

贞芪酪蛋白肽药物血清诱导 Be1-7402 细胞分化的体外实验研究

张延英^{1*}, 朱建坤¹, 吴建军¹, 李广远¹, 陈玉霞², 徐琳³, 张生萍⁴

(1. 甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州市城关区人民医院, 甘肃 兰州 730000;

3. 兰州市城关区妇幼保健所, 甘肃 兰州 730000; 4. 甘肃省医疗器械检测中心, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] 目的: 探讨贞芪酪蛋白复合肽对 Be1-7402 人肝癌细胞分化的诱导作用, 及其对端粒酶活性的影响。方法: 贞芪酪蛋白复合肽给正常大鼠灌胃, 采血制备药物血清。以正常鼠血清为阴性对照, 维甲酸(RA)为阳性对照, 将药物血清温育 Be1-7402 人肝癌细胞。噻唑蓝(MTT)比色法测定细胞增殖, 图像分析系统测定细胞核质比, 放射免疫法测定甲胎蛋白(AFP)含量, 动态比色法测定 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)和碱性磷酸酶(ALP)活性, 多聚酶链反应-酶联免疫吸附法(PCR-ELISA)检测细胞端粒酶活性。结果: 贞芪酪蛋白复合肽药物血清可抑制人肝癌细胞的增殖, 显著降低细胞核质比, 抑制细胞分泌 AFP, 降低细胞 γ -GT 活性, 升高 ALP 活性, 并有显著抑制人肝癌细胞端粒酶活性的作用。结论: 贞芪酪蛋白复合肽具有诱导人肝癌细胞分化的作用, 其主要机理可能是抑制了 Be1-7402 细胞端粒酶活性。

[关键词] 肝癌细胞; 贞芪酪蛋白复合肽; 细胞分化; 端粒酶

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)09-0047-04

Experimental Study on Differentiation of Human Hepatocarcinoma Cells Induced by ligustri-astragali casein co-peptid Drug Serum in Vitro

ZHANG Yan-ying^{1*}, ZHU Jian-kun¹, WU Jian-jun¹, LI Guang-yuan¹

CHEN Yu-xia², XU Lin³, ZHANG Sheng-ping⁴

(1. The Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. The Central District People's Hospital in Lanzhou, Lanzhou 730000, China;

3. The Maternal and Child Health Hospital, Lanzhou 730000, China;

4. The Gansu Medical Device Testing Centre, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of ligustri-astragali casein co-peptid(LACP) drug serum in inducing differentiation of Be1-7402 human hepatocarcinoma cell (HHC) and its influence of the telomerase activity. **Methods:** Rats were fed with LACP decoction to prepare the drug-serum of LACP, and the drug-serum was used for Be1-7402 HHC culture. Serum of normal rat, was taken as negative control and that of retinoic acid (RA) as the positive control. Cell proliferation was detected by MTT colorimetric assay, nucleocytoplasm ratio by image assay, α -fetoprotein (AFP) by RIA, alkaline phosphatase (ALP) activity and γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT) by dynamic colorimetric assay and telomerase activity of Be1-7402 cell by PCR-ELISA. **Results:** Drug-serum of FACP could inhibit the proliferation of Be1-7402 cell, markedly reduce the nucleocytoplasm ratio and the secretion of AFP, decrease γ -GT activity, increase ALP activity and suppress the telomerase activity of Be1-7402 cell. **Conclusion:** LACP can induce the differentiation of Be1-7402 HHC, the main mechanism maybe through the suppression of telomerase activity.

[收稿日期] 2007-11-12

[通讯作者] * 张延英, Tel: 13239652229; E-mail: zyy@gszy.edu.cn

[**Key words**] hepatocarcinoma cell; ligustrin astragali casein co-peptid; cell differentiation; telomerase

