

网络出版时间: 2019-1-11 14:06 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190109.1117.022.html>

加味逍遥散对肝癌细胞凋亡及钙离子的影响

王 昆, 王瑶瑶, 杨 茂, 李滕仙, 陈昱江

摘要 目的 观察加味逍遥散对离体肝癌 SMMC-7721 细胞生长的抑制作用及其对细胞内钙离子浓度的影响, 探讨中药治疗肝癌的发病机制。方法 采用 MTT 法测定高、中、低剂量加味逍遥散对肝癌 SMMC-7721 细胞生长的抑制作用; 并利用流式细胞仪分析细胞凋亡情况; 利用激光共聚焦显微镜观察细胞内游离钙离子情况。结果 加味逍遥散对肝癌 SMMC-7721 细胞的生长有抑制作用, 并且抑制率随着药物浓度的升高呈升高趋势; 加味逍遥散高、中、低剂量组给药后凋亡率分别为 0.276、0.202、0.096; 加入不同剂量的加味逍遥散时, 钙离子荧光强度显示不同, 低、中剂量时荧光增强不明显, 而高剂量时细胞内荧光强度明显增强。结论 加味逍遥散能抑制肿瘤细胞生长, 促进细胞凋亡, 同时能引起细胞内钙离子变化, 这可能是加味逍遥散诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的机制之一。

关键词 加味逍遥散; 肝癌 SMMC-7721 细胞; 细胞生长抑制率; 细胞凋亡; 细胞内钙离子

中图分类号 R 735.7; R 730.52

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)02-0272-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.02.022

目前, 全世界每年约 1 400 万人患肿瘤, 约 800 万人死于恶性肿瘤, 新发肝癌患者约占 0.50 左右^[1], 而中国恶性肿瘤发生位居全球恶性肿瘤中等偏上水平^[2]。据 2015 年中国癌症统计数据显示, 肝癌发病率居恶性肿瘤第 4 位, 死亡率居第 3 位^[3]。全世界对抗肿瘤药物的研究非常关注, 从中医药本身而言, 如何提高患者的生存质量, 减少痛苦是现阶段研究的出发点之一。肝癌在中医学中属于肝积、臌胀、积聚等病范畴。中药健脾养阴、活血除癥、软坚散结, 是治疗肝癌的主要论治法则^[4-6]。根据临床有经验老中医, 对传统经典方剂逍遥散进行加味, 该研究观察其对离体肝癌 SMMC-7721 细胞生长的抑制作用及对细胞内钙离子的影响, 初步探讨加味

逍遥散的抗癌机制。

1 材料与方法

1.1 材料 肝癌 SMMC-7721 细胞株由昆明细胞库提供; 顺铂购自上海旭东海普药业有限公司; 加味逍遥散由北柴胡、当归、白芍、白术、茯苓各 12 克及生姜、炙甘草、薄荷、党参、法夏、陈皮、白马骨、茵陈、山楂各 6 克组成, 所用中药一次性备齐, 经鉴定符合药典用药规定, 购自同济堂药房; HYCLONE DMEM 培养基、标准 Hyclone 胎牛血清购自美国 Thermo Fisher 公司; 0.002 5 Hyclone 胰蛋白酶、噻唑蓝 (MTT) 及 PBS 购自北京索莱宝公司; 酶标仪 (ZS-3 型) 购自北京新凤机电公司; ANNEXIN V-KFLUOR647 细胞凋亡检测试剂盒 (CAT NO. KGAV113-20ASSAYS)、钙离子分析指示探针 Fluo-3 (CAT NO. KGAF023-1) 购自南京凯基公司; CO₂ 培养箱 (MCO-475 型) 购自日本三洋公司; 激光共聚焦显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 肝癌 SMMC-7721 细胞在含 10% 胎牛血清的培养液中培养, 培养条件为 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度。取对数生长期的细胞, 按不同实验要求进行。

