

# 小半夏加茯苓颗粒含药血清对肝癌细胞凋亡及其 Bcl-2 表达的影响

冯泳<sup>1\*</sup>, 孟庆华<sup>2</sup>, 何前松<sup>1</sup>, 张伟玲<sup>3</sup>

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 天津中医药大学, 天津 300193;

3. 河北医科大学第一医院中医科, 石家庄 050031)

[摘要] 目的: 观察小半夏加茯苓颗粒含药血清对肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡及凋亡相关基因 Bcl-2 表达的影响。方法: 选用 SD 大鼠制备小半夏加茯苓颗粒及原方汤剂、环磷酰胺 (CTX) 含药血清。采用 ELISA 法检测细胞凋亡相关基因 Bcl-2 表达。FCM 法观察细胞生长凋亡情况。结果: 与空白对照组比较, 颗粒剂组细胞液中 Bcl-2 含量降低 ( $P < 0.05$ ), 汤剂组显著降低 ( $P < 0.01$ )。与同时段内空白对照组比较, 含药血清作用 18 h 后, 环磷酰胺 (CTX) 组、汤剂组、颗粒剂组细胞存活率有所下降 ( $P < 0.05$ ); 作用 36 h 后, CTX 组、汤剂组细胞存活率显著下降 ( $P < 0.01$ )。结论: 小半夏加茯苓颗粒含药血清可下调肝癌 SMMC-7721 细胞 Bcl-2 基因表达, 抑制其生长增殖, 其作用机制可能与诱导细胞凋亡或细胞毒作用有关。

[关键词] 小半夏加茯苓颗粒; SMMC-7721 细胞; Bcl-2

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0099-03

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的改良剂型<sup>[1]</sup>。鉴于有学者提出痰饮是肿瘤发病的重要病机之一<sup>[2]</sup>, 针对其主要病机, 本课题组前期研究表明该方防治家鸽实验性化疗呕吐作用显著<sup>[3]</sup>, 并对该方颗粒剂体外抗肿瘤进行了一系列研究, 证实了该方颗粒含药血清对体外肝癌 SMMC-7721 细胞有明显的抑制作用<sup>[4]</sup>。为探索其抗肿瘤的作用机制, 本实验检测了小半夏加茯苓颗粒含药血清对肝癌 SMMC-7721 细胞生长凋亡及其对凋亡相关基因 Bcl-2 表达的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康 SD 大鼠 40 只, 体重 (210 ± 10) g, 雌雄各半, 清洁级, 合格证号 0003377, 由重庆市中药研究院实验动物研究室提供。

**1.2 瘤株** 人肝癌 SMMC-7721 细胞株, 由中国科学院上海细胞生物学研究所提供。

**1.3 药品和试剂** 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, 含生药 1 g · mL<sup>-1</sup>, 药材由北京同仁堂有限公司提供。小半夏加茯苓颗粒: 由本院制剂研究中心提供, 含生药 1 g ·

g<sup>-1</sup>。环磷酰胺注射剂 (CTX): 200 mg/支, 江苏恒瑞医药股份有限公司生产, 批号 07051121, 用无菌生理盐水配制成 20 g · L<sup>-1</sup> 注射液。RPMI-1640 培养基 (干粉): 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, 批号 071115, 经 56 °C, 30 min 灭活后使用。0.25% 胰蛋白酶溶液: Gibco 公司产品。D-hank s 液: 贵阳医学院组织与干细胞工程中心实验室提供。Annexin-V-FITC/PI 凋亡试剂盒: 购自南京凯基生物科技有限公司。

**1.4 仪器** SW-CJ-1FD 超净工作台, 苏净集团安泰公司; CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱, 美国 Thermo 电子; TS100-F 倒置光学显微镜, 日本尼康公司; LD4-2 低速离心机, 北京医用离心机厂; FACS Aria<sup>TM</sup> 流式细胞仪, BD 公司。

