

# 牛黄天龙胶囊(含药血清)诱导人子宫内膜癌 HEC-B 细胞凋亡及其机制

田彦玲<sup>1</sup>, 王玉花<sup>2</sup>, 程建新<sup>3</sup>, 刘京生<sup>4</sup>

The Effect of Herbal Complex Prescription "Niu Huang Tian Long Capsule" on Human Endometrial Cancer Cell Line HEC-B and Its Action Mechanism

TIAN Yan-ling<sup>1</sup>, WANG Yu-hua<sup>2</sup>, CHENG Jian-xin<sup>3</sup>, LIU Jing-sheng<sup>4</sup>

1. Department of Gynecologic, People's Hospital of Shijiazhuang City, Shijiazhuang 050011, China; 2. Department of Gynecologic, People's Hospital of Xinle City; 3. Department of Gynecologic, The Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University; 4. Department of Microorganism, Control Disease Center of Hebei Province

**Abstract :Objective** To explore the effect and mechanism of "Niu Huang Tian Long capsule" whether can induce apoptosis on human endometrial cancer cell line HEC-B. **Methods** The test groups were respectively divided into three dose groups: low-dose, middle-dose and high-dose group including control group and positive group for medical serum. The cell proliferation inhibition was measured by MTT as well as by the cell refusing stain test. Additionally, HEC-B cell morphology changes of apoptosis were observed by AO/EB double fluorescent dye staining and by TEM. Finally, the cell apoptosis rates, cell cycle as well as the expression of survivin, caspase-3 were also measured by FCM. **Results** MTT: Endometrial cancer line was significantly inhibited by medical serum and show the low-dose group was the best effect. The assay of cell refusing stain: The results in the same or different period were the same as MTT. AO/EB double fluorescent dye staining: the early apoptosis cells stained in yellow-green and the later apoptosis cells stained in orange in the medical serum groups. TEM: the cell apoptotic morphology changes of HEC-B cells could be observed by TEM: marked condensation, Margination and acute angle project of nuclear chromatins as well as formation of vacuoles in cell cytoplasm. FCM: the apoptotic rate in medical serum groups was significantly different compared with control group ( $P < 0.01$ ). The cell apoptotic rate of low-dose group was also the highest as compared with the middle-dose, high-dose group ( $P < 0.01$ ). The result of cell cycle show: in the test group cells in S phase were reduced and G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> phase were enhanced obviously compared with control group ( $P < 0.01$ ). The expression of surviving was decreased evidently, on the contrary caspase-3 was increased obviously compared with control group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** (1) Human endometrial cancer cell HEC-B could be induced apoptosis and inhibited at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> period by herbal complex prescription "Niu Huang Tian Long capsule". (2) "Niu Huang Tian Long capsule" could reduce the expression of surviving and enhance the expression of caspase-3, which may be one of the HEC-B cell inducing apoptotic mechanism. (3) "Niu Huang Tian Long capsule" inducing HEC-B cell apoptosis do not display the better result with increasing dose, the low dose has the best effect in this experiment.

**Key words**: Pharmacology; Cell apoptosis; AO/EB double fluorescent dye staining; Transmission electron microscope; Flow cytometry

**摘 要**:目的 观察牛黄天龙胶囊(含药血清)对人子宫内膜癌 HEC-B 细胞能否诱导凋亡并对其抗癌机制进行探讨。方法 实验组分低、中、高 3 个剂量组并设空白组和阳性对照组进行含药血清的制备; MTT 法观察细胞毒作用;细胞排染法观察癌细胞直接损害实验;吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)双荧光染色法及电镜(TEM)下观察细胞凋亡的形态学变化;流式细胞术(FCM)测定细胞凋亡率并进行细胞周期

