

新抗癌中药——散结片对肝癌细胞超微结构的影响及其抗癌机制的研究

脱朝伟 刘今方 王绍东 丁 铭 王少林

(中国人民解放军第二〇二医院肿瘤研究所,辽宁省沈阳市和平区光荣街5号,110000)

摘要 我们采用光学显微镜、扫描电子显微镜(SEM)和透射电子显微镜(TEM)三者对比的观察方法,研究中药“散结片”对小鼠移植性肝癌细胞形态超微结构的影响及抗癌机理。结果表明,中药散结片对肝癌细胞具有直接杀伤破坏作用,直接作用于肝癌细胞膜系结构,甚至能严重损伤肿瘤细胞,在短时间内造成肝癌细胞崩解碎裂,该作用出现迅速而持久,是中药散结片抗肿瘤作用的主要机制。

关键词 肝癌/中医药疗法; @ 散结片

Impact of New Anticancer Drug-Binds Dissipating Tablet on Ultra-microstructure of Hepatoma Carcinoma Cell and Anticancer Mechanism

Tuo Chaowei, Liu Jinfang, Wang Shaodong, et al.

(Cancer Institute, No. 202 Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Shenyang 110000)

Abstract With the help of Light Microscope, Scanning Electron Microscope (SEM) and Transmission Electron Microscope (TEM), comparative observation was made into the impact of Binds Dissipating Tablet on ultra-microstructure of transplanted Hepatoma Carcinoma Cell (HCC) of mice and the anticancer mechanism. Results have shown the tablet directly killed or seriously damaged HCC through direct action on HCC membrane and produced immediate and long-acting breakdown of HCC with short-term application.

Key Words Hepatoma/ Chinese Medical Therapy; @ Binds Dissipating Tablet

我院依据中医理论及多年临床实践经验研制了中药散结片抗癌新药。其主要成分有白附子、白鲜皮、牛黄,具有清热解毒、活血化瘀、软坚散结之功效。近年来应用于临床,获得满意疗效,尤其是对中晚期肝癌疗效显著。为探讨其作用机理,我们应用光镜、扫描电镜和透射电镜,观察散结片对肝癌细胞杀伤过程,拟从超微结构水平探讨其抗癌机制,为临床应用提供理论依据,现将观察结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料:1)癌细胞株,小白鼠肝癌(HepA)癌株由中国医学科学院药物研究所提供。2)药品,散结片本院肿瘤研究室研制提供。3)配制 PH7.2 RPMI-1640 培养液,滤过消毒。

1.2 实验方法

1.2.1 实验方法与分组: HepA 细胞培养在 RPMI-1640(含 10% 的灭活小牛血清,青霉素 100Hg/ml)培养液中,取对数生长期的 HepA 细胞,配成浓度为 2×10^6 /ml 细胞悬液。每瓶 5ml,分装在培养瓶内,接种细胞的同时给药。实验分成 2 个实验组,1 个空白对照组。2 个实验组再加上等量的散结片 RPMI-1640 培养液,使散结片最终浓度为 5mg/ml,对照组加等容量 RPMI-1640 培养液,每组 10 个样品,混匀置 5% CO₂ 培养

箱中培养 1~3h,并分别于 1h、2h、3h 将上述样品离心(4000 转/min)10min,取细胞沉淀液,即行标本制作。

1.2.2 样品处理及制备:1)光镜样品制备:将细胞沉淀液涂片,干燥固定,HE 染色,在光镜下形态观察。2)扫描电镜样品制备^[2-3]:细胞沉淀液以 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定,乙醇、丙酮逐级脱水,CO₂ 临界点干燥。离子溅射喷金后,日立 S-450 扫描电镜下形态观察。3)透射电镜样品制备^[4]:细胞沉淀液以 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定,乙醇、丙酮逐级脱水,EPON812 包埋,超薄切片,铀铅双重染色,JEI200EX 透射电镜下形态观察。

2 观察结果

2.1 光学显微镜观察:在低倍镜下可观察到经散结片作用后 HepA 细胞膜肿胀、破裂、核固缩、破裂,细胞膜及细胞核溶解以及 HepA 细胞变性坏死等变化。由此可见,散结片对 HepA 细胞具有直接杀伤作用,结果见表 1。

