

消瘤平移合剂含药血清诱导肝癌 H-7402 细胞凋亡的实验研究^{*}

李秀荣¹ 张 丹² 齐元富¹ 孙兆贵²

内容提要 目的 观察消瘤平移合剂含药血清对肝癌 H-7402 细胞凋亡的诱导作用。方法 运用血清药理学方法,选择不同浓度的含药血清与人肝癌 H-7402 细胞共同孵育,于不同时间观察,并与空白血清作对照。结果 消瘤平移合剂含药血清可显著抑制 H-7402 细胞的生长,H-7402 细胞在显微镜下呈现典型的凋亡形态学改变,流式细胞仪检测可见亚 G₁ 峰,凋亡呈含药血清浓度、时间依赖性特点,对照组及 5%、10% 含药血清作用 24h,其凋亡率分别为 0.49%、5.58%、8.46%,48h 凋亡率分别为 0.83%、11.58%、14.25%;bcl-2 基因检测显示 bcl-2 基因表达受抑。结论 消瘤平移合剂可通过诱导肿瘤细胞凋亡,发挥其临床抗肿瘤、抗转移的作用。

关键词 消瘤平移合剂 血清药理学 凋亡 H-7402 细胞株

Experimental Study on Xiaoliu Pingyi Mixture with Medicated Serum in Inducing Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line H-7402 LI Xiu-rong, ZHANG Dan, QI Yuan-fu, et al *The Affiliated Hospital of Shandong TCM University, Jinan (250011)*

Objective: To observe the efficacy of Xiaoliu Pingyi Mixture (XLPY) in inducing the apoptosis of human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line H-7402. **Methods:** Using serum pharmacologic method, the morphological change of apoptotic cells was observed at different time points by co-culturing with different concentrations of medicated serum containing XLPY with light and fluorescent microscopy, flow cytometry, and immunohistochemical staining methods. Blank serum was taken as control. **Results:** The different concentration of medicated serum containing XLPY could significantly inhibit the growth of H-7402 cell line in vitro. After treated with medicated serum of XLPY, the cellular morphologic changes were typical apoptosis under light and fluorescent microscopy, the sub-G₁ peaks were observed by flow cytometric assays. The apoptosis rate revealed a medicated serum concentration and time dependent manner. The control group 5%, 10% medicated serum induced apoptotic rate were 0.49%, 5.58% and 8.46% by 24h; while by 48h, it was 0.83%, 11.58% and 14.25% respectively. bcl-2 gene examination showed that the bcl-2 gene expression was inhibited. **Conclusion:** XLPY could induce apoptosis in carcinoma cells, and play the clinical role of anti-tumor and anti-metastasis.

Key words Xiaoliu Pingyi Mixture, serum pharmacology, apoptosis, H-7402 cell line

根据肿瘤术后患者正虚血瘀、余毒未清之病机特点,拟定益气活血、解毒散结之消瘤平移合剂,临床与化疗配合应用,表明消瘤平移合剂具有一定的抑瘤抗转移作用^[1]。本研究运用血清药理学方法,进行了消瘤平移合剂含药血清体外诱导肝癌 H-7402 细胞凋亡的实验,以进一步从细胞分子生物学角度探讨其抑瘤抗转移的作用机制。

材料和方法

1 材料和含药血清的制备

1.1 消瘤平移合剂由人参、黄芪、女贞子、补骨脂、山慈菇、莪术、大黄、虫、土茯苓、土贝母、生水蛭、蜈蚣等中药组成,每支 10ml,每毫升含生药 1g,由山东中医药大学附属医院制剂室加工生产(批号 980406),实验时再低温浓缩到每毫升含生药 2g,置 4℃ 冰箱保存。

1.2 细胞系 肝癌 H-7402 细胞株,购自山东省医学科学院免疫室。

1.3 主要试剂及仪器 RPMI 1640 培养液、胰蛋白酶为 GIBCO 公司分装;小牛血清为杭州四季青生物工程材料研究所产品;吖啶橙由上海化学试剂采购供应站提供;兔抗人 Bcl-2 蛋白多克隆抗体免疫组化染色试剂盒购自广州中山生物技术有限公司。流式细胞仪

^{*} 山东省卫生厅资助课题 (No. 950111)

1. 山东中医药大学附属医院(济南 250011) 2. 山东中医药大学

FACScan 美国 BECTON DICKINSON 公司, CO_2 细胞培养箱 美国 Forma 公司, 倒置显微镜 Olympus 公司, 荧光显微镜 万能显微镜 美国 AO 公司。

