

第3届全国博士后生命科学学术论坛(中国博士后科学基金会,中国农业大学,2005年)

## 马尾松树皮提取物体外抑制人大肠癌细胞生长规律初探

崔映宇<sup>1</sup> 陈小红<sup>2</sup> 伍春莲<sup>1</sup> 谢衡<sup>3</sup> 王金发<sup>1</sup>

(1. 生物防治国家重点实验室,教育部基因工程重点实验室,中山大学生命科学院,广州 510275;  
2. 阜阳师范学院生物系,安徽 阜阳 236032; 3. 广州高珍营养源研究所,广州 510645)

**摘要** 为深入研究马尾松树皮提取物(PMBE)的抑癌生长作用,构建 PMBE 的动物药理模型,本研究通过细胞培养、细胞活力检测(MTT 实验)及计算机模拟评估马尾松树皮提取物(PMBE)抑制体外培养人大肠癌 LoVo 细胞生长规律,建立了马尾松树皮提取物(PMBE)、胎牛血清(FBS)及处理时间(t)三因素对 LoVo 细胞生长抑制率的反应模型,利用该回归模型对三因素优化组合,同时就各因素单独效应及其互作效应进行了探讨。PMBE、FBS、t 三因素适量水平搭配(0、1、0)可提高对 LoVo 的生长抑制效率,最高可达 0.42,即三因子用量分别为 140  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、15%、48 h 时效果最佳。系列数据分析结果表明,在体外处理细胞过程中可能存在抑制物效应报酬递减规律,且试验体系中多因素综合效应呈现随机非线性特点。该研究是统计学在医学科研设计、衡量和评价(D. M. E)领域的一次尝试,可为构建 PMBE 的动物药理模型确定药用剂量提供参考。

**关键词** 马尾松树皮提取物;胎牛血清;处理时间;二次通用旋转组合设计;大肠癌 LoVo 细胞;生长抑制率;统计建模

**中图分类号** R 735.34; R 73-3; Q 949.665 **文章编号** 1007-4333(2006)01-0011-06 **文献标识码** A

## Research on growth inhibition of PMBE to human colon cancer cell in vitro

Cui Yingyu<sup>1</sup>, Chen Xiaohong<sup>2</sup>, Wu Chunlian<sup>1</sup>, Xie Heng<sup>3</sup>, Wang Jinfa<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory for Biocontrol, Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 2. Fuyang Normal College, Fuyang 236032, China;  
3. Institute of Songzhen Nutritional Resource, Guangzhou 510645, China)

**Abstract** In order to probe further into the role of PMBE inhibiting the growth of cancer, and construct the pharmacological animal model, combination of cell culture, multiple group MTT assays and computer modeling techniques was used in this present study to assess the effect of PMBE, FBS and t on the cell growth inhibition ratio (GIR) of human colorectal carcinoma LoVo cells cultured in vitro. Quadratic general rotational design at 5 levels of 3 factors was used to design the MTT assay scheme. The reaction model between the GIR (Y) and PMBE ( $X_1$ ), FBS ( $X_2$ ) and t ( $X_3$ ) was established. Optimal combination of the three factors, effects of single factor and interaction between them were explored respectively, and appropriate combination of different factors could suppress the cell growth effectively. By simulation with computer, the optimal combination of PMBE, FBS and t with the highest GIR 0.42 was found at 0, 1, 0 level, or 140  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 15% and 48 h, respectively. A law of "reward descending of inhibitor effect" and nonlinear characteristic of many factors' integrative effect during cell treatment were first put forward. This research is a novel attempt to apply statistics principle in design, measurement and evaluation (D. M. E.) fields of medical scientific research, with reference significance in determining the dosage of candidate drug for pharmacological animal model.

