

# 抗癌口服液在体内外抗肿瘤作用的实验研究

许相范,孙抒,孙百研,李基俊,朴奎善(延边大学肿瘤研究中心,吉林 延吉 133000)

**摘要:**目的 抗癌口服液抗肿瘤作用的实验研究为该中药的临床应用及深入研究提供理论及实验依据。方法 应用 MTT 法、集落形成率的测定及血清药理学方法,检测该中药在体外对 MGC-803 胃癌细胞的抗增殖作用及药物敏感性;本实验还采用动物抗移植性肿瘤-小鼠肉瘤 S180 实验方法研究抗癌口服液的抗肿瘤作用。结果 (1)用 MTT 法和生长曲线的检测结果表明,该中药在体外对 MGC-803 胃癌细胞株有明显抑制作用,加药组与对照组相比其生长抑制率有显著性差异( $P<0.01$ ),而且这种抑制作用呈现浓度和时间的依赖性。(2)通过集落形成率的测定结果表明,加药组与对照组相比其集落形成率和集落形成抑制率有显著性差异( $P<0.01$ ),说明该中药对 MGC-803 胃癌细胞株有明显的抗增殖作用。(3)血清药理学实验结果表明,灌服抗癌口服液的含药血清组对 MGC-803 胃癌细胞株生长抑制率达 28.91%,与阴性对照组相比有显著性差异( $P<0.01$ )。(4)体内实验结果表明,抗癌口服液对小鼠肉瘤 S180 的实验抑瘤率在大、中、小剂量下分别达到 35.9%、39.5%、41.8%。结论 抗癌口服液在体内外有显著的抗肿瘤作用。

**关键词:**抗癌口服液; MGC-803 胃癌细胞株; S180

## Studies on anti-cancer for MGC-803 human gastric cancer cell line in vivo and vitro by Anti-cancer Oral Liquid

XU Xing-fan, SUN Shu, SUN Bai-yan, LI Ji-jun, PIAO Kui-shan (Tumor Research Center of Yanbian University, Jilin Yanji 133000, China)

**ABSTRACT:OBJECTIVE** To investigate anti-cancer of the Anti-cancer Oral Liquid (ACOL) for MGC-803 gastric cancer cell line in vivo and vitro. **METHOD** Using the MTT assay, colonogenic assay and sero-pharmacological experiment by treating with the Chinese traditional medicine in vivo and vitro. **RESULTS** The ACOL significantly inhibited the proliferation of gastric cancer cells *in vitro* and the inhibitive effects were depended on the medicine concentration and treating times. After treating 24 hours on the gastric cancer cells with the 50 $\mu$ g/mL of ACOL, morphologic changes of apoptosis with chromatin margination, karyopyknosis, karyorrhexis, apoptotic body were found by the light and electron microscope. **CONCLUSION** The ACOL has significant inhibition of proliferation and inducing apoptosis for MGC-803 gastric cancer cells *in vitro*. This experiment results will provide theoretical basis for clinical applying and further research of the ACOL.

**KEY WORDS:** Anti-cancer Oral Liquid; MGC-803 gastric cancer cell line; S180

胃癌是临床上一种常见的癌症。目前,对于晚期转移或不可切除的胃癌病人的化疗以及术后辅助性化疗仍以 5-Fu 为主,但其总有效率仍不尽人意。中草药治疗胃癌以其毒性低,有一定疗效而日益引起人们的重视,近年来科学工作者对中草药抗病机制的兴趣日益增加,研究越来越深入。越来

越多的有效组分被分离出来,并在不同水平上对抗病机制进行了研究。本实验以人体胃癌细胞株为供试体,用人参、灵芝、山豆根、白花蛇舌草等中草药的复方煎剂-抗癌口服液,直接作用于体外培养的人胃癌 MGC-803 细胞株,而探讨该中药的抗癌效果及其作用机制。

作者地址:吉林省延吉市局子街 121 号 延边大学医学院病理学教研室;邮编:133000;通讯作者:孙抒,教授,现任延边大学肿瘤研究中心主任;通讯地址:吉林省延吉市局子街 121 号 延边大学医学院病理学教研室

1.1 材料

MGC-803 人胃癌细胞株由中国医科大学肿瘤研究所提供;抗癌口服液,延边大学肿瘤研究中心提供(由人参、灵芝、山豆根、白花蛇舌草、杏仁等 20 味中药组成的复方水煎汤剂,内服药)。临用前过滤除菌,RPMI 1640 培养液 Gibco 产品,MTT 为 USB 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 抗癌口服液对胃癌 MGC-803 细胞的细胞毒作用

