

犀黄丸诱导人肝癌细胞凋亡及其机制的研究

李莉芳 陈如山 刘新民 金庆文 邓旭光
(深圳市第二人民医院, 518031, 广东深圳// 第一作者女, 1975年生, 硕士)

摘 要: 观察犀黄丸含药血清诱导人肝癌 Bel-7402 细胞凋亡的作用, 并对其机制进行初步的探讨, 目的: 研究犀黄丸含药血清诱导人肝癌 Bel-7402 细胞凋亡的作用, 并对其机制进行初步探讨。方法: 犀黄丸含药血清对肝癌细胞生长的影响, 检测对肿瘤 Bel-7402 杀伤率。在用不同浓度犀黄丸含药血清作用 Bel-7402 细胞不同时间后, 用 TUNEL 法检测凋亡, 用 SASB 法检测细胞 bcl-2、c-myc、p53 蛋白表达。结果: 犀黄丸含药血清能明显抑制 Bel-7402 细胞生长, 其肿瘤细胞 Bel-7402 杀伤率最高达 75%, 与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。TUNEL 法显示, 细胞凋亡率明显提高, 与对照组比较有显著性差异; Bel-7402 细胞的 bcl-2、c-myc 基因蛋白表达降低, 而 p53 基因蛋白表达增强。

关键词: 肝肿瘤; 中医药疗法; 细胞凋亡; 基因表达; 犀黄丸

中图分类号: R730

文献标识码: A

文章编号: 1009-5276(2004)01-0125-02

本研究采用现代分子生物学技术, 观察犀黄丸含药血清诱导人肝癌 Bel-7402 细胞凋亡的作用, 并对其机制进行初步的探讨, 为其进一步服务于临床提供理论基础。

材料与方 法

1 药物、实验动物、主要试剂

牛黄、麝香、乳香、没药生药 由湖北省中药材公司中药分公司提供。

日本大耳白兔 5 只由同济医科大学实验动物中心提供。

人肝癌细胞系 (Bel-7402) 由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。

1640 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶 由美国 GIBCO 公司提供。

MTT 购于美国 Sigma 公司。

DNA 原位末端标记试剂盒 购自 CLONTECH, INC. USA 公司。

抗 (Bel-2 鼠单抗, p53 鼠单抗, C-myc 鼠单抗) 链霉菌素抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组化染色试剂盒 (加强型, 含封闭血清和二、三抗), DAB 酶底物显色试剂盒 (美国 Maxim 公司产品) 由福建迈新公司提供。

2 仪 器

全自动酶标仪、微型震荡器培养箱、光学显微镜、高速离心机、荧光显微镜和照相设备 BH-213、Olympus Co. Japan、倒置相差显微镜。

3 实验方法

含药血清的制备: 将牛黄、麝香、乳香、没药按工艺制成每 ml 相当于含生药量 0.5g 的浸膏备用。

以日本大耳白兔 5 只, 每日给予药液 1.12g/kg 灌胃, 10d 后, 于最后 1 次灌药后 1h (灌药前禁食 12h), 乙醚麻醉, 颈动脉采血, 无菌分离血清, 经过 56℃, 30min 灭活后, 置 -20℃ 冰箱保存备用。

用 MTT 法分析犀黄丸含药血清对肝癌细胞系 Bel-7402 生长抑制的影响:

人肝癌细胞传代培养后, 待细胞形成单层, 常规消化, 收集细胞, 0.5% 台酚蓝染色, 观察细胞活性达 95% 以上。将培养细胞接种于 96 孔培养板中, 调整每孔的细胞浓度为 2×10^4 /ml, 接种 0.1ml 细胞悬液, 继续培养 24h 后, 弃培养液, 分别加入含 2.5%、5%、10%、15%、20% 浓度的含药血清的培养液, 设无含药的兔血清为对照组 (简称 RCK 组) 和完全培养液对照组 (简称 CK 组), 每组 8 孔, 继续培养 72h 后, 用 MTT 比色法检测细胞杀伤率。计算公式:

杀伤率 (%) =

$$\frac{\text{对照孔平均 OD 值} - \text{加药组平均 OD 值}}{\text{对照孔测定的平均 OD 值}} \times 100\%$$

