

四藤方对 Bel-7402 细胞增殖和凋亡作用研究

沈克平, 胡兵*, 刘威

(上海中医药大学附属龙华医院肿瘤五科, 上海 200032)

[摘要] 目的: 观察清热解毒中药-四藤方对肝癌细胞 Bel-7402 增殖和凋亡的影响。方法: 不同浓度四藤方处理人肝癌细胞 Bel-7402、人肝细胞 HL-7702, WST-8 法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡, Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡形态变化, Western Blot 法检测半胱天冬酶-3(caspase-3) 活化。结果: 与对照组比较, 四藤方对人肝细胞 HL-7702 增殖无明显影响; 100 ~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 四藤方作用 24 h 可显著抑制肝癌 Bel-7402 细胞增殖, 促使细胞 Bel-7402 凋亡, 呈现细胞凋亡形态, 并可活化 Bel-7402 细胞 caspase-3。结论: 四藤方可以抑制 Bel-7402 细胞增殖, 促 Bel-7402 细胞凋亡, 并可能与活化 caspase-3 相关。

[关键词] 肝癌细胞; 四藤方; 增殖; 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)03-0120-04

Effects of Siteng Fang on Proliferation and Apoptosis in Bel-7402 Cells *in vitro*

SHEN Ke-ping, HU Bing*, LIU Wei

(The 5th Department of Oncology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 20032, China)

[收稿日期] 20100823(008)

[基金项目] 国家自然科学基金(30873258); 上海市基础研究重点项目(09JC1413600); 上海市浦东新区中医领军型人才项目(PWZ2008-20-104); 上海市级医院临床科研资源共享平台(SHDC12007206)

[第一作者] 沈克平, 学士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 中医药治疗消化道肿瘤临床与基础, Tel: 021-58835753, E-mail: sher0313@163.com

[通讯作者] * 胡兵, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤生物学、功能基因组与抗癌中药作用及配伍, Tel: 021-58835753, E-mail: bearhu@hotmail.com

- [4] Zaheer A, Sahu S K, Wu Y H, et al. Diminished cytokine and chemokine expression in the central nervous system of GMF-deficient mice with experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Brain Res, 2007, 1144: 239.
- [5] Ghezzi P, Mennini T. Tumor necrosis factor and motoneuronal degeneration: An open problem [J]. Neuroimmunomodulation, 2001, 9(4): 178.
- [6] Tan Y V, Abad C, Lopez R, et al. Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide is an intrinsic regulator of Treg abundance and protects against experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(6): 2012.
- [7] Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Immunol, 2006, 177(1): 566.
- [8] Lalive P H, Paglinawan R, Biollaz G, et al. TGF-beta-treated microglia induce oligodendrocyte precursor cell chemotaxis through the HGF-c-Met pathway [J]. Eur J Immunol, 2005, 35(3): 727.
- [9] Bettelli E, Carrier Y J, Gao W D, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells [J]. Nature, 2006, 441(7090): 235.
- [10] Harrington L E, Hatton R D, Mangan P R, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages [J]. Nat Immunol, 2005, 6(11): 1123.
- [11] Graber J J, Allie S R, Mullen K M, et al. Interleukin-17 in transverse myelitis and multiple sclerosis [J]. J Neuroimmunol, 2008, 196(1/2): 124.
- [12] Zhao C B, Coons S W, Cui M, et al. A new EAE model of brain demyelination induced by intracerebroventricular pertussis toxin [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 370(1): 16.

[责任编辑 聂淑琴]

[Abstract] Objective: To observe the effects of Siteng Fang (STF), a Chinese herb formula, on proliferation and apoptosis in hepatocarcinoma Bel-7402 cells *in vitro*. **Method:** Human hepatocarcinoma Bel-7402 cells and human normal liver HL-7702 cells were treated with different dose of STF. Cell proliferation was detected with CCK-8 (cell counting kit-8, CCK-8) assay; cell apoptosis was detected by flow cytometry. Apoptotic morphology was visualized by hoechst 33258 staining, and activation of caspase-3 was detected by western blot assay. **Result:** STF showed no obvious cytotoxicity against normal liver HL-7702 cells. Upon treatment with 100-400 mg·L⁻¹ STF for 24 h, proliferation of Bel-7402 cells was significantly inhibited. 100-400 mg·L⁻¹ STF also induced apoptosis in Bel-7402 cells. In addition, caspase-3 was activated after 100-400 mg·L⁻¹ STF treatment. **Conclusion:** STF may inhibit cell proliferation, and induce apoptosis in Bel-7402 hepatocarcinoma cells. Activation of caspase-3 may be involved in the process.

