

新加良附颗粒含药血清体外诱导人胃癌细胞凋亡研究

庄 严^{1*}, 董 青¹, 陈信义¹, 孙颖立¹, 陈金龙²

(1. 北京中医药大学附属东直门医院血液肿瘤科, 北京 100700; 2. 军事医学科学院, 北京 100850)

[摘要] 目的: 观察新加良附颗粒对人胃癌细胞(BGC-823)诱导凋亡效应。方法 采用MTT法测定新加良附颗粒含药血清体外对BGC-823生长抑制率, 用流式细胞仪检测其对细胞凋亡影响的同时, 以倒置显微镜和透射电镜观察细胞形态学变化。结果: 新加良附颗粒对BGC-823有生长抑制效应和促进凋亡作用, 并与用药剂量呈正相关; 倒置显微镜下及透射电镜下对照组无明显变化, 给药各组出现细胞形态学改变并可见凋亡特征出现。结论: 新加良附颗粒体外具有抑制人胃癌细胞(BGC-823), 诱导其凋亡作用。

[关键词] 新加良附颗粒; 人胃癌细胞; 细胞株; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)08-0032-04

人体正常组织器官细胞凋亡与增殖转换(apoptotic index/proliferative index, AI/PI)始终维持着动态平衡。在细胞群体调控过程中, 凋亡和细胞增殖相辅相成, 其动态平衡维系着细胞群体数量相对稳定。任何因素导致细胞凋亡和增殖转换平衡机制的改变将会使组织内环境失去稳定。失控的细胞增殖以及凋亡的异常与肿瘤发生关系极为密切。有文献表明, 胃癌细胞存在着凋亡受阻现象, 其凋亡抑制越强预后越差^[1]。因此, 以药物诱导胃癌细胞凋亡可抑制胃癌生长。新加良附颗粒由清谢元庆的《良方集腋》的良附丸化裁, 其中高良姜温中暖胃, 香附疏肝开郁、行气止痛。我们在研究新加良附颗粒体外抑制胃癌细胞增殖的基础上, 采用血清药理学方法观察了药物血清对BGC-823细胞凋亡的影响。

1 材料

1.1 细胞系与动物 人胃腺癌细胞(BGC-823)由军事医学科学院陈金龙博士惠赠。Wistar大鼠, 雄性, 180~200g 购自军事医学科学院实验动物中心(合格证号SCXK-(军)2002-001)。实验前于国家药物安全评价中心GPS实验室适应一周, 饲养条件为(22±3)℃, 光暗周期12h/12h, 自由摄食、饮水。

1.2 药物与试剂 新加良附颗粒(煮提成膏, 制成

颗粒, 每1g颗粒含生药7g)由北京博诺瑞特科技发展有限公司与西安星华药物研究所制备并提供; 环磷酸胺(CTX)由江苏恒瑞医药股份有限公司生产(批号06052021)。MTT, RPMI1640培养基系Sigma公司产品, 购自北京欣经科生物技术有限公司; Annexin-V-FITC凋亡检测试剂盒系宝赛生物技术公司产品; 小牛血清为天津百叶生物制品公司产品。

1.3 仪器 倒置显微镜(OLYMPUS IX70); 全自动酶标仪(Bio-Rad 450); CO₂培养箱(Heraeus BB5060); 流式细胞仪(BD FacsCalibur); 透射电镜(Philips EM400T)。

2 方法

2.1 复方血清的制备^[2] 依据实验设计制备空白对照、CTX、新加良附颗粒高、中、低剂量组血清。取Wistar雄性大鼠25只, 按体重随机分为5组, 每组5只。制备药物血清前禁食12h。新加良附颗粒组灌服颗粒0.75, 1.5, 3g·kg⁻¹·d⁻¹(中剂量=临床用量×动物等效面积×培养基内血清稀释度, 以此基准, 高剂量乘以2, 低剂量除以2); CTX组按100mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量腹腔注射; 对照组给予相同体积的生理盐水。每日用药1次, 连灌1周。于末次用药后1h内, 在无菌条件下自腹主动脉采血, 4℃下静置过夜, 以3500r/min离心30min, 分离血清, 0.22μm微孔滤膜无菌过滤后, 置-20℃冰箱保存备用, 临用前56℃灭活30min。

