

# 复尔康注射液对肝癌 Hep G2 细胞凋亡和 VEGF 表达的影响

刘明华<sup>1</sup>, 任美萍<sup>1</sup>, 肖顺汉<sup>1</sup>, 冯文字<sup>2</sup>, 李 蓉<sup>1</sup>, 李 茂<sup>1\*</sup>

(1. 泸州医学院 药理学教研室, 四川 泸州 646000; 2. 泸州医学院药物研究所, 四川 泸州 646000)

**摘要:**目的 研究复尔康注射液对肝癌 Hep G2 细胞凋亡和 VEGF 表达的影响。方法 复尔康注射液干预 Hep G2 细胞 48 h 后, CCK8 试剂盒检测细胞的增殖活性, Hoechst 33258 荧光染色观察细胞凋亡的形态学改变, 流式细胞仪 Annexin V/PI 双染法检测细胞的凋亡率, 免疫组化 SABC 法检测细胞 VEGF 的表达。结果 复尔康注射液可抑制 Hep G2 细胞的增殖, IC<sub>50</sub> 值为 (29.63 ± 1.22) mg/L。复尔康注射液 5、10 mg/L 干预 Hep G2 细胞 48 h 后, Hoechst 33258 荧光染色可见核浓缩、核碎裂等凋亡形态学改变, Annexin V/PI 双染法检测显示细胞凋亡率明显升高, 免疫组化 SABC 法检测显示 VEGF 的表达明显减弱, 且呈现出一定的量效关系。结论 复尔康注射液可诱导 Hep G2 细胞凋亡, 减弱 VEGF 的表达。

**关键词:**复尔康注射液; CCK8; Hep G2; VEGF; 凋亡

**中图分类号:**R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)08-1288-03

复尔康注射液是从青蒿中提取的有效部位青蒿油, 研制而成的能供静脉给药的多相脂质体注射液。脂质体作为抗肿瘤药物的载体, 因其具有制作简单、对机体无毒、能显著降低药物不良反应, 以及容易实现肿瘤靶向等优点而备受关注<sup>[1]</sup>。本研究观察了复尔康注射液对肝癌 Hep G2 细胞凋亡和 VEGF 表达的影响, 为复尔康注射液应用于临床恶性肿瘤的治疗提供实验依据。

## 1 材料

1.1 药品与试剂: 复尔康注射液由泸州医学院药物研究所提供, 批号 061017; RPMI 1640 培养基, GIBCO 公司产品; 胎牛血清, 天津灏洋生物制品科技责任有限公司产品; CCK8 (cell counting kit-8), 碧云天生物技术研究所产品; Hoechst 33258, 南京凯基生物科技发展公司产品; Annexin V-FITC 试剂盒, Beckman Coulter; SABC 试剂盒和 DAB 显色剂由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.2 细胞株: 肝癌 Hep G2 细胞株由四川大学华西医学中心惠赠, 本实验室长期传代保存, 采用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下常规培养。

## 2 方法

2.1 CCK8 检测细胞增殖抑制率: 取对数生长期的 Hep G2 细胞, 0.25% 胰酶制成细胞悬液, 细胞浓度为 1 × 10<sup>8</sup>/L, 接种于 96 孔板, 每孔 90 μL, 设空白对照孔加 90 μL RPMI 1640; 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱

培养 24 h 后每孔加复尔康注射液 10 μL, 终质量浓度分别为 2.5、5、10、20、40、80 mg/L, 每个浓度 4 个复孔, 阴性对照组加等体积无血清 RPMI 1640; 继续培养 48 h, 每孔加入 CCK8 10 μL 继续培养 1 h, 酶标仪 450 nm 波长下检测各孔吸光度 (A) 值, 按下列公式计算抑制率<sup>[2]</sup>, LOGIT 法计算半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)。

$$\text{细胞增殖抑制率} = [1 - (A_{\text{给药}} / A_{\text{空白对照}}) / (A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{空白对照}})] \times 100\%$$

