

癌灵1号注射液对人肝癌 细胞杀伤动力学研究

哈尔滨医科大学附属第一医院 李元善 张亭栋

附属肿瘤研究所 王兴彬 刘旭

癌灵1号注射液系哈医大附属第一医院自制的抗癌药物,内含中药砒石、轻粉,1972年以来应用临床治疗急性非淋巴细胞白血病,效果满意⁽¹⁾。1981年配合手术切除治疗42例晚期原发性肝癌,3年生存率42%,其中5例生存5年以上,而单纯手术组3年生存率仅8%,且无生存3年以上者⁽²⁾。为进一步证实该剂对人肝癌细胞的效果及作用机理,我们对肝癌细胞的生长率、存活率、细胞分裂指数、杀伤作用方式以及细胞生长周期的影响进行了实验研究,报告如下。

实验材料和方法

1、材料来源:癌灵I号注射液由第一医院制剂室提供。肝癌细胞系由江苏省启东肝癌研究所引入。1640培养基由日本进口,加20%小牛血清。氚一胸腺嘧啶核苷(³H-TdR),核4乳胶均用北京401所新产品。

2、实验方法:采用放射自显影法。①生长率测定采用生长曲线,存活率及分裂指数三个指标。使用25ml方型培养瓶,每瓶加培养液3ml,接种细胞量为 2×10^6 个/ml。试验组加入癌灵I号 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$,阳性对照组加高三尖杉酯碱 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 空白组不加药。加药后每隔24小时每组取出2瓶,至144小时结束,样品经处理后用血球计数板计细胞总数,用苔盼兰染色计存活细胞数,按一鞭染色体制片方法制片⁽³⁾,计分裂指数。②杀伤作用方式试验:在经处理过的小瓶中加入含 2×10^6 个细胞的1640培养液1ml;试验组加入癌灵I号 $60 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 四个浓度。对照组加抗代谢药氟脲嘧啶为 $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $75 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $7.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、四个浓度、所加药物

均用PBS稀释后每瓶加入 $60 \mu\text{l}$ 于24、48、72、96小时每组对3瓶,用苔盼兰染色计存活细胞数,制成时间反应曲线。③生长周期影响试验:采用³H-TdR连续标记法,在细胞生长对数期时加入:³H-TdR $2 \mu\text{c}/\text{ml}$,空组加生理盐水 $3 \mu\text{l}/\text{ml}$,试验组加癌灵I号 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$,培养瓶中加入 $20 \times 8 \text{ mm}$ 盖片,连续采样至16小时。取出盖片后经冲洗、固定、贴附⁽⁴⁾,涂胶、曝光、显定影⁽⁵⁾,甲苯胺兰染色后计数标记指数(LI)和记算分裂指数(MI),作图⁽⁶⁾、并用回归分析细胞增殖周期。

实验结果

1. 癌灵1号对肝癌细胞生长率的影响:(图1)

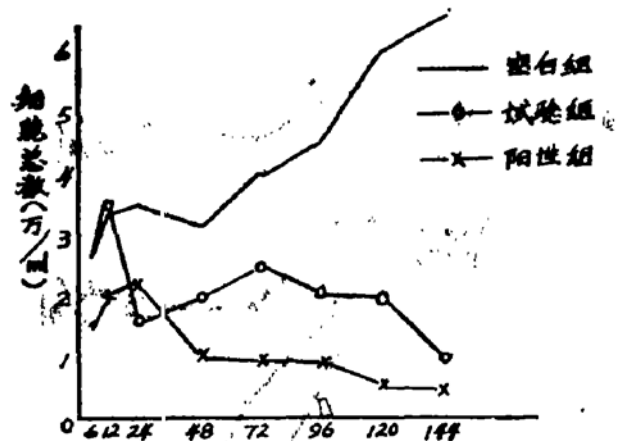


图1 加药后培养时间(小时)

图1说明该剂对肝癌细胞生长有显著抑制作用,24小时试验组细胞总数降至 $1.67 \text{ 万}/\text{ml}$,明显低于空白组,并一直维持较低水平,空白组与试验组和阳性对照组P值 < 0.01 ,试验组与阳性对照组无差异($P > 0.05$)。

2. 癌灵1号对肝癌细胞存活率影响(图2)