TUNEL 原位末端标记法检测细胞凋亡:

用 50ml 的塑料培养瓶, 将人肝癌细胞系 (Bel-7402) 接种于含双抗的 1640 培养液中, 细胞浓度为 1×10^5 /ml, 置于含 5% 二氧化碳、37℃ 的培养箱中培养。待细胞形成单层, 去除培养液, 分别加入含 10%、15% 浓度的含药血清的 1640 培养液、含 10% 正常兔血清的 1640 培养液、含 10^{-7} mol/L 地塞米松的 1640 培养液、完全 1640 培养液, 在培养 24、48、72h 后, 收集细胞, 用 TUNEL 法检测细胞凋亡。在荧光显微镜下观察。详细步骤参见试剂盒说明, 阳性对照用地塞米松。

免疫组化法 (SABC) 检测 Bel-7402 细胞 bcl-2、c-myc、p53 蛋白表达:

将 Bel-7402 细胞调整浓度为 1×10^5 /ml, 接种于内盖玻片的 6cm 培养皿中, 每个培养皿中放置 3 块四分之一盖玻片, 细胞贴壁生长后去培养液, 在培养皿中分别加入 10%、20% 浓度含药血清的 1640 培养液, 并设 RCK 组、CK 组, 继续培养 24、48h 后, 将玻片取出 (共设 10% 24h 组、15% 24h 组、10% 48h 组、15% 48h 组、CK 组、RCK 组), 然后用 SABC 法检测 bcl-2、c-myc、p53 蛋白表达。

4 结 果

含药血清对人肝癌细胞增殖的抑制作用的实验结果:

表 1 含药血清对 Bel-7402 细胞增殖抑制的影响

	OD	杀伤率(%)
2.5%	0.745 ± 0.14*	45.38
5.0%	0.524 ± 0.05*	61.5
10%	0.438 ± 0.03*	67.89
15%	0.371 ± 0.01*	72.8
20%	0.341 ± 0.01*	75.00
RCK	1.364 ± 0.14	
CK	1.768 ± 0.17	

注: * 代表与 RCK、CK 组比较有显著性差异 $P < 0.01$

由表 1 的结果可见, 犀黄丸含药血清对人肝癌 Bel-7402 细胞生长具有明显的抑制作用, 且随着含药血清浓度增加, 其肿瘤细胞生长抑制率增加。肿瘤细胞抑制率最高的是 20% 含药血清组, 可达 75%。经统计处理, RCK、CK 对照组与含药血清各组间均有显著差异 ($P < 0.01$), 15%、20% 含药血清组与 2.5%、5% 含药血清组间亦有显著性差异 ($P < 0.05$)。并且随着含药血清浓度升高, 肿瘤细胞抑制率亦升高, 二者之间呈直线相关。

TUNEL 法检测含药血清诱导肝癌细胞凋亡结果:

用荧光显微镜观察 TUNEL 实验结果, 凋亡细胞核的 DNA 断裂处呈现明显的绿色荧光, 而未断裂的细胞核则呈现红色。不同浓度含药血清在处理人肝癌 Bel-7402 细胞后, 继续培养 24h、48h、72h 不同时间段后, 均出现细胞凋亡现象。随机计数 300~500 个细胞, 计算其凋亡率, 结果如下。

表 2 含药血清作用 72h 后细胞凋亡率计数结果 (X ± S)

	凋亡率%
10% 组	35.1 ± 1.06*
15% 组	46.85 ± 3.04*
RCK	1.7 ± 0.28
CK	1.55 ± 0.49
地塞米松 72h 组	73.25 ± 0.141*

注: * 表示与 CK、RCK 组比较有显著性差异 $P < 0.01$

经统计学处理, CK 组、RCK 组凋亡率无显著性差异 ($P > 0.05$), 其余各组比较均有显著性差异 ($P < 0.01$)。

含药血清对 Bel-7402 细胞 bcl-2、c-myc、p53 蛋白表达的影响:

实验显示, bcl-2、c-myc、p53 阳性物质位于胞浆和胞核内, 阳性物质为棕褐色。随机计数 300~500 个细胞, 计算其阳性细胞百分率, 其结果如下:

表 3 含药血清作用 24h 后对 Bel-7402 细胞 bcl-2、c-myc、p53 蛋白表达的影响 (阳性细胞百分率)

	bcl-2	c-myc	p53
CK 组	15.4	15.05	11
10% 组	12.9	11.95	13.55
15% 组	10.95	11.55	14.65

犀黄丸含药血清作用后, bcl-2、c-myc 表达均减弱, 阳性细胞数减少, 阳性着色减弱; 而 p53 表达增强, 表现为阳性细胞数增多, 阳性着色加深。

表 4 含药血清作用 48h 后对 Bel-7402 细胞 bcl-2、c-myc、p53 蛋白表达的影响 (阳性细胞百分率)

	bcl-2	c-myc	p53
RCK 组	13.55	15.65	10.45
10% 组	12.95	11.05	14.65
15% 组	10.25	9	16.95

5 讨 论

随着分子生物学技术的发展, 越来越多的研究表明, 肿瘤的发生不仅与细胞增殖异常有关, 亦与细胞凋亡异常有关, 细胞凋亡已被视为评估抗肝癌治疗研究的一项新指标。^[1]如何诱导和调控肝癌治疗凋亡已成为目前抗肝癌细胞研究的热点。

肝癌细胞(HCC)存在高速的细胞增殖率和自然的细胞死亡率, 两者共同决定肿瘤细胞的速度。^[2]目前, 在细胞凋亡机制的研究方面, 肝癌的治疗策略主要包括抑制细胞增殖和促进细胞凋亡两个方面, 抑制 HCC 增殖已采用多种方法, 但过度抑制增殖对正常细胞的损伤亦相应增大。因此, 寻找诱导肝癌细胞凋亡, 防止其癌变或发展的方法似乎更合理可取。^[3]

本实验采用 TUNEL 检测含药血清诱导肝癌细胞凋亡, 结果显示, 犀黄丸含药血清具有诱导肝癌 Bel-7402 细胞凋亡的作用。随着含药血清浓度增高, 作用时间延长, 其凋亡率增高, 最高可达 46.85% 左右, 而 CK 组、RCK 组细胞凋亡率仅 1.5%~1.7% 左右。由此可见, 犀黄丸具有诱导肝癌 Bel-7402 细胞凋亡的作用, 此作用可能是其抗肿瘤作用的机制之一。

目前, 认为细胞凋亡的触发可能是一个级联式基因表达结果, 许多基因参与这一过程。c-myc 癌基因与许多肿瘤有关, 在多种人类肿瘤细胞中发现有 c-myc 基因的扩增与高表达。p53 基因为抑癌基因, 当细胞 DNA 受损时, p53 蛋白水平增高, 以终止增殖, 使受损细胞获得修复 DNA 的时间, 如无法修复, 则 p53 蛋白持续增高, 引起细胞凋亡。bcl-2 是 bcl-2 基因家族中的一员。它能抑制细胞凋亡, 使细胞长期存活, 促使细胞内某些癌基因活化, 产生恶性细胞克隆。分化差、体积大的肝癌细胞 bcl-2 基因表达增强。

本实验结果显示, 随含药血清浓度增加癌基因 bcl-2、c-myc 蛋白表达有减少的趋势, 抑癌基因 p53 蛋白表达有增加的趋势, 可能是犀黄丸诱导肝癌细胞凋亡的机制。但此 3 种基因表达改变的主次关系、先后作用关系及其相互作用尚不清楚, 犀黄丸含药血清中的有效成分是什么, 还需进行深入研究。

参 考 文 献

- [1] Alison, M R, Sarraf, E. Apoptosis: regulation and relevance to toxicology. [J] Hum Exp Toxicol, 1995, 14(3): 234
- [2] Hikita N, Vaughan J. Pitot HC. The effect of tow periods of short-term fasting during the promotion stage- of hepatocarcinogenesis in rat: [J] the role of apoptosis and proliferation 1997, 18: 159~ 166
- [3] 杨冬青, 张鸣青. 细胞凋亡与肝癌 [J]. 中华肝病杂志, 1999, 7 (2): 123~ 124