

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110303. 1349. 007

小半夏加茯苓方含药血清抑制 HepG2 细胞增殖及促进凋亡

杨长福, 冯泳*, 何前松
(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 采用血清药理学的方法, 观察小半夏茯苓方对肝癌 HepG2 细胞增殖的影响, 初步探索该方诱导肝癌细胞凋亡相关因子表达的影响。方法: 制备含药血清, 正常实验用动物 Wistar 大鼠, 采用灌胃或腹腔注射给药途径, 连续给药 3 d, 其中, 正常对照组, 灌服生理盐水; 环磷酰胺 (CTX) 组, 腹腔注射 CTX; 原方汤剂组, 灌服小半夏加茯苓汤; 原方汤剂加 CTX 组, 灌服小半夏加茯苓汤的同时腹腔注射 CTX; 颗粒剂高中剂量组, 灌服相当于小半夏加茯苓汤等量、二倍量的颗粒剂, 末次给药后 12 h, 腹主静脉取血, 制备含药血清, 刺激体外培养的 HepG2 肝癌细胞, 采用 MTT 法检测其对细胞增殖抑制的影响, 流式细胞术检测其对各时相细胞周期分布, 免疫组织化学的方法观察其对凋亡相关蛋白半胱天冬酶-3 (caspase-3)、半胱天冬酶-9 (caspase-9) 的影响。结果: 小半夏加茯苓方能抑制人肝癌 HepG2 细胞的生长, 在作用 24 h 时效果最明显。流式检测结果显示, 药物作用细胞 24 h, 小半夏加茯苓方阻滞细胞于 S 期, 环磷酰胺将细胞阻滞于 G₂ 期。小半夏加茯苓方作用 24 h 能诱导 HepG2 细胞的凋亡, caspase-3 表达与药物的剂量呈正相关。结论: 小半夏加茯苓方可能通过激活 caspase-3 蛋白表达, 从而诱导肝癌细胞凋亡, 阻滞细胞周期于 S 期, 有效抑制细胞增殖, 发挥抗肿瘤的作用。

[关键词] 小半夏加茯苓汤; HepG2; 细胞凋亡; 半胱天冬酶-3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2011)08-0168-04

Serum Containing Xiaobanxia Plus Fuling Formulas Inhibits Proliferation of Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cell and Induces its Apoptosis

YANG Chang-fu, FENG Yong*, HE Qian-song
(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of the serum containing Xiaobanxia plus Fuling formulas on the proliferation of human hepatoma carcinoma HepG2 cell and on the expression of apoptosis associated factors in HepG2. **Method:** The effects of Xiaobanxia plus Fuling formulas on the proliferation of HepG2 were determined by MTT assay. The cell cyclic retardation was examined by using flowcytometry. Immunohistochemistry was used to detect the expression of caspase-3 and caspase-9 in the level of protein. **Result:** MTT showed that Xiaobanxia plus Fuling formulas had an inhibitory effect on the proliferation of HepG2 cells, and the effect was best at 24 h than that at other time. The cell cycle analysis showed that Xiaobanxia plus Fuling formulas increased the percentage of S phase cells, and cyclophosphamide (CTX) reduced the percentage of G₂ phase cells in 24 hour. The results of the immunohistochemistry demonstrated the expression of caspase-3 was increased with dose-time dependent. **Conclusion:** The serum containing Xiaobanxia plus Fuling decoction has a

[收稿日期] 20101014(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960472); 贵州省优秀科技教育人才省长基金项目[黔省专合字(2006)50号]; 贵州省中药现代化资助项目[黔科合社字(2008)5025号]

[第一作者] 杨长福, 讲师, 从事中医药抗肿瘤机制研究, E-mail: yangchangfu@126.com

[通讯作者] * 冯泳, 教授, 硕导, 主要从事中药复方配伍规律研究, E-mail: fy668@sina.com

[网络出版时间] 2011-03-03 13:49

significant inhibitory effect on the proliferation of HepG2. The mechanism of inducing cell apoptosis may be related with increasing in the level of caspase-3.