**Key words** Pinus massianana bark extract (PMBE); fetal bovine serum (FBS); treatment time (t); quadratic general rotational design; colorectal carcinoma LoVo cell; growth inhibition ratio (GIR); Statistical modeling

收稿日期: 2005-12-13

基金项目: 广东省工业攻关计划资助项目(No. 2004B10401033)

作者简介: 崔映宇, 北京大学博士后, 主要从事生物化学与分子生物学研究, E-mail: yy-cui@126.com; 王金发, 教授, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事细胞生物学与分子遗传学研究, E-mail: ls19@zsu.edu.cn

目前,各种抗癌药物的筛选成为药学人士的主要任务,他们多以细胞模型进行目的化学合成药物或天然药物的初选,通常从时间、剂量2个方面考察候选药物对癌细胞的抑制或杀伤作用。曾有报道候选抗癌药物对某一或几种癌细胞具有时间或剂量依赖性的抑制作用或诱导凋亡作用<sup>[1-3]</sup>。马尾松树皮提取物(PMBE)由广州嵩珍营养源研究所通过膜分离技术,经浸提、微滤和超滤分离纯化获得,其主要成分是黄酮类化合物——原花青素(主要是B族原花青素),也是近年来我国自己从松树中提取的一种抗癌药物候选前体物<sup>[4-5]</sup>,能广谱抑制人体外癌细胞的生长,但对不同的癌细胞株表现出不同程度的浓度依赖性,生长曲线呈现非线性特点<sup>[6]</sup>。基于此,我们期望深入探索这一现象背后可能存在的规律,同时为构建 PMBE 的动物药理模型提供基本的实验参数。但考虑到,影响体外培养细胞生长的因素很多也很复杂,并不局限于所给药物的浓度及药物处理时间,譬如培养细胞所需的营养因子胎牛血清(FBS)用量就直接影响体外培养细胞的生长,严重缺乏时甚至导致培养细胞死亡。总之,药物浓度、血清用量及药物处理时间是影响体外培养体系中细胞生长状况的主要因素,而有关其综合效应的评估则未见报道。因此,我们就将 PMBE 放入由其自身浓度、血清用量及处理时间组成的复杂系统中考查其体外抑制癌细胞生长可能存在的规律,结合我国在医学科设计、衡量和评介领域的研究现状<sup>[7]</sup>,本研究采用三因素五水平二次通用旋转组合设计<sup>[8]</sup>,考查抗癌药物候选前体物马尾松树皮提取物(PMBE)体外抑制 LoVo 细胞生长的作用规律,为其动物药理模型的构建提供基础的实验参数。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

马尾松树皮提取物(*Pinus massaniana* bark extract, PMBE)由广州嵩珍营养源研究所提供,人大肠癌 LoVo 细胞株购自中山大学医学院动物细胞中心;二甲基亚砷(Dimethyl sulfoxide, DMSO, Amresco), RPMI 1640 (HyClone)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 四季青,杭州)、青链霉素(Penicillin Streptomycin, Penicillin 10 000 U/mL, Streptomycin 10 000 µg/mL, GIBCO, Invitrogen Corp.)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验设计 三因素五水平二次通用旋转组

合设计,以 LoVo 细胞体外生长抑制率为目标函数,以 PMBE、FBS、t 三因素用量水平为自变量,构建回归模型,并验证试验模型得出的结论。根据文献<sup>[4]</sup>和我们前期工作<sup>[6]</sup>基础确定,用 10% FBS RPMI 1640 配制成的 140 µg/mL PMBE 处理 LoVo 细胞 48 h 分别作为三因子的零水平(表 1)。

表 1 马尾松树皮提取物、胎牛血清和作用时间  
三因素五水平二次通用旋转组合设计

Table 1 Quantity of PMBE, FBS and *t* at different levels

因素	水平				
	<i>r</i>	1	0	-1	- <i>r</i>
PMBE/(µg mL <sup>-1</sup> )	173.64	160	140	120	106.36
FBS/%	18.41	15	10	5	1.59
<i>t</i> /h	68.184	60	48	36	27.816

据以上各因素不同水平用量,采用三元二次通用旋转组合设计共 20 个处理组,在培养条件完全相同(37 °C、5% CO<sub>2</sub>)的情况下,研究 PMBE、FBS、t 三因素对体外培养 LoVo 生长抑制率的影响。

**1.2.2 细胞培养** 人癌细胞株 LoVo 以含 10% 的灭活胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、100 U/mL 青霉素、100 µg/mL 链霉素、10 mmol/L HEPES, pH7.4 的 RPMI 1640 培养液于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,以 0.25% 胰蛋白酶或 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA(1:1)消化传代。

