

复方肝癌宁含药血清诱导肝癌HepG₂细胞凋亡的实验研究

袁冬生, 王新华, 李常青, 刘妮

■背景资料

细胞凋亡调控机制的失常是包括肿瘤在内的一系列疾病的产生根源。因此, 细胞凋亡已成为当前细胞生物学, 尤其是肿瘤学基础与临床研究的前沿与热点。利用血清药理学方法、动物实验等手段证实中药复方具有诱导肝癌细胞凋亡的作用, 是一种很重要的研究方法。

袁冬生, 广州中医药大学职业技术学院 广东省广州市 510405
王新华, 广州中医药大学校长办公室 广东省广州市 510405
李常青, 刘妮, 广州中医药大学热带医学研究所 广东省广州市 510405

广东省科技厅科技计划资助项目, No.2005B33001032

通讯作者: 袁冬生, 510405, 广东省广州市, 广州中医药大学职业技术学院. ydshy@21cn.com

电话: 020-36585519 传真: 020-36585521

收稿日期: 2005-11-23 接受日期: 2005-11-25

Apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line HepG₂ induced by composite Gan'aining medicated serum *in vitro*

Dong-Sheng Yuan, Xin-Hua Wang, Chang-Qing Li, Ni Liu

Dong-Sheng Yuan, Professional Technology College, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Xin-Hua Wang, Headmaster's Office, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Chang-Qing Li, Ni Liu, Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Supported by Department of Science and Technology of Guangdong Province, No. 2005B33001032

Correspondence to: Dong-Sheng Yuan, Professional Technology College, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China. ydshy@21cn.com

Received: 2005-11-23 Accepted: 2005-11-25

Abstract

AIM: To investigate the efficacy of composite Gan'aining (CGN) in inducing the apoptosis of human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line HepG₂ *in vitro*.

METHODS: Human HCC HepG₂ cells were co-cultured with non-medicated serum, 5-FU medicated serum, and different concentrations of CGN medicated serum, respectively. The apoptosis of HepG₂ cells was detected by TUNEL and flow cytometry (FCM), respectively.

RESULTS: CGN medicated serum at different

concentrations inhibited the growth of HepG₂ cells *in vitro*. After treatment with CGN, typical features of apoptosis such as apoptotic body were observed under light microscope. High-, moderate- and low-dose CGN medicated serum induced apoptotic rates (by TUNEL) of 14.5% ± 1.81%, 13.61% ± 1.78% and 10.19% ± 1.77%, respectively, which were significantly higher than that induced by non-medicated serum (0.74% ± 0.12%)(all $P < 0.01$). The sub-G₁ peaks were observed by FCM in CGN treated cells and the apoptosis rates of the cells treated with high-, moderate- and low-dose CGN medicated serum were 15.1%, 12%, and 5.5%, respectively, which were markedly higher than that of the cells treated with non-medicated serum (1.0%)($P < 0.01$ or $P < 0.05$).

CONCLUSION: CGN can induce the apoptosis of human HCC cells *in vitro* in a dose-dependent manner.

Key Words: Composite Gan'aining; Apoptosis; HepG₂ cell line; Serum pharmacology

Yuan DS, Wang XH, Li CQ, Liu N. Apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line HepG₂ induced by composite Gan'aining medicated serum *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(5): 522-525

摘要

目的: 观察复方肝癌宁含药血清对肝癌HepG₂细胞凋亡的诱导作用。

方法: 运用中药血清药理学方法, 选择不同浓度的含药血清与人肝癌HepG₂细胞共同孵育观察, 并与阳性血清组、无药血清组作对照。

结果: 复方肝癌宁含药血清可显著抑制HepG₂细胞的生长; TUNEL法检测HepG₂细胞在显微镜下呈现典型的凋亡形态学改变, 可见“凋亡小体”, 高、中、低剂量含药血清组凋亡率分别为: 14.50%, 13.61%和10.19%, 与无药血清组比较 $P < 0.01$; 流式细胞仪检测可见亚G₁峰, 凋亡呈含药血清浓度依赖性特点, 高、中、低剂量含药血清组凋亡率分别为15.1%, 12.0%,