2.2 扫描电子显微镜观察

2.2.1 对照组: HepA 细胞扫描电镜的特点:正常 HepA 细胞呈圆球形和椭圆形,结构完整,细胞丰满,表面布满大量微绒毛,微绒毛清晰。

2.2.2 实验组:散结片作用于 HepA 细胞后扫描电镜

表 1 中药散结片对肝癌细胞形态的影响

作用时间	药物	剂量 mg/ml	细胞数	正常 (%)	细胞肿胀 (%)	核淡染 (%)	核固缩 (%)	细胞破裂 (%)	核碎裂 (%)	核溶解 (%)	细胞坏死 (%)
1h	散结片	5	100	12	11	6	16	43	7	3	2
		25	100	7	5	6	12	59	6	3	2
	对照组	-	100	43	3			3			1
2h	散结片	5	100	13	12		17	47	5	2	4
		25	100	3	7		14	65	9		2
	对照组	-	100	89	3			4			4
3h	散结片	5	100	11	14		13	56	5		1
		25	100	3	11		10	71	4		1
	对照组	-	100	86	2	4		4		4	

改变:1)散结片 5mg/ml 作用 1h,细胞形态有明显改变。细胞囊面微绒毛消失,许多细胞表面光滑,细胞膜系光滑外露,细胞出现小裂孔,且细胞稍有变形。作用 2h,HepA 细胞明显肿胀,表面高低不平,细胞变形,细胞膜缺损,细胞孔明显增大。甚至细胞膜出现较大裂孔。作用 3h,HepA 细胞形态改变似前显著而广泛,细胞出现畸形肿胀,变性细胞继而溃破,亦呈现细胞破碎片状改变。2)散结片 25mg/ml 作用 1h,HepA 细胞破损,有孔洞。作用 2h,HepA 细胞轮廓尚存,细胞膜破碎,细胞膜裂孔显著增大。作用 3h,HepA 细胞通透、破碎、纤维化,甚至成蜂窝状,继而破溃、塌陷,只留细胞残骸。

2.3 透射电镜观察

2.3.1 对照组:HepA 细胞超微结构的特点:正常 HepA 细胞呈圆形,外形完整,细胞膜(CM)境界清晰,个别细胞可看到 3 层单位膜,从细胞膜延伸大量的微绒毛(MV)。细胞器所见,癌细胞分化程度较低,整体观察细胞器有典型结构。线粒体(MI)呈圆形或椭圆形,共嵴完整。粗面内质网(RER)丰富,呈层状排列,表面有核蛋白体。在细胞质内游离的多聚核蛋白体(RI)较丰富。在胞质内可见高尔基复合体(GO),及溶酶体,并可见类脂体(LI),多泡体和糖原颗粒(GI),细胞核(NU)大,有的呈多核或分叶核,但境界清晰,可见核膜孔,核仁增大,并可见到多个核仁。异染色质及常染色质均匀分布在核质中。总之,HepA 细胞分化程度低,呈恶性变化。

2.3.2 实验组:散结片作用于 HepA 细胞后超微结构的改变如下。1)散结片 5mg/ml 作用 1h,HepA 细胞形态主要改变为 HepA 细胞微绒毛脱落,单位膜部分溶解破坏,结构全部消失。细胞器所属膜系结构,线粒体肿胀。嵴消失,呈空泡化,粗面内质网扩张。细胞核周间隙基本消失,核膜孔消失,核膜溶融为单层且浓染,内侧附满薄层异染色质,相当于加厚的膜。作用 2h,

使 HepA 细胞膜多处溶解破坏,整个细胞呈空泡样改变,线粒体已呈溶解状,有细胞核坏死现象,有的细胞仍有完整的畸形核。作用 3h,HepA 细胞质膜崩解破裂,线粒体空泡化,细胞器全部消失,整个细胞呈溶解坏死状。2)散结片 25mg/ml 作用 1h,主要改变为 HepA 细胞程度不同的致死损伤性形态改变。HepA 在细胞质膜全部消失,质膜溶解破坏,胞质结构紊乱,胞质裸露,线粒体肿胀,呈空泡化,粗面内质网扩张,可见少量残余核糖体。细胞核大而畸形,核周间隙消失。核膜孔消失,核内主要为异染色质,常染色质较少。作用 2h,HepA 细胞质膜溶解呈破碎坏死状,细胞核破解,核内常染色质消失,出现核质透明区。作用 3h,HepA 细胞完全崩解,膜系结构全部消失,细胞核碎裂,核仁消失,呈固缩样高密度核残体,导致细胞整体崩溃。

