

ISSN 1009-3079

CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE

JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003 年 9 月 15 日 第 11 卷 第 9 期

(Volume 11 Number 9)



9/2003

ISSN 1009-3079



9 771009 307001

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports®, Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2002 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 2.532. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2003 年 9 月 15 日 第 11 卷

第 9 期 (总第 113 期)

述 评	1269 胃肠道肿瘤的影像诊断和介入治疗 程英升, 尚克中 1273 胃食管反流病的内镜缝合治疗 杨云生, 令狐恩强
胃 癌	1275 α -连接素表达与胃癌生物学行为的关系 徐采朴, 周永宁, 陈渝 1279 老年人胃癌前黏膜癌变的胃镜随访 王孟薇, 杨少波, 张子其, 祝庆孚, 王刚石, 李晖, 姚晨, 吴本俨, 尤纬缔 1282 内皮抑素-血管内皮细胞抑制因子重组腺病毒对荷胃癌裸鼠的治疗 潘欣, 李喆, 张珉, 王泳, 潘卫, 戚中田 1286 PKC β 1 和 PKC β 2 在早期胃癌中的表达 冯瑞娥, 陈杰, 崔全才, 詹阳, 王振宇 1290 二烯丙基二硫对人胃癌 MGC803 细胞生长的影响 张良运, 凌晖, 苏琦, 宋颖, 梁晓秋 1294 胃黏膜癌变过程中 PTEN 基因编码产物的表达及意义 李异玲, 何向民, 郑华川, 吴东璘, 杨雪飞, 辛彦, 傅宝玉 1297 进展期胃癌病理和预后影响因素的关系 黄海力, 吴本俨, 尤纬缔, 申明识 1302 雌激素诱导基因 PS2/TFF1 在胃癌及癌前病变中的表达 李俊美, 罗和生, 姚宏昌 1306 GSTM1, GSTT1 基因多态与胃腺癌及幽门螺杆菌感染的关联 张友才, 邓长生, 周燕, 朱尤庆 1310 基质金属蛋白酶-7 表达与胃癌临床病理生物学行为的关系 孙晋民, 郑华川, 杨雪飞, 辛彦, 张荫昌 1314 毒物代谢酶基因多态与胃癌的关联 叶梅, 刘君炎, 邓长生 1318 胃癌中医证型相关基因的表达谱 刘莺, 李俊军, 朱文锋, 刘平
肝 癌	1322 MUC1 基因免疫抑制 H22 肝癌生长的实验研究 袁时芳, 王岭, 李开宗, 颜真, 韩苇, 张英起 1326 纺锤体组装关卡基因 hsMAD2 在人肝细胞肝癌中的表达及其意义 李擒龙, 王文亮, 张晓晖, 晏伟 1329 GnRH 类似物诱导肝癌细胞凋亡的体外研究 刘庆元, 窦科峰, 张金山, 孙岚, 黄鲁豫, 张远强 1333 bFGF 对人肝癌细胞系 Bel-7402 的生长调控 于卉影, 孙利平, 孙黎光, 丁晓慧 1337 经肝动脉注射 5-FU 白苕微球治疗兔 VX ₂ 移植性肝癌 李欣, 冯敢生, 郑传胜, 柳曦, 孔健 1341 KAI1 正反义基因对 MHCC97-H 肝癌细胞 KAI1 蛋白表达的影响 司遂海, 杨建民, 罗元辉, 房殿春, 周平 1345 中药复方胃肠安血清诱导肝癌 SMMC-7721 细胞分化 赵海磊, 刘成, 赵爱光 1349 肝癌患者乙型肝炎病毒 X 基因变异的研究 代志琰, 徐启桓, 李刚, 马会慧, 汤正好, 舒欣, 姚集鲁 1353 复方中药 99-克星超声介入治疗肝癌裸鼠移植瘤凋亡与增生 林晓东, 林礼务, 何以教, 高上达, 杨发端, 薛恩生 1357 羟基磷灰石纳米粒子诱导人肝癌细胞凋亡模型的构建 刘志苏, 唐胜利, 艾中立, 孙权, 钱群, 何跃明, 朱忠超 1362 β -catenin 和 Cyclin D1 在肝癌肝内转移中的作用 苏小康, 赵先明, 李锦清, 崔学教, 谢晓华, 杨海燕, 徐发彬, 石明 1365 DC 负载凋亡肝癌细胞后的免疫应答 郭建巍, 秦力维, 蔡美英, 吕同德 1369 TRAIL 诱导肝癌细胞系 SMMC-7721 的凋亡作用 李小安, 房殿春, 司佩任, 张汝刚, 杨柳芹, 秦建平
大 肠 癌	1372 大肠肿瘤组织线粒体形态结构定量研究 吴正蓉, 申洪 1375 IL-4 增强 IL-2 活化的 A-NK 细胞对人直肠癌 CC95 的抗肿瘤作用 王志华, 申宝忠, 史历 1378 人源性大肠癌抗原基因的 SEREX 筛选 刘宇虎, 张振书, 钟东, 武金宝, 但汉雷, 赖卓胜, 王亚东, 张亚历, 肖冰 1382 直肠癌组织 CD44v6, DNA 含量的联合检测及临床意义 丁志杰, 单吉贤, 都姝妍 1385 胃泌素拮抗剂增加 CD 自杀基因对结直肠癌细胞的杀伤作用 王小军, 马庆久, 赖大年, 黎成金, 李金茂, 武永忠, 王青 1389 aFGF 和 genistein 对大肠癌细胞株 CCL229 PKC 及 ERK 活性的影响 尚海, 张颐, 单吉贤
基础 研究	1392 牛磺酸对 CCl ₄ 诱导的大鼠肝纤维化的保护作用及其机制的研究 梁健, 杨光业, 张锡流, 庞玉生, 袁海锋, 梁劲松, 黄仁彬, 韦新, 韦明 1396 胰腺移植 ICAM-1 的表达及信号转导的因素 梁健, 王凤山, 刘永锋, 刘利民, 刘树荣, 崔宏, 邵春泉, 何三光