5.5%, 与无药血清组比较 $P<0.01$ 或 $P<0.05$ 。

结论: 复方肝癌宁可通过诱导肿瘤细胞凋亡, 发挥临床抗肝肿瘤、抗转移的作用。

关键词: 复方肝癌宁; HepG₂; 流式细胞术; 细胞凋亡; 血清药理学

袁冬生, 王新华, 李常青, 刘妮. 复方肝癌宁含药血清诱导肝癌HepG₂细胞凋亡的实验研究. 世界华人消化杂志 2006;14(5):522-525
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/522.asp>

0 引言

复方肝癌宁是由叶下珠、青蒿、莪术、云芝等为主组成的中药复方制剂, 临床用于肝癌的治疗, 有明显改善患者生存质量和抗癌抑癌的作用。我们研究发现本方能明显提高荷肝癌HepG₂小鼠生存质量和抑瘤率, 体外有明显抑制2.2.15细胞分泌HBsAg和HBeAg两抗原的作用^[1]。为进一步探讨复方肝癌宁的抗癌细胞分子生物学机制, 我们采用流式细胞术检测该方对肝癌HepG₂细胞周期及诱导其细胞凋亡作用的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌HepG₂细胞株, 由中山大学动物中心细胞库提供, 常规培养传代。一级SD大鼠24只, 雌雄各半, 体质量250-300 g, 广东省医学动物中心提供, 常规饲养。制备实验血清用。5-氟脲嘧啶注射液(5-FU): 天津市河北制药总厂生产, 批号970277。培养基: DMEM(GIBCO)含100 mL/L胎牛血清(FCS)、0.3 g/L L-谷氨酰胺、1 mmol/L、100 g/L青霉素、100 g/L链霉素、0.01 mol/L hepes, 5.6 g/L NaHCO₃调至pH7.0。消化液与溶液: 1.25 g/L胰蛋白酶, 0.2 g/L EDTA, 碘化丙啶(P I)染色液50 mg/L, 为美国Sigma公司产品, PBS pH7.4。原位细胞死亡检测试剂盒。流式细胞仪: 美国Beckman Coulter公司(型号: ALTRA), 低速离心机, 光学显微镜。

1.2 方法

1.2.1 实验血清的制备 本实验需制备5组实验血清: 不含药物血清(无药血清组), 阳性对照5-FU血清组和复方肝癌宁高、中、低含药血清组。

取250-300 g SD大鼠30只, 雌雄各半, 随机分成5组, 每组6只。治疗组大鼠按15, 10, 5 g/kg灌胃复方肝癌宁; 阳性对照组大鼠按5 mL/只; 无药血清对照组大鼠每天灌胃生理盐水5 mL/只。

每天灌胃1次, 连续3 d, 末次给药后2 h, 以相同剂量重复给药(灌药前禁食不禁水12 h)1次, 再过1 h, 乙醚麻醉, 750 mL/L乙醇消毒, 心脏取血, 3 000 r/min离心20 min, 合并同组动物血清, 无菌分离血清即为含药血清, 经50℃, 30 min水浴灭活处理后, 置-20℃冰箱保存备用。临用前加入RPMI-1640 培养液调成所需浓度供实验用。

1.2.2 细胞培养条件 人肝癌细胞HepG₂接种于将含100 mL/L小牛血清、100 g/L青霉素、100 g/L链霉素的RPMI-1640完全培养液中, 37℃、含50 mL/L CO₂培养箱内培养, 并用2.5 mL/L胰蛋白酶消化传代。

1.2.3 实验血清添加方法 在指数生长期细胞于4℃冰箱放置1 h, 使细胞生长同步化, 分别加入复方肝癌宁(高、中、低剂量)、5-FU, 同时设无药血清对照组至96孔培养板中, 每个药物浓度设平行孔6孔。收集 1×10^6 /L细胞, 用含100 mL/L小牛血清的DMEM洗1次, PBS洗2次, 用70 mL/L乙醇固定。

