

# 槐耳清膏诱导人直肠癌 HR8348 细胞凋亡的实验研究

程若川<sup>1</sup> 汤礼贵<sup>1</sup> 兰丽琴<sup>2</sup> 贾伟<sup>3</sup>

**【摘要】** 目的 探讨槐耳清膏在体外对人直肠癌 HR8348 细胞的生长抑制作用和凋亡诱导作用及其作用机理。方法 将处于对数生长期的 HR8348 细胞用含槐耳清膏的培养基培养 36 h,用四氮唑蓝(MTT)比色法检测吸光度(OD)值,计算抑制率;用甲基绿-派若宁染色法及 TUNEL 法检测细胞凋亡指数;用免疫组织化学方法检测 bcl-2、bcl-xl、bax、bak 及 p53 基因表达的情况。结果 槐耳清膏对 HR8348 细胞的抑制率随浓度增加而上升,浓度为 4.0 mg/ml 时抑制率最大(71.1%),与 5-FU 组(浓度为 10 μg/ml)相比差异无显著性意义( $P>0.05$ )。甲基绿-派若宁染色法和 TUNEL 法均可见到典型的细胞凋亡、凋亡小体或出泡现象,凋亡指数随槐耳清膏浓度的增加而增加,当浓度达 4.0 mg/ml 时,凋亡指数迅速上升,甲基绿-派若宁法为  $0.1620 \pm 0.0128$ ,TUNEL 法为  $0.2612 \pm 0.0158$ ,均大于 5-FU 组的凋亡指数( $0.0780 \pm 0.0095$  和  $0.1028 \pm 0.0131$ ), $P<0.05$ 。槐耳清膏组 bcl-2、bcl-xl、bak、p53 蛋白表达较空白对照组明显增强( $P<0.05$ ),而 bax 变化不明显( $P>0.05$ )。槐耳清膏组 bak/bcl-2 和 bak/bcl-xl 比值显著大于空白对照组。结论 槐耳清膏在体外对人直肠癌 HR8348 细胞具有显著的抑制作用和凋亡诱导作用。槐耳清膏诱导人直肠癌 HR8348 细胞凋亡可能与提高 bak/bcl-2、bak/bcl-xl 比值及上调 p53 基因表达有关。

**【关键词】** 细胞凋亡 bcl-2 家族 p53 基因 槐耳多糖 HR8348 细胞

**【中图分类号】** R735.37 R285.5 **【文献标识码】** A

**Study on Apoptosis of Human Rectal Adenocarcinoma Cell Line HR8348 Induced by Polysaccharide of Trametes Robiniophila Murr in Vitro** CHENG Ru-chuan\*, TANG Li-gui, LAN Li-qin, JIA Wei. \*Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650032, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the growth inhibition and the apoptosis inducement effects of polysaccharide of trametes robiniophila murr (PS-T) on human rectal cancer cell line HR8348 and elucidate the possible mechanisms. **Methods** After treatment with PS-T, the growth inhibition rate of human rectal cancer cell strain HR8348 was studied by MTT method. The apoptotic index was detected by methyl green and pyronine Y staining and by terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). The bcl-2, bcl-xl, bax, bak and p53 gene expressions of HR8348 cells were examined by immunohistochemical method. **Results** PS-T induced a dose-dependent inhibition of HR8348 cells *in vitro*. The maximum percentage of growth inhibition was 71.1% by 36 h after administration of PS-T at a concentration of 4.0 mg/ml. There was no significant difference in the inhibitory rate as compared to the positive control (5-FU 10 μg/ml,  $P>0.05$ ). The typical apoptosis phenomons were observed under the light microscope by both staining methods. The apoptotic index increased parallelling with the increase of concentration of PS-T. When the PS-T concentration was 4.0 mg/ml, the apoptotic index determined by methyl green and pyronine Y staining and by TUNEL method increased rapidly to  $0.1620 \pm 0.0128$  and  $0.2612 \pm 0.0158$ , respectively, which was greater than that of the positive control (5-FU 10 μg/ml,  $P<0.05$ ). The expression of bcl-2, bcl-xl, bak and p53 was increased in the PS-T-treated HR8348 cells by 36 h, while the bax remained unchanged. Expression index of bak/bcl-2 and bak/bcl-xl was increased significantly as compared with the control ( $P<0.05$ ). **Conclusion** PS-T can significantly inhibit growth and induce apoptosis of human rectal cancer cell strain HR8348 *in vitro*. The apoptosis induced by PS-T might be related to the increase of the ratio of bak to bcl-2 and to bcl-xl and upregulation of the expression of p53 gene.

