

癌痛消颗粒对大鼠移植性肝癌细胞凋亡及 Bcl-2 表达影响的研究*

★ 魏录翠¹ 韦艾凌² 黄小琪² (1. 湖南中医药大学 长沙410007;2. 广西中医学院第一附属医院 南宁530023)

摘要:目的:观察癌痛消颗粒对大鼠移植性肝癌细胞凋亡及 Bcl-2 表达的影响。方法:采用 Walker-256 瘤株进行 SD 大鼠的移植性肝癌的造模,造模成功后随机分为4组,癌痛消颗粒高剂量组、癌痛消颗粒低剂量组、5-Fu 组、模型组,每组10只,分别给予相应药物治疗,最后处死大鼠,取出瘤块,用免疫组化法检测瘤块中 Bcl-2 的表达情况,应用流式细胞仪检测肿瘤细胞凋亡率;另设正常组大鼠10只,不进行造模及给药,供实验结束时取肝脏组织作空白对照用。结果:和正常组比较,模型组大鼠的细胞凋亡率下降、Bcl-2 升高,运用癌痛消颗粒或 5-Fu 治疗后细胞凋亡率升高、Bcl-2 下降。结论:癌痛消颗粒对大鼠移植性肝癌细胞具有诱导凋亡作用,其机理与下调 Bcl-2 基因蛋白的表达有关。

关键词:癌痛消颗粒;Bcl-2;细胞凋亡;实验研究

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

临床和实验研究表明:中医药治疗肝癌具有改善症状、增强免疫力、提高生存质量、延长生存期、减轻放化疗毒副作用、在一定程度上稳定或缩小瘤体的作用。癌痛消颗粒为纯中药制剂,组方具有化痰

软坚、健脾理气、解毒抗癌的功效,经临床应用对原发性肝癌患者的症状及体征有明显改善作用。本实验通过建立大鼠移植性肝癌模型,分别用免疫组化法和流式细胞仪检测 Bcl-2 的表达和细胞凋亡率的

* 基金项目:广西科学基金资助(桂科自 0640148)

用效果逐渐减弱;pH ≥ 6 其对金黄色葡萄球菌的作用效果都可以,且变化不大;偏酸或偏碱对青霉的作用效果较好,pH=7 时效果最差。

2.1.3 温度对仙人掌醇提取物抑菌活性的影响 结果见表3。

表3 仙人掌醇提取物抑菌活性的耐热性试验($\bar{x} \pm s, n=6$)

菌种	抑菌圈直径/mm	
	温度/℃	
枯草杆菌	100	121
	7.83 $\pm$ 0.89	9 $\pm$ 0.82
青霉菌	6.5 $\pm$ 0	6.5 $\pm$ 0

表3可知:耐热性试验表明仙人掌醇提取物对枯草杆菌作用的热稳定性很好;对青霉作用的热稳定性较差。

3 结论

实验结果表明,仙人掌醇提取物对细菌、酵母菌和霉菌都有一定的抑菌作用。仙人掌醇提取物在0.07%~0.9%浓度范围内对大肠杆菌和枯草杆菌作用较好且变化不大,其最适作用浓度分别为0.3%和0.5%;对酵母菌作用在0.9%最好;对金黄色葡萄球菌在 $\geq 0.1\%$ 时才有效,且抑菌作用随着浓度的增加而递增;对青霉的作用浓度在0.1%~0.3%范围内最好。总的来看,pH=6 时仙人掌醇提取物的抑菌作用

都较好;pH=5 时,大肠杆菌、枯草杆菌和金黄色葡萄球菌都无菌生长。pH=8 时,对大肠杆菌的作用最弱;对酵母菌的作用效果太酸或太碱都较弱且 pH ≥ 6 其效果逐渐减弱;对枯草杆菌作用效果随 pH 值递减;偏酸或偏碱对青霉的作用效果较好。耐热性试验表明,仙人掌醇提取物对细菌作用的热稳定性很好,对霉菌作用的热稳定性较差。

参考文献

- [1] 刘寿山. 中药研究文献摘要[M]. 北京:科技出版社,1979;206.
- [2] 陈淑冰,唐雨文,孟华民,等. 仙人掌抗炎作用的研究[J]. 中药药理与临床,1991,7(6):33-34.
- [3] 张治,张宏,余健. 仙人掌药理研究进展[J]. 时珍国医国药,2000,11(2):33-36.
- [4] 翁佩芳,吴祖芳. 仙人掌浸提液的抑菌作用[J]. 宁波大学学报,2001(1):39.
- [5] 王钊,林琳,鲍世铨. 我国海南仙人掌的成分分析及开发前景. 天然产物与开发,2000(1):44-48.
- [6] 吴传茂,吴周和. 丁香提取液的抑菌作用研究[J]. 湖北工学院学报,2000,15(1):43-45.