临床研究	1399 聚乙二醇 4 000 治疗老年人功能性便秘 85 例 张长青, 张国伟, 张葵玲, 付奕其
焦点论坛	1402 胃肠道肿瘤的影像诊断和介入治疗 程英升 1402 胃肠道肿瘤的 X 线诊断 尚克中, 程英升, 吴春根 1404 胃肠道肿瘤 CT 诊断 吴春根, 程英升, 尚克中 1406 胃肠道肿瘤 MRI 诊断 吴春根, 程英升, 尚克中 1408 胃肠道肿瘤超声诊断 胡兵, 周进祝 1410 胃肠道肿瘤核素诊断 陆汉魁 1413 胃肠道肿瘤血管和非血管双介入治疗 程英升, 尚克中
治疗指南	1416 肝细胞癌的诊断和治疗 陆嵘, 房静远
文献综述	1420 DNA 高甲基化与抑癌基因 刘仲敏, 刘芝华, 吴旻 1425 胃癌供血及其动脉介入化疗的研究进展 沈波, 朱金水 1429 腹膜粘连的分子机制及药物防治 曾健, 李晓辉 1433 肿瘤多药耐药和进展期大肠癌耐药细胞株建立研究进展 姚学清, 林锋 1436 肽转运载体的分子特征 韩飞, 施用晖, 乐国伟, 王立宽 1443 肝星状细胞与肝纤维化的研究进展 蒋业贵, 李兆申 1447 环氧化酶-2 与结直肠癌 姚红兵, 吴爱国, 朱卉娟 1451 幽门螺杆菌疫苗的研究进展 姜政, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙 1457 脂肪酸结合蛋白研究进展 冯爱娟, 陈东风 1460 肝移植后乙型肝炎病毒再感染相关因素的研究进展 王永刚, 王宇明
读者来信	1352 陈祖林 1368 汤伟
消息	1301 欢迎订阅 2004 年度世界华人消化杂志 1332 欢迎订阅 2004 年度 World Journal of Gastroenterology® 1424 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊 1450 WJG 搭建我国消化基础 and 临床研究惟一国际交流的平台 1464 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003-2004 年国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助
封面故事	巴松湖又名错宗湖, 在藏文里又是绿色湖水的意思, 位于西藏林芝地区工布江达县境内, 该湖湖面海拔 3464 m, 是川藏东部最大的淡水堰塞湖之一。湖水清澈见底, 四周雪山倒映其中, 湖周原始森林密布, 群山环绕, 景美如画。湖中央飘着一座秀丽的湖心小岛, 湖心岛上有一座错宗寺, 建于唐代末年。(马俐 马娜 摄影)。

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(月刊)

创刊 1993-01-15

改刊 1998-01-25

出版 2003-09-15

原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀

黄象谦

黎介寿

刘耕陶

裘法祖

汤钊猷

王宝恩

危北海

吴孟超

吴咸中

张金哲

张学庸

赵东海

周殿元

社长总编辑 马连生

中文编辑 潘伯荣

王瑾晖

英文编辑 王先林

排版 李少华

校对 李天华

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会

030001, 山西省太原市双塔西街 77 号

E-mail: wjcd@wjgnet.com

出版 世界胃肠病学杂志社

100023, 北京市 2345 信箱

E-mail: wjcd@wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

电话 (010)85381892

传真 (010)85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内 北京报刊发行局

国外 中国国际图书贸易总公司

(100044, 北京 399 信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部

(100023, 北京市 2345 信箱)

电话: (010)85381892

传真: (010)85381893

2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外

检索系统收录

美国《化学文摘(CA)》

荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》

俄罗斯《文摘杂志(PJ)》

中国科技论文统计与分析

中国学术期刊文摘

中国中医药信息服务网

中国生物医学文献光盘数据库

《中文科技资料目录(医药卫生)》

中国生物医学期刊目次数据库

中国医学文摘外科学分册(英文版)

中国医学文摘内科学分册(英文版)

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。

ISSN 1009-3079

CN 14-1260/R

邮发代号

82-262

国外代号

M 4481

国内定价

每期 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营许可证

1401004000050

www.wjgnet.com

中药复方胃肠安血清诱导肝癌 SMMC-7721 细胞分化

赵海磊, 刘 成, 赵爱光

赵海磊, 赵爱光, 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤一科 上海市 200032
刘成, 上海中医药大学肝病研究所 上海市 200032
赵海磊, 男, 1972-10-11 生, 上海市人, 汉族. 2002 年上海中医药大学博士研究生毕业, 主治医师, 主要从事中西医结合防治消化道肿瘤的临床与实验研究工作.