**【Key words】** Cell apoptosis bcl-2 family p53 gene Polysaccharide of trametes robiniophila murr HR8348 cell

**【作者单位】** 1. 昆明医学院第一附属医院普通外科(昆明 650032); 2. 浙江省苍南县第三人民医院普通外科(苍南 325800); 3. 昆明医学院第一附属医院实验中心

**【作者简介】** 程若川(1962年-),男,四川省江安县人,医学硕士,教授,主要从事甲状腺及腹部外科的临床、研究工作。

直肠癌是消化道常见的恶性肿瘤,化疗仍以 5-FU 为主,但其副作用大,因此,迫切需要研究与开发低毒或无毒且不易耐药的抗癌新药。金克<sup>①</sup>槐耳颗粒为近年开发出的国家一类抗癌新药,已广泛用于包括直肠

癌在内的各种恶性肿瘤的治疗,取得了一定的临床疗效。然而槐耳的抗癌作用机理,特别是与细胞凋亡有关的研究甚少。为探讨槐耳对人直肠癌的抗癌作用及其作用机理,我们研究了槐耳清膏对人直肠癌 HR8348 细胞的生长抑制作用、凋亡诱导作用及其对凋亡调节基因 bcl-2、bcl-x1、bax、bak 及 p53 表达的影响,为国家中药一类新药——金克<sup>®</sup>槐耳颗粒用于治疗直肠癌提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

HR8348 细胞系直肠低分化腺癌,由浙江省肿瘤医院研究所提供。培养液为 RPMF1640 加 20% 小牛血清及青霉素 100 u/ml、链霉素 100 μg/ml、氢化考的松 10 μg/ml、胰岛素 0.01 u/ml。干槐耳清膏由启东盖天力药业有限公司提供,超滤除菌器为 CORNING 公司产品,四氮唑蓝 (MTT) 为 Sino-American Biotechnology 公司产品,Wellscan Mk3 酶标仪为 Labsystems 公司产品,甲基绿和派若宁分别购自 Fluka 和 Chroma 公司,原位凋亡检测试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司,bcl-2、bcl-x1、bax、bak、p53 单抗及 SP 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

### 1.2 药品配制

精确称取干槐耳清膏 10.0 g,将其溶于 100 ml 单 RPMF1640 培养液,以 0.20 μm 超滤除菌器过滤除菌,制成 100 mg/ml 的槐耳清膏浓缩含药培养液。临用前用培养液分别稀释成 0.5 ~ 6.0 mg/ml 的工作液。

### 1.3 检测指标及方法

**1.3.1 体外药物抑瘤实验** 计算抑制率采用 MTT 比色法。取对数生长期的 HR8348 细胞,调节细胞浓度为  $5 \times 10^4$  个/ml,接种于 96 孔培养板,每孔加 0.1 ml。按查随机数字表的方法分别设槐耳清膏组(按加药浓度分为 0.5 mg/ml、1.0 mg/ml、2.0 mg/ml、4.0 mg/ml 及 6.0 mg/ml 5 个亚组)、5-FU 组(浓度为 10 μg/ml)及空白对照组,每组设 12 孔。将细胞置含 5% CO<sub>2</sub>、37 的培养箱中培养 24 h,去除旧的培养液,槐耳清膏组及 5-FU 组每孔加上上述浓度的含药培养液 0.2 ml,空白对照组加新鲜培养液 0.2 ml,继续置含 5% CO<sub>2</sub>、37 的培养箱中培养 36 h,每孔加入 0.5% MTT 20 μl,继续培养 4 h,吸去培养液,每孔加入二甲亚砜(DMSO) 100 μl,置酶标仪振荡 15 s,在波长 570 nm 处测定吸光度(OD)值,按以下公式计算抑制率:

