

益气化瘀解毒方药对人肝癌 HepG2 细胞增殖和裸鼠移植瘤生长的影响

曾普华¹, 邵文辉², 潘敏求¹, 朱克俭¹, 蒋益兰¹, 李勇敏¹, 唐 珍¹

Prescription form of Strengthening Qi and Clearing Stasis and Poison effect on HepG2 liver cancer cell proliferation and the influence of the nude mouse transplantation tumor growth

Zeng Puhua¹, Gao Wenhui², Pan Minqiu¹, Zhu Kejian¹, Jiang Yilan¹, Li Yongmin¹, Tang Zhen¹

¹State Administration of Traditional National Key Disciplines, Affiliated Hospital, Hunan Academic University of TCM, Hunan Changsha 410006, China; ²Institute of TCM, Hunan University of Chinese Medicine, Hunan Changsha 410208, China.

【Abstract】 Objective: To investigate the effects of Prescription form of Strengthening Qi and Clearing Stasis and Poison (SQCP) of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells proliferation and the influence of the nude mouse transplantation tumor growth. **Methods:** With SQCP drug - containing serum intervention on HepG2 cells, observing cell proliferation condition after 24, 48, 72 hours. Human liver transplantation tumor model, were divided into 7 groups, respectively by drug intervention such as SQCP, astragalus root, rhizoma zedoariae, paris polyphylla, gecko, cisplatin, to observe the transplanted tumor growth for 3 weeks. **Results:** The dose of medicated serum group and do not contain medicine absorbance differences between serum group significantly ($P < 0.05$). Comparison between the high and low dose groups had significant difference ($P < 0.05$). Nude mice weight comparison: cisplatin group were different before and after the change compared with other groups ($P < 0.05$), no difference between the other groups ($P > 0.05$). Drug delivery to tumors before and after product comparison: tumors and different comparison, after the treatment group and the blank group were significant different ($P < 0.05$). All parties respectively with astragalus membranaceus group, paris polyphylla, gecko group and blank control group were significant different ($P < 0.05$). The whole party and cisplatin group was no significant different ($P > 0.05$). **Conclusion:** SQCP medicated serum can inhibit the growth of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. The whole party group had no effect on body weight in a tumor - burdened nude mice, the whole party group has stronger role in tumor suppression compare with a single taste traditional Chinese medicine (TCM), the formula of TCM such as rhizoma zedoariae, paris polyphylla, gecko has a certain degree tumor suppression function, including rhizoma zedoariae tumor suppression effect is stronger. Formula in the main single Chinese medicine played a coordination tumor suppression effect, the whole party has the strongest inhibitory tumor effect.

【Key words】 Prescription form of SQCP; HepG2 cells; Proliferation; transplantation tumor

Modern Oncology 2014, 22(01): 0008 - 0011

【摘要】 目的: 探讨益气化瘀解毒方药对人肝癌 HepG2 细胞增殖和裸鼠移植瘤生长的影响。方法: 以益气化瘀解毒方含药血清干预 HepG2 细胞后, 观察 24、48、72 小时后细胞增殖状况; 建立人肝癌移植瘤模型, 分为 7 组, 分别以益气化瘀解毒方、黄芪、莪术、重楼、壁虎、顺铂等药物干预 3 周, 并设空白对照组, 观察移植瘤生长状况。结果: 各剂量含药血清组与不含药血清组之间的吸光度值差异明显 ($P < 0.05$); 高、低剂量组间比较有明显差异 ($P < 0.05$)。裸鼠体重比较: 顺铂组用药前后差值变化与其它各组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其它组间差异比较不明显 ($P > 0.05$)。成瘤体积比较: 给药后瘤体积及差值比较, 各组与空白组均有明显差异 ($P < 0.05$); 全方组分别与黄芪组、重楼组、壁虎组、空白对照组等比较有明显差异 ($P < 0.05$)。结论: 益气化瘀解毒方含药血清能抑制人肝癌 HepG2 细胞的生长, 呈现量效关系。整方组对荷瘤裸鼠体重无