诱导分化作为一种肿瘤治疗方法,近年来受到广泛重视。有研究表明一些中药可诱导肝癌细胞分化^[1],贞芪酪蛋白复合肽是根据“扶正培本、扶正驱邪”的祖国医学理论,以黄芪、女贞子及酪蛋白复合肽等组方经特定制剂工艺研制而成。本研究采用血清药理学方法,观察中药复方“贞芪酪蛋白复合肽”(ligustrin astragali casein co-peptid, LACP) 药物血清对 Bel-7402 肝癌细胞分化的诱导作用,及其对端粒酶活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物与细胞 SD 雄性大鼠 30 只,体重(200~300)g, SPF 级,购自甘肃中医学院实验动物中心,合格证号:SCXK(甘)2004-0006-0000011,制备药物血清用;制备药物血清的动物实验在甘肃中医学院 SPF 级动物实验室进行,动物实验设施使用证编号:SYXK(甘)2004-0006-0001615。人肝癌细胞(Bel-7402),由上海细胞生物研究所陈瑞铭于 1978 年建株,购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。

1.1.2 药物与试剂 贞芪酪蛋白复合肽(LACP)由黄芪、女贞子和酪蛋白复合肽组成。中药购自兰州市黄河药材公司,酪蛋白复合肽由兰州同健生物公司提供。中药生药量:黄芪 100 g,女贞子 100 g;中药煎液制备后加入酪蛋白复合肽 10 g。制剂由甘肃中医学院科研实验中心制备为 $1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的提取液;维甲酸(RA)为 Sigma 公司产品;二甲基亚砜(DMSO)为广州市海珠区化学试剂厂产品;小牛血清购于兰州生物所;RPMI-1640 培养基干粉为 Gibco 公司产品;甲胎蛋白(AFP)放射免疫分析药盒为上海生物制品研究所产品;PCR-ELISA 端粒酶检测试剂盒(TRAPEze ELISA Telomerase Detection Kit)为美国 Intergen 公司产品,购自兰州生升医药科技有限责任公司。

1.1.3 仪器设备 液体闪烁分析仪,美国 Perkin Elmer 公司生产,型号 Tri-Carb 2100TR;荧光 PCR 仪,美国 BIORAD 公司生产,型号 icycleriQ;流式细胞仪,美国 BECKMAN COULTER 公司生产,型号 Epics XL;大恒 CZAS-1000 细胞图像分析系统;全自动酶标仪,美国伯乐公司生产;倒置显微镜,日本 OLYMPUS,型号 ZX71-22PH/FL;CO₂ 培养箱,日本 SANYO,型号

MCO-15AC;生物安全柜,香港 HFsafe,型号 760S。

2 方法

2.1 药物血清的制备 参照文献方法^[1]。LACP 提取液灌胃,每次给药 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot 200 \text{ g}^{-1}$, 2 次/d;对照组给同体积生理盐水,每组 10 只,连续 3 d,第 4 天 1 次给予全日剂量 1 h 后,戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,无菌条件下从大鼠腹腔静脉采血,静置(3~4)h, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,分离血清。将同 1 组大鼠的血清混匀, $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭活 30 min, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2 分组 受试细胞分为 3 组:生理盐水鼠血清阴性对照组、维甲酸阳性对照组、贞芪酪蛋白复合肽药物血清组。维甲酸避光溶解于 0.02% DMSO 中,过滤除菌制成贮液。临用前将药物血清加入 RPMI-1640 培养液,配成 10% 药物血清培养液;维甲酸贮液加入温育液中,终浓度为 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3 细胞增殖的测定 用微量移液器将细胞以 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度接种于 96 孔培养板,每孔 200 μL 。培养 24 h 后,吸弃培养液,按组分别加入 10% 药物血清培养液及终浓度为 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 含维甲酸培养液 180 μL ,继续培养 48 h 后,每孔加入 MTT 贮液($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 20 μL , $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 继续温育 4 h,吸弃上清液,每孔加入 DMSO 200 μL ,振荡 10 min,溶解微小结晶。全自动酶标仪上选择波长 490 nm、参比波长 630 nm 测定各孔 A 值,按如下公式计算抑制率,抑制率 = $(1 - \text{实验组 A 均值} / \text{对照组 A 均值}) \times 100\%$ 。

2.4 细胞核质比测定 细胞经 10% 药物血清培养液及含维甲酸培养液 ($10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 温育 72 h 后,中性福尔马林固定,HE 染色,图像分析系统测定细胞核及细胞质面积和核质比。

