

# 加味小柴胡汤对顺铂诱导大鼠肝癌 CBRH7919 细胞凋亡蛋白表达的影响

刘应柯\*, 宫瑾瑾, 谢 磊

(解放军 153 中心医院, 河南 郑州 450007)

**[摘要]** 目的: 探讨加味小柴胡汤对顺铂诱导的大鼠肝癌 CBRH7919 细胞凋亡相关基因表达的影响。方法: 采用 TUNEL, Ladder, 免疫组化及完整细胞蛋白质斑点印迹技术等方法, 检测各组细胞凋亡率及细胞凋亡蛋白的变化。结果: 空白组细胞凋亡率为 6%; 顺铂组 52%; 实验 1 组(加味小柴胡汤大剂量) 58%; 实验 2 组(小剂量) 53%。与空白组比, 顺铂组及加味小柴胡汤 2 个剂量组 Rb, Caspase-3, Bax, wp53 均升高, Bcl-2, mp53 降低。实验 1, 2 组 Rb, Bax, wp53 明显较顺铂组升高, Bcl-2, mp53 较顺铂组降低。结论: 加味小柴胡汤是通过调控细胞凋亡相关基因, 而增强顺铂的抑癌作用。

**[关键词]** 肝癌 CBRH7919 细胞; 顺铂; 加味小柴胡汤; 凋亡率; 细胞凋亡蛋白

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)08-0058-02

小柴胡汤及其加减方已广泛用于防治恶性肿瘤或化疗药引起的肝功能损害<sup>[1,2]</sup>, 笔者研究发现, 加味小柴胡汤对顺铂诱导的培养肝细胞损伤有明显保护作用, 其机制可能与其抗氧化作用有关<sup>[3]</sup>。本研究观察了该方对顺铂诱导的大鼠肝癌 CBRH7919 细胞凋亡相关基因表达的影响。报告如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 大鼠肝癌 CBRH7919 细胞, 由广州中山大学动物实验中心细胞库提供。胎牛血清、DMEM、单克隆抗体、TUNEL 检测试剂盒均购自 Sigma 公司; 顺铂(CP): 齐鲁制药有限公司生产, 批号 0503007。加味小柴胡汤(小柴胡汤加生黄芪 20g, 白芍 15g, 元胡 15g, 郁金 15g, 焦三仙各 15g, 山慈姑 15g, 半枝莲 15g) 由我院中药制剂室制备: 将全部中药煎 2 次, 每次 1 h, 将 2 次滤液混合浓缩为生药 1 g/mL 的合剂, 灭菌, 冷藏备用。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞分组及处理** 取处于对数生长期的肝癌 CBRH7919 细胞随机分为 4 组(每组 6 瓶): ①对照组只加含 10% 小牛血清的培养基; ②顺铂组 CP 加入终浓度为 5 mg/L; ③实验 1 组加入 CP 5 mg/L 及加味小柴胡汤 4 g/L; ④实验 2 组加入 CP 5 mg/L 及加味小柴胡汤 2 g/L。在 37 °C 0.5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h 后, 收集细胞, 每组实验重复 3 次。将收获的 4 组细胞分别制成细胞滴片、细胞裂解液, 并提取 DNA 和蛋白质, 进行免疫组化, TUNEL 和 Ladder 试验。

**1.2.2 细胞滴片的制备** 将培养的细胞常规消化 3 min 后, 制备成细胞悬液, 调整细胞浓度成  $1 \times 10^6$  个/mL, 再按 5  $\mu$ L/片或 5  $\mu$ L/斑点, 将细胞悬液滴加于 1 铬矾明胶预处理过的硝酸纤维素膜上。滴玻片经多聚甲醛固定, 储存于 -20 °C 以备原位杂交; 滴膜晾干后储存于 -20 °C 以备斑点印迹。

**1.2.3 完整细胞蛋白质斑点印迹** 采用间接酶标抗体的免疫组化方法: 点膜标本经氯仿蒸气裂解细胞膜暴露细胞质内的蛋白质, 加 0.5% 吐温-20 °C/TBS(Tris-HCl pH 7.2) 封闭, 加各自的一抗, 0.01% 吐温-20 °C/TBS 洗 2 次, 加碱性磷酸酶标记的羊抗鼠或羊抗兔 IgG, 加 DAB/NBT-BCIP 底物液进行免疫组织化学显色, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

**1.2.4 TUNEL 法<sup>[4]</sup>** 分别取 4 组细胞滴片冷风吹 4 h, 蛋白酶 K 37 °C 消化 10 min, TdT buffer, Dig-dUTP, TdT 酶, 置于湿盒, 37 °C, 2 h 加抗 Dig 抗体复合物孵育后, BCIP/NBT 底物显色, 甲基绿复染。

