

·基础研究·

槐耳清膏体外诱导人肝癌细胞凋亡的实验研究

金小顺,耿小平,朱立新,许伦兵,熊奇如,侯辉,刘念

【摘要】目的 观察槐耳清膏在体外对人肝癌细胞株 HepG-2凋亡的影响,为槐耳清膏在临床上治疗肝肿瘤提供理论依据。方法 采用 MTT法、TUNEL法及流式细胞术,观察不同浓度的槐耳清膏对体外培养的人肝癌细胞株 HepG-2的生长活力、细胞凋亡、DNA合成能力的影响;琼脂糖凝胶电泳检测 DNA-LADDER的形成。结果:槐耳清膏在体外能抑制人肝癌细胞 HepG2的生长,并具有时间及剂量依赖性;发生作用后,细胞生长有明显的凋亡特征性改变;细胞 DNA的合成能力下降。结论:槐耳清膏能有效地抑制体外肝癌细胞生长,其机制可能与抑制肝癌细胞 DNA合成及诱导肝癌细胞凋亡有关。

【关键词】 癌,肝细胞;槐耳清膏;细胞凋亡;DNA合成

【中图分类号】 R 735.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1006-4761(2007)02-0148-04

AN EXPERIMENTAL STUDY ON INDUCTION OF HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELL LINE APOPTOSIS BY TRAMETS ROBINOPHILA IN VITRO (JN Xiao-shun, GENG Xiao-ping, ZHU Li-xin, et al Department of Hepatic Biliary Surgery, First Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of Tramets robinophila on the apoptosis of the human hepatocellular carcinoma cells line HepG-2 and provide the experimental basis for Tramets robinophila treating liver cancer in clinic. **Methods** The effects of Tramets robinophila on proliferation, apoptosis and DNA synthesis of HepG-2 cells were determined by MTT assay, TUNEL, and flow cytometry. Agarose electrophoresis was applied to investigate DNA-LADDER. **Results** The growth of HepG-2 cells was inhibited by Tramets robinophila in vitro in a time/dose-dependent manner. Tramets robinophila induced apoptosis of HepG-2 cells and reduced their DNA synthesis. **Conclusion** Extractum trametes robinophila murr is effective in inhibiting growth of HCC *in vitro*. The mechanism of antineoplastic effect of trametes robinophila might be inhibition of DNA synthesis and induction of apoptosis of tumor cells.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; trametes robinophila; apoptosis; DNA synthesis

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的趋势。虽然手术切除是最有效的治疗措施之一,但远期疗效有待于进一步提高。化疗是肝癌治疗的手段之一,但有效药物比较少,长期应用副反应大,致使临床应用受限。因此寻找有效的肝癌化疗药具有重要的临床意义。

槐耳清膏是槐耳菌质经热水提取,含有多种有机成分、10余种矿物质元素,据临床观察,槐耳清膏具有抑制原发性肝癌细胞的生长,缓解症状,延长生存期等功效,但具体抗癌机制尚未完全明了^[1]。本研究旨在观察槐耳清膏对人肝癌细胞株 HepG-2及 HepG-2/ADM生长的影响,探讨其对原发性肝癌的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人肝癌细胞株 HepG2、人肝癌细胞耐药株 HepG2/ADM由华中科技大学附属同济医院肝脏外科中心提供。HepG2和 HepG2/ADM细胞用含 10%新生牛血清、青霉素(100 U/ml)、链霉素(100 mg/L)的 DMEM培养液于 37℃、5% CO₂

环境中培养。

1.2 药物及试剂

槐耳清膏(江苏盖天力药业有限公司提供);阿霉素(ADM)(法玛西亚公司)、顺铂(cDDP)(山东齐鲁制药)、丝裂霉素(MMC)(浙江海正药业)、5-氟尿嘧啶(5-FU)(旭东海普公司);MTT(AMRESCO, Ultra pure);二甲亚砜(DMSO)(AR,广州市新港化工有限公司)、高糖型 DMEM、新生牛血清(Gibco公司)、TUNEL原位凋亡试剂盒(南京凯基生物制品公司产品)、碘化丙啶(PI)、RNase A(德国宝灵曼公司)。

