

扶正抑瘤颗粒对小鼠肝癌 H22 细胞 凋亡率及线粒体膜电位的影响

赵健雄, 郭芙莲, 白德成, 王学习

(兰州大学中西医结合研究所, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] 目的: 观察扶正抑瘤颗粒对小鼠肝癌 H22 细胞凋亡率及线粒体膜电位的影响。方法: 48 只荷瘤小鼠随机分为模型组、环磷酰胺治疗组、扶正抑瘤颗粒大剂量治疗组和扶正抑瘤颗粒小剂量治疗组, 分别予以相应药物治疗 14 d。碘化丙啶染色, 流式细胞术检测各组小鼠肝癌 H22 细胞的凋亡率。采用荧光探针罗丹明 123 负载, 激光扫描共聚焦显微镜下观察 H22 细胞的荧光强度, 分析 H22 细胞线粒体膜电位的大小。结果: 扶正抑瘤颗粒可以提高小鼠肝癌 H22 细胞的凋亡率, 降低 H22 细胞的线粒体膜电位, 与模型组比较, 差异有统计学意义。结论: 扶正抑瘤颗粒的抗肿瘤机制可能与降低肿瘤细胞线粒体膜电位, 诱导肿瘤细胞凋亡有关。

[关键词] 扶正抑瘤颗粒; 癌, 肝细胞; 细胞凋亡; 线粒体膜电位

[中图分类号] R246.6 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2006)03-0271-04

Effects of Fuzheng Yiliu Granules on apoptotic rate and mitochondrial membrane potential of hepatocellular carcinoma cell line H22 from mice

Jian-Xiong ZHAO, Fu-Lian GUO, De-Cheng BAI, Xue-Xi WANG

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

ABSTRACT Objective: To evaluate the effects of Fuzheng Yiliu Granules (FZYLG) on apoptotic rate and mitochondrial membrane potential (ψ_m) of hepatocellular carcinoma cell line H22 from mice . Methods: Forty-eight mice inoculated with H22 cells were randomly divided into four groups: untreated group, cyclophosphamide-treated group, high-dose FZYLG-treated group and low-dose FZYLG-treated group . After 14 days of corresponding treatment, H22 cells in each group were stained with propidium iodide, and the apoptotic rates were detected by flow cytometry (FCM) . The rhodamine 123 was used as a fluorescence probe to label the H22 cells, and the fluorescence intensities were observed with laser scanning confocal microscope . The fluorescence intensity of H22 cells indicated the ψ_m of H22 cells . Results: FZYLG could significantly increase the apoptotic rate while reduce the ψ_m of H22 cells from mice as compared with those in the untreated group . Conclusion: The antitumor effects of FZYLR on H22 cells from mice are related to decreasing the ψ_m and then inducing the apoptosis of the H22 cells .

KEY WORDS Fuzheng Yiliu Granules; carcinoma, hepatocellular; apoptosis; mitochondrial membrane potential

Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao / J Chin Integr Med, 2006, 4(3): 271-274 www.jcimjournal.com

扶正抑瘤颗粒 (Fuzheng Yiliu Granules, FZYLG) 具有扶正祛邪、化瘀解毒的功效。体内外

[基金项目] 教育部科学技术研究重点资助项目 (No. 01128)

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

实验已证实, FZYL G 具有较好的抗肿瘤作用^[1,2]。为了进一步阐明其作用机制, 本实验采用流式细胞仪检测 FZYL G 治疗后小鼠肝癌 H22 细胞的凋亡率, 并采用激光扫描共聚焦显微成像技术检测 H22 细胞线粒体膜电位的变化, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 健康昆明种小鼠, 体质量(18 ± 2) g, 由卫生部兰州生物制品研究所实验动物饲养中心提供。

1.2 细胞株 小鼠肝癌 H22 细胞株, 自中国医学科学院北京药物研究所引进, 本所传代保种。

1.3 药品 扶正抑瘤颗粒由红芪、当归、莪术、墓头回按 3 1 1 3 组方, 生药购自甘肃省药材公司, 由兰州佛慈制药有限公司制成浓缩颗粒, 批号 040816, 9 g 袋(相当于生药 30 g)。注射用环磷酰胺, 由上海华联制药有限公司生产, 批号 040606, 200 mg 支。