1.2.2 实验分组 空白对照组; 顺铂阳性对照组 (0.03 mg/ml 顺铂组); 加味逍遥散各剂量组: 低剂量组 (10 mg/ml)、中剂量组 (20 mg/ml)、高剂量组 (40 mg/ml)。以上中药提取物, 生药浓度均为 1 g/ml。中药提取物经高速离心取上清液 (3 500 r/min, 10 min, 2 次; 13 000 r/min, 10 min, 1 次), 0.22 μm 的微孔滤器除菌, 加过滤的饱和 NaHCO₃ 调 (pH 7.0 左右) 稀释, 新鲜配制使用。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖 待细胞进入对数生长期后, 传至 96 孔板 (NEST), 一次需要一块或根据实验需要调整, 做药毒性实验 MTT, MTT 配置 (50 mg MTT 溶解于 10 ml 培养基中), 0.22 μm (millipore) 滤器过滤后使用。加入不同浓度含药培养基, 培养 48 h, 加入 MTT 20 μl/孔, 培养 4 h, 抽出培养液, 加入 DMSO 150 μl/孔, 低速震荡 5 min, 450 nm

2018-09-27 接收

基金项目: 贵州省科学技术联合基金项目 (编号: 黔科合 LH 字 [2014]7337 号)

作者单位: 贵阳中医学院第一附属医院病理科, 贵阳 550001

作者简介: 王 昆, 女, 硕士研究生;

陈昱江, 男, 副主任医师, 责任作者, E-mail: 956693816@qq.com

波长读取吸光度值。细胞增殖抑制率(%) = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 对照组 OD 值 × 100%。

1.2.4 细胞凋亡检测 进行细胞计数,调整细胞为 1×10^5 个/ml,按 2 ml/孔加入 6 孔板中,贴壁培养 24 h,去除培养基,PBS 漂洗后,加入无血清培养基,同化培养 24 h,去除培养基,PBS 漂洗后,加入对应含药培养基,干预 48 h,去掉孔板中培养基,PBS 漂洗 3 次,使用 0.3% 胰蛋白酶(不含 EDTA)消化 5 min,细胞变圆脱落后收集至 2 ml 离心管中,2 000 r/min 离心 5 min,去掉上清液,用含 2% BSA 的 PBS 溶液重悬细胞,2 000 r/min 再次离心 5 min,去掉上清液。加入 500 μ l 的 Binding buffer 重悬细胞。加入 5 μ l Annexin V-Kfluor 647 和 7-AAD,混匀。避光,室温,反应 5 ~ 15 min,流式细胞仪检测,激发波长 650 nm,最大发射波长 665 nm,Annexin V-Kfluor 647 的红色荧光 FL4 通道检测,激发波长 546 nm,最大发射波长 647 nm,7-AAD 用 FL3 通道检测。

1.2.5 激光扫描共聚焦显微镜检测细胞内钙离子 正常培养至生长对数期,PBS 漂洗后,用胰酶消化 3 min,待细胞变圆脱落后,加入完全培养基终止消化,吹打重悬。进行细胞计数,调整细胞为 1×10^5 个/ml,按 0.5 ml/孔加入 6 孔板中,贴壁培养 24 h,去除培养基,PBS 漂洗后,加入无血清培养基,同化培养 24 h,去除培养基,PBS 漂洗后,加入对应含药培养基,干预 48 h。配制 Fluo-3 工作液:2.5 μ l 1 mmol/L Fluo-3 + 996.5 μ l 1640 得到 1 ml 2.5 μ mol/L Fluo-3,再加入 1 μ l F-127 混匀备用。去掉培养皿中培养基,Hank's 漂洗 3 次,以 200 μ l/皿加入 Fluo-3 工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。去掉 Fluo-3 工作液,Hank's 漂洗 3 次,加入无血清 1640 培养基,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。激光共聚焦检测,激发波长 506 nm,拍照取图。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 24.0 软件进行统计分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 ANOVA(单因素方差分析)判断,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测结果 结果显示,与空白对照组比较,顺铂组在对 SMMC-7721 肝癌细胞作用 48 h 后具有抑制肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的作用($P < 0.001$);加味逍遥散的低、中、高剂量组(10 mg/ml、20 mg/ml、40 mg/ml)与空白对照组比较均显示对肝癌 SMMC-7721 细胞增殖有一定的抑制作用,并且这种抑制作用随着剂量的增大而逐渐增强,差异均有