1.4 含药血清的制备 参考文献^(2,3)方法。Wistar 大鼠 20 只, 雄性, 体重 200g 左右(由山东中医药大学动物室提供), 随机分为 5、10 天血清制备鼠各 10 只(其中含药血清制备鼠 5 只, 空白血清制备鼠 5 只)。含药血清制备鼠给予浓缩消瘤平转移合剂 4ml/d 灌胃, 空白血清制备鼠给予等量生理盐水灌胃, 分别于给药第 5 天和第 10 天, 于最后一次灌胃后 1h(灌胃前禁食 12h), 乙醚麻醉, 腹主动脉采血, 无菌分离血清, 经 56℃、30min 灭活处理, 置 -20℃ 冰箱保存备用。

2 方法

2.1 实验分组

2.1.1 5 天血清组(由 5 天血清制备鼠制备)

(1) 对照组: 空白血清 (2) 5% 含药血清组: 5% 含药血清加 5% 空白血清 (3) 10% 含药血清组: 10% 含药血清。

2.1.2 10 天血清组(由 10 天血清制备鼠制备) 分组同 5 天血清组。

2.2 细胞培养 H-7402 细胞 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于含 10% 小牛血清和 1% 的青霉素、链霉素 PRMI 1640 培养液中, 37℃, 5% 饱和湿度下培养, 细胞贴壁生长, 隔日传代 1 次, 培养 24h, 至细胞生长旺盛后进行实验。

2.3 倒置显微镜下生长状态观察 上述培养细胞 去掉培养液, 分别加入以上各组血清于 PRMI 1640 培养液中, 在 CO_2 培养箱中继续培养 24、48h, 将培养瓶在倒置显微镜下作生长状态观察。

2.4 细胞形态学观察

2.4.1 光学显微镜观察 经上述不同血清浓度、不同培养时间处理的各组细胞分别离心, 用 PBS 洗涤 2 次, 收集细胞制成细胞悬液后涂片, 室温凉干, 以甲醇、醋酸固定 30min; Giemsa 染液与 Sorensen 磷酸缓冲液以 1:9 混合成工作液(新鲜配制)染色 10~20min, 冲净多余染液, 晾干后用普通光学显微镜观察, 并于高倍视野下, 计数 200 个细胞, 计算凋亡率⁽⁴⁾: 凋亡率(%) = 凋亡细胞数/200 × 100%。

2.4.2 荧光显微镜观察 参考文献^(5,6)方法。取经 95% 乙醇、1% 醋酸处理的各组细胞涂片, 0.01% 吖啶橙磷酸缓冲液(pH 6.0)染色 3~5min; PB 缓冲液冲洗 0.1% CaCl_2 分化 30s; PB 缓冲液冲洗; 以 PB 缓冲液为介质加盖玻片, 荧光显微镜观察。并各组分别计数 200 个细胞, 计算凋亡率, 计算方法同上。

2.5 bcl-2 基因表达检测——Bcl-2 蛋白免疫组化染色 参考文献⁽⁷⁾方法并有改进。同上制备细胞涂片, 甲醇:醋酸(3:1)固定 30min, 0.3% H_2O_2 甲醇液室温孵育 10min, PBS 冲洗 2min × 3 次, 滴加 5% 正常山羊血清(封闭液), 室温封闭 15min, 倾去多余血清, 滴加兔抗人 Bcl-2 蛋白多克隆抗体, 37℃ 孵育 2h, PBS 冲洗 3 次, 滴加生物素化羊抗兔 IgG, 37℃ 孵育 15min, PBS 冲洗 3 次, 滴加三抗(SA-HRP), 37℃ 孵育 15min, PBS 冲洗 3 次; DAB 显色: 滴加 DAB 液, 镜下控制反应时间, 蒸馏水冲洗, 终止显色。阳性细胞着色呈棕黄色颗粒, 位于胞浆和核膜。

2.6 流式细胞仪检测 每组取细胞 1×10^6 个, PBS 冲洗 2 次, 70% 冷乙醇 4℃ 固定 12h 以上, PBS 清洗细胞, 与含 1% 的 RNA 酶的 Tris HCl 缓冲液(pH 7.4) 37℃ 孵育 30min, 碘化丙啶(PI) DNA 染色, 以流式细胞仪检测凋亡细胞并分析不同 DNA 含量的细胞周期分布。所用软件为 ModFIT 和 CELLQUEST。

