

槐耳浸膏诱导肝癌细胞凋亡的实验研究*

李立新 叶胜龙 王艳红 孙瑞霞 薛琼 陈洁 高东梅 汤钊猷
(复旦大学肝癌研究所,中山医院,上海市肝脏肿瘤临床医学中心,上海 200032)

摘要 目的:探索槐耳浸膏抑制肝癌细胞增殖的机理,为槐耳浸膏在临床上治疗肝肿瘤提供理论依据。方法:将 MHCC97H 肝癌细胞株分别与 DMEM,槐耳浸膏(1 mg/ml,3 mg/ml,5 mg/ml,10 mg/ml)及 5-FU(10 μ g/ml)作用 24 h,48 h,72 h,在流式细胞仪上分别测定其细胞凋亡率。结果:不同浓度槐耳浸膏组在每一时段上诱导肝癌细胞凋亡率明显高于对照组。其凋亡率的升高有明显的剂量相关性。槐耳浸膏高浓度 10 mg/ml 组的凋亡率与 5-FU 组相当。槐耳浸膏诱导肝癌细胞凋亡的作用随着时间的延长而增加。结论:槐耳浸膏能明显诱导肝癌细胞的凋亡,从而抑制肝癌细胞的增殖,为临床治疗肝肿瘤提供了依据。

关键词 槐耳浸膏; 诱导; 肝癌细胞; 凋亡

中图分类号 R735.7 **文献标识码** A **文章编号** 1008-6358(2005)06-1152-02

Research on Apoptosis of Human Hepetocellular Carcinoma Cells Induced by Trametes Robiniophila

LI Lixin YE Shenglong WANG Yanhong, et al. (Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract Objective: We explore the mechanism that Trametes robiniophila inhibits proliferation of the human hepetocellular carcinoma cells and provide the experimental basis for Trametes robiniophila treating liver cancer in clinic. **Methods:** The human hepetocellular carcinoma cells(MHCC97H)were treated with DMEM, Trametes robiniophila(1mg/ml,3mg/ml,5mg/ml,10mg/ml) and 5-Fu(10ug/ml) for 24h, 48h, 72h respectively, and then the rates of apoptosis of the cells were measured in FACSCalibur. **Results:** The rates of apoptosis of human hepetocellular carcinoma cells in different concentration groups of Trametes robiniophila in same time were higher than that of the control group. there is evident dose dependence in the rise of the rates of apoptosis in every Trametes robiniophila groups, but only the rate of apoptosis in 10mg/ml group corresponds to that of the 5-Fu group. The efficiency that Trametes robiniophila induces apoptosis in the human hepetocellular carcinoma cells amplify with time prolonging. **Conclusion:** Trametes robiniophila can apparently induce apoptosis in human hepetocellular carcinoma cells, thereby it can inhibit the proliferation of the cells.

Key Words Trametes robiniophila; Induce; The human hepetocellular carcinoma cells; Apoptosis

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一。近年来其发病率有不断上升趋势。目前临床上治疗肝癌的方法有多种。手术切除仍是最有效的治疗措施之一,但远期疗效有待进一步提高。目前药物治疗存在的主要问题是:有效药物比较少,选择余地比较小,长期应用某种药物,不仅不良反应大,且肿瘤极易产生耐药性。故寻找新的抗肿瘤增殖和抗肿瘤转移复发的药物成为目前肿瘤治疗的热点。新一代的抗肿瘤药物应该具有疗效稳定可靠,可提升机体免疫力,不良反应小,肿瘤不易对其产生耐药性等特点。中药尤其是药用真菌因具备以上特点而倍受人们的关注。近年来槐耳在临床上的应用已证明其对肝癌、肺癌、食管癌、胃癌等肿瘤有独特疗效。但其抗癌机制迄今为止尚未见全面报道。本文通过对槐耳浸膏在体外诱导肝癌细胞凋亡的实验研