**1.2.5 Ladder 电泳** 将 1% 琼脂糖凝胶放入电泳槽。上样: 取 DNA 样品 10  $\mu$ L 加入 2  $\mu$ L 上样缓冲液, 混匀后取出 10  $\mu$ L 加入凝胶样品池中, DNA marker 5  $\mu$ L。电泳条件: 电压 60 V, 根据指示剂的迁移情况判断是否终止电泳。采用美国 Sungene 公司凝胶成像分析系统进行凋亡分析。

**1.2.6 统计学分析** 对 Western blotting 的印迹应用薄层层析扫描仪(Shimadzu, 日本)进行扫描并对免疫组织化学染色标本, 应用图象分析仪(山富, 中国)扫描各标本的免疫反应信号的灰度值。用 SPSS 11.5 软件对以上数据进行统计学分析。

## 2 结果

**2.1 加味小柴胡汤对顺铂诱导肝癌细胞凋亡的影响** 各组细胞处理 48 h, 经 TUNEL 法检测, 空白组细胞凋亡率为 6%; 顺铂组 52%; 实验 1 组 58%; 实验 2 组 53%。结果提示加味

[收稿日期] 2006-10-31

[基金项目] 郑州市科技攻关计划(052SGYS33207)

[通讯作者] \* 刘应柯, Tel: 13663863198; E-mail: liuyingke153@sina.com

小柴胡汤大剂量可增强顺铂诱导的肝癌细胞凋亡, 而小剂量则不甚明显。

2.2 加味小柴胡汤对顺铂诱导肝癌细胞凋亡的调控作用  
经细胞免疫组化分析, 与空白组比, 顺铂组及实验 1, 2 组 Rb,

Caspase 3, Bax, wp53 扫描值均升高, Bcl-2, mp53 值降低。实验 1, 2 组 Rb Bax wp53 明显较顺铂组升高, Bcl-2, mp53 降低, 提示加味小柴胡汤通过调控细胞相关凋亡基因, 而达到增强顺铂抑制癌细胞作用。见表 1。

表 1 各组癌细胞凋亡蛋白斑点印迹扫描值对比

组别	CP 浓度(mg/L)	小柴胡汤 g/L	Rb	Caspase 3	Bax	Bcl-2	wp53	mp53
空白组	—	—	204 ± 18	148 ± 16	186 ± 17	216 ± 20 <sup>2)</sup>	196 ± 18 <sup>2)</sup>	276 ± 26 <sup>2)</sup>
顺铂组	5	—	219 ± 21	195 ± 21	220 ± 22	141 ± 16	268 ± 26	215 ± 23
实验 1 组	5	4	327 ± 29 <sup>2)</sup>	202 ± 22	247 ± 23 <sup>2)</sup>	112 ± 12 <sup>2)</sup>	287 ± 19	185 ± 17 <sup>1)</sup>
实验 2 组	5	2	307 ± 31 <sup>2)</sup>	189 ± 17	239 ± 21 <sup>1)</sup>	107 ± 10 <sup>2)</sup>	275 ± 22	204 ± 20 <sup>1)</sup>

注: 与顺铂组比较<sup>1)</sup> P < 0.05, <sup>2)</sup> P < 0.01。

### 3 讨论

顺铂是一种作用较强的广谱抗肿瘤药物, 主要是通过与肿瘤细胞的碱基作用而变构 DNA 形成加合物 pt-DNA, 改变其作为正常复制模板的功能, 引起 DNA 复制障碍, 使瘤细胞分裂障碍而死亡, 但这些加合物损伤细胞的机制尚不清楚, 而其诱导细胞凋亡可能是一种重要的作用机制。由于顺铂是一种周期非特异性化疗药, 能促进肿瘤细胞凋亡, 其疗效可随剂量的增加而增强, 但对机体的毒副作用也随之加大, 这就限制了它在临床上的大剂量使用<sup>[5]</sup>。曾有人试图采用保护剂抑制其毒性, 但结果反而使顺铂的抗癌活性有所下降<sup>[6]</sup>。虽有报道维生素 E 琥珀酸酯能减低顺铂所致的肝细胞毒性, 增强顺铂对癌细胞的抗增殖作用<sup>[7]</sup>, 但尚未见可靠的临床应用报道。本研究证实, 培养的肝癌 CBRH7919 细胞自然凋亡率仅有 6%, 用顺铂终浓度 5 mg/L 处理后凋亡率可达 52%, 而加味小柴胡汤大剂量可增强顺铂诱导的肝癌细胞凋亡率达 58%, 小剂量则凋亡率略有增加为 53%, 表明加味小柴胡汤对顺铂诱导的肝癌细胞凋亡有增强作用, 而加味小柴胡汤对顺铂诱导的正常肝细胞则可使凋亡率明显降低, 提示加味小柴胡汤可选择性抑制顺铂对正常肝细胞的损害, 增强对肝癌细胞的抑制和凋亡。

