

# 扶正抑瘤颗粒药物血清诱导小鼠肝癌细胞凋亡及其机制的研究

赵健雄,程卫东,徐瑞峰,李元青

(兰州医学院中西医结合研究所,甘肃 兰州 730000)

**[摘要]** 目的:研究中药复方扶正抑瘤颗粒药物血清对小鼠肝癌 H22 细胞凋亡的影响及其作用机制。方法:采用扶正抑瘤颗粒药物血清,温育体外培养的 H22 小鼠肝癌细胞。流式细胞仪进行细胞周期分析,检测凋亡率;透射电镜观察细胞超微结构变化;链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(streptavidin-biotin peroxidase complex, SABC)免疫细胞化学法观察凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的变化。结果:扶正抑瘤颗粒药物血清可影响细胞周期,使小鼠肝癌 H22 细胞的增殖阻滞在 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 期,并可测到凋亡峰,同时可下调 Bcl-2 蛋白的表达,上调 Bax 蛋白的表达(扶正抑瘤颗粒药物血清组与空白对照组比较,  $P < 0.05$ )。结论:扶正抑瘤颗粒可通过影响细胞生长周期,调节 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达诱导小鼠肝癌细胞凋亡。

**[关键词]** 扶正抑瘤颗粒;细胞凋亡;细胞周期;原癌基因蛋白质 c-bcl-2; Bax

**[中图分类号]** R735.7; R286.91 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1997(2005)04-0278-04

## Effects of Fuzheng Yiliu Granule-medicated serum on apoptosis of liver cancer cells from mice and its mechanism

ZHAO Jian-Xiong, CHENG Wei-Dong, XU Rui-Feng, LI Yuan-Qing

(Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Lanzhou Medical College, Lanzhou, Gansu Province 730000, China)

**ABSTRACT** Objective: To study the effects of Fuzheng Yiliu Granule (FZYLG)-medicated serum on apoptosis of liver cancer cells H22 from mice and its mechanism. Methods: Liver cancer cells H22 from mice were incubated in culture media containing sera from rabbits medicated with different doses of FZYLG. Flow cytometry was used to examine the cell cycle and analyze the apoptotic rate of the H22 cells. The morphological changes of the H22 cells were observed by transmission electron microscope and the apoptosis related proteins Bcl-2 and Bax were examined by streptavidin-biotin peroxidase complex (SABC) method. Results: FZYLG-medicated serum could influence the cell cycle and stop the proliferation of H22 cells at the G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> phase with apoptotic peak being detected. In culture media with FZYLG-medicated sera, the expression of Bcl-2 decreased while that of Bax increased as compared with that in culture medium with non-medicated serum ( $P < 0.05$ ). Conclusion: FZYLG-medicated serum can induce apoptosis of the liver cancer cells H22 by influencing the cell cycle, down-regulating the expression of Bcl-2 and up-regulating the expression of Bax.

**KEY WORDS** Fuzheng Yiliu Granules; apoptosis; cell cycle; proto-oncogene proteins c-bcl-2; Bax

J Chin Integr Med, 2005, 3(4): 278-281

抑制肿瘤细胞生长和促进其凋亡是许多抗肿瘤药物的作用机制之一。我们研制的扶正抑瘤颗粒具有扶正祛邪、化痰解毒之功效。体内实验和临床研

究发现,该药有较好的抗癌作用<sup>[1,2]</sup>,但对其抗癌机制尚缺乏深入研究。本文通过血清药理学方法,进一步观察该药对小鼠肝癌 H22 细胞的抑制作用,并

**[基金项目]** 国家教育部重点资助项目(No.01128)

**[作者简介]** 赵健雄(1942-),男,硕士,教授。

Correspondence to: Prof. ZHAO Jian-Xiong. E-mail: ZhaoJX-01@126.com

从分子、细胞学水平探讨其抗癌机制。

## 1 材料与方 法

1.1 实验动物 纯种新西兰家兔 20 只,雄性,体质量 1.8~2.5 kg,中国兰州生物制品研究所动物室提供,合格证号 14-004;清洁级昆明种小鼠 20 只,体质量 18~22 g,兰州医学院动物实验中心提供,合格证号 14-005。