3 讨论

本文应用光学显微镜,扫描电镜和透射电镜三者对比分析观察中药“散结片”对肝癌细胞的杀伤过程。观察结果表明,散结片对肝癌细胞有显著的杀伤破坏作用,直接作用于肝癌细胞膜系结构,在短时间内造成肝癌细胞崩解碎裂,这与散结片临床应用的实际相符。《新抗癌中药—散结片治疗后的肝癌细胞超微结构的研究》^[1]证明肝癌细胞萎缩坏死,癌细胞明显变小,核变小,核仁减少与消失。染色质溶解和癌细胞间有许多坏死区,细胞结构消失,可见崩解的细胞器碎片及细胞质膜破损。这些改变导致癌细胞物质代谢和能量代谢障碍的研究结果与上述实验是相一致的。同时也证明了本实验所应用的电镜技术研究散结片抗癌机制,是一项具有科学价值的新方法。

光镜下观察其药理作用,实验结果证明肝癌细胞膜在散结片作用下其通透性发生了改变,肝癌细胞膜破裂、细胞核固缩、核破裂、细胞膜与细胞核溶解及细胞变性坏死等变化,细胞变性坏死的程度与散结片的药物浓度和作用时间呈正性相关。

电镜超微结构观察结果表明,散结片对肝癌细胞有致死损伤性形态改变,对肝癌的癌细胞质的脂类、蛋白质及糖类三种成分组成的细胞膜,有使其溶解破坏的作用,致使癌细胞失去屏障支架作用,并破坏了癌细胞的代谢功能。癌细胞变性,核蛋白体溶解和常染色质的消失都充分说明了散结片能阻断癌细胞蛋白质的合成作用,而导致癌细胞的崩溃。

扫描电镜与透射电镜的对比分析,透射电镜已证明散结片能使肝癌细胞质膜破溃,这一改变与扫描电镜下改变是相一致的。我们认为 5mg/ml 2h 与 25mg/ml 1h 对肝癌细胞的杀伤作用大致相同。肝癌细胞微绒毛损伤严重,细胞膜光滑外露有破损,出现较大破孔,线粒体肿胀,空泡化,其他细胞器有严重损伤。观察所见药物作用时间越长对肝癌细胞杀伤作用越严重。25mg/ml 3h 能使其细胞破裂,整个细胞呈空泡样

变性。上述药理作用,为散结片抗肿瘤机制提供了形态学基础。本研究证明,散结片对肝癌细胞具有迅速而强大的杀伤破坏作用,对肝癌细胞膜的杀伤破坏,是中药散结片发挥抗肿瘤作用的重要机制。

参考文献

- [1] Zhou X, et al. Hepato and its treatment in china in Uchino J, eds. Hepatocellular carcinoma epidemiology, pathogenesis, diagnosis and treatment. Sapporo: Fuji Shoin 408, 1989.
- [2] 松本明. 电子显微镜研究实际——生物学、医学在中心. 第 1 版. 近代出版社, 1979; 205-209.
- [3] 田中敬. 图说走查电子显微镜——生物试料制法——第 1 版. 超仓书店, 1980; 77-99, 240.
- [4] 虹涛. 生物医学超微结构与电子显微镜技术. 科学出版社, 1984; 111-115.
- [5] 脱朝伟. 新抗癌中药——散结片治疗后的肝癌细胞超微结构研究全军新药鉴定会上宣读. 电子显微学报, 1989.

