

仙芦抗癌胶囊抗肿瘤作用及对肝癌 HepG2 细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响

高世勇, 李文兰, 张宇金, 王帅帅, 季宇彬

(哈尔滨商业大学药物研究所 博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 观察仙芦抗癌胶囊的体内外抗肿瘤作用及对肝癌 HepG2 细胞内 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 的影响, 从而揭示仙芦抗癌胶囊的抗肿瘤作用机制。方法 通过观察仙芦抗癌胶囊对 S_{180} A 荷瘤小鼠瘤质量和 H_{22} 小鼠生存时间的影响, 观察其体内抗肿瘤作用。通过 MTT 法观察含药血清对肝癌 HepG2 细胞的细胞毒作用。通过 Fluo-3/AM 标记 HepG2 肝癌细胞, 激光共聚焦扫描显微术测定肿瘤细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ATP 酶试剂盒测定 HepG2 细胞膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性。结果 仙芦抗癌胶囊 (1.00、0.50、0.25 g/kg) 对 S_{180} A 小鼠的瘤体生长有显著的抑制作用, 对 H_{22} 小鼠的生存时间有显著的延长作用。仙芦抗癌胶囊体外对 HepG2 细胞有细胞毒作用; 对细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 有显著升高作用, 高、中剂量 (1.00、0.50 g/kg) 能够降低 HepG2 肝癌细胞膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性。结论 仙芦抗癌胶囊有明显的体内外抗肿瘤作用, 其作用机制为抑制肿瘤细胞膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性, 增加细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 从而诱导肿瘤细胞凋亡, 达到抗肿瘤作用的目的。

关键词: 仙芦抗癌胶囊; 荷瘤小鼠; HepG2; Ca^{2+} ; Ca^{2+} ; Mg^{2+} -ATP 酶

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)11-1675-04

Antitumor function of Xianlu Kang' ai Capsule and its effect on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of human cancer cell line HepG2

GAO Shi-yong, LI Wen-lan, ZHANG Yu-jin, WANG Shuai-shuai, JI Yu-bin

(Postdoctoral Programme, Institute of Materia Medica, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: **Objective** The antitumor action both *in vivo* and *in vitro*, and the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of HepG2 cells were studied to show the antitumor mechanism of Xianlu Kang' ai Capsule. **Methods** The *in vivo* antitumor action was studied by observing the variation of tumor weight and survival time of S_{180} A and H_{22} mice. The MTT assay was adopted to investigate the cellular cytotoxicity of the drug-serum on HepG2 cell. Internal Ca^{2+} of HepG2 cell was mensurated by laser scanning confocal microscope (LSCM), and the activity of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of HepG2 cell membrane was determined by ATPase kit. **Results** Xianlu Kang' ai Capsule (1.00, 0.50, 0.25 g/kg) inhibited the growth of cancer cells of S_{180} A mice and prolonged the survival time of H_{22} mice. Xianlu Kang' ai Capsule (1.00, 0.50, 0.25 g/kg) had strong cytotoxic effects on HepG2 cell and increased its internal Ca^{2+} . The activity of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase was reduced by Xianlu Kang' ai Capsule (1.00, 0.50 g/kg). **Conclusion** Xianlu Kang' ai Capsule has antitumor effect both *in vivo* and *in vitro*. The mechanism is that Xianlu Kang' ai Capsule could increase the internal Ca^{2+} of HepG2 cell by reducing the activity of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of HepG2 cell membrane to induce the apoptosis of tumor.

Key words: Xianlu Kang' ai Capsule; tumor-bearing mice; HepG2; Ca^{2+} ; Ca^{2+} ; Mg^{2+} -ATPase

仙芦抗癌胶囊是一种纯中药抗癌制剂, 由食用仙人掌 *Opuntia milpa* Alta 和库拉索芦荟 *Aloe vera* L. 提取的有效成分组方而成的复方抗癌制剂。抗肿瘤药物一度以化疗药物为主, 不可否认其良好的细胞毒作用是其成为治疗肿瘤的主打药物的原因, 但其严重的不良反应同时也日益成为人们关注的焦点和难以解决的矛盾。由于这样的现状, 以及新世纪人类对回归大自然这一主题的认可, 逐渐把抗