1.2 药物 扶正抑瘤颗粒 (Fuzheng Yiliu Granules, FZYLG)由红芪、当归、墓头回、莪术按 3:1:3:1 的比例组方,甘肃省药材公司提供生药,兰州佛慈制药厂按标准工艺制成浓缩颗粒,烘干后装袋,9 g 袋(相当于生药 30 g)。复方天仙胶囊 (Tianxian Capsules),0.25 g 粒,吉林通化长白山药业股份有限公司生产,批号 03010543。

1.3 仪器与试剂 CO<sub>2</sub> 培养箱,日本三洋电机株式会社产品;流式细胞仪,美国 Becton Dickinson 公司产品;倒置相差显微镜和普通光学显微镜,日本 Olympus 公司产品;JEM 100CX 透射电子显微镜,日本电子株式会社产品;RPMI 1640 培养基,美国 GIBCO 公司产品;小牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司产品;碘化丙啶, Triton-X 100, RNase A 均为 Sigma 公司产品;链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (streptavidin-biotin peroxidase complex, SABC) 法免疫组化试剂盒及多克隆抗体,武汉博士德公司产品。

1.4 细胞培养 小鼠肝癌 H22 细胞由兰州医学院药理学教研室惠赠。常规接种于昆明种小鼠腹腔保种。实验前,取腹腔接种 7 d 的小鼠乳白色腹水,用 PBS 液漂洗 1 次后调整细胞浓度为  $(1 \sim 5) \times 10^5$  / ml,转种于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 完全培养基中(内含青霉素、链霉素各 100 U / ml),于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.5 药物血清制备 纯种新西兰家兔 20 只,随机分成 5 组:空白对照组、FZYLG 大、中、小剂量组和天仙胶囊组。空白对照组予以灌服生理盐水;FZYLG 大、中、小剂量组分别按 9、4.5、2.25 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 予以 FZYLG 灌胃(FZYLG 中剂量 = 临床常用量 × 动物等效面积系数 × 培养基内血清稀释度;大剂量 = 中剂量 × 2;小剂量 = 中剂量 / 2);天仙胶囊组予以复方天仙胶囊 0.375 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 灌胃(按人体等效剂量 × 培养基内血清稀释度计算)。各组均每日分 2 次等体积灌胃(灌药前禁食 4 h,自由取水),共 3 d。于末次灌胃后 2 h 心脏采血,室温下静置 4 h,2 400 r / min 离心

10 min,分离血清,0.22 μm 微孔滤膜无菌过滤后,置 -20℃ 冰箱保存备用。

1.6 细胞周期及凋亡分析 取对数生长期细胞,用空白 RPMI 1640 培养基调整细胞浓度至  $5 \times 10^5$  / ml,加样于 24 孔板,分别加入各组血清至终浓度为 20%。常规培养 72 h 后收集各孔细胞于离心管中,用 PBS 液离心漂洗 2 次,震荡混匀后,沿管壁缓慢加入 75% 的冷酒精固定,4℃ 过夜。测试前用 PBS 液洗去乙醇,加入 RNA 酶、Triton-100 和碘化丙啶混合液,避光染色 30 min,流式细胞仪检测,采用 Multicycle DNA content and cell cycle analysis 软件进行数据处理。

1.7 细胞超微结构观察 收集对数生长期细胞,用 RPMI 1640 培养基调整浓度为  $2 \times 10^6$  / ml,接种于 24 孔培养板中,分别加入不同组的药物血清和空白对照组血清,使其终浓度为 20%,常规培养 72 h 后收集细胞于离心管中,1 000 r / min 离心 5 min,弃去上清,沿管壁缓慢加入 3% 的戊二醛,4℃ 固定过夜,后经 1% 锇酸固定,环氧树脂 Epon812 包埋,超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅双染色,用 JEM100-CX 透射电子显微镜观察并摄片。