## 2 方法

**2.1 细胞的复苏与传代培养** 将冻存于液氮中的细胞株取出, 快速置于 50 °C 水浴解冻, 转移细胞液于离心管中, 加入适量培养液, 1 000 r · min<sup>-1</sup> 离心, 弃上清, 重复操作 1 次。加入适量培养液重悬细胞, 将细胞悬液接种入培养瓶, 以含 10% 小牛血清, 青霉素、链霉素各 100 U · mL<sup>-1</sup> 的 RPMI-1640 培养基, 于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱内培养。倒置显微镜下观察, 待细胞完全贴壁后, 用 D-hank s 液清洗细胞 3 遍, 更换培养液。1 ~ 2 d 清洗换液 1 次。每日镜下观察, 当细胞铺满瓶底时进行传代。

[收稿日期] 20100506(005)

[基金项目] 贵州省优秀科技教育人才省长资金课题 [黔省专合字 (2006) 50 号]

[通讯作者] \* 冯泳, 教授, 研究方向: 中药复方配伍研究, E-mail: fy668@sina.com

用 D-hanks 液清洗细胞 3 遍, 以充分去除残存血清, 加入适量胰蛋白酶消化液, 置 37 °C 培养箱内 5 min, 镜下观察当细胞间隙增大、细胞形态变圆时, 使用含有小牛血清的培养液终止消化, 用吸管吹打细胞使之完全脱落, 转移细胞液至离心管中, 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心, 弃上清, 加入新鲜培养液混悬, 将细胞悬液平均分装入 2 个培养瓶。

**2.2 含药血清的制备** 健康 SD 大鼠 40 只, 适应性饲养 1 周后随机分为 4 组, 每组 10 只。空白对照组: ig 生理盐水 2.4 mL, 早晚各 1 次 (9.6 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。环磷酰胺 (CTX) 组: ip 环磷酰胺注射液 0.55 mL, 每日 1 次 (50 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。小半夏加茯苓汤组: ig 小半夏加茯苓汤药液 2.4 mL, 早晚各 1 次 (20 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。小半夏加茯苓颗粒剂组: ig 小半夏加茯苓颗粒药液 2.4 mL, 早晚各 1 次 (20 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。连续给药 3 d, 末次给药 1 h 后大鼠股动脉取血<sup>[4]</sup>。血样于 4 °C 静置 12 h, 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 分离血清, 同组血清混合, 经 56 °C, 30 min 灭活处理, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 获得 4 组含药血清, 置 -20 °C 冰箱保存备用。

**2.3 ELISA 法检测细胞液中 Bcl-2 蛋白浓度** 选择生长状态较好, 处于对数生长期的 SMMC-7721 细胞, 用培养液制成细胞悬液并调细胞密度至 7 × 10<sup>5</sup> / mL, 取 24 孔平底培养板, 各孔分别加入 500 μL 细胞悬液, 将培养板移入 CO<sub>2</sub> 培养箱中, 待细胞完全贴壁后, 更换无血清培养基, 将细胞分为 3 组, 分别为汤剂组、颗粒剂组、空白对照组, 每组 6 个复孔, 各孔分别加入相应含药血清, 使终体积分数为 10%, 继续培养, 于 24 h 后用微量移液器吸出细胞上清液检测 Bcl-2 蛋白含量。具体操作按照鼠抗人 Bcl-2 ELISA 检测试剂盒说明书进行。

**2.4 流式细胞术检测细胞生长凋亡** 选择生长状态较好, 处于对数生长期的 SMMC-7721 细胞, 以不含血清的培养基制成细胞悬液, 调整细胞密度 7 × 10<sup>5</sup> / mL 接种入 24 孔培养板, 各孔分别加入 500 μL 细胞悬液, 将培养板移入 CO<sub>2</sub> 培养箱中, 待细胞完全贴壁后, 将细胞分为 4 组, 分别为空白组、西药组、汤剂组、颗粒剂组, 每组 8 个复孔, 各孔加入相应含药血清, 使血清终体积分数为 10%, 继续培养。于 18, 36 h 各组取出 4 孔进行检测。