上海市青年科技启明星计划, No. 02QB14043

上海市教委基金资助课题, No. 01C06

项目负责人: 赵爱光, 200032, 上海市宛平南路 725 号, 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤一科. aiguangzhao@hotmail.com

电话: 021-64385700-2104

收稿日期: 2002-12-24 接受日期: 2003-01-08

Differentiation of hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cell line induced by Chinese medicine recipe Weichangan

Hai-Lei Zhao, Cheng Liu, Ai-Guang Zhao

Hai-Lei Zhao, Ai-Guang Zhao, No.1 Oncology Department of Longhua Hospital, affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Cheng Liu, Institute of Liver Diseases, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Supported by Research Grant of Shanghai Youth Science and Technology Venus Program, No. 02QB14043, Shanghai Education Committee Grant, No. 01C06

Correspondence to: Dr. Ai-Guang Zhao, No.1 Oncology Department of Longhua Hospital, affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China. aiguangzhao@hotmail.com

Received: 2003-03-06 Accepted: 2003-03-28

Abstract

AIM: To observe the differentiation in hepatocellular carcinoma cell line induced by Chinese medicine recipe Weichangan.

METHODS: Weichangan, contrasted by the retinoic acid and distilled water, was made by using serum pharmacological method. The inhibition on the growth of SMMC-7721 cell line by Weichangan was observed through the method of MTT and Alamar Blue. Radioimmunoassay was applied to determine the concentration of α -fetoprotein and albumin secreted by the incubated cells. Western blot method was used to detect the mutant p53, p16 and p21 protein expression in SMMC-7721 cell line.

RESULTS: MTT assay showed both Weichangan and serum retinoic acid had inhibiting effect on the proliferation of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cell line. Weichangan reached its maximal inhibition effect after 48 hours, while the effect of retinoic acid decreased gradually after 48 hours. Alamar Blue method showed that significant decrease was found in serum Weichangan after 16 hours compared with that in the control. After 32 hours, the decrease induced by Alamar Blue was more significant than that in cells incubated with serum Weichangan compared with those incubated in serum retinoic acid, indicating the gradual and durable action of Weichangan recipe. The decreased

amount ($11.4 \pm 1.4 \mu\text{g/L}$ vs $17.2 \pm 1.1 \mu\text{g/L}$, $P = 0.036$) of α -fetoprotein and increased amount ($0.40 \pm 0.02 \text{ mg/L}$ vs $0.29 \pm 0.01 \text{ mg/L}$, $P = 0.043$) of albumin were found in the cells incubated in serum Weichangan. Western blot method showed decreased expression of p53 protein and increased expression of p16 and p21 protein in cells incubated in serum Weichangan.

CONCLUSION: The results suggest that Weichangan inhibits the growth of SMMC-7721 cell line and induces the differentiation in this hepatocellular carcinoma cell line. The effect on p53, p16 and p21 may be the mechanisms of Weichangan in inducing the differentiation of this cell lines.

Zhao HL, Liu C, Zhao AG. Differentiation of hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cell line induced by Chinese medicine recipe Weichangan. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(9):1345-1348

摘要

目的: 观察中药复方胃肠安诱导肝癌细胞分化的作用.

方法: 以 SMMC-7721 人肝癌细胞为研究对象, 维甲酸为对照, 采用药物血清添加法, 通过 MTT 法和 Alamar Blue 法观察胃肠安对肝癌细胞增生的抑制作用; 放射免疫法观察对肝癌细胞分泌甲胎蛋白和白蛋白的影响; Western blot 观察对肝癌细胞 P53、P16 以及 P21 蛋白表达的影响.

结果: MTT 法显示胃肠安与维甲酸对 SMMC-7721 人肝癌细胞增生均有抑制作用, 胃肠安在 48 h 达到最大, 而维甲酸对细胞增生的抑制作用在 48 h 后逐渐下降, 较胃肠安组明显降低. Alamar Blue 法结果显示, 16 h 后, 胃肠安组细胞还原的 Alamar Blue 值较对照组明显减少, 并在 32 h 后较维甲酸组显著下降, 提示与维甲酸相比, 胃肠安作用起效慢但持续时间长; 胃肠安组分泌的甲胎蛋白较对照组显著减少 ($11.4 \pm 1.4 \mu\text{g/L}$ vs $17.2 \pm 1.1 \mu\text{g/L}$, $P = 0.036$), 而白蛋白显著增多 ($0.40 \pm 0.02 \text{ mg/L}$ vs $0.29 \pm 0.01 \text{ mg/L}$, $P = 0.043$); 胃肠安组突变型 P53 蛋白的表达较对照组明显减少, 而 P16 蛋白和 P21 蛋白的表达较对照组增多.