(2007-03-16 收稿)

针药并用治疗膝关节创伤性滑膜炎 35 例

慈 兰

(* 河南省兰考县中医院针灸科, 475300)

关键词 膝关节创伤性滑膜炎/中医药疗法

膝关节由于急性创伤或慢性劳损,可致滑膜的炎症渗出,呈现滑膜腔积液。自 2004 年 10 月~2006 年 4 月笔者运用自拟化痰祛湿汤配合针灸拔罐的方法治疗本病,取得了明显的效果,现报告如下。

1 一般资料

观察病例共 70 例,均为门诊患者。治疗组 35 例,其中男 14 例,女 21 例;年龄 23~76 岁,病程 14 天~6 年;单侧膝关节病变 22 例,双侧膝关节病变 13 例。其中膝关节屈伸障碍,股四头肌萎缩者 4 例。对照组 35 例,其中男 15 例,女 20 例;年龄 22~75 岁,病程 15 天~16 年;单侧膝关节病变 21 例,双侧膝关节病变 14 例。其中膝关节屈伸障碍,股四头肌萎缩者 3 例。两组在性别、年龄分布、病情等方面差异均无显著意义($P>0.05$)且有可比性。诊断依据:参照 1994 年国家中医药管理局制定的《中医病证诊断疗效标准》膝关节创伤性滑膜炎的诊断依据:1) 膝部外伤史或劳损史。2) 多发于年老、体胖者。3) 膝关节肿胀、膨隆、胀痛,屈膝困难。4) 浮髌试验阳性。

2 治疗方法

2.1 治疗组:1) 中药:自拟化痰祛湿汤。基本方:桃仁 10g,红花 10g,当归 10g,鸡血藤 25g,茯苓 15g,萆薢 20g,川牛膝 15g,木瓜 25g。加减:疼痛明显者,加全蝎 10g,地龙 10g;兼湿热者,加苍术 6g,黄柏 6g;肌肉萎缩者,加乌蛇 6g,黄芪 15g,川续断 15g。上方加水 600ml,煎汁 400ml,每天 1 剂,早晚各服 1 次,7 天为 1 个疗程,疗程间间隔 2 天。2) 针灸:以局部取穴为主。穴位:鹤顶,犊鼻,足三里,阳陵泉,阴陵泉。手法:平补平泻,每天针灸 1 次,7 天为 1 个疗程,共针灸 3 个疗程。疗程间间隔 2 天。3) 拔

罐:起针后,用闪火法在针刺的穴位处拔罐,每日 1 次,7 天为 1 个疗程,共 3 个疗程,疗程间间隔 2 天。以上方法,治疗 3 个疗程后进行疗效评价。

2.2 对照组:采用口服双氯灭痛片,每次 2 片,1 日 3 次;元胡止痛片,每次 2 片,1 日 3 次;维生素 C 片,每次 0.2g,1 日 3 次;连服 7 天为 1 个疗程,3 个疗程后进行疗效评价。

3 疗效标准与治疗结果

3.1 疗效标准:参照 1994 年国家中医药管理局制定的《中医病证诊断疗效标准》膝关节创伤性滑膜炎的疗效标准:1) 治愈:疼痛肿胀消失,膝关节活动正常,浮髌试验阴性,无复发。2) 好转:膝关节肿痛减轻,关节活动功能改善。3) 未愈:症状无改善,并见肌肉萎缩,或关节强硬。

3.2 治疗结果:治疗组,治愈 22 例,好转 10 例,无效 3 例,总有效率 91.4%;对照组,治愈 9 例,好转 16 例,无效 10 例,总有效率 71.4%。两组总有效率比较,差异有显著意义($P<0.05$),治疗组优于对照组。

4 体会

中医学认为本病属“痹证”范畴,病机为瘀血、水湿滞留筋肌,阻遏气血所致。其急性者多为外伤,离经之血凝滞筋膜,与湿相结聚于肌腠,留滞经络骨节而发病,故出现受病的关节沉重、胀痛。故本病以行气活血、利湿消肿为基本治则。用桃仁、红花活血化痰;当归活血补血;鸡血藤补血行血、舒筋活络;茯苓、萆薢健脾利湿消肿;川牛膝为引经药,善于走下肢,且配木瓜善治下肢风湿痹痛,脚膝拘挛。全方合用则湿除痰化,肿痛自消,病情自愈。

(2007-05-22 收稿)