

中药散剂在抗肿瘤转移实验中的研究

魏华民 花宝金

(中国中医科学院广安门医院肿瘤科,北京,100053)

摘要 目的:中药散剂在动物实验中应用较少,本研究重在对比中药散剂和煎剂在肿瘤学常规体内外实验中的差异。方法:根据文献及药物特性制备双参颗粒散剂、煎剂及醇提产物,体外实验对比醇提双参颗粒散剂和传统水煎剂对 Lewis 肺癌细胞的影响;动物实验观察 2 种剂型对 C57BL/6 荷瘤小鼠肺转移的抑制作用。结果:和传统煎剂相比,双参颗粒醇提产物对肿瘤细胞有更明显的抑制增殖及迁移、促进凋亡的作用,其优势在于抑制早期肿瘤生长的作用,对肺转移无显著优势。结论:中药散剂和传统汤剂在肿瘤学常规实验中有较大差别,应进一步深入研究。

关键词 中药散剂;水煎剂;肿瘤

Study of Chinese Medicine Power in Anti-Tumor Metastasis Experiment

Wei Huamin, Hua Baojin

(Oncology department, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

Abstract Objective: There are few applications of Chinese medicine powder in animal experiments. This study is to compare the differences between the Chinese medicine powder and decoction in oncology experiment in vitro and vivo. **Methods:** Shuangshen granules power, decoction and alcohol extract were prepared based on the literature and characters of the medicinals. In vitro experiment, the effects of Shuangshen granules power alcohol extract and traditional decoction on lewis lung cancer cells were compared; in vivo experiment, two dosage forms were compared in efficacy on lung metastasis inhibition in C57BL/6 tumor-bearing mice. **Results:** The powder had more obvious effects on growth/migration inhibitory and apoptosis promotion, which also showed better effects on early tumor-growth inhibition than decoction, but not on lung metastasis. **Conclusion:** There is great difference between Chinese medicine power and decoction in oncology routine experiment, therefore more research should be done with it.

Key Words Chinese Medicine Power; Decoction; Oncology

中图分类号:R283. 6;285. 5 文献标识码:A doi:10. 3969/j. issn. 1673 - 7202. 2017. 02. 039

中药散剂是传统的中药剂型之一,在临床治疗中有其特定的优势与不可替代性。但目前中药相关动物实验中多为中药煎煮灌胃,以散剂进行的啮齿类动物实验研究较少。而文献提示:有些药物的有效成分不溶于水或难溶于水,散剂作为弥补这一缺陷的重要方式缺乏相应的实验研究。本试验以双参颗粒为例,对比了散剂与传统水煎剂对肿瘤细胞的作用差异及对荷瘤小鼠肺转移的影响,发现散剂醇提产物与传统汤剂相比对肿瘤细胞的增殖有更明显的抑制作用,还可促进肿瘤细胞凋亡并抑制其迁移能力,并抑制早期肿瘤生长,这不仅为散剂在临床中的应用提供实验数据支持,而且为探索中药散剂在啮齿类动物实验研究中的进一步应用提供了新思路。

1 材料与方法

1. 1 材料

1. 1. 1 细胞株 Lewis 肿瘤细胞购自国家实验细胞资源共享平台,用高糖 DMEM 培养液(hyclone)加 10% 胎牛血清(Gibco)培养,取对数生长期细胞进行细胞实验。

1. 1. 2 动物 SPF 级 C57BL/6 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,雄性,19 ~ 21 g,饲养于中国中医科学院广安门医院动物房,符合中国中医科学院广安门医院动物实验伦理委员会标准。

1. 1. 3 药物 1) 双参颗粒散剂饲料制备:西洋参、冬虫夏草、三七(1:1:6)3 种中药饮片均由中国中医科学院广安门医院中药房提供(产品批号 412041)。3 种药物均经紫外线联合 75% 乙醇灭菌,卫生质量符合 2000 版《中华人民共和国药典》标准^[1]。干燥温度控制在 30 ℃,干燥后用无菌粉碎机进行粉碎并过 100 目筛备用。按照小鼠进食量 4 g/d(前期摸索结果)计算,将药粉和小鼠饲料混合(散剂饲料浓度

基金项目:国家科技部重点领域创新团队项目(编号:RA20134022);国家自然科学基金项目(编号:81273718;81102719);国家自然科学基金青年项目(编号:81603601);中国中医科学院肿瘤扶正培本创新团队项目(编号:YS1305)