**1.2.3 细胞处理** 本研究中,LoVo 细胞株分别用不含马尾松树皮提取物(PMBE)的 10% FBS RPMI 1640 和含不同浓度 PMBE 的 10% FBS RPMI 1640 处理相应时间。

**1.2.4 MTT 实验及数据采集** 将人大肠癌 LoVo 细胞株的单细胞悬液以 10<sup>4</sup> 个/mL 的密度接种在 96 孔板上,200 µL/孔,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h,大部分细胞贴壁后,换上 0.5% FBS RPMI 1640 培养液,再培养 48 h,使细胞基本同步于 G<sub>0</sub> 期,再换用 10% FBS RPMI 1640 培养液,分实验组和空白对照组。实验组分别加入以 DMSO 为介质的 PMBE 处理液,使 PMBE 的终浓度分别为相应组合要求的数值,使 DMSO 的终浓度均小于 0.25% 以至于不影响细胞的生长。每孔总反应体系 200 µL,每一浓度设 6 个重复孔,空白组仅加培养液而不加细胞;对照组加培养液和细胞而不加 PMBE,培养相同时间。实验结束前 4 h,每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 µL,继续培养 4 h 后,吸弃上清,每孔加入 150 µL DMSO,振荡 10 min,使结晶物

充分溶解,在酶联免疫检测仪上,分别以 550 nm 和 630 nm 波长测每孔的吸光度  $A_1$  值和  $A_2$  值, $A_1$  减去  $A_2$ ,即为每孔的吸光度  $A$  值,取 6 孔均值。细胞的生长抑制率 = (1 - 实验组  $A$  值/对照组  $A$  值)。上述实验重复 3 次,取均值进行分析。

**1.2.5 数据处理** 用 Excel 6.0 进行各处理组 LoVo 细胞生长抑制率的计算。

**1.2.6 模型构建** 利用 DPS 软件,进行模型构建和选优。

**1.2.7 模型验证** 为确保模型的可靠性和准确性,依据模型分析选出的最优组合 A,最差组合 B 和经验水平组合 CK 共 3 个处理组,进行模型验证实验。

## 2 结果与分析

### 2.1 模型构建

据试验结果(表 2),以 LoVo 细胞生长抑制率(GIR)为目标变量( $Y$ ),以与 PMBE、FBS、 $t$  对应的三因子( $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ )为决策变量,利用 DPS 软件对数据进行处理,得到体外培养 LoVo 细胞生长抑制率对三因素反应的方程:

$$Y = 0.40982 - 0.04643X_1 + 0.14951X_2 - 0.03288X_3 - 0.11077X_1^2 - 0.13729X_2^2 - 0.23275X_3^2 - 0.01500X_1X_2 - 0.06250X_1X_3 + 0.14500X_2X_3 \quad (1)$$

失拟性检验发现, $F_1 = 5.737 > F_{0.05} = 5.05$ ,差异显著,说明本实验中除 PMBE、FBS、 $t$  三因素外,尚有其他因素影响 LoVo 的生长;但回归方程显著性检验发现, $F_2 = 7.913 > F_{0.01} = 4.19$ ,表明回归关系达到极显著水平,因而所得方程可以用于研究分析。

去除  $= 0.10$  不显著项后,回归方程(1)可简化为:

$$Y = 0.40982 - 0.04643X_1 + 0.14951X_2 - 0.11077X_1^2 - 0.13729X_2^2 - 0.23275X_3^2 - 0.06250X_1X_3 + 0.14500X_2X_3 \quad (2)$$

(2)式可用于分析和寻求体外抑制 LoVo 细胞生长的最佳配方,并用于预测。

$Y$  取最高值的各因素组合( $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ ) = (140、15、48)时, $Y_{\max} = 0.42$

**2.1.1 主效应分析** 由于回归模型本身已经过无量纲形编码代换,其偏回归系数已经标准化,故可直接从其绝对值大小来判断各因子对目标函数的相对重要性,即一次项系数的绝对值大小可反映三因素对 LoVo 细胞生长抑制率的影响程度。因此,在 LoVo

表 2 实验处理及细胞生长抑制率

Table 2 Experimental treatment and growth inhibition ratio (GIR)