分析,测定凋亡抑制蛋白 survivin 和凋亡效应蛋白 Caspase-3 的表达。结果

MTT 法:人子宫内膜癌 HEC-B 细胞经含药血清作用后细胞生长受到明显抑制且以低剂量组抑制率最高。细胞排染法:同一时间段内以低剂量组

收稿日期:2005-05-16;修回日期:2005-12-02

作者单位:1. 050011 河北石家庄市第一医院妇产科; 2. 河北新乐市人民医院妇产科; 3. 河北医科大学附属四院妇产科; 4. 河北省疾病预防控制中心

作者简介:田彦玲(1966-),女,硕士,主治医师,主要从事妇产科临床工作

效果最好,不同时间段内(24、48h)细胞抑制率显著提高( $P < 0.01$ )。AO/EB和TEM:实验组均可见到典型细胞凋亡的形态学变化。FCM:实验组各组细胞凋亡率与空白组相比差异有显著性( $P < 0.01$ )且以低剂量组最高,细胞周期分析显示实验组 $G_0/G_1$ 期细胞明显增多而S期细胞明显减少与空白组相比差异有显著性( $P < 0.01$ ),Survivin蛋白表达在空白组最高,在实验组表达降低与空白组相比差异有显著性( $P < 0.01$ ),Caspase-3表达则相反,在实验组表达最高与空白组相比差异有显著性( $P < 0.01$ )。结论 复方中药“牛黄天胶囊”(含药血清)能够使人子宫内膜癌 HEC-B 细胞生长阻滞在 $G_0/G_1$ 期并可诱导人子宫内膜癌 HEC-B 细胞凋亡;并可降低凋亡抑制蛋白 survivin 表达同时可提高凋亡效应蛋白 Caspase-3 表达,这可能是其诱导人子宫内膜癌 HEC-B 细胞凋亡的机制之一;对人子宫内膜癌 HEC-B 细胞的抗肿瘤作用并非浓度越大效果越好而有一最适剂量。

关键词:血清药理学;细胞凋亡;AO/EB 双荧光染色法;TEM;FCM

中图分类号:R730.52;R737.33 文献标识码:A

文章编号:1000-8578(2006)06-0417-05

## 0 引言

大量研究表明,复方中药制剂可通过阻滞肿瘤细胞生长周期,影响癌基因和抑癌基因表达等途径发挥抗癌活性<sup>[1]</sup>。我们所用方剂“牛黄天胶囊”,是在传统抗肿瘤中药方剂“犀黄丸”<sup>[2]</sup>基础上添加了新的抗肿瘤中药成分,针对妇科肿瘤而研制的新的抗癌组方。本研究运用血清药理学方法从细胞、分子和基因水平对牛黄天胶囊(含药血清)诱导人子宫内膜癌 HEC-B 凋亡的作用机制进行了初步探讨,旨在为筛选有效的抗妇科肿瘤的中药方剂提供理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 Wistar 大鼠 40 只,雌性,清洁级动物,体重(280 ± 30)g,合格证号:DK0402-0086,由河北医科大学动物实验中心提供。

1.2 实验药物 复方中药牛黄天胶囊主要由牛黄、麝香、乳香、没药等十几味中药组方(生药购自河北省石家庄仁仁堂中药饮片厂)由河北医科大学第四医院药剂室按工艺制成,相当于含生药量每胶囊 2.5g。

1.3 细胞株 人子宫内膜癌中分化细胞系 HEC-B 细胞由北京医科大学附属第一医院北京医院妇科教研室提供。

1.4 主要仪器和试剂 PRMF1640 培养基为美国 Gibco 公司产品;胰蛋白酶,γ-吡啶橙(AO),溴化乙锭(EB)由美国 Sigma 公司提供;胎牛血清由河北医科大学第四医院科研中心提供;顺铂(冻干型)购自山

东省德州制药厂,产品批号 031001;CO<sub>2</sub> 培养箱,美国 Forma Scientific 公司产品;倒置相差显微镜(XS<sub>2</sub>-D<sub>2</sub>型),荧光显微镜(Nikon UFX-型)均购自日本 Olympus 公司;透射电子显微镜为日本日立 H-7500;流式细胞仪 420 为美国 B.D 公司产品。

## 1.5 方法

1.5.1 含药血清的制备<sup>[3,4]</sup> 将 40 只 Wistar 大鼠随机分成 5 组:阴性对照组(空白组),实验组(分高、中、低剂量组)和阳性对照组(顺铂组)。实验组高、中、低三组每日用药剂量分别按 1/10LD<sub>50</sub>、1/20LD<sub>50</sub>、1/40LD<sub>50</sub> 给药,以每只 2ml / 次灌胃,阳性对照组采用腹腔注射每只 1ml / 次(剂量按每只 5mg/kg / 天计算)。采用李仪奎“通法原则”方案,即每日剂量分 2 次灌胃(灌胃前禁食 12h 不禁水)连续 3d,于第 3d 第 1 次给药 2h 后再给药一次,间隔 1h 以乌来糖腹腔注射麻醉,背位固定,无菌条件下腹主动脉取血,分离血清,56 ℃,30min 灭活,0.2μm 过滤除菌,分装, - 20 ℃ 冰箱保存备用。