结论: 胃肠安方剂具有抑制 SMMC-7721 人肝癌细胞增生、诱导细胞分化的作用, 其机制可能在于减少突变型 P53 蛋白表达和增加 P16, P21 蛋白表达.

赵海磊, 刘成, 赵爱光. 中药复方胃肠安血清诱导肝癌 SMMC-7721 细胞分化. *世界华人消化杂志* 2003;11(9):1345-1348

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1345.asp>

0 引言

癌症是分化异常的疾病^[1-3], 分化障碍可能决定了肿瘤

细胞的恶性程度^[4,5],因此诱导分化已成为肿瘤治疗学研究的热点^[6,7].中药复方胃肠安以健脾扶正中药为主,临床与实验研究证实对包括肝癌在内的消化道肿瘤有良好的防治效果.我们重点研究胃肠安方剂防治肝癌的机制是否在于诱导肝癌细胞分化.

1 材料和方法

1.1 材料 选用人肝癌细胞株 SMMC-7721,购自中国科学院细胞生物学研究所. Wistar大鼠,质量 250 ± 30 g,普通级,常规颗粒饲料喂养,由上海中医药大学实验动物中心提供,制备药物血清用. 胃肠安(太子参 12 g、炒白术 12 g、茯苓 30 g、姜半夏 9 g、红藤 30 g、野葡萄藤 30 g、藤梨根 30 g、陈皮 4.5 g、生牡蛎 30 g、夏枯草 9 g、绿萼梅 9 g、青皮 4.5 g),配制成 100 g/L 的灌胃液. 全反式维甲酸由瑞金医院血液研究所提供,配制成 0.5 g/L 的灌胃液. RPMI1640 培养基干粉和胎牛血清(FBS), Gibco 公司产品; 噻唑蓝 (MTT) 购自华美生物制品有限公司; Alamar Blue: Nalgene Biosource 公司产品; 甲胎蛋白与白蛋白放免分析药盒,上海生物制品研究所产品; 兔抗 P53 多克隆抗体,博士德生物科技有限公司产品; p21^{WAF1}/Cip1/Sdi1/Pic1 鼠单克隆抗体、p16^{INK4a}/MTS1 鼠单克隆抗体, Antibody Diagnostica Inc. 产品; 抗鼠 Ig、抗兔 Ig, Amersham Pharmacia Biotech 公司产品.

1.2 方法 SMMC-7721 细胞以含 100 mL/L FBS 的 RPMI1640 培养液, 37 °C, 50 mL/L CO₂ 培养 96 h. 细胞传代以 2.5 g/L Trypsin-EDTA 消化细胞后, 加入 FBS 中止消化. 药物血清制备按参考文献[8]进行. 大鼠分别以 20 mL/kg 灌以胃肠安灌胃液与维甲酸灌胃液(均相当于临床成人用量的 10 倍), 对照组灌以等量生理盐水, 共 3 d, 2 次/d, 2 次灌胃间隔 6 h. 第 3 d 灌胃结束后禁食, 次日晨再灌胃 1 次. 1 h 后下腔静脉取血. 每只大鼠取 5-8 mL 静脉血, 离心分离血清, 即为胃肠安药物血清、维甲酸药物血清和对照血清. 56 °C 水浴灭活 30 min 后分装, 置低温冰箱中备用. 随机分为胃肠安组、维甲酸组、对照组, 分别添加 9:1 的 RPMI1640/ 胃肠安药物血清、RPMI1640/ 维甲酸药物血清、RPMI1640/ 对照血清, 使配制的各组细胞温育液中药血清浓度为 100 mL/L.

1.2.1 SMMC-7721 细胞增生检测 采用 MTT 法^[9]: 各孔加入细胞温育液 100 μ L 培养 12, 24, 48, 72, 96 h 观察药物血清对细胞增生的抑制作用. Alamar Blue 法^[10]. SMMC-7721 细胞以 5.0×10^3 /孔加入 96 孔板. 细胞贴壁后加入各组细胞温育液和 Alamar Blue, Alamar Blue 在总体积中浓度为 100 mL/L. 培养 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 72 h 后酶标仪 570 nm 和 590 nm 分别测 A 值, 计算 AB 值.

1.2.2 甲胎蛋白及白蛋白含量的测定 SMMC-7721 细胞以 2.5×10^8 /L 种于培养瓶中. 细胞贴壁后分别加入各组细胞温育液 2 mL. 48 h 后吸弃上清, 加入 RPMI1640 培养液 2 mL 培养 48 h. 吸取上清液于离心管中, 1 000 g,

离心 5 min. 取上清 1.5 mL 冷冻干燥. 采用放免法测定.

