

槐耳清膏诱导人直肠癌HR8348细胞凋亡的实验研究

程若川, 汤礼贵, 兰丽琴 (昆明医学院第一附属医院, 云南 昆明 650031)

Apoptosis of Human Rectal Adenocarcinoma Cell Line HR8348 Induced by PS-T in vitro

CHENG Ruo-chuan, TANG Li-gui, LAN Li-qin

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制。[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小时,用MTT比色法检测OD值,计算抑制率;用甲基绿-派诺宁染色法及TUNEL法检测细胞凋亡指数;用免疫组织化学方法研究Bcl-2、Bcl-X_L、Bax、Bak及p53基因表达情况。[结果]①槐耳清膏对HR8348细胞的抑制率随浓度增加而上升,浓度4.0 mg/ml的抑制率最大,为71.1%。与5-Fu10μg/ml对照组相比无显著差异($P>0.05$)。②两种凋亡检测方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增加而增加,当浓度达4.0mg/ml时,凋亡指数迅速上升,甲基绿-派诺宁法达0.1620, TUNEL法达0.2612,均大于5-Fu10μg/ml对照组的凋亡指数,差异显著($P<0.05$)。③槐耳清膏组Bcl-2、Bcl-X_L、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-X_L比值显著大于空白对照组。[结论]①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。②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-X_L比值及上调p53基因表达有关。

关键词: 细胞凋亡; 基因, Bcl-2; 基因, p53; 槐耳清膏; HR8348细胞; 直肠肿瘤

中图分类号: R73-3; R735.3⁷ 文献标识码: B 文章编号: 1004-0242(2003)02-0122-03

直肠癌是消化道常见的恶性肿瘤。目前直肠癌的化疗仍以5-Fu为主,迫切需要研究与开发低毒或无毒且不易耐药的抗癌新药。金克槐耳颗粒为近年来开发出的国家一类抗癌新药,已较广泛地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。为了探讨槐耳对人直肠癌的抗癌作用及其机制,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-X_L、Bax、Bak及p53表达的影响,希望为国家中药一类新药——金克槐耳颗粒用于治疗直肠癌提供一定的理论依据。

1 材料与方

1.1 实验细胞

HR8348细胞系直肠低分化腺癌,由浙江省肿瘤研究所提供。培养液为PRMI1640加20%小牛血清及每毫升含青霉素100u、链霉素100μg、氢化考的松10μg、胰岛素0.01u,37℃,5%

CO₂。

1.2 药品配制

精确称取干槐耳清膏(启东盖天力药业有限公司提供)10.0g,将其溶于100ml单PRMI1640培养液,以0.20μm超滤除菌器(CORNING公司产品)过滤除菌,制成100mg/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0.5mg/ml~6.0mg/ml的工作液。

1.3 体外药物抑瘤实验

采用四氮唑蓝(MTT)比色法。MTT为Sino-American Biotechnology公司产品。取对数生长期的HR8348细胞,调节细胞浓度为 5×10^4 /ml,接种于96孔培养板,每孔加0.1ml。将细胞置含5%CO₂、37℃的培养箱中培养24小时。去除旧的培养液,每孔加槐耳清膏浓度分别为0.5 mg/ml、1.0 mg/ml、2.0 mg/ml、4.0 mg/ml、6.0 mg/ml的含药培养液0.2ml,另设空白对照组及5-Fu10μg/ml组,每组设12孔。继续置含5%CO₂、37℃的培养箱中培养36小时。每孔加入0.5%MTT 20μl,继续培养4小时。吸去培养液,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)100μl。置Wellscan Mk3酶标仪(Labsystems公司产品)振荡15秒钟,在波长570nm处测定吸光度OD值。结果按以下公式计算抑制

收稿日期:2002-08-14;修回日期:2003-01-03

率:

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

1.4 凋亡细胞的形态学检测

采用甲基绿-派诺宁染色法。甲基绿和派诺宁分别为Fluka公司和Chroma公司产品。取对数生长期的HR8348细胞,调节细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$,接种于24孔含盖玻片的培养板,每孔加1ml。将细胞置含5%CO₂、37℃的培养箱中培养24小时。去除旧的培养液,每孔加槐耳清膏浓度分别为0.5 mg/ml、1.0 mg/ml、2.0 mg/ml、3.0 mg/ml、4.0 mg/ml的含药培养液2ml,另设空白对照组及5-Fu10μg/ml组,共7组,每组设4孔。继续置含5%CO₂、37℃的培养箱中培养36小时。取出细胞爬片进行甲基绿-派诺宁染色,染色方法按文献进行。结果观察以每张细胞爬片光镜下随机检查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)。

1.5 凋亡细胞的生化检测

采用TdT介导的dUTP缺口末端标记法(TUNEL法)。原位凋亡检测试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司。细胞接种、加药、分组及结果观察同甲基绿-派诺宁染色法,每组设4孔。染色步骤严格按说明书进行。加DNase I作为阳性对照,加不含TdT的反应液作为阴性对照。