利用 MTT 比值法,取对数生长期胃癌细胞调整至  $10 \times 10^4$  个/mL 细胞悬液,接种于 96 孔细胞培养板上,每孔加 0.2 mL 细胞悬液。置于  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$  细胞培养箱中培养,待细胞贴壁后,加入不同浓度的中药 20  $\mu\text{L}$ ,使终浓度分别为:10, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及另设终浓度为 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  5-Fu 的阳性对照组,加生理盐水的阴性对照组,每组重复 8 孔。作用时间:24h、48h 后,每孔加 MTT 20  $\mu\text{L}$  (5mg/mL),置于  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$  细胞培养箱中培养,连续培养 4h 后小心弃去上清液,加入二甲基亚砜 (DMSO) 150  $\mu\text{L}$ ,轻轻振荡后用酶标仪测定其吸光度值 (A 值)。参考波长 490nm,实验波长 570nm。

按下式计算细胞生长抑制率:

抑制率(%) =  $\frac{(\text{对照孔 A 值} - \text{实验孔 A 值})}{\text{对照孔 A 值}} \times 100\%$

1.2.2 集落形成率的测定

将细胞制成浓度为  $2 \times 10^3/\text{mL}$  的细胞,悬液中的细胞充分分散,按 1mL/孔接种于 12 孔板,培养 12h 待细胞完全贴壁后加入中药,使药物终浓度分别为 25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,设空白对照,每组复三孔;继续培养 6d,弃上清液,用无水乙醇固定 1h,HE 染色后在  $4.5 \times 10$  倍显微镜下计数,10 个以上的细胞为一个集落。按下列公式计算集落形成率 (PE) 和集落形成抑制率。

PE = 集落数 / 接种细胞数  $\times 100\%$ ;

表 1 抗癌口服液对 MGC-803 细胞抑制作用

| 终浓度<br>( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | 24h               |                    | 48h               |                    |
|------------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
|                                    | A 值               | 抑制率(%)             | A 值               | 抑制率(%)             |
| 0(阴性对照 NaCl)                       | 1.181 $\pm$ 0.065 |                    | 1.429 $\pm$ 0.105 |                    |
| 10                                 | 1.197 $\pm$ 0.041 | /                  | 1.428 $\pm$ 0.129 | 0.1                |
| 25                                 | 1.154 $\pm$ 0.036 | 2.3                | 1.160 $\pm$ 0.084 | 18.8 <sup>1)</sup> |
| 50                                 | 0.678 $\pm$ 0.066 | 42.6 <sup>2)</sup> | 0.922 $\pm$ 0.043 | 64.5 <sup>2)</sup> |
| 100                                | 0.420 $\pm$ 0.033 | 64.4 <sup>2)</sup> | 0.318 $\pm$ 0.013 | 77.7 <sup>2)</sup> |
| 200                                | 0.329 $\pm$ 0.041 | 72.1 <sup>2)</sup> | 0.244 $\pm$ 0.045 | 82.9 <sup>2)</sup> |
| (阳性对照 5-Fu) 25                     | 0.809 $\pm$ 0.012 | 31.5 <sup>2)</sup> | 0.627 $\pm$ 0.048 | 56.1 <sup>2)</sup> |

注:与上一组相比,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$

2.2 倒置显微镜下观察结果

对照组细胞:呈上皮型贴壁生长呈延展、扁平,细胞均质而透明,细胞一般有 2~4 个核仁,核膜、核仁轮廓明显,细胞间结构紧密,细胞生长旺盛;而加药组细胞:细胞轮廓增强、反差增大,有部分变圆浮起,细胞间接触变松,增殖减慢,胞质中颗粒增多,随药物浓度增高,可见细胞周围碎片增多。

2.3 集落形成率测定结果:

如表 2 所示,对照组集落形成率大于 40%(对照组集落

集落形成抑制率(%) =  $(1 - \text{给药组集落数} / \text{对照组集落数}) \times 100\%$

1.2.3 抗癌口服液的抗肿瘤作用的血清药理学实验:

实验分给药组和阴性对照组。给药组大鼠灌胃该中药煎剂(56g 生药/100mL),阴性对照组给等量生理盐水,按 25 mL/kg 灌胃,连续 2 次 间 4h,于第 2 次灌胃后 1h,右心采血,无菌分离血清,经  $56^\circ\text{C}$ 、30min 灭活后,  $-20^\circ\text{C}$  保存备用。

将此含中药的血清用 MTT 法测体外对细胞的不良反应,其体外实验分:给药血清组、给生理盐水血清组、等量生理盐水组及终浓度为 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 5-Fu 阳性对照组等 4 组。