处理组	PMBE/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) $X_1$	FBS/ % $X_2$	$t$ / h $X_3$	GIR* $Y$
1	160	15	60	0.177 047
2	160	15	36	0.150 252
3	160	5	60	- 0.453 806
4	160	5	36	- 0.079 524
5	120	15	60	0.471 686
6	120	15	36	0.007 383
7	120	5	60	- 0.401 175
8	120	5	36	- 0.100 816
9	173.64	10	48	0.171 827
10	106.36	10	48	- 0.101 48
11	140	18.14	48	- 0.111 485
12	140	1.59	48	0.021 179
13	140	10	68.184	- 0.232 836
14	140	10	27.816	- 0.389 906
15	140	10	48	0.523 137
16	140	10	48	0.417 499
17	140	10	48	0.481 541
18	140	10	48	0.421 232
19	140	10	48	0.314 478
20	140	10	48	0.326 727

\* GIR is defined as  $(1 - A_{\text{treatment}}/A_{\text{control}})$

体外培养处理过程中,三因素对其生长状况的影响依次为:FBS > PMBE >  $t$ 。

**2.1.2 单因子效应分析** 模型(2)中,分别将 2 个变量固定在零水平,进行降维分析,即可得到 3 个以其中 1 个因素为决策变量的偏回归模型

$$Y_1 = 0.40982 - 0.04643X_1 - 0.11077X_1^2$$

$$Y_2 = 0.40982 + 0.14951X_2 - 0.13729X_2^2$$

$$Y_3 = 0.40982 - 0.23275X_3^2$$

分别对其求导,可得出 PMBE、FBS、 $t$  的 LoVo 生长抑制率增量反应模式

$$dy_1/dx_1 = - 0.04643 - 0.22154X_1$$

$$dy_2/dx_2 = 0.14951 - 0.27458X_2$$

$$dy_3/dx_3 = - 0.46550X_3$$

令  $dy_i/dx_i = 0$ , 求出  $Y_i$  达极大值时各因素单独作用的最适量,

得:  $X_1 = - 0.2096$ ,  $X_2 = 0.5445$ ,  $X_3 = 0$

PMBE、FBS、 $t$  用量水平与 LoVo 细胞生长抑制

率之间皆呈抛物线关系(图1)。从图1A可知, PMBE用量水平从-1.682增加到-0.2096,抑制率由0.175增至0.4147,每增加单位水平PMBE,抑制率增量平均为0.1628;PMBE用量水平从-0.2096增加到1.682,抑制率由0.4147降至0.018,单位水平PMBE的抑制率负增量平均为0.2097。可见,低水平PMBE的抑制率增量很大,抑制率迅速上升;当 $X_1$ 编码值逼近-0.2096时,抑制率增量趋近于零; $X_1$ 取值-0.2096时,抑制率达最大;之后抑制率呈现负增值,抑制率开始下降。图1B显示,FBS用量水平由-1.682增加到0.5445,抑制率由-0.23增至0.4505,抑制率增量平均为

0.3056;FBS用量水平从0.5445增加到1.682,抑制率出现负增长,由0.4505降至0.273,单位水平FBS的抑制率负增量平均为0.1560,其变化趋势与PMBE相似,但较PMBE稍弱,FBS的单点极值水平为 $X_2 = 0.5445$ ,未超出本实验方案最高水平1.682。图1C则表明培养时间 $t$ 水平由-1.682增加到0,抑制率由-0.248增加至0.40982,每增加单位水平,抑制率平均增量为0.3911;时间水平由0增至1.682,抑制率又由0.40982降至-0.248,单位时间水平的抑制率负增量为0.3911, $t$ 的单点极值水平为 $X_3 = 0$ ,图形呈关于纵轴对称的钟形,提示时间独立于PMBE、FBS而起作用。

