

鳖甲煎丸抑制肝癌细胞增殖、黏附及侵袭作用的实验研究

程 旸¹ 贺松其² 朱 云¹ 范 钦² 杨 爽¹ 陈 瑞¹

摘要 目的 研究鳖甲煎丸对肝癌细胞生长增殖、黏附及侵袭能力的影响,初步探讨鳖甲煎丸抗肝癌细胞的转移、侵袭作用机制。**方法** 运用血清药理学方法,以高、中剂量的鳖甲煎丸含药血清和空白血清分别培养肝癌细胞 HepG2,采用 MTT 比色法、细胞黏附实验和 transwell 侵袭实验检测药物对细胞生长、黏附和侵袭作用的影响,以进一步阐明鳖甲煎丸抗肝癌细胞的转移、侵袭作用机制。**结果** 高剂量和中剂量含药血清可显著抑制肝癌细胞生长增殖,对基底膜的黏附及侵袭穿越迁移亦有抑制作用,且该作用与药物浓度有关。**结论** 鳖甲煎丸能显著抑制肝癌细胞的生长增殖、黏附及转移侵袭。

关键词 鳖甲煎丸;原发性肝癌;增殖;黏附;侵袭

Biejiajian Pill Inhibited the Proliferation, Adhesion, and Invasion of Hepatoma Carcinoma Cells: an Experimental Research CHENG Yang¹, HE Song-qi², ZHU Yun¹, FAN Qin², YANG Shuang¹, and CHEN Rui¹ 1 First Clinical College of Southern Medical University, Guangzhou (510515), China; 2 College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou (510515), China

ABSTRACT Objective To investigate effects of Biejiajian Pill (BP) on the proliferation, adhesion, and invasion of hepatoma carcinoma cells (HepG2), and to primarily explore the mechanisms for fighting against metastasis and invasion. **Methods** Using seropharmacological methods, HepG2 cells were respectively cultured by high and middle dose BP containing serums and the vehicle serum. Using MTT colorimetry, cell adhesion test, and Transwell invasion test, effects of BP on the proliferation, adhesion, and invasion of HepG2 cells were detected, thus further exploring the mechanisms for fighting against the metastasis and invasion of HepG2 cells. **Results** High and middle dose BP containing serums could significantly prohibit the growth and proliferation, the adhesion and invasion of HepG2 cells on the basilar membrane. Besides, these effects were correlated with the concentrations of BP. **Conclusion** BP could effectively inhibit the growth and proliferation, adhesion and invasion of HepG2 cells.

KEYWORDS Biejiajian Pill; primary carcinoma of liver; proliferation; adhesion; invasion

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC), 简称肝癌。是我国常见的恶性肿瘤之一。近年来,其发病率呈持续上升趋势^[1]。生长增殖速度快、转移和侵袭能力强是肝癌的基本特征,也是影响肝癌治疗效果的重要因素。目前,对肝癌转移和侵袭的基础研究已经展开,Wnt/ β -catenin 信号通路在调控细胞的生长、运动、分化以及在胚胎发育和肿瘤发生及侵袭转移过程中起重要作用^[2,3],该信号通路作为近

年来肿瘤分子生物学领域研究的热点受到广泛关注^[4],研究发现,肝癌的转移侵袭与 Wnt/ β -catenin 信号通路有密切的关系^[5]。已有的临床研究表明,鳖甲煎丸具有较好的抑制肝癌生长,防止肝癌转移的作用^[6],如早期肝癌术后防止复发,提高 5 年生存率;与介入治疗配合提高疗效,减轻毒副反应等^[7]。但其具体抗癌机制仍不甚明确。本研究以肝癌细胞 HepG2 为模型,运用血清药理学方法研究鳖甲煎丸对肝细胞生长增殖、迁移及侵袭作用的影响,为鳖甲煎丸的临床应用提供进一步的理论依据。

材料与方法

1 材料

1.1 动物及分组 6 周龄 Wistar 大鼠,体重 (250 ± 30) g,雌雄各半,清洁级,动物许可证号:

基金项目:国家自然科学基金资助课题(No. 81072934);广东省自然科学基金资助课题(No. 9151051501000003);广东省中医药管理局基金资助课题(No. 1050128)