癌药物研究的眼光投向了中医药。本实验所研究的仙芦抗癌胶囊就是基于这样的现状开发的一种纯中药抗肿瘤制剂。本实验观察了仙芦抗癌胶囊对移植性肿瘤的作用, 采用血清药理学的方法体外观察了其对于肝癌 HepG2 的细胞毒作用, 同时观察了对肝癌细胞内 Ca^{2+} 的影响, 从而揭示其抗肿瘤作用机制。

1 材料

收稿日期: 2005-02-10

基金项目: 哈尔滨市科技局攻关项目 (2003AA6CN095); 黑龙江青年基金 (QC02C46)

作者简介: 高世勇 (1975—), 男, 讲师, 在读博士, 研究方向为肿瘤药理学。E-mail: sygao2002@sina.com

1.1 药品:仙芦抗癌胶囊,由哈尔滨商业大学药物研究所自制。含生药2 g/粒(每粒含仙人掌多糖和芦荟多糖共0.3 g),人用量为4 g/d。药物用蒸馏水配置。5-氟脲嘧啶(5-Fu),购自上海海普制药厂,批号20040602。

1.2 实验动物及肿瘤细胞株:昆明种小鼠,体重(20±2) g,由哈尔滨医科大学第二临床医学院实验动物中心提供。 S_{180} 荷瘤小鼠、 H_{22} 荷瘤小鼠及人肝癌HepG2细胞株均由黑龙江省肿瘤医院肿瘤研究所提供。

1.3 试剂:RPMI-1640培养基,HyClone Laboratories公司。胎牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司。胰酶,Gibco公司。DMSO,北京索莱宝科技有限公司。Fluo-3/Am,美国Biotium公司。ATP酶试剂盒,南京建成生物工程研究所。

1.4 仪器设备:CO-150 CO₂培养箱,美国NBS公司。奥林巴斯CKX-41-32荧光倒置显微镜,日本Olympus公司。双人双面SW-CJ-2F超净工作台,中国苏州苏净集团。低温超速离心机,美国Beckman-Coulter公司。恒温水浴箱,厦门医疗电子仪器厂。水平高速离心机,北京医用离心机厂。激光共聚焦扫描显微镜SP2,德国Leica公司。酶标仪,美国Bio-rad公司。

2 方法

2.1 体内抗肿瘤实验

2.1.1 对 S_{180} 小鼠瘤质量的影响:昆明种小鼠50只,雌雄各半,随机分为5组,分别为对照组,5-Fu组,仙芦抗癌胶囊高、中、低剂量(1.00、0.50、0.25 g/kg)组。分组后连续ig给药7 d,给药量为0.4 mL/20 g,对照组给同体积蒸馏水,阳性对照组给同体积5-Fu(0.50 g/kg)。第8天接种 S_{180} 瘤株,取接种生长良好的 S_{180} 荷瘤小鼠,无菌条件下,抽取腹水,在冰浴条件下,灭菌生理盐水与腹水按4:1稀释,混匀制成肿瘤细胞混悬液,该混悬液应为乳白色半透明状态,若有血性腹水不可使用。将制备好的 S_{180} 肿瘤细胞混悬液按每只0.2 mL接种于昆明种小鼠右侧腋窝皮下。接种后继续给药7 d。停药后第2天剥瘤、称质量,计算抑瘤率。

抑瘤率=(对照组平均瘤质量-给药组平均瘤质量)/对照组平均瘤质量×100%

2.1.2 对 H_{22} 小鼠生存时间的影响:小鼠分组、给药及接种方法同2.1.1项。接种后继续给药7 d。停药后第2天开始观察记录各组小鼠的死亡数。各组小鼠全部死亡后,计算生命延长率。

生命延长率=(给药组平均生存天数-对照组平均生存天数)/对照组平均生存天数×100%

2.2 对人肝癌 HepG2 的细胞毒作用

2.2.1 细胞培养:人肝癌细胞 HepG2 以适量浓度接种于培养瓶中,加入含10%小牛血清的RPMI-1640培养基,置于37℃恒温、5%CO₂及饱和湿度的培养箱中培养,细胞贴壁生长,每2~3 d传代1次,传代时首先倒出培养液,PBS洗3次,25%胰酶消化后,加入新鲜的培养液吹打均匀,调整细胞至适当的细胞浓度移入新的培养瓶中,添加适量培养液。