[Key words] Xiaobanxia plus Fuling formulas; HepG2; apoptosis; caspase-3

小半夏加茯苓颗粒是《金匱要略》中经典止呕方剂小半夏加茯苓汤为顺应中药制剂携带及服用方便发展而来的改良剂型,既往研究表明该方止呕的效应物质为生物碱类成分,在防治顺铂诱发的家鸽实验性呕吐作用显著^[1-2]。近年,围绕半夏抗肿瘤的研究日趋活跃,亦取得了一定的成果,前期研究表明小半夏加茯苓颗粒含药血清能明显的抑制体外培养的肝癌 SMMC-7721 细胞增殖^[3],为进一步阐明其可能的作用途径,本研究拟用该方对肝癌 HepG2 进行体外活性筛选。

1 材料

1.1 动物 健康 Wistar 大鼠 60 只,体重(200 ± 10) g,雌雄各半,清洁级,合格证号 SCXK(京)2009-0007,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供。

1.2 细胞培养 肝癌细胞株(HepG2)由中国医学科学院细胞基础研究所提供,常规传代于含 10% 小牛血清 MEM 培养基,37 °C 5% CO₂ 及饱和湿度条件孵箱中培养。

1.3 药物制备 小半夏加茯苓汤:由半夏 18 g,生姜 15 g,茯苓 9 g 组成,按照传统方法水煎浓缩,使成 1 mL 含生药 1 g,药材由北京同仁堂有限公司提供。小半夏加茯苓颗粒:由贵阳中医学院制剂研究中心提供,1 g 颗粒剂相当于 1 g 生药量,临用前加蒸馏水溶解。

1.4 药物与试剂 环磷酰胺注射剂(CTX):购自江苏恒瑞医药股份有限公司(批号 07051121,临用前用生理盐水配制成 20 g·L⁻¹ 无菌注射液);MEM 培养液:美国 Gibco 公司产品;小牛血清(FCS):杭州四季青生物工程材料公司;四甲基偶氮唑盐法(MTT)试剂购自 Sigma 公司;碘化丙啶(PI)、RNase A 为 Amersco 公司产品;半胱天冬酶-3(caspase-3, sc-7272),半胱天冬酶-9(caspase-9, sc-8355) 美国 Santa cruz 公司产品;免疫组化试剂盒(批号 PV-9001)、DAB 试剂盒(批号 ZLI-9017)购自北京中杉金桥生物有限公司。

1.5 主要仪器 流式细胞仪(BD 公司),全波长荧光酶标仪(TECAN 公司),荧光倒置显微镜(Olympus)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 参照冯泳等^[3]的方法,略加改进,60 只健康 Wistar 大鼠,适应性饲养 1 周后随机分为小半夏加茯苓汤组(以下简称原方汤)、小半夏加茯苓颗粒大剂量组(以下简称颗粒大剂量组)、小半夏加茯苓颗粒中剂量组(以下简称颗粒中剂量组)、小半夏加茯苓汤与环磷酰胺组(以下简称原方汤 + CTX 组)、生理盐水对照组(以下简称对照组)、环磷酰胺(CTX)组(以下简称 CTX 组),每组 10 只,按如下方法给药:①原方汤组:每日分 2 次 ig 小半夏加茯苓汤药液(20 g·kg⁻¹·d⁻¹);②颗粒大剂量组:每日分 2 次 ig 小半夏加茯苓颗粒水溶液(20 g·kg⁻¹·d⁻¹);③颗粒中剂量组:每日分 2 次 ig 小半夏加茯苓颗粒水溶液(10 g·kg⁻¹·d⁻¹);④原方汤 + CTX 组:每日分 2 次 ig 小半夏加茯苓汤药液(20 g·kg⁻¹·d⁻¹),同时,ip 环磷酰胺注射液(50 mg·kg⁻¹·d⁻¹);⑤对照组:每日分 2 次 ig 等量的生理盐水。⑥CTX 组:ip 环磷酰胺注射液(50 mg·kg⁻¹·d⁻¹),每日 1 次。连续给药 3 d,末次给药 1 h 后大鼠腹主动脉取血。血样于 4 °C 静置过夜,1 000 r·min⁻¹ 低速离心分离血清,同组血清混合,56 °C,30 min 补体灭活处理,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,分装, -20 °C 冰箱保存,1 个月内使用。