2.2 Hoechst 33258 荧光染色观察细胞凋亡形态: 参照文献方法<sup>[3]</sup>, 取对数生长期的 Hep G2 细胞制成细胞悬液, 浓度为 5 × 10<sup>7</sup>/L, 接种于预先铺好盖玻片的 24 孔板, 每孔 450 μL, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h, 加入终浓度分别为 5、10 mg/L 的复尔康注射液, 溶媒对照组加溶媒终质量浓度为 10 mg/L, 阴性对照组加等体积无血清 RPMI 1640; 继续培养 48 h, 吸尽孔内培养液, 4% 多聚甲醛固定 10 min, Hoechst 33258 避光染色 10 min, 爬片, 水冲净, 晾干, 以紫外光 340 nm 波长激发, 荧光显微镜下拍照观察细胞凋亡形态学改变。

2.3 流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率: 取对数生长期的 Hep G2 细胞, 活细胞计数大于 95%, 接种于 6 孔板, 每孔 5 × 10<sup>5</sup> 个细胞, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h, 加入终质量浓度分别为 5、10 mg/L 的复尔康注射液, 溶媒对照组加溶媒终浓度为 10 mg/L, 阴性对照组加等体积无血清

\* 收稿日期: 2008-10-04

基金项目: 四川省教育厅青年基金项目 (2006B025)

作者简介: 刘明华 (1972—), 男, 硕士, 副教授, 研究方向为抗肿瘤药物筛选及分子靶点研究。

RPMI 1640;37、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 24 h,0.125% 胰酶消化细胞收集于离心管,PBS 洗涤一次,离心,弃上清液,将细胞悬浮于 100 μL PBS 中,每管加 Annexin V-FITC 5 μL,PI 2.5 μL,轻轻震荡混匀,置冰上避光染色 10 min,每管加 400 μL 1 × Buffer,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.4 免疫组化 SABC 法检测 VEGF 的表达:调整 HepG2 细胞悬液密度为 5 × 10<sup>7</sup>/L。接种于预先铺好盖玻片的 24 孔板,每孔 450 μL,37、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h。每孔加药 50 μL,使其终质量浓度分别为 5、10 mg/L,溶媒对照加溶媒终质量浓度为 10 mg/L,阴性对照组加等体积无血清 RPMI 1640;37、5% CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养 48 h。吸净培养液,PBS 液洗 2 次,勿使细胞脱落。按免疫组化 SABC 染色试剂盒说明书步骤染色、封片、显微镜观察。胞浆和胞膜出现棕黄色颗粒为 VEGF 阳性染色,每组随机采取 8 个视野拍照,结果用 Image-Pro plus 6.0 图像分析软件进行分析,检测其阳性物质的吸光度平均值(A)。

2.5 统计学处理:数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析(组间比较用 SNK 法)。

3 结果

3.1 CCK8 检测细胞增殖活性:当复尔康注射液终浓度大于 5 mg/L 时,HepG2 细胞的增殖即受到抑制,且呈明显的剂量依赖性,其 IC<sub>50</sub> 值为 (29.63 ±

1.22) mg/L。见图 1。

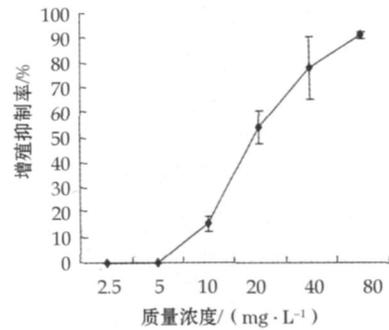
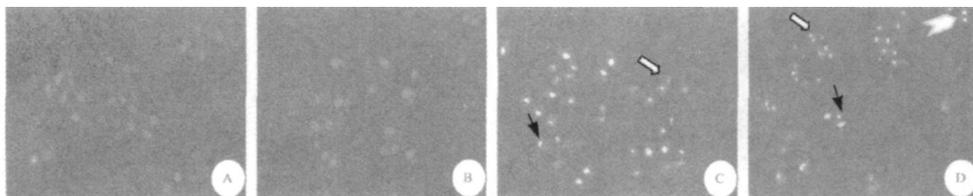


