

克癌 7851 对癌细胞的作用

迟永春* 周 舒 万 方 徐 梅 王石麟 潘子昂

(临床医学研究所生理病理生理室 电镜室)

摘要 经口连续给荷 Ehrlich 腹水癌的 BALB/c 小鼠克癌 7851 (AC 7851 160 mg/kg) 15d, 结果表明癌细胞死亡率明显增加, 而腹水量明显减少, 二者呈高度相关。AC 7851 体外实验用扩散合细胞培养法, 结果对空白对照组 (不加任何药物)、阴性对照组 (黄芪提取液 0.6 mg/ml) 肝癌细胞无杀伤效应; 而阳性对照组 (阿霉素 0.8 μ g/ml) 明显地杀伤了癌细胞 (死亡率为 $14.9 \pm 0.8\%$), AC 7851 组 (剂量为 16 μ g/ml) 也杀伤了大量的癌细胞 (死亡率为 $6.9 \pm 1.3\%$)。扫描电镜下见癌细胞微绒毛大量脱落, 许多细胞崩解破坏, 破损的细胞粘连在一起形成团块。透射电镜观察到, 胞膜、胞核、线粒体及异染色质等均有不同程度的损伤, 乃至细胞崩解破坏, 核内可见许多圆形的、电子密度高的致密颗粒, 其杀伤效应有随 AC 7851 剂量增加而增加的趋势。在同样条件、同样剂量下, AC 7851 对正常淋巴细胞损伤较轻。

关键词 克癌 7851 体内和体外相关研究 腹水癌细胞 扩散合细胞培养 直接杀伤效应

EFFECT OF AC 7851 ON CANCER CELLS

Chi Yongchun, Zhou Shu, Wan Fang, et al

1993, 7(3): 132

(Department of Physiology & Pathophysiology, Institute of Clinical Medical Sciences)

Abstract: In vivo, BALB/c mice bearing Ehrlich ascites tumor cells were administered orally with AC 7851, 160 mg/kg for 15 days. Then, the volume of ascites and the survival rate of cancer cells were measured. The results showed that the volume of ascites in AC 7851 group reduced obviously, and number of dead cancer cells increased. Significant correlation between the volume of ascites and death rate of cancer cells was observed. In vitro, diffusion chamber was used for the cancer cell culture. Results showed that after 12 hours cultivation, the survival rate of cancer cells in control group did not decrease, meanwhile the death rate of cancer cells in negative control group (Astragalus Root) did not increase. Whereas, in positive control group (Adriamycin, 0.8 μ g/ml), the death rate of cancer cells increased significantly (the death rate, $14.9 \pm 0.8\%$). In AC 7851 group (AC 7851, 16 μ g/ml), a large amount of cancer cells were killed. Under scanning electron microscope, the microvilli of the cancer cells disappeared, some cancer cells broke or burst, and many broken cancer cells glued to each other forming many clusters. Under transmission electron microscope, besides microvilli changes, injuries of the membrane, nucleus, mitochondria and heterochromatin were observed. In addition, many big or small, round electron density higher compact granules in nucleus were observed. While under the same condition and same dosage, the injury of normal

* 男, 51 岁, 副研究员

lymphocytes was less. Therefore, it is suggested that direct killing effect is the important mechanism of anticancer effects of the AC 7851.

Key words: anticancer 7851; in vivo and in vitro corelation study; ascites cancer cells; diffusion chamber cell culture; direct killing effect of cancer cells

我们以往的工作^[1]证明,以 Cu、Fe 微量元素为主的克癌 7851 (anticancer 7851, AC 7851)在整体荷瘤动物表现出明显的抗癌作用。为了进一步探讨 AC 7851 对癌细胞的作用,我们进行了体内、外两方面的实验观察。

1 材料与方法

1.1 体内实验

BALB/c 小鼠 60 只,雄性,体重 18~22 g,分 6 组,每组 10 只动物。给药组腹腔接种 Ehrlich 腹水癌细胞 5×10^6 /只。次日始连续灌喂 AC 7851 0.2 ml/d (160 mg/kg,根据成人量换算),给药 15d 后,取腹水;对照组给水 1 次/d。给药组和对照组各做 3 批实验。用 Trypan blue 染色法光镜下测定癌细胞的死亡率,并同时用刻度吸管准确测量腹水量。

