

实验研究

香龙散诱导人胃癌细胞凋亡的机理探讨

杨勤建¹ 雷良蔚¹ 李 波¹ 潘希雄¹ 郑从义²

摘要 应用荧光染色法、电镜、流式细胞术、DNA 凝胶电泳和免疫组化法研究中药香龙散含药血清诱导人胃癌细胞(HS-746T)的凋亡和对 Bcl-2、Bax、P16 基因表达的影响。结果香龙散含药血清在 5% 的浓度剂量时,作用细胞 24 小时,去含药血清,再加入无含药血清的培养液培养 36 小时,细胞凋亡达到高峰,凋亡率为 37.02%,大部分细胞阻滞在 S 期;可使 Bcl-2 基因表达减弱,Bax、P16 基因表达增强。结果表明,香龙散含药血清可诱导人胃癌细胞凋亡,并影响凋亡相关基因的表达。

关键词 胃肿瘤/中医药疗法 @ 香龙散

细胞凋亡(又称程序性细胞死亡)是在体内、体外因素作用下,由多基因参与调控的一种生理现象。近年来研究表明,肿瘤的发生、发展与细胞凋亡的调控异常有关。本研究在中医理论指导下,选用中药复方香龙散,通过血清药理学方法和分子生物学实验技术,从分子水平观察了其对人胃癌细胞的诱导凋亡作用以及对凋亡相关基因表达的影响,探讨其作用机理。结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 含药血清的制备:中药香龙散:由炒白术、半夏、天龙(壁虎)、九香虫等 10 余味中药组成,生药由湖北省药材公司饮片厂提供。动物:日本大耳白兔,雄性,体重 2.5~3kg,由同济医科大学实验动物学部提供。用日本大耳白兔 5 只,每日给予含香龙散浸膏 10g/kg 灌胃,10 日后,于最后 1 次灌药后 2 小时(灌药前禁食不禁水 12 小时),乙醚麻醉,颈动脉取血,无菌分离血清,经 56℃、30 分钟灭活处理后,置-20℃冰箱保存备用。空白兔血清:用生理盐水灌胃 10 日,血清取法同上。

1.2 人胃癌细胞培养:人细胞株(HS-746T),由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;二苯胺 Hoechst 33258、硫柳汞 thymersol 购自美国 Sigma 公司;PI 染色剂购自美国 BD 公司;S-P 免疫组化试剂(含 Bcl-2 单抗、Bax 多抗、P16 多抗、DAB

酶底物显色剂盒等)购自福建迈新公司。电镜标本由广州军区武汉总医院电镜室协助制作。将传代的人胃癌细胞接种于 100u/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中(简称单纯培养液,下同),置 5%CO₂、37℃ 培养箱中培养至对数生长期,再分别按实验要求接种。

1.3 荧光染色细胞制备:将人胃癌细胞接种(调整细胞浓度为 2×10^4 /ml)于直径为 5cm 培养皿中,置培养箱培养 24 小时至细胞生长旺盛,去原培养液,分别加入 5%、10% 含药血清浓度的培养液,另设无含药兔血清和单纯培养液组作对照,置培养箱中按细胞常规培养方法培养 24 小时,去含药血清培养液,加入单纯培养液(此方法下同),分别培养 24 小时、36 小时、48 小时。将上清液收集,培养皿中加胰酶消化,二者合并,离心,去上清;加入含甲醇、冰乙酸的固定液固定,反复 2 次;离心,去固定液,取细胞沉淀液玻片滴片,置室温下干燥。加入二苯胺、硫柳汞荧光染色液染色 1 小时(避光)。三蒸水反复冲洗 3 次,常温下自然干燥,甘油封片,Olympus 荧光显微镜下(10×20 倍)作细胞凋亡的形态学观察。

1.4 透射电镜观察凋亡细胞标本制备:用培养皿接种细胞(细胞浓度 2×10^5 /ml),含药血清浓度和培养方法同 1.3。加单纯培养液培养 36 小时刮片收集细胞,分别离心,去上清,用 2.5% 的戊二醛液固定,1% 锇酸后固定,梯度乙醇脱水,Epon812 浸泡、包埋、聚合,超薄切片,硝酸铀、柠檬酸铅染色、晾干,透射电镜下作凋亡细胞的超微结构观察。