$$\text{抑制率} = 1 - \frac{\text{实验孔 OD 值}}{\text{对照孔 OD 值}} \times 100\%$$

**1.3.2 凋亡细胞的形态学检测** 采用甲基绿-派若宁染色法。取对数生长期的 HR8348 细胞,调节细胞浓度为  $5 \times 10^4$  个/ml,接种于含盖玻片的 24 孔培养板,每孔加 1 ml。按随机的方法分别设槐耳清膏组(按加药浓度又分为 0.5 mg/ml、1.0 mg/ml、2.0 mg/ml 及 4.0 mg/ml 4 个亚组)、5-FU 组(浓度为 10 μg/ml)及空白对照组,每组设 4 孔。将细胞置于含 5% CO<sub>2</sub>、37 的培养箱中培养 24 h,去除旧的培养液,槐耳清膏组及 5-FU 组每孔加上上述浓度的含药培养液 2 ml,空白对照组加新鲜培养液 2 ml,继续置含 5% CO<sub>2</sub>、37 的培养箱中培养 36 h,取出细胞爬片按文献[1]的方法进行甲基绿-派若宁染色。观察每张细胞爬片,于光镜下随机检查 10 个高倍视野,计数其中凋亡细胞占细胞总数的比值作为细胞凋亡指数(AI)。

**1.3.3 凋亡细胞的生化检测** 采用末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL 法)。细胞接种、加药、分组及结果观察同甲基绿-派若宁染色法,每组设 4 孔。染色步骤严格按说明书进行。加 DNA 酶 (DNase) 作为阳性对照,加不含 TdT 的反应液作为阴性对照。

**1.3.4 凋亡调节蛋白 bcl-2、bcl-x1、bax、bak 及 p53 的检测** 采用细胞免疫组织化学方法,细胞接种及加药同甲基绿-派若宁染色法。分槐耳清膏 4.0 mg/ml 组和空白对照组两组,每组设 4 孔。染色步骤严格按说明书进行,以 PBS 替代一抗作为阴性对照。观察每张细胞爬片,于光镜下随机检查 10 个高倍视野,参照文献[2]的方法,以阳性细胞计数值和染色强度值的乘积记分。即阳性细胞计数值(阳性细胞数与 10 个倍视野细胞总数的比值) < 5% 为 0 分; 5% ~ 25% 为 1 分; 25% ~ 50% 为 2 分; 50% ~ 75% 为 3 分; > 75% 为 4 分。染色强度值以浅棕黄色为弱阳性,计为 1 分; 棕黄色为中度阳性,计为 2 分; 深棕黄色为强阳性,计为 3 分。由于 bax 或 bak 和 bcl-2 或 bcl-x1 是功能相反的凋亡调节蛋白,它们以二聚体的形式来调节细胞凋亡,故在对其表达情况进行染色评分后还需计算 bax/bcl-2、bax/bcl-x1、bak/bcl-2 和 bak/bcl-x1 的比值。

### 1.4 统计学处理

用 SPSS 10.0 统计软件包作单因素方差分析,检验水准 = 0.05。

## 2 结果

### 2.1 槐耳清膏对人直肠癌 HR8348 细胞的抑制率

槐耳清膏各浓度亚组的抑制率随浓度增加而上升,依次为 (34.4 ± 9.2) %、(49.0 ± 3.0) %、(56.1 ±

4.4) %、(71.1 ±4.3) %和(68.4 ±7.5) % ,呈一定的剂量依赖性,浓度达 4.0 mg/ml 时其抑制率最大; 5-FU (为体内血峰浓度) 组的抑制率为 (66.5 ±3.4) %; 槐耳清膏各浓度亚组与 5-FU 组的抑制率进行两两比较,槐耳清膏组中 4.0 mg/ml 和 6.0 mg/ml 亚组及 5-FU 组之间差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ),其他各组之间差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。

## 2.2 槐耳清膏对人直肠癌 HR8348 细胞的凋亡诱导作用

甲基绿-派若宁染色光镜下见凋亡细胞的细胞核固缩,呈绿蓝色深染,细胞质呈红紫色深染; TUNEL 染色光镜下见凋亡细胞的细胞体积缩小,细胞核呈蓝黑色深染; 两种染色方法均可见到典型的凋亡细胞、凋亡小体或出泡现象。HR8348 细胞凋亡指

