

抗纤灵药物血清对人肝癌细胞 (HepG₂)的体外生长抑制作用

朱梅菊¹, 郭振球²

(1. 广东省湛江师范学院 应用保健康复中心, 广东 湛江 524048 2. 湖南中医学院中医诊断研究所, 湖南 长沙 410007)

摘要: 目的 研究抗纤灵的抑癌作用及分子机制 方法 运用血清药理学及免疫组织化学等方法, 观察抗纤灵药物血清对人肝癌细胞 (HepG₂)的体外生长抑制作用及对 P₂₁^{WAF1/CIP1}蛋白表达的影响 结果 含抗纤灵血清 18, 9, 3 g/kg 对体外培养的 HepG₂细胞的细胞生长抑制率 (%) 分别为 63.09±5.08, 55.09±4.09, 48.08±4.08, 细胞毒活性 (%) 分别为 48.06±4.08, 38.09±5.01, 25.00±4.13, 其细胞毒活性均高于空白血清 ($P < 0.01$). 含抗纤灵血清各组细胞生长抑制率和细胞毒活性与环磷酰胺血清组比较, 差异有显著性或无显著性 含抗纤灵血清 18, 9, 3 g/kg 各组 HepG₂ P₂₁^{WAF1/CIP1}蛋白表达高于环磷酰胺血清组及空白血清组 ($P < 0.01$) 结论 抗纤灵具有抑制人肝癌细胞体外生长的作用, 其分子机制与该方提高 HepG₂ P₂₁^{WAF1/CIP1}蛋白表达有关

关键词: 抗纤灵; 肝细胞癌; P₂₁^{WAF1/CIP1}

中图分类号: R286.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2001)10-0905-03

Inhibitory effect of KANGXIANLING containing serum on *ex-vivo* proliferation of human hepato carcinoma cell HepG₂

ZHU Mei-ju¹, GUO Zhen-qi²

(1. Department of Physical Training, Zhanjiang Normal College, Zhanjiang Guangdong 524048, China; 2. Institute of Diagnosis of TCM, Hunan College of TCM, Changsha Hunan 410007, China)

Abstract Object To study the antitumor action of KANGXIANLING (KXL), a traditional herbal preparation and its mechanism of action at molecular pharmacological level. **Methods** Effect of KXL containing serum on cell periferation and protein expression of P₂₁^{WAF1/CIP1} of human hepatic cancer HepG₂ were studied by serologic pharmacologic tests. **Results** KXL containing serum at concentrations of 18, 9, 3 g/kg inhibited proliferation of *ex-vivo* cultured HepG₂ cells by (63.09±5.08)%, (55.09±4.09)%, and (48.08±4.08)% respectively. Their cytotoxicities were (48.06±4.08)%, (38.09±5.01)%, and (25.00±4.13)% respectively, which were all higher than that of blank serum without KXL ($P < 0.01$). When compared with cyclophosphamide (CTX) containing serum, their inhibition of cell proliferation and cytotoxicities showed either statistically significant or non-significant differences. Protein expression of HepG₂ P₂₁^{WAF1/CIP1} were higher than that of CTX containing serum or blank serum ($P < 0.01$). **Conclusion** KXL could inhibit proliferation of HepG₂ cells cultured *ex-vivo* relevant to its increased protein expression of HepG₂, P₂₁^{WAF1/CIP1}.

Key words KANGXIANLING (KXL); hepatocellular carcinoma; P₂₁^{WAF1/CIP1}

抗纤灵是郭振球教授治疗血吸虫肝病肝硬化和乙肝后肝硬化的主要方剂,近年我们运用该方治疗原发性肝癌取得了一定疗效^[1]。为了确证该方抗癌的效果,我们运用血清药理学实验方法观察了该方对人肝癌细胞 (HepG₂)体外生长的抑制作用,并探讨了该方抗癌的分子机制。

1 材料

1.1 主要试剂: MTT [溴化-3(4,5-二甲基-2-噻唑基-2,5-二苯基四氮唑丁)] 为 Sigma 公司产品 SP 试剂盒: 北京中山生物技术有限公司产品,一抗: 小鼠抗人的 P₂₁^{WAF1/CIP1}单克隆体,即用型;二抗: 生物素化山羊抗小鼠 IgG2,工作浓度 1:100,北京中山生物技术有限公司产品

