

◁实验研究▷

槐耳清膏体外抑制肝癌细胞生长的实验研究

任建庄, 郑传胜*, 冯敢生, 梁惠民, 周国锋, 夏向文

【摘要】 目的 探讨槐耳清膏体外抑制肝癌细胞生长的机制。材料与方法 取对数生长期的肝癌 Hep-G2 细胞, 分别与 DMEM 和含槐耳清膏不同浓度 (1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml) 的 DMEM 培养液作用 24、48、72 h 后, 应用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 比色法检测肝癌细胞的增殖情况, 用流式细胞仪检测肝癌细胞的凋亡情况。结果 MTT 比色法检测结果显示槐耳清膏作用 Hep-G2 细胞后, 随着槐耳清膏药物浓度的增加, 肝癌细胞生长抑制率增加, 呈量效关系。流式细胞仪检测结果显示槐耳清膏诱导 Hep-G2 细胞的凋亡率随着槐耳清膏药物浓度的增加, 作用时间的延长, 其诱导 Hep-G2 细胞的凋亡率逐步增加。结论 槐耳清膏体外能抑制 Hep-G2 细胞增殖, 诱导 Hep-G2 细胞凋亡。槐耳清膏对肝癌有治疗作用。

【关键词】 槐耳清膏 肝癌细胞 凋亡 实验研究

The Inhibition of Hepatocellular Carcinoma Cells Growth by Huaier Fungi Extract : An Experimental Study

REN Jianzhuang, ZHENG Chuansheng, FENG Gansheng, et al.

Department of Radiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei Province 430022, P. R. China

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of huaier fungi extract to inhibit the growth of the human hepatocellular carcinoma in vitro. **Materials and Methods** The human hepatocellular carcinoma cells lines (Hep-G2) in log phase were treated with DMEM and huaier fungi extract (1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml) in DMEM for 24h, 48h, 72h respectively. The growth inhibitory effect of huaier fungi extract on Hep G2 was observed by MTT assay. The ratios of cells apoptosis was also observed by flow cytometry. **Results** The growth of Hep G2 cells were significantly inhibited by huaier fungi extract. The inhibition ratios increased with the concentration of huaier fungi extract, in an evident dose dependent manner. By increasing the concentration or the time prolonging of huaier fungi extract, the apoptosis ratios were amplified. **Conclusion** The huaier fungi extract can induce apoptosis and inhibit the proliferation of Hep G2 cells. It is an ideal drug for hepatic cancer treatment.

【Key words】 Extract of fungi of huaier Hepatocellular carcinoma cells Apoptosis Experimental study

在我国原发性肝癌是常见的恶性肿瘤之一, 每年约有 11 万人死于肝癌, 占全球肝癌死亡人数的 45%。经导管肝动脉化疗栓塞 (transcatheter arterial chemoembolization, TACE) 目前已成为治疗中晚期肝癌的主要手段之一, 但 TACE 的远期疗效仍不理想, 其主要原因为化疗栓塞虽能使肿瘤病灶大部分发生坏死, 但发生完全性坏死者少见, 多数病灶内仍可残存肿瘤细胞, 成为肿瘤复发及转移的根源, 严重影响了 TACE 的远期疗效^[1,2]。为了提高肝癌介入治疗

的效果, 近年来, 采用中成药槐耳颗粒冲剂 (其有效成分为槐耳清膏) 作为 TACE 的辅助治疗, 取得了明显的临床疗效^[3], 但其作用机制尚不十分清楚。笔者拟通过槐耳清膏在体外对肝癌细胞生长影响的研究, 从细胞水平探讨槐耳清膏的抗癌机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人肝癌细胞株 Hep-G2 (协和医院普外科实验室细胞保藏中心提供); 胰蛋白酶、四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 试剂包 (Sigma 公司); DMEM 培养基 (Gibco 公司); 胎牛血清 (三利公司); 凋亡检测包 (晶美公

作者单位: 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科介入诊疗中心; *通讯作者

司);酶标仪(Sunrise公司);倒置显微镜(Olympus公司);BCM-1000型超净工作台(苏州净化设备有限公司);流式细胞仪(BD公司);CO₂温箱(Nuaire公司);槐耳清膏(江苏启东盖天力制药有限公司),临用时将槐耳清膏溶于DMEM培养基内,配制成1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml、8 mg/ml溶液,用0.22 μm滤膜过滤除菌待用。

1.2 试验方法

细胞培养:人肝癌细胞株 Hep-G2 采用 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清)培养,2天换液 1次,细胞长满后用 0.25%胰蛋白酶消化,1~4传代,在 37℃、5% CO₂ 温箱内培养。