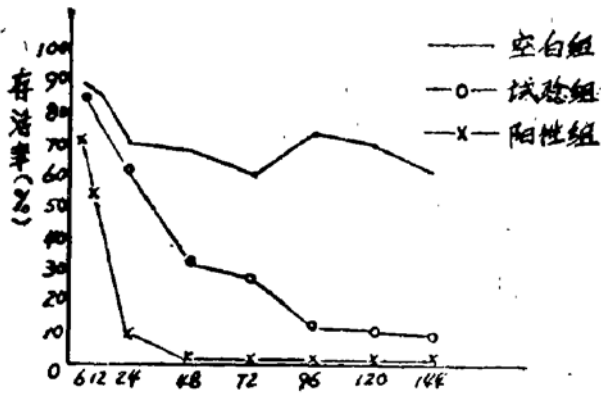


图2 加药后培养时间(小时)

图2, 试验组于48小时存活细胞明显下降, 于96小时降至最低水平, 存活细胞仅10.5%, 但此浓度尚不能将全部细胞杀死。空白组与试验组P值 <0.01 , 说明该剂有明显的杀细胞作用。

3. 癌灵I号对细胞分裂指数影响(图3)

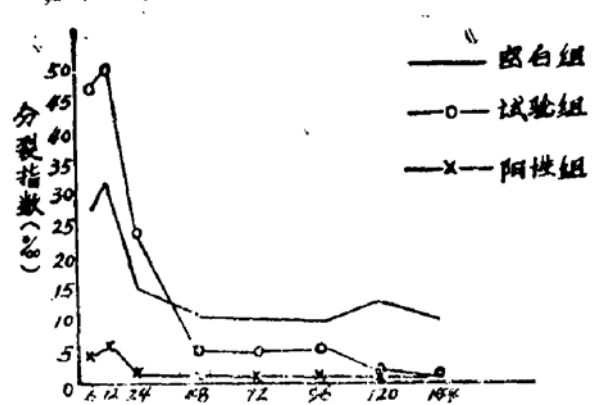


图3 加药后培养时间(小时)

图3中试验组在6、12、24小时分裂指数高于空白组, 48小时后明显降低, 且一直在较低水平, 144小时降至0, 统计学处理 $P>0.05$, 说明在此浓度下, 该剂无明显抑制细胞分裂作用。

4. 癌灵I号对肝癌细胞杀伤方式(图4、5)