各检测孔弃上清, 经 D-hanks 液洗涤后加入 0.25% 胰蛋白酶 300 μL, 镜下观察当细胞间隙增大,

细胞变圆时, 加入含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液 500 μL 终止消化。吹打细胞使之脱落, 并移入 1.5 mL EP 管中, 2 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 弃上清, 加入 PBS 液 1 mL, 重复离心 1 次, 调整细胞密度为 5 ~ 6 × 10<sup>5</sup> / mL。将细胞重悬于 200 μL 结合缓冲液中, 依次加入 5 μL Annexin-V-FITC (荧光生物素 FITC 标记的膜联蛋白 V 抗体), 5 μL PI (碘化丙荧光染料), 混匀避光室温反应 15 min, 加入 300 μL 结合缓冲液, 上机检测, 激发波长设置为 5 W 氩离子激光器 488 nm 红色荧光。

**2.5 数据处理** 实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析。采用单因素方差分析 LSD 法 (Least-significant difference, 最小显著性差异法),  $P < 0.05$  为有显著性差异。

### 3 结果

**3.1 Bcl-2 蛋白浓度** 根据已知对照品浓度及所测吸光度 (A), 得出曲线回归方程:  $Y = 132.31X^2 + 35.568X + 10.413$ 。根据测得 A 及回归方程计算各样本 Bcl-2 蛋白浓度。

与空白对照组比较, 小半夏加茯苓颗粒组作用于 SMMC-7721 细胞后其 Bcl-2 含量有所降低 ( $P < 0.05$ ), 汤剂组 Bcl-2 含量显著降低 ( $P < 0.01$ ), 但汤剂组与颗粒剂组比较, 无统计学差异, 结果见表 1。

表 1 小半夏加茯苓含药血清对细胞 Bcl-2 蛋白浓度的影响  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

组别	剂量 / g·kg <sup>-1</sup>	Bcl-2 蛋白 / ng·L <sup>-1</sup>
空白对照	-	84.87 ± 5.40
小半夏加茯苓汤	20	72.77 ± 6.10 <sup>2)</sup>
小半夏加茯苓颗粒	20	76.22 ± 6.82 <sup>1)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2 细胞生长凋亡情况** 本实验初衷采用 Annexin-V-FITC/PI 凋亡试剂盒观测小半夏加茯苓颗粒及汤剂对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响, 但实际结果却未检测到凋亡细胞大规模分布, 细胞分布仅表现为存活细胞和坏死细胞。各时段各给药组 Q4 象限中的早期凋亡细胞数几乎为零, Q2 象限中晚期凋亡细胞数很少, 而 Q3 象限的存活细胞与 Q1 象限的坏死细胞占大多数。

数据统计结果表明, 含药血清对 SMMC-7721 细胞作用 18 h 后, 与同时段内空白对照组比较, 环磷酰胺 (CTX) 组、汤剂组、颗粒剂组细胞存活率 (Q1 象限细胞数占 4 个象限细胞总数百分比) 有所下降 ( $P$

< 0.05); 作用 36 h 后, CTX 组、汤剂组细胞存活率显著下降 ( $P < 0.01$ ), 结果见表 2。

表 2 含药血清作用后 SMMC-7721 细胞存活率 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	细胞存活率 / %	
		18 h	36 h
空白对照	-	94.05 $\pm$ 1.43	90.40 $\pm$ 0.12
环磷酰胺	0.05	76.83 $\pm$ 4.82 <sup>1)</sup>	67.95 $\pm$ 0.98 <sup>2)</sup>
小半夏加茯苓汤	20	85.63 $\pm$ 0.71 <sup>1)</sup>	81.95 $\pm$ 1.79 <sup>2)</sup>
小半夏加茯苓颗粒	20	89.70 $\pm$ 1.04 <sup>1)</sup>	83.45 $\pm$ 1.67 <sup>1)</sup>