MTT实验:取对数生长期的 Hep-G2 细胞,接种于 96孔板,每孔 200 μl,含 3 × 10³ 个细胞,设 6个复孔,在温箱内培养 24 h后,加入含槐耳清膏不同浓度(1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml、8 mg/ml)的 DMEM 培养液 100 μl,以加入不含槐耳清膏的 DMEM 培养液 100 μl 为空白对照组,分别培养 24、48、72 h,每天在倒置显微镜下观察细胞生长情况。显色前,弃上清液,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3次,然后,每孔加入 MTT 20 μl,培养 4 h后,弃上清液,加入 150 μl 二甲基亚砷,在微量震荡仪上震荡 10 min,在酶标仪上读取 570 nm 波长下每孔的吸光度(A)值,按下列公式计算细胞生长抑制率(inhibitory rate, R): $R = [(\text{正常对照组 A 值} - \text{用药组 A 值}) / \text{正常对照组 A 值}] \times 100\%$ 。

用流式细胞仪检测肝癌细胞凋亡:取对数生长期的 Hep-G2 细胞,接种于 6孔板,每孔 3 ml,含 1 × 10⁵ 个细胞,设 3个复孔,在温箱内培养 24 h后,加入含槐耳清膏不同浓度(1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml、8 mg/ml)的 DMEM 培养液 500 μl,以加入不含槐耳清膏的 DMEM 培养液 500 μl 为空白对照组,分别培养 24、48、72 h。终止培养前,先把培养液上清液收集在离心管内,1000转/min,离心 5 min,收集细胞备用。对每培养孔内细胞用胰蛋白酶消化后加入培养液 1.5 ml 终止消化,反复吹打成细胞悬液,然后把细胞悬液收集在刚才相应的离心管内,1000转/min,离心 5 min,弃上清液,用 4℃ 预冷的 PBS 洗细胞 2次,用结合缓冲液重新悬浮细胞,调节其浓度为 1 × 10⁶ /ml,取 100 μl 细胞悬液于 5 ml 流式管内,加入 5 μl Annexin V/FITC 和 10 μl 碘化丙啶溶液,混匀后于室温避光孵育 15 min,在反应管内加 400 μl PBS,上流式细胞仪分析。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件。对槐耳清膏不同浓度干预后 24、48、72 h 的 A 值、凋亡率及槐耳清膏同一浓度干预不同时间段的凋亡率,采用方差分析,再用 LSD 法进行相邻组间两两比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槐耳清膏对 Hep-G2 细胞生长影响的形态观察

倒置显微镜下观察细胞发现,空白对照组细胞生长良好,细胞之间紧密相靠、互相衔接,呈“铺路石”状。实验组细胞加入槐耳清膏进行干预,1、2 mg/ml 浓度干预 24 h 后与对照组相比无明显变化,48、72 h 后细胞形态发生变化,表现为细胞皱缩,出现悬浮细胞;4、8 mg/ml 浓度干预 24 h 后细胞形态即出现皱缩,出现悬浮细胞;随着槐耳清膏浓度的增加及作用时间的延长,细胞皱缩逐渐明显,悬浮细胞数量逐渐增多。

2.2 MTT 法检测槐耳清膏对 Hep-G2 细胞增殖的抑制作用

MTT 结果显示,在槐耳清膏浓度为 1~8 mg/ml,分别处理细胞 24、48、72 h 后,与各自对照组相比(P < 0.05),其能明显抑制 Hep-G2 细胞的增殖,随着槐耳清膏药物浓度的增加,细胞存活率降低,A 值变小,R 值增大,呈量效关系。随着时间的延长,48 h 与 24 h 相比,R 值增大,到 72 h 时,R 值变小。在 72 h R 值变小,可能与观察时间长,一些细胞崩解成碎片有关,也可能与槐耳清膏溶液的 pH 值、离子浓度和渗透压等因素相关。在槐耳清膏浓度相同情况下,随着时间的延长,其 A 值增加,表明槐耳清膏在目前实验前提下并不能完全抑制肝癌细胞生长,细胞还是有所增殖,只是在槐耳清膏作用下,细胞的生长速度降低(表 1)。

2.3 流式细胞仪检测槐耳清膏对 Hep-G2 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示:槐耳清膏能明显诱导肝癌细胞凋亡,在槐耳清膏浓度为 1~8 mg/ml 时,其诱导 Hep-G2 细胞的凋亡率与对照组相比差异均有统计学意义(P < 0.05),随着槐耳清膏药物浓度的增加,时间延长,其诱导 Hep-G2 细胞的凋亡率逐步增加(表 2)。