1.5.2 细胞培养 将人子宫内膜癌 HEC-B 细胞置于含 10% 胎牛血清的 PRMF1640 培养基中,在 37 ℃,5% CO<sub>2</sub>,95% 湿度条件下的培养箱中贴壁生长,以按 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 1:1 比例配置的消化酶消化,3d 传一代。实验分组:将制得的 5 组含药血清即空白组、高、中、低实验组和阳性对照顺铂组分别加入 PRMI 培养基中,使各培养基的血清终浓度为 10%<sup>[5]</sup>。

1.5.3 细胞抑制率的检测(MTT 法)<sup>[6]</sup> 取对数生长期的细胞,以 1:10.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 消化,制成单细胞悬液,再以 2.0 × 10<sup>4</sup> / ml 浓度接种于 96 孔板,每孔 200μl,实验分 5 组,即空白组、高、中、低实验组和阳性对照(顺铂)组,每组设 4 个复孔并设空白调零孔(除不加细胞外,余处理与其他各组相同)。将已接种 HEC-B 细胞的培养板置于 37 ℃,5% CO<sub>2</sub>,95% 湿度的培养箱中培养 24h,待细胞进入对数生长期,弃去原培养基以 PBS 液洗两遍,然后依次更换含 10% 药物血清的 PRMF1640 培养基,置培养箱中分别培养 24h 和 48h。取出培养板,向每孔加入 MTT20μl,继续培养 4h 后终止培养,小心吸去孔内上清液,每孔加入 DMSO 150μl,在微量振荡器振荡 15min,使结晶物充分溶解之后在酶联免疫检测仪 490nm 处读取各孔光密度值(OD 值)。瘤细胞抑制率 = (空白组平均光密度值 - 实验组平均光密度值) / 空白组平均光密度值。

1.5.4 吡啶橙/溴化乙锭(AO/EB)染色法观察 HEC-B 细胞凋亡的形态学变化<sup>[8]</sup> 取对数生长期的细胞消化制成单细胞悬液以 2 × 10<sup>5</sup> / ml 接种于 6

孔板,每孔 2ml,每组设 4 个复孔。将培养板置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、95%湿度的培养箱中培养 24h,细胞贴壁后弃原培养基,更换含 10% 药物血清的 PRMF-1640 培养基,继续培养 48h。分别消化制成 1.0 × 10<sup>6</sup>/ml 的细胞悬液,取 100μl 受检细胞悬液加入 4.0μl 上述染液轻轻吹打均匀后取细胞悬液一滴滴在洁净的载波片上,加盖玻片后立即置于荧光显微镜下观察凋亡细胞的形态学变化并摄片。

1.5.5 透射电镜(TEM)观察 HEC-B 细胞凋亡的超微结构变化 收集含药血清(空白组、实验组)培养 48h 的 HEC-B 细胞,离心(1 000 转/分 15min),PBS 洗涤 3 遍,沉淀细胞以 2.5% 戊二醛溶液前固定,1% 锇酸后固定,梯度乙醇脱水,Epon812 浸透、包埋、聚合、超薄切片、硝酸油柠檬酸铅着色,凉干,在透射电镜下观察凋亡细胞的超微结构特征并摄片。

1.5.6 细胞凋亡率及细胞周期的测定 取 1 × 10<sup>5</sup>/ml 单细胞悬液 0.1ml 加入 10% 的鸡红细胞作为内参标准,调整仪器 CV 值在 5% 以内。加入碘化丙锭(PI)(PI:50mg/L, Triton ×100 1.0%)1 ml,在 4℃ 冰箱染色 30min,以 500 目铜网过滤使样品成为合格的单细胞悬液上机检测。

