

# 体外培育牛黄诱导人肝癌 Hep G2 细胞凋亡的实验研究

汪世元 陈孝平 蔡红娇 黄志勇 吴在德

华中科技大学同济医学院附属同济医院外科, 武汉 430030

**摘要** 目的 研究体外培育牛黄诱导人肝母细胞瘤 Hep G2 细胞凋亡的作用及机制。方法 用单层培养法培养 Hep G2 细胞, 用不同剂量的体外培育牛黄作用于 Hep G2 细胞不同时间, 用荧光显微镜、透射电镜观察细胞形态的改变及细胞凋亡, 用流式细胞仪检测 Hep G2 细胞的亚 G<sub>1</sub> 峰细胞 (凋亡) 率的变化。结果 体外培育牛黄 100 ~ 800 μg/ml 作用于 Hep G2 细胞 48 h 后, Hep G2 细胞表现为细胞皱缩、核质浓缩、核碎裂、细胞起泡以及凋亡小体形成等凋亡特征性形态学改变; 流式细胞直方图上可见亚二倍体峰, 不同浓度作用于 Hep G2 细胞 24、36、48、72 h 后的细胞凋亡率均显著高于空白对照组 ( $P < 0.01$ ), 400 μg/ml 浓度组与阳性对照 FT207 (100 μg/ml) 组比较无明显差异。结论 体外培育牛黄能诱导人肝母细胞瘤 Hep G2 细胞凋亡。

**关键词** 体外培育牛黄; Hep G2 细胞; 细胞凋亡  
中图分类号 R735.7

## Induction of Human Hepatoma HepG2 Cells Apoptosis by *in vitro* Cultivated Calculus Bovis

Wang Shiyuan, Chen Xiaoping, Cai Hongjiao *et al*  
Department of Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College,  
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030

**Abstract Objective** To study the induction of human hepatoma Hep G2 cells apoptosis by *in vitro* cultivated calculus bovis (ICCB) and the mechanism. **Methods** Hep G2 cells were cultured by using monolayer culture method and treated with ICCB of different concentrations for different time. The changes in morphology and apoptosis were observed under fluorescence microscopy and transmission electron microscopy (TEM). Flow cytometry (FCM) was performed to check the changes in apoptotic rate of Hep G2 cells. **Results** After Hep G2 cells were treated with ICCB (100 - 800 μg/ml) for 48 h, the typical changes of apoptosis of Hep G2 cells were found. Hypodiploid peak appeared on FCM histogram. After Hep G2 cells were treated with ICCB (400 μg/ml) for 24 h, 36 h, 48 h and 72 h, the apoptotic rate was significantly different from those in blank control groups (all  $P < 0.01$ ), but not from positive control groups. **Conclusion** ICCB can induce apoptosis of human hepatoma Hep G2 cells.

**Key words** *in vitro* cultivated calculus bovis; Hep G2 cells; apoptosis

体外培育牛黄 (*in vitro* cultivated calculus bovis, ICCB) 是华中科技大学同济医学院附属同济医院外科研制的、具有自主知识产权并获得国家专利的国家一类中药新药, 并获得了 2002 年国家发明二等奖和 2003 年国家中药奖。ICCB 与天然牛黄在性状、结构、成分、含量及药效、临床疗效等方面完全一致, 无明显毒副作用。而天然牛黄资源匮乏, 价格昂贵, ICCB 是其理想的替代品。国家已批准 ICCB 与天然牛黄等同使用。牛黄对多种肿瘤有治疗作用, 对消化道肿瘤尤为有效, 实验证实

牛黄具有抗癌及提高机体免疫力作用<sup>[1,2]</sup>。许多抗癌药物, 包括中药<sup>[3,4]</sup>, 能以诱导细胞凋亡的方式抑制癌细胞生长, 而 ICCB 是否具有同样的功效? 为此, 我们进行了 ICCB 诱导人肝母细胞瘤 Hep G2 细胞凋亡的实验研究。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 药物: ICCB 由华中科技大学同济医学院附属同济医院牛黄研究室提供, 国药准字 (20010075 号), 批号 20010816, 并由华中科技大学材料研究所谢长生教授进行纳米处理。准确称取 ICCB 0.3、0.6、1.2、2.4 g 分别加蒸馏水 100 ml, 搅拌至溶

汪世元, 男, 1964 年生, 医学硕士, 副主任医师。现址: 上海第二医科大学附属新华医院徐州财贸医院, 徐州 221005  
通讯作者, Corresponding author

解, 调节 pH 值到 7, 超声处理 30 min, 分别配制成 0.3%、0.6%、1.2%、2.4% 的备用药液。呋喃氟尿嘧啶 (FT207) 由中国济南制药厂生产, 取 FT207 0.3 ml 用蒸馏水稀释至 10 ml, 配制成 0.3% 的备用药液。

1.1.2 细胞及培养: Hep G2 细胞由华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科实验中心提供。将 Hep G2 细胞置于含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  链霉素的 RPMI 1640 培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%CO<sub>2</sub> 培养箱内常规传代培养。