1.3 MTT药敏实验

设不同药物实验组、细胞对照组和空白对照组,将细胞制成 1×10^5 /L 细胞悬液,接种于 96孔板,每孔加细胞悬液 100 μ l,培养过夜,按分组情况加入不同浓度的抗肿瘤药,每个浓度设 5个复孔,每孔终体积 200 μ l,培养 36 h后,每孔加入 MTT(5 g/L) 20 μ l,继续培养 4 h,吸弃培养液,每孔加入 DMSO 150 μ l,充分振荡 10 min,于酶标仪上检测 490 nm 处吸光度值(A值),计算细胞抑制率,细胞抑制率 = $[1 - (AX - A) / (A_0 - A)] \times 100\%$, AX为加药孔吸光度值, A为对照组吸光度值, A₀为不加药孔的吸光度值;分组情况如下:其中 A为 HepG2, B为 HepG2+槐耳清膏, C为 HepG2/ADM, D为 HepG2/ADM+槐耳清膏。MTT实验在不同日重复 3次。

【作者单位】 安徽医科大学第一附属医院,合肥 230022

【作者简介】 金小顺,男,硕士,主治医师。研究方向:肝胆外科。

责任作者:导师耿小平,男,教授,主任医师。

【收稿日期】 2007-01-15

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

将 1×10^5 个细胞接种到 6 孔板中,培养 24 小时后,分别加入不同浓度 (0、1、5、10 g/L) 槐耳清膏,阳性对照组加 5-FU 10 mg/L,阴性对照组用 DMEM 培养液连续培养 3 天,每 24 小时离心收集细胞一次,无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS 洗涤 2 次,振荡使细胞分散;70% 冷乙醇 4 固定 18 小时以上;上机测定前,离心去乙醇,用磷酸缓冲液洗 3 次,加入 50 mg/L Rnase 37 消化 30 min,PI 50 mg/L,4 避光染色 30 分钟以上;经尼龙网过滤后,用流式细胞仪测定细胞的凋亡峰及凋亡率。实验重复 3 次。

1.5 TUNEL 法检测细胞凋亡

将无菌盖玻片置于 6 孔板底部,每孔接种 1×10^5 个细胞,培养 24 小时后,去除培养液,分别加入 1 g/L 及 10 g/L 槐耳清膏的培养液处理 24 小时 (阴性对照组为 DMEM 培养液);用眼科镊取出盖玻片粘在载玻片上,按照 TUNEL 原位凋亡试剂盒说明操作,DAB 显色后,倒置显微镜下 (40 \times 10) 随机选取 5 个视野,计数显色和未显色细胞,分别计算细胞凋亡率:细胞凋亡率 = 显色细胞 / (显色细胞 + 未显色细胞) \times 100%。

1.6 细胞 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

在不同时间,分别用胰酶消化收集不同浓度槐耳清膏作用的 HepG2 细胞 4×10^6 个 (阳性对照组用 5-FU 10mg/L 作用,阴性对照组用 DMEM 培养液),培养细胞经胰蛋白酶消化后,经 PBS 洗 2 遍,用酚-氯仿方法提取 DNA,并溶于无 DNA 酶的 TE 缓冲液中保存待测。经 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外透射反射分析仪观察电泳带,成像。

1.7 统计学处理

数据以表示,结果用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 细胞的药物敏感性

低于 0.008 g/L 的槐耳清膏未见明显细胞毒性,当浓度

增至 0.01 g/L 以上时,随着浓度增加,肝癌细胞抑制率逐渐增加,槐耳清膏对 HepG2 和 HepG2/ADM 的 IC₅₀ 分别为 0.917 g/L 和 1.66 g/L。(表 1)。