2.7 统计学方法 采用 *t* 检验和 Riddit 分析。

结 果

1 肝癌 H-7402 细胞生长状况观察 于倒置显微镜下观察, 对照组的肝癌细胞在镜下见其贴壁生长, 胞浆饱满, 相邻细胞生长晕融合成片, 经含药血清处理的各组细胞 24h 后观察见其细胞逐渐由贴壁而脱落, 至 48h 脱落更明显, 脱落细胞悬浮于培养液中, 细胞形态变圆, 胞膜完整, 颜色加深, 折光性增强。比较含药血清各组细胞生长状况, 以 10% 含药血清组作用 48h 脱落最明显, 而 5 天与 10 天血清组各相应组之间无明显差异(图略)。

2 形态学观察

2.1 光学显微镜下观察 对照组血清与 H-7402 细胞共同培养 24、48h, 细胞形态学上无明显变化。5% 及 10% 含药血清与 H-7402 细胞共同培养 24h 后, 即出现具有典型凋亡特征的细胞, 光镜下见部分细胞膜皱缩, 核染色质浓集, 核固缩, 胞浆内有空泡变性, 核碎裂, 继续培养 48h, 光镜下见凋亡细胞、凋亡小体增多。分别计算各组凋亡率, 结果见表 1。凋亡率随含药血清浓度增加、作用时间延长而提高: 相同培养时间, 10% 较 5% 含药血清作用明显, 同一血清浓度 48h 较 24h 作用明显($P < 0.05$), 各含药血清组与相应对照组比较差异均有显著性($P < 0.01$), 但 5 天血清组与 10 天血清组各相应组之间凋亡率差异无显著性($P > 0.05$)。

2.2 荧光显微镜下观察 油镜下见空白对照组

表 1 光学显微镜下各组凋亡率的变化 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别		凋亡率	
		培养时间 24h	48h
5 天血清	5% 含药血清	4.44 ± 0.68 *	10.19 ± 1.77 * ▲
	10% 含药血清	9.11 ± 1.01 *	13.61 ± 1.78 * ▲
	对照	0.25 ± 0.03	0.48 ± 0.08
10 天血清	5% 含药血清	5.05 ± 0.55 *	10.27 ± 1.57 * ▲
	10% 含药血清	8.55 ± 1.15 * ▲	14.50 ± 1.81 * ▲
	对照	0.51 ± 0.11	0.74 ± 0.12

注:与相应对照组比较, * $P < 0.01$; 与相应 5% 含药血清组比较, ▲ $P < 0.05$; 与同组别培养 24h 比较, ▲ $P < 0.05$; $n = 9$; 下表同

H-7402 细胞核完整,呈圆形饱满,晶莹发光。经含药血清处理的 H-7402 细胞分别于 24、48h 观察,镜下见核有部分碎裂,呈大小不等,形态不规则的碎片,或呈花瓣状细胞核,此即为凋亡细胞中的凋亡小体。镜下计算各组凋亡率,其结果与光学显微镜下结果基本相符,以 10% 含药血清作用 48h 凋亡率最高,但 10 天血清组与 5 天血清组各相应组之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

3 免疫荧光检测结果 Bcl-2 蛋白阳性表达为细胞浆或核膜呈棕黄色颗粒。判断标准⁽⁷⁾: 阴性(-) 标本中无阳性细胞着色; 阳性(+) 标本中阳性细胞数 $< 50\%$; 强阳性(++) 标本中阳性细胞数 $\geq 50\%$ 。镜下观察对照组 Bcl-2 蛋白呈阳性或强阳性表达,含药血清组阳性表达明显降低,结果见表 2。统计学结果显示, H-7402 细胞经含药血清作用后, Bcl-2 阳性表达率明显降低,与相应对照组比较,差异有显著性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 2 各组 Bcl-2 免疫荧光阳性表达比较

组别	培养时间 (h)		Bcl-2			u	P
			++	+	-		
5 天血清	24	5% 含药血清	1	4	4	1.5423	> 0.05
		对照	3	5	1	1.9052	< 0.05
		10% 含药血清	0	5	4		
	48	5% 含药血清	0	3	6	1.9052	< 0.05
		对照	2	5	2	2.227	< 0.05
		10% 含药血清	0	2	7		
10 天血清	24	5% 含药血清	0	4	5	1.9956	< 0.05
		对照	2	6	1	2.3134	< 0.05
		10% 含药血清	0	3	6		
	48	5% 含药血清	1	2	6	2.4495	< 0.05
		对照	3	6	0	3.1299	< 0.01
		10% 含药血清	0	2	7		

