

方药研究

肠复康对人大肠癌 HT-29 细胞凋亡的影响

熊绍权¹ 琚国胜² 王柏丁³ 刘碧清⁴

摘要 目的:研究中药复方肠复康对人大肠癌细胞凋亡的影响及其作用机制。方法:建立人大肠癌 HT-29 裸鼠移植瘤模型,设立肠复康低、中、高剂量组和空白对照组、5-氟脲嘧啶(5-FU)+甲酰四氢叶酸钙(CF)对照组,各组裸鼠 8 只,给药 8 周后处死裸鼠,瘤体称重,末端原位标记 TUNEL 法检测凋亡指数,并分别行半胱天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、Bax、Bcl-2 免疫组化染色,图像分析系统定量检测并比较该 3 种物质表达情况。结果:肠复康各组瘤重小于空白对照组,而凋亡指数均高于空白对照组和 5-FU+CF 组,其中高剂量组显著较高(与空白对照组和 5-FU+CF 组比较, $P<0.01$)。肠复康各组移植瘤 Caspase-3 表达及 Bax、Bcl-2 表达的相对比率(Bax/Bcl-2)均高于空白对照组。结论:肠复康具有诱导人大肠癌 HT-29 裸鼠移植瘤细胞凋亡的作用,其机制可能与促进移植瘤 Caspase-3 表达及增大 Bax/Bcl-2 表达比率有关。

主题词 结肠肿瘤/中医药疗法 细胞凋亡/药物作用 @ 肠复康

Effect of Changfukang on Apoptosis of Human Large Intestinal Cancer HT-29 Cells

Xiong Shaoquan¹, Ju Guosheng², Wang Baiding³, et al.

(1. Department of Internal Medicine, 8670 Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Force, Pingliang 744000, Gansu Province; 2. General Hospital of Taiyuan Steel Company, Taiyuan; 3. Sichuan University)

Objective: To investigate the effect of Chinese compound drug Changfukang on apoptosis of human large intestinal cancer cells and to explore its mechanism. **Methods:** Nude mouse model of transplanting tumor of human large intestinal cancer HT-29 was established. The low, medium and high dose groups of Changfukang, the blank control group and 5-FU plus CF group were set up. Eight weeks after medication, all mice were killed and the tumor weights were measured, the apoptotic indexes were tested with terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, the tumor bodies were respectively stained by Caspase-3, Bax and Bcl-2 immunohistochemistry and their expressions were quantitatively measured and compared by an image analysis system. **Results:** The tumor weight in each Changfukang group was lower than that in the blank control group, but the apoptotic index was higher than that in the blank and 5-FU plus CF groups. The apoptotic index of the high dose group was significantly higher than that in the blank group and the 5-FU plus CF group ($P<0.01$). The expression of Caspase-3 and the ratio of Bax and Bcl-2 expression (Bax/Bcl-2) in each Changfukang group was higher than that in the blank group. **Conclusion:** Changfukang has the function of inducing apoptosis of nude mouse transplantation tumor of human large intestinal cancer HT-29, and the mechanism is possibly related to Changfukang enhancing expression of Caspase-3 and amplifying the ratio of Bax and Bcl-2 expression in transplanted tumor cells.

Key Words Colic tumor/TCM therapy; Apoptosis/drug action; @ Changfukang

肠复康系成都中医药大学附属医院肿瘤科刘碧清教授在长期临床实践中总结自拟,并经先进工艺制成的复方制剂,临床运用于消化道肿瘤特别是大肠癌的治疗,疗效确切^[1,2]。本实验从细胞凋亡方面初步探讨肠复康的作用及机理,报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物模型: BALB/c-nu/nu 裸小鼠由四川省抗生

素研究所动物房提供(合格证:川实动管第 90 号),4~6 周龄,体重 18~22g,在无特殊病原体(SPF)条件下饲养。采用人大肠癌 HT-29 细胞株(由四川大学华西医院移植免疫室提供)。裸鼠腹背侧部皮下注射含 5×10^6 癌细胞的悬液 0.5ml,成瘤后用组织块套管针法皮下移植为实体瘤。

1.2 药物:肠复康由鸦胆子、喜树果、人参、莪术、薏苡仁 5 味组成,比例为 2:2:2:3:3,经醇提、浓缩等流程制成稠浸膏,每克稠浸膏含生药 8.96g,成品放于 4℃ 冰箱保存备用。5-氟脲嘧啶(5-FU,江苏南通制药厂,批号:011210),甲酰四氢叶酸钙(CF,山西普德药业有限公司,批号:20020101)。

1.3 分组及给药:接种后第 6 天,将裸鼠随机分为 5

基金项目:四川省科技厅基金资助课题(01SY051-35)