1.4 主要仪器与试剂 主要仪器: EPICS XL4 流式细胞仪(美国 Beckman-Coulter 公司产品); TCS SP2 激光扫描共聚焦显微镜系统(德国 Leica 公司产品); 普通光学显微镜(日本 Olympus 公司产品); TGL-40B 离心机(上海安亭科学仪器厂产品); DK-98- 型电子恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司产品); DHG 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司产品); BL3100 型(精确度 0.1 g)和 BP221S 型(精确度 0.1 mg)电子天平。主要试剂: 碘化丙啶(美国 Beckman-Coulter 公司产品); 罗丹明 123(美国 Eugene 公司产品); 其余试剂均为国产分析纯。

1.5 接种瘤株 健康昆明种小鼠 48 只, 雌雄各半, 置于室温(23 ± 2) 的动物室中自由进食饮水, 适应 3 d 后, 接种瘤株。常规消毒, 从 H22 传代小鼠腹腔抽取含 H22 细胞的乳白色瘤液, 用生理盐水稀释至瘤细胞计数约 12×10^6 个/ml, 小鼠腹腔接种瘤液 0.2 ml/ 只。

1.6 动物分组与给药 48 只小鼠随机分为 4 组, 每组 12 只: (1) 模型组: 生理盐水 $15 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃; (2) FZYL G 大剂量治疗组: FZYL G $24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃; (3) FZYL G 小剂量治疗组: FZYL G $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃; (4) 环磷酰胺治疗组: 环磷酰胺 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔注射^[3]。各组小鼠均于接种瘤株 24 h 后开始给药, 1 次/d, 连续 14 d。

1.7 流式细胞仪样本制备 治疗结束后第 1 天, 抽取各组小鼠腹水 1 ml, 加入 3 ml 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4), 混匀成瘤细胞悬液。取瘤细胞悬液 200 μl , 加入 75% 乙醇 0.5 ml, 4 固定 12 h。加磷酸盐缓冲溶液洗涤, 1 000 r/min 离心 10 min, 重复 3 次, 弃上清。

瘤细胞计数 $> 1 \times 10^6$ 个/ml, 取瘤细胞悬液 50 μl 加入碘化丙啶 1 ml, 染色 30 min, 上机检测。

1.8 H22 细胞凋亡率测定 采用流式细胞仪检测, 计数 5 000 个细胞, 用 Multicycle 软件进行数据分析。测定前用鸡红细胞校准仪器, 使其变异系数 $< 4\%$ 。

1.9 罗丹明 123 负载 罗丹明 123 是一种亲脂性阳离子荧光染料, 对膜具有通透性, 其荧光信号主要集中于线粒体, 其荧光强度代表细胞线粒体膜电位的大小。采用陈扬超等^[4]方法, 稍作修改。治疗结束后第 1 天, 抽取各组小鼠腹水 2 ml, 用预热 37 磷酸盐缓冲溶液洗涤, 1 000 r/min 离心 10 min, 重复 3 次; 将细胞重悬于 0.1 ml 磷酸盐缓冲溶液中, 取罗丹明 123 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) 1 ml 加入细胞悬液中, 37 避光孵育 45 min; 加磷酸盐缓冲溶液洗涤, 1 000 r/min 离心 10 min, 重复 3 次; 将细胞重悬于 0.5 ml 磷酸盐缓冲溶液中, 滴片, 盖上载玻片。

1.10 线粒体膜电位(m)测定 将玻片固定于激光扫描共聚焦显微镜载物台上, 在荧光显微镜下初调焦平面, 观察细胞状态及负载情况。氩离子激光预扫描并设置扫描条件: 激发光波长 488 nm, 发射光波长 530 nm; 扫描方式: X、Y、Z 三轴; 扫描密度 $1\,024 \times 1\,024$; 物镜倍数 40 倍; 电子图像放大倍数以标尺为准; Pinhole 1.00。调节焦平面, 选择最清晰的荧光图像扫描。每组取 3 个样本, 每个样本随机选取 3 个视野, 取其均数进行统计学分析。