2.2.2 药物血清的制备:将昆明种小鼠随机分为5组,每组20只,雌雄各半,按2.1.1项方法连续ig给药7 d。末次给药2 h后眼球取血,分离血清,56℃灭活30 min,分装置-20℃保存备用。

2.2.3 MTT法检测细胞毒作用:分别取对数生长期人肝癌 HepG2 细胞,经台盼蓝染色后作细胞计数,拒染细胞应在97%以上,用RPMI-1640细胞培养液(含10%小牛血清),调整细胞浓度至 1×10^4 /mL,加入96孔细胞培养板,每孔100 μL,设10个平行孔,放入5%CO₂培养箱、37℃培养24 h,使细胞贴壁。对照组加入胎牛血清,仙芦抗癌胶囊高、中、低组及阳性对照组分别加入相应的含药血清,血清添加量均为25%。加血清后放入5%CO₂、37℃培养箱继续培养48 h。取出细胞,倒出培养液,每孔加入1 mg/mL MTT 100 μL,放入5%CO₂培养箱、37℃继续培养4 h。快速翻板倒出液体,每孔加入DMSO 150 μL,微量震荡器震荡5~10 min,使其中的兰色颗粒充分溶解。将培养板放入酶标仪于570 nm处测定吸光度(A)值。计算抑制率。

抑制率=(1-A_{实验}/A_{对照})×100%

2.3 对人肝癌 HepG2 细胞[Ca²⁺]_i的作用:细胞培养、含药血清制备及给药处理同2.2项。细胞浓度调至 1×10^4 /mL后加入Petri皿中培养,48 h后取出,给药组及对照组细胞用HEPES液洗3次,加入4 μg/mL的Fluo-3/Am(Molecular Probes)、37℃温育50 min,然后用HEPES液洗3次,重新悬浮在HEPES液中,用激光共聚焦扫描显微镜测定荧光强度,激发波长为488 nm,发射波长为540~570 nm,物镜APO CS 40×/1.25 oil, zoom>1, pin-hole 1.5 Airy。采用Leica激光共聚焦扫描显微镜定量系统测定各组细胞的平均荧光强度(FI)。

2.4 对人肝癌 HepG2 细胞Ca²⁺, Mg²⁺-ATP酶活性的影响:细胞培养、含药血清制备及给药同2.2项。各组细胞在培养瓶中培养48 h后分别收集

1×10^6 个细胞,用超声粉碎机粉碎;按照 ATP 酶测试试剂盒说明书方法测定 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性。

3 结果

3.1 体内抗肿瘤作用

3.1.1 对 S_{180}A 小鼠瘤质量的影响:结果见表1。仙芦抗癌胶囊(1.00、0.50、0.25 g/kg)对 S_{180}A 小鼠的瘤体生长有显著的抑制作用,剂量与效果呈正相关,与对照组比较有显著的统计学意义($P < 0.01$)。

表1 仙芦抗癌胶囊对 S_{180}A 小鼠瘤质量的影响 ($n=10$)

Table 1 Effect of Xianlu Kang'ai Capsule on tumor weight of S_{180}A mice ($n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	瘤质量/g	抑瘤率/%
对照	—	1.271±0.114	—
5-Fu	0.50	0.453±0.043**	64.36
仙芦抗癌胶囊	1.00	0.771±0.199**	39.34
	0.50	0.790±0.166**	37.84
	0.25	0.801±0.149**	36.98

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

3.1.2 对 H_{22} 小鼠生存时间的影响:结果见表2。仙芦抗癌胶囊(1.00、0.50 g/kg)对 H_{22} 小鼠的生存时间有显著的延长作用,剂量与效果呈正相关。仙芦抗癌胶囊高、中剂量对 H_{22} 小鼠的生命有显著的延长作用,而低剂量组对 H_{22} 小鼠的生存时间没有显著影响($P > 0.05$)。

表2 仙芦抗癌胶囊对 H_{22} 小鼠生存时间的影响 ($n=10$)

Table 2 Effect of Xianlu Kang'ai Capsule on survival time of H_{22} mice ($n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	生存时间/d	生命延长率/%
对照	—	13.17±5.56	—
5-Fu	0.50	22.95±3.56*	74.26
仙芦抗癌胶囊	1.00	19.97±4.93*	51.63
	0.50	19.87±3.28*	50.87
	0.25	16.00±2.56	21.49