图 1 复尔康注射液对 HepG2 细胞增殖的浓度抑制率曲线 (n=3)

Fig. 1 Concentration inhibition rate curve of Fuerkang Injection on proliferation of HepG2 cells (n=3)

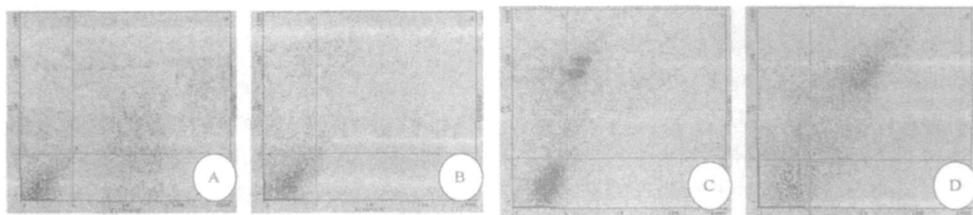
3.2 Hoechst 33258 荧光染色观察细胞凋亡形态:复尔康注射液处理组均可见核浓缩致密的强荧光团块、核碎裂以及凋亡小体等典型的细胞凋亡特征,且随药物浓度的增加,凋亡形态学改变愈明显,而阴性对照组与溶媒组细胞大小均一,成弥散均匀的淡蓝色弱荧光。见图 2。

3.3 流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率:复尔康注射液 5、10 mg/L 均可诱导 HepG2 细胞的凋亡,凋亡率分别为 (32.30 ± 1.87)%、(42.09 ± 1.43)%,呈现出一定的剂量依赖关系,与阴性对照组比较差异有显著性 (P < 0.01)。见图 3。



→核浓缩 ⇨核碎裂 ⇩凋亡小体  
A-对照 B-溶媒 C、D-复尔康注射液 5、10 mg · L<sup>-1</sup>  
→ nuclear concentration ⇨ nuclear fragmentation ⇩ apoptotic body  
A-control B-solvent C, D-Fuerekang Injection (5 and 10 mg · L<sup>-1</sup>)

图 2 HepG2 细胞凋亡的形态学改变  
Fig. 2 Apoptosis morphological changes of HepG2 cells



A-对照 B-溶媒 C、D-复尔康注射液 5、10 mg · L<sup>-1</sup>  
A-control B-solvent C and D-Fuerekang Injection (5 and 10 mg · L<sup>-1</sup>)

图 3 复尔康注射液诱导 HepG2 细胞的凋亡率  
Fig. 3 Apoptosis rate of HepG2 cells induced by Fuerekang Injection

3.4 免疫组化 SABC 法检测 VEGF 的表达:阴性对照组与溶媒对照组 Hep G2 细胞均明显表达 VEGF, VEGF 分布于胞质及胞膜,呈棕黄色颗粒状,细胞阳性率为 99%。复尔康注射液作用 48 h 后 Hep G2 细胞 VEGF 的表达不同程度减弱。采用 Image-Pro plus 6.0 图像分析软件进行分析,复尔康注射液组的阳性物质吸光度平均值明显降低,与阴性对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),结果见表 1。

表 1 复尔康注射液对 HepG2 细胞 VEGF 表达的影响  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Table 1 Effect of Fuerkang Injection on VEGF expression in HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

组别	剂量/(mg·L <sup>-1</sup> )	$\bar{A}$
阴性对照	-	1 103.61 ± 86.44
溶媒	-	1 062.61 ± 81.57
复尔康注射液	5	255.28 ± 13.70 **
	10	207.34 ± 18.93 **