2.5 AFP 含量测定 用放射免疫法^[2]测定 AFP 含量。

2.6 γ -GT 和 ALP 活性的检测 方法参照文献^[3,4]。 γ -GT 活性用 SZASZ/PERSIJN 动态比色法测定。ALP 活性用 IFCC 推荐的动态比色法测定。蛋白质含量用改良的 Lowry 法测定。

2.7 端粒酶活性的检测 细胞以 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度接种于直径 3.5 cm 培养皿,24 h 后换为 10% 药物血清培养液,继续培养 72 h,收集细胞,抽提端粒酶。按美国 Intergen 公司端粒酶检测试剂盒说明的方法

检测端粒酶活性。样品在 TRAP 反应时蛋白定量为 1 μg, 设端粒酶阳性细胞对照组和样本加热灭活端粒酶阴性对照组。

2.8 统计学方法 数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 应用 levene 进行方差齐性检验, 然后应用 Dunnett-*t* 检验分析(方差分析)与对照组的差异显著性。

3 结果

3.1 LACP 药物血清对 Be1-7402 细胞增殖的影响 见表 1。与对照组比较, LACP 药物血清组 A 值显著降低($P < 0.05$), RA 组 A 值也显著降低($P < 0.01$)。提示贞芪酪蛋白复合肽和维甲酸均可抑制 Be1-7402 细胞的增殖。

表 1 LACP 药物血清对 Be1-7402 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	终浓度	Be1-7402 细胞(A 值)	抑制率(%)
空白对照	—	1.810 ± 0.103	
LACP 药物血清	10%	1.602 ± 0.101 ¹⁾	11.49
RA	10 μmol·L ⁻¹	1.573 ± 0.098 ²⁾	13.09

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

3.2 LACP 药物血清对 Be1-7402 细胞核质比的影响 见表 2。与对照组比较, LACP 药物血清组和 RA 组细胞质面积显著增高($P < 0.01$), 核质比显著降低($P < 0.01$)。

表 2 LACP 药物血清对 Be1-7402 细胞核质比的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	核面积(μm ²)	质面积(μm ²)	核质比(%)
空白对照	162.35 ± 13.14	157.45 ± 15.84	1.03 ± 0.02
LACP 药物血清	154.79 ± 14.50	216.93 ± 30.51 ²⁾	0.71 ± 0.04 ²⁾
RA	153.43 ± 15.18	221.82 ± 33.63 ²⁾	0.69 ± 0.04 ²⁾

3.3 LACP 药物血清对 Be1-7402 细胞分泌 AFP 的影响 见表 3。LACP 药物血清组和 RA 组 AFP 分泌量显著低于对照组($P < 0.01$), 表明贞芪酪蛋白复合肽和维甲酸均可抑制 Be1-7402 细胞分泌 AFP。

表 3 LACP 药物血清对 Be1-7402 细胞 AFP 分泌量的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	AFP(ng/10 ⁶)	抑制率(%)
对照	24.79 ± 3.52	
LACP 药物血清	15.56 ± 2.46 ²⁾	37.23
RA	14.18 ± 3.84 ²⁾	42.80

3.4 LACP 药物血清对 Be1-7402 细胞 γ-GT 和 ALP 活性的影响 见表 4。与对照组比较, LACP 药物血清组和 RA 组细胞内 γ-GT 活性显著降低($P <$

0.05), ALP 活性显著增高($P < 0.01$)。

表 4 LACP 药物血清对 Be1-7402 细胞 γ-GT 和 ALP 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	γ-GT(IU/mg prot)	ALP(IU/mg prot)
对照	8.43 ± 1.59	9.87 ± 1.61
LACP 药物血清	4.97 ± 1.24 ¹⁾	17.33 ± 1.35 ²⁾
RA	4.82 ± 1.07 ¹⁾	20.06 ± 1.52 ²⁾

3.5 LACP 药物血清对 Be1-7402 细胞端粒酶活性的影响 见表 5。LACP 药物血清组和 RA 组端粒酶活性显著低于 Be1-7402 细胞对照组($P < 0.01$), 表明贞芪酪蛋白复合肽可抑制 Be1-7402 细胞端粒酶活性。

表 5 LACP 药物血清对 Be1-7402 细胞端粒酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	端粒酶活性(A ₄₅₀)	抑制率(%)
Be1-7402 对照	0.975 ± 0.120	
LACP 药物血清	0.438 ± 0.117 ¹⁾	55.08
RA	0.379 ± 0.096 ¹⁾	61.12
阴性对照	0.082 ± 0.006	

