

3 种治法方药诱导 H₂₂ 荷瘤小鼠细胞凋亡的实验研究

蒋时红*, 刘旺根, 谢慧琚, 王雪萍, 张文娴
(河南中医学院, 河南 郑州 450008)

[摘要] **目的:** 观察比较活血化瘀方、清热祛湿方和养阴柔肝方 3 种不同治法的中药复方对 H₂₂ 肝癌移植瘤抑瘤作用, 并初步探讨其机理。**方法:** 采用皮下接种肝癌 H₂₂ 细胞的方法建立荷瘤小鼠模型, 分别用上述 3 种中药复方水煎液 ig 给药 11 d, 观察各组荷瘤小鼠的肿瘤生长情况, 采用缺口末端标记法测定肿瘤细胞凋亡指数, 免疫组织化学方法测定凋亡蛋白 Bcl-2, Bax 的表达情况。**结果:** 与模型对照组比较, 3 种复方均可抑制 H₂₂ 肝癌移植瘤生长, 促进瘤体细胞凋亡, 降低瘤体细胞 Bcl-2/Bax 比值 ($P < 0.01$); 其中清热祛湿方与养阴柔肝方作用后 Bcl-2/Bax 分别为 0.16 ± 0.04 , 0.19 ± 0.02 , 显著低于模型组 (2.71 ± 0.06), 且与活血化瘀方 1.24 ± 0.10 比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 但前二者之间比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论:** 活血化瘀、清热祛湿、养肝柔肝 3 种方法均可抑制 H₂₂ 肝癌移植瘤生长, 其机制与通过调控凋亡相关蛋白 Bcl-2, Bax 的表达诱导肿瘤细胞凋亡有关。

[关键词] 不同治法; 肝癌 H₂₂ 细胞株; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)12-0078-03

肿瘤是细胞增殖和死亡失衡所致, 细胞凋亡与肿瘤发生、发展、消退关系密切, 促进瘤体细胞凋亡

是肿瘤治疗的关键之一。目前有关不同治法的中药复方对凋亡蛋白表达影响的文章较少^[1]。本实验以活血化瘀经方复元活血汤、清热祛湿方为茵陈蒿汤、养阴柔肝方为一贯煎进行加减, 以肝癌 H₂₂ 荷瘤小鼠为模型, 对各实验组瘤体组织细胞内 Bcl-2, Bax 蛋白表达进行检测, 以观察各组药物的抗肿瘤作用并初步探讨其机制。

[收稿日期] 2009-03-11

[基金项目] 河南省科技攻关计划项目(0524420036)

[通讯作者] * 蒋时红, Tel: (0371) 65680027; E-mail: shihong-jiang@hotmail.com

1 材料

1.1 中药水煎液的制备 活血化瘀方由当归 12 g, 桃仁 12 g, 红花 15 g, 山甲 6 g, 蛭虫 15 g, 柴胡 12 g 组成, 水煎后, 浓缩为含生药 18.7 g·kg⁻¹; 清热祛湿方由茵陈 30 g, 栀子 15 g, 大黄 9 g, 厚朴 9 g, 陈皮 9 g, 泽泻 12 g 组成, 水煎后, 浓缩为含生药 21.8 g·kg⁻¹; 养阴柔肝方由生地 30 g, 沙参 12 g, 麦冬 12 g, 枸杞 12 g, 川楝子 6 g 组成, 水煎后, 浓缩为含生药 37.4 g·kg⁻¹。3 方浓度剂量均由预实验最佳量效关系所确定。

1.2 动物 清洁级昆明小鼠 40 只, 雌雄各半, 体重 (20±2) g, 购于河南省实验动物中心[许可证号: SCXK(豫) 2005-0001], 并由其提供标准实验动物全价颗粒饲料。

1.3 瘤细胞株 肝癌 H₂₂ 细胞株, 由河南省医学科学研究所提供。

1.4 主要试剂 缺口末端标记(TUNEL)试剂盒为德国 Roche 公司产品, 规格: 10 人份; Bax 和 Bcl-2 抗小鼠单克隆抗体均为美国 Santa Cruz 公司产品, 规格均为 0.1 mL。

2 方法

2.1 造模方法 无菌条件下, 抽取接种 H₂₂ 瘤种 8 d, 生长良好小鼠腹水为瘤源, 用生理盐水调整细胞浓度至 1×10⁷ mL⁻¹, 取 0.2 mL 于鼠右侧腋窝皮下接种。

2.2 动物分组及处理方法 将 40 只昆明小鼠随机分为 4 组, 即模型对照组、活血化瘀组、清热祛湿组、养阴柔肝组, 每组 10 只, 雌雄各半。模型对照组接种瘤株 12 h 后于每日上午 8 点予以生理盐水灌胃, 每只 0.4 mL·d⁻¹, 每日 1 次, 3 组用药组则在同样条件下给予相应中药水煎液灌胃, 连续给药 11 d。