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

3.2 对人肝癌 HepG2 细胞的细胞毒作用:结果见表3。仙芦抗癌胶囊含药血清作用于人肝癌 HepG2 细胞 48 h 后表现出一定的细胞毒作用。

3.3 对人肝癌 HepG₂ 细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响:结果见表4。采用激光扫描共聚焦显微术观察了仙芦抗癌胶囊对人 HepG2 细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响,同时对所采集的图像进行了定量分析,仙芦抗癌胶囊组能够显著升高肿瘤细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$,并具有一定的剂量相关性,而 5-Fu 组荧光强度也有所升高,但与对照组比较无统计学差异。

3.4 对人肝癌 HepG2 细胞 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶

活性的影响:结果见表5。仙芦抗癌胶囊能降低细胞膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性。

表3 仙芦抗癌胶囊含药血清对 HepG2 细胞的细胞毒活性 ($n=10$)

Table 3 Cytotoxicity of Xianlu Kang'ai Capsule drug-serum on HepG2 cell ($n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	A_{570}	抑制率/%
对照	—	1.210±0.037	—
5-Fu	0.50	0.510±0.032	57.85
仙芦抗癌胶囊	1.00	0.611±0.024	49.50
	0.50	0.720±0.021	40.50
	0.25	0.787±0.029	34.95

表4 仙芦抗癌胶囊含药血清对 HepG2 细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

Table 4 Effect of Xianlu Kang'ai Capsule drug-serum on internal Ca^{2+} of HepG₂ cell

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	细胞数	FI
对照	—	30	70.98±20.01
5-Fu	0.50	30	89.31±17.56
仙芦抗癌胶囊	1.00	30	119.01±25.32**
	0.50	30	158.75±21.25**
	0.25	30	199.85±10.86**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

表5 仙芦抗癌胶囊含药血清对 HepG2 细胞 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性的影响

Table 5 Effect of Xianlu Kang'ai Capsule drug-serum on activity of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of HepG2 cell

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性/ [$\mu\text{mol Pi} \cdot (10^7 \text{个细胞} \cdot \text{h})^{-1}$]
对照	—	0.225 8±0.030 1
5-Fu	0.50	0.183 2±0.020 6
仙芦抗癌胶囊	1.00	0.155 1±0.015 7**
	0.50	0.165 2±0.024 2**
	0.25	0.182 6±0.070 3

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

仙芦抗癌胶囊是本课题组在以往的研究基础上开发的一种纯中药抗肿瘤制剂。仙人掌和芦荟分别有上百个品种,各个品种的药理活性又有所差异。课题组分别对几种药理活性较强的仙人掌和芦荟进行了抗肿瘤作用研究,筛选出了抗肿瘤作用最好的食用仙人掌和库拉索芦荟,组方成仙芦抗癌胶囊,利用其协同抗肿瘤作用以期达到更好的抗肿瘤效果。

体内药效学实验结果表明,仙芦抗癌胶囊(1.00、0.50、0.25 g/kg)对 S_{180}A 小鼠的瘤体生长有一定的抑制作用;对 H_{22} 小鼠的生存时间有一定的延长作用。在体外药效学中运用血清药理学的原理,制备了含药小鼠血清,通过 MTT 比色法观察了

仙芦抗癌胶囊含药血清对人肝癌细胞 HepG2 的细胞毒作用,从而间接反映仙芦抗癌胶囊对人体肿瘤细胞的抑制作用,结果表明仙芦抗癌胶囊高、中、低剂量对 HepG2 细胞的抑制率分别为 49.50%、40.50% 和 34.95%。虽然从抑制率上并不占优势,但作为口服中药制剂,已经相当可观。中药口服抗癌制剂,首先避免了化疗药物的不良反应,同时又不存在中药其他剂型的一些缺点,如中药注射剂稳定性差,患者使用出现过敏率高的弊端,适合肿瘤患者长期用药。