1.2.4 指标检测 原位末端核苷标记法(TUNEL)检测细胞凋亡。采用TUNEL法(末端脱氧核苷酰转移酶介导的脱氧尿苷三磷酸原位缺口末端标记法), 具体操作按试剂盒说明书。结果判断标准: 在光学显微镜下观察, 胞核染成棕黄色的为凋亡细胞。计数至少1 000个细胞。

流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡。把各类样品制成单细胞悬液, 固定于70 mL/L冰乙醇中, 置4℃冰箱固定保存24-36 h, 取出单个细胞悬液, 离心洗涤去除乙醇, 加PBS, 用300目尼龙网过滤, PBS洗涤二次, 倒去上清, 调整细胞数(1×10^6 /L), 加入P I 荧光染液1 mL, 孵育25 min, 进行流式细胞仪检测。运用EXPO32软件采集30 000个细胞, 进行细胞周期分布及凋亡率测定。

统计学处理 TUNEL法凋亡率采用方差分析、*t*检验进行比较分析; FCM法细胞周期分布分析和凋亡率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 细胞的形态学变化 光镜下, 各组细胞均表现出肿瘤细胞的典型凋亡特征, 如细胞核固缩、胞质浓缩、细胞体急剧变小、细胞骨架解体等。其中空白对照组和无药血清组少见有凋亡形态的细胞出现, 而阳性血清组和复方肝癌宁高、中、低剂量含药血清组, 则可见有细胞凋亡的典型形态学变化出现, 如细胞体积缩小, 细胞膜完整, 细胞核固缩、染色质凝聚深染; 细胞失去

■ 相关报道

关于中药复方治疗肝癌的实验研究, 作者曾进行研究进展的报道。(袁冬生, 王新华. 中药复方治疗肝癌的实验研究进展. 世界肿瘤杂志 2004; 3 :285-287). 其他与本文相关的报道详见本论文参考文献。

■名词解释

中药血清药理学: 给实验动物灌服中药一定时间后, 取其血清进行实验的药理学研究方法。中药血清药理学是研究和探索中药药效作用的一种体外实验方法, 对成分复杂的中药及粗提物制剂的药理实验提供了正确性、真实性和可靠性的保证, 引起了医药界人士的广泛关注。

表 1 TUNEL法不同实验血清对HepG₂细胞凋亡率($n = 6$, mean \pm SD)

| 组别 | 凋亡率(%) |
|---------|-------------------------------|
| 空白对照组 | 0.48 \pm 0.08 |
| 无药血清组 | 0.74 \pm 0.12 |
| 5-FU血清组 | 16.72 \pm 1.85 ^b |
| 高剂量血清组 | 14.50 \pm 1.81 ^b |
| 中剂量血清组 | 13.61 \pm 1.78 ^b |
| 低剂量血清组 | 10.19 \pm 1.77 ^b |

^b $P < 0.01$ vs 空白组, 无药血清组。

表 2 不同实验药物血清对HepG₂细胞凋亡和细胞周期时相分布的影响

| 组别 | 凋亡率(%) | 各期细胞(%) | | |
|---------|-------------------|--------------------------------|------|-------------------|
| | | G ₀ /G ₁ | S | G ₂ /M |
| 空白对照组 | 2.3 | 56.9 | 27.6 | 15.5 |
| 无药血清组 | 1.0 | 61.3 | 24.0 | 14.7 |
| 5-FU血清组 | 16.9 ^b | 62.8 | 18.5 | 18.7 |
| 高剂量血清组 | 15.1 ^b | 62.8 | 14.2 | 23.0 |
| 中剂量血清组 | 12.0 ^b | 58.7 | 19.1 | 22.2 |
| 低剂量血清组 | 5.5 ^a | 63.9 | 22.6 | 13.5 |

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 空白组, 无药血清组。

微绒毛, 胞浆浓缩, 胞浆和细胞器密度增高, 胞内可见空泡, 核染色质浓缩、凝聚靠近于核膜周边, 形成不同形状和大小的块状(核碎片); 可见有膜包裹的“细胞质”或核碎片, 称为“凋亡小体”。