1.2 细胞株及培养条件: HepG₂由湖南医科大学肿

瘤研究所细胞培养中心提供,接种于含 15% 灭活小牛血清、200 U/mL青霉素、200 μg/mL链霉素的 RPMI 1640 培养液中,置培养箱于 5% CO₂ 37℃ 充分湿化条件下培养传代

1.3 抗纤灵煎剂浓缩液的制备:黄芪 15 g,柴胡 10 g,莪术 8 g 等,将中药饮片置煎煮容器内,加相当药材量 5 倍的水浸泡 1 h,煮沸 30 min,过滤,药渣加 3 倍量水继续煎煮 20 min,过滤,合并两次滤液,于水浴上浓缩成 200 mg/mL 的药液,置 4℃ 冰箱保存备用,实验时用 RPMI 1640 稀释成 20 mg/mL,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤除菌。

1.4 含药血清的制备:5 只 SD 大鼠,其中 4 只分别按体重每日给予抗纤灵 18, 9, 3 g/kg,环磷酰胺 (CTX) 30 mg/kg,溶于 5 mL 的蒸馏水中 ig,另 1 只每日以 5 mL 蒸馏水 ig 作对照,共 3 d,于最后 1 次 ig 后 2 h,心脏采血,无菌分离血清,经 56℃, 30 min 处理后,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤除菌,置 -20℃ 保存备用。

2 实验方法

2.1 细胞排染法瘤细胞直接损害试验:按文献^[2]方法进行, HepG₂ 细胞悬液为 $\times 10^6$ /mL,分别接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL,然后分别加入 100 μL 空白血清、含 CTX 血清及含中药血清,总体积为 200 μL 每组均设 7 个平行孔。以上处理后细胞均在 37℃、5% CO₂ 充分湿化条件下传代培养,48 h 后取 100 μL 细胞悬液加等量 0.4% 台盼蓝染色液,搅动细胞使之与染料混和均匀,滴入血细胞计数板,稳定 2 min 后进行观察,计数未染色细胞数(活细胞数),统计 4 大格细胞数得 R 值,以下式求得每毫升细胞和细胞生长抑制率。

$$\text{每毫升细胞数} = R \times 1/4 \times 10^4$$

$$\text{细胞生长抑制率} =$$

$$\frac{\text{对照组活细胞数} - \text{实验组活细胞数}}{\text{对照组活细胞数}} \times 100\%$$

2.2 MTT 比色法测药物的细胞毒作用:据文献^[2]方法略加修改,靶细胞以完全培养液调为 $\times 10^5$ /mL,分别接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL,然后分别加入 100 μL 不同含药血清及空白血清,总体积 200 μL,每组均设 7 个平行孔,在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 48 h 后,每孔加入 5 mg/mL MTT 10 μL,继续培养 4 h 后进行显色反应,加 20% 二甲基亚砷 100 μL 终止反应,振荡 10 min,在 DG3022-A 型酶联免疫检测仪,波长 570 nm 测吸光度 (A) 值。细胞毒活性计算公式为:

$$\text{细胞毒活性} (\%) = 1 - \frac{\text{实验组 A 值}}{\text{对照组 A 值}} \times 100\%$$

2.3 采用 LSAB^[4]法检测人肝癌细胞 (HepG₂) P₂₁^{WAF1/CIP1} 蛋白表达:取对数生长期细胞按 $\times 10^6$ 接种于 30 mL 培养瓶中,细胞完全贴壁后换液,分别加入含抗纤灵血清 (18, 9, 3 g/kg)、含 CTX 血清 (30 mg/kg) 及空白血清。处理 48 h 后收集细胞, Hanks 液洗,离心 (400×g, 7 min),去上清,取细胞悬液 50 μL 滴于 0.01% 多聚赖氨酸处理后的玻片上,室温干燥,纯丙酮固定 (4℃, 30 min), 0.05% Triton X-100 的 PBS 液渗透 5 min, 5% 羊血清 (PBS 稀释) 封闭, 25℃、10 min, 倾去血清加一抗, 37℃、30 min; 加二抗, 37℃、30 min 加链霉卵白素, 37℃、30 min; 3% H₂O₂ 的 DAB 显色,清水冲洗 10 min,常规封片。以上每一步后,均需 PBS 洗 5 min \times 3 次。