1.2 体外扩散盒细胞培养

1.2.1 肿瘤细胞株

HepA 小鼠肝癌细胞,由 BALB/c 小鼠腹腔接种,传代后 10d 取腹水癌细胞,调成 5×10^6 /ml,注入扩散盒中,0.2 ml/盒。

1.2.2 正常小鼠脾细胞悬液的制备

取 3 只健康小鼠,无菌下切除脾脏,置 RP-MI-1640 中,剪除脾一端,用眼科弯剪背挤压出脾内容物,6 号针头抽吸,再通过 4 号针头,制成单细胞悬液,Ficoll 淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,调成 5×10^6 /ml 之细胞悬液。

1.2.3 扩散盒细胞培养程序见文献 [2]

1.2.4 观察项目

AC 7851 对癌细胞的杀伤活性及形态变化
设空白对照组、阴性药物对照组 (黄芪提取液 0.6 mg/ml)、阳性药物对照组 (阿霉素 0.8 μ g/ml)、待测药物组 (AC 7851 16 μ g/ml),培养

12h 后取出细胞,光镜下测定癌细胞的死亡率 (Trypan blue 法),同时作扫描和透射电镜观察癌细胞形态变化。

剂量-效应曲线 将 AC 7851 设 7 个剂量点,2、4、6、8、16、32 和 64 μ g/ml,观察癌细胞的死亡率和活存率与药物剂量的关系,绘制剂量-效应曲线。

观察正常淋巴细胞 对比观察相同剂量下 AC 7851 对正常淋巴细胞和癌细胞的损伤程度。

2 结果

2.1 体内实验结果见表 1

几批实验的结果均显示:经口给予 AC 7851 可以杀伤腹水中的癌细胞,给药组的癌细胞死亡率明显增高,腹水量明显减少 (图 1);癌细胞死亡率的增加与腹水量减少之间呈明显的负相关关系 ($r = -0.9383$)。

2.2 体外扩散盒细胞培养结果

2.2.1 AC 7851 对腹水癌细胞的效应见表 2

表 2 显示,空白对照组和阴性对照组的癌细胞死亡率很低;阳性对照 (化疗药-阿霉素)组癌细胞死亡率增高非常明显 ($p < 0.01$);AC 7851 对癌细胞也有明显的杀伤作用,但比阿霉素弱。

2.2.2 AC 7851 作用下癌细胞的形态学变化

除用 Trypan blue 染色观察癌细胞的死亡

表 1 口服 AC 7851 后腹水癌细胞死亡率的变化

批次	AC 7851 剂量 mg/kg	腹水癌细胞死亡率 (%) $\bar{x} \pm s$		t 检验 P 值
		对照组 (n)	组药组 (n)	
1	160	4.92 $\pm$ 1.96 (10)	7.82 $\pm$ 4.50 (10)	<0.05
2	160	3.40 $\pm$ 1.60 (10)	4.90 $\pm$ 1.27 (10)	<0.01
3	160	4.60 $\pm$ 2.60 (10)	7.20 $\pm$ 2.59 (10)	<0.05

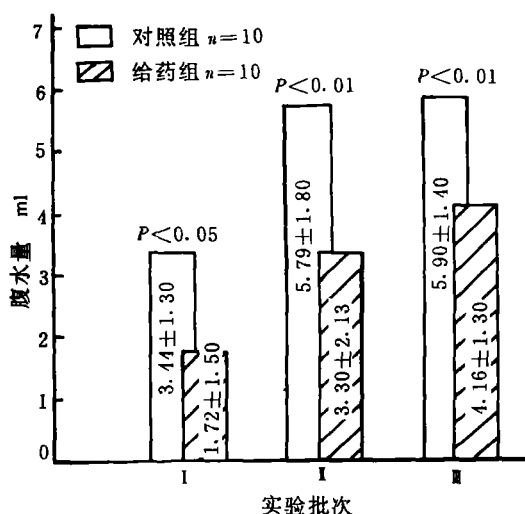


图1 AC 7851 对小鼠癌性腹水量的影响

表2 体外扩散盒培养条件下, AC 7851 对癌细胞的杀伤作用

实验分组	药物	剂量 每 ml	癌细胞 死亡率 % $\bar{x} \pm s$	t 检验 与阴性对 照组对比
空白对照			4.90 ± 0.50	
阴性对照	黄芪液	0.6 mg	1.47 ± 0.26	
阳性对照	阿霉素	0.8 μ g	14.90 ± 0.80**	$p < 0.01$
AC 7851	AC 7851	16 μ g	6.90 ± 1.30*	$p < 0.01$