[收稿日期] 2007-03-23

[通讯作者] * 庄严, Tel: (010) 84013145; E-mail: yan2003324@yahoo.com.cn

2.2 细胞传代与 MTT 实验 BGC-823 细胞放入含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中, 于 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度条件下传代培养。取对数生长期以上的贴壁肿瘤细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 以 1×10^4 /mL, 接种于 96 孔板 100 μ L/孔; 细胞于 5% CO₂, 37 °C 培养箱培养 24 h 后, 换成无血清培养基, 并在每个培养孔中加入 10 μ L 药物血清(对照组加不含药血清), 每个剂量设 3 个平行孔; 继续培养 72 h, 吸弃培养基, 每孔中加入含 MTT 0.5 mg/mL 的 PBS (pH6.8) 100 μ L, 培养 4 h 后, 快速翻板法去除培养基, 每孔加入二甲基亚砜 100 μ L, 微量振荡仪振荡 5 min。于次日用全自动酶标仪测 570 nm 处 A 值, 调零孔为 100 μ L 培养液^[3]。依据结果计算细胞生长抑制率。

2.3 电镜观察细胞形态

2.3.1 倒置显微镜观察 倒置显微镜下观察细胞在培养瓶中的生长情况。

2.3.2 透射电镜观察 将 BGC-823 细胞以 1×10^6 接种于 75 cm² (150 mL) 培养瓶中, 培养 24 h 后, 更换含不同浓度新加良附血清的同一培养基, 继续培养 48 h。用 PBS 洗 2 次细胞, 刮取法收集细胞, PBS 洗 2 次后离心成细胞丸, 立即于含 2.5% 戊二醛的 0.1 mol/L 二甲基砷酸钠中固定 1 h。0.1 mol/L PBS (pH7.2) 洗 3 次, 再于含 0.1% 四氧钼酸的 PBS (pH7.2) 中固定 1 h。系列梯度乙醇脱水后, 用 812 环氧树脂: 乙醇(1:1) 渗透 1 h, 于纯环氧树脂中渗透过夜。将细胞用新鲜环氧树脂包进模孔, 60 °C 成熟 48 h, 用 LKB 超薄切片机切成 70 nm 超薄切片。切片放入丙酮清洗后的 200 目铜网, 用铀酸乙脂和枸橼酸铅染色后透射电镜观察^[4]。

2.4 流式细胞检测细胞凋亡 参照文献并加以改进^[5], 将取对数期细胞以 1×10^6 接种于 25 cm² (50 mL) 培养瓶中, 在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中培养 24 h; 更换含 10% 不同浓度含药血清(0.75 g/kg, 1.5 g/kg, 3 g/kg) 及不含药血清培养基继续培养 48 h; 消化收集细胞于离心管中, PBS 洗 2 次后离心成丸, 将细胞丸于 200 μ L 结合缓冲液(10 mmol/L HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂) 中均匀悬浮, 接着加 10 μ L PI 和 10 μ L Annexin V-FITC, 室温避光孵育 30 min, 再加 300 μ L 结合缓冲液, 立即用流式细胞仪检测。每样至少检测 20 000 细胞, CELLQuestk 软件分析结果。

2.5 计算与统计 细胞生长抑制率计算公式: 生长

抑制率 = (对照组 A 值 - 用药组 A 值) / 对照组 A 值 $\times 100\%$ 。统计学处理使用 SPSS10.0 统计软件。统计数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并经 *t* 检验, 当 $P < 0.05$ 时被认为有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞生长状态与形态学观察 在倒置显微镜下, 对照组细胞呈上皮型贴壁生长, 细胞呈延展、扁平, 细胞间结构紧密, 细胞生长旺盛; 实验组细胞轮廓增强、反差增大, 有部分变圆浮起, 细胞间接触变松, 增殖减慢, 且与药物剂量相关。倒置显微镜下观察的 BGC-823 细胞见图 1~5。在透射电镜下, 对照组大多数细胞细胞核清晰完整, 有丰富正常的线粒体及内质网; 实验各组均出现较多的凋亡细胞, 具有不同时期细胞凋亡特征, 主要表现为凋亡细胞体积变小, 核内出现许多空泡结构, 细胞质浓缩, 聚集, 附着在核膜上。见图 6~10。