作者单位:1.南方医科大学第一临床医学院(广州 510515);2.南方医科大学中医药学院(广州 510515)

通讯作者:贺松其, Tel: 020-61648247, E-mail: hesongqijz@126.com

SCXK 粤 2006-0015, 批号 No. 0074358, 由南方医科大学实验动物中心提供, 在南方医科大学中医药学院实验动物中心普通饲料喂养, 自由饮水。随机分为高药物剂量组 (简称 H 组)、中药物剂量组 (简称 M 组) 和阴性对照组 (简称 N 组), 每组 8 只。

1.2 细胞株 肝癌细胞株 (HepG2) 由南方医科大学药学院抗病毒中心提供。

1.3 药物 鳖甲煎丸由杭州胡庆余堂药业有限公司提供, 产品批号: 100901。

1.4 试剂及仪器 DMEM 培养基 (高糖)、胎牛血清系美国 GIBCO 产品; MTT 试剂、胰蛋白酶、二甲亚砜 (DMSO) 由 Sigma 公司提供; transwell 小室 (8 μm)、层粘连蛋白 (laminin, LN)、纤维粘连蛋白 (fibronectin, FN)、Matrigel 人工基底膜胶由 BD 公司提供; 6、24、96 孔板由 Corning 公司提供; 磷酸盐缓冲液 (PBS) 系按照配方配制, 并经过高压灭菌; 恒温 CO_2 细胞培养孵箱系美国 Froma Scientific 产品; 超净工作台系苏州医疗仪器厂产品; 显微镜系日本 Olympus 产品; GENios 多功能酶标仪系瑞士 TECAN 公司产品。

2 方法

2.1 含药血清制备 参照文献[8]。H、M 组分别以成人 (60kg) 临床剂量的 20、10 倍的鳖甲煎丸用生理盐水溶解 (12 g/kg、6 g/kg), 按 10 mL/kg 灌胃给药, N 组用等量生理盐水灌胃, 2 次/天, 连续给药 3 天, 于第 4 天给药 2 h 后 3% 异戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 腹主动脉取血, 静置 1 h 后, 4 000 r/min 离心 30 min 分离血清, 经 56 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 30 min, 0.22 μm 过滤除菌后, 置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2 细胞培养 用含 10% (体积分数) 小牛血清 DMEM (高糖) 培养基 (简称完全培养基) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的孵箱内常规培养 HepG2 细胞, 每 3~4 天传代 1 次。

2.3 细胞增殖 将对数生长期的 HepG2 细胞悬液以 6 000/孔浓度接种于 96 孔培养板培养 48 h; 弃去培养液, 将细胞分为 4 组 (H、M、N、空白对照组) 并分别处理: H、M、N 组细胞加入含对应组药物血清 (终浓度 10%) 的完全培养基, 空白对照组 (简称对照组) 细胞仅加入完全培养基而不加药物血清, 另设调零组仅加入完全培养基而不加入细胞, 以上各组均 4 孔重复, 常规培养 48 h; 加 20 μL /孔 MTT (无血清 DMEM 溶解, 5 mg/mL), 培养 4 h; 弃上清, 加入 DMSO 150 μL /孔, 震荡 10 min, 待甲臆完全溶解, 于 GENios 多功能酶标仪上用 570 nm 波长测定各孔吸光度 (A) 值。

2.4 细胞黏附 利用 MTT 法^[9] 测定细胞的黏附情况: 倍比稀释的 2.5~40.0 μg /孔 LN、FN 和 Matrigel 分别包被 96 孔平底细胞培养板, 风干过夜, BSA 为对照基底。每孔加入 50 μL 含 0.1% BSA 的无血清培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 h, 水化基底膜。取按前述方法处理 48 h 的不同组 (H、M、N 及对照组) HepG2 细胞, 经消化、PBS 洗涤后, 0.1% BSA-DMEM 调细胞浓度为 6×10^4 /mL, 分别加入处理后的 96 孔平底细胞培养板 100 μL /孔, 4 孔重复, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下温育 30~120 min。温育结束后弃去各孔培养液, PBS 冲洗除去未黏附肿瘤细胞; 弃 PBS 后加 MTT 50 μL /孔, CO_2 箱温育 4 h; 吸弃 MTT, DMSO 150 μL /孔溶解甲臆。GENios 多功能酶标仪上 570 nm 测各孔 OD 值。分别计算细胞在 Matrigel 和 FN、LN 上的黏附率和黏附抑制率。计算公式:

黏附率 (%) = [(Matrigel 或 FN 或 LN 组细胞 OD 值/BSA 组细胞 OD 值) - 1] $\times$ 100%。

黏附抑制率 (%) = [1 - (用药组细胞黏附率/未用药组细胞黏附率)] $\times$ 100%。

2.5 细胞侵袭 取按前述方法处理 48 h 的不同组 (H、M、N 及对照组) HepG2 细胞, 吸去培养液和死亡悬浮细胞, 将贴壁细胞消化, PBS 洗涤后用 0.1% BSA-DMEM 将细胞悬液密度调整为 5×10^5 个/mL, 以 200 μL /孔对应地移入 transwell 小室的上室, 上室面覆盖孔径 8 μm 的聚碳酸酯膜, 接触细胞的一面铺 Matrigel, 另一面铺 FN, 下室加入 500 μL 含 5% FBS 的 DMEM, 4 孔重复, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 12~48 h, 轻轻刮去膜上室面的 HepG2 细胞, 24 孔板中加入 500 μL /孔 0.5 mg/mL 的 MTT, 将小室置于其中, 使膜浸没在培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 4 h 后取出。24 孔板中加入 500 μL /孔 DMSO, 将小室置于其中, 使膜浸没在 DMSO 中, 振荡 10 min, 使甲臆充分溶解。取出小室, 24 孔板于 GENios 多功能酶标仪上 570nm 测 OD 值。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK-q 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

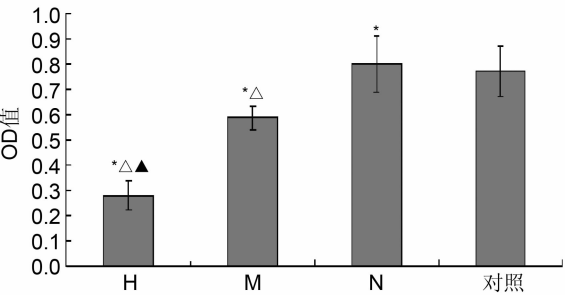
结 果

1 各组细胞增殖情况比较 (图 1) HepG2 细胞加不同组的药物血清 (H、M、N 组) 及正常血清 (对照组) 培养 48 h 后, H 组和 M 组活细胞数目 (OD 值) 与对照组及 N 组比较, 差异均有统计学意义 (P < 0.05)。

表 1 各组 Matrigel、FN、LN 的黏附率及抑制率比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	黏附率			抑制率		
		Matrigel	FN	LN	Matrigel	FN	LN
H	12	26.71 ± 18.79 * [△]	24.26 ± 10.40 * [△]	26.61 ± 18.01 * [△]	70.45 ± 14.38 * [△]	70.86 ± 15.24 * [△]	66.51 ± 11.85 * [△]
M	12	50.02 ± 16.41 *	46.74 ± 17.20 *	44.67 ± 21.18 *	44.37 ± 12.22 *	43.78 ± 10.49 *	43.43 ± 7.74 *
N	12	83.67 ± 21.32	82.10 ± 22.63	75.47 ± 12.01	6.94 ± 1.58	1.27 ± 0.43	4.12 ± 0.81

注:与 N 组比较,* $P < 0.01$;与 M 组比较,[△] $P < 0.01$

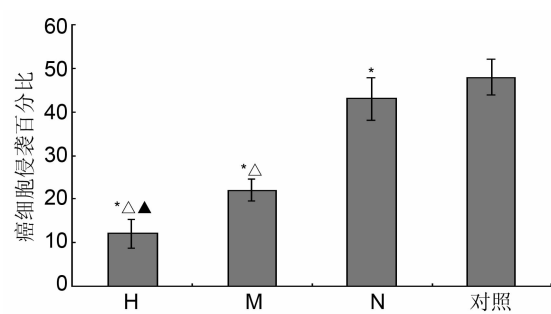


注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 N 组比较,[△] $P < 0.05$;与 M 组比较,[▲] $P < 0.05$