1.8 细胞凋亡相关蛋白检测 载玻片用 10% 的多聚赖氨酸作防脱处理。细胞培养 72 h 后,各组分别收集细胞悬液,500 r / min 离心 5 min,弃去上清,500 μl PBS 液重悬细胞,使细胞浓度为  $1 \times 10^5$  / ml,离心涂片机涂片,室温干燥。纯丙酮室温固定 20 min。纯甲醇 50 份 + 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 份,室温下浸泡 30 min,以灭活内源性过氧化物酶。一抗均用 PBS 液按 1:100 的比例稀释,其余步骤严格按试剂盒说明进行。苏木素轻度复染,梯度脱水,常规封片。将 PBS 液代替一抗按上述步骤操作,作为阴性对照,用已知阳性切片作为阳性对照。

1.9 统计学方法 所有实验数据均采用 SPSS 10.0 进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用方差分析的组间比较法,等级资料采用秩和检验。

## 2 结 果

2.1 细胞周期及凋亡分析 FZYLG 药物血清作用 72 h 后,与空白对照组比较,S 期、G<sub>2</sub>/M 期细胞减少,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞增多,细胞增殖指数降低,尤以中、大剂量组变化显著 ( $P < 0.01$ )。各用药组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期前出现了亚二倍体峰,即凋亡峰 (apoptotic peak, AP),随着用药剂量的增大,细胞凋亡率增加,FZYLG 小、中、大剂量组与空白对照组比较有统计学意义 ( $P < 0.01$ );与天仙胶囊组比较,FZYLG 小、中剂量组无统计学意义,而 FZYLG 大

剂量组则有统计学意义(  $P < 0.05$  )。见表 1。

2.2 细胞凋亡的超微结构观察 不同血清作用 72 h 后,在透射电子显微镜下观察。非药物血清培养的细胞,胞膜、核膜完整,微绒毛丰富,细胞器正常;药物血清培养的细胞,可见部分细胞染色质固缩并凝结成块状,聚集在核膜周边,细胞浆浓缩,基质消失,内质网疏松,胞浆内空泡形成,部分细胞核发生碎裂。见图 1、图 2。

2.3 Bcl-2、Bax 蛋白表达的变化 Bcl-2、Bax 阳性

表达细胞可见明显的棕黄色细胞轮廓及黄染的胞浆。判断标准参照生秀杰<sup>[3]</sup>法:阴性(-):标本中无阳性细胞着色;阳性(+):标本中阳性细胞数  $< 50\%$ ;强阳性(++):标本中阳性细胞数  $\geq 50\%$ 。结果显示:H22 细胞经药物血清作用后,FZYLG 各剂量组 Bcl-2 阳性反应物强度明显降低,染色变浅,而 Bax 阳性细胞数则明显增加,染色加深,说明 Bcl-2 阳性表达率降低而 Bax 蛋白表达增加,与空白对照组比较,有统计学意义(  $P < 0.05$  )。见表 2。

表 1 不同培养条件对 H22 细胞细胞周期及凋亡的影响

Tab 1 Effects of different culture media on cell cycle and apoptosis of H22 cells

Culture medium	n	Apoptotic rate	G <sub>0</sub> / G <sub>1</sub> phase	S phase	( $\bar{x} \pm s, \%$ )
					G <sub>2</sub> / M phase
With non-medicated serum	8	5.5 ± 1.3	66.5 ± 5.7	23.0 ± 2.8	11.2 ± 1.2
With low-dose FZYLG-medicated serum	8	25.5 ± 4.7	67.2 ± 6.4	23.2 ± 2.4**	8.8 ± 3.7**
With medium-dose FZYLG-medicated serum	8	30.9 ± 4.1	72.8 ± 4.3	19.3 ± 3.9**	7.6 ± 3.1**
With high-dose FZYLG-medicated serum	8	39.6 ± 5.9*	78.6 ± 6.1	16.8 ± 2.1**	3.7 ± 1.3**
With Tianxian Capsule-medicated serum	8	31.1 ± 4.2	70.9 ± 4.1	3.1 ± 1.8	25.9 ± 5.5

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , vs culture medium with Tianxian Capsule-medicated serum;  $P < 0.01$ , vs culture medium with non-medicated serum

表 2 不同培养条件对 H22 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

Tab 2 Effects of different culture media on expressions of Bcl-2 and Bax in H22 cells