2.3 取材 停药 24 h 后, 称重, 断颈处死小鼠, 完整剥离瘤体, 滤纸吸干后电子天平称取瘤重。再于瘤体中心部位取小块组织, 进行常规石蜡切片, -20℃保存待检。

2.4 检测指标

2.4.1 肿瘤抑制百分率(抑瘤率) 抑瘤率(%) = (模型对照组平均瘤重 - 给药组平均瘤重) ÷ 模型对照组平均瘤重 × 100%。

2.4.2 凋亡指数(apoptotic index, AI) 严格按照试剂盒说明书应用 TUNEL 法检测待检切片凋亡情况。阳性判断标准^[2]: 细胞核呈棕黄色为阳性细胞, 每片

随机选取 5 个非坏死区域 400 倍视野, 计数阳性细胞的个数, 以同一视野内阳性细胞占总细胞的百分比表示细胞凋亡指数: AI = (n_{阳性细胞} / n_{总细胞}) × 100%。坏死区可见均一性的阳性染色, 为非特异性染色, 不予计数。

2.4.3 Bcl-2 免疫组化检测 严格按照试剂盒说明书应用 SABC 法检测待检切片 Bcl-2 表达情况。阳性判断标准^[3]: 细胞胞浆出现棕黄色颗粒为阳性细胞, 每片随机选择 5 个 400 倍视野, 计数至少 100 个细胞中阳性细胞数, < 5% 为阴性(-), 6% ~ 25% 为阳性(+), 26% ~ 50% 为中度阳性(++), > 50% 为高度阳性(+++)。坏死区可见均一性的阳性染色, 为非特异性染色, 不予计数。

2.4.4 Bax 免疫组化检测 严格按照试剂盒说明书应用 SABC 法检测待检切片 Bax 表达情况。阳性判断标准^[4]: Bax 阳性着色定位于细胞浆。每张切片随机选择 10 个高倍视野(×400), 共计数 1 000 个肿瘤细胞中的阳性细胞数, 得出阳性细胞百分数, 在不同时间计数 3 次, 取平均值。< 5% 为阴性, ≥5% 为阳性。5% ~ 24% 为(+), 25% ~ 49% 为(++), 50% ~ 74% 为(+++), ≥75% 为(++++) , 将后两者归为强阳性。坏死区可见均一性的阳性染色, 为非特异性染色, 不予计数。

2.5 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析, 数值变量均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

3 结果

3.1 对 H₂₂ 移植性肿瘤的抑制作用 与模型对照组比较, 3 组用药组小鼠平均瘤重均显著性降低, 但 3 组之间瘤重比较差异无统计学意义。见表 1。

表 1 不同治法方药对 H₂₂ 荷瘤小鼠瘤体生长抑制作用及对癌细胞凋亡指数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	n	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)	AI
模型对照组	—	9	1.65 ± 0.21	—	0.08 ± 0.01
活血化瘀组	18.7	8	0.93 ± 0.07 ¹⁾	43.64	0.12 ± 0.02 ¹⁾
清热祛湿组	21.8	10	0.81 ± 0.21 ²⁾	50.91	0.76 ± 0.02 ^{2,3)}
养阴柔肝组	37.4	9	0.90 ± 0.14 ¹⁾	45.45	0.82 ± 0.03 ^{2,3)}

注: 与模型对照组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与活血化瘀组比较³⁾ P < 0.01(下同)

3.2 对凋亡指数 AI 的影响 与模型对照组 AI 比较, 活血化瘀组明显升高 (P < 0.05), 清热祛湿组与

养阴柔肝组明显升高 ($P < 0.01$)。清热祛湿组与养阴柔肝组 AI 明显高于活血化瘀组 ($P < 0.01$) (参见表 1)。

3.3 对 Bcl-2, Bax 表达及其比值的影响 结果见表 2。与模型对照组比较, 3 个组的 Bcl-2, Bcl-2/Bax 均明显降低 ($P < 0.01$), Bax 均明显升高 ($P < 0.01$), 其中清热祛湿组与养阴柔肝组作用强于活血化瘀组 ($P < 0.01$)。

表 2 不同治法方药对 H₂₂ 肝癌细胞 Bcl-2, Bax 表达及其比值的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	n	Bcl-2 表达量	Bax 表达量	Bcl-2/Bax
模型对照组	—	9	77.64 ± 3.58	28.69 ± 1.25	2.71 ± 0.06
活血化瘀组	18.7	8	62.77 ± 2.29 ²⁾	50.74 ± 2.22 ²⁾	1.24 ± 0.10 ²⁾
清热祛湿组	21.8	10	13.26 ± 3.77 ^{2,3)}	82.73 ± 2.40 ^{2,3)}	0.16 ± 0.04 ^{2,3)}
养阴柔肝组	37.4	9	15.71 ± 1.94 ^{2,3)}	82.07 ± 1.09 ^{2,3)}	0.19 ± 0.02 ^{2,3)}