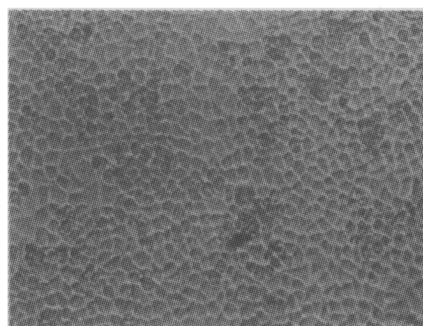


图1 对照组3细胞生长状况良好(10×20)

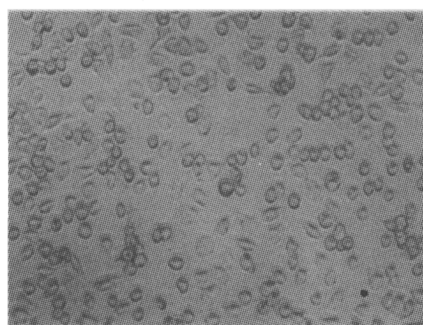


图2 CTX组细胞生长明显受抑(10×20)

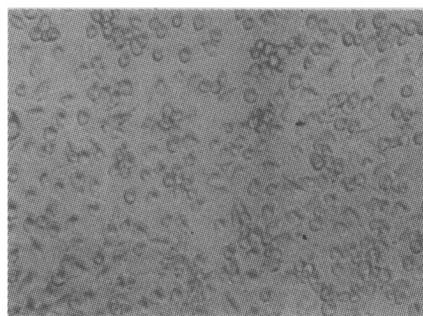


图3 良附大剂量组细胞生长受抑(10×20)

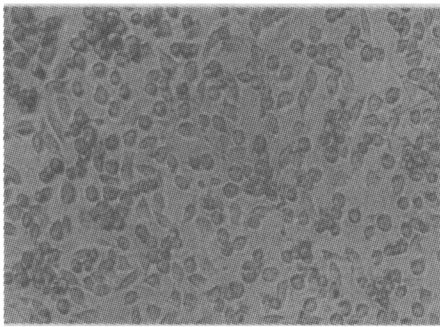


图 4 良附中剂量组细胞生长受抑(10×20)

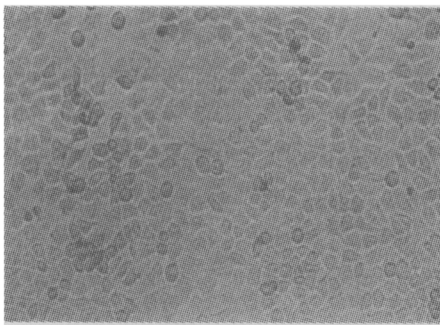


图 5 良附小剂量组细胞生长受抑(10×20)

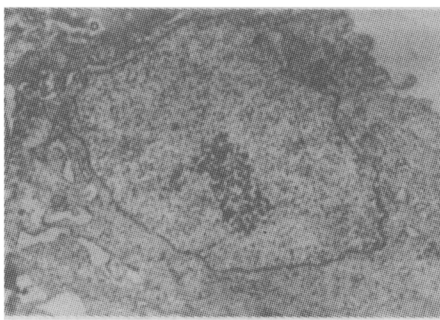


图 6 BGC-823 细胞核清晰完整, 有丰富线粒体及内质网(×6 000)