作者简介:魏华民(1984. 09—),男,在读博士研究生,主治医师,研究方向:中医药治疗肿瘤,E-mail:wei.huamin6255@126. com

通信作者:花宝金(1964. 06—),男,博士,主任医师,中国中医科学院广安门医院副院长,研究方向:中医药治疗肿瘤,E-mail:huabaojin@sohu. com

为 4.5%) 进行实验, 平均每只小鼠进食药物为 180 mg/d。2) 双参颗粒醇提产物制备: 根据文献, 三七醇提 2 次, 乙醇浓度 85%, 加醇倍量 6 mL/g, 提取时间 7.5 h^[2-4]; 西洋参醇提 2 次, 乙醇浓度为 70%, 加醇倍量 8 mL/g, 提取时间 4 h^[5-6]; 冬虫夏草醇提 2 次, 乙醇浓度为 75%, 加醇倍量为 8 mL/g, 提取时间为 24 h, 提取温度为 23 ~ 25 °C^[7-8]。各组提取产物均离心 (2 200 r/min) 得到醇提产物, 三者混合并调至合适细胞生长的渗透压及 pH 值即为双参颗粒醇提物。3) 传统水煎剂即用去离子水煎煮 3 种按比例配置的药材饮片, 煎煮时间为 1 h, 煎煮 2 次, 将水煎剂浓缩至相应体积, 药物浓度为 180 mg/200 μL。

1.1.4 试剂 Cell Counting Kit-8 试剂盒 (DOJINDO, CK04-500); Annexin V-FITC Apoptosis Detection 试剂盒 (Abcam, ab14085); Bouin's Fluid (江莱生物, DF0010)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 小鼠在动物房适应性喂养 7 d 后, 于实验前按体重对小鼠进行分组, 保证 2 组体重比较差异无统计学意义, 且散剂组采用单笼饲养, 以精确计算小鼠食量。取 1×10^6 对数生长期细胞接种于 C57BL/6 小鼠背部皮下构建小鼠肺癌模型。

1.2.2 给药方法 传统水煎剂组 ($n = 20$), 每只小鼠每天灌胃 200 μL 双参颗粒水煎剂; 散剂组 ($n = 20$), 由动物自由进食, 每天称饲料重量, 计算小鼠实际进食药量。

1.3 检测指标与方法 观察 24 h、48 h、72 h 细胞增殖、凋亡和迁移情况, 实验结束时, 将处死小鼠肺部病灶制成病理切片, 置于显微镜下拍照观察。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 2 组之间计数资料比较采用两样本间 t 检验, 采用 log-rank 检验比较 2 组生存时间, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况 2 组动物观察共 35 d, 观察期间 2 组体重、动物活动能力、皮毛光泽及平均进食量未见明显差异。未观察到动物不良反应, 未出现动物异常损失情况。

2.2 体外细胞实验

2.2.1 细胞增殖实验 采用相同药物浓度 (25 μg/μL) 的醇提产物及传统水煎剂进行细胞增殖实验, 结果如下: 2 组药物在 24 h 对肿瘤细胞的生长未见明显差异, 在 48 h 及 72 h 时, 醇提组和水煎剂对肿

瘤细胞生长的抑制率分别从 (0.25 ± 0.02) , (0.56 ± 0.03) 上升至 (0.27 ± 0.02) 和 (0.89 ± 0.02) , 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

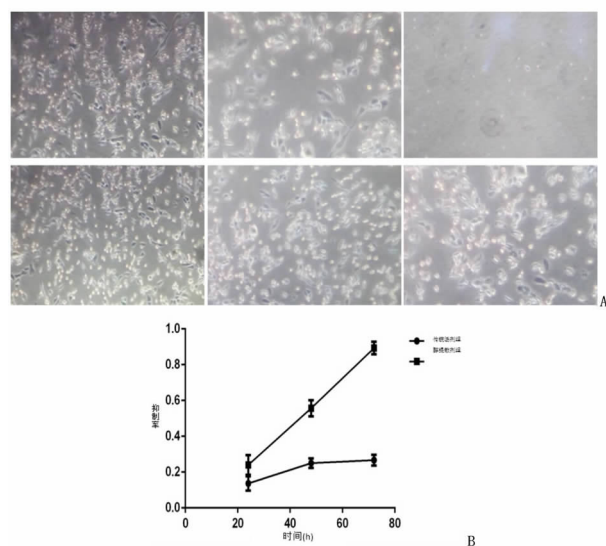


图1 A为Lewis细胞增殖图片; B为2组药物对细胞增殖的抑制情况

注: A上3图分别为 24 h、48 h、72 h 醇提散剂组细胞增殖情况; A下3图分别为 24 h、48 h、72 h 传统汤剂组细胞增殖情况。

2.2.2 细胞凋亡实验 我们进一步研究了 2 组不同制剂对肿瘤细胞凋亡的影响, 其中在 24 h 即表现出明显的差异, 如图 2 所示, 24 h 中药干预和正常组比较, 水煎剂组对肿瘤细胞的凋亡略显促进, 但差异无统计学意义; 而醇提组肿瘤细胞表现出较明显的早期凋亡, 2 组比较差异有统计学意义 ($P = 0.002$)。

