

# 槐耳清膏体外诱导人肝癌细胞 MHCC97H 凋亡

张光军, 郑 起, 袁 周, 王志刚, 黄新余

(上海交通大学医学院附属第六人民医院, 上海 200233)

**摘要:** [目的] 研究槐耳清膏对人肝癌细胞 MHCC97H 凋亡的作用及其机制。[方法] 不同浓度槐耳清膏及 5-Fu 分别与人肝癌细胞 MHCC97H 共同培养, 采用 CCK-8 法、FCM 及荧光显微镜检测细胞增殖与凋亡变化, 细胞免疫组化检测 Bax、Bcl-2 及 p53 基因的表达。[结果] 槐耳清膏在体外可抑制 MHCC97H 细胞的增殖, 诱导 MHCC97H 细胞产生早期凋亡, 且作用具有剂量和时间依赖性。荧光显微镜下细胞呈典型的早期凋亡形态学改变。细胞免疫组化可见 Bax 及 p53 蛋白表达增强, 而 Bcl-2 蛋白表达减少。[结论] 槐耳清膏能明显诱导人肝癌细胞 MHCC97H 凋亡, 其机制可能与改变凋亡相关基因 Bax、Bcl-2、p53 的表达有关。

**关键词:** 槐耳清膏; 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:** 1671-170X(2010)04-0281-04

## Trametes Robiniophila Murr Induced Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma Cell Line MHCC97H

ZHANG Guang-jun, ZHENG Qi, YUAN Zhou, et al.

(Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai School of Medicine, Jiaotong University, Shanghai 200233, China)

**Abstract:** [Purpose] To investigate the effect and mechanism of Trametes robiniophila Murr induced apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line MHCC97H. [Methods] MHCC97H cells were incubated with different dose of Trametes robiniophila Murr or 5-Fu. Cell growth and apoptosis were assessed by CCK-8, flow cytometry (FCM) and fluorescence microscopy. The change of Bax, Bcl-2 and p53 expression were detected by cell immunohistochemistry. [Results] The growth of MHCC97H cells was inhibited and the apoptosis was induced by Trametes robiniophila in vitro in a time/dose-dependent manner. Typical morphological changes of early apoptosis could be observed by fluorescence microscopy. Cell immunohistochemistry showed that the expression of Bax and p53 was upregulated and expression of Bcl-2 was downregulated. [Conclusion] Trametes robiniophila Murr can markedly induce apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line MHCC97H. The mechanism might be related to the change of Bax, Bcl-2 and p53 expression.

**Subject words:** Trametes robiniophila Murr; induce; hepatocellular carcinoma cells; apoptosis

原发性肝癌是最常见的恶性肿瘤之一, 疗效差, 死亡率高。绝大部分中晚期肝癌患者缺乏有效治疗措施。对肝癌采取包括中药在内的综合治疗的疗效明显优于单一治疗。槐耳是我国重要的药用抗肿瘤真菌, 临床研究表明槐耳对原发性肝癌有独特的疗效, 但具体机制尚未明确<sup>[1]</sup>。本研究通过观察槐耳清膏体外对具有高转移潜能的人肝癌细胞株

MHCC97H 凋亡的作用, 以探讨其对原发性肝癌的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株

具有高转移潜能的人肝癌细胞株 MHCC97H (复旦大学肝癌研究所提供), 传代培养于含 10% 胎牛血清的 DMEN 培养液中 (37°C, 5%CO<sub>2</sub>); 取对数生