4 流式细胞仪检测结果 5 天血清组 5% 及 10% 的含药血清作用于 H-7402 细胞 24h 后凋亡细胞开始增多,在 DNA 直方图上表现为亚二倍体细胞增多,并出现 sub- G_1 峰,此一低 DNA 含量的亚二倍体峰的百分比,即为凋亡细胞的凋亡率。结果提示凋亡率随含药血清浓度增加、作用时间延长而提高。流式细胞仪检测凋亡

率结果与显微镜下计算结果基本相符。

细胞周期分析,含药血清作用后, S 期细胞明显减少, G_2 -M 期细胞较对照组明显增多,提示 5%、10% 的含药血清即可使细胞阻滞于 G_2 -M 期,并通过启动凋亡机制阻止肿瘤细胞恶性增殖。其细胞周期变化见表 3。

表 3 含药血清(5 天血清组)对 H-7402 细胞周期的影响 (%)

组别	作用时间(h)	凋亡率	$G_0 - G_1$	S	$G_2 - M$
5% 含药血清	24	5.58	55.57	13.65	30.78
	48	11.58	61.78	6.30	31.92
10% 含药血清	24	8.46	63.66	7.19	29.15
	48	14.25	63.28	19.44	17.28
对照	24	0.49	62.70	26.23	11.08
	48	0.83	60.10	28.30	11.60

讨 论

诱导凋亡是肿瘤治疗的新战略。近年来研究发现⁽⁸⁾,一些中药具有诱导癌细胞凋亡的作用,尤以单味中药或其提取物或中药单体成分研究为多⁽⁹⁾,中药复方具有“天然组化化学库”之称,作用机理可能是“多靶作用”(mechanism of multitarget)⁽¹⁰⁾,而细胞凋亡的发生又具有多因素、多基因、多层次级联作用特点,故复方中药较单一成分药物更有可能对基因表达的调控进行干预、影响,以调节基因代谢水平。中药复方煎液成分复杂而理化性质较难控制,且以口服药为多,一般不便直接加到细胞培养液中进行体外实验。而血清药理学方法则在研究中显示了明显的优势,其特点是实验结果与在体实验有较好的一致性,不但能反映中药及其可能的代谢产物的药理(效)作用,而且还能反映有可能由药物诱导的机体内源性成分所产生的作用,且可在某种程度上克服中药本身理化性质不确定因素对实验的干扰,从而使研究结果可信度大大提高。

中药复方消瘤平移合剂全方扶正与祛邪并用,使补而不助邪,攻而不伤正,即能调整气血阴阳和脏腑功能以调动体内免疫功能,又能活血祛瘀、解毒散结以消灭体内的肿瘤细胞。其含药血清的制备有以下特点: (1) 采用成年大鼠,体重均匀,并分别将各组大鼠血清相混,这样既能适应实验需要,也减少了动物的个体差异; (2) 为避免麻醉剂和抗凝剂的干扰,采集含药血清而不用血浆,并采用乙醚吸入麻醉; (3) 以末次灌药后 1h 采集血清,血清制备后冷存于 -20°C 备用。由于细胞培养液中多包含有较多的营养物质以及含药血清的细胞毒性作用,因此加入的含药血清浓度不宜过高,以 10% 左右为宜⁽²⁾,实验中采用 5%、10% 两种含药血清浓度。本实验结果显示,经 5%、10% 含药血清作用于

H-7402 细胞 24h 镜下观察到典型的凋亡细胞出现 ; 继续作用至 48h 凋亡细胞及凋亡小体比例明显增多。计算各组凋亡率显示 : 凋亡率随含药血清浓度增加及作用时间的延长而增加 , 以 10% 含药血清组 48h 作用最明显。但 5 天取血与 10 天取血各相应组之间镜下观察差异不明显。流式细胞仪检测结果与形态学观察相一致。细胞周期 DNA 含量分析表明含药血清作用 24、48h 均见 S 期细胞较对照组明显减少 , 而 G₂-M 期细胞较对照组增高 , 结果提示消瘤平转移合剂能使肿瘤细胞阻滞于 G₂-M 期 , 阻止细胞进入下一分裂周期 , 并通过启动凋亡机制抑制肿瘤细胞的恶性增殖。bcl-2 是细胞凋亡的抵抗基因⁽¹¹⁾ , 本研究初步证实消瘤平转移合剂可能通过降低 bcl-2 基因表达水平 , 启动细胞凋亡机制以诱导肿瘤细胞凋亡。