[Key words] hepatocarcinoma cell; Siteng Fang; proliferation; apoptosis; caspases-3

原发性肝癌(简称肝癌)是我国最常见恶性肿瘤之一,起病隐匿,进展迅速,治疗疗效不尽人意,预后差;中医药治疗在控制肝癌病情发展、改善生存质量、延长生存期等方面取得一定的成效,中医药已广泛应用于肝癌手术、介入、射频治疗等综合治疗中的各个环节,以及中晚期肝癌的单独治疗^[1-2]。肝癌临床可见热证证型^[3-4],清热解毒是中医肝癌临床常用治法。四藤方是龙华医院肿瘤科临床常用清热解毒药对,原为邱佳信教授抗癌验方胃肠安方中主要祛邪中药,一直作为主要抗癌药对用于胃癌等消化道恶性肿瘤的治疗^[5],也用于肝癌的临床治疗,本研究在肝癌细胞模型中观察了四藤方的抗癌作用及可能机制。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌细胞 Bel-7402,人肝细胞 HL-7702,购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 试剂 CCK8(cell counting kit-8,货号 CK04),试剂购自日本 Dojindo 公司;RPMI1640(货号 SH30809.01B);胎牛血清(货号 SV30087.02),购自美国 Hyclone 公司;碘化吡 (propidium iodide, PI)(货号 P4170-10MG),RNase A(货号 R6513-10MG),购自美国 Sigma Aldrich 公司;caspase-3 抗体(货号 9662),美国 Cell Signaling Technology 公司;其余为国产试剂。

1.3 仪器设备 培养箱,美国 NUAIRE 产品;流式细胞仪,美国 Becton Dickinson 产品;倒置显微镜,日本 Nikon 产品;酶标仪,美国 Thermo 产品。

1.4 中药制备 四藤方由红藤、野葡萄藤、菝葜、藤梨根组成,按等比例配方,中药由龙华医院中药房提

供,由龙华医院药剂科许丽雯副主任药师鉴定;中药常规浸泡 30 min,煎煮 2 次,每次 30 min,纱布粗虑去渣,将所得滤液以 5 000 ×g 离心 30 min,上清液加等体积无水乙醇后 4 ℃ 过夜;取出药液 5 000 ×g 离心 30 min,取上清液冰冻干燥,称重,RPMI 1640 溶解,调浓度至 400 g·L⁻¹,依次 0.45,0.22 μm 滤器过滤除菌,1 mL 分装,4 ℃ 保存备用。

2 方法

2.1 细胞增殖检测 Bel-7402,HL-7702 细胞在含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基常规培养。消化并计数细胞,调整细胞密度 5 ×10⁴/mL,以 5 ×10³/孔的密度接种细胞于 96 孔板,接种后第 2 d 加入不同质量浓度中药提取物(终质量浓度分别为 100 ~400 mg·L⁻¹),对照组加等体积 RPMI 1640,每组 3 个复孔。分别于药物作用 24 h 后加入 CCK8 试剂 10 μL,37 ℃ 反应 2 h,450 nm 波长检测各孔吸光度值(A)。按公式计算细胞存活率:存活率=(1-实验组 A/对照组 A) ×100%。实验重复 3 次。

2.2 流式细胞仪检测 常规消化计数 Bel-7402 细胞,以 6 ×10⁵/孔接种 Bel-7402 细胞于直径 10 cm 培养皿,细胞接种第 2 d 加入中药提取物(终浓度分别为 100 ~400 mg·L⁻¹)或等体积 RPMI1640,每组 3 个复孔;药物作用 24 h 后常规消化、离心、收获细胞,PBS 重悬,调整密度 1 ×10⁶/mL 以上,70% 乙醇(终浓度)固定,碘化吡 染色后流式细胞仪检测细胞周期及凋亡。

2.3 Hoechst 33258 染色 常规消化计数 Bel-7402 细胞,以 5 ×10⁴/孔接种 Bel-7402 细胞于 24 孔板,细胞接种第 2 d 加入中药提取物(终浓度分别为 100 ~400 mg·L⁻¹)或等体积 RPMI 1640,药物作用 24 h 后

弃培养基, PBS 洗涤 2 次, 加入 Hoechst 33258 染色 10 min, 荧光显微镜观察并拍照。

2.4 Wesren blot 收集药物作用后 Bel-7402 细胞, 常规裂解, 离心去除 DNA, 加入蛋白质上样缓冲液 100 变性 15 min, 在 12% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 电转法将蛋白质转移至硝酸纤维膜, 5% 脱脂奶粉封闭后与 caspase-3 或 α -actin 抗体 4 孵育过夜, PBST 洗涤 3 次后与荧光标记二抗 37 反应 1 h, 反复洗涤 3 ~4 次后 Odyssey 双色红外荧光成像系统扫描图像入计算机。