1.2.3 P53, P16 和 P21 蛋白的表达 采用 Western blot 方法. 蛋白样品制备: SMMC-7721 细胞以 2.5×10^8 /L 接种于培养皿. 贴壁后分别加入各组细胞温育液. 48 h 后加入 RIPA 裂解液 150 μ L 将贴壁细胞刷下, 移入离心管内. 4 °C, 15 000 g 离心 15 min, 取上清, -20 °C 保存. 取 4 μ L 标准品或样品分别与考马斯亮蓝溶液 2 mL 混匀, 595 nm 波长处测吸光度. 计算每组样品浓度, 确定上样量. 电泳: 灌制分离胶和积层胶. 按以上计算结果平衡上样量, 余数用裂解液补齐. 95 °C 水浴 5 min. 倒入电泳缓冲液. 加样品和 Marker, 电压 90 V, 电泳 120 min. 转膜: 剪取硝酸纤维素滤膜贴于凝胶上, 并在转膜装置中放置冰盒. 加转移缓冲液. 电流 0.22 mA, 转膜 90 min. 杂交与检测: 滤膜以 50 g/L 脱脂奶粉的 TBS 封闭抗原. 加入兔抗 P53 多克隆抗体, 稀释度 1:200, 4 °C, 摇床摇动过夜. TTBS 洗 3 次. 加入抗兔 Ig, 稀释度 1:2 000, 室温下摇动 1 h. TTBS 洗 3 次. 将滤膜浸入 ECL 中, 1 min 后取出, 暗匣内固定. 暗室中放入胶片. 曝光 15 min, 显影 2 min, 清水洗后再定影 5 min, 观察实验结果. 以 β - 巯基乙醇洗膜后, 一抗加 p21^{WAF1}/Cip1/Sdi1/Pic1 或 p16^{INK4a}/MTS1 鼠单克隆抗体进行 P21 和 P16 蛋白的观察, 二抗为抗鼠 Ig.

统计学处理 采用双侧 t 检验.

2 结果

2.1 SMMC-7721 肝癌细胞在 100 mL/L FBS 的 RPMI1640 培养液中生长良好, 对数生长期 4 d 后进入平台期(图 1).

2.2 胃肠安药物血清对 SMMC-7721 细胞增生的抑制作用 MTT 分析结果显示胃肠安及维甲酸药物血清对该细胞增生有抑制作用(表 1). 培养 16 h 后, 胃肠安组还原的 Alamar Blue 值与对照组相比明显减少($P < 0.05$); 维甲酸组在 16, 24 h 与对照组相比有显著差异, 但随后的观察点未见显著差异; 胃肠安组在 32, 40, 48, 72 h 与维甲酸组相比有显著差异($P < 0.05$, 表 2).

表 1 药物血清对 SMMC-7721 细胞的抑制率(% , $n=5, \bar{x} \pm s$)

分组	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
胃肠安组	11.0 \pm 1.1	16.9 \pm 2.1	21.4 \pm 5.4	21.5 \pm 4.0 ^a	18.4 \pm 1.5 ^a
维甲酸组	12.3 \pm 0.6	23.8 \pm 2.4	21.5 \pm 3.2	11.1 \pm 0.6	7.5 \pm 1.3

^a $P=0.032$, vs 维甲酸组.

2.3 胃肠安药物血清对 SMMC-7721 细胞分泌甲胎蛋白和白蛋白的影响 胃肠安组甲胎蛋白分泌量较对照组明显减少($11.4 \pm 1.4 \mu\text{g/L}$ vs $17.2 \pm 1.1 \mu\text{g/L}$, $P=0.036$), 白蛋白分泌量较对照组明显增多($0.40 \pm 0.02 \text{ mg/L}$ vs $0.29 \pm 0.01 \text{ mg/L}$, $P=0.043$); 维甲酸组甲胎蛋白量与白蛋白量较对照组也有减少与增多的趋势, 但统计未见明显差异.

表2 肝癌细胞还原 Alamar Blue 值(% , $n=5, \bar{x} \pm s$)

分组	0 h	8 h	16 h	24 h	32 h	40 h	48 h	72 h
胃肠安组	0.9 ± 1.0	7.5 ± 1.1	15.2 ± 1.6 ^a	25.3 ± 1.2 ^a	29.4 ± 1.9 ^{a, c}	33.6 ± 2.0 ^{a, c}	38.3 ± 2.6 ^{a, c}	49.3 ± 3.3 ^{a, c}
维甲酸组	1.0 ± 0.6	9.7 ± 1.0	16.6 ± 1.6 ^a	29.7 ± 6.2 ^a	39.7 ± 3.9	49.1 ± 5.2	57.1 ± 7.7	80.9 ± 11.1
对照组	0.3 ± 1.2	9.5 ± 1.7	23.2 ± 2.9	39.8 ± 2.7	45.3 ± 4.7	52.9 ± 8.3	62.2 ± 13.5	84.1 ± 26.8

^aP=0.021 vs 对照组; ^cP=0.038 vs 维甲酸组.

2.4 胃肠安药物血清对 SMMC-7721 细胞 P53, P16, P21 蛋白的影响 胃肠安组突变型 P53 蛋白表达较对照组和维甲酸组明显减少. 密度扫描积分: 胃肠安组 3 559, 维甲酸组 4 277, 对照组 4 042; 胃肠安组 P16 蛋白表达较维甲酸组和对对照组增多. 密度扫描积分: 胃肠安组 5 265, 维甲酸组 4 992, 对照组 4 797; 维甲酸组和胃肠安组 P21 蛋白表达较对照组增多. 密度扫描积分: 胃肠安组 6 171, 维甲酸组 6 764, 对照组 5 809.