3 讨论

槐耳是一种重要的药用真菌,其味苦、辛,性平

表 1 槐耳清膏对 Hep-G2细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

组别	槐耳清膏浓度 (mg/ml)	24 h		48 h		72 h	
		A值	R (%)	A值	R (%)	A值	R (%)
对照组	0	0.425 ± 0.036	-	0.751 ± 0.030	-	1.217 ± 0.068	-
槐耳清膏组	1	0.358 ± 0.021	15.8	0.614 ± 0.036	18.2	1.090 ± 0.053	10.4
	2	0.316 ± 0.027	25.6	0.522 ± 0.044	30.5	0.979 ± 0.036	19.6
	4	0.296 ± 0.026	30.4	0.444 ± 0.017	40.9	0.796 ± 0.043	34.6
	8	0.210 ± 0.043	50.6	0.338 ± 0.034	55.0	0.641 ± 0.049	47.3
F值	-	37.934	-	134.09	-	122.86	-
P值	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-

注:槐耳清膏浓度 1 mg/ml组与对照组、2 mg/ml组与 1 mg/ml组、4 mg/ml组与 2 mg/ml组、8 mg/ml组与 4 mg/ml组相比,24 h P值分别为 0.001、0.032、0.275、0.000;48 h P值均为 0.000;72 h P值分别为 0.000、0.001、0.000、0.000。-表示无数据

表 2 槐耳清膏诱导 Hep-G2细胞的凋亡率 (%) ($\bar{x} \pm s$)

组别	槐耳清膏浓度 (mg/ml)	24 h	48 h	72 h	F值	P值
对照组	0	4.186 ± 0.655	9.353 ± 0.596	13.306 ± 1.233	81.584	0.000
槐耳清膏组	1	6.456 ± 0.640	12.653 ± 0.701	18.530 ± 1.384	116.504	0.000
	2	8.750 ± 0.575	21.546 ± 1.277	25.176 ± 1.136	206.13	0.000
	4	10.440 ± 0.730	28.386 ± 1.316	33.410 ± 1.223	348.948	0.000
	8	13.703 ± 0.755	34.456 ± 1.423	37.443 ± 1.370	336.361	0.000
F值	-	88.2	265.191	186.318	-	-
P值	-	0.000	0.000	0.000	-	-

注:槐耳清膏浓度 1 mg/ml组与对照组、2 mg/ml组与 1 mg/ml组、4 mg/ml组与 2 mg/ml组、8 mg/ml组与 4 mg/ml组相比,24 h P值分别为 0.002、0.002、0.012、0.000;48 h P值分别为 0.005、0.000、0.000、0.000;72 h P值分别为 0.001、0.000、0.000、0.003。槐耳清膏干预 48 h与 24 h,72 h与 48 h相比,槐耳清膏浓度 0 mg/ml组的 P值分别为 0.000、0.001;槐耳清膏浓度 1 mg/ml组的 P值均为 0.000;槐耳清膏浓度 2 mg/ml组的 P值分别为 0.000、0.005;槐耳清膏浓度 4 mg/ml组的 P值分别为 0.000、0.002;槐耳清膏浓度 8 mg/ml组的 P值分别为 0.000、0.024。-为无数据

无毒,有治风、破血、益力的功效,民间多用于治疗癌症及炎症。槐耳清膏是槐耳菌质经热水提取,其主要成分为多糖蛋白,现已证实多糖蛋白是槐耳菌质抗癌和增加免疫功能的主要有效成分,它由 6种单糖(含量为 41.53%)和 18种氨基酸(含量为 12.93%)组成。目前已有槐耳颗粒冲剂(国家一类新药)用于临床,其具有抑瘤、增强免疫的双重作用,且能协助化疗、减轻化疗毒副作用,改善患者全身症状,提高生存质量,使用安全、方便,在肿瘤的治疗中取得了明显疗效,是一种较理想的抗癌新药^[4]。为了探讨槐耳清膏的抗肿瘤作用机理,许多学者在这方面进行了有益探索,认为其抗肿瘤机制主要为:抑制肿瘤血管内皮细胞增殖,阻碍肿瘤血管生成^[5];诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖^[6];防癌、抑癌作用^[7]等。肿瘤的形成,主要是机体细胞异常增殖的结果,可能还与细胞正常的死亡机制发生障碍有关^[8]。这种导致肿瘤形成的细胞增殖称为肿瘤性增殖,其细胞增殖是克隆性的,肿瘤细胞生长旺盛,失去控制,具有相对自主性,肿瘤性增殖常常在局部形成肿块。凋亡,也可称程序性细胞死

亡,是由体内外某些因素触发细胞内预存的死亡程序而导致的细胞主动死亡方式。肿瘤的进行性生长及生长速度,与肿瘤细胞的生成和死亡的比例有关。在肿瘤生长过程中由于营养供应和抗肿瘤反应等因素的影响,有一些肿瘤细胞会死亡,并且常以凋亡的形式发生。所以,抑制肿瘤细胞增殖和促进肿瘤细胞凋亡,是肿瘤治疗的两个重要方面。