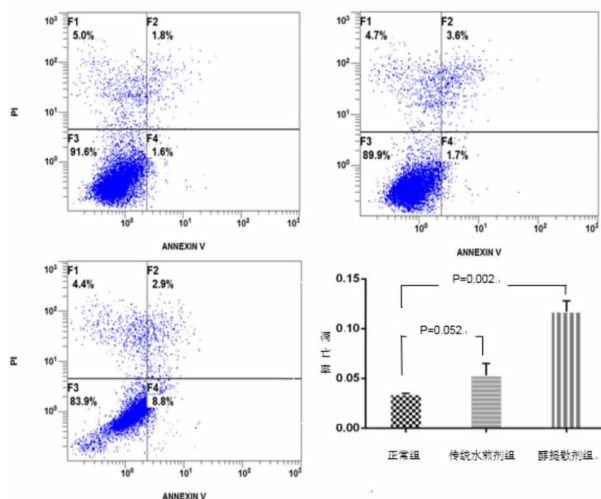


图2 醇提散剂药物和传统水煎剂药物作用 24 h 对 Lewis 细胞凋亡的影响

注: 上图左、右及下图左侧分别为正常组、传统煎剂组和醇提散剂组; 下图右侧为 2 组药物对细胞凋亡率比较。

2.2.3 细胞迁移实验 肿瘤细胞的迁移能力是肿瘤发生转移的重要条件,所以评估肿瘤细胞迁移是肿瘤常规实验中的重要环节。我们分析了 24、48、72 h 3 个时间点,观察 2 种制剂对肿瘤细胞迁移的影响,图 3 为 72 h 时正常组、水煎剂组及醇提组

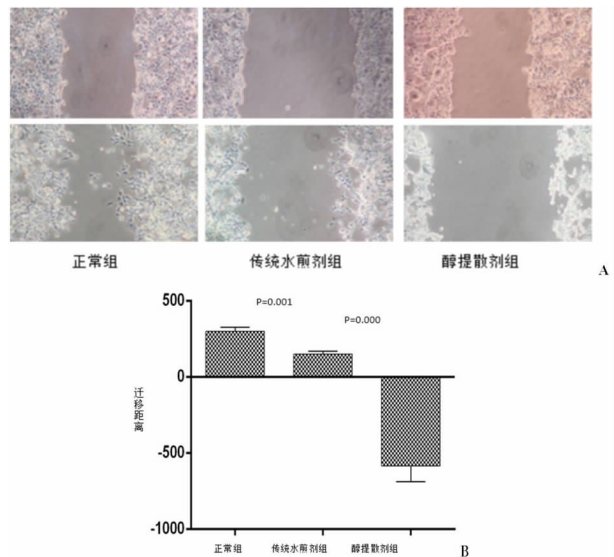


图 3 醇提散剂药物和传统水煎剂药物作用 72 h 对细胞迁移的影响

注:A 上 3 图分别为 0 h 正常组、传统煎剂组和醇提散剂组的细胞划痕图片;A 下 3 图分别为 3 组 72 h 时划痕实验图片。

2.3 动物实验

2.3.1 抑瘤效果及对小鼠生存期的影响 观察至接种后 35 d,2 组小鼠实际进食药物量分别为散剂 162 mg/d 和水煎剂 180 mg/d ($P=0.000$)。2 组抑制肿瘤早期生长差异显著(图 4),其中第 14 天差异最大($P=0.010$),之后随着肿瘤的不断长大,2 组之间差异逐渐消失。生存期方面,2 组比较差异无统计学意义($P=0.635$)。