注: 与空白对照组比较 * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

情况外,扫描电镜下见癌细胞微绒毛大量脱落,胞体破坏或崩解,以崩解的细胞为核心,破损的细胞彼此粘连形成团块。透射电镜下观察到,AC 7851 剂量较低时,癌细胞核膜模糊,异染色质减少;AC 7851 剂量加大到一定程度(100 μ g/ml)以上时,癌细胞绒毛完全脱落,线粒体肿胀,胞膜和核膜均发生断裂或破碎,乃至整个细胞崩解破坏,并且可在癌细胞核内见许多大小不等的圆形、电子密度高的致密颗粒(图2、3)。

2.2.3 AC 7851 对癌细胞杀伤作用的剂量-效应曲线

药物对癌细胞的杀伤效应有随剂量增加而增加之趋势,在小剂量(2~4 μ g/ml)下,AC 7851 对癌细胞无杀伤作用; >8 μ g/ml 时,剂量越高癌细胞的死亡率越高;剂量达 64 μ g/ml 以上时癌细胞几乎 100%死亡(图4)。

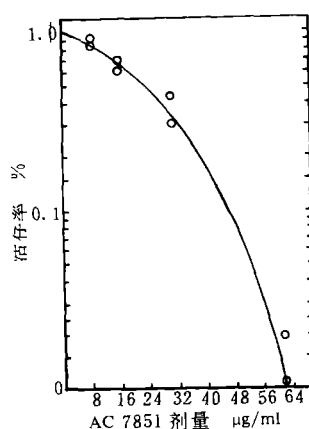


图4 AC 7851 作用下, 癌细胞的活存率曲线(剂量-活存率效应曲线)

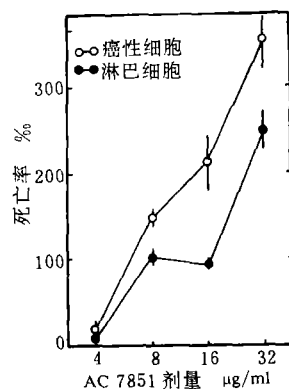


图5 体外扩散盒培养下, AC 7851 对癌细胞作用的剂量-死亡率效应曲线

2.2.4 AC 7851 对正常细胞的影响

正常淋巴细胞与肿瘤细胞在相同剂量和相同培养条件下,在同一时间观察比较,发现 AC 7851 对正常淋巴细胞损伤较轻(图5)。

3 讨论

经过实验,证明 AC 7851 体内和体外对癌细胞作用的结果是一致的。经口给药,药物可进入体内杀伤腹水癌细胞。体外实验也证明,阳性对照药物(包括 AC 7851)对癌细胞有直接杀伤作用。光镜下见在 AC 7851 作用下癌细胞大量死亡,癌细胞的死亡率有随药物剂量增加而增加之趋势,有一个典型的剂量-效应曲线。电镜下观察到:在较高剂量 AC 7851 作用下,癌细胞核内可见许多大小不等、圆形、高电子密度的致密颗粒,推测很可能是 Cu、Fe 微量元素进入癌细胞内,发挥其杀伤破坏癌细胞的作用。这可能是 AC 7851 抗癌作用的机理之一。^[3,4] Fuchs 等^[5]用细胞化学法证明,在正常情况下 Cu 沉积于细胞胞浆;而在癌细胞, Cu 则沉积于细胞核周围及核内, Cu 的这种分布规律与其选择性杀伤癌细胞作用有密切关系。

(本文图2、3见封二)

4 参考文献

- 1 周舒, 迟永春, 杜皓萍, 等. 克癌 7851 抗癌作用的实验研究. 中日友好医院学报, 1991, 5 (1): 3
- 2 万方, 迟永春, 徐梅, 等. 癌细胞体外扩散盒细胞培养技术. 中日友好医院学报, 1993, 7 (1): 59
- 3 Reiners JJr & Colby AB. Survey of cytotoxicities and antitumorigenic and antitumor initiating activities of Cu (II) (3,5-disopropylsalicylate) 2 and its analogs in a keratinocyte-mediated

mutation assay and the murine skin multistage carcinogenesis model. Carcinogenesis, 1988, 9 (4): 629

- 4 Surkin AB & Chlenova EL. Antidotal and antineoplastic properties of copper sulfate. Biull Eksp Biol Med, 1988, 105 (4): 477
- 5 Fuchs AG, Angel HR, Buenos A, et al. Localization of tissue copper in mouse mammary tumor, Rr Oncology 1989, 46 (3): 183

(1992-01-24 收稿 1992-06-29 第2次修回)

• 病例报告 •

运用甘温除热法为主治愈疑是恶性肿瘤发热 1 例

陈庆平

(中医内科)