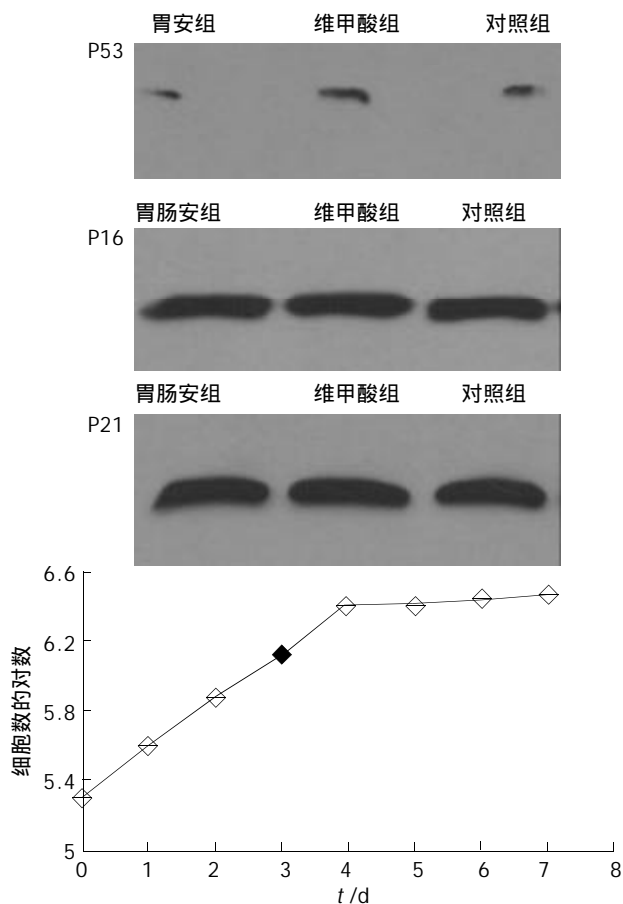


图1 SMMC-7721 人肝癌细胞生长曲线的观察.

3 讨论

SMMC-7721 人肝癌细胞是目前体外研究肝癌常用的细胞株^[11-13]. 我们在细胞传代后 24h 添加药物血清, 作用 48 h 后观察实验结果. 全反式维甲酸具有诱导 Bel-7402 和 SMMC-7721 人肝癌细胞分化的作用^[14, 15], 因而本研究中以维甲酸为对照. MTT 法显示胃肠安及维甲酸药物血清对 SMMC-7721 细胞增生有一定的抑制作用, 维甲酸最大抑制作用出现在 24 h 和 48 h, 而胃肠安出现在

48 h 和 72 h. Alamar Blue 为一种染料, 在细胞培养上清液中可作为氧分子电子传递链的受体, 因而可以反映所研究的细胞对氧分子的消耗, 以观察细胞的代谢状况^[16-19]. 与 MTT 分析法相比, Alamar Blue 法可以连续、快速地检测细胞的增生状态, 并且由于是对同一批细胞的增生状态进行观察, 因此有操作简便和几乎不干扰细胞正常代谢的特点. 结果显示胃肠安组细胞代谢状态最低, 表明胃肠安对该细胞增生具有抑制作用; 维甲酸组在 16、24 h 与对照组相比有差异, 但 24 h 后观察未见显著差异, 说明维甲酸抑制细胞增生的作用减弱. 综合 MTT 与 Alamar Blue 的结果, 胃肠安对 SMMC-7721 肝癌细胞增生有抑制作用. 与维甲酸相比, 其抑制作用起效慢, 但持续时间长. 甲胎蛋白和白蛋白是目前较为公认的反映肝癌细胞分化程度的指标, 甲胎蛋白是肝癌细胞去分化的标志, 而白蛋白是分化的标志. 实验结果显示胃肠安组细胞分泌的甲胎蛋白量较对照组明显减少, 而分泌的白蛋白显著增多, 提示胃肠安对该肝癌细胞具有诱导分化作用.

P53 过表达参与肝癌去分化和增生, 有研究显示 p53 基因突变与肝癌的分化等级、肝癌微血管侵犯显著相关, 可导致肿瘤早期转移, 是肝癌预后差的指标^[20-28]. 本结果显示胃肠安组中突变型 P53 蛋白表达较对照组明显减少, 提示胃肠安方剂有降低 SMMC-7721 人肝癌细胞突变型 P53 蛋白表达的作用. P16 蛋白通过直接作用于 CDK4/6, 阻滞其与 CyclinD 结合, 避免 Rb 蛋白磷酸化及 E2F 因子释放, 将细胞周期停滞在 G1 期, 从而抑制细胞过度增生. 已发现 P16 蛋白表达缺失与肝癌分化密切相关^[29-36]. 我们观察到胃肠安组细胞中 P16 蛋白表达较对照组增多, 提示胃肠安可能通过增加 P16 蛋白表达诱导该肿瘤细胞分化. p21 是调节细胞生长和分化的重要基因, 几乎能抑制与 Rb 基因磷酸化有关的所有周期素 - 周期素依赖激酶复合物^[37-40]. 实验结果胃肠安组细胞中 P21 蛋白表达较对照组增多, 提示胃肠安方剂可能通过增加 P21 蛋白表达抑制细胞增生, 诱导细胞分化. 实验中观察到维甲酸组 P21 蛋白表达明显增多, 可能与维甲酸通过该作用环节诱导肝癌细胞分化有关.