数随槐耳清膏浓度的增加而增加,当浓度达 4.0 mg/ml 时,凋亡指数明显升高,均明显高于 5-FU 组的凋亡指数 ( $P < 0.05$ ),两种染色凋亡指数的变化见表 1。

## 2.3 槐耳清膏对凋亡调节基因表达的影响

### 2.3.1 对 bcl-2 家族基因表达的影响

bcl-2、bcl-xl、bax 及 bak 表达主要定位于细胞浆,阳性细胞胞浆被染成棕黄色,与空白对照组相比,槐耳清膏组 bcl-2、bcl-xl 及 bak 表达明显增强,而 bax 变化不明显(见图 1)。

槐耳清膏 4.0 mg/ml 组的 bcl-2、bcl-xl 及 bak 表达的免疫组织化学染色评分均大于空白对照组 ( $P < 0.05$ ),见表 2; 槐耳清膏组 bak/bcl-2 及 bak/bcl-xl 的比值大于空白对照组 ( $P < 0.05$ ),见表 3。

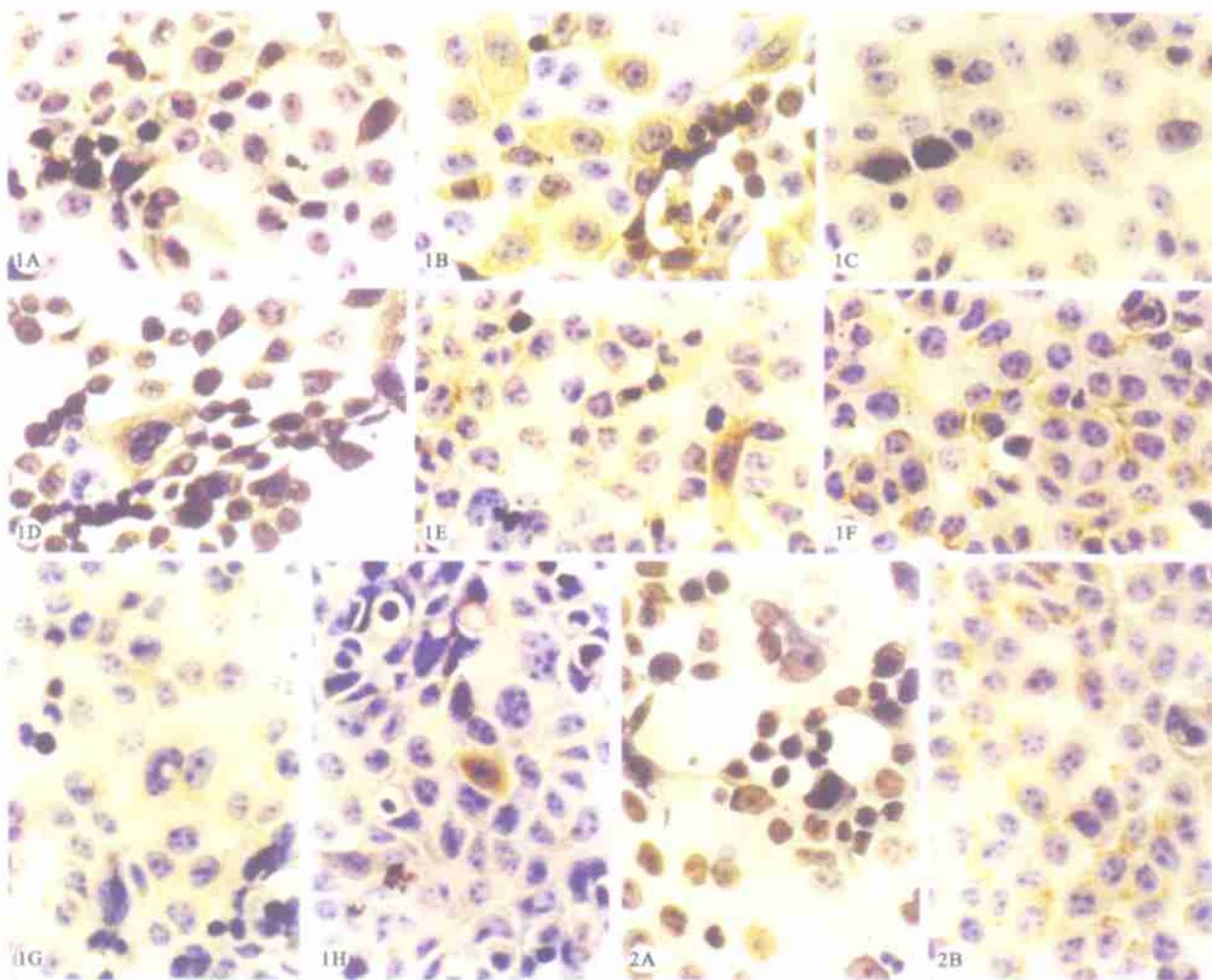


图 1 示 bcl-2 家族表达情况。阳性细胞胞浆被染成棕黄色。图 1A~图 1D 分别为槐耳清膏 4.0 mg/ml 亚组的 bcl-2、bcl-xl、bax 和 bak 的表达情况; 图 1E~图 1H 为相应基因空白对照组的表达情况。bcl-2、bcl-xl 及 bak 的表达前组明显增强,bax 的表达两组差异不明显。甲基绿-派若宁染色 ×400  
图 2 示 p53 的表达情况。图 2A 为槐耳清膏组,其 p53 呈阳性表达; 图 2B 为空白对照组,其 p53 呈阴性表达。甲基绿-派若宁染色 ×400

表 1 3 组两种染色细胞凋亡指数的比较(  $\bar{x} \pm s$  )

染色方法	槐耳清膏各浓度亚组(mg/ml)					5-FU 组(mg/ml)	空白对照组
	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0		
甲基绿-派若宁染色	0.0024 $\pm$ 0.0004	0.0048 $\pm$ 0.0009	0.0163 $\pm$ 0.0051*	0.0189 $\pm$ 0.0016*	0.1620 $\pm$ 0.0128*	0.0780 $\pm$ 0.0095*	0.0019 $\pm$ 0.0007