【收稿日期】 2013 - 08 - 19

【修回日期】 2013 - 09 - 27

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(编号: 81001522); 湖南省自然科学基金课题(编号: 13JJ4138); 首届中国中西医结合学会 - 金港榄香烯中医药肿瘤研究基金资助项目(编号: 2010 - F10)

【作者单位】 ¹ 国家中医药管理局重点学科、湖南省中医药研究院附属医院肿瘤科, 湖南 长沙 410006

² 湖南中医药大学中医学院, 湖南 长沙 410208

【作者简介】 曾普华(1976 -), 男, 副教授, 医学博士, 硕士生导师, 主要从事肝癌的中西医结合诊治研究。E-mail: zph120@126.com

【通讯作者】 邵文辉(1977 -), 女, 讲师, 医学博士, 主要从事中医药抗肿瘤药理研究。E-mail: 476541034@qq.com

影响,益气化瘀解毒方全方较单味中药具有较强的抑瘤作用,其组方中药如莪术、重楼、壁虎均有一定程度抑瘤作用,其中莪术抑瘤作用较强;组方内主要单味中药发挥了协同抑瘤效应,使整方呈现出最强的抑瘤效应。

【关键词】益气化瘀解毒方; HepG2 细胞; 增殖; 移植瘤

【中图分类号】R73-36⁺1; R735.7 【文献标识码】A DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2014.01.03

【文章编号】1672-4992-(2014)01-0008-04

我们前期临床研究已发现益气化瘀解毒方药具有抗血管生成,调节机体免疫功能,稳定瘤体,抗肿瘤侵袭和转移作用。本实验研究拟观察该方药对人肝癌 HepG2 细胞增殖和裸鼠移植瘤生长的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌 HepG2 细胞由中南大学湘雅医学院细胞中心提供。SD 大鼠,体重 180-220g。BALB/c-nu 裸鼠,16-20g,购于长沙斯莱克景达实验动物有限公司。中药材购于湖南省药材公司。益气化瘀解毒方由人参、黄芪、莪术、重楼、壁虎等组成。顺铂购于湖南省中医药研究院附属医院(齐鲁制药有限公司,批号:1120431DB,规格:10mg/瓶)。高糖 DMEM 培养基(Hyclone);胎牛血清(杭州四季青);胰蛋白酶、噻唑蓝(美国 Sigma);二甲基亚砜(DMSO 北京北化精细化学公司)。

1.2 方法

1.2.1 含药血清的制备 制备每种血清分别选用正常成年大鼠 4 只,共 12 只。不含药血清组大鼠每日灌胃等体积生理盐水,高剂量组(20g/kg)、低剂量组(10g/kg),在灌胃前 12h 禁食不禁水,灌胃 2 次/日,连续 3d 后禁食,于第 4 天最后 1 次灌胃后 1h 腹主动脉采血,2000r/min,离心 10min,合并同组动物血清,用 0.22μm 微孔滤膜过滤除菌,4℃ 保存,两周内使用。

1.2.2 人肝癌细胞的培养 人肝癌 HepG2 细胞用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。细胞铺满 80%-90% 时开始传代,约 1-2 天传代 1 次。

1.2.3 MTT 法检测人肝癌 HepG2 细胞增殖情况 细胞用胰酶消化,用常规培养基配成细胞悬液,浓度为 4×10⁴/ml,种入 96 孔板,每孔 200μl。在培养箱内培养 16h 后,随机分为 4 组,即含药血清高、低剂量组、不含药血清组(阴性对照)、生长液组(含胎牛血清 10%,空白对照)。每组设 5 个平行孔,继续培养 24h、48h、72h。加入 MTT 溶液 20μl 继续培养 4h 后,终止培养,小心吸去培养液,加入 DMSO 150μl/孔,在摇床上轻轻振荡 10min,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度 A 值,以空白孔调零。根据公式计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率(IR%)=(对照组 A 值-实验组 A 值)/对照组 A 值×100%。