1.1.3 试剂及仪器: RNA 酶、碘化丙啶 (PI) 及 Hoechst32258 荧光染色剂购于美国 Sigma 公司, RPMI 1640 培养基、小牛血清购自美国 Gibco 公司。

倒置相差显微镜、BH-2 型荧光显微镜, 日本 Olympus 公司; Hitachi-600 型透射电镜, 日本日立公司; FACSsort 流式细胞仪 (flow cytometer, FCM), 美国 Becton Dickinson 公司。

## 1.2 方法

1.2.1 实验分组: 取对数生长期 Hep G2 细胞, 以  $2 \times 10^5/2.9 \text{ ml}$  的密度接种于 T-25 培养瓶中。实验组: 分别加入浓度 0.3%、0.6%、1.2%、2.4% 的 ICCB 0.1 ml, 使终浓度分别为 100、200、400、800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 阳性对照组: 加入 0.3% FT207 0.1 ml, 使终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 空白对照组: 不加任何药物。以上各组每个浓度设平行实验 6 次。将上述各组分别培养 12、24、36、48 和 72 h, 分别用酶消化法收集细胞于离心管中, 用 -20 $^{\circ}\text{C}$  预冷的 70% 乙醇固定细胞并置于 -20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

1.2.2 荧光显微镜观察: 收集不同浓度的 ICCB 作用 48 h 的 Hep G2 细胞, 甲醛/冰醋酸固定液固定 5 min 后, 加入荧光染液 Hoechst33258 重悬细胞, 室温避光 1 h, 将细胞悬液滴 1~2 滴于载玻片上, 完全干燥后用甘油封片, 置 BH-2 荧光显微镜下观察并摄影。

1.2.3 透射电镜观察细胞凋亡: 细胞培养于 T-25 培养瓶内, 经不同浓度的 ICCB 作用 48 h 后, 用刮刀将细胞从瓶底刮下, 3% 戊二醛固定, 再用 10 mg/ml 锇酸固定, 逐级乙醇脱水, 氧化丙烯浸透, 树脂包埋, 超薄切片机切片, 于透射电子显微镜下观察并摄影。

1.2.4 流式细胞仪检测: 收集经不同浓度的 ICCB 和浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 FT207 作用 0、12、24、36、48、72 h 后的 Hep G2 细胞, 制成单细胞悬液, 离心去上清, 沿管壁缓慢加入预冷 (-20 $^{\circ}\text{C}$ )

的 70% 乙醇固定, 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜 (同法重复实验并收集细胞 3 次)。上机检测前 RNA 酶消化, 再加入 PI 染色液, 4 $^{\circ}\text{C}$  避光 30 min。采用 FACSsort 流式细胞仪对样品进行检测, 每次计数细胞 6 000 个, 激发波长 488 nm, CellQuest 分析软件计算细胞凋亡率。

## 1.3 统计学处理

实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS12.0 软件统计分析, 组间比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 荧光显微镜观察结果

空白对照组细胞胞膜完整, 胞质丰富饱满。而各处理组可见部分细胞胞膜皱缩, 细胞核发生固缩, 并碎裂呈大小不等, 形似多边形、圆形或花瓣状的细胞碎片, 此即凋亡小体, 呈现典型的凋亡形态特征。

### 2.2 透射电镜观察结果

经 ICCB 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  作用 48 h 后的细胞胞膜皱缩, 胞质起泡, 核膜皱缩, 染色质固缩, 发生碎裂 (图 1)。

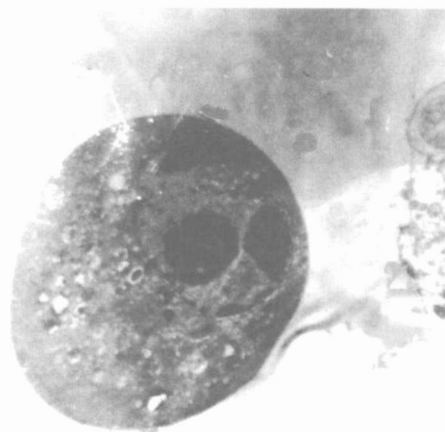


图 1 透射电镜观察 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ICCB 作用 48 h Hep G2 细胞的变化 ( $\times 6 300$ )

### 2.3 流式细胞仪检测结果

DNA 直方图上可见亚二倍体峰。经 FCM 定量发现, 不同剂量 ICCB 作用下 Hep G2 细胞凋亡率显著增加; 在 100~400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  剂量范围内, ICCB 诱导细胞凋亡效应呈时间、剂量依赖性; 不同剂量 ICCB 作用 24 h 后各组的 Hep G2 细胞凋亡率与 12 h 作用组比较, 差异均有极显著性意义 (均  $P < 0.01$ )。400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ICCB 组诱导 Hep G2 细胞凋

亡效应与 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  FT207 相当, 二者比较差异 无显著性意义。见表 1。