本实验对照设计: A. 用 PBS 代替一抗对照; B. 用 PBS 代替二抗对照。对照染色结果均为阴性。

染色结果评定: A. P₂₁^{WAF1/CIP1} 以细胞浆中有明确棕黄着颗粒为阳性细胞^[5]。 B. 参照 Fromowitz 等^[3]的综合计分法并作半定量分析。

2.4 统计学处理:采用 SPSS 统计软件包,多个样本率比较用 Kruskal wallistest 和 Friedman test 多组计量资料采用方差分析,方差不齐时用非参数统计。

3 结果

3.1 含药血清对人肝癌细胞体外生长的抑制作用:含抗纤灵血清各组、含 CTX 血清组活细胞数低于空白血清组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。含抗纤灵 18, 9 g/kg 细胞生长抑制率与含 CTX 血清组比较,差异无显著性 (均 $P > 0.05$)。含抗纤素 3 g/kg 细胞生长抑制率低于含 CTX 血清组 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 含药血清对 HepG₂ 癌细胞体外生长的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	活细胞数 ($\times 10^3$ /mL)	生长抑制率 (%)
空白血清	-	1 188.14 ± 97.79	-
含 CTX 血清	0.03	541.52 ± 58.62 [△]	0.54 ± 0.04
含抗纤血清	18	445.43 ± 66.28 ^{△△*}	0.63 ± 0.05
	9	530.29 ± 43.84 [△]	0.55 ± 0.04
	3	607.29 ± 18.19 [△]	0.48 ± 0.04

与空白血清组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

与含 CTX 血清组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ (下同)

3.2 含药血清对肿瘤细胞体外生长的细胞毒作用:含抗纤灵血清各组,含 CTX 血清组细胞毒活性均高于空白血清组 ($P < 0.01$)。含抗纤灵 18, 3 g/kg

细胞毒活性分别高或低于含 CTX 血清组 (均 $P < 0.05$)。含抗纤灵 9 g/kg 血清组细胞毒活性与含 CTX 组比较,差异无显著性 ($P < 0.05$),见表 2

表 2 含药血清对 HepG₂ 的细胞毒活性 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	细胞毒活性 (%)
空白血清	-	0.05 ± 0.02
含 CTX 血清	0.03	0.38 ± 0.04 ^{△△}
含抗纤灵血清	18	0.48 ± 0.04 ^{△△*}
	9	0.38 ± 0.05 ^{△△}
	3	0.25 ± 0.04 ^{△△*}

3.3 含药血清对人肝癌的细胞 (HepG₂) P₂₁^{WAF1/CIP1} 蛋白表达的影响

3.3.1 各组肝癌细胞 P₂₁^{WAF1/CIP1} 表达半定量分析: 含抗纤灵血清各组 HepG₂ P₂₁^{WAF1/CIP1} 蛋白表达高于含 CTX 血清组和空白血清组 (均 $P < 0.01$)。含 CTX 血清组和空白血清组 HepG₂ P₂₁ 蛋白表达无显著性差异 ($P > 0.05$),见表 3

表 3 各组 HepG₂ 细胞 P₂₁^{WAF1/CIP1} 表达半定量结果 ($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	剂量 (g/kg)	n	P ₂₁ ^{WAF1/CIP1}
空白血清	-	25	0.20 ± 0.41
含 CTX 血清	0.03	25	0.48 ± 0.65
含抗纤灵血清	18	25	2.32 ± 0.95 ^{△△**}
	9	25	1.88 ± 1.20 ^{△△**}
	3	25	1.67 ± 0.81 ^{△△**}

3.3.2 各组人肝癌细胞 P₂₁^{WAF1/CIP1} 表达定性分析: P₂₁ 蛋白定位于 HepG₂ 细胞浆中,呈粗大的棕黄色颗粒状。含 CTX 血清组、空白血清 HepG₂ 细胞 P₂₁ 蛋白表达均极低。含抗纤灵血清各组 HepG₂ 细胞 P₂₁ 蛋白表达明显增强。