通讯作者: 郑 起

收稿日期: 2009-12-24; 修回日期: 2010-02-03

长期细胞用于实验。

### 1.2 试剂与仪器

槐耳清膏(江苏盖天力药业有限公司)溶于DMEN培养液中,配成10mg/ml、5mg/ml、1mg/ml、0.1mg/ml,20 $\mu$ m滤膜过滤除菌待用;DMEN培养液(Gibco/Brl公司);胎牛血清(Hyclone公司);5-Fu(上海旭东海普药业有限公司);CCK-8及Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物制品公司);凋亡基因Bax、Bcl-2、p53(上海泰中医疗设备有限公司);VersaMax连续波长酶标仪(美国分子仪器公司);COULTER EPICS XL流式细胞仪(美国贝克曼库尔特有限公司);BX51TF荧光显微镜(日本OLYMPUS公司)。

### 1.3 实验分组

A组为10mg/ml槐耳清膏,B组为5mg/ml槐耳清膏,C组为1mg/ml槐耳清膏,D组为0.1mg/ml槐耳清膏,E组为10mg/L 5-Fu,F组为对照组DMEN。

### 1.4 CCK-8法观察槐耳清膏对MHCC97H的生长抑制作用

MHCC97H细胞计数后制成1 $\times$ 10<sup>8</sup>/L细胞悬液,接种于96孔板,每孔加细胞悬液100 $\mu$ l,培养过夜,按分组情况加入不同浓度的药物,每个浓度设5个复孔,每孔终体积200 $\mu$ l,分别作用24、48、72h后,每孔加入CCK-8 20 $\mu$ l,继续培养4h后于酶标仪上检测450nm处吸光度值(A值),计算细胞抑制率。细胞抑制率=[1-(AX-A)/(A0-A)] $\times$ 100%,AX为加药孔吸光度值,A为空白组吸光度值,A0为对照组吸光度值。CCK-8实验在不同时日重复3次。

### 1.5 流式细胞仪检测MHCC97H凋亡

将1 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞接种于6孔板中,培养24h后,按分组情况加入药物,分别作用24、48、72h后,用不含EDTA的胰酶消化收集1 $\times$ 10<sup>5</sup>~5 $\times$ 10<sup>5</sup>细胞;加入500 $\mu$ l Binding Buffer悬浮细胞;加入5 $\mu$ l Annexin V-FITC混匀,加入5 $\mu$ l Propidium Iodide混匀;室温、避光、反应5~15min后上流式细胞仪进行检测。实验重复3次。

### 1.6 荧光显微镜观察MHCC97H凋亡

消毒好的盖玻片置于6孔板中,将1 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞接种于6孔板,培养24h;按分组情况加入药物作用48h;PBS洗2次;500 $\mu$ l Binding Buffer中加入5 $\mu$ l Annexin V-FITC和5 $\mu$ l Propidium Iodide,混匀;将

上述溶液滴加于盖玻片表面,使盖玻片表面均匀覆盖;将盖玻片倒置于载玻片上,于荧光显微镜下观察。

### 1.7 细胞免疫组化检测凋亡基因Bax、Bcl-2、p53表达

盖玻片置于6孔板中,将1 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞接种于6孔板,培养24h;按分组情况加入药物,作用48h;取出盖玻片,PBS清洗后用4%的多聚甲醛固定30min;0.3%Triton X-100孵育20min;PBS清洗后用3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温孵育5~10min;蒸馏水冲洗,PBS浸泡5min;滴加1:100稀释一抗50 $\mu$ l,4 $^{\circ}$ C冰箱过夜;PBS冲洗后滴加生物素化二抗工作液IgG,37 $^{\circ}$ C孵育15min;PBS冲洗后DAB显色,室温下控制10~15min;PBS冲洗后苏木素复染(检测p53此步省略),常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,50%明胶封片。阴性对照用PBS代替一抗。

### 1.8 统计学处理

各组数据用均数 $\pm$ 标准差表示。采用SPSS11.0软件行t检验或方差分析,P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 槐耳清膏对MHCC97H的生长抑制作用