(收稿日期:2008-05-13)

变化,探讨癌痛消颗粒抗肝癌作用的部分机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SD 雄性大鼠 50 只,体重 (200 ± 20) g,取 40 只制作大鼠移植性肝癌模型;断奶 Wistar 雄性大鼠 4 只,体重 60 ~ 80g,用于癌细胞增殖传代。均购于广西医科大学实验动物中心(动物生产合格证号:SCXK2003-0003)。

1.1.2 瘤株 种鼠购于武汉大学中国典型培养物保藏中心,为 walker-256 腹水型 Wistar 大鼠,重约 80 g。

1.1.3 药物 癌痛消颗粒:主要成分为桃仁、当归、赤芍、红花、乌药、延胡索、三棱、莪术、香附、黄芪、党参、山药、白花蛇舌草、半枝莲等,用单味中药免煎颗粒组配而成,各单味中药由江苏省江阴市天江药业有限公司生产提供。5-氟尿嘧啶(5-Fu)注射液(0.25g/10ml)由上海旭东海普药业公司生产。

1.1.4 主要试剂 Annexin-v/PI:由美国贝克曼苏州生物技术有限公司提供,批号:F104002;即用型二步法免疫组化检测试剂盒及 Bcl-2 单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.5 主要仪器 德国 LEICA-RM2135 石蜡切片机、ZMN-7803 全自动组织包埋机、ZMN-9802 全电脑自动组织脱水机、Olympus 显微镜、EPICSXL 型流式细胞仪分析系统(美国贝克曼库尔特公司)、5804R 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司)、移液器(德国 Eppendorf 公司)、水浴箱(上海跃进医疗有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 造模 SD 雄性大鼠 50 只,按比例随机留 10 只为正常饲养组,其余 40 只进行造模。参照文献方法^[1,2]用 1ml 注射器吸取 walker-256 荷瘤鼠腹水,注入幼年 Wistar 大鼠皮下,长出皮下实体瘤,取瘤体边缘鱼肉状、质地稍韧的瘤组织切成约 2 mm^3 小块,SD 大鼠麻醉后打开腹腔,暴露肝脏,在肝左外叶表面切一长 2 mm 的切口,将备用瘤块完全埋入,用可吸收凝胶海绵填塞压迫,防止瘤块脱出及出血,肝叶送入腹腔,缝合腹壁。大鼠接种瘤瘤 7 天后肝脏中形成直径 8 ~ 10 mm 大小的实体瘤。

1.2.2 分组及给药 模型动物按比例随机分为 4 组,癌痛消颗粒高剂量组,癌痛消颗粒低剂量组,5-Fu 组,模型组,每组 10 只。正常组大鼠 10 只,不进行造模及给药,供实验结束时取肝脏组织作空白对照用。于造模后第 8 天开始,分别给予高、低剂量的癌痛消颗粒(分别以 110、55 mg/ml 按 $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$

$\cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃)、模型组给予等量生理盐水,以上 3 组每日给药 1 次;5-Fu 组按 $75 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{次})$ 腹腔注射给药,隔日 1 次,共用 7 次。连续给药 14 d,停药 24 h 后处死所有动物,造模各组取出瘤块,正常组取肝脏组织,以生理盐水冲洗后,10% 中性福尔马林液固定,石蜡包埋,进行连续石蜡切片,厚度 $4 \mu\text{m}$;每只动物另取 2 g 新鲜组织(肿瘤或肝脏组织),以进行流式细胞检测。

