

健脾补肾方对 615 小鼠前胃癌术后复发瘤细胞凋亡和线粒体膜电位的影响

吴 洁, 孙桂芝*, 唐晓颇, 李 杰, 祁 鑫, 裴迎霞
(中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

[摘要] 目的: 研究健脾补肾方对小鼠前胃癌术后复发瘤细胞凋亡和线粒体膜电位的影响。方法: 以 615 小鼠前胃癌术后模型为对象, 应用健脾补肾方, 观察抑制术后复发的作用, 应用流式细胞仪检测复发瘤的细胞凋亡的水平和线粒体膜电位。结果: 与模型组比较, 健脾补肾组复发瘤重显著降低, 复发瘤抑制率为 71.07%; 复发瘤凋亡指数显著增高; 复发瘤细胞线粒体膜电位(MMP)显著降低。以上各项指标均 $P < 0.01$ 。结论: 健脾补肾方对术后局部肿瘤复发有明显的抑制作用, 导致复发瘤细胞线粒体膜电位降低, 从而诱导肿瘤细胞凋亡。

[关键词] 健脾补肾方; 复发; 线粒体膜电位; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)04-0025-03

[收稿日期] 2006-02-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30271656)

[通讯作者] * 孙桂芝, Tel: (010) 88001192; E-mail: wujielily@163.com

Effect of Jianpi Bushen Formula on the Apoptosis and Level of Mitochondrial Membrane Potential in 615 Murine with Cancer Cell Line MFC after Surgical Operation

WU Jie, SUN Gui-zhi^{*}, TANG Xiao-po, Li Jie, QI Xin, PEI Ying-xia

(Guanganmen Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine Sciences, Beijing 100053)

[**Abstract**] **Objective:** To study the inducing effect of Jianpi Bushen Formulation (JPBS) on apoptosis and the level of mitochondrial membrane potential (MMP) in 615 murine with MFC after surgical operation. **Methods:** 615 murine with MFC after surgical operation was adopted as animal model. JPBS were orally delivered to the animals for therapy. The effects were evaluated by inhibition of local recurrence tumor. Apoptosis and the level of MMP of those was detected respectively using flow cytometry (FCM). **Results:** After treatment, the weight of recurrence tumor of JPBS group was obviously lower than that of model group. The inhibition rate of recurrence tumor of JPBS group was 71.07%. Apoptotic index of JPBS group was obviously higher than that of model group. The MMP level of JPBS group was obviously lower than that of model group. (all $P < 0.01$) **Conclusions:** JPBS were effective for local recurrence tumor after resection of primary tumor. The MMP level of local recurrence tumor may be degraded, and apoptosis of that may be induced by JPBS.

[**Key words**] Jianpi bushen formula; recurrence; mitochondrial membrane potential; apoptosis

胃癌是我国各种恶性肿瘤中发病死亡率最高的, 手术是治疗胃癌的首选方案, 但术后复发转移则高达 80%^[1]。因此在抑制胃癌术后复发和转移的研究及预防性治疗将是 21 世纪重点课题之一。健脾补肾方是广安门医院肿瘤科针对胃癌患者手术治疗之后的特点制定的以健脾补肾为治则, 经过多年临床辨证用药、对比观察筛选而精制的方药, 其在胃癌术后防治中的疗效确切。本实验在过去实验和临床研究基础上, 进一步采用小鼠前胃癌术后模型, 即在小鼠的足垫皮下移植肿瘤细胞后, 待原发瘤生长到一定大小时手术切除原发瘤后, 应用健脾补肾方进行治疗, 观察其对局部复发的抑制作用及对复发瘤线粒体膜电位和凋亡的作用机制进行研究。

1 材料

1.1 实验动物 清洁级近交系 615 小鼠 (6~7)w, 雌雄各半, 体重 (18~24)g, 购自中国医学科学院药鉴所实验动物中心许可证号: SCXK 京 2000-0010 号。

1.2 瘤株 小鼠前胃鳞癌细胞 (MFC), 中国医学科学院基础医学研究所病理室用甲基亚硝胺灌胃诱发而成, 移植率 100%, 传代品系近交系 615 小鼠, 中国医学科学院基础医学研究所病理室提供。