1.11 统计学分析 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析, 组间均数比较采用 Dunnett *t* 检验, 率的比较采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 各组荷瘤小鼠 H22 细胞凋亡率的比较 FZYL G 大、小剂量治疗组和环磷酰胺治疗组小鼠肝癌细胞凋亡率较模型组明显升高, 差异有统计学意义。见表 1。

2.2 各组荷瘤小鼠 H22 细胞线粒体膜电位的比较 ZYL G 大、小剂量治疗组和环磷酰胺治疗组小鼠 H22 细胞罗丹明 123 平均荧光强度较模型组明显减弱, 差异有统计学意义。见表 2。

2.3 各组荷瘤小鼠 H22 细胞内罗丹明 123 荧光强度的比较 模型组 H22 细胞内罗丹明 123 荧光强度很强, 环磷酰胺治疗组 H22 细胞内罗丹明 123 荧光强度很弱, ZYL G 大剂量治疗组 H22 细胞内罗丹明 123 荧光强度较模型组明显减弱, ZYL G 小剂量治疗组 H22 细胞内罗丹明 123 荧光强度较模型组减弱。见图 1。

表 1 FZYL G 对荷瘤小鼠 H22 细胞凋亡率的影响

Table 1 Effects of FZYL G on apoptotic rates of H22 cells from mice

Group	n	Apoptotic rate ($\bar{x} \pm s, \%$)
Untreated	12	27.02 ± 0.83
Cyclophosphamide-treated	12	71.45 ± 1.34**
High-dose FZYL G-treated	12	45.33 ± 1.63**
Low-dose FZYL G-treated	12	37.69 ± 1.11*

* P < 0.05, ** P < 0.01, vs untreated group.

表 2 FZYL G 对荷瘤小鼠 H22 细胞线粒体膜电位的影响

Table 2 Effects of FZYL G on mitochondrial membrane potentials (m) of H22 cells from mice

Group	n	Average fluorescence intensity of Rhodamine 123 ($\bar{x} \pm s$)
Untreated	12	230.13 ± 57.46
Cyclophosphamide-treated	12	106.20 ± 27.60**
High-dose FZYL G-treated	12	124.44 ± 68.35**
Low-dose FZYL G-treated	12	207.97 ± 64.70*

* P < 0.05, ** P < 0.01, vs untreated group.

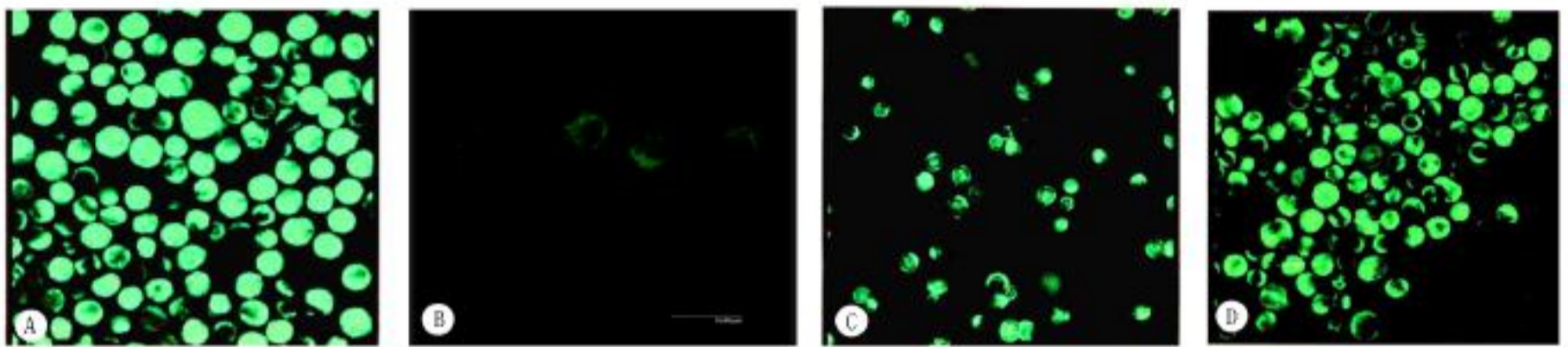


图 1 各组荷瘤小鼠 H22 细胞内罗丹明 123 荧光强度(激光扫描共聚焦显微镜)

Figure 1 Fluorescence intensities of Rhodamine 123 in H22 cells from mice in different groups (by laser scanning confocal microscope)

A: Untreated group; B: Cyclophosphamide-treated group; C: High-dose FZYL G-treated group; D: Low-dose FZYL G-treated group.