统计学意义($P < 0.001$)。见表 1。

表 1 加味逍遥散不同浓度对 SMMC-7721 肝癌细胞增殖抑制作用的量效关系($n=3, \bar{x} \pm s$)

各实验组	抑制率	F 值	P 值
顺铂 a	46.532 $\pm$ 2.561	201.943	<0.001
中药高浓度 b	77.165 $\pm$ 2.882		
中药中浓度 c	74.243 $\pm$ 4.344		
中药低浓度 d	56.133 $\pm$ 4.162		
a ~ b	-30.632		<0.001
a ~ c	-27.710		<0.001
a ~ d	-9.600		<0.001
b ~ c	2.923		0.05
b ~ d	21.032		<0.001
c ~ d	18.110		<0.001

x ~ y 表示采用 LSD 法多重比较时两组抑制率平均值之差

2.2 流式细胞仪检测结果 加入药物后显示,空白对照组以大量活细胞为主,凋亡率为 0.026;顺铂组的凋亡早期及晚期细胞明显增多,凋亡率为 0.820;加味逍遥散高剂量组的坏死细胞和凋亡细胞也增多,凋亡率为 0.276;加味逍遥散中剂量组的坏死细胞和凋亡细胞均有增多,但不如高剂量组明显,凋亡率为 0.202;加味逍遥散低剂量组的坏死细胞和凋亡细胞有少量增多,凋亡率为 0.096(图 1)。说明加味逍遥散对肝癌 SMMC-7721 细胞有抑制作用,并随着浓度的变化而变化。

2.3 激光共聚焦检测结果 实验显示,加入顺铂时,荧光强度增强明显。加入加味逍遥散不同剂量的荧光反应强度不同,当加入高剂量时,荧光强度增强明显;加入中剂量时,荧光强度有增加,但不明显;而加入低剂量时,荧光强度没有变化。而且当荧光强度增强后,并没有立刻又下降。见图 2。

3 讨论

肿瘤的发病率日趋上升,治疗肿瘤已经成为刻不容缓的课题。现代医学治疗肿瘤,主要是西医学的手术切除、化学药物和放射治疗。近年在临床治疗肿瘤的大量资料积累下,中医药在治疗肿瘤上,无论是对癌细胞的直接杀伤,还是通过提高免疫力来抑制肿瘤细胞的生长,都有不可忽视的作用^[7-9]。而且中医的整体治疗观念和中药的多途径药理作用决定了中医药在治疗肿瘤中具有其独特的优势。逍遥散是中医传统名方,具有健脾益气、调正补虚、提高机体免疫力的作用。根据临床经验对其进行加减,针对性的治疗肿瘤及其并发症,有很好的效果^[10-12]。