由于细胞凋亡是细胞在一定环境条件下, 由基因调控下的一个严密完整的程序过程, 是保证机体内外环境稳定的重要手段, 多种因素都可影响细胞凋亡的发生发展。Bcl-2 与 Bax 可通过形成同源或异源二聚体来调节细胞凋亡, 尽管细胞内 Bcl-2/Bax 的比值是固定的, 但外界刺激可以改变抑凋亡的 Bcl-2-Bax 与促凋亡的 Bax-Bax 的量发生改变; p53 基因为抑癌基因, 可分为 2 型: 一型为有抑制细胞增殖的野生型 (wp53), 可诱导细胞凋亡; 一型是具有突变能力的突变型 (mp53), 有抑制细胞凋亡作用<sup>[8]</sup>; p53 可同时上调 Bax, 下调 Bcl-2, 主要是通过作用于 Bcl-2 的启动子内的 Bcl-2 元件而下调 Bcl-2 的表达<sup>[9]</sup>。Caspase 3 是细胞凋亡进程中的效应分子, 各种引起细胞凋亡的因素如 Fas 死亡因子、肿瘤坏死因子等均需要激活 Caspase 3 才能发挥作用, 最终导致细胞不可逆凋亡<sup>[10]</sup>。

加味小柴胡汤可选择性增强顺铂诱导的肝癌细胞凋亡, 与其增强顺铂抑癌基因 Rb, wp53, Caspase 3, Bax 的表达, 促进顺铂对癌细胞增殖的抑制作用; 下调抑凋亡基因 Bcl-2, mp53

的表达, 因而增强癌细胞的凋亡。研究结果表明加味小柴胡汤有增强顺铂诱导的肝癌细胞促凋亡蛋白表达, 抑制抑凋亡蛋白表达的作用。

### [参考文献]

[ 1 ] 金航. 小柴胡汤预防肝癌的研究[ J ]. 国外医学( 中医中药分册 ), 1999, 21( 1 ): 21-23.

[ 2 ] 沈红梅, 黄杰. 加味小柴胡汤对癌症化疗患者肝功能保护作用的临床观察[ J ]. 云南中医中药杂志, 2005, 26( 6 ): 15-16.

[ 3 ] 刘应柯, 宫瑾瑾, 刘尚岭. 加味小柴胡汤对顺铂诱导大鼠肝 BRL 细胞过氧化损伤的保护作用[ J ]. 中医研究, 2006, 19( 12 ): 17-18.

[ 4 ] 王红梅, 郑乃刚, 吴景兰, 等. 8-Br-cAMP 和槲皮素对 Eca-109 细胞凋亡中 p38 和 Caspase-3 表达的影响[ J ]. 郑州大学学报( 医学版 ), 2003, 38( 5 ): 672-674.

[ 5 ] Robson H, Meyer S, Shalet SM, et al. Platinum agents in the treatment of osteosarcoma: Efficacy of cisplatin vs. carboplatin in human osteosarcoma cell lines[ J ]. Med Pediatr Oncol, 2002, 39: 573-580.

[ 6 ] Vermeulen N P E, Van de straat R, te Koppele Vije, et al. Molecular mechanisms in toxicology and drug design. In: Claasen V ed Trends In Drug Research, Pharmacchemistry [ J ]. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV, 1990, 13( 13 ): 253.

[ 7 ] 李秋娟, 卢永科, 仲来福. 维生素 E 琥珀酸酯体外防护顺铂肝细胞毒性并增强其抗肿瘤细胞增殖活性[ J ]. 中国药理学与毒理学杂志, 2004, 18( 3 ): 208-211.

[ 8 ] Ahn JY, Chung EY, Kwun, et al. Transcriptional repression of p21 (Waf1) promoter by hepatitis B virus X protein via a p53 independent pathway[ J ]. Gene, 2001, 275( 1 ): 163-168.

[ 9 ] 车晓芳, 罗颖. Bcl-2 和 Bax 调节细胞凋亡的研究[ J ]. 国外医学输血与血液学分册, 2001, 24( 2 ): 103-105.

[ 10 ] Kaya ss, Mahmood A., Li Y., et al. Apoptosis and expression of P53 response protein and cyclin D1 after cortical impact brain[ J ]. Brain Research, 1999, 818: 23-33.