3 讨论

临床及实验研究表明, FZYL G 对胃癌、食道癌、乳腺癌等均有较好的辅助治疗作用, FZYL G 可以通过影响细胞周期和核转录因子- B 的表达等诱导细胞凋亡^[1,2,5]。本实验结果表明, FZYL G 可明显增加肿瘤细胞的凋亡率。近年来的大量研究发现, 线粒体与细胞凋亡进程密切相关, 在药物诱导肿瘤细胞凋亡的信号转导过程中, 线粒体在促进凋亡信号和 caspase 激活之间起着不可替代的作用^[6]。

有研究表明, m 降低主要是由于线粒体膜上通透性转运孔(permeability transition pore, PTP) 的开放^[4]。PTP 是由线粒体内、外膜蛋白所组成的, 定位于内外膜接触点, 可以无选择性地允许 1.5 kD 的分子通过。PTP 开放后, 由于线粒体基质内高渗透压而使线粒体内外 H⁺ 梯度消失, 呼吸链脱偶联, 导致能量产生中断; 还会由于水和溶质的进入使基质发生肿胀, 导致外膜破裂, 释放出各种活性蛋白, 包括细胞色素 C 和活化 caspase, 从而引起细胞凋亡。此外, 线粒体还可释放其他介导凋亡的分子, 如凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)、procaspase-3 等, AIF 在体外可作用于 procaspase-3, 并且其本身可能就是一种 caspase^[6]。本

实验采用亲脂性阳离子荧光探针罗丹明 123 与 H22 活细胞内线粒体基质结合^[7], 对线粒体进行标记, 并采用激光扫描共聚焦显微镜系统检测活细胞内的荧光强度, 进行定量分析, 以此反映细胞内线粒体膜电位的相对变化。实验结果表明, FZYL G 大、小剂量治疗组治疗后, H22 细胞内罗丹明 123 荧光强度较模型组明显减弱。罗丹明 123 荧光强度的下降, 说明线粒体内膜两侧电位差下降, 不能提供足够的电位梯度使标记物被吸收和保留在线粒体中; 电位差越小, 线粒体吸收的染料越少, 荧光强度就越弱^[8]。因此, 降低线粒体膜电位可能是 FZYL G 诱导 H22 细胞凋亡, 从而发挥抗肿瘤作用的机制之一。

[参考文献]

- 1 赵健雄, 程卫东, 徐瑞峰, 等. 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. 中西医结合学报, 2005, 3(4): 278-281.
- 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. 中国中西医结合杂志, 2003, 23(12): 908-910.
- 3 陈德昌, 祝晓光, 陈桂英, 等. 中药消癌散抗肿瘤作用的实验观察. 蚌埠医学院学报, 1999, 24(3): 149-150.
- 4 陈扬超, 周茂华, 周克元, 等. 顺铂诱导鼻咽癌 CNE-2Z 细胞凋亡并降低其线粒体膜电位. 癌症, 2001, 20(8):

887-888 .

5 连平, 赵健雄, 沈世林, 等. 扶正抑瘤颗粒对乳腺癌术后患者 T 细胞亚群 NK 细胞及全血粘度影响的临床研究. 中华实用中西医杂志, 2003, 3(16): 431-432 .

6 张晓晖, 姚天明, 黄高昇, 等. 细胞凋亡的最新研究进展. 第四军医大学学报, 2002, 23(Suppl): 42-44 .

7 Green DR, Reed JC . Mitochondria and apoptosis . Science, 1998, 281(5381): 1309-1312 .

8 彭心昭, 陈英, 乔东访, 等. 长春新碱诱导的自噬性细胞凋亡对线粒体膜电位的影响. 中国医学物理学杂志, 2001, 18(1): 37-39 .