CCK-8法结果显示(表1、图1)各组吸光度值均随着时间的增加而增大,表明虽有槐耳清膏和5-Fu的作用,细胞数仍在增加,但是随槐耳清膏浓度的增加,细胞的生长速度在降低。槐耳清膏对MHCC97H细胞的抑制作用与其剂量及作用时间呈正相关;高浓度槐耳清膏组(10mg/ml和5mg/ml)对MHCC97H细胞的生长抑制作用明显高于未加任何药物的对照组(P<0.05),但与5-Fu组比较无统计学差异,10mg/ml和5mg/ml浓度组72h抑制率分别为42%和21%。低浓度槐耳清膏组(1mg/ml和0.1mg/ml)对MHCC97H细胞的抑制作用与对照组比较无统计学

表1 各组MHCC97H细胞吸光度值(A450)

组别	24h	48h	72h
5-Fu	1.6468 $\pm$ 0.1941*	1.7672 $\pm$ 0.0895*	1.9488 $\pm$ 0.1698*
槐耳清膏(mg/ml)			
0	1.9142 $\pm$ 0.1470 $\Delta$	2.4646 $\pm$ 0.1424 $\Delta$	3.2378 $\pm$ 0.1244 $\Delta$
0.1	1.8468 $\pm$ 0.2087	2.3128 $\pm$ 0.2580 $\Delta$	3.0382 $\pm$ 0.0877 $\Delta$
1	1.7982 $\pm$ 0.1362	2.1728 $\pm$ 0.2444* $\Delta$	2.8452 $\pm$ 0.1227 $\Delta$
5	1.6853 $\pm$ 0.1770*	2.0094 $\pm$ 0.2582*	2.4527 $\pm$ 1.3156*
10	1.5326 $\pm$ 0.0606*	1.7112 $\pm$ 0.2200*	1.9388 $\pm$ 0.1361*

\*:与槐耳清膏0mg/ml组比较,P<0.05; $\Delta$ :与5-Fu组比较,P<0.05。

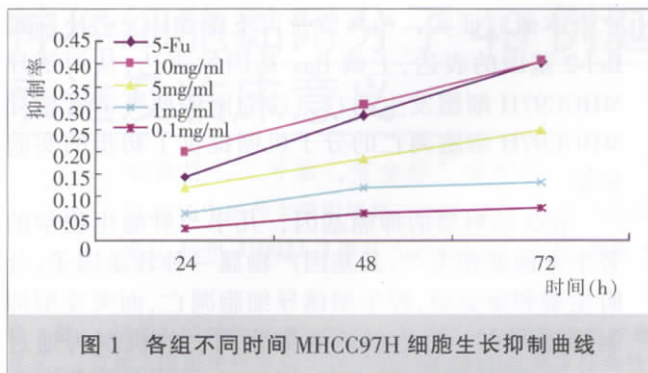


图1 各组不同时间 MHCC97H 细胞生长抑制曲线

差异。

## 2.2 流式细胞仪检测 MHCC97H 凋亡

随着槐耳清膏浓度或作用时间的增加, MHCC97H 细胞的凋亡诱导作用也逐步增加, 呈现明显的剂量/时间正向依赖关系。高浓度槐耳清膏组(10mg/ml 和 5mg/ml)的凋亡率与对照组相比有显著性差异( $P < 0.05$ ), 但与 5-Fu 组比较无显著性差异, 其中 A 组的 72h 凋亡率甚至高于 5-Fu 组(表 2)。

## 2.3 荧光显微镜观察 MHCC97H 凋亡

Annexin V-FITC 荧光信号呈绿色, PI 荧光信号呈红色。10mg/ml 组及 5mg/ml 组可见明显绿色荧光信号, 提示高浓度槐耳清膏可诱导 MHCC97H 细胞出现早期凋亡; 而对照组可见大量红色荧光信号, 提示 MHCC97H 细胞出现晚期凋亡或坏死(图 2)。