2.5 统计学方法 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS 15.0 软件进行方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 四藤方抑制 Bel-7402 细胞增殖 100 ~400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 四藤方提取物可以不同程度地抑制 Bel-7402 细胞增殖, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。为排除中药提取物体外对细胞的非特异作用, 研究同时观察了四藤方提取物对人正常肝细胞 HL-7702 增殖的影响, 结果表明四藤方提取物对 HL-7702 细胞增殖无明显作用。见表 1。

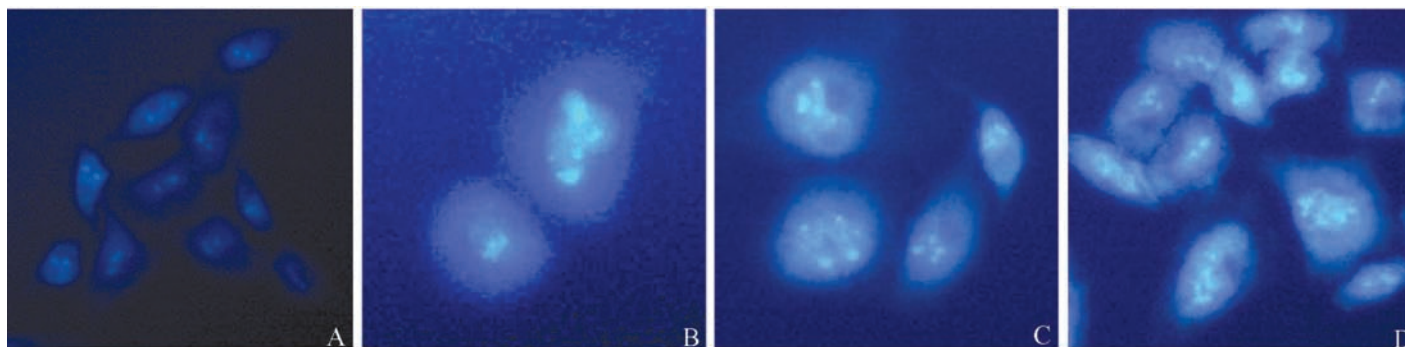


图 1 四藤方对 Bel-7402 细胞凋亡形态影响

A. 对照组; B. 四藤方 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; C. 四藤方 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 四藤方 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

可见浓染致密的蓝色荧光颗粒及明显核形态变化。

3.4 四藤方对 Bel-7402 细胞 caspase-3 活化影响

caspase-3 是细胞凋亡过程中关键执行分子, caspase-3 以酶原形式存在于胞浆中, 在细胞凋亡早期阶段, caspase-3 激活后剪切产生 17×10^3 和 12×10^3 片断, 细胞凋亡研究常以检测 caspase-3 17×10^3 产物的形式鉴定 caspase-3 活化。Bel-7402 细胞经 100, 200, 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 四藤方作用 24 h 后可以检测到 caspase-3 17kD 产物, 提示四藤方可以活化 caspase-3, 图 2。

4 讨论

目前肿瘤治疗如放、化疗、靶向治疗等治疗方式主要通过细胞凋亡、细胞衰老、细胞自噬 (autophagy)

表 1 四藤方对肝癌 Bel-7402, HL-7702 细胞增殖影响

($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	存活率 / %	
		Bel-7402	HL-7702
对照	-	100	100
四藤方	100	90.69 \pm 3.13 ¹⁾	99.48 \pm 1.93
	200	78.10 \pm 3.35 ¹⁾	99.11 \pm 1.55
	400	58.54 \pm 1.76 ¹⁾	98.90 \pm 2.64

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$

3.2 四藤方对 Bel-7402 细胞凋亡影响 根据以上结果, 研究进一步观察了四藤方对 Bel-7402 凋亡影响, 流式细胞仪检测显示不同浓度四藤方作用 24 h 后 Bel-7402 细胞出现明显凋亡峰, 100, 200, 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 四藤方组细胞凋亡率分别为 (7.59 \pm 1.46) %, (14.21 \pm 2.84) %, (17.59 \pm 2.66) %, 与对照组细胞凋亡率 (2.98 \pm 0.53) % 比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3.3 四藤方对 Bel-7402 细胞凋亡形态影响 为进一步验证流式细胞仪检测结果, 研究同时观察了四藤方对 Bel-7402 细胞凋亡形态影响, 结果如图 1 所示, 对照组细胞呈弱荧光染色, 不同浓度四藤方作用后 Bel-7402 细胞呈强荧光染色, 细胞核或细胞质内