表 1 槐耳清膏的细胞毒性测定

槐耳清膏 (g/L)	抑制率 (%)	
	HepG2	HepG2/ADM
0.01	0.10 \pm 0.002	0.03 \pm 0.005
0.1	0.19 \pm 0.002	0.11 \pm 0.004
1	0.31 \pm 0.006	0.19 \pm 0.003
2	0.51 \pm 0.004	0.46 \pm 0.002
5	0.73 \pm 0.004	0.72 \pm 0.008
10	0.94 \pm 0.004	0.86 \pm 0.005

表 2 显示 ADM、 α DDP、MMC 和 5-FU 对 HepG2、HepG2 + 槐耳清膏、HepG2/ADM 和 HepG2/ADM + 槐耳清膏细胞的 IC₅₀,使用槐耳清膏前后 HepG2 和 HepG2/ADM 对 ADM、 α DDP、MMC 和 5-FU 的 IC₅₀ 值显著降低。

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡

表 3 显示除 0.1 g/L 浓度组外其他浓度槐耳清膏诱导肝癌细胞的凋亡率与空白对照组比较均有显著性差异。在槐耳清膏组中随着其浓度的升高,槐耳清膏诱导肝癌细胞的凋亡率逐步增加。与 5-Fu 组相比,各浓度槐耳清膏诱导肝癌细胞的凋亡率仅 10 g/L 与 5-Fu 组无显著差异,其余各组均有显著差异。相同浓度的槐耳清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。(如图 1 所示 A 对照组 B 1 g/L 组 C 5 g/L 组 D 10 g/L 组)

2.3 TUNEL 法检测细胞凋亡率比较

原位末端标记法 (TUNEL) 检测细胞的凋亡情况,可见核呈棕黄色的凋亡细胞呈小片或散在分布,细胞核碎裂、大小不一。检测结果为:槐耳清膏 (1 g/L) 组的细胞凋亡率为 (5.96 \pm 0.68)%,槐耳清膏 (10 g/L) 组的细胞凋亡率为 (12.96 \pm 1.36)%,阴性对照组的细胞凋亡率为 (1.23 \pm 0.21)%,经统计学处理差异有显著性, ($P < 0.05$)。实验表

表 2 HepG2 细胞与 HepG2/ADM 细胞的药物敏感性

组别	IC ₅₀ (mg/L)			
	ADM	α DDP	MMC	5-FU
HepG2	0.070 \pm 0.003	0.156 \pm 0.0021	0.105 \pm 0.007	0.307 \pm 0.012
HepG2 + 槐耳清膏	0.036 \pm 0.001 ^a	0.141 \pm 0.005	0.095 \pm 0.009	0.175 \pm 0.004 ^a
HepG2/ADM	0.913 \pm 0.063 ^b	0.895 \pm 0.096 ^b	0.260 \pm 0.015 ^b	1.169 \pm 0.039 ^b
HepG2/ADM + 槐耳清膏	0.247 \pm 0.026 ^c	0.352 \pm 0.016 ^c	0.109 \pm 0.013	0.412 \pm 0.021 ^c

a: HepG2 + 槐耳清膏与 HepG2 比较 ($P < 0.05$); b: HepG2/ADM 与 HepG2/ADM + 槐耳清膏比较 ($P < 0.05$); c: HepG2/ADM + 槐耳清膏与 HepG2 比较 ($P < 0.05$); 槐耳清膏浓度为 0.008 g/L

表 3 槐耳清膏诱导肝癌细胞凋亡率 (%)

凋亡率	DMEM 组	槐耳清膏 (0.1 g/L)	槐耳清膏 (1 g/L)	槐耳清膏 (5 g/L)	槐耳清膏 (10 g/L)	5-FU
24 h	2.7 \pm 0.36	3.6 \pm 0.53	7.25 \pm 0.96	8.96 \pm 1.56	13.65 \pm 1.38	15.98 \pm 1.34
48 h	6.73 \pm 1.23	7.86 \pm 1.35	11.89 \pm 1.64	26.34 \pm 1.1	29.86 \pm 1.32	32.64 \pm 1.25
72 h	9.54 \pm 1.46	10.67 \pm 1.53	16.42 \pm 1.79	30.89 \pm 1.2	35.43 \pm 1.63	37.68 \pm 1.74