1 中国人民武装警察 8670 部队医院内科,甘肃省平凉市七里店(744000)

2 太原钢铁公司总医院神经内科

3 四川大学临床医学院 2003 级博士研究生

4 成都中医药大学附属医院肿瘤科

收稿日期:2004-01-09;修回日期:2004-02-18

组,雌雄各半,每组 8 只。空白对照组:生理盐水 0.2ml,灌胃。阳性对照组:5-FU25mg/kg,CF2mg/kg 腹腔注射。肠复康低、中、高剂量组:分别以肠复康 4.48g/kg、8.96g/kg、17.92g/kg 灌胃。

5-FU、CF 用生理盐水各配成 0.2ml 注射,每天给药 1 次,5 天后停药,停药后第 29 天起重复注射 5 天。肠复康各剂量均用生理盐水配成 0.2ml 使用,每天给药 1 次,每给药 6 天后停 1 天,共 8 周。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 瘤重及凋亡指数(AI):移植分组后第 60 天(即末次给药后第 2 天),处死裸鼠,剥离瘤体后称重,立即用 10%中性甲醛固定瘤体 48 小时,梯度酒精系列脱水,石蜡包埋后切片。采用 TdT 介导的 DNA 末端原位标记染色法^[3](Terminal deoxynucleotidy transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)检测细胞凋亡(试剂购自 SANTA CRUZ 公司),以细胞核棕黄色者为凋亡细胞。在 400 倍视野下,随机选取 5 个癌区,计算凋亡细胞在全部癌细胞中所占的比例。AI=(凋亡细胞数/癌细胞总数)×100%。

1.4.2 免疫组化指标:如上,瘤体经甲醛固定、梯度酒精脱水、石蜡包埋,常规切片 3~5μm,分别行免疫组化半胱天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、Bax 和 Bcl-2 (一抗均购自 SANTA CRUZ 公司,相应二抗、试剂盒及阳性对照片购自北京中山生物技术有限公司)染色,具体步骤按试剂盒说明进行。

200 倍视野下,选取每张切片中 Caspase-3、Bax、Bcl-2 着色最明显的 10 个视野,以 Mias-2000 图像系统(四川大学)采集图像并半定量检测 3 种染色阳性物质的积分光密度,求取每视野的平均值表示以上 3 种物质的含量。

1.5 统计学方法:计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有指标分析经 SPSS 11.0 统计软件包处理。组间比较采用 LSD(方差齐)或 Tamhane (方差不齐)。

2 结果

2.1 各用药组对瘤重及凋亡指数 AI 的影响:见表 1。实验过程中,除空白对照组和 5-FU+CF 组外,各组均有 1 只裸鼠确因灌胃不当死亡。表 1 示,各用药组瘤重均小于空白对照组,而 AI 都比空白对照组高,其中肠

复康高剂量组 AI 显著高于与空白对照组和 5-FU+CF 组(P 均 <0.01)。

表 1 各组小鼠移植瘤凋亡指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (初/末)	AI(%)	瘤重(g)	体重(g)
空白对照组	8/8	2.58±0.71	1.02±0.23	25.27±5.15
肠复康高剂量组	8/7	5.16±0.97 ^{△△▲}	0.35±0.07 ^{△△▲}	30.32±6.85 [△]
肠复康中剂量组	8/7	4.44±1.04 ^{△△}	0.54±0.11 ^{△△}	30.03±6.47 [△]
肠复康低剂量组	8/7	3.86±0.51 [△]	0.68±0.23	27.27±5.94
5-FU+CF 组	8/8	3.10±1.27	0.69±0.29	29.45±6.29

与空白对照组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与 5-FU+CF 组比较,▲ $P<0.01$

2.2 各用药组对裸鼠移植瘤 Caspase-3 表达的影响:镜下 Caspase-3 呈棕黄色,主要表达在肿瘤细胞胞浆。表 2 示,肠复康各组移植瘤 Caspase-3 表达均较空白对照组多,中、低剂量组 Caspase-3 积分光密度均显著大于空白对照组($P<0.01$)。

表 2 各组小鼠移植瘤 Caspase-3 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(初/末)	积分光密度
空白对照组	8/8	1321410.30±806250.23
肠复康高剂量组	8/7	3067217.60±1481467.30 ^{△△}
肠复康中剂量组	8/7	3392120.10±1773037.21 ^{△△}
肠复康低剂量组	8/7	4417619.60±1486953.29 ^{△△}