1.2.4 裸鼠造模分组及给药 细胞培养至约每瓶 5×10⁶ 个细胞时,收集细胞以胰酶消化,低速离心机 2000 转/分离心 5 分钟,调整至约 1×10⁷/0.2ml。将收集好的细胞尽快接种。一只手持裸鼠背部皮肤提起,另一手以 1ml 注射器接种至裸鼠背部皮下,每只接种 0.2ml(含细胞数约 1×10⁷ 个),接种处可见一圆形隆起。

接种一周后 2 只成瘤不理想裸鼠予以剔除,38 只裸鼠背部接种处均形成 1 个约绿豆大小隆起。随机分为 7 组:全方组 5 只、黄芪组 5 只、莪术组 6 只、重楼组 5 只、壁虎组 6 只、顺铂组 5 只、空白组 6 只。

中药连续灌胃 3 周,以 60kg 体重全方 100g 的比例计算裸鼠给药剂量^[1],裸鼠每日剂量为:(100/60)×12=20(g/kg),黄芪 12g/kg,莪术 10g/kg,重楼 12g/kg,壁虎 10g/kg。顺铂以成人 20mg/m² 计算,裸鼠腹腔注射剂量约为 5mg/kg。每周 1 次,给药 3 周。

1.2.5 裸鼠实验观察指标 实验过程中一般症状、体征观察。各组实验前后裸鼠体重,灌胃前及实验结束时瘤体体积。

1.3 统计分析

用 SPSS 17.0 统计分析软件处理,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料采用 t 检验和单因素方差分析;所有统计检验均采用双侧检验,检验水平采用 α=0.05。

2 结果

2.1 细胞实验结果

各剂量含药血清组与不含药血清组(阴性对照组)之间的吸光度差异有统计学意义(P<0.05);高、低剂量组间比较有明显差异(P<0.05,表 1)。HE 染色可见阴性对照组细胞密集,用药组普遍细胞稀疏(图 1)。

2.2 裸鼠移植瘤实验结果

2.2.1 一般症状体征观察 实验过程中发现,顺铂组比较消瘦,但饮水量未明显减轻,重楼组略显躁动,其余各组无明显异常。

2.2.2 裸鼠体重的比较 给药前,各组间体重比较差异无统计学意义(P>0.05)。给药后体重顺铂组与其它各组比较差异有统计学意义(P<0.05)。给药前后差值变化顺铂组与其它各组比较差异有统计学意义(P<0.05)。其它组间差异比较不显著(P>0.05),结果见表 2。

表 1 各组含药血清对人肝癌 HepG2 细胞的生长抑制作用

Tab. 1 Groups of medicated serum inhibition for the growth of hepatocellular carcinoma HepG2 cells

Group	24h		48h		72h	
	A($\bar{x} \pm s$)	IR(%)	A($\bar{x} \pm s$)	IR(%)	A($\bar{x} \pm s$)	IR(%)
High dose	0.46±0.15*	46.4 [△]	0.74±0.15*	35.7 [△]	0.94±0.12*	33.8 [△]
Low dose	0.65±0.11*	23.4 [△]	1.01±0.21*	10.2 [△]	1.31±0.11*	7.6 [△]
Negative control	0.86±0.57 [□]	-	1.23±0.37 [□]	-	1.43±0.15 [□]	-
Blank control	0.87±0.07	-	1.37±0.08	-	1.47±0.17	-

无药对照组与生长液组比较,[□]P>0.05;高、低剂量组与无药对照组比较,* P<0.01;不同时间段组间低、高剂量组间比较,[△]P<0.05。

The comparison between negative control group and blank control group, [□]P>0.05; The comparison between high and low dose group and negative control group, * P<0.01; The comparison between high and low dose group in different time stages, [△]P<0.05。