与 DMEM 组比较: $P > 0.05$; 与 DMEM 组比较: $P < 0.05$; 与 5-Fu 组比较: $P < 0.05$

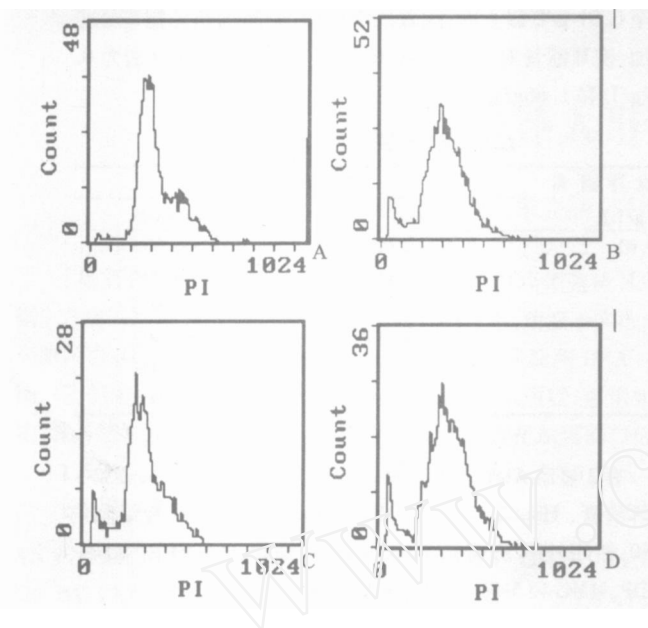


图 1 流式细胞仪检测槐耳清膏处理的 HepG-2细胞的 DNA组方图

明随着槐耳清膏浓度的增加,其凋亡率亦明显升高,且明显高于阴性对照组。

2.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析

凝胶电泳分析显示,经不同浓度槐耳清膏处理的 HepG2 细胞 DNA 断裂成相差约 200bp 的片段,呈现凋亡细胞特征的“梯形条带”(ladder),提示槐耳清膏诱导肝癌细胞凋亡,而对对照组 DNA 无断裂现象如图 2 所示。

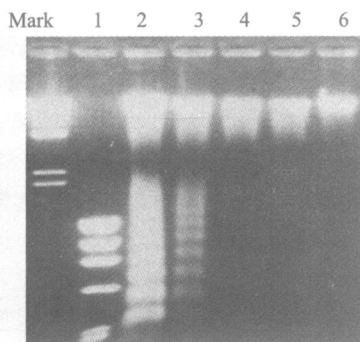


图 2 HepG2细胞经槐耳清膏作用 24h后 DNA断裂带

1泳道,5-Fu组;2,3泳道 10 g/L及 5 g/L槐耳清膏;4,5泳道为 1 g/L及 0.1 g/L槐耳清膏;6泳道为阴性对照组

3 讨论

槐耳是一种入药 1500年但已淹没 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,更未见国外有药用的报道。槐耳清膏的主要活性成分是多糖蛋白。其化学结构为由 6种单糖即 L岩藻糖、L阿拉伯糖、D木糖、D甘露糖、D半乳糖、D葡萄糖组成的杂多糖结合 18种氨基酸构成的蛋白质。目前已有其成品槐耳清膏槐耳颗粒(国家一