1.6 凋亡调节蛋白Bcl-2、Bcl-X_L、Bax、Bak及p53的检测

采用细胞免疫组织化学方法。Bcl-2、Bcl-X_L、Bax、Bak、p53单抗及SP试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。细胞接种及加药同甲基绿-派诺宁染色法。分槐耳清膏4.0 mg/ml和空白对照两组,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。结果观察以每张细胞爬片光镜下随机检查10个高倍视野,按阳性细胞计数值和染色强度值的乘积记分^[2]。其中,阳性细胞数计分为:0, ≤5%;1, 5%~25%;2, 25%~50%;3, 50%~75%;4, ≥75%。染色强度计分为:1, 弱阳性;2, 中度阳性;3, 强阳性。

1.7 数据统计分析

用SPSS10.0 for windows 统计软件包作单因素方差分析。以P<0.05为结果有统计学意义。

2 结果

2.1 槐耳清膏对人直肠癌HR8348细胞生长的影响

槐耳清膏对人直肠癌HR8348细胞的抑制率随浓度增加而上升,呈一定的剂量依赖性。其中4.0mg/ml和6.0mg/ml两浓度组的抑制率分别达到71.1%和68.4%,而对照组5-Fu 10μg/ml(为体内血峰浓度)的抑制率为66.5%,三者无显著性差异(P>0.05)。

2.2 槐耳清膏对人直肠癌HR8348细胞的凋亡诱导作用

2.2.1 甲基绿-派诺宁染色

经甲基绿-派诺宁染色后凋亡的HR8348细胞在光镜下表现为细胞核固缩呈绿蓝色深染,胞质呈红紫色深染,并可

见凋亡小体。凋亡指数随槐耳清膏浓度增加而增加,当浓度达到4.0mg/ml时,凋亡指数迅速上升,达0.1620±0.0128,大于5-Fu10μg/ml对照组的凋亡指数,两者有显著性差异(P<0.05,表1)。

表1 HR8348细胞凋亡指数(n=4)

组别	甲基绿-派诺宁法	TUNEL法
清膏4.0mg/ml	0.1620±0.0128*	0.2612±0.0158*
5-Fu10μg/ml	0.0780±0.0095	0.1028±0.0131
空白对照	0.0019±0.0007	0.0042±0.0015

*: 与5-Fu10μg/ml及空白对照比较, P<0.05

表2 免疫组织化学染色评分(n=4)

组别	Bcl-2	Bcl-X _L	Bax	Bak	p53
槐耳清膏组	11.50±0.58	10.50±1.91	9.00±1.63	10.75±1.26	10.50±1.73
空白对照组	8.00±1.41	7.25±1.50	8.50±0.58	3.50±1.73	2.75±1.26
	P=0.004	P=0.037	P=0.585	P=0.001	P<0.001

表3 免疫组织化学染色评分比值

组别	Bax/Bcl-2	Bak/Bcl-2	Bax/Bcl-X _L	Bak/Bcl-X _L
槐耳清膏组	0.78	0.93	0.86	1.02
空白对照组	1.060	0.44	1.17	0.48

2.2.2 TUNEL染色

经TUNEL染色后凋亡的HR8348细胞在光镜下表现为细胞体积缩小、细胞核呈蓝黑色着染,并可见出泡现象;部分核呈蓝黑色或淡蓝黑色着染的细胞与正常细胞在形态学上无异。Dnase I作用的阳性对照为阳性,不含TdT的阴性对照为阴性。TUNEL法检测的凋亡指数变化情况与甲基绿-派诺宁法基本一致,但TUNEL法凋亡指数大于甲基绿-派诺宁法(见表1)。其中槐耳清膏浓度4.0mg/ml的凋亡指数为(0.2612±0.0158),与5-Fu10μg/ml对照组相比有显著性差异(P<0.05)。

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-X_L、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-X_L及Bak表达明显增强,而Bax变化不明显。以PBS代替一抗的阴性对照为阴性。

Bcl-2家族蛋白表达的免疫组织化学染色评分见表2。槐耳清膏组的Bcl-2、Bcl-X_L及Bak表达评分大于空白对照组,尤其是Bak具有非常显著的差异(P<0.05);Bax与空白对照组无显著差异(P=0.585)。槐耳清膏组Bak/Bcl-2、Bak/Bcl-X_L的比值显著大于空白对照组(见表3)。

2.3.2 对p53基因表达的影响

p53蛋白表达定位于细胞核,呈棕黄色着染。槐耳清膏组细胞镜下可见p53高表达,而空白对照基本呈阴性。槐耳清膏组p53免疫组织化学染色评分显著高于空白对照组(P<0.001,见表2)。