2.2 TUNEL法不同实验药物血清对HepG₂细胞凋亡率 高、中、低含药血清组的细胞凋亡率呈浓度依赖性, 表现出明显的量效关系(表1)。

2.3 凋亡率测定及周期时相分析 由于散射光与细胞大小有关, 在前散射光(FSC)与侧散射光(SSC)的点图上, 可根据细胞凋亡时, 表现为细胞皱缩, 细胞体变小, FSC低于正常, 初步分出正常细胞和凋亡细胞。在直方图上显示, G₁/G₀、S、G₂/M以及在G₀/G₁前出现的DNA含量减少亚二倍体峰(凋亡峰), 通过测定DNA含量, 分析细胞的周期时相百分率及凋亡率; 异倍体的出现对肿瘤的诊断及预后判断有着重要的意义。

2.3.1 凋亡率测定 在细胞DNA直方图上, 可见阳性血清组和复方肝癌宁高、中、低剂量含药血清组在G₁峰前出现了明显亚二倍体峰, 即凋亡细胞形成的凋亡峰(Ap峰), 凋亡率分别为16.9%、

15.1%、12.0%和5.5%; 而空白对照组和无药血清组DNA直方图上则见很小的Ap峰, 凋亡率分别为2.3%和1.0%, 为肿瘤细胞的自发凋亡。经统计学 χ^2 检验, 高、中、低剂量血清组和5-FU血清组凋亡率与空白对照组和无药血清组相比均有显著性差异($P < 0.01$)。

2.3.2 细胞周期时相分布分析(表2) 空白对照组与无药血清组各期细胞所占百分比非常接近($P > 0.05$), 阳性血清组和复方肝癌宁高、中、低剂量血清组的S期细胞百分比都较前述两组为高, 而G₀/G₁期和G₂/M期细胞数则明显降低。其中, 高剂量血清组S期和G₀/G₁期细胞百分比与空白对照组及无药血清组相比均有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

细胞凋亡(apoptosis)现象早在1972年Kerr *et al*^[2]就已描述。他们主要根据细胞形态学上的不同将细胞凋亡和坏死分开, 并指出前者是一个主动的、程序化的细胞固有的死亡过程, 称为程序性细胞死亡(PCD), 凋亡异常(相对减弱)是肿瘤形成和发展的一个重要原因。通过各种途径和方式诱导、增强肿瘤细胞的凋亡, 是抑制、杀伤肿瘤细胞的一个重要方面^[3]。

研究表明该复方药物青蒿^[4-6]、莪术^[7-9]、叶下珠^[10-12]、广豆根^[13-15]等均有较好的抗肝癌作用。中医认为正气虚衰, 邪毒内侵, 气滞血瘀, 癌毒蓄积是肿瘤发生和发展的主要原因。因此, 扶正固本, 解毒化瘀, 祛除毒结是治疗肿瘤的基本原则。复方肝癌宁为纯中药复方制剂, 由叶下珠、青蒿、云芝为主, 佐以广豆根、莪术、菟丝子等组成。其中云芝、菟丝子健脾益气、补肾养肝, 广豆根、叶下珠、青蒿清热祛湿、理气散结, 莪术活血破瘀, 共奏扶正固本、清热解毒、化瘀散结之功, 故能促使正气恢复、抑制肿瘤的生长和发展。

流式细胞术(FCM)是当前最先进的技术之一, 他能迅速、准确、简便地分析细胞周期各时相的分布。本研究应用FCM分析了复方肝癌宁抗肝癌HepG₂的细胞学机制, 发现复方肝癌宁使DNA合成期(S)细胞明显减少, 百分率下降, 而DNA合成前期(G₁)细胞显著增加, 说明复方肝癌宁可阻滞癌细胞G₁期向S期的进程, 造成G₁期细胞堆积。有学者指出, 如G₁期被阻断, 就可阻断DNA合成和复制, 从而能有效地控制癌细胞的增殖^[16]。其详细机制有待于进一步探讨。