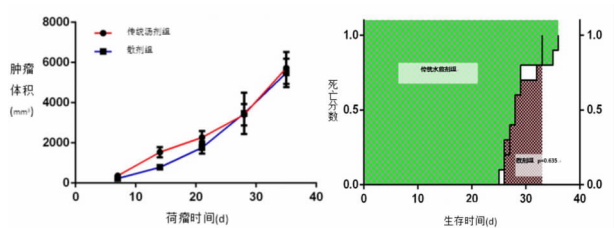


图 4 不同剂型双参颗粒对肿瘤体积和小鼠生存期的影响 注:左图片 2 组肿瘤体积比较(长×宽²),右图为生存时间(绿色部分为传统水煎剂,褐色部分为散剂)。

2.3.2 对肺转移的影响 接种 GFP+ Lewis 肿瘤细

胞第 35 天时取小鼠肺切片,荧光显微镜观察 2 组肺转移的荧光值及相对面积,散剂组平均荧光值为 (15.35 ± 0.53), 荧光面积比例(% Area) 为 (54.51 ± 2.15)。水煎剂组为 (15.48 ± 0.37) 和 (57.51 ± 0.73)。无论是荧光值还是荧光面积比较,2 组差异无统计学意义 ($P=0.8071$ 和 $P=0.2023$)。见图 5。

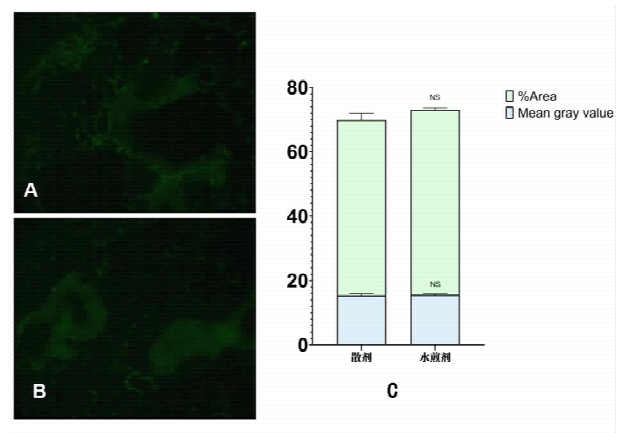


图 5 2 种剂型对肺转移的影响比较 注:A 图为散剂组,B 图为水煎剂组,C 图为 2 组荧光值及面积比较。

3 讨论

双参颗粒是中国中医科学院广安门医院花宝金教授研制的用于肺癌术后抗复发转移的中药散剂,在临床取得较好的效果并申请国家专利。我们以该药为例,从动物和细胞实验证实,中药散剂具有传统汤剂不可替代的作用。

中药散剂属于中药传统剂型之一,古书中有“散者散也,去疾病用之”的说法。中药成分复杂,有些药物的有效成分不溶于水或难溶于水,必须直接吞服药粉,通过消化道分解吸收。有些药物不能高温煎熬,有效成分容易破坏;有些贵重药物只有通过吞服才能确保疗效又不造成浪费。散剂的药物面积大,与溶媒的接触面大,具有易分散、奏效快的特点,有效成分易溶出,与汤剂相比,更省药材而疗效不减。散剂在临床应用中具有一定的不可替代性,实验研究证实五苓散散剂比汤剂在利尿消肿方面疗效显著^[9],基础实验证实:五苓散汤剂中低极性化学成分较散剂中严重缺失,可能是其临床疗效差异的主要原因^[10]。

虽然目前临床应用散剂相对广泛,但基础实验应用散剂较多的集中于兽医学,临床医学基础实验涉及的中药散剂较少,不能反映散剂在治疗疾病中的真正价值。我们通过实验证实,双参颗粒散剂虽然在延长荷瘤小鼠生存期及肺转移方面未显示出优

于传统煎剂的价值,但病理切片提示,散剂明显抑制微观转移灶的形成,且细胞实验提示其具有传统汤剂不具备的对肿瘤细胞的抑制作用,这可能与高温对皂苷成分有一定的破坏作用有关^[11],也可能与不同条件下药物析出成分差异有关^[12-13]。这提示我们,对于不同的疾病,应采用不同的剂型,以保证药物发挥最佳的效应。当然本研究只是采用了散剂的传统制备方法来说明问题,最近散剂剂型已经有了新的发展,如超微粉体技术就是较传统散剂更有效的现代综合技术,不仅使药材破壁率大大提高,还能加快固体药物的溶解、释放,提高生物利用度,提高临床疗效^[14]。此外,中药粒子设计技术及中药超微速溶饮片也为散剂的研究提供了新的研究思路^[15-16]。这些新技术均应在临床基础实验中得到广泛研究,避免只用传统汤剂进行动物实验而不能充分显示中医中药的治疗效果。

本实验只初步评估了散剂较传统汤剂的优势作用,但仍存在一下缺点:1)双参颗粒临床中用于肺癌术后患者,可能是本试验在延长生存期及肺癌转移方面未得出阳性结果的主要原因,针对肺癌术后小鼠的实验可能更能显示出散剂的优势。2)本实验提示,中药治疗肿瘤的优势在于肿瘤负荷较轻时,针对无肿瘤负荷给药即肿瘤转移前微环境给药可能得到更好的效果。3)本实验未能进行中药质谱分析,对中药进行精确的含量控制可为以后药物提纯及新药开发提供更可靠的基础。

参考文献

[1]刘辉.3 种灭菌法对中药散剂卫生学质量的影响[J].广东药学院

学报,1999,15(1):52-53.