3 讨论

槐耳是生长在中国古槐树上的一种药用真菌——槐栓

菌(*Trametes robiniophila* Murr),具有“治风”、“破血”、“益力”的功效,民间用于治疗癌症和炎症。由槐耳菌质经热水提取得到的槐耳清膏含有多种有机成分和十余种矿物质元素,其主要抗癌活性成分为蛋白多糖(PS-T)。经荷瘤动物体内抑瘤试验表明,槐耳清膏具有明显的抑制肿瘤生长和延长荷瘤动物生命的作用;并且动物毒性试验未见毒副作用。现已有其成品——金克槐耳颗粒(国家一类新药)应用于临床。据报道^[4-8],槐耳冲剂对中晚期肝癌具有独特的疗效,无明显毒副作用;槐耳冲剂联合其它化疗药物用于治疗大肠肿瘤、非小细胞肺癌、晚期胃癌、复发性非霍奇金淋巴瘤等,亦有一定的疗效。对其抗肿瘤机理的研究表明:(1)槐耳具有调节与促进机体免疫功能,从而杀伤、抑制肿瘤细胞的作用^[3]。(2)对某些肿瘤细胞可通过诱导凋亡来发挥其直接的细胞毒性作用^[9]。然而有关槐耳抗癌作用的基础性研究很少,尤其是在抗大肠肿瘤方面还属空白。

3.1 槐耳清膏对人直肠癌HR8348细胞的生长抑制作用

本实验结果表明,槐耳清膏对人直肠癌HR8348细胞具有显著的抑制作用,当槐耳清膏达到一定的药物浓度时,抑制率达最大值,再提高药物浓度抑制率反稍有下降,但无统计学意义,提示槐耳清膏对HR8348细胞的抑制作用具有一定的剂量依赖性。

3.2 槐耳清膏对人直肠癌HR8348细胞的凋亡诱导作用

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。本实验两种凋亡检测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的浓度增加而增加,当槐耳清膏达到一定的浓度时,凋亡指数迅速上升,说明槐耳清膏在一定的药物浓度能显著诱导人直肠癌HR8348细胞凋亡。本研究中TUNEL法凋亡指数大于甲基绿-派诺宁法,可能是TUNEL法检测到的部分凋亡细胞处于凋亡的早期,还未出现典型的凋亡细胞形态学特征之故。

3.3 槐耳清膏对Bcl-2家族基因表达的影响

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-X_L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变细胞凋亡。据报道^[10],Bcl-2或Bcl-X_L和Bax或Bak结合可抑制后两者的促凋亡作用。本研究发现,槐耳清膏组Bak/Bcl-2、Bak/Bcl-X_L的比值显著大于空白对照组,而Bax/Bcl-2、Bax/Bcl-X_L的比值两者差别不大。由此推测,槐耳清膏诱导人直肠癌HR8348细胞凋亡可能与升高Bak/Bcl-2、Bak/Bcl-X_L的比值有关。

3.4 槐耳清膏对p53基因表达的影响

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^[11、12]。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^[13],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此时可显著诱导HR8348细胞凋亡。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。

3.5 本研究的不足

虽然槐耳清膏4.0mg/ml和6.0mg/ml对人直肠癌HR8348细胞的抑制率与5-Fu10μg/ml无显著差异,甚至槐耳清膏4.0mg/ml组的凋亡指数大于5-Fu10μg/ml组,但由于本研究没有检测槐耳清膏和5-Fu对HR8348细胞的最大抑制率及最大凋亡诱导作用,故槐耳清膏对人直肠癌HR8348细胞抗癌作用与5-Fu的效果比较有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 姜泊.细胞凋亡基础与临床[M].北京:人民军医出版社,1999.257-258.
- [2] Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, et al. Bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 1995, 55:237-241.
- [3] 庄毅.真菌抗癌药物槐耳颗粒的研制 [J]. *中国肿瘤*, 1999, 8(12):540-543.
- [4] 薛兆祥,朱永泉,沈鸣曙,等.槐耳冲剂治疗恶性肿瘤582例临床分析[J].*中国实用外科杂志*, 1994, 14(6):382.
- [5] 戴妙庆,杨剑兵.槐耳冲剂治疗原发性肝癌26例临床报告[J].*上海中医药杂志*, 1994, (12):40.
- [6] 赵文生.金克联合化疗对复发性非霍奇金淋巴瘤的疗效[J].*中国肿瘤*, 1999, 8(5):237-238.
- [7] 姚亚民,马智勇,赵艳秋.金克冲剂合并化疗治疗非小细胞肺癌41例[J].*中国肿瘤*, 2001, 10(3):184-185.
- [8] 刘星野,周默巍,徐枫,等.金克槐耳颗粒配合FAM方案治疗晚期胃癌38例[J].*浙江肿瘤*, 1999, 5(3):189.
- [9] 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(8):503.
- [10] 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):705-711.
- [11] Oh SJ, Im MY. The p53 mutation which abrogates transactivation while maintaining its growth suppression activity [J]. *Mol Cells*, 2000, 10(4):386-391.
- [12] 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/Sdi1 and bax [J]. *Mol Carcinog*, 1999, 26(1):44-52.
- [13] Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation [J].*Ann N Y Acad Sci*, 2000, 910:121-137, discussion 137-139.