患者刘某 男 29 岁 病案号 112495

4 个月来反复发热, 恶寒 (T 38~39℃), 寒热往来, 午后热甚, 微汗出, 面色萎黄, 疲乏无力, 纳少, 口苦咽干。1986 年 12 月 29 日入院。

查体: T 39℃, P 116 次/min, 心肺 (-), 肝肋下 4 cm, 剑突下 6 cm, 质硬有压痛及叩击痛, 表面不光滑。右上腹部疼痛拒按, 舌苔薄白, 舌质黯, 脉细数弦。B 超提示: 肝内多发实性占位, 腹膜后实性占位, 肝转移癌可能性大。CT 示: 肝内多发低密度病灶性质待定, 血管瘤可除外。CT 导引下针吸活检: 穿刺物为炎性渗出物, 以中性白细胞为主伴出血, 未见肿瘤成份; 病理涂片未找到细菌。实验室检查: WBC $16 \times 10^9/L$, N $1280 \times 10^6/L$, L $320 \times 10^6/L$, ESR 101 mm/1h, AFP (-), AKP 837 IU/L, γ -GT 117 IU/L, GPT 70 IU/L, TTT (-), T-Bil 18.81 $\mu\text{mol/L}$, TP 70 g/L, ALB 33 g/L, A/G 0.89, CEA 3 $\mu\text{g/ml}$ 。

初以小柴胡汤加减和解, 治疗 2 周热不退。改予清热通腑之剂, 服药 1 周, 发热依然不减, 肝区刺痛拒按。继投以膈下逐瘀汤加减, 服药 10 余剂, 同时静点多种抗生素, 发热仍然不退。患者精神萎靡, 倦怠无力, 纳少, 舌质淡黯, 舌体胖大有齿痕, 脉细数弱。故改拟甘温除热佐以行气化瘀, 停用抗生素。以补中益气汤加减: 白人参 15 g、黄芪 30 g、陈皮 10 g、当归 10 g、柴胡 20 g、

桃仁 10 g、红花 10 g、鳖甲 40 g (先下)、郁金 15 g、元胡 15 g、乌药 10 g、川芎 10 g、川楝子 20 g。服 10 剂后, 体温降至正常, 肝区疼痛消失, 食量和体力倍增。复查 B 超: 肝脏较前有所缩小, 肝内多发实性占位和腹膜后实性占位同前; 复查 CT: 肝内多发低密度病灶与前对比, 病灶大小、形态无明显改变。实验室检查: WBC $10.4 \times 10^9/L$, ESR 24 mm/1h, GPT 42 IU/L, TTT (-), T-Bil 17 $\mu\text{mol/L}$, AKP 516 IU/L, γ -GT 101 IU/L, AFP (-)。上方加减连续服用 1 个月后, 体温恢复正常, 肝脏明显缩小, 体重增加 5 kg。患者出院 3 个月后随访无复发。

讨论: 该患者以发热为主症, 反复发作数月, 午后尤甚, 后期但热不寒, 微汗出而热不减, 具有内伤发热的特点, 面色萎黄, 倦怠乏力, 纳少, 舌质淡体大有齿痕, 是脾胃气虚的表现, 肝区刺痛拒按, 肝大, 是气滞血瘀久而成积。治疗曾以和解少阳、清热通腑、活血去瘀等法均未奏效, 最后以甘温除热法为主佐以活血化瘀、软坚散结, 用补中益气汤加减而收效。方中参芪大补元气, 使元气充, 脾胃之气盛, 气虚发热自然消退, 当归、川芎、桃仁、红花、鳖甲等活血去瘀、软坚散结, 使肝区刺痛消失, 肝脏也有缩小。

(1991-11-12 收稿 1991-12-31 修回)