1.5.7 HEC-B 细胞凋亡相关基因 Survivin 和 Caspase-3 的定量检测 取单细胞悬液 1 × 10<sup>6</sup>/ml,分别加入鼠抗人 survivin 单克隆抗体和鼠抗人 Caspase-3 单克隆抗体 0.1ml,室温孵育 30min,加入 PBS 10ml 洗涤一次,弃上清,加入羊抗鼠 FITC-IgG 二抗工作液 100μl,避光室温孵育 30min,加入 PBS 10ml 离心同上,弃上清以除去未结合的荧光二抗,上机检测前加入 PBS 0.1ml,经 500 目铜网过滤后上机检测。检测结果用荧光指数(fluorescence index,FI)或 X-mode 值表示。

1.6 统计学处理 统计学处理在 SPSS 12.0 软件包内进行。方法采用单因素方差分析和 t 检验。检验水准 = 0.05, P < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 MTT 法 检测牛黄天胶胶囊含药血清对人子宫内膜癌 HEC-B 细胞作用 24h、48h 后,细胞增殖受到明显抑制,与空白组相比差异均有显著性(P < 0.01),但并非浓度越高抑制率越高而以低浓度组抑制率最好。同一剂量组 24、48h 细胞抑制率相比差异有显著性(P < 0.01),见表 1。

2.2 AO/EB 双荧光染色法 镜下可见到空白对照组细胞以正常细胞为主,表现为细胞结构完整,大小正常。细胞被 AO 染色呈均匀一致的绿色,并可

表 1 含药血清对 HEC-B 细胞的生长抑制作用 MTT 法

组别	24h		48h	
	光密度值 ( $\bar{x} \pm s$ )	抑制率 (%)	光密度值 ( $\bar{x} \pm s$ )	抑制率 (%)
空白对照	0.27 ± 0.10		0.57 ± 0.02	
低剂量组	0.20 ± 0.06	27.13 <sup>‡</sup>	0.29 ± 0.01	50.03 <sup>‡</sup>
中剂量组	0.25 ± 0.06	5.67	0.51 ± 0.01	11.03
高剂量组	0.26 ± 0.10	3.70	0.50 ± 0.01	12.20
阳性对照	0.16 ± 0.10	40.77	0.26 ± 0.01	54.63

<sup>‡</sup> 在同一时间段,细胞生长抑制率与中、高组相比 P < 0.01

见到少量早期凋亡细胞,表现为细胞染色增强,荧光亢进,细胞被染色呈黄绿色-黄色荧光。实验组中、高剂量组正常细胞减少,凋亡细胞增多并可见到晚期凋亡细胞,表现为细胞被 EB 染色呈橙红色,细胞体积缩小,部分细胞核破裂,呈现为大小不等、形态不规则的荧光染色碎片或梅花状核形。低剂量组和阳性对照顺铂组正常细胞明显减少,晚期凋亡细胞更多并可见到凋亡小体及细胞肿胀,体积增大,边缘模糊,被染成桔红色的坏死细胞见图 1。

2.3 实验组人子宫内膜癌细胞,在电镜下均可见到凋亡的早期信号,表现为凋亡细胞的部分核膜向外呈锐角凸起,凋亡征象表现为核染色质浓缩并凝集成块,呈半月或新月状聚集在核膜周边,细胞浆浓缩,内质网变疏松并与胞膜融合形成一个个空泡及凋亡小体。空白对照组则很少见到凋亡细胞征象(图略)。

2.4 实验各组含药血清作用人子宫内膜癌 HEC-B 细胞 48h 后,在 DNA 直方图上均出现 G<sub>1</sub> 期前明显的细胞凋亡峰。各组凋亡率与空白组相比差异均有显著性(P < 0.01)。实验各组对细胞周期亦有明显影响,表现为 S 期细胞减少、G<sub>1</sub> 期细胞增多,与空白组相比差异均有显著性(P < 0.01),见图 4、表 2。

表 2 含药血清对 HEC-B 细胞增殖(48h)的影响 FCM ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	细胞凋亡率 (%)	G <sub>1</sub> 期细胞 (%)	S 期细胞 (%)
空白组	3.25 ± 0.84	49.30 ± 0.75	40.53 ± 0.95
低剂量组	12.54 ± 1.19 <sup>*#</sup>	59.53 ± 0.74 <sup>*#</sup>	29.37 ± 0.64 <sup>*#</sup>
中剂量组	8.53 ± 0.96 <sup>*</sup>	54.33 ± 2.15 <sup>*</sup>	34.67 ± 0.96 <sup>*</sup>
高剂量组	7.02 ± 1.51 <sup>*</sup>	53.53 ± 3.02 <sup>*</sup>	35.50 ± 0.70 <sup>*</sup>
阳性对照	14.46 ± 0.80	62.37 ± 1.65	28.37 ± 0.85