1.2.4 抗癌口服液体内抗癌作用

在无菌条件下给小鼠右前肢腋窝部皮下注射肉瘤 S-180 后,灌胃抗癌口服液 0.038、0.076、0.152 g/kg;对照组每天只给予生理盐水;阳性对照组给予 5-Fu 0.40 mg/kg。连续给予 10d,实验期间动物自由进食和饮水。第 11d,将小鼠脱臼猝死,称分离瘤体称重。肿瘤生长抑制率观察,以下公式进行计算:

肿瘤生长抑制率(%) =  $\frac{(\text{对照组平均瘤重} - \text{实验组平均瘤重})}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$

1.3 统计学处理:

采用统计软件 Jandel Scientific-Sigmaplot 和 SPSS-10 统计软件配合使用。两组间比较时采用  $t$  检验。

2 结果

2.1 抗癌口服液对胃癌 MGC-803 细胞的细胞毒作用

如表 1 所示,以上结果可知生长的抑制与药物浓度和药物作用时间呈一定依赖关系,药物浓度越大抑制作用越强,作用时间越长抑制效果越明显。当中药浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时对 MGC-803 细胞的抑制率接近半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )、其有效作用时间为 24h。

形成率应在 40%~60%),说明细胞生长状况良好;加药组当药物浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时就能抑制细胞集落形成,浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时抑制率达 100%。说明胃癌 MGC-803 细胞的确对该中药有敏感性。

表 2 不同浓度中药对 MGC-803 细胞的集落形成的影响

| 药物浓度<br>( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | 低倍显微镜下观察        |          |            |
|-------------------------------------|-----------------|----------|------------|
|                                     | 集落平均数           | 集落形成率(%) | 集落形成抑制率(%) |
| 0                                   | 4.63 $\pm$ 0.32 | 46.3     |            |

| 药物浓度<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 低倍显微镜下观察        |             |              |
|------------------------------|-----------------|-------------|--------------|
|                              | 集落平均数           | 集落形成率(%)    | 集落形成抑制率(%)   |
| 25                           | $2.75 \pm 0.31$ | $26.3^{1)}$ | 43.2         |
| 50                           | $0.75 \pm 0.25$ | $7.5^{1)}$  | $83.8^{1)}$  |
| 100                          | 0               | $0^{1)}$    | $100.0^{1)}$ |

注:与上一组相比,<sup>1)</sup> $P < 0.01$

#### 2.4 含药血清对胃癌细胞体外生长的抑制作用:见(表3)

表3 含药血清对 MGC-803 胃癌细胞体外生长的抑制作用

| 组别<br>(各加 $20\mu\text{L}$ ) | 24h                    |              |
|-----------------------------|------------------------|--------------|
|                             | A 值( $\bar{x} \pm s$ ) | 抑制率(%)       |
| 无血清 NaCl                    | $0.8178 \pm 0.0113$    |              |
| NaCl 血清                     | $0.7975 \pm 0.0047$    | 2.50         |
| 含药血清                        | $0.5813 \pm 0.0123$    | $28.91^{1)}$ |
| $25\mu\text{g/mL}$ 5-Fu     | $0.6030 \pm 0.0093$    | $26.27^{1)}$ |

注:与阴性对照组相比,<sup>1)</sup> $P < 0.01$

从上表可看出灌服 NaCl 血清与无血清 NaCl 相比无统计学意义,但灌服抗癌口服液的含药血清组与终浓度为  $25\mu\text{g/mL}$  的 5-Fu 阳性对照相似其抑制率达  $28.91\%$  与上两个阴性对照组相比有显著性差异( $P < 0.01$ )。

#### 2.5 对 S-180 小鼠动物体内抑瘤实验

本实验用不同剂量的抗癌口服液对小鼠  $S_{180}$  肿瘤的抑瘤作用如表4所示,给予该中药  $0.038$ 、 $0.076$ 、 $0.152\text{ g/kg}$  的小鼠瘤重明显低于对照组抑瘤率,其抑瘤率超过  $30\%$ 。

表4 S-180 小鼠动物体内抑瘤实验

| 组别     | 给药量<br>( $\text{g/kg}$ ) | 瘤重<br>( $\bar{x} \pm s$ )g | 抑瘤率<br>(%)  |
|--------|--------------------------|----------------------------|-------------|
| 阴性对照组  | 0(代 NaCl)                | $2.314 \pm 0.735$          |             |
|        | $0.038$ (小)              | $1.483 \pm 0.924$          | $35.9^{1)}$ |
| 加药组    | $0.076$ (中)              | $1.401 \pm 0.816$          | $39.5^{2)}$ |
|        | $0.152$ (大)              | $1.346 \pm 0.732$          | $41.8^{2)}$ |
| (5-Fu) | $0.40\text{ mg}$         | $1.637 \pm 0.598$          | $29.3^{1)}$ |

注:加药组与阴性对照组相比<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; <sup>2)</sup> $P < 0.01$