本研究结果显示 5 天与 10 天血清制备组诱导凋亡作用相近。表明用药 5 天与用药 10 天含药血清之药理作用强度基本一致。究其原因可能系用药 5 天 , 含药血清已达药代动力学之稳态血药浓度 , 此时含药血清有较高且稳定的中药活性成分 , 继续用药 , 得以血清中活性有效成分含量保持在稳态水平 , 以利于发挥其诱导肿瘤细胞凋亡之作用。

本研究运用血清药理学方法从细胞、分子水平证实 , 消瘤平转移合剂之抑瘤抗转移作用与诱导肿瘤细胞凋亡有关 , 并且这种诱导肿瘤细胞凋亡的作用可以经口服药物在体内实现。但诱导人肝癌细胞凋亡的药物

有效成分是药物原型还是口服进入机体后的代谢产物所产生的活性成分 , 还有待深入研究。

参 考 文 献

1. 李秀荣 , 周延峰 , 焦中华 , 等 . 消瘤平转移合剂抗肿瘤术后转移的临床研究 . 中国中西医结合杂志 2001 ; 21(5): 335—338.
2. 王宁生 , 雷 燕 , 刘 平 , 等 . 关于血清药理学的若干思考 . 中国中西医结合杂志 1999 ; 19(5): 263—266.
3. 杨勤建 , 涂晋文 . 892 号药液诱导人肝癌细胞凋亡的初步研究 . 中西医结合肝病杂志 1998 ; 8(3): 159—160.
4. 谢新生 , 高 聆 , 宋玉琴 , 等 . 515 抗癌方剂诱导白血病 HL-60 细胞凋亡的研究 . 中国中西医结合杂志 2000 ; 20(2): 129—131.
5. 韩 锐 . 抗癌药物研究与实验技术 . 北京 : 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社 , 1997 : 391—404.
6. 赵卫红 , 寿好长 , 阎福岭 . 细胞凋亡 . 郑州 : 河南医科大学出版社 , 1997 : 173—206.
7. 生秀杰 , 宋和存 , 何秀琴 . 抗凋亡基因 bcl-2 在子宫内膜癌的表达及意义 . 中华肿瘤杂志 1998 ; 20(5): 365—366.
8. 栗 俭 . 药物诱导的肿瘤细胞凋亡研究进展 . 国外医学肿瘤分册 1995 ; 22(1): 7—10.
9. 黄 镜 , 孙 燕 . 肿瘤药物治疗的新靶点 : 凋亡 . 中国新药杂志 1997 ; 6(6): 412—416.
10. 周 俊 . 中药复方——天然组合化学库与多靶作用机理 . 中国中西医结合杂志 1998 ; 18(2): 67.
11. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes : regulators of cell death. Blood 1992 ; 80 : 879—886.

(收稿 2000 - 11 - 10 修回 2001 - 06 - 03)

《中国中西医结合杂志》第六届编委会名单

名誉总编	季钟朴								
总 编 辑	陈可冀								
副总编辑	沈自尹	肖培根	陈维养(常务)						
顾 问	吴咸中	辛育龄	关幼波	邓铁涛	尚天裕	王永炎	侯 灿		
编辑委员	马必生	王一涛	王书臣	王今达	王宁生	王 阶	王学美	王 佩	王宝恩
	王硕仁	王雪苔	尹光耀	史大卓	史载祥	刘干中	刘建勋	刘耕陶	刘猷枋
	危北海	匡调元	朱 兵	吕爱平	吕维柏	齐清会	孙 燕	李 恩	李乃卿
	李大金	李玉光	李连达	李廷谦	李国贤	李国栋	李鸣真	李顺成	李恩宽
	杨任民	杨秀伟	时毓民	陈士奎	陈小野	陈冬燕	陈香美	吴伟康	陆付耳
	张大钊	张之南	张永祥	张伯礼	张国玺	张亨栋	张荣华	张家庆	张梓荆
	林求诚	林志彬	林瑞超	郁仁存	周文泉	周 俊	周霭祥	金益强	赵伟康
	唐由之	顾振纶	郭赛珊	徐治鸿	梁晓春	黄晓愚	曹小定	葛秦生	谢宗万
	谢竹藩	董福慧	曾晓春	雷 燕	蔡定芳	裴正学	黎磊石	廖家桢	廖福龙
	戴瑞鸿								