表 1 不同剂量 ICCB 作用不同时间对 Hep G2 细胞凋亡率的影响 (%,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	时 间 (h)				
	12	24	36	48	72
ICCB ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )					
100	1.13 $\pm$ 0.14	6.62 $\pm$ 1.37 *	17.13 $\pm$ 1.15 *	22.47 $\pm$ 2.27 *	32.33 $\pm$ 2.91 *
200	2.13 $\pm$ 0.21	13.69 $\pm$ 2.21 *	23.35 $\pm$ 5.23 *	36.52 $\pm$ 5.86 *	57.64 $\pm$ 6.63 *
400	3.13 $\pm$ 0.35	17.46 $\pm$ 2.13 *	35.98 $\pm$ 3.38 *	91.91 $\pm$ 6.52 *	94.54 $\pm$ 8.03 *
800	7.51 $\pm$ 2.24 *	38.86 $\pm$ 3.23 *	76.36 $\pm$ 5.25 *	84.38 $\pm$ 7.45 *	92.83 $\pm$ 7.73 *
FT207 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	1.37 $\pm$ 0.83	16.58 $\pm$ 3.21 *	27.71 $\pm$ 5.32 *	89.85 $\pm$ 8.73 *	91.92 $\pm$ 7.85 *
空白对照	1.43 $\pm$ 0.12	2.78 $\pm$ 0.35	5.03 $\pm$ 1.72	9.76 $\pm$ 3.33	13.78 $\pm$ 5.45

与空白对照组比较 \*  $P < 0.01$ ; 与 12 h 组比较  $P < 0.01$

### 3 讨论

自 1972 年 Kerr 等<sup>[5]</sup>首先提出细胞凋亡的概念以来, 随着对凋亡分子机制的逐步认识, 人们发现诱导肿瘤细胞凋亡是一条有效的肿瘤治疗途径。迄今为止, 已证实化疗药物、生长抑素类似物<sup>[6]</sup>及多种中药成分<sup>[4]</sup>都能以诱导细胞凋亡的方式抑制肿瘤细胞生长。

ICCB 是华中科技大学同济医学院附属同济医院牛黄研究室根据人体胆石形成的原理, 通过物理、化学、生物的方法及静电效应在体外利用牛胆汁培育而成的, 它是一个复合物, 其主要成分有: 胆红素、胆酸、去氧胆酸、牛磺酸、磷脂、18 种氨基酸、21 种微量元素等。

本实验将 ICCB 与 Hep G2 细胞共孵育, 从荧光显微镜和透射电镜观察到 Hep G2 细胞凋亡形态学改变, 可见细胞体积缩小, 胞膜皱缩, 核固缩, 核质沿核膜浓缩边集, 有的细胞核碎裂, 形成凋亡小体, 从而证实 ICCB 能诱导 Hep G2 细胞凋亡。400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ICCB 诱导 Hep G2 细胞凋亡的效果与 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  FT207 基本一致。FCM 检测发现典型的凋亡峰, 随 ICCB 剂量增加和作用时间延长细胞凋亡发生率较对照组显著增高 ( $P < 0.01$ ), 当作用 48 h 后细胞凋亡达高峰, ICCB 作用 Hep G2 细胞 72 h 时, 细胞凋亡率与 48 h 时比较无明显差

异。

研究表明, 肿瘤的发生和发展不仅与细胞的分化异常及增殖过度有关, 而且与细胞凋亡的减少密切相关, 而一旦细胞增殖与凋亡失控, 则可导致肿瘤的发生<sup>[7]</sup>。因此, 开发诱导肿瘤细胞凋亡的新药, 成为肿瘤治疗的新方向。本研究将 ICCB 作用于人肝母细胞瘤 Hep G2 细胞后, 发现其能诱导癌细胞凋亡, 并可能还有抑制癌细胞生长的作用, 这为传统中药在肿瘤治疗方面的研究和应用开拓了新的思路。至于 ICCB 诱导肿瘤细胞凋亡发生的机制, 尚有待于进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 刘春安, 彭明. 抗癌中草药大辞典. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1994. 202
- 2 张民庆, 龚惠明. 抗肿瘤中药的临床应用. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 276
- 3 司维柯, 张广运, 马立强等. 苦参碱对 Hep G2 细胞系增殖能力的影响. 第三军医大学学报, 2000, 22 (5): 451
- 4 司维柯, 陈安, 李鹏等. 苦参碱诱导人肝癌细胞系 Hep G2 凋亡. 第三军医大学学报, 2001, 23 (7): 816
- 5 Kerr J E R, Wyllie A H, Currie A H *et al.* Apoptosis, a basic biological phenomenon with wider implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972, 26: 239
- 6 陈华, 何振平, 马宽生等. 生长抑素类似物诱导人胆管癌细胞株凋亡及对胞内游离钙的影响. 第三军医大学学报, 2002, 24 (5): 588
- 7 Thompson C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995, 267: 1456

(2004-04-02 收稿)