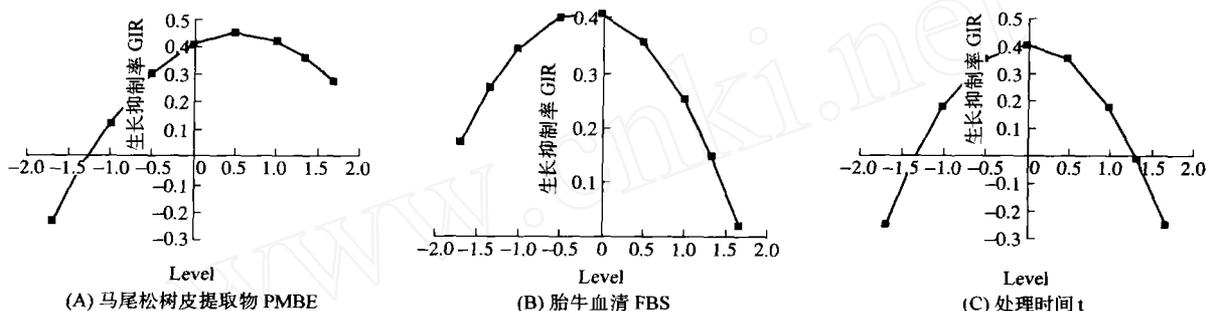


图1 马尾松树皮提取物、胎牛血清和处理时间对LoVo细胞生长抑制率的影响

Fig. 1 Effect of PMBE, FBS and t on the GIR of LoVo

总之,解析回归方程,发现三因子对LoVo细胞生长的抑制作用模式均为上抛物线形,提示随着三因子各自用量的增加,其对LoVo生长的抑制率也增加,但达到一定程度后,抑制率会随各自用量的增加而下降。整个培养和处理过程中各因素单位水平用量的增加导致的抑制率增量是逐渐减少的,我们称之为“抑制物效应报酬递减率”,这一结论是否具有普适性,尚需其他类似研究检验。

2.1.3 PMBE、FBS、t 互作分析

1) PMBE、FBS 互作效应分析

令 $X_3 = 0$ ,由(2)式得到PMBE、FBS互作效应方程:

$$Y_{(1,2)} = 0.40982 - 0.04643 X_1 + 0.14951 X_2 - 0.11077 X_1^2 - 0.13729 X_2^2$$

经计算, $X_1 = -0.2096$ 、 $X_2 = 0.5445$ 时,LoVo细胞生长抑制率最高, $Y_{(1,2)max} = 0.4554$ 。分析PMBE、FBS互作效应,应从二者用量不同的变化进行考察(表3)。

2) PMBE、t 互作效应分析

令 $X_2 = 0$ ,由(2)式得到PMBE、t互作效应

方程:

$$Y_{(1,3)} = 0.40982 - 0.04643 X_1 - 0.03288 X_3 - 0.11077 X_1^2 - 0.23275 X_3^2 - 0.06250 X_1 X_3$$

表3 PMBE、FBS用量变化对LoVo生长抑制率的影响

Table 3 Effect of different PMBE and FBS quantity variation on the GIR of LoVo

条件	因素变化	生长抑制率变化
$X_1 < -0.2096, X_2 < 0.5445$	PMBE, FBS	
$X_1 > -0.2096, X_2 < 0.5445$	PMBE, FBS不变	
	PMBE不变, FBS	
$X_1 < -0.2096, X_2 > 0.5445$	PMBE, FBS不变	
	PMBE不变, FBS	
$X_1 > -0.2096, X_2 > 0.5445$	PMBE, FBS	

经计算, $X_1 = -0.01626$ 、 $X_3 = -0.68524$ 时,LoVo细胞生长抑制率最高, $Y_{(1,3)max} = 0.3238$ 。表4显示二者用量水平的不同对LoVo生长抑制率的影响。

总之,双因子互作效应分析结果显示,PMBE 与 FBS 的互作分界点为:  $X_1 = -0.2096$ ,  $X_2 = 0.5445$ 。低于此水平时,二者用量与 LoVo 体外生长抑制率间存在正相关,高于此水平时,则会呈现负相关; PMBE 与 t 的互作存在类似规律,不同之处在于其互作分界点为:  $X_1 = -0.01626$ ,  $X_3 = -0.68524$ 。提示三因素综合效应的最终结果应当呈现随机非线性特点。

表 4 PMBE,t 用量变化对 LoVo 生长抑制率的影响

Table 4 Effect of different PMBE and t quantity variation on GIR of LoVo

条件	因素变化	生长抑制率变化
$X_1 < -0.01626, X_3 < -0.68524$	PMBE, t	
$X_1 > -0.01626, X_3 < -0.68524$	PMBE, t 不变	
	PMBE 不变, t	
$X_1 < -0.01626, X_3 > -0.68524$	PMBE, t 不变	
	PMBE 不变, t	
$X_1 > -0.01626, X_2 > -0.68524$	PMBE, t	