4 参考文献

- 1 袁冬生, 王新华, 李常青, 肖会泉. 复方肝癌宁抗乙型肝炎病毒的体外实验研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1292-1294
- 2 Kerr JFR, Wyllie AH, Curie AR. Apoptosis: a basic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-241
- 3 胡野, 凌志强, 单小云. 细胞凋亡的分子医学. 第1版. 北京: 军事医学科学出版社, 2002: 490-492
- 4 陈绍芳, 徐亦益, 刘祥麟, 马洁羽, 于晓宏, 贾旭玲, 朱家光. 青蒿琥酯对小鼠Heps肝癌的抑瘤作用. 中国肿瘤 2004; 13: 375-378
- 5 李燕, 李明远, 王林, 蒋中华, 李婉宜, 李虹. 青蒿油诱导肝癌细胞凋亡的实验研究. 四川大学学报(医学版) 2004; 35: 337-339
- 6 吴玲霓, 黄真炎, 雷妮妮, 杨冬娣, 余思雄, 陈征途, 曾庆平. 青蒿素诱导肝癌细胞凋亡的电镜观察. 新中医 2002; 34: 76-77
- 7 王娟, 王顺启, 倪虹, 陈力, 宋文芹. 莪术挥发油抑制人肝癌细胞株SMMC-7721生长的实验研究. 天津中医药 2003; 20: 48-51
- 8 吴万垠, 徐凯, 刘伟胜, 罗海英, 朱迪盈, 陈春永, 刘宇龙, 李柳宁, 常钢, 杨志刚, 孟凡哲. 莪术油微球经肝动脉灌注栓塞治疗原发性肝癌. 上海中医药杂志 2004; 38: 3-6
- 9 陈庆仁, 李湖潮, 贺赐平. 砂冰莪术酊治疗晚期原发性肝癌疼痛的研究. 临床肝胆病杂志 2003; 19: 312-315
- 10 张建军, 黄育华, 晏雪生, 张赤志, 盛国光, 王伯祥. 叶下珠药物血清对人肝癌细胞株的诱导分化作用的实验研究. 中国中医药科技 2002; 9: 289-291
- 11 魏春山, 贺劲松, 贺宪, 周大桥, 童光东, 陈孝银. 中药复方叶下珠防治原发性肝癌探析. 辽宁中医杂志 2005; 32: 199-200
- 12 杨书兰, 邝幸华, 朱宇同. 叶下珠复方制剂对小鼠肝癌抑制作用的实验研究. 癌症 2000; 19: 837-838
- 13 朱玉娟, 周爱玲, 茅家慧, 胡亚娥, 朱燕. 苦参素对实验性肝癌PCNA、cyclinD1、CDK4表达的影响. 中国临床药理学与治疗学 2005; 10: 52-56
- 14 马玲娣, 张彦, 文世宏, 何於娟, 康格非, 蒋纪恺. 苦参碱对小鼠H₂₂细胞抗肿瘤作用的实验研究. 重庆医科大学学报 2005; 30: 178-182
- 15 左国庆, 何松, 张燕, 汤为学. 苦参素改变端粒酶活性对人肝癌细胞株HepG₂、QGY体外增殖影响的研究. 肿瘤学杂志 2005; 11: 126-129
- 16 朱世能. 肿瘤基础理论. 第1版. 上海: 上海科技出版社 1986: 67-69

■同行评价

本文探讨了复方肝癌宁含药血清诱导肝癌HepG₂细胞凋亡的作用, 目的明确, 设计合理. 具有一定的指导意义.

电编 韩江燕 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006 年版权归世界胃肠病学杂志社

● 消息 ●

第十一届全国胰腺外科学术研讨会征文

本刊讯 中华医学会外科学分会胰腺外科学组定于2006-09-08/11在西部高原城市青海省西宁市举行第十一届全国胰腺外科学术研讨会, 届时将邀请全国普外科百位知名专家到会就胰腺癌和急性胰腺炎的诊治规范进行专题讨论, 欢迎全国普外科同仁参加此次研讨会, 共同商定我国胰腺癌和急性胰腺炎的诊治规范.

投稿及联系事项: 北京协和医院基本外科, 李丽君. 截稿日期2006-06-30. 通信地址: 北京市东城区王府井大街帅府园1号, 邮编: 100730. 联系电话: 010-65296021, 010-65296016; 传真: 010-65296021 (世界胃肠病学杂志社 2006-02-18)