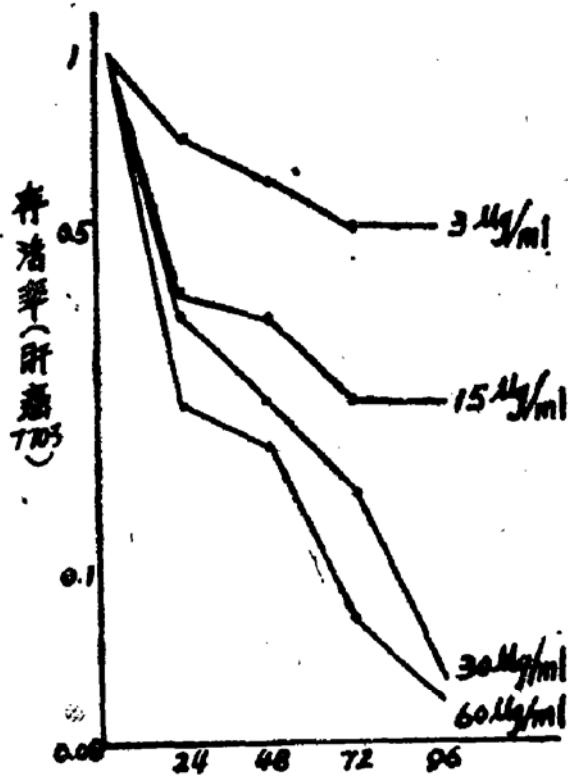


图4 作用时间(小时)
癌灵I号对细胞杀伤特点曲线

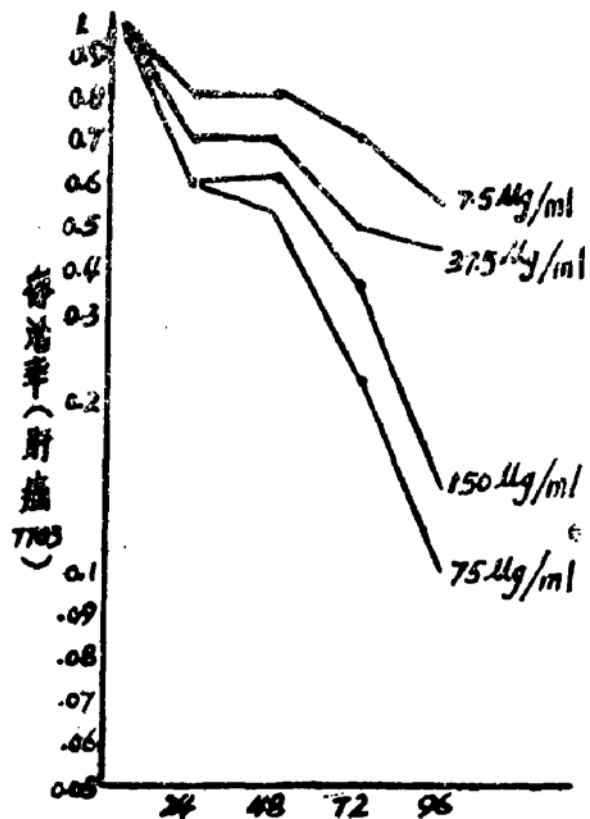


图5 作用时间(小时)
氟尿嘧啶对细胞杀伤特点曲线

从半对数标绘的时间反应曲线中显示出, 癌灵 I 号 (图 4) 于 24 小时已明显看出不同浓度作用的差异性, 显出浓度依赖性特点。而氟脲嘧啶 (图 5) 则具有明显的时间依赖性特点, 即 48 小时前浓度差异对细胞杀伤作用比较接近, 随着时间的延长而显示出浓度作用。说明, 氟脲嘧啶是细胞周期特异性抗代谢药物, 而癌灵 I 号的杀伤作用是以直接杀伤为主。

5. 癌灵 I 号对肝癌细胞增殖周期的影响: 空白组与试验组标记指数于 14 小时达最高峰, 在采用回归分析方法作出的标记指数曲线和标记分裂指数曲线, 所求得的增殖周期各期时间无统计学意义。

讨 论

原发性肝细胞癌仍是目前各种肿瘤中最难功克的恶性肿瘤, 早期尚可配合手术治疗, 但生存期很短⁽⁷⁾, 晚期只可以姑息治疗一般最长生存期均在 3 个月以内, 尽管部分病人虽能进行广泛的肝叶切除, 但也不能完全消除肝癌细胞的存在, 因此就提示出必须加强综合疗法以延长生存期。我们以癌灵 I 号配合手术治疗, 生存期延长一倍以上;

显示出较好疗效。癌灵 I 号由中药砒石, 轻粉制成, 《本草纲目》中记载“砒石解毒治瘰、烂肉, 蚀痰腐瘰病, 痈疽败肉”“轻粉治痰涎积滞, 鼓胀毒疮”⁽⁸⁾此二药均具有去腐生新的功能。临床病理发现投药组的癌细胞核内常见大空泡形成, 其它结构均被破坏, 常见流产型分裂象, 而癌周肝细胞改变无明显差别, 证明该药对正常肝细胞无明显毒性作用。本实验结果证实癌灵 I 号注射液对人肝细胞癌的生长率、存活率均有显著抑制作用, 当加药 24 小时即显示明显的不同浓度作用的差异性。提示本剂浓度依赖性特点。癌灵 I 号注射液对肝癌细胞直接杀伤, 是细胞周期非特异性药物。本剂的临床作用为治疗原发性肝癌提供了一个新的药物。

参 考 文 献

1. 张亭栋等, 黑龙江中医药 (4), 35 1982
2. 李广华等, 实用外科杂志 1 (2): 95 1981
3. 方锦声等, 江苏省医学情报研究所编 34 页 1981
4. 鄂征等, 组织培养技术 人民卫生出版社 1982 年版 208 页
5. 刘鼎新, 放射自显影讲义, 中国解剖学会 1982 年
6. 大星章一等, 人癌细胞培养, 科学出版社 1979 年
7. 应越英等, 中华医学, 59 (7), 410 1979
8. 李时珍 本草纲目, 人民卫生出版社 1979 年版

CLINICAL AND EXPERIMENTAL STUDIES OF TREATING ACUTE NON-LYMPHATIC LEUKEMIA WITH AILING-L INJECTION. PART THREE: PHARMACODYNAMIC STUDY OF KILLING EFFECT OF AILING-L ON CANCER CELLS

Li Yushan et al.

First Hospital of Harbin Medical College

In recent ten years and over, notable therapeutic effects have been obtained in treating acute non-lymphatic leukemia with Ailing-l, and in treating advanced primary liver cancer with operation combining Ailing-l. By use of autoradiography, experimental observations on the pharmacodynamic effects of Ailing-l on liver cancer cells (QGY-7703) have been carried out. The results show that Ailing-l injection markedly inhibits the growth and survival of the cancer cells, but has no inhibitory effect on the division of the cancer cells. Ailing-l produced different degrees of inhibitory effects at different concentrations, showing dose-effect relationship. Ailing-l directly wounds or kills cells by deactivating cellular enzyme system, and checking cellular oxidation and respiration. It is concluded that Ailing-l is a new promising antineoplastic agent.