4 讨论

复元活血汤、茵陈蒿汤、一贯煎临床应用表明, 3 种复方均可明显改善临床症状, 提高患者生存质量。我们在不改变其治则的前提下进行加减, 组成活血化瘀方、清热祛湿方、养阴柔肝方, 作用于 H₂₂ 荷瘤小鼠模型, 结果显示 3 种药物均可发挥良好的抑制肝癌瘤体生长的作用, 其中清热祛湿方重用茵陈、栀子、大黄, 重在祛邪, 其对肿瘤细胞生长的抑制作用最为显著 ($P < 0.01$), 抑瘤率高达 50.91%。这说明, 在肝癌早期, 患者体质相对较好的条件下, 重用祛邪与健脾理气药物可在邪未盛、正未虚之时, 及时通利二便, 前后分消, 湿热得行, 瘀热得下, 则毒结自消。

近年来的研究表明, 凋亡在肿瘤的发生发展中起着不可替代的作用^[5-6]。许多抗癌中药或其提取成分能诱导肿瘤细胞发生凋亡, 可能是这些中药抑制肿瘤生长的机理之一^[7]。Bcl-2 家族是目前最受重视的与细胞凋亡关系密切的一类基因, 其中包括凋亡抑制基因 Bcl-2 以及凋亡促进基因 Bax^[8]。一般认为, Bax 同源二聚体能促进细胞凋亡, 而 Bcl-2 则通过与 Bax 竞争结合, 形成异源二聚体来抑制细胞凋亡。抗凋亡蛋白与促凋亡蛋白的比例在一定程度上决定了细胞是否发生凋亡, Bcl-2 的高表达及 Bax 的低表达, 可导致 Bcl-2/Bax 比值升高, 细胞凋亡的

敏感性降低, 细胞凋亡减少, 为肿瘤细胞的快速增长, 减慢细胞的丢失提供优势条件^[9]。

本实验结果表明, 活血化瘀方、清热祛湿方、养阴柔肝方均可使凋亡指数 AI 升高, 与模型对照组比较具有统计学意义 ($P < 0.01$), 提示 3 种方法均可诱导肿瘤细胞发生凋亡; 3 种方法均能下调荷瘤小鼠肿瘤组织细胞中凋亡抑制基因 Bcl-2 的表达 (与模型对照组比较 $P < 0.01$), 上调凋亡促进基因 Bax 的表达 (与模型对照组比较 $P < 0.01$), 使 Bcl-2/Bax 比值降低 (与模型对照组比较 $P < 0.01$), 从而诱导凋亡的发生。提示凋亡相关蛋白 Bcl-2, Bax 可能是活血化瘀、清热祛湿、养阴柔肝 3 种方法诱导肝癌细胞凋亡的重要调控因子。其中清热祛湿方与养阴柔肝方作用后 Bcl-2/Bax 比值均数分别为 0.16, 0.19, 与活血化瘀方比较结果具有统计学意义 ($P < 0.01$), 提示清热祛湿、养阴柔肝的方法主要通过诱导肿瘤细胞凋亡发挥抑癌作用, 二者作用后结果相似 ($P > 0.05$)。

[参考文献]

- [1] 崔 艳, 肖曼丽. 瘤体内注射消痔灵对荷 H₂₂ 肝癌小鼠凋亡蛋白表达的影响 [J]. 中医药学刊, 2006, 24(9): 1697-1698.
- [2] 杜标炎, 谭宇蕙, 吴映雅, 等. 六味地黄丸对小鼠移植性肝癌自杀基因治疗增效作用的病理学研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2007, 24(5): 386-391.
- [3] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准 [J]. 中国癌症杂志, 1996, 6(4): 229-231.
- [4] 周振华, 宋明志. 健脾理气方对小鼠 HAC 肝癌细胞凋亡和 Bax 基因蛋白表达影响的实验研究 [J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 2000, 8(2): 78-82.
- [5] 应小平, 陈捷, 史迎丽, 等. 山仙颗粒对小鼠 S180 肉瘤的抑瘤作用及 Bcl-2 基因表达影响的实验研究 [J]. 陕西中医, 2006, 27(11): 1441-1443.
- [6] 王彦刘. 复方抗癌冲剂抑制小鼠 S180 肉瘤生长的机理研究 [J]. 中国微循环, 2002, 6(6): 335-337.
- [7] 夏同礼. 肿瘤实验诊断学 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2005: 6.
- [8] 李玉林. 病理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 20.
- [9] 季红斌, 翟琦巍, 郑仲承. Bcl-2 基因的转录调控 [J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(2): 95-99.