肝细胞癌为富血供肿瘤,其病灶血供的 95%~99%来自于肝动脉,TACE正是利用肝癌的这一病理特点在肿瘤供血动脉内注入化疗药物并进行栓塞达到治疗的目的,但 TACE很难完全杀死肿瘤细胞。有研究

研究发现肝癌 TACE后肺转移率增加^[9];肝癌术前 TACE可致肝外转移率增加,患者生存期缩短^[10]。在临床上,许多抗肿瘤药物通过诱导肿瘤细胞凋亡达到治疗肿瘤的目的^[11],而 TACE可增加化疗药的细胞毒副作用,增加肿瘤细胞的凋亡率^[12,13]。本实验从槐耳清膏抑制肝癌细胞增殖和诱导肝癌细胞凋亡两个方面探讨槐耳清膏治疗肝癌的机制。实验结果提示:在槐耳清膏浓度为 1~8 mg/ml时,其能明显抑制 Hep-G2细胞的增殖,随着槐耳清膏药物浓度的增加,A值变小,R值变大,呈量效关系;在槐耳清膏浓度为 1~8 mg/ml时,其诱导 Hep-G2细胞的凋亡率与对照组相比差异均有统计学意义,随着槐耳清膏药物浓度的增加,时间延长,其诱导 Hep-G2细胞的凋亡率逐步增加。结果表明槐耳清膏可以通过抑制肝癌细胞增殖和诱导肝癌细胞凋亡两个途径抑制肝癌细胞的生长;槐耳清膏可增加 TACE的疗效。

肝细胞癌恶性程度高,转移早,而且常是多中心发病,有些病灶较小不能被现有的检查方法发现,外科手术很难完全切除病灶。由于 50%~90%的肝

细胞癌合并有不同程度的肝硬化,患者免疫力下降,不能耐受外科手术,因此,TACE目前已成为治疗中晚期肝癌的主要手段之一。虽然TACE方法在不断改进,其疗效有了较大提高,但结果仍很难使人满意,因此,针对肝细胞癌强调多学科、多种方法联合治疗。我国传统中药在治疗肿瘤方面具有独特优势。随着对槐耳清膏研究的进一步深入,其抑癌、抗癌的机制将会更加明确。

参考文献

- Liado L, Virgili J, Figueras J, et al A prognostic index of the survival of patients with unresectable hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization. *Cancer*, 2000, 88: 50
- Higuchi T, Kikuchi M, Okazaki M. Hepatocellular carcinoma after transcatheter hepatic arterial embolization: a histopathologic study of 84 resected cases. *Cancer*, 1994, 73: 2259
- 郭添胜,黄福喜,曹小龙. 槐耳颗粒联合介入治疗原发性肝癌的疗效观察. *实用医学杂志*, 2005, 16: 1846
- 李力新,叶胜龙,王艳红,等. 槐耳清膏的实验研究及临床应用进展. *中国肿瘤*, 2007, 16: 110
- 徐戈良,英卫东,马金良,等. 槐耳清膏体外抑制血管生成的实验研究. *中国药理学通报*, 2003, 19: 1410
- 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. *中华结核和呼吸杂志*, 2001, 24: 487
- Chen L, Lu ZX, Lu P, et al Anticancer effect of PS-T on the experimental hepatocellular carcinoma. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 2004, 3: 55
- 李玉林,主编. *病理学*. 北京:人民卫生出版社, 2005, 92
- Lion TC, Shih SC, Kao CR, et al Pulmonary metastasis of hepatocellular carcinoma associated with transarterial chemoembolization. *J Hepatol*, 1995, 23: 563
- Wu CC, Ho YZ, Ho WL, et al Preoperative transcatheter arterial chemoembolization for resectable large hepatocellular carcinoma: a reappraisal. *Br J Surg*, 1995, 82: 122
- Matsuura T, Fukuda Y, Fujitaka T, et al Preoperative treatment with tegafur suppositories enhances apoptosis and reduces the intratumoral microvessel density of human colorectal carcinoma. *Cancer*, 2000, 88: 1007
- Huschtscha LI, Bartier WA, Ross CEA, et al Characteristics of cancer cell death after exposure to cytotoxic drugs in vitro. *Br J Cancer*, 1996, 73: 54
- 蒋飏,楼琦,丁信法,等. 碘油栓塞致大鼠肝肿瘤细胞凋亡的研究. *中华肿瘤杂志*, 2004, 26: 205

(收稿: 2008 - 04 - 30)