类新药)运用于临床,对肝癌、肺癌、食管癌、胃癌等均有独特疗效^[2]。根据槐耳清膏的一系列基础和临床研究表明,槐耳清膏具有以下作用:(1)直接抑制肿瘤的生长,促进肿瘤细胞的凋亡和坏死^[3,4];(2)增强机体免疫功能,提高对放疗的耐受性;(3)明显减轻症状,改善患者精神食欲及睡眠状况,从而提高生存质量。(4)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^[5]。陈大兴等研究发现,槐耳清膏可通过影响血管内皮细胞的增殖能力、迁移能力、附壁能力,抑制肝癌组织的血管生成,降低肝癌组织的微血管密度从而发挥抑制肝癌生长的作用^[6]。

细胞凋亡是机体清除衰老、异常细胞,维持内环境稳定的重要生理功能。免疫应答、造血系统的调控、胚胎的发育、肿瘤的形成都与细胞凋亡息息相关。肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,肝癌的发生、发展与细胞凋亡有着密切的关系^[7,8]。

但是,槐耳清膏诱导肝癌细胞凋亡的研究报道不多,本实验将槐耳清膏在体外作用于人肝癌细胞系 HepG-2,采用 MTT法、流式细胞仪、TUNEL法、琼脂糖凝胶电泳等不同的测试手段,检测肝癌细胞的变化。实验发现,首先采用 MTT法检测槐耳清膏对肝癌细胞株 HepG-2的体外生长抑制作用,发现低于 0.008g/L的槐耳清膏未见明显细胞毒性,当浓度增至 0.01 g/L以上时,其抑制作用具有明显的剂量相关性和时间相关性,随着剂量的增加、时间的延长,抑制作用增强。TUNEL法检测可见核呈棕黄色的凋亡细胞呈小片或散在分布,细胞核碎裂,大小不一。流式细胞仪可检测到细胞呈特征性的亚二倍峰,并且细胞生长滞留于 G2/M期。琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 呈现凋亡细胞特征的“梯形条带”。以上结果充分提示槐耳清膏在体外能够诱导肝癌细胞的凋亡,同时抑制肝癌细胞的生长增殖。

肝癌的发生、发展不仅与癌细胞的过度增殖有关,而且与癌细胞的凋亡减缓也密切相关,肝癌细胞的增殖与凋亡失去平衡,最终的结果肝癌不断增大。因此,治疗策略要从抑制、杀伤肝癌细胞以及促进肝癌细胞的凋亡着手。槐耳清膏在体外能有效地抑制肝癌细胞生长,由于其成分为传统中成药,具有价廉、低毒的优势,作为化疗时联合使用的辅助治疗手段,具有广阔的临床应用前景。

参考文献

- 1 黄涛,孔庆志,卢宏达,等. 槐耳清膏对耐顺铂人肺癌细胞系 A549DDP逆转的研究实验[J]. 中国药师, 2002, 5(9): 517 - 521.
- 2 庄毅. 真菌抗癌药物槐耳颗粒的研制[J]. 中国肿瘤, 1998, 8: 540 - 543.
- 3 黄涛,孔庆志,卢宏达,等. 槐耳清膏诱导人肺腺癌细胞 A549 凋亡的实验研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24: 503 - 504.
- 4 程若川,汤礼贵,兰丽琴. 槐耳清膏诱导人直肠癌 HR8348细胞凋亡的实验研究[J]. 中国肿瘤, 2003, 12(2): 122 - 124.
- 5 许戈良,英卫东,马金良,等. 槐耳清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.
- 6 陈大兴,陈孝平,张万广. 槐耳清膏治疗肝癌的实验研究[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 8: 578 - 582.
- 7 Chang Y C, Xu Y H. Expression of Bcl-2 inhibited Fas-mediated ap-

- optosis in human hepatocellular carcinoma BEL7404 cells[J]. *Cell Res*, 2000, 10 (3): 233 - 242
- 8 Xiao EH, Li JQ, Huang JF. Effects of p53 on apoptosis and proliferation of hepatocellular carcinoma cells treated with transcatheter arterial chemoembolization[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10 (2): 190 - 194.
- (本文编辑 朱化刚)