<sup>\*</sup> 各组与空白组相比 P < 0.01, <sup>#</sup> P < 0.01 与中、高剂量组相比 P < 0.01

2.5 各组含药血清作用人子宫内膜癌 HEC-B 细胞 48h 后,流式细胞仪测得凋亡相关基因蛋白 survivin 和 Caspase-3 的定量表达,结果显示 survivin

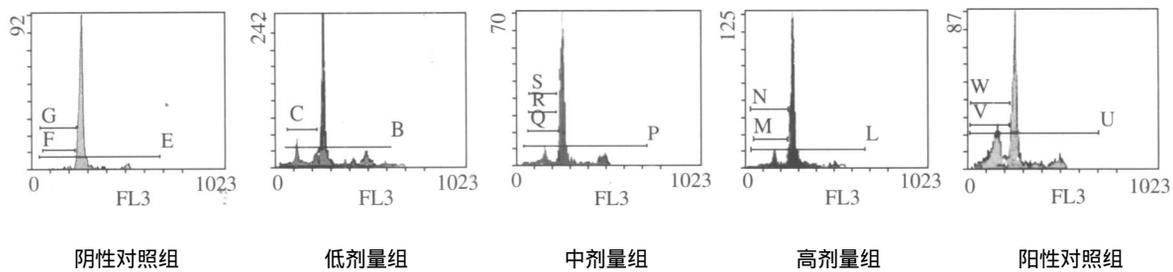


图 4 含药血清作用 HEC-B 细胞 48h 的凋亡测定 FCM

蛋白在空白组的表达量最高,而在实验组和顺铂组的表达则降低,各组与空白组相比差异均有显著性 ( $P < 0.01$ ),但中、高浓度组相比差异无显著性 ( $P > 0.05$ ),低浓度组与中、高浓度组相比差异均有显著性 ( $P < 0.01$ )。Caspase-3 蛋白表达则相反,在空白组表达量最低,而在顺铂组最高,实验组中以低浓度组表达较高,与中、高组相比差异均有显著性 ( $P < 0.01$ ),而中、高组相比差异无显著性 ( $P > 0.05$ ),并且显示在空白组 survivin 蛋白表达最高, Caspase-3 蛋白表达最低,此时细胞凋亡率也最低,细胞增殖指数最高。在顺铂组则相反,此时细胞凋亡率也最高,细胞增殖指数最低为  $39.40 \pm 0.75$ ,见表 3。

表 3 含药血清作用 HEC-B 48h 对基因的影响 FCM( $\bar{x} \pm s$ )

组别	survivin	Caspase-3	凋亡率 (%)	增殖指数 ( $P$ )
空白组	$3.10 \pm 1.52$	$0.47 \pm 0.06$	$3.25 \pm 0.84$	$50.43 \pm 1.43$
低剂量组	$0.43 \pm 0.06^*$	$1.47 \pm 0.21^*$	$12.54 \pm 1.19^*$	$37.07 \pm 1.33^*$
中剂量组	$1.01 \pm 0.06$	$0.97 \pm 0.06$	$8.53 \pm 0.96$	$44.47 \pm 1.09$
高剂量组	$1.02 \pm 0.10$	$1.10 \pm 0.10$	$7.02 \pm 1.51$	$44.77 \pm 1.37$
阳性对照	$0.37 \pm 0.06$	$2.00 \pm 0.15$	$14.46 \pm 0.80$	$39.40 \pm 0.75$

实验各组与空白组相比  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.01$  与中、高剂量组相比  $P < 0.01$

### 3 讨论

血清药理学已成为中药药理研究的热点并逐渐被人们所认同。既往研究中药药理的离体实验多采用中药粗制剂直接体外给药,但由于中药粗提物并不能代表在体内真正发挥作用的有效成分,加之中药本身的理化性质也会干扰实验结果,因此对其可信度难于进行客观的评定。1998 年由日本田代真一正式提出了“血清药理学”这一概念<sup>[9]</sup>。血清药理学是将中药或复方经口给动物灌服一定时间后,采集动物血液,分离血清,用含药物成分的血清进行体外实验的一种方法和技术(ex vivo method)<sup>[10]</sup>。优点是:(1)排除了通常体外实验中复方粗制剂的各种杂质成分,电解质以及 PH 等因素对实验结果干扰的不利影响。(2)客观地模拟了药物与机体相互作用的过程,其血清所含的药物成分也是经过体内一