2.1.4 模型寻优 根据方程(2)在计算机上进行选优的结果,LoVo 细胞体外生长抑制率最高  $Y_{max} = 0.42$  时,PMBE、FBS、t 三因子取值分别为 0、1、0 (表 5)。

表 5 最高生长抑制率时的各因子组合

Table 5 Each factor combination of the highest growth inhibition ratio (GIR)

因子	编码值	实际用量
$X_1$	0	140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (PMBE)
$X_2$	1	15% (FBS)
$X_3$	0	48 h (t)

从上述方程模拟得出的理论值,并不能完全与本研究结果相吻合,因为影响试验的因素很多,且其相互关系较复杂,这些都不可避免地影响 LoVo 细胞的体外生长抑制率。因此,需要对理论值进行频数分析,将其他因素的影响考虑在内,使理论值更接近实际。

2.1.5 频数分析 从表 6 中可见,当抑制率大于 0.08 时,PMBE、FBS、t 水平分别为 0、1、0 在 23 个方案中出现频率最高;当  $X_1$  的投入水平介于  $-0.714 \sim 0.042$ 、 $X_2$  的投入水平介于  $0.433 \sim$

$1.054$ 、 $X_3$  的投入水平介于  $0.051 \sim 0.558$  时,95% 的组合抑制率达到 0.08。

表 6 GIR 大于 0.08 的 23 个方案中各变量取值和各因子的频率分布

Table 6 Frequency distribution of value of variables in 23 schemes of GIR above 0.08

水平	$X_1$	频率	$X_2$	频率	$X_3$	频率
-1.682	4	0.17391	0	0	0	0
-1	6	0.26087	1	0.4348	2	0.08696
0	8	0.34783	8	0.34783	12	0.52174
1	5	0.21739	8	0.34784	9	0.3913
1.682	0	0	6	0.26087	0	0

因子	加权均数	标准差	95% 的分布区间
$X_1$	-0.336	0.193	-0.714 ~ 0.042
$X_2$	0.743	0.158	0.433 ~ 1.054
$X_3$	0.304	0.129	0.051 ~ 0.558

### 2.2 模型验证

DPS 软件分析结果提示 PMBE、FBS、t 三因子取值水平分别为 (0、1、0) 时,LoVo 体外生长抑制率达最大值  $Y_{max} = 0.42$ 。将其与 20 个试验组中的最差组合 B 和经验水平组合 CK 共 3 个处理组搭配,进行模型验证试验,试验方法同 1.2.4,每个处理组重复 3 次,每次每组各设 6 个平行孔,取 3 次的均值进行统计分析,由 SPSS10.0 的 One-Way ANOVA 程序完成。差异显著性分析表明,3 个处理组对 LoVo 体外生长抑制率间存在显著性差异(表 7)。

表 7 验证三组合 PMBE、FBS、t 的不同用量及相应 LoVo 生长抑制率

Table 7 Quantity of PMBE, FBS and t in different treatment groups of model validation and GIR of LoVo

Group	PMBE / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	FBS / %	t / h	GIR
A	140	15	48	0.47306*
B	120	15	36	0.007529**
CK	140	10	48	0.35415

\*  $P < 0.05$  vs CK, \*\*  $P < 0.01$  vs CK ( $n = 3$ )

### 3 讨论

本研究采用“三因素五水平二次通用旋转组合设计”方法,研究 PMBE、FBS、t 三因子对体外培养

人大肠癌 LoVo 细胞生长的影响,建立了 LoVo 体外生长抑制率的三因子反应模型。该法融合了回归旋转设计与回归通用设计的优点,使实验规模小,利于各因子的均一控制,减少实验误差。本回归模型,经过计算机数据处理和统计分析,可以有效地模拟常规实验全面实施中的全部实验结果,大大简化计算过程,减少工作量,节省开支。