## 2.4 槐耳清膏对 MHCC97H 细胞中 Bax、Bcl-2、p53 表达的影响

Bax、Bcl-2、p53 免疫组化阳性反应为黄色到棕褐色, 其中 Bax 及 Bcl-2 定位于胞浆, 亦可见于胞膜和核膜; p53 定位于细胞核。采用半定量计数方法, 根据阳性细胞在全部组织细胞中所占比例以及阳性细胞染色强度判定实验结果。A: 按显色细胞数记分, 阳性细胞数  $< 1/3$  为 1 分, 阳性细胞数  $1/3 \sim 2/3$  为 2 分, 阳性细胞数  $\geq 2/3$  为 3 分; B: 按细胞显色深浅记分, 无阳性反应细胞为 0

分, 浅黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分; 积分数 =  $A \times B$ , 0 判断为 (-), 1~2 判断为 (+), 3~4 判断为 (++) , 6~9 判断为 (+++)。

免疫组化显示(表 3、图 3)MHCC97H 细胞经高浓度槐耳清膏作用后, 可见胞浆或细胞核中 Bax 或

表 2 各组诱导 MHCC97H 凋亡率(%)

组别	24h	48h	72h
5-Fu	15.45±1.34 <sup>△</sup>	38.87±1.62 <sup>△</sup>	51.68±2.27 <sup>△</sup>
槐耳清膏(mg/ml)			
0	1.04±0.65*	5.46±0.64*	8.95±1.07*
0.1	2.27±1.25 <sup>△</sup>	7.61±1.18 <sup>△</sup>	24.18±1.42* <sup>△</sup>
1	3.78±1.22 <sup>△</sup>	21.37±1.28* <sup>△</sup>	35.88±1.58* <sup>△</sup>
5	7.96±1.09*	31.93±1.76*	36.37±1.47* <sup>△</sup>
10	18.67±1.14*	42.20±2.09*	69.50±2.81* <sup>△</sup>

\*: 与槐耳清膏 0mg/ml 组比较,  $P < 0.05$ ;  $\Delta$ : 与 5-Fu 组比较,  $P < 0.05$ 。

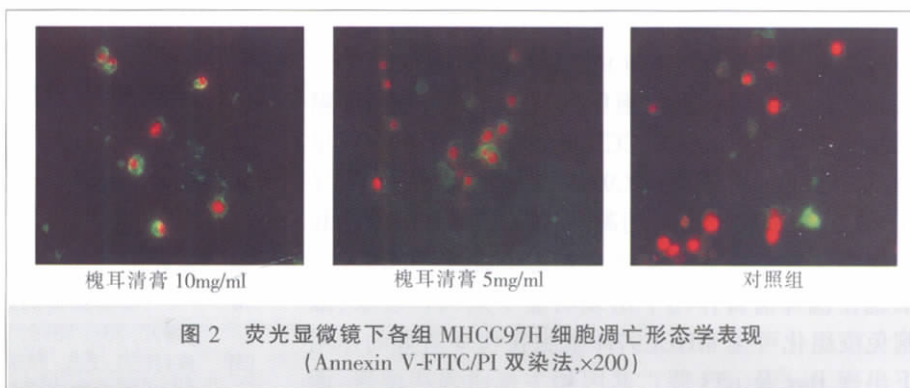


图 2 荧光显微镜下各组 MHCC97H 细胞凋亡形态学表现 (Annexin V-FITC/PI 双染法,  $\times 200$ )