与空白对照组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

2.3 各用药组对裸鼠移植瘤 Bax、Bcl-2 表达的影响:镜下 Bax、Bcl-2 阳性部位主要在细胞浆,呈棕黄色。表 3 示,肠复康各用药组移植瘤 Bax、Bcl-2 含量均较空白对照组增多。各组 Bax/Bcl-2 比值比较,肠复康各组均大于空白对照组,尤以高剂量组 Bax/Bcl-2 比值最大,与空白对照组比较差异有显著性($P<0.01$)。

3 讨论

细胞凋亡(Apoptosis)是指在基因控制下的程序性细胞死亡,是一系列生化级联反应的结果,与机体的生长发育、细胞分化和病理状态关系十分密切。对大肠癌的研究表明,具有保护作用的细胞凋亡通路障碍有利于大肠癌的发生和发展^[4]。

本实验参照有关抗肿瘤研究要求^[5],运用人癌裸鼠移植瘤模型,初步探讨肠复康诱导大肠癌细胞凋亡作用及机理。实验结果显示,空白对照组凋亡指数 AI 最小,瘤体最重,进一步佐证了大肠癌的发生发展与细

表 3 各组小鼠移植瘤 Bax、Bcl-2 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Bax 积分光密度	Bcl-2 积分光密度	Bax/Bcl-2
空白对照组	3096414.80±2679264.95	1687516.10±782438.24	1.80±0.82
肠复康高剂量组	14522725.00±7837872.63 ^{△△}	4417978.90±1493274.23 ^{△△}	4.44±2.70 [△]
肠复康中剂量组	13327626.00±8863479.77	4910495.60±1107770.91 ^{△△}	2.53±1.48
肠复康低剂量组	8002598.10±5615576.66	4184302.00±1437637.07 ^{△△}	1.87±1.20

与空白对照组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

胞凋亡的密切关系。用药后肠复康各组 AI 明显增高,并与用药剂量呈正相关、与瘤体大小呈负相关趋势,表明肠复康对移植瘤细胞具有诱导凋亡并抑制生长的作用。在本实验中,5-FU+CF 组 AI 较空白对照组有所减小,但两组之间差异无显著性($P>0.05$),与文献报道^[6]的 5-FU 具有较强的诱导细胞凋亡作用不一致,这可能与体内实验 5-FU 总剂量限制,较早结束治疗,发生凋亡的细胞很快被巨噬细胞或邻近其他细胞吞噬消化而未被检测出有关。

细胞凋亡发生主要是由半胱氨酸蛋白酶家族 Caspases 成员介导的蛋白酶级联反应过程,尽管在不同细胞或同一细胞受不同刺激诱发凋亡过程中激活的 Caspase 不尽相同,但普遍认为,Caspase-3 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路,是哺乳动物细胞凋亡中的关键酶^[7]。多种刺激因素启动的信号激活 Caspase-3,进而促进凋亡信号转导,激活凋亡特异性核酸酶、降解细胞骨架蛋白、裂解 DNA 修复的关键酶 PARP 等,导致细胞凋亡^[8~10],故 Caspase-3 又称“死亡蛋白酶”。本实验结果表明,肠复康用药组移植瘤 Caspase-3 含量较空白对照组明显增多,提示 Caspase-3 可能参与了肠复康促进移植瘤细胞凋亡的作用机制。

Bcl-2 相关基因家族是细胞凋亡信号转导的重要调节者,包含抑制和促进细胞凋亡两类功能相反的基因。Bcl-2 是该家族中研究得较多的细胞凋亡的拮抗基因,编码分子量为 26kd 的蛋白,在正常及病理情况下,Bcl-2 具有抑制细胞凋亡、延长细胞寿命的功能^[11,12]。Bax 基因与 Bcl-2 具有同源性,编码分子量为 21.4kd 的蛋白,它的功能与 Bcl-2 相反,具有对抗 Bcl-2 抑制细胞凋亡的作用。国外研究表明,Bax 可与 Bcl-2 形成异源二聚体而发挥作用,Bax/Bcl-2 的相对比率成为调节细胞凋亡的关键因素,Bax/Bcl-2 升高,促进细

胞凋亡,反之则抑制细胞凋亡。本实验研究表明,肠复康具有同时促进人大肠癌移植瘤 Bax 和 Bcl-2 表达的作用,但更主要是促进 Bax 的表达,各用药组移植瘤 Bax/Bcl-2 值均大于空白对照组,并随肠复康剂量增大 Bax/Bcl-2 值增大,提示 Bax/Bcl-2 比率增大可能也是肠复康促进移植瘤细胞凋亡的作用机制之一。