1.5 流式细胞仪检测标本制备:用培养瓶接种细胞(细胞浓度 2×10^5 /ml),含药血清浓度和培养方法同 1.3。将分别培养 24 小时、36 小时、48 小时的细胞上清收集,用胰酶消化培养瓶中的贴壁细胞,将上清和胰酶消化的细胞合并,离心、去上清,沉淀物用 PBS 洗 3 次,在震荡状态下缓慢滴入 75% 乙醇 2ml 左右,过夜,再用 PBS 冲洗 1 次,调至终浓度为 1ml,加入 0.01% RNA 酶 15μl,37℃ 水浴 30 分钟,加 0.25% PI 染色(避光)30 分钟,作流式细胞仪检测。汞激发波长 488nm,分析软件为 Modfit。

基金项目:湖北省教委科研基金(1993031)

1 湖北中医学院,湖北省武汉市武昌区云架桥 110 号(430061)

2 武汉大学

收稿日期:1999-09-15

1.6 DNA 提取及琼脂糖凝胶电泳:在培养瓶中接种细胞(细胞浓度 $2 \times 10^6/\text{ml}$),含药血清浓度和培养方法同 1.3。将细胞培养 36 小时,收集上清,用胰酶消化瓶中贴壁细胞,将二者合并,离心,去上清,按文献[1]方法提取 DNA,真空抽干后,溶于 $60\mu\text{l}$ TE,缓冲液中加入 $5\mu\text{l}$ RNase,反复颠倒混匀, 37°C 水浴 30 分钟,取所制备的样品在含溴化乙啶 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 2 小时(电压 $1.5\text{V}/\text{cm}$),用 ethidium bromide 染色,紫外线检测仪下观察,摄影。

1.7 Bcl-2、Bax、P16 基因表达标本制备:在直径为 5cm 培养皿中放置 3 小块消毒的盖玻片,再将人胃癌细胞接种于培养皿中(细胞浓度 $2 \times 10^6/\text{ml}$),含药血清浓度和培养方法同 1.3。分别将培养 12 小时、24 小时、36 小时细胞贴壁生长的玻片取出,每张玻片分别用 PBS 洗 2 次,滴入 4% 多聚甲醛液, 4°C 温度下固定 30 分钟,室温下干燥, PBS 洗 3 次,按文献[2,3] S-P 免疫组化法染色制备标本,在光学显微镜下观察显色效果,显色完后自来水冲洗,苏木素复染,中性树胶封固,摄影。

2 结果

2.1 含药血清诱导的凋亡细胞形态学观察

2.1.1 荧光显微镜观察:镜下见不同浓度含药血清孵育 24 小时、36 小时、48 小时的人胃癌细胞均有部分细胞核碎裂,呈大小不等、形态不规则的碎片状或梅花状。此即为细胞凋亡的形态,其中以 5% 含药血清浓度孵育 36 小时的细胞在镜下显现的凋亡细胞数较多,单纯培养液培养和空白兔血清培养的人胃癌细胞的细胞核圆而完整,未见有凋亡细胞的形态特征(图略)。

2.1.2 透射电镜的超微结构观察:在 7000~15000 倍的镜下观察可见凋亡细胞的核染色质浓聚成颗粒状或条索状,聚集在核膜下,内质网扩张,出现空泡,有典型的凋亡小体形成(图略)。

2.2 凋亡细胞的流式细胞仪检测:不同含药血清浓度处理 36 小时、48 小时的人胃癌细胞在 DNA 直方图上的 G1 期峰前均显现明显的细胞凋亡峰,其中 5% 36 小时组细胞凋亡率为 37.02%, 10% 36 小时组为 27.20%, 5% 48 小时组为 26.7%, 10% 48 小时组为 28.11%;单纯培养液培养 36 小时组和 5%、10% 24 小时未见明显凋亡峰(图略)。5% 含药血清孵育 24 小时的人胃癌细胞,在 G1 期细胞为 12.49%, S 期细胞 34.30%, G2 期细胞 53.30%;而单纯培养液组 G1 期、S 期、G2 期细胞分别为 46.68%、28.10%、25.22%。可见含药血清组 G1 期细胞数明显减少, S 期~G2 期细胞数逐渐增多,大部分细胞阻滞在 S~G2 期。

2.3 DNA 凝胶电泳:从图中可见 5%、10% 含药血清浓度孵育 36 小时组均有明显的典型 DNA 梯形条带形成, 5% 组 DNA 梯带长度明显长于 10% 组;单纯培养液组 DNA 电泳未见梯形条带形成(图略)。

2.4 Bcl-2、Bax、P16 基因表达:显色结果示, Bcl-2 在单纯培养液组呈高表达(显色深),在含药血清组呈低表达(显色淡),而 Bax、P16 基因在含药血清处理 12 小时、24 小时呈高表达(显色深),以 10% 24 小时组显色最明显,在 36 小时组表达稍弱,单纯培养液组亦呈低表达,显色淡(图略)。