1.3 药物 健脾补肾方 (生晒参、白术、枸杞子、女贞子等按 1:1.5:1.5:1.5 水煎浓缩制备) 由中国中医科学院广安门医院制剂中心提供。氟脲嘧啶注射液: 10 mL, 0.25 g/支, 由上海旭东海普药业有限公司生产 (批号: 041008)。

1.4 试剂 Annexin V-FITC 试剂盒, 北京宝赛生物技术有限公司; 碘化丙啶 Sigma 公司; 罗丹明 123, Sigma 公司。

1.5 仪器 FACSort 流式细胞仪, 美国 Becton Dickinson 公司生产。

2 方法

2.1 建立术后复发动物模型^[2] 从液氮中复苏小鼠前胃癌细胞 (MFC), 接种于数只 615 小鼠右腋下, 待局部肿瘤长至 8~12 d 时处死动物, 无菌取出新鲜生长良好无坏死的肿瘤组织, 用生理盐水洗净后, 剪碎, 加生理盐水用玻璃匀浆器研磨成单细胞悬液, 过 200 目不锈钢筛网, 调整细胞数为 4×10^6 /mL, 取 0.05 mL 瘤细胞悬液接种于每只 615 小鼠左侧后足垫内侧皮下。足垫皮下肿瘤 10 d 生长明显, 切除局部原发瘤, 原发瘤切除后, 体内仍有残存瘤细胞存在, 与临床肿瘤患者在进展期手术切除后的情况相似。

2.2 实验分组 切除原发瘤后, 采用随机数字表将 30 只小鼠随机分为 3 组, 每组 10 只。模型对照组: 从术后当日开始, 每天给生理盐水 0.3 mL, 连续灌胃 15 d。化疗组: 从术后当日开始给予氟脲嘧啶注射液, 20 mg/kg 腹腔注射 0.2 mL, 每天 1 次, 连续 7 d。同时从术后当日开始, 每天给生理盐水 0.3 mL, 连续灌胃 15 d。健脾补肾方组: 从术后当日开始给予健脾补肾方 20 g 生药/kg, 每天灌胃 1 次 (相当于成人临床用量的 15 倍), 连续灌胃 15 d。共进行 3 批实验, 第 2 3 批实验分组和给药方法同第 1 批实验。

2.3 计算荷瘤小鼠术后复发瘤重抑制率 术后 15 d, 颈椎脱臼处死全部小鼠, 从小鼠荷瘤左下肢剥离复发瘤称重, 计算抑瘤率。复发瘤重抑制率 = $(1 - \frac{\text{治疗组瘤重}}{\text{对照组瘤重}}) \times 100\%$

2.4 制备复发灶肿瘤组织单细胞悬液 取小鼠复发灶肿瘤组织, 剪成小块, 研磨, 经 300 目筛网过滤, 用 3 mL 生理盐水洗 2 次, 离心 10 min (1 000 r/min)。再加 PBS 液悬浮细胞, 调整细胞数 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。单细胞悬液分成 2 管 500 μL , 分别进行下列测定。

2.5 采用 Annexin V-FITC 试剂盒加 PI 染色, 用流式细胞仪测定细胞凋亡^[3] 取制备的单细胞悬液离心弃上清, 加 200 μL $1 \times$ Bind Buffer, 轻振混匀; 加 AV-FITC 5 μL , PI 10 μL 双染, 混匀孵育, 室温 15 min; 加 PBS 300 μL ; 过滤, 1 h 内上流式细胞仪测定结果。

2.6 荧光探针标记, 流式细胞仪测定复发瘤细胞内线粒体膜电位^[3] 取制备的单细胞悬液, 加入 Rhodamine 123 15 μL (终浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱孵育 30 min, 加 2 mL PBS 洗 3 遍; 加 0.5 mL PBS, 过滤, 流式细胞仪测定平均荧光强度。