图 1 各组 HepG2 细胞增殖 OD 值比较

2 各组癌细胞黏附情况比较(表 1) 从量效实验可看出,不同基底膜成分(Matrigel、FN、LN)40 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 时各基底膜成分都能达到最大黏附率。而时效实验则表明:温育时间 $t \geq 2 \text{ h}$ 时各基底膜成分都能达到最大黏附率。根据公式分别计算各组细胞的黏附率和抑制率可见,H、M 组黏附率显著小于 N 组($P < 0.01$)。

3 各组癌细胞侵袭情况比较(图 2) 在培养 48 h 时,H 组和 M 组中癌细胞侵袭的百分比与 N 组及对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。



注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 N 组比较,[△] $P < 0.05$;与 M 组比较,[▲] $P < 0.05$

图 2 各组癌细胞侵袭百分比比较

讨 论

每年全球肝癌发病率位居恶性肿瘤的第 5 位,病死率位居第 3 位,而 55% 的肝癌患者分布在中国^[10]。肝癌恶性程度高,转移率高,病死率高。肝癌迁移和侵

袭是肝癌进展的关键,而肿瘤的迁移是一个多阶段的复杂过程,Liotta LA 等^[11]提出肿瘤侵袭和转移的三步学说,即黏附、降解和移动。肝癌的侵袭转移与肝癌细胞的生长、肝癌细胞对细胞外基质成分的黏附及肝癌细胞的侵袭作用有密切关系。

中医学认为,肝癌转移病机复杂,属多系统、多组织、多器官受累,寒热交错,虚实夹杂^[12]。针对肝癌转移的病机特点,中医药防治原则涉及扶正培本、解毒散结及活血化瘀等 3 个方面。鳖甲煎丸出自东汉医家张仲景所著《金匱要略》,具有寒热并用,攻补兼施,益气养血,活血化瘀,解毒散结之功。本实验选取具有高转移性的肝癌细胞 HepG2 作为研究对象,建立癌细胞生长、黏附和侵袭的相关模型,并通过设置空白对照,探究鳖甲煎丸含药血清对肝癌细胞增殖、黏附和侵袭的影响。

细胞增殖不仅与肿瘤的发生、发展密切相关,且与肿瘤的治疗直接相关。如何特异性地抑制肿瘤细胞增殖,诱导其凋亡是肿瘤治疗的新方向。我们根据肝癌 HepG2 细胞生长规律,用含药血清培育 HepG2 细胞特定时间(48 h)后,与正常生长的 HepG2 细胞比较。本研究发现,鳖甲煎丸对肝癌 HepG2 细胞有抗增殖作用,并且该作用与药物在血清中的浓度相关。

肝癌的转移与肝癌细胞对不同组织的黏附有密切关系。Yamamoto Y^[13]曾指出,肿瘤细胞与细胞外基质的多种成分(如 LN、FN 等)的相互黏着,是肿瘤转移过程的重要环节。我们分别采用具有促进肿瘤细胞黏附作用的人工基底膜胶 Matrigel 及 FN、LN,人为模拟基底膜及细胞外基质成分,测定肝癌细胞的黏附性及含药血清对其的影响。实验发现,含药血清表现出抑制 HepG2 细胞黏附的作用,随着含药血清浓度的增加,这种抑制作用更加明显,呈一定的剂量依赖关系。表明抑制癌细胞黏附可能是鳖甲煎丸防治肝癌、改善肝癌预后的机制之一。

在肝癌转移的过程中,细胞外基质(ECM)是其主要屏障^[14,15]。肿瘤细胞通过表面特定受体与基底膜的 LN、FN 和 IV 型胶原等相粘连,然后在蛋白水解酶和相关因子的作用下,侵袭基底膜,降解 ECM,肿瘤细胞一旦突破基底膜即在基质内较快侵袭性生长并发生