3 讨论

1984 年,日本学者提出了给动物灌服中药一定时间后,取出血清进行体外实验的药理学新方法。1988 年,田代真一正式提出了“中药血清药理学”这一新概念^[4],使中药的药理学实验能较客观地反映药物进入机体后,经过消化、吸收、代谢等而发挥药物效应的过程,排除了传统的中药粗提取物在体外实验中各种干扰因素的影响,能较为清楚地认识中药药理实验中发挥作用的主要有效成分及活性部位,也为中医药研究与现代分子生物学等现代科学技术的结合奠定了可行的基础,提高了中药体外实验的可信性、可靠性。本实验采用血清药理学的研究方法,观察中药复方香龙散诱导人胃癌细胞的凋亡及其对凋亡相关基因表达的影响,从形态学、生化特征、流式细胞术、免疫组化等方面得到验证,表明了香龙散诱导人胃癌细胞凋亡作用的真实性。

香龙散是基于中医对胃癌病症病机为脾虚,痰瘀浊气凝结中焦的认识,选用具有健脾化痰、理气散结等作用的白术、半夏、天龙、九香虫等组方而成。方中半夏、天龙虽有抗肿瘤作用^[5],但对其作用机理尚无深入研究。本实验中发现,由半夏、天龙等组方的香龙散具有诱导人胃癌细胞凋亡作用,并影响凋亡相关基因 Bcl-2、Bax、P16 的表达,这可能与抗肿瘤的作用密切相关。本实验中发现,香龙散含药血清诱导的人胃癌细胞凋亡,主要是作用于人胃癌细胞的 DNA 复制期,即大部分细胞阻滞于 S 期~G2 期,抑制了癌细胞的分裂增殖。同时还发现香龙散含药血清对人胃癌细胞诱导的凋亡并非是直接而持续的作用,用 5% 的含药血清处理 24 小时后再更换单纯培养液培养 36 小时,细胞凋亡形态特征更为明显,提示香龙散含药血清诱导的人胃癌细胞凋亡与药物浓度和药物作用时间呈非正比关系,这对临床应用香龙散是一个有益的启发,也表明香龙散含药血清诱导的人胃癌细胞凋亡并非是单一的药物直接作用,可能还与中药诱导其它因子的参与

有关。

肿瘤发生、发展的根本原因是基因的改变,表现为许多基因的丢失、失活、突变或过度表达等。如 Bcl-2 基因家族是细胞凋亡的关键性调节者^[6], Bcl-2 基因高表达,可提高细胞凋亡的阈值,抑制细胞的凋亡,并可产生治疗抗性,而 Bax 的高表达则可促进细胞凋亡。本研究结果表明,香龙散含药血清作用于人胃癌细胞,可使 Bcl-2 表达下降而使 Bax、P16 基因表达增强。我们推测这是中药香龙散抗肿瘤的作用机理之一。本实验研究为中药治疗肿瘤研究提供了新的思路和方法。

参考文献

- 1 姜泊,张亚力,周殿元. 分子生物学常用实验方法. 北京:人民军医出版社,1996:174.
- 2 施作榕. 链霉菌素合物素蛋白-生物毒酶标免疫组化染色法的初步研究. 中华免疫学杂志,1986,2(3):169-170.
- 3 任占平. 应用 S-P 免疫组化染色法的体会. 诊断病理学杂志,1994,1(3):176-178.
- 4 田代真一. “血清药理学”与“血清药化学”—汉方的药理学か始まつた药物血中浓度测定の新しい世界. TDM 研究. 1998,(5):54.
- 5 杨仓良,程方,高绿纹,等. 剧毒中药古今用. 北京:中国医药科技出版社,1991:191-202.
- 6 曾耀英. 细胞凋亡分子机制的研究进展. 中国科学基金,1999,(3):137-139.