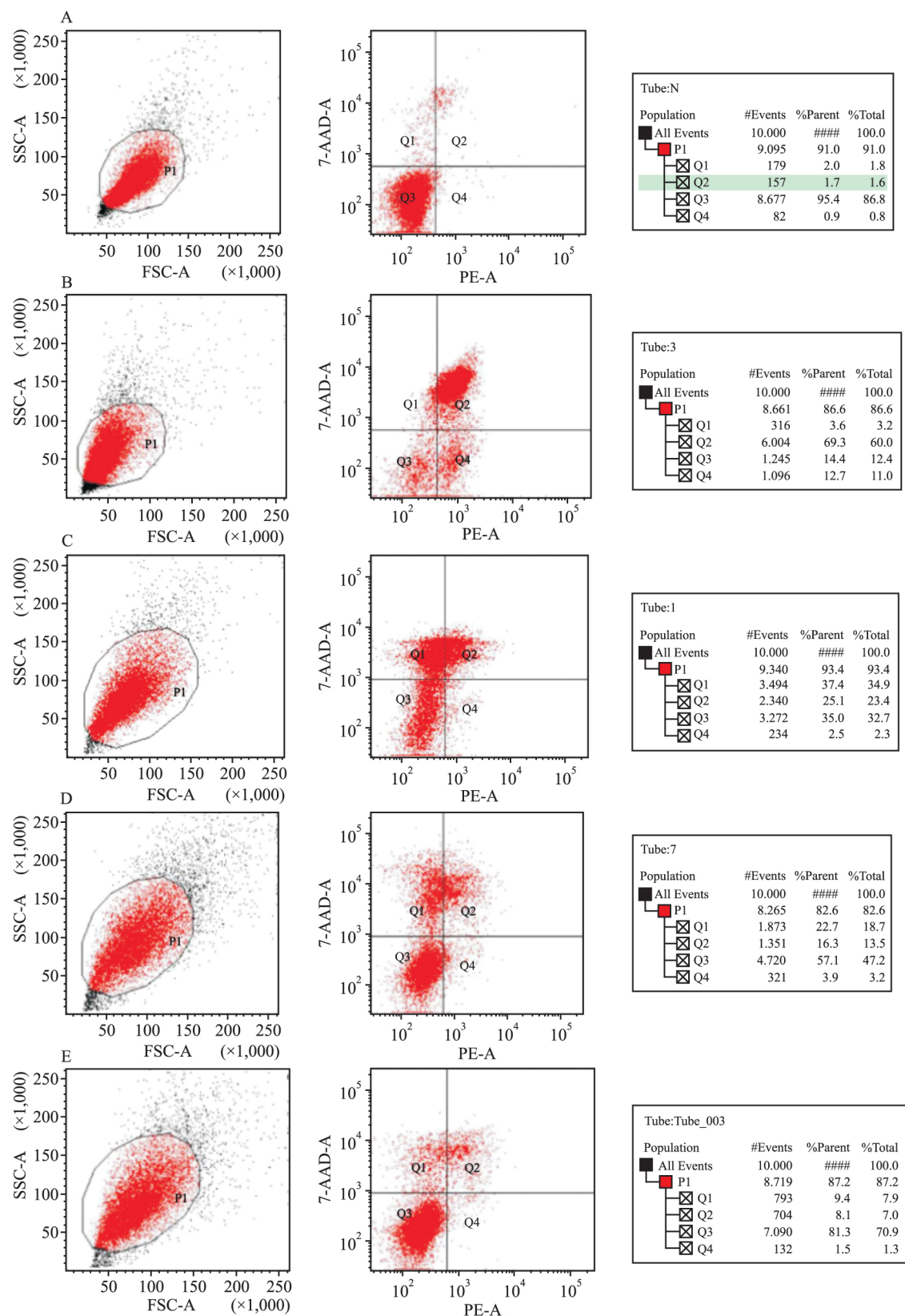
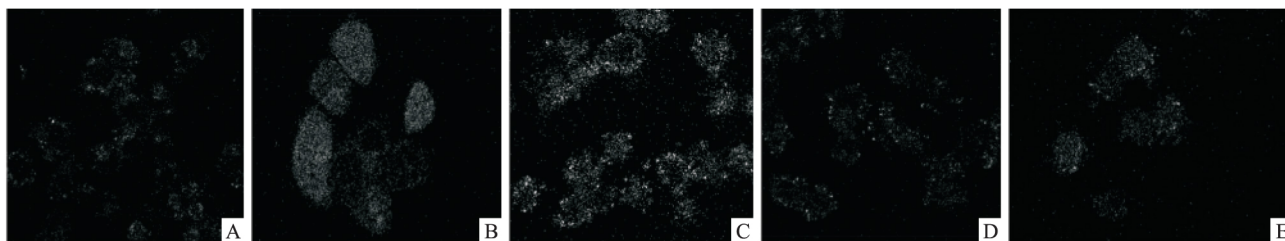


图1 对 SMMC-7721 肝癌细胞凋亡的影响

Q1:坏死细胞;Q2:凋亡晚期细胞;Q3:活细胞;Q4:凋亡早期细胞;A:空白对照组;B:顺铂组;C:加味逍遥散高剂量组;D:加味逍遥散中剂量组;E:加味逍遥散低剂量组