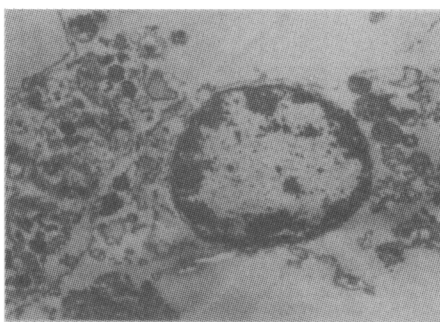


图 7 CTX 组凋亡细胞, 染色质凝集成团块状部分并附着在核膜上(×6 000)

3.2 细胞生长抑制率与凋亡率统计 经含新加良附颗粒药物血清干预后的 BGC-823 细胞均由不同程度的抑制效应, 流式细胞仪检测发现也有不同程度的细胞凋亡现象。细胞生长抑制率与凋亡率见表 1。对 A 值影响: 与对照组相比, 新加良附颗粒对 BGC-823 作用明显与剂量相关; 与阳性药 CTX 组抑

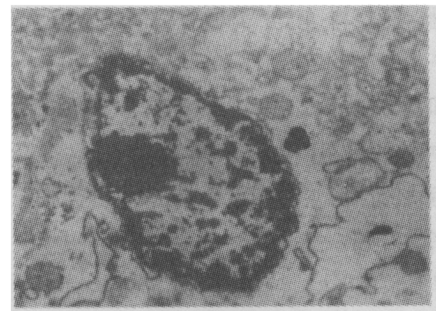


图 8 良附大剂量组凋亡细胞, 染色质凝集成团块状, 出现空泡结构(×6 000)

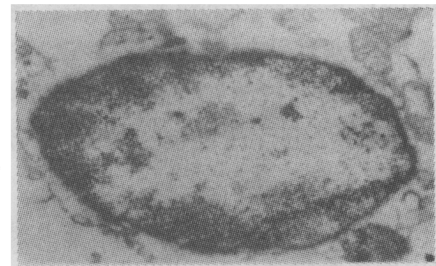


图 9 良附中剂量组凋亡细胞, 染色质凝集成团块状, 出现空泡结构(×6 000)

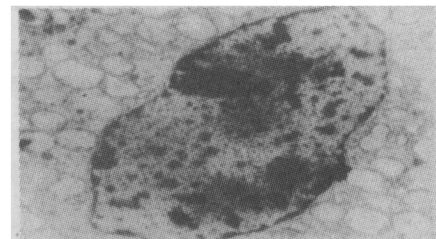


图 10 良附小剂量组凋亡细胞, 染色质凝集成团块状, 出现空泡结构(×6 000)

制率相比, 高、中剂量组无明显差别; 对细胞系的生长抑制率的影响: 高、中剂量组生长抑制率与 CTX 组无明显差别($P > 0.05$); 流式细胞检测结果表明新加良附颗粒有诱导 BGC-823 细胞凋亡作用, 随剂量的增加, 细胞凋亡增加, 与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

表 1 细胞生长抑制率与凋亡率检测结果($\bar{x} \pm s$)

实验分组	A 值 (n=3)	生长抑制率 (%, n=3)	凋亡率 (%, n=2)
空白对照组	0.75±0.13	—	14.45±3.33
环磷酸胺组	0.39±0.14 ²⁾	44.63±30.03	—
良附高剂量	0.44±0.06 ²⁾	40.35±6.45	35.92±0.87 ¹⁾
良附中剂量	0.52±0.08 ¹⁾	30.29±4.89	29.51±1.02 ¹⁾
良附小剂量	0.61±0.10	17.29±14.42 ³⁾	18.32±1.64

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与环磷酸胺组比较, ³⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

虽然胃癌在世界范围内发病率及病死率呈持续下降趋势,但我国仍是威胁生命健康最严重的恶性肿瘤之一。对失去手术机会的中晚期胃癌及术后复发患者,目前尚缺乏有效的治疗手段。化疗和放疗在杀伤癌细胞的同时,也损伤正常的组织细胞,其严重的不良反应使患者难以耐受。长期的临床实践使我们看到,在中晚期肿瘤综合治疗中占有重要角色,已形成我国肿瘤治疗的特色医疗之一。其特征是依据患者体质、临床表现、肿瘤生长部位以及肿瘤分期提供个体化辨证施治方案。新加良附颗粒是依据恶性肿瘤“寒凝血瘀”病机证候拟定的治疗消化道肿瘤方剂,急性毒性实验显示无明显毒性。