[2]陈华丽.三七醇提与水沉工艺研究[D].杭州:浙江大学,2015.

[3]陈培丰,刘鲁明,陈震,等.三七醇提液对恶性肿瘤肝转移的干预作用[J].中西医结合学报,2006,4(5):500-503.

[4]何静雯,罗干明.正交试验法优选三七提取工艺[J].中成药,2005,27(8):964-966.

[5]王冬雪,谢海龙,吴雪,等.西洋参中总皂苷的提取工艺研究[J].黑龙江科技信息,2016(4):139-140.

[6]李素婷,刘郁.正交试验法优选西洋参提取工艺[J].中国生化药物杂志,2011,32(6):478-479.

[7]李晓磊,赵珺,高长城,等.虫草醇提物的抗氧化活性及保健酒的研制[J].食品工业科技,2010,31(6):229-231.

[8]李志,黄俊明,杨颖,等.人工蛹虫草子实体醇提物遗传毒性分析[J].中国公共卫生,2010,26(9):1168-1169.

[9]金汝真,余仁欢,高辉,等.五苓散与五苓汤治疗肾病综合征水湿内停证的临床对照研究[J].中医杂志,2012,53(7):572-573,577.

[10]孙彩霞,王建农,韩林.五苓方汤、散剂低极性化学成分差异研究[J].中药材,2016,39(2):367-370.

[11]武双,郭从亮,崔秀明,等.炮制前处理对三七中三七皂苷含量的影响[J].中国医院药学杂志,2015,35(24):2208-2212.

[12]王梓.热裂解人参皂苷的分析、制备工艺及抗肿瘤活性研究[D].吉林:吉林农业大学,2015.

[13]李泽仟,张亚,康乐,等.西洋参煎煮工艺的优化及煎煮液气味活性化合物的分析[J].食品科技,2015(6):333-339.

[14]蔡光先,李跃辉,杨永华.生脉超微颗粒与其散剂的体外溶出度研究[J].中国医药学报,2004,19(10):603-606.

[15]杨明,韩丽,杨胜,等.基于传统丸、散剂特点的中药粒子设计技术研究[J].中草药,2012,43(1):9-14.

[16]蔡光先,胡学军,刘芳.26 味常用中药散剂中的用量研究[J].中国实验方剂学杂志,2005,11(1):63-64.

(2017-01-11 收稿 责任编辑:王明)

(上接第 393 页)

[5]瓮恒,曲中平.麦门冬汤加减治疗特发性肺间质纤维化 32 例临床观察[J].国医论坛,2008,23(1):6-7.

[6]陆国辉,李艳茹,高健美.甘草干姜汤对博来霉素诱导的大鼠肺纤维化 SIRT1 和 TGF- β 1 蛋白表达的影响[J].中药药理与临床,2014,30(6):25-28.

[7]Chaudhary NI, Schnapp A, Park JE. Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 173(7):769-776.

[8]Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 294(2):L152-L160.

[9]李瑞琴,宋建平,张瑞,等.麦门冬汤对肺纤维化模型早期阶段肺组织中 TNF- α 、IL-10 表达的影响[J].中医研究,2009,22(9):10-13.

[10]杨美凤,谢忠礼,宋建平.麦门冬汤对大鼠肺纤维化形成阶段肺

及海马 DA、NE、5-HT 的干预作用[J].中医研究,2012,25(6):73-75.

[11]孙成成,谢雁鸣,焦以庆,等.基于医院信息系统的肺纤维化患者临床特征与中西药联合应用分析[J].辽宁中医药大学学报,2016,18(7):114-117.

[12]覃冬云,谢佳星,吴铁,等.甘草酸对血清和组织胺诱发的大鼠气道平滑肌细胞增生的影响[J].中国药理学通报,2004,20(8):904-907.

[13]营大礼.干姜化学成分及药理作用研究进展[J].中国药房,2008,19(18):1435-1436.

[14]中华医学会呼吸病学分会间质性肺疾病学组.特发性肺纤维化诊断和治疗中国专家共识[J].中华结核和呼吸杂志,2016,39(6):427-432.

(2016-10-20 收稿 责任编辑:洪志强)