1.2.3 免疫组化染色 Bcl-2 单抗的免疫组化染色,具体操作按试剂盒说明书进行。主要染色步骤如下:切片脱蜡至水,3% H_2O_2 孵育消除内源性过氧化物酶的活性,高压抗原修复,非免疫性动物血清孵育,滴加一抗,滴加山羊抗小鼠 IgG 抗体-HRP 多聚体,以上各步骤间均以 PBS 冲洗 3 次。DAB 显色,苏木素淡复染,酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,显微镜观察。

免疫组化结果判定 Bcl-2 基因主要位于细胞浆,染色阳性呈棕褐色,选择切片中染色反应最强的区域,在 400 倍显微镜下,每例计数 10 个视野,以细胞浆内出现棕褐色颗粒为阳性,染色结果综合染色程度及阳性细胞百分比两方面进行综合计分,以二者积分和记分。染色程度计分为:细胞无染色为 0 分,染色弱但明显高于背景者为 1 分,染色清晰计为 2 分,染色强计为 3 分。阳性细胞百分比计分:阳性细胞数: $\leq 10\%$ (0 分), $10\% \sim \leq 25\%$ (1 分), $25\% \sim \leq 50\%$ (2 分), $> 50\%$ (3 分)。

1.2.4 流式细胞仪检查 单细胞悬液的制备:取 2 g 左右新鲜组织放入平皿中,加少量 PBS,用眼科剪剪至匀浆状,加少量 PBS,用吸管吸取组织匀浆,以 100 目尼龙网过滤,然后离心沉淀($1500 \text{ r}/\text{min}$) 3 min,再用 PBS 洗 3 次,每次以短时低速离心沉淀($500 \text{ r}/\text{min}$)去除细胞碎片,再以 300 目尼龙网过滤去除细胞团块,调整细胞浓度为 $1.2 \times 10^6/\text{ml}$, 4°C 冰箱保存备检。

采用 Annexin-v/PI 双染色法对细胞 DNA 染色,具体操作按试剂盒说明书。上流式细胞仪按操作规程,用标准荧光微球校准散射光及荧光灵敏度至符合标准,调整流式细胞仪变异灵敏度至 $\text{CV} < 2\%$,同时设对照管和补偿设置管,每个样本获取 10 000 个细胞,检测对照细胞,检测待测标本,然后开启分析专用软件进行分析。

1.3 统计学处理

所有数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析,采用单因素方差分析,各组间均数两两比较用 q 检验。

2 实验结果

各组大鼠 Bcl-2 的表达水平及细胞凋亡率的测定结果见下表 1。

表 1 各组大鼠 Bcl-2 表达水平及细胞凋亡率的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bcl-2	细胞凋亡率(%)
癌痛消高剂量组	10	1.50 ± 0.53 ☆★※	17.89 ± 1.32 ☆★※
癌痛消低剂量组	10	2.40 ± 0.52 ☆★▲	12.03 ± 1.68 ☆★▲
5-Fu 组	10	1.60 ± 0.52 ☆★	16.79 ± 1.31 ☆★
模型组	10	4.10 ± 0.88 ☆	3.42 ± 1.89 ☆
正常组	10	0.20 ± 0.42	7.83 ± 2.10

注:与正常组比较,☆ $P < 0.01$;与模型组比较,★ $P < 0.01$;与 5-Fu 组比较,▲ $P < 0.01$;与癌痛消低剂量组比较,※ $P < 0.01$ 。

实验结果显示:造模各组 Bcl-2 的表达水平均高于正常组,差异有非常显著性意义(均 $P < 0.01$),以模型组的表达最高;癌痛消高、低剂量组和 5-Fu 组均可明显降低 Bcl-2 的表达,和模型组比较,差异有非常显著性意义(均 $P < 0.01$),其中以癌痛消高剂量最低;在降低 Bcl-2 的表达作用上,癌痛消高剂量组和 5-Fu 组的作用相似($P > 0.05$),癌痛消高剂量组作用优于癌痛消低剂量组($P < 0.01$)。