我们已采用血清药理学方法进行了体外抑瘤实验,通过筛选,选用人胃癌细胞(BGC-823)作为研究对象。本研究继续采用血清药理学方法,进一步观察新加良附颗粒对 BGC-823 凋亡的影响。

细胞凋亡与细胞坏死不同,是细胞主动参与自身死亡的过程。有特殊形态学变化,如细胞膜不对称性和细胞附着消失,胞浆和细胞核固缩,核内出现许多空泡结构,细胞质浓缩,聚集,附着在核膜上,凋亡细胞断裂成“凋亡小体”等。我们在倒置显微镜下观察到,对照组 BGC-823 细胞依旧呈上皮型,给药组和阳性药组细胞多失去原有形状,细胞附着消失;透射电镜下观察发现对照组的 BGC-823 细胞中多数细胞线粒体、内质网丰富,表明细胞代谢旺盛;而给药组和阳性药组中有较多处于不同时期的凋亡细胞,具有不同时期细胞凋亡特征,主要表现为凋亡细胞体积变小,核内出现许多空泡结构,细胞质浓缩、聚集,附着在核膜上,均证实新加良附颗粒对 BGC-823 细胞有诱导凋亡作用。流式细胞仪检测给药组中,高、中剂量组凋亡率与对照组相比差异显著($P < 0.05$),进一步证实了细胞凋亡是新加良附颗粒是抑制癌细胞的作用机制之一。

细胞凋亡的过程大致可分为以下 2 个阶段: 1.

凋亡的启动阶段,如细胞凋亡的膜受体通路:各种外界因素是细胞凋亡的启动剂,它们可以通过不同的信号传递系统传递凋亡信号,引起细胞凋亡,如 Fas-FasL。2. 凋亡的执行阶段:如 Caspase 不可逆有限水解底物的级联放大反应过程。但细胞的凋亡受到严格调控,如在正常细胞, Caspase 处于非活化的酶原状态,凋亡程序一旦开始, Caspase 被活经随后发生凋亡蛋白酶的层叠级联反应,发生不可逆的凋亡。多种凋亡调控因子包括 P35, CmnA, IAPs, FLIPs 以及 Bcl-2 家族参与凋亡的调控,阻止或促进凋亡的发生和发展^[7,8]。新加良附颗粒诱导肿瘤细胞凋亡是否有靶向调控基因的参与,我们将进一步研究,探讨其抑制肿瘤的可能分子机制,为临床治疗提供理论依据。

[参考文献]

- [1] Gregory Y. Immunohistochemical evaluation of Bcl-2 protein expression in gastric adenocarcinomas[J]. Cancer, 1995, 76: 2209-2213.
- [2] 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题[J]. 中药新用与临床药理, 1999, 10(2): 95.
- [3] Kazuho Abe, Norio Matsuki. Measurement of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT[J]. Neuroscience Research, 2000, 38: 325-329.
- [4] Salmaan H. Inayat-Hussain, Shannon L. Winski, David Ross. Differential Involvement of Caspases in Hydroquinone-Induced Apoptosis in Human Leukemic HL-60 and Jurkat Cells[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2001, 175: 95-103.
- [5] Ionone YA, Chen FW. Quantization of DNA fragmentation in apoptosis[J]. Nucleic Acid Res, 1996, 2(4): 992-993.
- [6] 刘士廉, 邓德先. 细胞凋亡及其基因调整[J]. 基础医学与临床, 1994, 14(3): 1.
- [7] 季枚, 吴昌平, 赵伟庆, 等. FasL 在胃癌中的表达及临床意义[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13(20): 1568-1570.
- [8] 王玉, 孙黎光, 夏春辉. Caspase 介导的 Fas 凋亡途径[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(36): 3439-3442.