注: 与 Be1-7402 细胞对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$ 阴性对照, 样品加热灭活端粒酶

4 讨论

肿瘤细胞的基本生物学特征为增殖与分化的平衡失调, 虽然肿瘤细胞由于某种原因发生分化阻断或分化异常, 但仍具有和正常细胞相同的分化潜能, 有可能在分化诱导作用下被诱导分化转为良性细胞。中医药用于诱导肿瘤细胞分化具有较广阔的应用前景^[3]。贞芪酪蛋白复合肽主要由黄芪、女贞子、酪蛋白复合肽等组成。酪蛋白复合肽及其衍生的小分子肽具有各种生物活性。研究表明, 酪蛋白复合肽在饮食中可能对控制肝脏疾病有益、对胃肠蠕动起到类吗啡效果, 另外当喂给饥饿的动物时, 会产生饱腹感, 酪蛋白复合肽的存在会促进钙、铁和锌的吸收^[4]。我们以往的研究表明该方能够促进大鼠巨噬细胞表面 Ia 抗原表达, 激活机体免疫应答反应, 增强巨噬细胞 ADCC 活性, 能提高大鼠免疫功能, 临床上用于防治肝癌前病变取得较好疗效, 可较快降低肝硬化患者的高 AFP 血症。为探讨该方的疗效机理, 我们研究了贞芪酪蛋白肽对人肝癌细胞(Be1-7402 细胞)增殖速度、核质比、AFP 分泌量、和酶活性(ALP, γ-GT), 这些公认的细胞分化指标^[6]和端粒酶活性的影响。肝癌细胞分化不良在形态学上主要表现为细胞明显增大, 染色深, 核大、圆, 呈多型性, 核质比例失常。核质比例失常, 是区别癌变肝细胞和

肝细胞良性增生的主要根据; AFP 分泌量和 γ -GT 活性是肝细胞恶变的指标, ALP 则是肝癌细胞分化的酶学指标^[5]。本研究结果表明: 贞芪酪蛋白复合肽可抑制人肝癌细胞的增殖, 显著降低细胞核质比, 抑制细胞分泌 AFP, 降低细胞 γ -GT 活性, 升高 ALP 活性。提示贞芪酪蛋白复合肽具有诱导人肝癌细胞分化的作用。

端粒酶(telomerase)是一种核糖蛋白体酶, 其作用是利用自身 RNA 为模板合成端粒 DNA, 弥补随着细胞有丝分裂逐渐缩短的端粒长度。近年的研究发现^[6], 端粒酶几乎在包括肝癌在内的多种人类恶性肿瘤中均有不同程度的表达, 端粒酶的活化可使细胞发展成为永生细胞或无限增殖的癌细胞, 可能是恶性肿瘤发生中的一个共同途径。因而, 寻找有效的端粒酶活化抑制剂是抗肿瘤治疗新的亮点。本研究表明贞芪酪蛋白复合肽具有抑制人肝癌细胞端粒酶活性的作用, 这可能是其诱导人肝癌细胞分化的作用机理之一。本研究同时提示, 从有抗癌作用的

中药中寻找端粒酶活化抑制剂不失为一捷径。

[参考文献]

- [1] 刘平, 周建锋, 胡义扬, 等. 益气养阴诱导 SMMC-7721 肝癌细胞分化作用与意义[J]. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6(8): 29-33.
- [2] 刘志毅, 刘耕陶, 张世馥. 联苯双醋对人肝癌细胞株的诱导分化作用[J]. 中华医学杂志, 1995, 75(11): 676-678.
- [3] 花宝金. 中药有效单体对肿瘤细胞诱导分化及调亡的机制研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(7): 63-65.
- [4] 王专, 易华西, 吴永英. 乳酪蛋白源生物活性肽的研究进展[J]. 生物信息学, 2006, (02).
- [5] 黄炜, 黄济群, 彭安, 等. Be1-7402 人肝癌细胞分化指标的研究[J]. 肿瘤防治研究, 2001, 28(1): 17-20.
- [6] Kim NW, Piatysezek MA, Prouse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. Sci 1994; 266(18): 2011-2015.