体外细胞毒实验表明仙芦抗癌胶囊含药血清对肝癌 HepG2 细胞有一定的细胞毒作用,而近年的研究结果表明细胞凋亡是细胞毒类药物发挥作用的一个共同通路^[1-5],而细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的改变是细胞凋亡发生的关键环节^[6-10]。因此在药效观察的基础上,本实验进一步观察了仙芦抗癌胶囊对肝癌 HepG2 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响。实验结果表明仙芦抗癌胶囊高、中、低 3 个剂量组均能显著提高细胞 $[Ca^{2+}]_i$,而阳性对照组 5-Fu 的 $[Ca^{2+}]_i$ 水平有所升高,但与对照组比较没有统计学意义 ($P>0.05$),说明仙芦抗癌胶囊存在着与 5-Fu 不同的抗肿瘤作用机制。就仙芦抗癌胶囊引起细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高而言,可以推测出其抗肿瘤作用机制可能为升高细胞 $[Ca^{2+}]_i$,从而启动细胞凋亡机制以致诱导肿瘤细胞凋亡,在下一步工作中本课题组将从细胞凋亡角度,即从细胞的形态学观察、DNA Ladder、流式细胞术等几个方面验证仙芦抗癌胶囊诱导肿瘤细胞凋亡的作用。

细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的改变有多条途径,如细胞外钙内流和细胞内钙库的释放。钙泵的主要生理功能就是将细胞内的 Ca^{2+} 主动转运到细胞外和线粒体内,是细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 改变的一条主要途径。因此,在细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 测定的基础上,采用同样的给药方式,使用 ATP 酶试剂盒,测定了 HepG2 细胞内钙泵的活性,实验结果表明仙芦抗癌胶囊高、中、低各组均能降低细胞膜钙泵活性,而以高、中两组的作用最为显著 ($P<0.01$)。

本实验结果表明仙芦抗癌胶囊在体内能够抑制

S₁₈₀A 荷瘤小鼠瘤体生长,延长 H₂₂ 荷瘤小鼠的生存时间,体外实验对 HepG2 肝癌细胞有明显的抑制作用,其作用机制为抑制肿瘤细胞膜钙泵活性,减少细胞内 Ca^{2+} 向细胞外及线粒体内的主动转运,从而间接地增加细胞 $[Ca^{2+}]_i$,推测 Ca^{2+} 升高后通过启动细胞凋亡机制诱导肿瘤细胞凋亡,从而达到抗肿瘤作用的目的,这还有待于进一步的实验研究加以证实。

References:

- [1] Seol J W, Lee Y J, Kang H S, et al. Wortmannin elevates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in LNCaP cells through down-regulation of IAP-2 protein [J]. *Exp Oncol*, 2005, 27(2): 120-124.
- [2] Zhou Y, Brattain M G. Synergy of epidermal growth factor receptor kinase inhibitor AG1478 and ErbB2 kinase inhibitor AG879 in human colon carcinoma cells is associated with induction of apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(13): 5848-5856.
- [3] Ma X, Ziel-van der Made A C, Autar B, et al. Targeted biallelic inactivation of Pten in the mouse prostate leads to prostate cancer accompanied by increased epithelial cell proliferation but not by reduced apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(13): 5730-5739.
- [4] Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. Apoptotic and antiangiogenic strategies in liver and gastrointestinal malignancies [J]. *J Surg Oncol*, 2005, 90(4): 249-259.
- [5] Ghobrial I M, Witzig T E, Adjei A A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy [J]. *CA-Cancer J Clin*, 2005, 55(3): 178-194.
- [6] Santini M T, Ferrante A, Rainaldi G, et al. Extremely low frequency (ELF) magnetic fields and apoptosis: a review [J]. *Int J Radiat Biol*, 2005, 81(1): 1-11.
- [7] Zhang X Y, Li W G, Wu Y J, et al. Proanthocyanidin from grape seeds enhances doxorubicin-induced antitumor effect and reverses drug resistance in doxorubicin-resistant K562/DOX cells [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2005, 83(3): 309-318.
- [8] Pelletier M, Oliver L, Meflah K, et al. Caspase-3 can be pseudo-activated by a Ca^{2+} -dependent proteolysis at a non-canonical site [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(11): 2364-2368.
- [9] Kim J A, Kang Y S, Lee Y S. A phospholipase C-dependent intracellular Ca^{2+} release pathway mediates the capsaicin-induced apoptosis in HepG2 human hepatoma cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 28(1): 73-80.
- [10] Lee Y S. Role of intracellular Ca^{2+} signal in the ascorbate-induced apoptosis in a human hepatoma cell line [J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(12): 1245-1252.