2.2 HepG2 细胞处理 取对数生长期细胞进行实验,弃培养液,PBS 洗 2 遍,0.25% 胰酶消化,10% 小牛血清 MEM 培养液重悬细胞,调整细胞至实验要求密度,分别接种于无菌 96 孔培养板(2.5 × 10⁴ 个/mL,每孔 200 μL)或 6 孔培养板(4 × 10⁵ 个/mL,每孔 2.5 mL)中,贴壁生长 24 h 后,弃培养液,PBS 洗 2 遍,加入 1% 小牛血清 MEM 培养液,使细胞同步 24 h。去除培养液,换入含 10% 药物血清的条件培养液。

2.3 药物血清对 HepG2 细胞形态学的影响 实验条件及分组同 2.2,细胞培养 24 h 后在倒置显微镜下阅片,拍照。

2.4 药物血清对 HepG2 细胞增殖的影响 实验条件及分组同 2.2,每组设 6 个复孔,加入各组含药血清刺激细胞,分别于 12,24,48 h 各取出 1 块培养板,

加入 MTT 溶液($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) $20 \mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 继续培养 4 h 以上, 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 $200 \mu\text{L}$ DMSO, 室温振荡 10 min, 于酶标仪 570 nm 波长处测定各孔吸光度(A)。

2.5 药物血清对 HepG2 细胞周期的影响 取对数生长期的 HepG2 细胞, 照 2.2 项下方法处理细胞, 换入含 10% 药物血清的条件培养液培养 24 h 后 70% 乙醇 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 固定过夜, RNase A 处理, PI 避光染色, 1 h 内上流式细胞仪检测细胞周期分布, 实验重复 3 次。

2.6 药物血清对 HepG2 细胞凋亡蛋白 caspase-3, caspase-9 的影响 取对数生长期的 HepG2 细胞, 以每孔 5×10^4 个接种于 24 孔板中, 照 2.2 项下方法处理细胞, 换入含 10% 药物血清的条件培养液继续培养 24 h。去除培养液, PBS 洗 2 遍, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 室温晾干, 0.01% Triton X-100 透膜, 3% 过氧化氢去除内源性过氧化物酶, 一抗 caspase-3, caspase-9 (1:150) 标记 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, 二抗结合, DAB 显色, 苏木素复染, 透明, 封片。阳性染色为胞浆棕色颗粒, 阴性对照以 PBS 替代一抗。获取图像后, 用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件测量每个视野染色后的着色强度, 每个样本随机取 5 个视野, 取均值代表该组蛋白表达强度。

2.7 统计分析 试验结果用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 LSD 法, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 小半夏加茯苓方对 HepG2 细胞形态的影响及

抑制增殖 各组含药血清处理细胞 24 h 后, 其边界清晰, 生长紧密, 但单位面积内细胞数目, 随小半夏加茯苓颗粒剂量的增加而减少。与正常组相比, 小半夏加茯苓颗粒中剂量、小半夏加茯苓汤组细胞密度变化不明显, 小半夏加茯苓颗粒大剂量组、小半夏加茯苓汤与 CTX 组、CTX 组细胞数明显减少, 且有数目不等的漂浮样细胞; 小半夏加茯苓汤、小半夏加茯苓汤与 CTX 组有空泡样细胞。

3.2 小半夏加茯苓方抑制 HepG2 细胞增殖 小半夏加茯苓方对 HepG2 细胞增殖有不同程度的抑制作用(表 1), 在 24 h 时获得最佳抑制效果。与对照组相比, 其中, 颗粒大剂量组抑制 HepG2 细胞增殖起效快, 作用效果在 12 h 时就呈现($P < 0.05$); 小半夏加茯苓汤和 CTX 组抑制 HepG2 细胞增殖效果维持时间长。