此外,回归方程的失拟性检验提示本试验中尚存在其他因素影响 LoVo 的体外生长,比如细胞代谢废物浓度的升高就是应该考虑的因素,但该因素难于测定,无法作为一个独立的因素在该回归模型中有所体现,这是该模型的缺陷所在,有待检测技术手段进步后继续探索完善;但回归方程显著性检验发现,该模型回归关系达到极显著水平,表明三因素与 LoVo 细胞的体外生长抑制率之间存在明显相关性,用该模型考查三因素对 LoVo 体外生长的影响是可行的<sup>[8]</sup>。鉴于实际培养体系的成分较复杂,且在培养过程中该体系是一个动态系统,各因子效应的发挥与周围环境中的其他因子密切相关,模型的参数是否会随不同因子的改变而发生较大的变化,尚需作进一步研究。

本研究提出的“抑制物效应报酬递减率”,与临床用药实践相吻合。比如,无论中药还是西药,其治疗效果的体现都要通过每日服用一定剂量和一定的疗程方能实现。提示正是由于该规律的作用,需要每天定量服用药物并且持续一段时间,才能使药物的治疗效果得以最佳体现。

## 4 结 论

试验结果,以 LoVo 体外生长抑制率为因变量 ( $Y$ ), PMBE、FBS、 $t$  三因子 ( $X_1, X_2, X_3$ ) 为自变量,得到了 LoVo 体外生长抑制率对三因子的反应方程为:  $Y = 0.40982 - 0.04643X_1 + 0.14951X_2 - 0.03288X_3 - 0.11077X_1^2 - 0.13729X_2^2 - 0.23275X_3^2 - 0.01500X_1X_2 - 0.06250X_1X_3 + 0.14500X_2X_3$ 。失拟性和回归方程显著性检验分析结果表明回归关系达到极显著水平,提示该方程可用于实践分析,寻求体外抑制 LoVo 生长的最佳药物、营养用量配方。PMBE、FBS、 $t$  三因子对 LoVo 体外生长抑制率的影响程度依次为  $FBS > PMBE > t$ ; 三因子独立作用,

分别于  $X_1 = -0.2096$ 、 $X_2 = 0.5445$ 、 $X_3 = 0$  水平时获得最高抑制率,在此基础上,提出抑制物效应报酬递减率的可能存在。交互效应分析表明 PMBE、FBS 与 PMBE、 $t$  在较低水平时交互作用均呈现正效应,在较高水平时都呈负效应,提示三者同时作用则应呈现随机非线性特点。验证实验显示,得出的最优组合准确,可用于预测 PMBE 抑制体外培养 LoVo 细胞生长的效率。

本研究是统计学在医学科研 D. M. E.<sup>[7]</sup>领域的一次尝试,可作为非线性药物代谢动力学研究内容的补充,既为 PMBE 的动物药理模型构建提供用药剂量参考,也可为其他植物提取物活性成分的动物药理模型构建确定用药剂量提供方法借鉴。

## 参 考 文 献

- [1] Liu J, Shen H M, Ong C N. Salvia miltiorrhiza inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma Hep G (2) cells [J]. Cancer Lett, 2000, 153(1-2): 85-93
- [2] Qing C, Jiang C, Zhang J S, et al. Induction of apoptosis in human leukemia K-562 and gastric carcinoma SGC-7901 cells by salvicine, a novel anticancer compound [J]. Anticancer Drugs, 2001, 12(1): 51-56
- [3] Chao J C, Chu C C. Effects of *Ginkgo biloba* extract on cell proliferation and cytotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(1): 37-41
- [4] Cui Y Y, Xie H, Wang J F. Potential biomedical properties of *Pinus massoniana* bark extract (PMBE) [J]. Phytotherapy Research, 2005, 19(1): 34-38
- [5] Cui Y Y, Xie H, Qi K B, et al. Effects of *Pinus massoniana* bark extract on cell proliferation and apoptosis in human hepatoma BEL-7402 cells [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(34): 5277-5282
- [6] 崔映宇, 谢衡, 王金发. 马尾松树皮提取物对人体外癌细胞的广谱作用研究 [J]. 药学进展, 2004, 28(9): 418-421
- [7] 黄正南. 医学科研的设计、衡量和评价 洪定国. 科学前沿集 [M]. 第 2 版. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998: 175-186
- [8] 白厚义, 肖俊璋. 试验研究与统计分析 [M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 1998: 218-235