系列生物转化后真正发挥作用的有效成分及药物作用于机体所产生的内生性有效成分,并且血清的理化性质与细胞所处的内环境相似。(3)实验结果与在体实验有较好的一致性,不但能反映中药(母体药物)及其可能的代谢产物的药理(效)作用,而且还能反映可能由药物诱导机体内源性成分所产生的作用,比较客观和真实地阐明了中药的药效和作用机理,为从细胞、亚细胞和基因水平研究中药的抗癌机制提供了一个更加科学、客观的新手段。本实验正是采用了血清药理学方法研究牛黄天胶胶囊(含药血清)诱导人子宫内膜癌 HEC-B 细胞凋亡极其凋亡相关基因表达情况并分别从细胞形态学、流式细胞术及分子生物学等方面对其诱导凋亡的机理进行了初步探讨。

复方中药牛黄天胶胶囊以牛黄清心、退热、化痰、通窍、散结肿为主药;以麝香通经络、散结滞、辟恶毒、除秽浊为辅药;并配以水蛭、天龙、巴豆等消症、化结;佐以乳香、没药等活血、化瘀、消肿、定痛。君臣佐使,各有所司,从而起到有主次、多靶点、多环节的整体协同的抗癌治疗效果。本研究结果也显示牛黄天胶胶囊可显著抑制人 HEC-B 生长并能诱导其发生凋亡,通过荧光显微镜和电子显微镜对人 HEC-B 细胞的形态学观察和流式细胞仪的 DNA 含量分析,证实牛黄天胶胶囊含药血清具有使人子宫内膜癌 HEC-B 细胞发生凋亡的作用并使其生长阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。

目前观点认为恶性肿瘤是一种多基因异常的疾病,它发生的分子基础是原癌基因的激活或抑癌基因的突变失活或缺失,导致某些细胞分化不良、凋亡受阻、增殖失控而形成肿瘤。研究显示细胞凋亡的核心成分是半胱氨酸蛋白酶家族(cysteiny aspartate specific proteinase, Caspase)。其中研究最多,功能相对较明确的为 Caspase-3, Caspase-3 被发现是哺乳动物细胞凋亡的关键蛋白酶之一,为凋亡的效应分子,被称为凋亡的“执行者”<sup>[11-13]</sup>。survivin 是凋亡抑制蛋白家族(IAPs)结构独特的新成员 1997 年由耶鲁大学的 Altieri 等<sup>[14]</sup>首先分离出来。survivin 只在胚胎和肿瘤组织中表达在正常成人分

化组织中(胸腺,生殖器除外)检测不到。survivin 能抑制细胞凋亡,促进细胞增殖,参与调节细胞的有丝分裂并可能参与血管形成,是至今发现最强的凋亡抑制因子<sup>[15,16]</sup>。研究发现 survivin 可强烈抑制由 Caspase-3 和 Caspase-7 过度表达诱导的凋亡。另有研究显示<sup>[17-19]</sup>在食管小细胞癌、肝癌和胃癌中 survivin 和 Caspase-3 的表达呈负相关,提示 survivin 基因对 Caspase-3 的表达可能是负反馈调节, survivin 直接或间接抑制 Caspase-3 的表达从而促进肿瘤的发生、发展及恶性增殖,但二者在子宫内膜癌组织中的表达关系如何,目前国内外尚未见报道。本实验运用流式细胞技术检测了 survivin 和 Caspase-3 这两个基因,对牛黄天胶胶囊(含药血清)能否诱导人子宫内膜癌 HEC-B 细胞凋亡方面进行了初步研究。结果显示,在实验组中 survivin 的表达降低, Caspase-3 的表达升高,二者与空白组相比差异均有显著性( $P < 0.01$ ),且显示以低剂量组表现最明显( $P < 0.01$ )。本研究 survivin 和 Caspase-3 的表达也证实了以上观点。表明牛黄天胶胶囊(含药血清)能降低人子宫内膜癌 HEC-B 细胞 survivin 的表达同时可升高 Caspase-3 表达,而使子宫内膜癌 HEC-B 细胞凋亡增加,进而使肿瘤细胞生长受到抑制。由此推测,牛黄天胶胶囊(含药血清)诱导人子宫内膜癌 HEC-B 细胞凋亡的机制之一,可能是干扰了肿瘤细胞代谢,并使其基因蛋白表达发生改变,从而抑制了人子宫内膜癌 HEC-B 细胞的生长。