图2 作用于 SMMC-7721 肝癌细胞后钙离子荧光强度表现 $\times 200$

A:空白对照组;B:顺铂组;C、D、E:分别为加味道遥散高、中、低剂量组

原发性肝癌是常见的恶性肿瘤之一,其治疗是研究的重点。恶性肿瘤细胞具有无限增殖的特点,这是区别于正常细胞最显著的生物学特征,因此,抑制肿瘤细胞增殖,诱导其凋亡成为治疗的最终目的。在本实验中,加味道遥散各个剂量组均对离体肝癌 SMMC-7721 细胞有抑制作用,并随着浓度的变化而变化。细胞无限增殖是通过细胞分裂、经历无数细胞周期来实现的,当细胞周期发生障碍时,细胞增殖将受到抑制。流式细胞检测显示肝癌 SMMC-7721 细胞随着中药浓度的增高,凋亡率逐渐增高。这些都说明了加味道遥散对离体肝癌 SMMC-7721 细胞有抑制作用,其发生机制可能是通过影响肝癌细胞生长周期来完成,今后可从周期的几个阶段分别观察其具体影响从而深入研究。该实验是将加味道遥散直接作用于细胞,而该药为中药复方煎剂,在作用于肿瘤细胞时,可能存在改变细胞环境、有效成分及浓度,因此得到的结果会受一定的影响,正如在流式细胞检测结果中当高剂量中药加入后,除了细胞凋亡率明显增加以外,也出现坏死细胞明显增加,因此今后也将从这些方面进一步深化研究。

目前提到细胞内 Ca^{2+} 是一种重要的第二信使,参与调节细胞膜的通透性,影响环核苷酸及磷酸肌醇代谢,调控酶活性。 Ca^{2+} 本身作为一种凋亡信号,可调节 Ca^{2+} 敏感的关键酶如蛋白激酶、磷脂酶、核酸内切酶及谷氨酰氨转移酶等诱导凋亡。在实验中,当加入加味道遥散高、中剂量时,细胞内钙离子荧光强度增加,特别是加入高剂量的中药时荧光强度增加明显,而且随后并未立刻下降,说明在该药的中、高剂量加入时,可增加细胞内钙离子的浓度,影响细胞内钙离子稳定,且暂时无法通过自身调节而

使钙离子浓度恢复正常状态,这可能就是加味道遥散直接抑制离体肝癌 SMMC-7721 细胞增殖、诱发其凋亡的作用机制。但对细胞膜通透性的影响、细胞内钙离子浓度的调节范围及具体作用时间尚不清楚,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 国家癌症中心. 中国肿瘤登记工作指导手册(2016) [M]. 北京:人民卫生出版社, 2016:59-75.
- [2] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65:87-108.
- [3] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. Can J Clin, 2016, 66(2):115-32.
- [4] 占义平, 凌昌全. 原发性肝癌中医证候研究概述 [J]. 中医杂志, 2017, 58(2):167-70.
- [5] 王磊, 周荣耀, 周荣耀. 健脾补肾健脾胃法治疗原发性肝癌经验 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(2):2547-8.
- [6] 宋慧娟, 乔飞, 邵铭. 中医药治疗原发性肝癌的研究进展 [J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32(1):174-7.
- [7] 史国军, 叶兴涛, 陆宁, 等. 健脾柔肝方联合替吉奥胶囊治疗中晚期原发性肝癌患者 30 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2016, 57(8):677-81.
- [8] 山广志, 邱慧颖, 史国军, 等. 健脾柔肝汤对荷肝癌 H22 小鼠肿瘤组织 VEGF 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(10):2465-8.
- [9] 黄静, 马萍, 卢建峰. 中医药干预肝癌干细胞的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(43):74-6, 78.
- [10] 朱沛维. 六味地黄汤合丹栀逍遥散加减改善乳腺癌三苯氧胺不良反应患者的效果分析 [J]. 临床合理用药, 2017, 10(9C):15-6.
- [11] 郭维, 孙琪, 桂牧微, 等. 逍遥散对慢性应激大鼠模型血清肿瘤标志物的影响 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(4):807-9.
- [12] 朱政, 杨昌卫, 陈永强, 等. 丹栀逍遥散联合消融治疗肝脏肿瘤的临床观察 [J]. 中医临床研究, 2017, 9(8):54-5.