参考文献

- 1 吴雪梅,姚德蛟. 肠复康胶囊治疗原发性中晚期大肠癌近期疗效观察. 成都中医药大学学报, 2001, 24(2): 12~13.
- 2 熊绍权,刘碧清,王柏丁,等. 肠复康胶囊治疗大肠癌临床疗效探析. 中药药理与临床, 2003, 19(1): 45~46.
- 3 Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, et al. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. J Histochem Cytochem, 1993, 41(1): 7~12.
- 4 彭仲生,谢礼雄,梁湛聪. 细胞凋亡与大肠癌. 国外医学内科学分册, 1997, 24(4): 141~144.
- 5 徐叔云,卞如谦,陈修. 药物实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1762~1770.
- 6 Inada T, Ichikawa A, Kubota T, et al. 5-FU-induced apoptosis correlates with efficacy against human gastric and colon cancer xenografts in nude mice. Anticancer Res, 1997, 17(3C): 1965~1971.
- 7 李小明,孙志贤. 细胞凋亡中的关键蛋白酶—Caspase-3. 国外医学分子生物学分册, 1999, 21(1): 6~9.
- 8 Yang XH, Sladek TL, Liu X, et al. Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin and etoposide-induced apoptosis. Cancer Res, 2001, 61(1): 348~354.
- 9 Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature, 1998, 391(6662): 43~50.
- 10 Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. Science, 1998, 281(5381): 1312~1316.
- 11 Mosnier JF, Perret AG, Vindimian M, et al. An immunohistochemical study of the simultaneous expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in epithelial tumor of the colon and rectum. Arch Pathol Lab Med, 1996, 120(7): 651~661.
- 12 Bosari V, Moneghini L, Graziani D, et al. Bcl 2 oncoprotein in colorectal hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas. Hum Pathol, 1995, 26(5): 534~542.

北京现代医苑医学书店特惠邮购书目

重点推荐

《中华医典》是第一套对中医古籍进行全面系统整理而成的系列电子光盘,收录了民国以前中国历代医学古籍 700 余部,卷帙近万,2.8 亿字,巨大的容量使您能纵览千古中华之大成而无憾,由裘沛然、王永炎、邓铁涛等著名人士担任编中,选自权威,资料齐备,中华中医药学会监制。简体版:350.00,优惠价:280.00;繁体版:398.00,优惠价:318.00

《中国医学大成续集》上海科技出版社出版,本套书为校勘影印本,精选了中医古籍内经、本草、诊断、方剂、通治、外感病、内、外、妇、儿、针灸、医案十二大类,计 116 种书,结集成 44 卷。定价:

3800.00,优惠价(3.5 折):1330.00

上海科技出版社特惠书目(7.5 折优惠)

本草纲目(金陵版)560 优惠价 420.00
实用中医诊断学 35.00,优惠价 26.25
世医得效方 35.00,优惠价 26.25
实用中医内科学 64.30,优惠价 48.20
寿世保元 36.90,优惠价 27.60
实用中医外科学 55.00,优惠价 41.30
伤寒论译解 43.00,优惠价 32.30
实用中医儿科学 65.10,优惠价 48.80
医心方 85.00,优惠价 63.80
实用中医妇科学 34.00,优惠价 25.50
景岳全书(上下)10.40,优惠价 30.30
实用中医气功学 62.00,优惠价 46.50
临证指南医案 40.00,优惠价 30.00

实用耳鼻喉口腔科学 78,优惠价 59.50

证治准绳(1~6)122.20,优惠价 91.70

中国医学百科全书,中医学(上中下)定价 280.00,优惠价 210.00

急病针灸典籍通览 50.00,优惠价 37.50

华夏出版社历代中医名著文库(7.5 折优惠)

本草名著集成 138.00,优惠价 103.50

外台秘要方 128.00,优惠价 96.00

医经病源论法名著集成 98,优惠价 73.50

医心方 98.00,优惠价 73.50

方剂名著集成 95.00,优惠价 71.30

针灸名著集成 128.00,优惠价 96.00

中医内科名著集成 98.00,优惠价 73.50

中医儿科学名著集成 88.00,优惠价 66.00

中医妇科学名著集成 128,优惠价 96.00

中医外科病科名著集成 110,优惠价 82.50

中医五官科名著集成 76,优惠价 57.00

中医综合类名著集成 116,优惠价 87.00

医案医论医话名著集成 98,优惠价 73.50

伤寒金匮温病名著集成 110,优惠价 82.50

本草纲目(上下)198.00,优惠价 148.50

中华药海(上下)150,优惠价 315.00 元

汇款地址:北京市和平街北口

北京中医药大学 37 信箱,邮编:

100029,收款人:李明江,联系电话:

010-61287550,66517368,传真:

010-66515918. 邮购图书 50 元

以下加收 5 元邮挂费,50 元以上免

收邮费。欢迎光临中国医学图书网:

http://www.chinamedbook.com