与阴性对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

\*\*  $P < 0.01$  vs negative control group

#### 4 讨论

细胞凋亡又称程序性细胞死亡,是由体内某些因素触发的细胞内预存的死亡程序而导致的具有特殊形态学和生化改变的一种细胞主动性死亡方式<sup>[4]</sup>。

细胞凋亡是生命的基本特征之一,与细胞增殖共同维持机体正常生长发育和内环境稳定。细胞凋亡受阻与肿瘤的发生、发展有着密切的关系,故以选择性诱导肿瘤细胞凋亡为目标的技术已成为肿瘤治疗的重要策略之一。

肿瘤发生、发展、浸润及转移的各个阶段,均有赖于肿瘤的血管生成,新生血管提供肿瘤生长所需的营养,排除代谢产物,同时也是癌细胞播散的途径,又能促进血管渗漏。血管生成构成了肿瘤进程中的重要调节点<sup>[5]</sup>。肿瘤细胞(含间质细胞)分泌多种血管生成因子参与调节血管生成,其中以 VEGF 的作用最为突出<sup>[6]</sup>。VEGF 与其受体结合后,可释放各种生长因子及细胞因子,并以多种方式

促进肿瘤血管生成,从而为肿瘤的浸润、转移创造条件<sup>[7]</sup>。因此,可通过抑制肿瘤细胞中 VEGF 的分泌来抑制肿瘤的生长及转移是治疗肿瘤的一条新途径。

本实验结果表明复尔康注射液对体外培养的 Hep G2 细胞的增殖具有抑制作用,且呈现出良好的量效关系,其 IC<sub>50</sub> 值为 (29.63 ± 1.22) mg/L。不同浓度的复尔康注射液处理 Hep G2 细胞后, Hoechst 33258 荧光染色均可见核浓缩致密的强荧光团块以及核碎裂、凋亡小体等典型的细胞凋亡特征,且随药物浓度的增加,凋亡形态学改变愈明显。流式细胞仪检测显示,复尔康注射液可诱导 Hep G2 细胞的凋亡,且凋亡率随药物浓度的增加而增加,在 10 mg/L 时细胞凋亡率达 (42.09 ± 1.43)%。免疫组化 SABC 法检测显示复尔康注射液能使 Hep G2 细胞 VEGF 的表达不同程度减弱,与阴性对照组比较差异有统计学意义,具有一定的抗血管生成作用。

复尔康注射液能明显抑制 Hep G2 细胞的增殖,诱导其凋亡,减弱 VEGF 的表达,结合前期的抗肿瘤活性研究,揭示复尔康注射液诱导肿瘤细胞凋亡和抗血管生成可能是其抗肿瘤作用的机制,在恶性肿瘤的药物中具有广阔的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] 陈卫东, 刘晓东. 抗肿瘤药紫杉醇脂质体的研究进展 [J]. 中国药物与临床, 2005, 5(10): 776-778.
- [2] 石亮, 林向阳, 陈晓东, 等. 维生素 K3 诱导肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡及其 survivin 基因表达的变化 [J]. 临床检验杂志, 2007, 25(3): 189-191.
- [3] 王葆, 梁永锯, 符立梧, 等. Manumycin 诱导舌鳞癌 Tca8113 细胞凋亡的作用及机制 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(29): 1104-1106.
- [4] 刘玉林主编. 病理学(第 6 版) [M]. 北京:人民卫生出版社, 2004.
- [5] Visconti R P, Richardson C D, Sato T N. Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(12): 8219-8224.
- [6] Hicklin D J, Ellis L M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis [J]. *Int J Clin Oncol*, 2005, 23(5): 1011-1027.
- [7] Tanaka S, Arii S. Current status and perspective of antiangiogenic therapy for cancer: hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Clin Oncol*, 2006, 11(2): 82-89.