注: 与同时段空白对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

小半夏加茯苓颗粒由半夏、生姜、茯苓组成, 既往文献表明方中单味药均具有不同程度抑制肿瘤生长的作用<sup>[1]</sup>, 我们前期研究也证实该复方含药血清对体外培养的肝癌 SMMC-7721 细胞具有明显的抑制作用, 但其作用机制尚不明确。

现有研究表明肿瘤的发生发展与细胞增殖和凋亡动态平衡受破坏有关, 细胞基因的缺失、突变导致细胞生长失控、恶变是发生恶性肿瘤的主要机制<sup>[5]</sup>, 因此, 肿瘤治疗的策略要从抑制、杀伤癌细胞以及促进癌细胞的凋亡着手。从分子水平看<sup>[6-7]</sup>, 肿瘤的病因而主要与癌基因的激活和抑癌基因的突变失活有关, Bcl-2 癌基因, 即 B 细胞淋巴瘤/白血病细胞基因-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2), 其过度表达可以对抗许多因素诱导的细胞凋亡, 通过检测细胞中 Bcl-2 基因的表达产物 Bcl-2 蛋白的含量变化可以反映药物对该细胞诱导凋亡作用的强弱。

本研究结果提示, 小半夏加茯苓汤及颗粒可以下调肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡相关基因 Bcl-2 表达, 或许通过诱导其凋亡而抑制肝癌细胞的生长增殖。但本实验中流式细胞术 (FCM) 统计数据仅表明该方剂确有抑制肝癌细胞生长增殖的作用, 并未检测到凋亡细胞大比例存在, 两者结果似乎有悖。然而, FCM 是一种对单细胞定量分析及分选的高新技术, 可在单细胞水平上对大量细胞进行快速、准确、

多参数、可定量的分析和分选, 既可检测早期凋亡, 又可将凋亡及死亡细胞区分开来, 具有较高的灵敏性及特异性<sup>[8]</sup>。因此, 出现以上结果的原因可能与其诱导肿瘤细胞凋亡发生于作用早期, 在 18, 36 h 检测时细胞已经进入凋亡晚期阶段或坏死阶段, 细胞膜已不完整。细胞膜丧失完整性, 染色剂碘化丙即可穿透细胞, 嵌入 DNA 双链, 仪器检测其荧光时即认为细胞已经坏死。原因之二, 不能排除该含药血清对细胞有直接杀伤作用, 推测小半夏加茯苓颗粒及汤剂含药血清或许具有细胞毒性, 可破坏细胞膜完整性, 导致细胞裂解死亡, 其具体机制有待于进一步的深入研究。

#### [参考文献]

- [1] 冯泳, 何前松, 时京珍, 等. 小半夏加茯苓汤临床应用和实验研究概况 [J]. 江苏中医药, 2008, 40(2): 84.
- [2] 赵远红. 恶性肿瘤“温药和之”解析 [J]. 新中医, 2008, 40(7): 100.
- [3] 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.
- [4] 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 生长增殖的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 168.
- [5] 宋其蔓, 孙洞箫. 细胞凋亡与 p21 关系的研究进展 [J]. 医学综述, 2008, 14(6): 816.
- [6] Gobe G, Rubin M, Williams G, et al. Apoptosis and expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in renal cell carcinoma [J]. Cancer Invest, 2002, 20(3): 324.
- [7] Cory S, Huang D C, Adams J M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis [J]. Oncogene, 2003, 22(53): 8590.
- [8] 游木荣, 俞光荣, 于秀淳. 流式细胞术在骨肿瘤研究中的进展 [J]. 国际骨科学杂志, 2008, 29(2): 83.

[责任编辑 聂淑琴]