[收稿日期] 2005-11-14

CAM-CANCER 证据概要

乳香

张晶 编译, 刘建平 审校

(北京中医药大学循证中医药临床研究与评价中心, 北京 100029)

乳香是一种从橄榄科植物卡氏乳香树及同属植物的树干切口中渗出的坚硬胶状树脂。在市场上交易的是自这种胶状树脂中获取的干燥提取物, 通常以含约 400 mg 乳香提取物的口服胶囊或片剂的形式进行销售。

对健康男性志愿者进行的乳香药代动力学研究结果表明, 乳香在口服后, 最初在胃内被快速地吸收, 随后在肠道内吸收, 而摄入高脂饮食会加速乳香酸的吸收。体外实验发现, 高浓度的乳香提取物对某些恶性细胞株具有抗炎和抗增殖效应。

在印度的传统医学中, 常使用乳香制剂治疗各种炎症性疾病。目前正在有关乳香提取物抗炎活性及治疗克隆氏病和支气管哮喘方面的研究。

1 乳香的疗效

迄今为止, 关于乳香的临床疗效, 已发表了 1 篇回顾性临床研究、1 篇前瞻性临床研究和 1 篇有关临床治疗脑肿瘤患者的研究。杰森等对采用乳香提取物(H15)治疗 19 例(其中男性 11 名, 女性 8 名, 年龄 0.5~18 岁)患增殖性或复发性脑瘤的儿童做了回顾性分析, 患儿口服 H15 40~126 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 治疗 1~26 个月, 其中 6 名患儿同时接受常规治疗(3 例接受脑部放疗, 2 例接受化疗, 1 例服用地塞米松)。结果表明, 6 名患儿的临床症状与自觉症状均得到改善。斯瑞夫等对 12 例伴有或不伴有肿瘤的进展性脑水肿成年患者进行前瞻性研究, 其中 7 例为脑胶质瘤患者, 5 例为脑白质脑病患者(同时接受常规治疗), 所有患者均停用类固醇治疗至少 4 周, 而改用口服乳香提取物 H15 3×1 200 mg/d。研究结果发现, 7 例脑胶质瘤患者的临床症状得到改善, 其中 2 例患者经核磁共振检查发现病灶周围的水肿减轻; 5 例脑白质脑病患者均治疗有效。海特和波克等进行了

一项前瞻性临床研究, 在行外科手术治疗之前, 将 29 例神经胶质瘤患者分成高、中、低剂量乳香提取物治疗组(分别口服乳香提取物 3×1 200 mg/d, 3×800 mg/d 和 3×400 mg/d)。治疗 7 d 后行 CT 检查, 结果表明, 高剂量组患者病灶周围的水肿减轻; 中剂量组患者病灶周围的水肿也有不同程度的减轻; 而低剂量组患者病灶周围的水肿未见明显缓解。同时, 高剂量组患者的临床症状亦有所改善。

目前, 有关乳香提取物治疗脑水肿可能的有益结论来源于在循证医学中属于级别较低的牛津级证据。由于临床研究报告及病例数均较少, 且在研究中未设立空白组或安慰剂对照组, 因此对于上述研究结果的推广及应用十分有限。

2 安全性

134 例接受乳香治疗的癌症患者中有 11 例发生了不良反应: 恶心(呕吐)1 例(WHO 级), 皮疹 2 例(WHO 级), 胃肠道疼痛 2 例, 食欲不振和烧心 6 例。其中, 发生恶心(呕吐)及皮疹的 3 例患者停止继续服用乳香制剂。乳香提取物是否存在对人体的致畸作用以及对人乳哺育婴儿的影响, 目前尚不清楚。因此建议怀孕或哺乳妇女不要服用乳香提取物。

3 结论

对于脑瘤患者进行的临床研究表明, 乳香提取物可能具有改善患者主观症状以及部分脑水肿患者临床和(或)放射学征象的作用。但由于存在方法学上的局限性, 这些研究结果尚无法予以肯定, 抑制肿瘤的功效并不一定是出于乳香提取物的作用。研究报道的不良反应主要涉及胃肠道和皮肤方面。总之, 目前尚不能肯定服用乳香提取物对脑水肿或脑肿瘤具有治疗作用。

(资料来源: www.cam-cancer.org)