本实验为复方中药治疗妇科恶性肿瘤提供了新依据。虽然本研究在多方面证明了牛黄天胶胶囊的抗肿瘤效果,但有关该中药抗肿瘤作用的研究尚处于起步阶段,且由于条件的限制本实验未能对含药血清的有效成分进行定量和分析,所以有关复方中药牛黄天胶胶囊抗肿瘤作用的其他机制及其活性成分如何尚有待深入研究。

(本文图 1 见第 475 页)

#### 参考文献:

[1] 汝海龙,陈敏明. 抗肿瘤中药诱导细胞凋亡的研究进展[J]. 黑

- 龙江医学,2002,26(1):8-10.
- [2] 熊鹰,孔小云,陈如山. 复方犀黄丸含药血清对人肝癌细胞生长极其周期影响的实验研究[J]. 中国中医药科技,2001,8(4):217-218.
- [3] 李仪奎,吴健宇. 血清药理实验中采血时间的通法方案[J]. 中国药理学通报,1999,15(6):569-70.
- [4] 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题[J]. 中药新药与临床药理,1999,10(2):95-98.
- [5] 刘平. 关于血清药理学的若干思考[J]. 中国中西医结合杂志,1999,19(5):263-265.
- [6] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版社,2001. 186-187.
- [7] 张静波. 组织与细胞培养技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2002. 111-112.
- [8] 汪承亚,盛瑞兰,汪凡,等. 丫啶橙/溴化乙锭双荧光染色检测细胞凋亡的形态学变化[J]. 中国病理生理杂志,1998,14(1):104-106.
- [9] 杨奎. 关于血清药理学的若干思考[J]. 中国中西医结合杂志,1999,19(5):263-265.
- [10] 韩克起,凌昌全. 中药体外抗肿瘤效应血清药理学研究现代与前景[J]. 中国中西医结合杂志,2003,23(9):717-719.
- [11] Chen YC, Shen SC, Lee WR, et al. Emodin induces apoptosis in human promyelokukemic HL-60 cells accompanied by activation of caspase-3 cascade but independent of reactive oxygen species production [J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64(12):1713-1724.
- [12] 周喜乐,郑树森,谢海洋. 半胱氨酸酶-3 在依托利酸诱导肝癌细胞凋亡中的作用[J]. 中华实验外科杂志,2004,21(5):541-543.
- [13] 郑世营,葛锦锋,赵军,等. 外源性 FasL 基因诱导肺癌细胞 Caspase-3 的表达及凋亡[J]. 肿瘤防治杂志,2004,11(3):273-277.
- [14] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. Nat Med, 1997, 3(8):917-921.
- [15] 徐纪香,李珊珊,董雪蕾. Survivin、细胞凋亡与恶性肿瘤[J]. 医学综述,2004,10(1):14-16.
- [16] 伊新,曲喜英,林木生. 凋亡抑制因子 Survivin 与肿瘤诊治的研究进展[J]. 中国癌症杂志,2003,13(2):182-185.
- [17] 林木生,伊新,缪辉来,等. 生存素和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 在肝癌中的表达及其关系[J]. 中华实验外科杂志,2004,21(2):210-211.
- [18] 王晨,陈龙邦,王靖华,等. Survivin 和 caspase-3 在胃癌中的表达以及与凋亡的关系[J]. 医学研究生学报,2003,16(7):509-512.
- [19] 买玲,马杰,汤翔忠,等. 食管小细胞癌凋亡蛋白酶 Caspase-3 的表达与 Survivin Ki67 的相关性[J]. 中国肿瘤临床,2003,30(10):694-696.