正常肝细胞存在一定的凋亡率,说明细胞凋亡是细胞得以维持正常形态的一种形式;模型组大鼠细胞凋亡率明显下降,和正常组比较具有非常显著性差异($P < 0.01$),表明细胞凋亡率下降是肝癌发生的机制之一;癌痛消高、低剂量组和 5-Fu 组可明显提高肝癌细胞的凋亡率,和模型组比较有极显著性差异(均 $P < 0.01$),3 个治疗组以癌痛消高剂量组的凋亡率最高;癌痛消高剂量组和 5-Fu 组比较,差异无显著性意义($P > 0.05$),癌痛消两个剂量组比较,高剂量组的凋亡率明显高于低剂量组($P < 0.01$),说明在诱导肝癌细胞凋亡作用上,癌痛消高剂量组的作用更为明显。

3 讨论

细胞凋亡(apoptosis)的概念于 1972 年由 Kerr^[3]等首先提出,是指由体内因素触发的、受机体严密调控的细胞程序性死亡过程,它呈现出独特的有别于细胞坏死的形态学和生物学特点,被普遍认为是有机体维持个体内稳态恒定的极其重要的机制之一。业已证明,细胞凋亡受阻与肿瘤的形成密切相关^[4],细胞凋亡途径的紊乱将导致细胞发育异常从而引起并加速肿瘤的发生和恶化。细胞凋亡受凋亡抑制基因和凋亡促进基因的调控,Bcl-2 是最重要的抑制细胞凋亡的基因,在正常肝组织中,Bcl-2 不表达或低表达,在多数原发性肝细胞癌(hepatocarcinoma, HCC)中 Bcl-2 高表达,其阳性率明显高

于癌前组织,且 HCC 分化越低,Bcl-2 表达越高^[5]。Bcl-2 能抑制细胞的凋亡,导致肝癌发生。

李东垣《医学发明》中指出:“血者皆肝之所主,恶血必归于肝,不问何经之伤,必留于胁下,盖肝藏血之故也。”说明瘀血与肝有着密切的关系,邪客于肝,必入血分。《医林改错》亦曰:“结块者,必有形之血也。”包括肝癌在内的肿瘤均与血行不畅、瘀血内停有关。肝癌常见的症状胁下积块、肋肋疼痛、痛处固定不移、面色晦暗、红丝赤缕、青筋暴露、舌色青紫瘀斑、脉弦涩等均为血瘀证的具体表现。《内经》云“坚者削之”、“结者散之”、“坚者软之”,就是指应用祛瘀软坚散结之法治疗癥瘕、痞块之类病证。肝癌是由于体内多种因素引起气机阻滞、瘀血内停、湿热火毒蕴结,日久瘀血毒邪积聚而成,其病机特点集中体现在血瘀、毒聚、正虚三个方面。癌痛消颗粒由膈下逐瘀汤加黄芪、山药、党参、三棱、莪术、白花蛇舌草、半枝莲而成,方中五灵脂、当归、川芎、桃仁、丹皮、赤芍、红花等均归肝经,具活血化瘀作用,乌药、延胡索、香附、枳壳疏肝理气止痛,三棱、莪术破血消积、化瘀软坚,黄芪、山药、党参健脾益气以补正,白花蛇舌草、半枝莲清热解暑抗癌,组方切合肝癌病机,具有化瘀软坚、解毒抗癌、健脾理气、行气止痛的功效,祛邪不伤正、扶正不留邪。

本实验结果表明:癌痛消颗粒对大鼠移植性肝癌细胞具有诱导凋亡作用,其机理与下调 Bcl-2 基因蛋白的表达有关。中药一般是通过多种途径、多个环节、多个靶点发挥抗肿瘤效应的,癌痛消颗粒为中药复方制剂,成分复杂,其抗肝癌作用的其他环节和机制尚待进一步的研究证实。

参考文献

- [1] 王锦波,吕毅,潘承恩,等. W256 大鼠肝癌模型的制作及传代保存[J]. 肝胆外科杂志,1995,3(2):121-122.
- [2] 邵成伟,田建明. 两种大鼠肝癌模型制作方法的比较研究[J]. 临床放射学杂志,2002,21(12):985-987.
- [3] Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26:239-245.
- [4] Mullauer L, Gruber P, Seibinger D, et al. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease [J]. Mutat Res, 2001, 488:211-231.
- [5] Guo XZ, Shao XD, Liu MP, et al. Effect of bax, bcl-2 and bcl-xL on regulating apoptosis in tissues of normal liver and hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol, 2002, 8(6): 1059-1062.

(收稿日期:2008-04-15)