### 3 讨论

早在 50 年代初,美国就开始建立抗癌药物筛选体系。在随后几十年内,以培养细胞株为筛选试验体系。采用细胞培养的筛选体系可以在体外对人体癌细胞进行抗癌效力测验,从而加快筛选速度,而且可以从细胞水平和分子水平上对抗癌机制进行研究<sup>[1-4]</sup>。本实验采用 MTT 法、台盼兰染色法测生长曲线以及集落形成率的测定等方法判定该中药在体外对 MGC-803 细胞是否确切有抗增殖作用。MTT 法是简便、快速的大多数药物敏感性实验中所采用的方法之一<sup>[3]</sup>。用该中药以不同浓度梯度作用于 MGC-803 细胞 24h 和 48h 两个时间段后测其吸光度值并计算细胞生长抑制率,结果细胞生长抑制率与药物浓度和药物作用时间呈一定依赖关系。当药物浓度为  $50\mu\text{g/mL}$ ,作用时间 24h 时生长抑制率为  $42.6\%$ ,作用时间 48h 时  $64.5\%$ 。台盼兰排染法观察该中药对 MGC-803 胃癌细胞的生长的影响情况,结果表明该中药对细胞生长也有剂量和时间依赖性;集落形成试验,是探讨单个瘤细胞生物学行为的敏感试验<sup>[4]</sup>。因为贴壁生

长细胞在体外要形成集落必须具备良好的黏附性,较强的增殖力这样才能单个细胞附于支持物生长并增殖成克隆。这与肿瘤细胞在体内的局部生长、侵袭转移过程相似。本实验结果发现中药浓度为  $50\mu\text{g/mL}$  时有良好的细胞抑制作用。

本实验还采用了血清药理学方法<sup>[5,6,7]</sup>观察了抗癌口服液的含药血清对肿瘤细胞在体外生长的影响,对其抗肿瘤作用进行再评价。结果,含药血清组吸光度值与阴性对照组相比有显著性差异( $P < 0.001$ )。这可能是含药血清中含有所服中药有效成分或其活性代谢产物,也可能含有在中药作用下产生的内源性活性物质,并因此而产生药理作用。这一结果有力证明该中药在体内也有可能引起抗肿瘤作用<sup>[8]</sup>。

抗癌口服液对小鼠  $S_{180}$  肉瘤的抑制作用结果不同浓度的该中药复方制剂对  $S_{180}$  肿瘤有抑制作用,且剂量组低、中、高浓度剂量组抑制作用均超过  $30\%$ ,表明该中药复方制剂在体内试验中也表现出较强的抑瘤活性。据体外实验结果可初步判断可能是因为给小鼠灌胃该中药后,中药直接抑制肿瘤细胞增殖和/或中药吸收后体内产生一些抗癌活性物质而产生抑瘤作用,还有可能该中药促使肿瘤细胞凋亡引起肿瘤组织变小<sup>[9]</sup>。

目前用于胃癌的化疗药层出不穷,但探求高效、低毒、经济的化疗药仍是许多学者坚持不懈的追求目标。该中药的复方制剂中几味药均为传统治疗胃肠癌较为有效的中药。我们研究表明抗癌口服液在体外及体内有较好的抗肿瘤作用,为该中药复方制剂的临床应用及深入研究提供了理论依据。

### 参考文献

- [1] 鄂征.组织培养和分子细胞学技术.1999.3.
- [2] 韩锐,主编.抗癌药物研究与实验技术.北京:北京医科大学/中国协和医科大学联合出版社.1997.4月第一版.
- [3] 邱潮淋,龚玉瑜. TUNEL 法与 MTT 法比较分析检测肿瘤细胞药敏.上海免疫学杂志,2000;20(2):10.
- [4] 高凌、王岱先等.张能芳复方威爪龙制剂抗移植性肿瘤的实验研究.中国药科大学学报,2000,02.20;31(1):44.
- [5] 林志彬.灵芝的抗肿瘤作用机制.基础医学与临床,2000,20(5):7.
- [6] 王力倩,余上才,李仪奎,等.用血清药理学方法研究中药苦参、仙鹤草的抗肿瘤作用[J].中国中医药科技,1995,2(5):19.
- [7] 张群豪、於东晖、林志彬.用血清药理学方法研究灵芝浸膏 GLE 的抑瘤机制[J].北京医科大学学报,2000,32:210.
- [8] 王力倩,余上才,李仪奎,等.用血清药理学方法研究中药苦参、仙鹤草的抗肿瘤作用.中国中医药科技,1995,2(5):19.
- [9] 高凌,王岱先,等.张能芳复方威爪龙制剂抗移植性肿瘤的实验研究.中国药科大学学报,2000.02.20;31(1):44.

收稿日期:2003-06-30