3.3 含药血清对 HepG2 细胞周期分布的影响 流式细胞术 PI 染色结果显示, 药物血清作用 HepG2 细胞 24 h 后, 与正常组相比, 小半夏加茯苓颗粒组阻滞细胞于 S 期; 环磷酰胺及原方汤加环磷酰胺组主要通过减少 G_1 期细胞分布; 原方汤加环磷酰胺组 G_1 期细胞显著减少($P < 0.05$), 环磷酰胺组 G_1 期细胞极显著减少($P < 0.01$), 将细胞周期阻滞于分裂间隙期。环磷酰胺组 G_2 期细胞分布显著增加($P < 0.01$), 原方汤加环磷酰胺组 G_2 期细胞分布亦增加, 但无统计学意义。各组细胞均存在不同程度的凋亡, 见表 2。

3.4 小半夏加茯苓汤激活 caspase-3 介导的细胞凋亡途径 细胞免疫化学结果表明, 小半夏加茯苓方

表 1 小半夏加茯苓方 10% 含药血清作用不同时间对 HepG2 细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	药物剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	12 h	24 h	48 h
对照	-	0.173 1 \pm 0.007 4	0.186 0 \pm 0.014 9	0.408 7 \pm 0.053 3
原方汤	20	0.188 7 \pm 0.020 7	0.140 5 \pm 0.021 5 ³⁾	0.349 0 \pm 0.052 5 ²⁾
小半夏加茯苓方颗粒	10	0.161 0 \pm 0.014 1	0.141 4 \pm 0.016 0 ³⁾	0.376 0 \pm 0.028 4
	20	0.140 8 \pm 0.007 7 ¹⁾	0.134 9 \pm 0.021 4 ³⁾	0.376 2 \pm 0.037 7
原方汤 + CTX	20 + 0.05	0.173 4 \pm 0.013 4	0.155 3 \pm 0.017 7 ³⁾	0.387 6 \pm 0.016 5
CTX	0.05	0.168 0 \pm 0.005 8	0.155 3 \pm 0.012 4 ³⁾	0.304 7 \pm 0.020 1 ²⁾

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ (表 2~3 同)。

表 2 小半夏加茯苓方 10% 含药血清影响 HepG2 细胞周期分布 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	药物剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期	凋亡率 %
对照	-	58.14 \pm 5.68	20.20 \pm 2.19	21.66 \pm 4.51	6.58 \pm 1.11
原方汤	20	60.44 \pm 1.19	17.74 \pm 2.49 ²⁾	21.82 \pm 6.29	6.79 \pm 3.30
小半夏加茯苓方颗粒	10	57.29 \pm 5.93	22.68 \pm 0.86	20.04 \pm 6.37	6.94 \pm 1.41
	20	55.58 \pm 5.23	23.48 \pm 3.82	20.94 \pm 4.89	6.58 \pm 3.44
原方汤 + CTX	20 + 0.05	54.80 \pm 6.13 ¹⁾	21.07 \pm 3.15	24.12 \pm 3.92	4.05 \pm 3.82
CTX	0.05	52.73 \pm 0.80 ²⁾	20.36 \pm 2.30	26.90 \pm 1.59 ²⁾	4.60 \pm 0.46

参与 caspase-3, caspase-9 介导的凋亡。与正常组相比,原方汤组、颗粒剂大剂量组处理的细胞 caspase-3 高表达,具有统计学意义 ($P < 0.01$);环磷酰胺组、颗粒剂中剂量组处理的细胞 caspase-3 表达下调但无统计学意义;原方汤加环磷酰胺组细胞中, caspase-3 显著下降。caspase-9 在原方汤组、颗粒剂中剂量组及原方汤加环磷酰胺组细胞中高表达,在环磷酰胺处理的细胞中显著下调 ($P < 0.01$),在颗粒剂大剂量中无明显变化(表 3)。

表 3 小半夏加茯苓方 10% 含药血清对 HepG2 细胞凋亡相关因子表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$) (A)

组别	药物剂量 /g·kg ⁻¹	caspase-3	caspase-9
对照	-	363.47 ± 133.65	6 767.03 ± 491.13
原方汤	20	1461.06 ± 396.88 ³⁾	11 876.57 ± 435.63 ¹⁾
小半夏加茯苓方颗粒	10	278.65 ± 69.37	9 649.57 ± 634.72 ¹⁾
	20	869.56 ± 129.34 ²⁾	5 554.36 ± 350.62
原方汤 + CTX	20 + 0.05	34.94 ± 7.79 ³⁾	13 839.29 ± 983.72 ³⁾
CTX	0.05	215.09 ± 125.14	629.25 ± 31.31 ³⁾