表 3 不同浓度槐耳清膏对 MHCC97H 细胞中 Bax、Bcl-2、p53 表达的影响

药物浓度(mg/ml)	Bax	Bcl-2	p53
10	+++	+	+++
0	+	+++	+

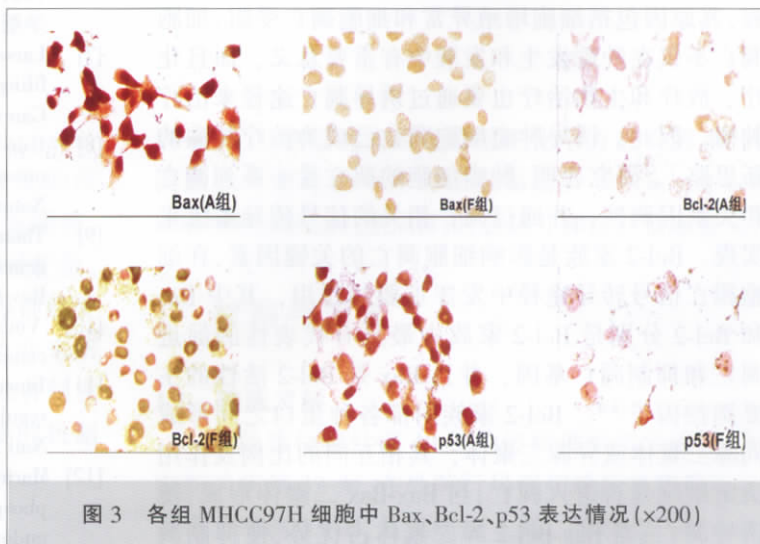


图 3 各组 MHCC97H 细胞中 Bax、Bcl-2、p53 表达情况 ( $\times 200$ )

p53 (棕黄色颗粒, 染色深) 大量表达, Bcl-2 表达很少, 而对照组中可见 Bcl-2 明显表达; 提示槐耳清膏可上调 MHCC97H 细胞 Bax 及 p53 表达, 并下调 Bcl-2 表达。

### 3 讨论

槐耳是我国民间重要的药用抗肿瘤真菌, 味苦辛, 性平无毒, 有“治风”、“破血”、“益力”的功效; 其主要成分是槐耳多糖蛋白(简称 PS-T), 由 6 种单糖(含量为 41.53%)和 18 种氨基酸(含量为 12.93%)组成<sup>[2]</sup>。临床上已应用槐耳治疗各种肿瘤, 包括肝癌、乳腺癌、胃癌、结肠癌等, 提示槐耳能提高 Karnofsky 评分、减少化疗毒副作用、提高 5 年生存率。

本实验将槐耳清膏在体外作用于具有高转移潜能的人肝癌细胞株 MHCC97H, 采用 CCK-8 法、流式细胞仪、荧光显微镜、细胞免疫组化等方法检测肝癌细胞的变化。实验发现: CCK-8 法及流式细胞仪可见槐耳清膏能抑制 MHCC97H 细胞的生长并诱导 MHCC97H 细胞产生早期凋亡, 其作用具有剂量和时间相关性; 荧光显微镜从形态上证实 MHCC97H 细胞在槐耳清膏作用下出现明显早期凋亡现象; 细胞免疫组化可见 MHCC97H 细胞在槐耳清膏的作用下出现 Bax 及 p53 凋亡基因相关蛋白表达增强, 而 Bcl-2 凋亡基因相关蛋白表达减少, 以上结果充分表明, 槐耳清膏在体外能诱导肝癌细胞凋亡。研究表明槐耳清膏也可诱导 A549 肺癌细胞、HR8348 直肠癌细胞、K562 白血病细胞、SGC-7901 胃癌细胞等其他肿瘤细胞产生凋亡<sup>[3-6]</sup>。

肿瘤的发生和发展是细胞无限制过度累积的过程, 其原因包括细胞增殖异常和细胞凋亡受阻; 细胞凋亡不仅在肿瘤发生和发展中有重要意义, 而且化疗、放疗和生物治疗也要通过诱导凋亡途径来治疗肿瘤。因此, 诱导肿瘤细胞凋亡已成为治疗肿瘤的新思路<sup>[7]</sup>。研究表明, 肿瘤细胞的凋亡受一系列凋亡相关基因调控, 并通过凋亡相关的信号传导系统来实现。Bcl-2 家族是影响细胞凋亡的关键因素, 在细胞凋亡信号转导途径中发挥重要的作用, 其中 Bax 和 Bcl-2 分别是 Bcl-2 家族中最具有代表性的促进凋亡和抑制凋亡基因, 并且 Bax 是 Bcl-2 活性的主要调控因子<sup>[8,9]</sup>。Bcl-2 家族内部各种蛋白之间形成同源二聚体或异源二聚体, 其相互间的比例及作用决定细胞是否进入凋亡; 当 Bax-Bax 二聚体形成, 便诱导凋亡; 当 Bax-Bcl-2 异二聚体占优势, 便抑制凋

