

## 犀黄丸诱导 Bel-7402 细胞凋亡及其细胞内钙离子浓度的变化

李莉芳, 陈如山, 刘新民

(深圳市第二人民医院, 广东 深圳 518031)

**【摘要】**研究犀黄丸(含药血清)诱导肝癌 Bel-7402 细胞凋亡的作用及凋亡过程中细胞内游离钙离子浓度的变化。DNA 琼脂糖凝胶电泳法检测细胞凋亡, 流式细胞仪检测凋亡过程中细胞内游离钙离子浓度的变化。DNA 琼脂糖凝胶电泳法显示有明显的 DNA 梯带, 同时在细胞凋亡过程中细胞内游离钙离子浓度明显升高, 以凋亡早期较为明显。犀黄丸能诱导肝癌细胞凋亡, 细胞内游离钙离子浓度升高可能是其机制之一。

**【关键词】**肝肿瘤/中医药疗法; 细胞凋亡; 钙离子; 犀黄丸

**【中图分类号】**R735.7

**【文献标识码】**B

**【文章编号】**1001-5256(2003)06-0362-02

**Xihuangwan induce Bel-7402 cell apoptosis and the change of intracellular-free calcium level in the process** LI Li-fang, CHEN Ru-shan, LIU Xin-min (Second Hospital, Shenzhen, 518031)

**Abstract:** To study whether herbal medicinal mixture Xihuangwan can induced apoptosis of Bel-7402 cells in vitro and the dynamic change of intracellular-free calcium level ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Apoptosis induced by serum containing Xihuangwan was investigated by agarose gel electrophoresis. Flow cytometry was used to measure the change of intracellular-free calcium level ( $[Ca]_i$ ). After treatment with Xihuangwan, nuclear DNA of the Bel-7402 cells exhibited DNA ladder.  $[Ca]_i$  was significantly higher than that in control groups, especially at the beginning stage of apoptosis. Xihuangwan may be able to induce apoptosis of Bel-7402 cell line. The increase of  $[Ca]_i$  might be one of the mechanisms of Bel-7402 cellular apoptosis.

**Key words:** hepatoma / treatment of TCM; cell apoptosis; calcium; xihuangwan

原发性肝癌是人类最常见的消化道恶性肿瘤之一, 中医药治疗原发性肝癌适应范围广, 毒副作用小, 能明显抑制肿瘤生长速度, 延长患者生存期, 改善生存质量, 因而在肝癌治疗中被广泛采用。本实验选用中药犀黄丸制备含药血清后, 观察其对入肝癌细胞 Bel-7402 的诱导凋亡作用, 及细胞凋亡过程中细胞内游离钙离子浓度的变化。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 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; 麝香酮, 购自中国药品生物制品检定所 (含量测定用); 无水乙醇、正己烷均为 AR 级; Fluo-3-AM 购自 SIGMA 公司。

#### 1.2 实验方法

1.2.1 将牛黄、麝香、乳香、没药按工艺制成每毫升相当于含生药量 0.5g 的浸膏备用。

1.2.2 以日本大耳白兔 5 只, 每日给予药液

1.12g/kg 灌胃, 10 天后, 于最后 1 次灌药后 1 小时 (灌药前禁食 12 小时), 乙醚麻醉, 颈动脉采血, 无菌分离血清, 经过 56℃, 30 分钟灭活后, 置 -20℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 含药血清中麝香酮成份的检测: 应用气相色谱法。

1.2.4 凋亡细胞检测: 用 DNA 琼脂糖凝胶电泳法检测。

1.2.5 含药血清对细胞内游离钙离子浓度的影响:

用 Fluo-3/AM 负载细胞, 使其终浓度为 10 $\mu$ mol/L, 再用流式细胞仪测定其荧光比值, 选用的激发波长为 488nm。用 10mmol/L 的 EDTA 螯合细胞外的 Ca<sup>2+</sup>, 阻止胞外 Ca<sup>2+</sup> 进入胞内, 所测出的荧光比值为最小值 (R<sub>min</sub>), 用 0.01% Triton × 100 处理的细胞所测定的荧光比值 (R<sub>max</sub>) 为最大值, 根据公式  $[Ca^{2+}]_i = KDa(R - R_{min}) / (R_{max} - R)$  计算钙离子浓度。KDa 是 Fluo-3 与钙的解离常数, 为 400nmol/L, R 为加药后 3h、6h、16h、24h 等各时间点所测得的荧光比值。计算 R 前要减去自发荧光比值, 即公式的 R、R<sub>max</sub>、R<sub>min</sub> 均要减去未加负载 Fluo-3 的细胞所测得的荧光比值, 再按照公式计算。

### 2 结果

2.1 含药血清中麝香酮成份的检测:

麝香酮标准品样本于 6.025min 时出峰, 含药血

收稿日期: 2003-01-05 修订日期: 2003-06-30

作者简介: 李莉芳 (1975-), 女, 医师, 医学硕士, 研究方向: 原发性肝癌的中西医结合治疗。

清组在 6.058min 时出现一峰,说明血清中含有麝香酮成分。空白兔血清组在 6.025min 左右无峰出现,说明空白兔血清中无麝香酮成份存在。

## 2.2 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果:

10%、15% 含药血清组电泳检测可见清晰而典型的凋亡 DNA 梯状条带显示(DNA Ladder),而 CK 组、RCK 组仅在近电泳点样孔附近出现基因条带。根据 marker 参照物,可知其 DNA 梯状带呈整数倍增加。说明含药血清具有诱导 Bel-7402 细胞凋亡的作用。

## 2.3 含药血清作用后 Bel-7402 细胞内 $Ca^{2+}$ 浓度变化

未加药物的对照组细胞内游离钙离子浓度为  $(61.57 \pm 9.73) \text{ nmol/L}$ 。加药后 3h 细胞内游离钙离子浓度上升至  $(264.03 \pm 40.32) \text{ nmol/L}$ ,在 6h 时达  $(133.07 \pm 16.98) \text{ nmol/L}$  ( $P < 0.01$ )。而 24h 时细胞内游离钙离子浓度则稍有下降,但仍较未加药组高。 $R_{\max}$  为 69.47,  $R_{\min}$  为 12.57,自发荧光比值为 1.12。

## 3 讨论

### 3.1 血清药理学方法:

血清药理学方法由日本学者<sup>[1]</sup>提出后不断地被应用于中西药的药理研究中。该方法能体现复方药物的体内转化效应,排除非吸收物质的作用,克服药物本身理化性质对实验的直接干扰<sup>[2]</sup>。因此在实验过程中选择了该方法。并用气相色谱法证实灌药后兔血清中确实含有犀黄丸的有效成分之一麝香酮。证明了血清药理学的可靠性和科学性。

### 3.2 肝癌 Bel-7402 细胞凋亡过程中的 $[Ca^{2+}]_i$ 动态变化:

目前关于凋亡时细胞内信号的研究涉及细胞内  $Ca^{2+}$ 、cAMP 激酶、蛋白激酶系统以及蛋白质的磷酸化与去磷酸化等<sup>[3]</sup>,而  $Ca^{2+}$  在信号传递中起着重要作用。在多种刺激因子如激素、药物作用细胞后,在细胞发生凋亡前都有细胞内游离钙离子浓度的持续升高,并随之出现核酸内切酶活化, DNA 降解和细胞死亡。而如果细胞处于低钙环境,则可以抑制或延迟细胞凋亡的发生。如细胞外螯合剂及细胞内钙离子缓冲剂能抑制许多因素诱发的凋亡,间接证明了  $Ca^{2+}$  在细胞凋亡中有重要作用<sup>[4]</sup>。而本实验也说明犀黄丸诱导肝癌细胞凋亡时细胞内游离  $Ca^{2+}$  浓度明显升高,并且持续时间较长,这可能是犀黄丸含药血清诱导肝癌细胞凋亡的机制之一。

细胞内  $Ca^{2+}$  浓度升高,一般认为有三个来源:一是细胞外  $Ca^{2+}$  的内流,二是细胞  $Ca^{2+}$  内库的动员,三是  $Ca^{2+}$  空间分布的改变<sup>[5~6]</sup>。而犀黄丸含药血清引起细胞内钙离子的升高,其作用环节还有待于进一步的实验证明。

### [参考文献]

- [1] 田代真一. “血清药理学”と“血清药化学”- 汉方の药理学から始まった药物浓度测定の新しい世界[J]. MP 研究, 1988, (5): 54.
- [2] 刘海成. 中药复方体外药理研究思考[J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11(1): 54.
- [3] Cole KA, Kohn EC. Calcium-mediated signal translation: biology, biochemistry and therapy[J]. Cancer Metastasis Rev, 1994, 13: 33-41.
- [4] Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signaling[J]. Nature, 1993, 361: 315-325.
- [5] Shulz L. Modulation of intracellular free  $Ca^{2+}$  concentration by IP3-sensitive and IP3-insensitive nonmitochondrial  $Ca^{2+}$  pool[J]. Cell Calcium, 1989, 10: 325-336.

## 《现代肝脏病学》2003 年 8 月出版

本书由王宝恩主编,多名国内著名肝脏学专家共同编撰,共 10 篇 49 章,对肝脏病的基础和临床,肝脏病的新技术、新理论、新方法进行了详细介绍,内容新颖,实用性强。220 万字,2003 年 8 月出版,邮购价 285 元。另有《肝脏外科》,邮购价 150 元;《肝胆外科学(上下卷)》,邮购价 518 元;《肝脏移植》,邮购价 98 元;《肝癌》,邮购价 145 元;《肝胆胆道肿瘤外科学》,邮购价 110 元。《肝功能衰竭》,邮购价 105 元。邮购地址:北京 55 信箱激流书店 金莉收,邮编:100053。开户行:招商银行展览路支行,帐号:0982817310001。户名:北京激流图书有限公司。电话:83154081。