Culture medium	Bcl-2					Bax				
	-	+	++	u	P	-	+	++	u	P
With non-medicated serum	3	3	9			11	1	3		
With low-dose FZYLG-medicated serum	4	3	8	103.5	$> 0.05$	10	4	1	110.5	$> 0.05$
With medium-dose FZYLG-medicated serum	5	9	1	58.5	$< 0.05$	5	4	6	70.5	$> 0.05$
With high-dose FZYLG-medicated serum	7	7	1	52.5	$< 0.05$	2	3	10	44.5	$< 0.05$
With Tianxian Capsule-medicated serum	5	3	7	94.5	$> 0.05$	5	5	5	71.0	$> 0.05$

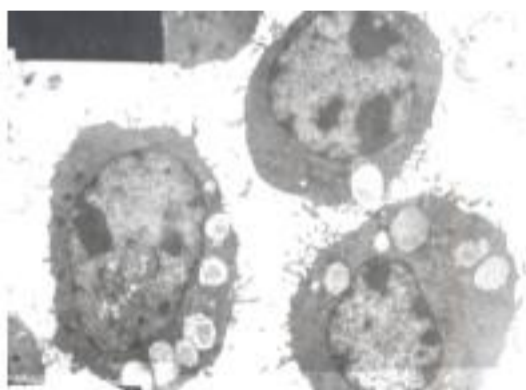


图 1 电镜下空白对照组细胞超微结构(  $\times 4000$  )  
Fig 1 Ultrastructure of cells cultured in medium with non-medicated serum examined by an electron microscope (  $\times 4000$  )

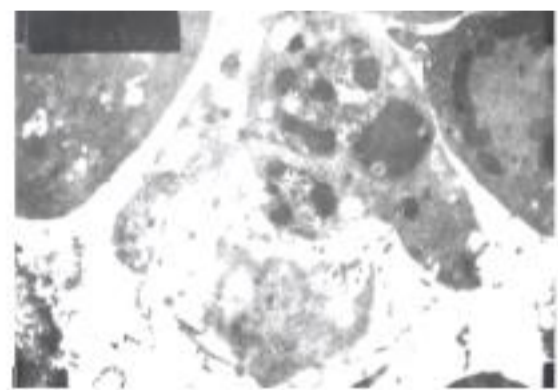


图 2 电镜下 FZYLG 中剂量组细胞超微结构(  $\times 4000$  )  
Fig 2 Ultrastructure of cells cultured in medium with medium-dose FZYLG-medicated serum examined by an electron microscope (  $\times 4000$  )

### 3 讨论

越来越多的研究表明,肿瘤的发生不仅与细胞增殖异常有关,亦与细胞的凋亡异常密切相关。因此,细胞凋亡被视为评估疗效的一项新指标<sup>[4]</sup>。近

年来的研究发现,传统中药具有诱导癌细胞凋亡的作用,但大多集中于单味中药及中药有效成分抗癌效应的研究。中药复方具有“天然组合化学库”之称,其作用机制可能是“多靶点”的<sup>[5]</sup>,而细胞凋亡的发生又是多因素、多基因、多层次级联作用的结果,

因此复方中药较单一成分药物更有可能干预、影响细胞凋亡的调控。

细胞凋亡受多种基因的调控,有众多凋亡基因参与凋亡过程。Bcl-2 是一种新型的原癌基因,Bcl-2 蛋白对不同因素引起的细胞凋亡均有抑制作用,它在各种正常细胞的激发和发育过程中表达,而在成熟或走向凋亡的细胞中不表达或低表达。与 Bcl-2 相关的蛋白 Bax 可拮抗 Bcl-2 的功能,加速细胞凋亡,它能和 Bcl-2 形成异源二聚体抑制凋亡,而其自身还能形成同源二聚体诱导凋亡<sup>[6]</sup>。本实验发现:体外培养的小鼠肝癌 H22 细胞经 FZYLG 药物血清处理后,流式细胞仪可测到细胞凋亡峰,且随着用药剂量的增大,细胞凋亡率增加,同时,细胞增殖周期受到抑制,表现为 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞增多,S 期、G<sub>2</sub>/M 期细胞减少。电镜下可见到 FZYLG 组细胞呈典型的凋亡形态学改变,表现为染色质浓缩,细胞核碎裂,空泡形成;SABC 法检测发现其 Bcl-2 蛋白的表达降低,Bax 蛋白的表达增加,二者比例下调,表明细胞发生了凋亡,与空白对照组比较,有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