究来探讨槐耳浸膏抑制肝癌细胞增殖的机制。

1 资料与方法

1.1 材料 具有高转移潜能的肝癌细胞株(MHCC97H)由复旦大学肝癌研究所建立。

采用 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清)培养,每 3 天更换一次。0.25%胰酶-EDTA 消化液消化后,1:3 传代。Annexin V-FITC 凋亡检测包 II 购自 BD 公司。DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium)购自 Gibco/Brl 公司;

胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司;胰蛋白酶购自 Difco 公司。槐耳浸膏由江苏盖天力药业有限公司提供。将槐耳浸膏溶于 DMEM 培养基中,配成 1 mg/ml, 3 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 μ m 滤膜过滤除菌待用。流式细胞仪购自美国 BECTON DICKINSON

* 本课题受以下基金项目资助:复旦大学“211”工程肿瘤学科建设项目(校批字[2003]257号);上海市临床医学中心建设项目

FACSCALIBUR 公司。

1.2 体外检测肝癌细胞凋亡 已贴壁 MHCC97H 细胞与槐耳浸膏(1 mg/ml, 3 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml) 及 5-FU(10 μg/ml), DMEM(含 10% 胎牛血清) 分别作用 24 h, 48 h, 72 h。胰酶消化, 1 000 rpm 离心 2 min 后弃上清, PBS 洗 3 次。用 1×binding 缓冲液调细胞浓度为 1×10⁶/ml, 取 100 μl 细胞悬液加入 5 ml 管(测试专用管)。加 Annexin-V-FITC 5 μl; PI 5 μl。避光, 25℃, 15 min。加入 1×binding 缓冲液 400 μl, 在 1 h 内上流式细胞仪检测肝癌细胞凋亡率(%)。

表 1 槐耳浸膏诱导肝癌细胞凋亡率(%)

凋亡率	DMEM 组	槐耳浸膏组(1 mg/ml)	槐耳浸膏组(3 mg/ml)	槐耳浸膏组(5 mg/ml)	槐耳浸膏组(10 mg/ml)	5-FU 组
24 h	5.01 ± 1.46	7.43 ± 1.05*△△	9.08 ± 1.21*△	9.69 ± 1.61*△	14.25 ± 1.55*	16.35 ± 1.29
48 h	8.63 ± 1.46	12.17 ± 1.26*△	20.13 ± 1.83*△	28.04 ± 1.22*△	33.04 ± 1.29*	34.51 ± 1.06
72 h	12.91 ± 1.65	17.69 ± 1.85*△	24.61 ± 1.48*△	34.48 ± 1.21*△	36.93 ± 1.14*	39.09 ± 1.31

注: * 与 DMEM 组比较, P<0.05; △ 与 5-FU 组比较, P<0.05

3 讨 论

槐耳是一种入药 1500 年但已湮没 300 余年的重要药用菌。它曾经是中国历史上著名的药用真菌, 民间多用于治疗癌症及炎症。但近代国内有关书刊很少提及, 更未曾见国外有药用的报道。槐耳浸膏系槐耳菌质经热水提取所得。内含多种有机成分及矿物质, 主要活性成分是多糖蛋白。近代化学研究表明槐耳中所含的蛋白多糖体是其抗癌及增强免疫功能的主要活性成分, 它分别由 6 种单糖及 18 种氨基酸组成^[1]。目前针对槐耳蛋白多糖体的药理研究提示其有如下作用: 对巨噬细胞功能有非常明显的促进作用, 能增强溶菌酶活性; 可诱生 α, β 干扰素, 对 α 干扰素促进 NK 细胞活性有协同作用; 可提高特异性抗体的产生, 强化体液免疫功能^[2,3]; 对血管内皮细胞体外构建新生血管具有抑制作用, 从而明显抑制肿瘤血管的生成^[4]; 可以诱导肿瘤细胞的凋亡从而抑制肿瘤细胞的增殖^[5,6]; 另外槐耳浸膏与化疗药物(CTX, 5-FU, MMC 等) 合用对肿瘤细胞的生长有明显的协同抑制作用^[7,8]。