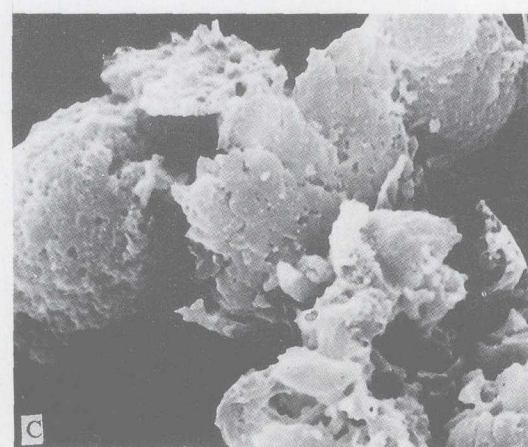
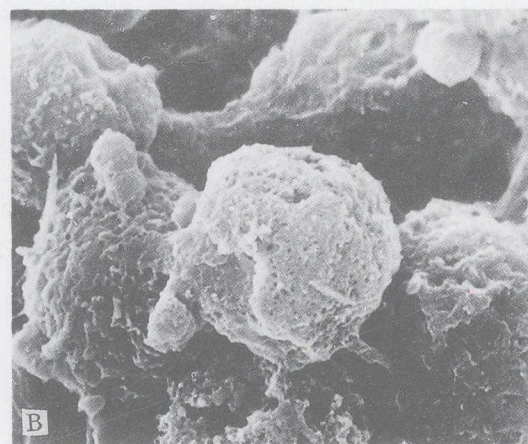
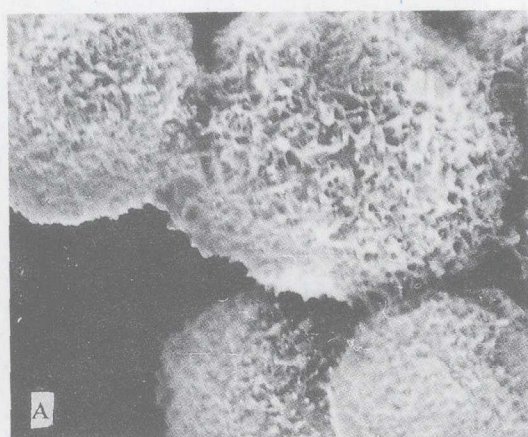


图 2 体外扩散盒培养下, AC 7851 对癌细胞作用的扫描电镜观察
A 对照组; B、C AC 7851 (16 µg/ml) 作用下
×3000

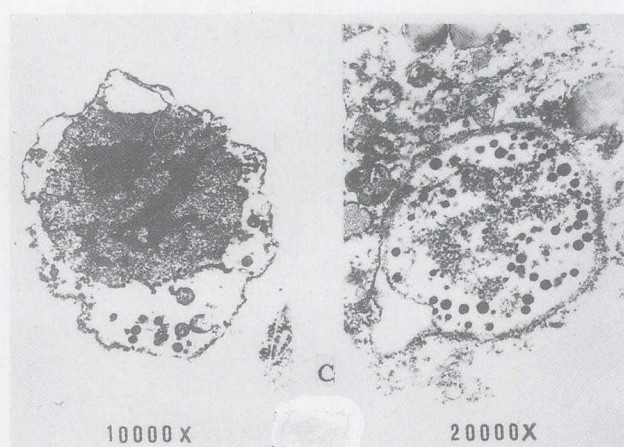
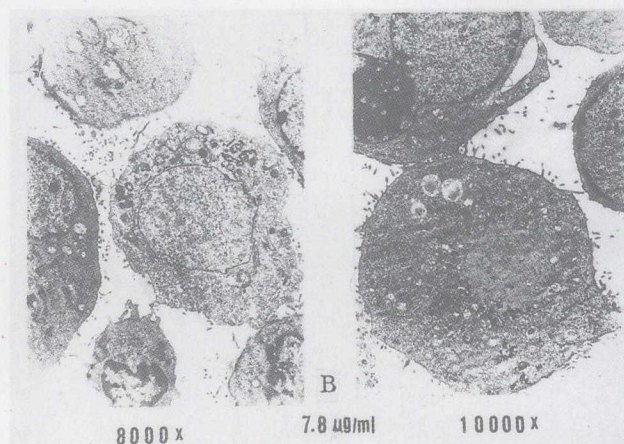
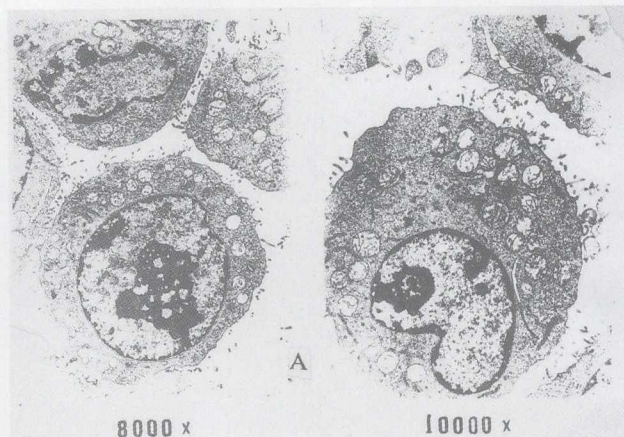


图 3 体外扩散盒培养下, AC 7851 对癌细胞作用的透射电镜观察
A 对照组; B 为低剂量 AC 7851 作用下;
C 为高剂量 AC 7851 作用下
×10000