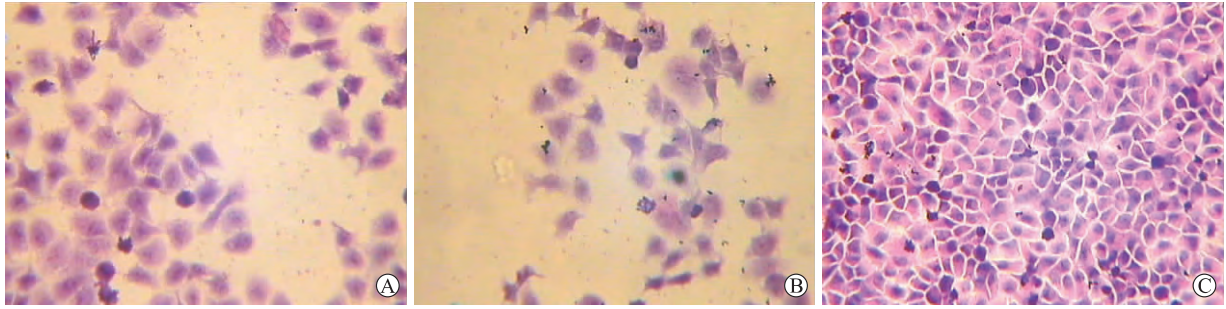


图1 细胞加药培养48小时HE染色图(×200)

Fig.1 Cell culture dosing 48 hours HE dyeing figure(×200)

A: Low dose group; B: High dose group; C: Negative control group.

表2 各组裸鼠体重变化比较 (g, $\bar{x} \pm s$)Tab.2 nude mice weight comparison (g, $\bar{x} \pm s$)

	n	Treatment		Δ Weight
		Before	After	
All prescription	5	16.8 ± 0.5	22.9 ± 0.7	6.1 ± 0.3
Astragalus	5	17.2 ± 0.6	24.3 ± 1.1	7.1 ± 1.0
Zedoariae	6	16.7 ± 0.4	23.9 ± 0.8	7.2 ± 0.8
Polyphylla	5	17.4 ± 0.4	23.2 ± 0.8	5.7 ± 1.0
Gecko	6	16.5 ± 0.7	24.0 ± 1.3	7.4 ± 1.4
DDP	5	17.1 ± 0.7	19.7 ± 1.0*	2.7 ± 0.7*
Blank	6	16.5 ± 0.7	23.2 ± 2.7	6.6 ± 2.9

给药前各组间体重比较, $P > 0.05$; 给药后体重和给药前后体重差值, 顺铂组与其它组比较, * $P < 0.05$; 其它组间差异比较, $P > 0.05$ 。

The comparison between each groups ($P > 0.05$); The comparison between cisplatin group difference before and after the change compared with other groups (* $P < 0.05$); The comparison between the other groups ($P > 0.05$).

2.2.3 给药前后瘤体体积的比较 给药前各组间瘤体比较无明显差异 ($P > 0.05$); 给药后瘤体及差值比较, 各组与空白组均有明显差异 ($P < 0.05$); 全方组分别与黄芪组、重楼组、壁虎组、空白对照组等比较有明显差异 ($P < 0.05$); 全方组与莪术组、顺铂组比较无明显差异 ($P > 0.05$); 莪术组与黄芪组比较有明显差异 ($P < 0.05$); 莪术组与顺铂组比较无明显差异 ($P > 0.05$)。结果见表3。

3 讨论

原发性肝癌为我国常见恶性肿瘤之一, 是严重危害国民生命健康的重大疾病。当前中医药治疗肝癌具有长期服用毒副作用低、改善生活质量、抗复发和转移而呈现“带瘤生存”的特点。

“益气化瘀解毒”为切合肝癌“瘀、毒、虚”之中医基本病机的有效治法。潘氏^[2]通过对湖南省843份肝癌病历的调查发现, 肝癌发展到中晚期, 其中最常见的症状和体征有4个, 即肝区疼痛、神疲乏力、纳呆食少和进行性肝肿大, 脾虚肝瘀为其主要特点。总之, “虚”“瘀”“毒”并行为肝癌的主要病机特点。益气化瘀解毒方以人参、黄芪益气健脾, 莪术行气化瘀散结, 重楼清热解毒, 壁虎攻毒散结, 全方药物配伍精要, 扶正抗癌, 标本兼治。方中重楼清热解毒, 消肿止痛。金炜东等^[3]将重楼提取物作用于 HepG2, 发现各浓度均对 HepG2 细胞有一定的杀伤作用。莪术破血行气、消积止痛。莪术油含有榄香烯等多种成份, 具有抑杀癌细胞, 增强免疫功能, 对实验性肝损伤有明显的保护作用。蜈蚣具有熄风止