槐耳浸膏对原发性肝癌的作用, 目前主要集中在临床观察其疗效或在肝癌形成中抑癌作用的研究。临床疗效观察的结果提示槐耳浸膏具有抑制原发性肝癌细胞的生长, 缓减症状, 延长生存期等功效^[9,10]。而抑癌作用的研究表明: 在鼠肝癌模型制备早期灌服槐耳浸膏具有显著的防癌作用, 癌变率显著降低。在癌形成与发展中灌服槐耳浸膏也有显著的抑癌效应。在基础理论研究方面, 尚未见槐耳浸膏抑制原发性肝癌细胞增殖及转移复发的依据。本实验从槐耳浸膏诱导肝癌细胞凋亡的角度来探讨槐耳抑制肝癌的机制。实验

1.3 统计分析 采用 SPSS10.0 统计分析软件包, 应用配对 T 检验方法对数据进行统计分析。

2 结 果

各浓度槐耳浸膏诱导肝癌细胞的凋亡率与空白对照组相比均有显著性差异。在槐耳浸膏组中随着其浓度的升高, 槐耳浸膏诱导肝癌细胞的凋亡率逐步增加。但与 5-FU 组相比, 各浓度槐耳浸膏诱导肝癌细胞的凋亡率仅 10 mg/ml 组与 5-FU 组无显著差异, 其余各组均有显著差异。相同浓度的槐耳浸膏其诱导肝癌细胞凋亡的作用随药物作用时间的延长而上升(表 1)。

研究提示: 槐耳浸膏确能明显诱导肝癌细胞的凋亡, 其凋亡率随药物浓度的上升而提高, 浓度 10 mg/ml 组诱导肝癌细胞的凋亡率已与 5-FU 组相当。同时相同浓度的槐耳浸膏其诱导肝癌细胞凋亡的作用随药物作用时间的延长而上升。从而为槐耳浸膏临床治疗原发性肝癌提供了部分理论依据。

从目前的临床疗效观察及部分实验结果来看, 槐耳浸膏在肝肿瘤治疗中是一个非常具有前途的药物。我们将继续这方面的工作, 不断探索槐耳浸膏在抑制肝癌细胞转移及复发方面的机理, 为临床治疗提供进一步的理论依据。

参 考 文 献

- 郭跃伟, 程培元, 陈玉俊, 等. 槐耳菌丝体多糖的研究(I)[J]. 中草药, 1992, 23(4): 175-177.
- 王建忠, 程若川. 槐耳的研制及临床应用[J]. 井冈山医学学报, 2003, 10(1): 15-16.
- 陈慎宝, 丁如宁. 槐耳菌质成分对小鼠免疫功能的影响[J]. 食用菌学报, 1995, 2(1): 21-25.
- 许戈良, 英卫东, 马金良, 等. 槐耳浸膏体外抑制血管生成的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(12): 1410-1412.
- 王家顿, 谢大兴, 陈金明, 等. 抗癌药物诱导 Molt-4 细胞凋亡的周期时相性分析[J]. 中国肿瘤, 2002, 11(9): 533-534.
- 程若川, 汤礼贵, 兰丽琴. 槐耳浸膏诱导人直肠癌 HR8348 细胞凋亡的实验研究[J]. 中国肿瘤, 2003, 12(2): 122-124.
- 姚建高, 韩少良, 朱冠宝, 等. III 期胃癌术后联合化疗与金克的疗效[J]. 中国肿瘤, 2003, 12(10): 606-608.
- 庄毅. 抗癌新药槐耳冲剂的研究[J]. 中国药学杂志, 1998, 33(5): 273-275.
- 陈乃杰, 金源. 槐耳冲剂配合化疗治疗 76 例原发性肝癌的临床观察[J]. 海峡医学, 1995, 7(2): 43-44.
- 周启康. 槐耳冲剂治疗原发性肝癌 30 例临床报告[J]. 上海中医药杂志, 1995, (2): 25.