转移。将 Matrigel 铺在 transwell 小室膜上,能形成与天然基底膜极为相似的基底膜结构,可以有效地在体外模拟肿瘤细胞的侵袭过程。本研究采用 Matrigel 模型,检测细胞的黏附能力,探究含药血清对 HepG2 侵袭性的影响。该实验结果证明:与空白血清比较,含药血清可以显著降低 HepG2 的侵袭性,且这种抑制作用与鳖甲煎丸的血清浓度相关。

以上这些结果证明了鳖甲煎丸对肝癌细胞的增殖、迁移及侵袭具有抑制作用,为下一步研究这种抑制作用与 Wnt/ β -catenin 通路的关系提供了实验依据。

参 考 文 献

- [1] 沈锋,夏勇. 肝癌外科综合治疗的临床研究之浅见[J]. 外科理论与实践, 2010, 15(3): 205.
- [2] Behrens J, Lustig B. The Wnt connection to tumorigenesis[J]. Int J Dev Biol, 2004, 48(526): 477-487.
- [3] Doucas H, Garcea G, Neal CP, et al. Changes in the Wnt signaling pathway in gastrointestinal cancers and their prognostic significance[J]. Eur J Cancer, 2005, 41(3): 365-379.
- [4] Karim R, Tse G, Putti T, et al. The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers[J]. Pathology, 2004, 36(2): 120-128.
- [5] Roberts LR, Gores GJ. Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets[J]. Semin Liver Dis, 2005, 25(2): 212-225.
- [6] 张再康,邓国兴,郑玉光,等. 鳖甲煎丸的临床和实验研究进展[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(8): 965-967.
- [7] 曹阳. 鳖甲煎丸加减在原发性肝癌治疗中的应用[J]. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6(7): 450-451.
- [8] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1993: 1103.
- [9] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司, 1996: 186, 160.
- [10] 夏冬,吴斌,梁建群,等. 包载 TIMP-1 重组腺病毒微球的制备及其对肝癌细胞增殖的抑制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010, 17(1): 57-61.
- [11] Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation[J]. Cancer Res, 1991, 51(18): 5054-5059.
- [12] 闫洪飞. 中医药防治肿瘤转移的探讨[J]. 上海中医药大学学报, 2003, 17(4): 20-24.
- [13] Yamamoto Y, Tsutsumi Y, Mayumi T. Molecular design of bioconjugated cell adhesion peptide with a water soluble polymeric modifier for enhancement of anti-metastatic effect[J]. Curr Drug Targets, 2002, 3(2): 123-130.
- [14] 张力冰,张维东,王朝霞,等. 蝎毒多肽提取物体外抑制胰腺癌细胞侵袭转移及相关机制[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(6): 820-824.
- [15] 王秀峰,周钱梅,苏式兵. 黄芩素抑制人乳腺癌细胞侵袭和迁移的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(6): 745-750.

(收稿:2012-11-20 修回:2013-01-10)

第十六届全国中西医结合大肠肛门病学术交流会征文通知

由中国中西医结合学会大肠肛门病专业委员会主办,中山大学附属第六医院(中山大学附属胃肠肛门病医院)、《中华胃肠外科杂志》承办的第十六届全国中西医结合大肠肛门病学术交流会于2013年8月在广东省广州市召开,现将会议有关事宜通知如下。

会议内容 (1)大会将邀请国内外肛肠界的同道(包括影像、消化内镜)及知名专家就结、直肠肛门外科领域的肛肠良性疾病,结、直肠肿瘤,顽固性便秘等有关的新理论、新技术、新方法、新材料、新器械等,紧扣临床实际问题做专题发言,供大家交流切磋学习;(2)中国中西医结合学会大肠肛门病专业委员会、青年委员会换届改选工作会议。

会议征文 欢迎参会人员针对上述内容踊跃投稿,全文一般不超过4 000字,中文、英文稿件均可,文内请注明通讯作者的姓名、工作单位、E-mail、联系电话及地址、邮政编码。投稿为电子邮件形式,稿件一般以全文形式发表,大会发言材料以PPT形式提交。

截稿时间 2013年7月20日。联系人:李丽,13632407564;万星阳,15999951833;地址:广州市天河区员村二横路26号(邮编510655)中山六院;E-mail:zxyjh2013@163.com。