痉、解毒散结、通络止痛之功效。近年来研究表明蜈蚣对多种肿瘤有效, 如肺癌、肾癌、结肠癌、肝癌、卵巢癌。壁虎祛风定惊, 解毒散结。研究表明, 壁虎对肝癌、食管癌和胃癌等均有抑制作用。杨丽华等^[4]用 MTT 法观察壁虎不同部位提取液对体外培养的细胞的抑制作用。发现壁虎内脏提取液的作用最显著。益气化瘀解毒方组方具有可靠的传统理论及现代科学研究依据。

表3 各组对人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤的影响 (mm³, $\bar{x} \pm s$)Tab.3 the influence of the growth of transplantation tumor in nude mouse (mm³, $\bar{x} \pm s$)

	n	Treatment		Δ Volume
		Before	After	
All prescription	5	47.4 ± 12.9	203.3 ± 104.2	155.9 ± 110.23*☆
Astragalus	5	46.6 ± 11.0	557.3 ± 126.3	510.7 ± 130.03
Zedoariae	6	63.9 ± 20.8	342.0 ± 156.3	278.2 ± 143.3
Polyphylla	5	44.9 ± 12.2	445.3 ± 161.0	400.4 ± 160.03
Gecko	6	40.7 ± 10.8	470.2 ± 64.7	429.5 ± 61.23
DDP	5	48.5 ± 14.2	117.1 ± 77.8	68.6 ± 81.53
Blank	6	55.7 ± 16.5	934.4 ± 307.4	878.7 ± 316.2*

实验前各组间瘤体比较, $P > 0.05$; 各组给药前后瘤体比较, $P < 0.05$; 实验前后瘤体变化差值比较, 空白对照组与其余组比较, * $P < 0.05$; 全方组分别与黄芪组、重楼组、壁虎组、空白对照组比较, ★ $P < 0.05$; 全方组与莪术组、顺铂组比较, ☆ $P > 0.05$ 。

The comparison between each groups before experiment, $P > 0.05$; The comparison before and after experiment, $P < 0.05$; The comparison between the blank and the other groups, * $P < 0.05$; The comparison All parties respectively with astragalus membranaceus group, paris polyphylla, gecko group and blank control group, ★ $P < 0.05$; The whole party and cisplatin group and zedoariae group was no significant difference, ☆ $P > 0.05$.

我们前期临床研究发现该方具有调节免疫、稳定瘤体、下调 VEGF 表达、抗复发转移等作用^[5-6]。本研究结果表明, 益气化瘀解毒方含药血清能抑制人肝癌 HepG2 的细胞增殖, 具有一定的量效关系; 该方整方组对荷瘤裸鼠体重无影响, 全方组较单味中药具有较强的抑瘤作用, 其组方中药如莪术、重楼、壁虎均有一定程度抑瘤作用, 其中莪术抑瘤作用较强; 组方内主要单味中药发挥了协同抑瘤效应, 使益气化瘀解毒方全方呈现出最强的抑瘤效应。其作用机制有待深入研究。

(致谢: 感谢湖南中医药大学中医诊断研究所病理生理实验室对本实验工作的大力支持!)

【参考文献】

[1] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体

- 间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9 (9): 1069 - 1072.
- [2] 李琳霏, 潘博, 潘敏求. 潘敏求主任医师治疗肝癌经验[J]. 湖南中医杂志, 2010(6): 23 - 25.
- [3] 金炜东, 陈孝平, 蔡红娇. 重楼提取物对 HepG2 细胞的毒性作用[J]. 华中科技大学学报, 2006, 35(1): 103 - 105.
- [4] 杨丽华, 杨金霞, 王学美. 鲜壁虎不同部位提取液对鼠肝癌体内外抑制作用[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15 (35): 3734 - 3737.
- [5] 曾普华, 邵文辉, 潘敏求, 等. 益气化痰解毒方加减联合鸦胆子油乳经血管介入治疗中晚期原发性肝癌的临床研究[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(1): 19 - 20.
- [6] 邵文辉, 曾普华, 滕久祥, 等. 益气化痰解毒方含药血清对鸡胚尿囊膜血管生成的影响[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(1): 19 - 20.

