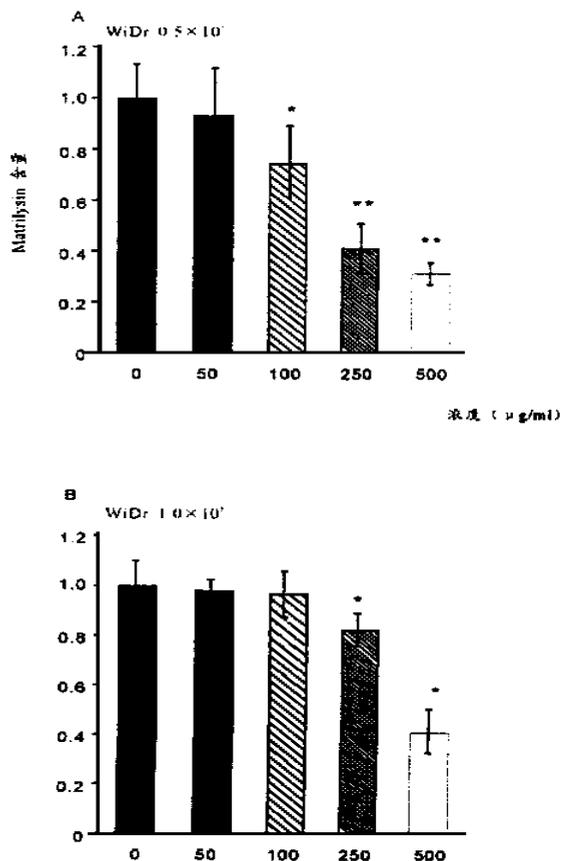


图 2

2.4.2 黄芪女贞子汤对混合培养癌细胞和正常纤维细胞株的 matrilysin 分泌的影响: 黄芪女贞子汤对癌细胞株 WiDr 和正常纤维细胞株 MRC-5-30 以 5:1 的比例培养时, 在 250, 500  $\mu\text{g/ml}$  药物浓度表现出较强的抑制作用, 与对照组相比  $P < 0.05$ ; 而当以 10:1 的比例培养时仅在 500  $\mu\text{g/ml}$  药物浓度表现出较强的抑制作用, 与对照组相比  $P < 0.05$  (如图 3 表示)。

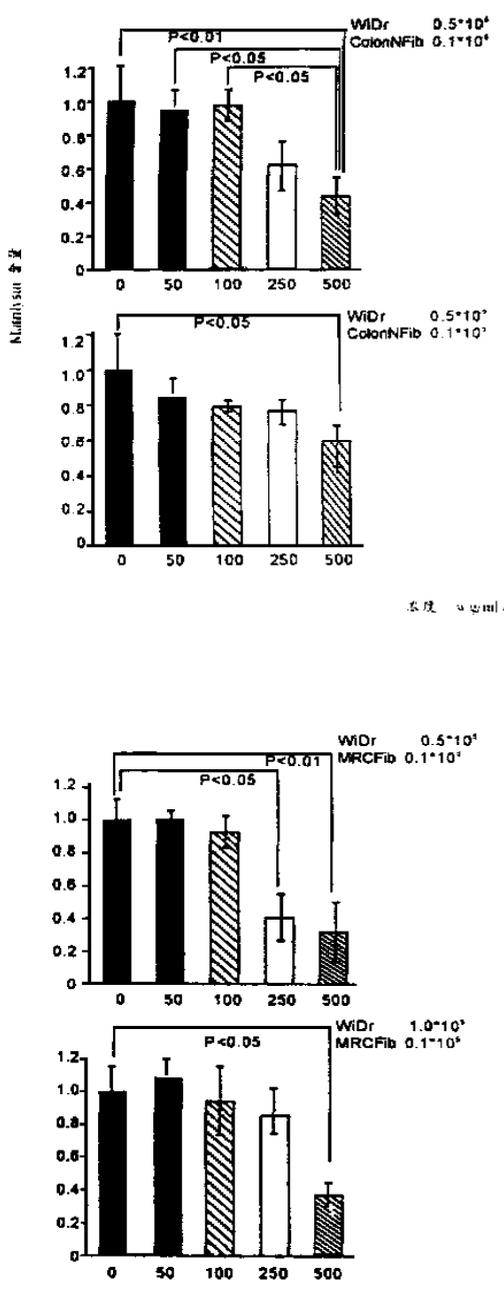


图 3 黄芪女贞子汤对癌细胞株和正常纤维细胞株的混合培养 matrilysin 分泌的作用

### 3 讨论

近年来应用小柴胡汤, 十全大补汤<sup>[2,3]</sup>等一系列中药方剂, 观察它们对人和动物癌细胞株的影响的体外实验已有许多报告。黄芪女贞子汤是以中医传统理论为基础, 根据“清热解毒, 活血化瘀, 扶正培本”的治疗原则确立的以黄芪、女贞子、丹参为主药的经验效方, 它通过提高人的正气, 提高肌体免疫力从而增强抗癌能力。本实验结果显示黄芪女贞子汤不仅对单纯培养的各种胃、肠癌细胞有明显的抑制作用, 而且对应用更加模拟临床实际的实验方法即混合细胞培养法<sup>[4]</sup>, 也获得了较强的抑制效果, 说明本方确有较强的抗癌作用, 同时本方对正常纤维细胞不仅没有抑制作用, 反而有增殖促进作用, 这与中医的“扶助正气”理论, 以及减轻癌患者的临床症状, 改善体质是相一致的。这也为的中医临床治疗提供了理论依据。

Matrix Metalloproteinase - 7 (MMP - 7, matrilysin) 是 Matrix Metalloproteinase 家族中的结构最简单的蛋白酶之一, 它在癌细胞和它的培养液中被表达, 在癌的浸润和转移中具有重要的作用<sup>[5]</sup>。本实验表明该方无论对癌细胞的单纯培养, 还是对混合培养均能较强的抑制 matrilysin 的分泌。黄芪女贞子汤不仅具有抑制癌细胞的生长, 而且可能通过抑制 matrilysin 的分泌, 从而阻断癌细胞的浸润和转移, 但该方的更合适的配伍组方, 与抗癌剂的联合使用的抑癌效果, 以及这些作用的详细机理还有待于今后继续探讨。

### 参考文献

- 1 Mosman T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assay. J. Immunol Methods. 65: 55 ~ 63, 1983.
- 2 安井敏之, 苟原捻, 田正晴, 等. 小柴胡汤抗妇科肿瘤效果和作用机理的研究. 和汉医药杂志, 1994; 1: 161 ~ 167
- 3 Takahashi, H, Nakawawa, s etal: Antitumor effect of juzen-taiho- to, a kampo medicine for transplanted malignant glioma. Int. J. Immunotherapy. 1995; 2: 65 ~ 69
- 4 Kataoka, H, Meng, Jingyan Etal: Modulation of Matrix Metalloproteinase - 7 (Matrilysin) secretion in co-culture of human colon carcinoma cells with fibroblasts from orthotopic and ectopic organs. Oncology Research. 1997; 9: 101 ~ 109
- 5 Imai, K, Yokohama, Y etal: Matrix Metalloproteinase 7 (matrilysin) from rectal carcinoma cells activation of the precursor interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. J. Biol. Chem. 1995; 24: 6691 ~ 6697

(收稿日期: 2001-05-28)