分化是组织胚胎学概念. 细胞正常分化过程受到基因的严格调控. 本实验观察到中药复方胃肠安血清减少 SMMC-7721 人肝癌细胞突变型 P53 蛋白表达和增加 P16、P21 蛋白表达, 这可能是胃肠安诱导该肝癌细胞分化的分子生物学机制.

4 参考文献

- 1 Kanazawa T, Watanabe T, Kazama S, Tada T, Koketsu S, Nagawa H. Poorly differentiated adenocarcinoma and mucinous carcinoma of the colon and rectum show higher rates of loss of heterozygosity and loss of E-cadherin expression due to methylation of promoter region. *Intern J Cancer* 2002;102: 225-229
- 2 Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, Yang JM. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol* 2002;8:987-993
- 3 Yamamoto H, Ochiya T, Takeshita F, Toriyama-Baba H, Hirai K, Sasaki H, Sasaki H, Sakamoto H, Yoshida T, Saito I, Terada M. Enhanced skin carcinogenesis in cyclin D1-conditional transgenic mice: cyclin D1 alters keratinocyte response to calcium-induced terminal differentiation. *Cancer Research* 2002; 62:1641-1647
- 4 Faderl S, Keating MJ, Do KA, Liang SY, Kantarjian HM, O'Brien S, Garcia-Manero G, Manshouri T, Albitar M. Expression profile of 11 proteins and their prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia* 2002;16: 1045-1052
- 5 Schmied BM, Ulrich AB, Matsuzaki H, El-Metwally TH, Ding X, Fernandes ME, Adrian TE, Chaney WG, Batra SK, Pour PM. Biologic instability of pancreatic cancer xenografts in the nude mouse. *Carcinogenesis* 2000;21:1121-1127
- 6 Charrad RS, Gadhoom Z, Qi J, Glachant A, Allouche M, Jasmin C, Chomienne C, Smadja-Joffe F. Effects of anti-CD44 monoclonal antibodies on differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cell lines. *Blood* 2002;99:290-299
- 7 Chambery D, De Galle B, Ehrenborg E, Babajko S. Multi-hormonal regulation of IGFBP-6 expression in human neuroblastoma cells. *Growth Horm IGF Res* 2000;10:349-359
- 8 Liu P, Zhou JF, Hu YY, Liu CH, Lin C. Effect and significance of "benefiting qi and nourishing yin" on induction of hepatoma cell differentiation. *Zhongguo Zhongyi Jichu Yixue Zazhi* 2000; 6:29-34
- 9 Mao H, Zhang L, Wang Y, Li X. Experimental studies of icariin on anticancer mechanism. *Zhongyao* 2000;23:554-556
- 10 Elattar TM, Virji AS. Effect of tea polyphenols on growth of oral squamous carcinoma cells in vitro. *Anticancer Res* 2000; 20:3459-3465
- 11 Tian G, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Yue H, Li JY, Mei Q. Effect of Nimesulide on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:483-487
- 12 Chan RC, Xie H, Zhao GP, Xie Y. Dendritomas formed by fusion of mature dendritic cells with allogenic human hepatocellular carcinoma cells activate autologous cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Letters* 2002;83:101-109
- 13 Fang Y, Jin JW, Zha XL. Role of FAK in TNF-alpha/Cycloheximide-induced apoptosis of SMMC-7721 cells. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2001;33:53-58
- 14 Wang L, Tang Z, Xue Q, Sun H, Chen J, Gao D, Zhao Y, Chen J, Sun R, Liu Y, Ye S. Effects of interferon-alpha on recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma after curative resection in nude mice. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2001;9:154-156
- 15 Chen HM, Huang W, Huang JQ. Effect of retinoic acid and sodium butyrate on expression of hepatocarcinoma specific enzymes. *J Pract Oncol* 2000;15:11-13
- 16 DeForge LE, Billeci KL, Kramer SM. Effect of IFN-gamma on the killing of *S. aureus* in human whole blood. Assessment of bacterial viability by CFU determination and by a new Method using alamarBlue. *J Immunol Methods* 2000;245:79-89
- 17 Back SA, Khan R, Gan X, Rosenberg PA, Volpe JJ. A new Alamar Blue viability assay to rapidly quantify oligodendrocyte death. *J Neurosci Methods* 1999;91:47-54
- 18 Mountzouros KT, Howell AP. Detection of complement-mediated antibody-dependent bactericidal activity in a fluorescence-based serum bactericidal assay for group B *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 2000;38:2878-2884
- 19 Gloeckner H, Jonuleit T, Lemke HD. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar BlueTM. *J Immunol Methods* 2001;252:131-138
- 20 Liu H, Wang Y, Zhou Q, Gui SY, Li X. The point mutation of p53 gene exon7 in hepatocellular carcinoma from Anhui Province, a non HCC prevalent area in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:480-482