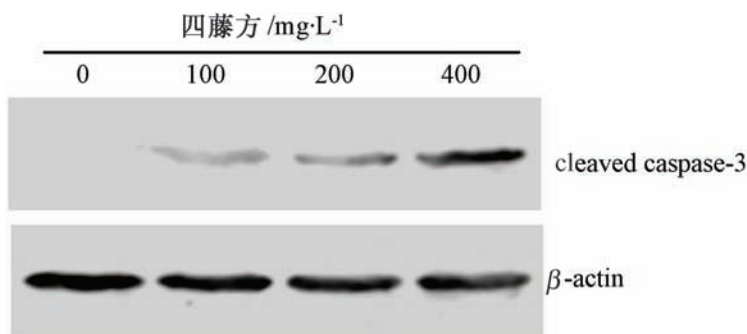


图 2 四藤方对 Bel-7402 细胞 caspase-3 活化影响

等机制实现治疗目的^[6-8]。本研究结果显示四藤方可以抑制肝癌 Bel-7402 细胞增殖, 但不影响正常肝细胞 HL-7702 细胞增殖, 可以排除中药提取物体外对细胞生长非特异作用, 提示四藤方对肝癌细胞具有一定的抗肿瘤作用。流式细胞仪检测显示不同浓度四藤方作用后 Bel-7402 细胞出现明显凋亡峰,

Hoechst 33258 染色显示四藤方作用后 Bel-7402 细胞呈强荧光染色,细胞核或细胞质内可见浓染致密的蓝色荧光颗粒及明显核形态变化,提示四藤方可以促 Bel-7402 细胞凋亡,这可能是四藤方抑制 Bel-7402 细胞增殖的细胞机制。

细胞凋亡研究始于 20 世纪 70 年代,是细胞在一定的生理或病理条件下,受内在基因调控的自动结束生命的过程;细胞凋亡有内源性 (intrinsic pathway) 和外源性 (extrinsic pathway) 两种通路,其中外源通路凋亡与死亡受体相关,如 FAS 等;肿瘤治疗诱发内源通路细胞凋亡与 DNA 损伤反应相关,寡聚化的 Bax 或 Bak 可激发线粒体释放细胞色素 C,细胞色素 C 在 dATP 存在的条件下与 Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1)、caspase-9 前体结合形成凋亡复合体 (apoptosome),激活 caspase-9,激活的 caspase-9 进而激活 caspase-3,剪切后产生 17×10^3 和 12×10^3 片断,进而裂解下游蛋白底物,诱发细胞凋亡^[6-8]; caspase-3 激活是细胞凋亡的标志分子事件,已成为细胞凋亡通路研究的经典指标^[9-10]。本研究结果显示四藤方可以活化 caspase-3,提示四藤方诱发 Bel-7402 细胞凋亡可能与活化 caspase-3 相关。

综上所述,本研究结果初步提示四藤方在体外可以抑制 Bel-7402 细胞增殖,促使 Bel-7402 细胞凋亡,并可能与活化 caspase-3 相关;四藤方在体内、以及临床是否也具有抑制肝癌的作用,值得进一步研究。

[参考文献]

[1] Meng M B, Cui Y L, Guan Y S, et al. Traditional Chinese medicine plus transcatheter arterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma [J]. J Altern Complement Med, 2008, 14

(8): 1027.

- [2] Shu X, McCulloch M, Xiao H, et al. Chinese herbal medicine and chemotherapy in the treatment of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Integr Cancer Ther, 2005, 4(3): 219.
- [3] 侯风刚, 凌昌全, 赵钢, 等. 原发性肝癌中医基本证候临床分布状况调查分析 [J]. 上海中医药杂志, 2005, 39(2): 22.
- [4] 武嫣斐, 王素萍, 孙健民, 等. 原发性肝癌中医证型临床分布及证型标准 [J]. 山西中医学院学报, 2007, 8(2): 21.
- [5] 沈克平, 潘传芳. 胃肠安方抑制胃癌转移的临床观察及对胃癌细胞株侵袭转移的影响 [J]. 现代肿瘤医学, 2007, 15(9): 1301.
- [6] Chiantore M V, Vannucchi S, Mangino G, et al. Senescence and cell death pathways and their role in cancer therapeutic outcome [J]. Curr Med Chem, 2009, 16(3): 287.
- [7] Meier P, Vousden K H. Lucifer's labyrinth-ten years of path finding in cell death [J]. Mol Cell, 2007, 28(5): 746.
- [8] Brown J M, Attardi L D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(3): 231.
- [9] Liu W, Huang X F, Qi Q, et al. Asparanin a induces G₂/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 381(4): 700.
- [10] Du H P, Shen J K, Yang M, et al. 4-Chlorobenzoyl berbamine induces apoptosis and G₂/M cell cycle arrest through the PI3K/Akt and NF-kappaB signal pathway in lymphoma cells [J]. Oncol Rep, 2010, 23(3): 709.

[责任编辑 聂淑琴]