2.7 统计方法 采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析, 计量资料采用单因素方差分析。

3 实验结果

3.1 健脾补肾方对术后复发瘤的抑制作用 局部复发瘤是指前胃癌细胞在足垫皮下接种后 10 d, 从踝关节处切除局部原发瘤后, 少量残存的瘤细胞又在手术部位不断增殖生长而形成局部复发瘤。实验结果表明健脾补肾方和化疗药均可明显降低前胃癌在 615 小鼠下肢局部复发。说明健脾补肾方对术后局部肿瘤复发有明显的抑制作用。见表 1。

表 1 健脾补肾方对 615 小鼠前胃癌术后 15 d 复发瘤抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	体重 (g)	复发瘤重 (g)	复发瘤抑制率 (%)
模型组	20.31 \pm 2.16	1.21 \pm 0.43	
化疗组	21.20 \pm 2.03	0.26 \pm 0.12 ²⁾	78.51
健脾补肾组	22.17 \pm 1.67 ¹⁾	0.35 \pm 0.15 ²⁾	71.07

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。(下同)

3.2 健脾补肾方诱导术后复发瘤细胞凋亡 实验结果表明健脾补肾方有诱导术后复发瘤细胞凋亡的作用。见表 2。

3.3 健脾补肾方对术后复发瘤细胞线粒体膜电位 (MMP) 的影响 实验结果表明健脾补肾方可以降低术后复发瘤细胞线粒体膜电位。见表 2。

表 2 各组复发瘤 AV-PI 标记细胞凋亡指数

组别	复发瘤凋亡指数 (%)	$\Delta\psi_m$
模型组	1.63 \pm 1.20	129.89 \pm 42.51
化疗组	6.76 \pm 5.46 ¹⁾	96.08 \pm 38.46
健脾补肾组	7.25 \pm 4.83 ²⁾	56.82 \pm 16.70 ²⁾

4 讨论

近年来, 细胞凋亡的研究重点已从细胞核转向线粒体。各种死亡信号诱导线粒体膜通透性改变孔 (PT pore) 开放, 引起线粒体跨膜电位 (MMP) 下降, 导致促凋亡物质释放, 继而激活半胱天冬酶, 最终使细胞凋亡。细胞凋亡与肿瘤发生、发展的关系为抗癌药物的研究提供了新的药理学机制和新靶点。

长期服用健脾补肾方对术后局部肿瘤复发确有明显的抑制作用。因此, 我们提出健脾补肾方防治胃癌术后复发转移机理之一可能在于诱导肿瘤细胞凋亡的假说。实验中所采用的 Annexin V 是目前公认的灵敏、高效的凋亡细胞的检测方法。它是一种磷脂结合蛋白, 可以与早期凋亡细胞的胞膜结合, 而细胞膜的改变是细胞发生凋亡时最早的改变之一。实验结果证实, 健脾益肾方对荷瘤小鼠术后复发灶具有诱导细胞凋亡的作用。为了进一步明确其作用靶点何在, 我们又瞄准了线粒体这条凋亡途径的起点——MMP 的变化。研究发现, MMP 是细胞能量产生的先决条件, 而 MMP 的变化是细胞凋亡的一个早期特征, 是细胞凋亡不可逆转的标志^[4]。实验结果表明, 健脾补肾方明显使术后复发瘤细胞 MMP 降低, 进一步阐明了我们的假说。

细胞凋亡是一个复杂而精致的调控网络, 凋亡精确的生化机制及其不同的信号传导途径的调控仍有很多问题需要进一步了解。中药复方的特点是多成分、多器官、多系统、多效应, 因此作用机制可能是多方面的。我们的研究工作还在不断深入, 但是细胞凋亡及其调控机制的研究为探求预防胃癌复发和转移的新方法具有光明的前景。

[参考文献]

[1] 王奇璐. 胃肠癌诊断治疗学[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2002. 247.
 [2] 刘玉琴, 赵雪梅, 顾蓓, 等. 金龙胶囊和蛇毒对小鼠子宫颈癌(U14)抗复发和转移的观察[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2000, 7(5): 4-7.
 [3] 彭黎明, 王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 164-170.
 [4] Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondria membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis: an update [J]. Apoptosis, 2003, 8: 115-128.