- 21 Qin LX, Tang ZY, Ma ZC, Wu ZQ, Zhou XD, Ye QH, Ji Y, Huang LW, Jia HL, Sun HC, Wang L. P53 immunohistochemical scoring: an independent prognostic marker for patients after hepatocellular carcinoma resection. *World J Gastroenterol* 2002;8:459-463
- 22 Martins C, Kedda MA, Kew MC. Characterization of six tumor suppressor genes and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in southern African blacks. *World J Gastroenterol* 1999;5:470-476
- 23 Peng XM, Peng WW, Yao JL. Codon 249 mutations of p53 gene in development of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 1998;4:125-127
- 24 Ming L, Yuan B, Thorgeirsson SS. Characteristics of high frequency 249 codon mutation of p53 gene in hepatocellular carcinoma in prevalent area of China. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1999;21:122-124
- 25 Shao J, Li Y, Li H, Wu Q, Hou J, Liew C. Deletion of chromosomes 9p and 17 associated with abnormal expression of p53, p16/MTS1 and p15/MTS2 gene protein in hepatocellular carcinomas. *Chin Med J (Engl)* 2000;113:817-822
- 26 Zhu Z, Zhu M, Ni C. Significance of p33(ING1b) and p53 gene expression in hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:1332-1336
- 27 Ming L, Thorgeirsson SS, Gail MH, Lu P, Harris CC, Wang N, Shao Y, Wu Z, Liu G, Wang X, Sun Z. Dominant role of hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong, China. *Hepatology* 2002;36:1214-1220
- 28 Niu ZS, Li BK, Wang M. Expression of p53 and C-myc genes and its clinical relevance in the hepatocellular carcinomatous and pericarcinomatous tissues. *World J Gastroenterol* 2002;8:822-826
- 29 Liew CT, Li HM, Lo KW, Leow CK, Chan JY, Hin LY, Lan WY, Lai PB, Lim BK, Huang J, Leung WT, Wu S, Lee JC. High frequency of p16INK4A gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1999;18:789-795
- 30 Liew CT, Li HM, Lo KW, Leow CK, Lau WY, Hin LY, Lim BK, Lai PB, Chan JY, Wang XQ, Wu S, Lee JC. Frequent allelic loss on chromosome 9 in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1999;81:319-324
- 31 Luo D, Liu Q, Su J. The expression of p16, CDK4 and pRb in hepatocellular carcinomas. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 1999; 7:94-95
- 32 Jin M, Piao Z, Kim NG, Park C, Shin EC, Park JH, Jung HJ, Kim CG, Kim H. P16 is a major inactivation target in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000;89:60-68
- 33 Suh SI, Pyun HY, Cho JW, Baek WK, Park JB, Kwon T, Park JW, Suh MH, Carson DA. 5'-Aza-2'-deoxycytidine leads to down-regulation of aberrant p16INK4A RNA transcripts and restores the functional retinoblastoma protein pathway in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Letters* 2000;160:81-88
- 34 Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S. Expression of mRNA for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins and DNA methylation status on CpG islands and pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2001;33:561-568
- 35 Azechi H, Nishida N, Fukuda Y, Nishimura T, Minata M, Katsuma H, Kuno M, Ito T, Komeda T, Kita R, Takahashi R, Nakao K. Disruption of the p16/cyclin D1/retinoblastoma protein pathway in the majority of human hepatocellular carcinomas. *Oncology* 2001;60:346-354
- 36 Huang J, Shen W, Li B, Luo Y, Liao S, Zhang W, Cheng N. Molecular and immunohistochemical study of the inactivation of the p16 gene in primary hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2000;113:889-893
- 37 Shi YZ, Hui AM, Takayama T, Li X, Cui X, Makuuchi M. Reduced p21(WAF1/CIP1) protein expression is predominantly related to altered p53 in hepatocellular carcinomas. *British J Cancer* 2000;83:50-55
- 38 Gong Y, Deng S, Zhang M, Wang G, Minuk GY, Burczynski F. A cyclin-dependent kinase inhibitor (p21(WAF1/CIP1)) affects thymidine incorporation in human liver cancer cells. *British J Cancer* 2002;86:625-629
- 39 Yoshizawa K, Cioca DP, Kawa S, Tanaka E, Kiyosawa K. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand troglitazone induces cell cycle arrest and apoptosis of hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer* 2002;95:2243-2251
- 40 Suzui M, Masuda M, Lim JT, Albanese C, Pestell RG, Weinstein IB. Growth inhibition of human hepatoma cells by acyclic retinoid is associated with induction of p21 (CIP1) and inhibition of expression of cyclin D1. *Cancer Research* 2002;62:3997-4006



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