TUNEL 染色	0.0033 $\pm$ 0.0014	0.0065 $\pm$ 0.0010	0.0225 $\pm$ 0.0124*	0.0232 $\pm$ 0.0014*	0.2612 $\pm$ 0.0158*	0.1028 $\pm$ 0.0131*	0.0042 $\pm$ 0.0015

与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 5-FU 组比较,  $P < 0.05$

表 2 两组的免疫组织化学染色评分结果比较(分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	bcl-2	bcl-xl	bax	bak
槐耳清膏组	11.50 $\pm$ 0.58	10.50 $\pm$ 1.91	9.00 $\pm$ 1.63	10.75 $\pm$ 1.26
空白对照组	8.00 $\pm$ 1.41	7.25 $\pm$ 1.50	8.50 $\pm$ 0.58	3.50 $\pm$ 1.73
P 值	0.004	0.037	0.585	0.001

表 3 两组免疫组织化学染色评分比值比较(  $\bar{x} \pm s$  )

组别	bax/bcl-2	bax/bcl-xl	bak/bcl-2	bak/bcl-xl
槐耳清膏组	0.78 $\pm$ 0.14	0.86 $\pm$ 0.16	0.93 $\pm$ 0.11	1.02 $\pm$ 0.12
空白对照组	1.06 $\pm$ 0.07	1.17 $\pm$ 0.08	0.44 $\pm$ 0.22	0.48 $\pm$ 0.24
P 值	0.013	0.011	0.006	0.007

2.3.2 对 p53 基因表达的影响 p53 蛋白表达定位于细胞核,呈棕黄色。槐耳清膏 4.0 mg/ml 亚组镜下可见 p53 高表达,而空白对照组基本上呈阴性(见图 2)。槐耳清膏 4.0 mg/ml 组 p53 免疫组织化学染色评分为 (10.50  $\pm$  1.73) 分,显著高于空白对照组的 (2.75  $\pm$  1.26) 分,  $P < 0.001$ 。