网络出版时间: 2019-1-11 14:06 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190109.1117.023.html>

水飞蓟宾和卡托普利联合用药对大鼠酒精性肝病作用及机制的研究

李光明 李万平 李晓冰 张红 李华 李茂

摘要 目的 观察水飞蓟宾和卡托普利联合用药对酒精性肝病作用及其机制。方法 取健康的雄性SD大鼠60只,随机选取12只作为正常组,其余48只大鼠作为造模组,造模组采用35%、40%、45%、50%的酒精每周递增法分两次灌胃。造模6周,病检有脂肪肝形成,将造模组随机分为4组:模型组、卡托普利组、水飞蓟宾、卡托普利和水飞蓟宾联合用药组,每组12只,于两次灌胃酒精的间隙给药。连续给药6周后,腹主动脉取血,制备肝匀浆、肝脏病理切片。检测大鼠血浆中天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、肝匀浆中核转录因子- κ B(NF- κ B)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。结果 模型组AST、ALT、LDL-C、

NF- κ B、TNF- α 均显著升高,HDL-C降低($P < 0.05$);卡托普利和水飞蓟宾联合用药能降低大鼠血浆中ALT、AST、LDL-C、NF- κ B、TNF- α 的含量($P < 0.05$),升高血浆中HDL-C的含量($P < 0.05$);肝切片检查显示,正常组大鼠肝细胞形态正常,肝血窦及门管区清晰,模型组大鼠肝细胞肿大,排列紊乱伴有炎细胞浸润,大部分肝细胞发生脂肪变性,联合用药组只有少量肝细胞发生脂肪变性,且大多数肝细胞排列比较正常,细胞水肿较少,炎细胞浸润较低。结论 卡托普利和水飞蓟宾联合用药对酒精性肝病大鼠有显著的治疗作用,其机制可能与降低NF- κ B、TNF- α 的水平有关。

关键词 水飞蓟宾;卡托普利;酒精性肝病

中图分类号 R 96

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)02-0276-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.02.023

2018-09-27 接收

基金项目:四川省科技厅应用基础研究计划项目(编号:14JC0149)

作者单位:西南医科大学药学院药理教研室 泸州 646000

作者简介:李光明,男,硕士研究生;

李万平,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:

675832860@qq.com

酒精性肝病(alcoholic liver disease,ALD)是由于长期饮酒所致的肝脏疾病,主要有3种类型:酒精性脂肪肝、急性酒精性肝炎和酒精性肝硬化。研究^[1]表明,长期大量饮酒,使肝细胞反复发生脂肪

Influence of Jiawei Xiaoyaosan on hepatoma cell apoptosis and calcium

Wang Kun ,Wang Yaoyao ,Yang Mao ,et al

(Dept of Pathology ,The First Affiliated Hospital of Guiyang College
of Traditional Chinese Medicine ,Guiyang 550001)

Abstract Objective To probe the inhibitory effect of human hepatocarcinoma cell line SMMC-7721 and the influence of intracellular free Ca^{2+} levels induced by Jiawei Xiaoyaosan, so as to reveal the pathogenesis of Chinese medicine treatment of liver cancer. **Methods** Determined by MTT method was used to determine the high, medium and low dose Jiawei Xiaoyaosan for liver cancer SMMC-7721 cell growth inhibition. The rate of apoptosis of liver cancer SMMC-7721 cell were examined by flow cytometry. The fluorescent intensity of intracellular free Ca^{2+} was observed by laser scanning confocal microscopy. **Results** Jiawei Xiaoyaosan had an inhibitory effect on the growth of liver cancer SMMC-7721 cells, and the inhibition rate increased with the increase of drug concentration. The apoptotic rate of Jiawei Xiaoyaosan was 0.276 in the high, 0.202 in the medium and 0.096 in the low dose groups. When adding different doses of Jiawei Xiaoyaosan, the fluorescence intensity of calcium ions was different. The fluorescence enhancement was not obvious at low and medium doses, while the intracellular fluorescence intensity was significantly enhanced at high doses. **Conclusion** Jiawei Xiaoyaosan can inhibit the proliferation of cancer cells and promote their apoptosis, and can cause changes in intracellular Ca^{2+} at the same time. This may be one of the mechanisms of Jiawei Xiaoyaosan to induce apoptosis of liver cancer SMMC-7721 cells.

Key words Jiawei Xiaoyaosan; hepatoma SMMC-7721 cell; cell growth inhibition rate; apoptosis; intracellular free Ca^{2+}