[编辑:安 凤]

### BAG-1 在喉鳞癌组织中表达 及其与 p53 基因和细胞凋亡的相关性

(正文见 404 页)

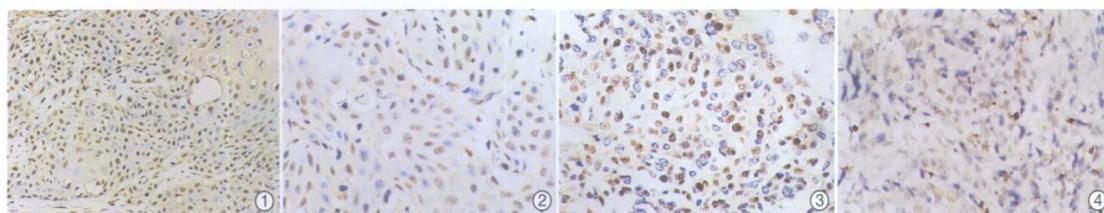


图 1 BAG-1 蛋白在 LSCC 胞核强阳性表达 (SP 法, DAB 显色 × 200)

图 2 BAG-1 蛋白在 LSCC 胞浆强阳性表达 (SP 法, DAB 显色 × 400)

图 3 p53 在 LSCC 胞核中强阳性表达 (SP 法, DAB 显色 × 400)

图 4 凋亡细胞呈阳性, 凋亡细胞胞核呈棕黄色, 核固缩, 染色体聚集 (TUNEL 法, DAB 显色 × 400)

### 尼美舒利对人小细胞肺癌细胞株 NCL-H446 增殖的抑制作用

(正文见 408 页)

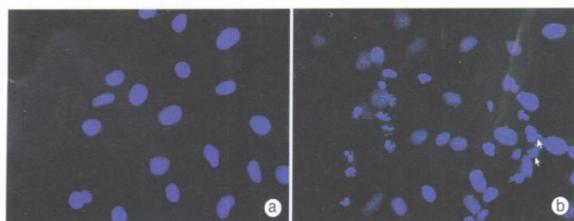


图 3 尼美舒利对 NCL-H446 细胞核形态的改变 (× 400)  
a. 对照; b. 尼美舒利作用 NCL-H446 细胞 24h

### 端粒酶反义寡核苷酸对 肝癌细胞生长的影响

(正文见 455 页)

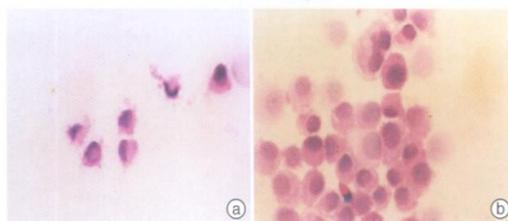


图 3 5μmol/L 端粒酶反义 DNA 作用 20 天细胞形态的变化 (HE × 400)  
a. SMMC-7721 b. L-02

### 牛黄天胶囊 (含药血清) 诱导人子宫内膜癌 HEC-B 细胞凋亡及其机制

(正文见 417 页)

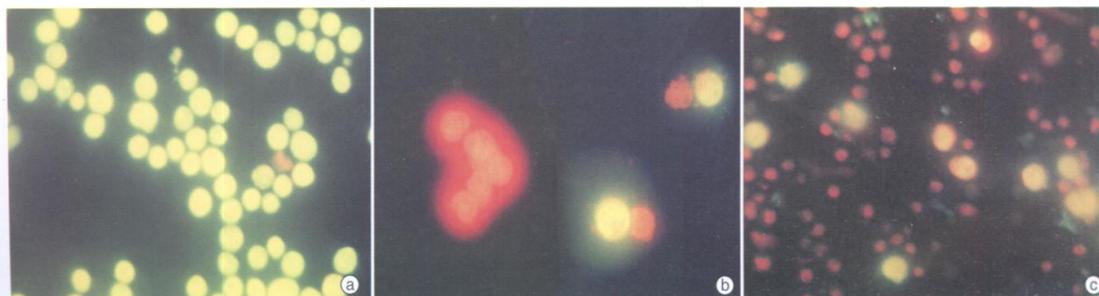


图 1 含药血清诱导 HEC-B 凋亡 (AO/EB 染色 10 × 20)

a. 阴性对照组, 正常细胞被染为绿色, 仅见一个凋亡细胞被染为桔黄色; b. 低剂量组, 可见晚期凋亡细胞肿胀, 体积增大, 边缘不规则, 呈桔红色; c. 阳性对照组, 许多凋亡细胞体积缩小, 破碎呈红色