FZYLG 中红芪、当归益气养血以扶正,墓头回、莪术活血化瘀、利湿解毒以祛邪,起到扶正抑瘤的功效。红芪为豆科植物多序岩黄芪(*Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz.)的干燥根,效同黄芪,其有效成分黄芪总苷可诱导人肝癌 HepG2 细胞与 Bel-7402 细胞凋亡<sup>[7]</sup>。当归的有效成分当归多糖能增强正常及免疫抑制小鼠的非特异性免疫功能,抑制小鼠移植性肿瘤的生长,延长生存时间<sup>[8]</sup>。莪术有效成分榄香烯能明显抑制白血病细胞 K562 的增殖,使 Bcl-2 的表达下降,并诱导 K562 细胞凋亡<sup>[9]</sup>。墓头回(*Patrinia heterophylla* Bunge.)之有效成分-丁香烯、环烯醚萜苷具有抗艾氏腹水癌和全面提高小鼠机体免疫功能的作用<sup>[10]</sup>。这些研究结果均为探讨该方抗肿瘤机制提供了一定的依据。

血清药理学方法在中药研究中具有明显的优势,所获实验结果与在体实验有较好的一致性,不仅能反映中药及其可能的代谢产物的药理(效)作用,还能反映可能由药物诱导的机体内源性成分所产生的作用,某种程度上也克服了中药本身理化性质不

确定对实验的干扰,尽管在某些方面还存在争议,但却大大提高了中药复方研究的科学性和可信度。本实验将血清药理学方法与细胞凋亡研究方法有机结合起来,采用 FZYLG 药物血清温育体外培养的小鼠肝癌 H22 细胞,研究该方对体外培养小鼠肝癌 H22 细胞凋亡的影响及其作用机制。实验结果表明:FZYLG 药物血清具有诱导体外培养的小鼠肝癌 H22 细胞凋亡的作用,而影响细胞增殖周期及调节 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达可能是其诱导细胞凋亡的机制之一。

[参考文献]

- 1 戴恩来,赵健雄,朱玉真,等.扶正抑瘤汤对肿瘤细胞周期及端粒酶影响的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2001,21(10):760-762.
- 2 赵健雄,曲勇,陈学忠,等.扶正抑瘤颗粒对食管癌、胃癌组织细胞周期及核转录因子的影响[J].中国中西医结合杂志,2003,23(12):908-910.
- 3 生秀杰,宋和存,何秀琴.抗凋亡基因 Bcl-2 在子宫内膜癌的表达及意义[J].中华肿瘤杂志,1998,20(5):365-366.
- 4 Alison MR, Sarraf CE. Apoptosis: regulation and relevance to toxicology [J]. Hum Exp Toxicol, 1995, 14(3): 234-247.
- 5 周俊.中药复方——天然组合化学库与多靶作用机理[J].中国中西医结合杂志,1998,18(2):67.
- 6 Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, et al. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2 [J]. Am J Pathol, 1994, 145(6): 1323-1336.
- 7 杨雁,陈敏珠.黄芪总苷对肝癌细胞凋亡及 wtp53 基因表达的影响[J].中国药理学通报,2001,17(4):447-451.
- 8 杨铁虹,卢保华,贾敏,等.当归多糖对小鼠免疫功能的影响[J].中国药理学通报,2003,19(4):448-451.
- 9 袁静,顾振伦,周文轩,等.榄香烯诱导人白血病 K562 细胞凋亡及调控 Bcl-2 蛋白的表达[J].中国药理学报,1999,20(2):103-106.
- 10 唐清秀.墓头回对小鼠免疫功能的影响[J].中国中医基础医学杂志,1998,4(4):27-28.

[收稿日期] 2004-12-28 [本文编辑] 黄文华 周庆辉