(编校: 张志明)

热休克蛋白 HSP27 抑制食管鳞癌细胞的侵袭转移能力

薛琳¹, 杨蕾², 刘冰¹, 李红¹, 康建琴¹, 王彪落¹, 梁树辉¹, 丁杰¹

Heat shock protein HSP27 inhibits the invasion and metastasis of esophageal carcinoma cell lines

Xue Lin¹, Yang Lei², Liu Bing¹, Li Hong¹, Kang Jianqin¹, Wang Biaoluo¹, Liang Shuhui¹, Ding Jie¹

¹State Key Laboratory of Cancer Biology, Xijing Hospital of Digestive Diseases, Fourth Military Medical University, Shaanxi Xi'an 710032, China; ²Baoji City Second People's Hospital, Shaanxi Baoji 721000, China.

【Abstract】 Objective: To explore the relationship between the expression of heat shock protein 27 (HSP27) and the invasive and metastatic potential of human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cell lines. **Methods:** Scratch assays were performed to identify the differences and changes of invasive and metastatic ability in ESCC cell lines. Western blot were used to examine the differences of HSP27 expression in ESCC cell lines. Lentivirus infection technique was employed to up-regulate the expression of HSP27 in highly metastatic cells. **Results:** The invasive and metastatic potentials of EC9706-H and EC109-H cells were higher than the matched EC9706-L and EC109-L cells. The expression levels of HSP27 in EC9706-H and EC109-H cells were lower than the matched EC9706-L and EC109-L cells. The invasive and metastatic potentials of EC9706-H and EC109-H cells were significantly decreased after overexpression of HSP27. **Conclusion:** The expression level of HSP27 may be inversely correlated to the invasive and metastatic behavior of ESCC cell lines and up-regulating the expression of HSP27 can inhibit the invasion and metastasis ability of ESCC.

【Key words】 esophageal squamous cell carcinoma; HSP27; invasion; metastasis

Modern Oncology 2014, 22(01): 0011 - 0015

【摘要】 目的: 探讨 HSP27 分子的表达水平与食管鳞癌高、低转移潜能细胞系侵袭转移能力的关系。方法: 选用 EC9706-H、EC9706-L 和 EC109-H、EC109-L 两对食管鳞癌高、低转移潜能细胞系, 利用细胞划痕实验检测不同细胞侵袭转移能力的差异; 利用 Western blot 检测 HSP27 在不同转移潜能细胞中的表达水平; 利用慢病毒转染技术上调 HSP27 低表达细胞中 HSP27 的表达, 采用细胞划痕实验检测其侵袭转移能力的变化。结果: 细胞划痕实验证实, EC9706-H 细胞和 EC109-H 细胞的体外侵袭转移能力高于 EC9706-L 细胞和 EC109-L 细胞; Western blot 实验结果显示, HSP27 在 EC9706-H 细胞和 EC109-H 细胞中呈低表达, 在 EC9706-L 细胞和 EC109-L 细胞中呈高表达; 通过慢病毒转染技术上调 EC9706-H 细胞和 EC109-H 细胞中 HSP27 的表达, 二者的侵袭转移能力明显降低。结论: HSP27 与食管鳞癌的侵袭转移能力呈负相关, 即

【收稿日期】 2013-08-22

【修回日期】 2013-09-23

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(编号: 30900674, 81272516, 30973428, 81090273, 81090274); 陕西省科技计划项目(编号: 2011K12-03-06)

【作者单位】 ¹第四军医大学西京消化病医院, 肿瘤生物学国家重点实验室, 陕西 西安 710032

²宝鸡市第二人民医院, 陕西 宝鸡 721000

【作者简介】 薛琳(1988-), 女, 山西运城人, 在读硕士研究生, 主要从事消化道肿瘤基础研究。E-mail: xuelin214209@126.com

【通讯作者】 丁杰(1952-), 男, 江苏南京人, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事消化道肿瘤临床研究。E-mail: dingjie@fmmu.edu.cn