4 讨论

由于原发性肝癌伴有肝硬化者多,抗纤灵是我们治疗原发性肝癌的主要方剂之一。初步的临床观察结果显示该方能有效提高中晚期原发性肝癌的近期和远期疗效,在改善肝功能,提高患者生活质量,缓解临床症状等方面有较突出的作用^[1]。抑瘤试验结果表明该方对裸鼠移植性人肝癌细胞 (HepG₂) 的体内抑瘤率达 52.9%。本研究结果表明,含抗纤灵血清各组均对 HepG₂ 细胞的体外生长有抑制作用,并随药物剂量的增加而抑制作用有增强的趋势。提示抗纤灵具有抗人肝癌细胞体外生长的作用。抗纤

灵是治疗原发性肝癌的有效方剂。现代药理研究表明,黄芪之有效成分黄芪多糖对小鼠体内 6 种细胞系瘤株有抑瘤作用^[6];莪术之有效成分榄香烯能诱导白血病 HL-60 和 K562 细胞的凋亡^[7];柴胡之药理活性成分柴胡皂苷 d 对小鼠艾氏腹水癌有抑制肿瘤生长作用,且能明显延长动物生存时间^[8]。故诸药配伍后,具有明显的抑制 HepG₂ 体外生长的作用。

近来研究表明, P₂₁^{WAF1/CIP1} 低表达与原发性肝癌的发生、发展关系密切^[4]。P₂₁ 超表达不仅引起细胞周期运行的停止,而且能启动自杀程序,诱导人肝癌细胞 (HCC-9204) 的凋亡^[9]。本研究表明, P₂₁^{WAF1/CIP1} 在 HepG₂ 细胞系中表达极低,含抗纤灵药物血清与 HepG₂ 细胞作用后, P₂₁^{WAF1/CIP1} 蛋白表达明显增加,高于空白血清和 CTX 血清组,提示抗纤灵能提高 HepG₂ 细胞 P₂₁^{WAF1/CIP1} 蛋白表达。由于 P₂₁^{WAF1/CIP1} 既能对细胞周期实行负性调控,又能启动自杀程序,诱导人肝癌细胞的凋亡,故 P₂₁^{WAF1/CIP1} 蛋白表达水平的提高可阻止肝细胞癌的恶性增殖,从而表现出一定的抗肝肿瘤作用。抗纤灵提高 HepG₂ 细胞 P₂₁^{WAF1/CIP1} 蛋白表达水平可能是该方抑瘤的分子机制之一。

参考文献:

- [1] 张红,朱梅菊,郭振球. 抗癌 1 方治疗原发性肝癌气虚血瘀证 11 例临床观察 [J]. 中国中医药科技, 1999, 6(4): 258-259.
- [2] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1991.
- [3] Scudiero D A. Evaluation of a soluble tetrazolium formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines [J]. Cancer Res, 1988, 48: 4827-4832.
- [4] 张晓晖,王文亮,黄高升. 细胞周期素依赖激酶的抑制蛋白 P₂₁^{WAF1/CIP1} 在肝细胞肝癌和肝硬化组织中的表达 [J]. 第四军医大学学报, 1996, 17(1): 46.
- [5] Fromowitz P B, Viola M V, Chao S, et al. Ras P₂₁ expression in the progression of breast cancer [J]. Human Pathol, 1987, 18(12): 1268.
- [6] 马占好,张春艳,刘旭,等. 黄芪多糖对小鼠体内 6 种细胞系瘤株抑瘤作用的实验研究 [J]. 中医药学报, 1996, 23(4): 55-56.
- [7] 杨马华,王仙平,郁琳琳,等. 榄香烯抗癌作用与诱发肿瘤细胞凋亡 [J]. 中华肿瘤杂志, 1996, 18(3): 169-171.
- [8] 黄泰康. 常用中药成分与药理手册 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994.
- [9] 杨帆,王文亮,曹云新,等. P₂₁^{WAF1} 基因介导诱发的人肝癌细胞系的细胞凋亡研究 [J]. 中国癌症杂志, 1997, 7(3): 165-167.