4 讨论

肝癌是常见的恶性肿瘤,恶性程度高、病情进展快,到确诊时往往已处于中晚期,错过手术的最佳期。因此,临床上内科药物治疗在肝癌的治疗中仍具有非常重要的作用。但放化疗药物在杀死肿瘤细胞的同时亦导致正常组织和细胞的损害。中医中的水湿痰饮属肿瘤的范畴。源于《金匱要略》的小半夏加茯苓汤,主治痰饮所致的呕眩悸证,在临床将其作为肿瘤辅助药物用于放化疗药物引起的呕吐症状。研究表明,方中的半夏、生姜、茯苓均有抑制肿瘤的作用,既往的研究亦证明,3 药合用(即小半夏加茯苓方)能抑制体外培养肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖^[3]。本研究亦证实,小半夏加茯苓方能抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖,与正常组相比,各组作用 24 h 时效果最明显;当培养时间为 48 h 时,与正常组相比,仅有原方汤组和 CTX 组能显著抑制细胞增殖 ($P < 0.05$)。流式细胞术结果表明,小半夏加茯苓方能阻滞 HepG2 细胞于 S 期,环磷酰胺影响细胞周期分布主要是将细胞阻滞于 G₂ 期。

细胞凋亡是由基因调控的主动的细胞自我消亡的过程,需要多分子参与,其中, caspase 酶家族的激活在凋亡事件中起着关键的作用,研究表明^[4-5],处于枢纽地位的 caspase-3 因子作为凋亡的效应器参

与肿瘤细胞凋亡,是引起细胞凋亡的执行酶之一^[6]。caspase-3 的活化引发下游级联放大效应,染色质凝集, DNA 片段化及细胞出现空泡等凋亡特有的形态特征。小半夏加茯苓方作用 24 h 能诱导人肝癌 HepG2 细胞的凋亡,且与血清中药物的剂量呈正相关。

在 caspase 级联反应中的作用和活化先后, caspase-9 属于上游的启动酶,活化的启动酶可直接激活效应性的 caspase-3 触发凋亡途径的其他信号分子,发生凋亡。本研究表明,小半夏加茯苓方作用人肝癌 HepG2 细胞后,原方汤组和颗粒剂小剂量组 caspase-9 表达增加,但活化的 caspase-9 与表达增加的 caspase-3 不存在级联效应,提示小半夏加茯苓方诱导 HepG2 细胞凋亡是否通过启动细胞色素 C 介导的凋亡途径^[7] 仍需进一步研究。

综上,本研究表明小半夏加茯苓方能抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖,其可能机制是阻滞细胞分裂、诱导细胞凋亡途径而实现的,且存在一定程度的时间-剂量依赖性。

[参考文献]

- [1] 刘文,冯泳.小半夏加茯苓汤中药效物质的正交试验筛选[J].中草药,2005,35(1):51.
- [2] 何前松,冯泳,时京珍,等.小半夏加茯苓颗粒抗顺铂所致家鸽呕吐的药效学观察[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(4):209.
- [3] 冯泳,孟庆华,何前松,等.小半夏加茯苓颗粒含药血清体外对肝癌细胞 SMMC-7721 生长增殖影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(5):51.
- [4] Woo H J, Lee S J, Choi B T, et al. Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity by trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, in human leukemic U937 cells [J]. Exp Mol Pathol, 2007, 82(1): 77.
- [5] Lu Y, Wu L Q, Wang S G et al. Caspase-3 gene transfected with LIGHT gene: can it be used for therapy of human hepatocellular carcinoma [J]. Clin Chem Lab Med, 2008, 26: 1 322.
- [6] 侯颖,曹蔚,李涛,等.氧化苦参碱诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的可能机制[J].第二军医大学学报,2008,29(6):634.
- [7] Suzuki K, Hasegawa T, Sakamoto C, et al. Cleavage of mitogen-activated protein kinases in human neutrophils undergoing apoptosis: role in decreased responsiveness to inflammatory cytokines [J]. J Immunol, 2001, 166(2):1185.

[责任编辑 聂淑琴]