中医辨证论治脑中风 96 例

杨树亮* 李存富* 杨洁*

笔者自 1996 年 10 月~1999 年 10 月,采用以中药为主,中西医结合疗法治疗脑中风 96 例,疗效满意,现报告如下。

1 临床资料

病例选择:全部患者均符合 1986 年全国中、西医脑血管疾病诊疗标准评定,并经颅脑 CT 证实。96 例中男性 72 例,女性 24 例;年龄 32~78 岁,平均 58 岁,超过 60 岁者 78 例,占 81.25%;发病时间:6~144 小时;并发症:脑心综合征 38 例,继发性癫痫 16 例,肺部感染 14 例,上消化道出血 2 例,糖尿病 17 例,肺气肿 13 例,风心病 1 例,肾功能不全 2 例,多脏器功能衰竭 1 例,高渗性非酮症糖尿病昏迷 1 例, DIC 1 例。

中医辨证分型:中经络者 83 例,其中脉络空虚、经脉瘀阻型 32 例;风痰上扰、痰热腑实型 9 例;肝肾阴虚、肝阳上亢型 14 例;气虚血瘀型 22 例;肾阴不足、风痰上扰型 6 例。中脏腑者 13 例,其中肝阳暴亢、风火挟痰、蒙闭清窍型(阳闭)8 例,痰湿蒙塞心神型(阴闭)4 例;元气败脱、心神散乱证(脱症)1 例。

西医诊断:脑梗塞 64 例,其中大面积脑梗塞 6 例,多发性脑梗塞 24 例;部位分别为基底节 23 例,颞叶 8 例,放射冠区 4 例,脑干 2 例,腔隙性 24 例。脑出血 32 例,其中多发性 2 例,部位分别为基底节 16 例,丘脑 10 例,脑叶 4 例,小脑 2 例,桥脑和脑室各 1 例。出血量最小者 3ml,最大者 90ml;破入脑室者 11 例,中线移位者 12 例,脑室受压 8 例;混合性中风 5 例。以上急性缺血性中风 64 例,其中中脏腑者 4 例,出血性中风 32 例,其中中脏腑者 9 例。

2 治疗及观察方法

2.1 中医治疗:中脏腑属阳闭者首选清开灵、醒脑静注射液足量静脉滴注,同时鼻饲自拟阳闭汤(羚羊角粉 3g,醋龟甲 30g,生地黄 30g,牡丹皮 12g,竹茹 12g,天竺黄 10g,玄参 30g,节菖蒲 12g)和北京同仁堂安宫牛黄丸;阴闭者鼻饲自拟阴闭汤(半夏 10g,胆南星 10g,全蝎 12g,蜈蚣 3 条,节菖蒲 15g)和苏合香

丸;脱证者用参附注射液静脉注射,继以 100~500ml 静脉滴注维持。视病情改善情况,于抢救 3~7 天给予活血化瘀注射剂如脉络宁、复方丹参、川芎嗪注射液等静脉滴注。中经络者除选用上述活血化瘀、益气通络药物静脉滴注外,尚根据中医辨证分型论治,同时服用本院制剂“中风回春丹”口服,每日 2 次,每次 6~8g(由全蝎、蜈蚣、小白花蛇、郁金、天麻、钩藤、节菖蒲、丹参、红花等 20 余味中药组成)。

2.2 西医治疗:限于颅脑 CT 证实和临床主症有脑水肿现象、颅内高压、重度高血压、癫痫大发作、严重肺部感染、上消化道出血、肾功能不全、严重心力衰竭等并发症,分别采取迅速降低颅压、抗感染、止血、止痉等综合治疗措施。

2.3 针灸治疗:辨证取穴,一般采取头针和体针结合,配合理疗,疗程一般为 15 天,通常观察 2 个疗程。

3 治疗结果

参照中风病中医诊疗标准评定。统计学处理采用 χ^2 和 t 检验。本组总有效率为 90.63%,以中医诊断评价中经络者为 95.18%,中脏腑者为 61.54%。总病死率为 5.21%,以中脏腑为主,占 80%。颅脑 CT 改善情况:对脑出血、大面积或多发性脑梗塞者作了颅脑 CT 治疗前后对照观察,部分病例尚进行了动态 CT 分析(2 次以上),结果脑出血组治疗有效者,血肿吸收或液化最快者 7 天,最慢者 60 天,平均 20 天。脑梗塞治疗组有效者,梗塞面积缩小者与治疗时间密切相关,治疗时间越早、面积缩小所需时间越短,本组平均所需时间为 22 天。

4 讨论

活血化瘀用于出血性中风早期治疗上,令人瞩目。例如对 23 例中经络脑出血患者,入院时即积极、稳妥地采取包括静脉给药在内的活血化瘀辨证中药治疗,结果治愈和显效率高达 79.52%,颅脑 CT 复查出血病灶完全吸收最快者 7 天,平均 20 天左右。比我们既往单纯使用西药对症处理所需时间要迅速得多,且无 1 例出现再出血或恶化现象。由此证明,中医药对中风病的抢救和治疗已成为整个医学在这方面不可缺少的重要组成部分,并且有其独特优势。

* 河南省新蔡县中医院(463500)

收稿日期:1999-12-16