### 3 讨论

槐耳是一种药用真菌,槐耳清膏由槐耳菌质经热水提取所得,含有多种有机成分和 10 余种矿物质元素,其主要抗癌活性成分为蛋白多糖(PS-T)。本研究结果表明,槐耳清膏对 HR8348 细胞的抑制率随其浓度的增加而升高,呈一定的剂量依赖性,槐耳清膏 4.0 mg/ml 组和 6.0 mg/ml 组的抑制率与 5-FU 组相比无差异,提示槐耳清膏对人直肠癌 HR8348 细胞具有显著的抑制作用。

细胞凋亡是现代生物医学领域的研究热点之一,不仅在胚胎发育、器官成熟过程中起至关重要的作用,而且与肿瘤等疾病的发生、发展及治疗密切相关。本实验甲基绿-派若宁染色法和 TUNEL 法均可见到典型的凋亡细胞、凋亡小体或出泡现象,HR8348 细胞凋亡指数随槐耳清膏浓度的增加而增加,当槐耳清膏达到一定的浓度时,凋亡指数迅速上升,说明槐耳清膏达到一定的药物浓度能显著诱导人直肠癌 HR8348 细胞凋亡。

细胞凋亡受细胞内一系列基因如 bcl-2、p53、c-myc 等的网络式精细调控,其中 bcl-2 家族基因为细胞凋亡的主要调节基因。bcl-2 家族基因按功能分为两类,一类是抑制细胞凋亡的基因,如 bcl-2、bcl-xl 等;另

一类是促进细胞凋亡的基因,如 bax、bak 等。bcl-2 家族基因表达的蛋白可通过各自的同源区域相互作用形成同或异二聚体来调节细胞凋亡。Cheng 等<sup>[3]</sup>报道, bcl-2 或 bcl-xl 和 bax 或 bak 结合可抑制后二者的促凋亡作用。本研究发现,槐耳清膏组 bak/bcl-2、bak/bcl-xl 的比值显著大于空白对照组,而 bax/bcl-2、bax/bcl-xl 的比值小于空白对照组,由此推测,槐耳清膏诱导人直肠癌 HR8348 细胞凋亡可能与 bak/bcl-2、bak/bcl-xl 比值的升高有关。p53 亦是与细胞凋亡密切相关的基因,分为野生型和突变型。野生型 p53 常见于正常细胞中,对细胞凋亡起促进作用;突变型 p53 常见于肿瘤中,对细胞凋亡起抑制作用。然而也有报道,某些突变型 p53 可抑制细胞生长,促进细胞凋亡<sup>[4,5]</sup>。由于野生型 p53 蛋白在细胞中的半衰期很短,而突变型 p53 蛋白的半衰期较长<sup>[6]</sup>,故用免疫组织化学方法检测到的主要为突变型 p53 蛋白。本研究发现,槐耳清膏组的 p53 蛋白表达不但没有减弱,反而显著增强;而同样浓度的槐耳清膏可显著诱导 HR8348 细胞的凋亡。由此推测,槐耳清膏诱导 HR8348 细胞凋亡可能与上调 p53 基因表达有关。

### 参 考 文 献

- 姜 泊主编. 细胞凋亡基础与临床 [M]. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1999 257 ~ 258
- Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, et al. bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis [J]. Cancer Res, 1995; 55(2) 237
- Cheng EH, Wei MC, Weiler S, et al. BCL-2, BCL-x(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing bax- and bak-mediated mitochondrial apoptosis [J]. Mol Cell, 2001; 8(3) 705
- Oh SJ, Im MY. The p53 mutation which abrogates transactivation while maintaining its growth suppression activity [J]. Mol Cells, 2000; 10(4) 386
- Kaneuchi M, Yamashita T, Shindoh M, et al. Induction of apoptosis by the p53 - 273L (Arg Leu) mutant in HSC3 cells without transactivation of p21Waf1/Cip1/Sd1 and bax [J]. Mol Carcinog, 1999; 26(1) 44
- Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation [J]. Ann N Y Acad Sci, 2000; 910 121

(2002-10-20 收稿, 2003-03-07 修回)

(本文编辑 应桂英)