亡。本研究证实, 槐耳清膏可下调 MHCC97H 细胞 Bcl-2 基因的表达, 上调 Bax 基因的表达, 从而诱导 MHCC97H 细胞发生凋亡, 这为阐明槐耳清膏诱导 MHCC97H 细胞凋亡的分子机制提供了初步的实验依据。

p53 是典型的抑癌基因, 几乎与肿瘤生物学的各个方面都相关<sup>[10]</sup>; 其基因产物属一种转录因子, 分野生型和突变型, 野生型诱导细胞凋亡, 而突变型抑制细胞凋亡。野生型诱导细胞凋亡的机制为通过 cyclinB<sub>1</sub> 调控着 G<sub>2</sub> 检查点, 使 DNA 受损细胞停滞于 G<sub>1</sub> 期并启动凋亡<sup>[11]</sup>; 通过调控 Bcl-2, 抑制 Bcl-2 基因的转录, 从而促进细胞凋亡<sup>[12]</sup>。本研究发现, 经过槐耳清膏处理的 MHCC97H 细胞其 p53 基因相关蛋白表达明显增强。由此推测, p53 蛋白水平的增加对于 MHCC97H 细胞的凋亡和 G<sub>2</sub>/M 期阻滞发挥着重要的作用, 槐耳清膏可能通过上调 p53 基因的表达从而诱导 MHCC97H 细胞凋亡。

### 参考文献:

- [1] 蒋梅, 周岱翰. 槐耳冲剂治疗中晚期原发性肝癌 98 例 [J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(6): 21-22.
- [2] 郭跃伟, 程培元, 陈玉俊, 等. 槐耳菌丝体多糖的研究 (I): 槐耳多糖的组成及摩尔比测定 [J]. 中国药科大学学报, 1992, 23(3): 155-157.
- [3] 黄涛, 孔庆志, 卢宏达, 等. 槐耳清膏诱导人肺癌细胞 A549 凋亡的实验研究 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(8): 503.
- [4] 程若川, 汤礼贵, 兰丽零, 等. 槐耳清膏诱导人直肠癌 HR8348 细胞凋亡的实验研究 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2003, 10(6): 568-571.
- [5] 王运玉, 吴柱国. 槐耳清膏对 K562 细胞体外作用研究 [J]. 中国少儿血液与肿瘤杂志, 2008, 13(3): 104-107.
- [6] 吴志慧, 蒋建伟, 曹明溶, 等. 槐耳清膏诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的实验研究 [J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2009, 29(4): 370-373.
- [7] Larsen JE, Pavey SJ, Passmore LH, et al. Expression profiling defines a recurrence signature in lung squamous [J]. Carcinogenesis, 2007, 28(3): 760-766.
- [8] Guo B, Zhai D, Cabezas E, et al. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation [J]. Nature, 2003, 423(6938): 456-461.
- [9] Thomadaki H, Scorilas A. Bcl2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2006, 43(1): 1-67.
- [10] Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53 [J]. Cell, 2009, 137(3): 413-431.
- [11] Innocente SA, Abrahamson JL, Cogswell JP, et al. p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(5): 2147-2152.
- [12] Maruyama T, Yamamoto Y, Sakai N, et al. Protein tyrosine phosphorylation signaling in the differentiation of human endometrial stromal cells [J]. Keio J Med, 2002, 51(2): 93-99.