

参杞合剂诱导鼻咽癌细胞凋亡及其作用机制探讨

范晓磊 邓国英 周慧敏 杨淑凤

(大连医科大学微生物学教研室, 辽宁省大连市旅顺南路西段 9 号, 116044)

[摘要] **目的** 研究参杞合剂(SQ)对人鼻咽癌细胞CNE的凋亡及转移的影响,探讨其对人类肿瘤细胞作用的机制。**方法** 以四氮唑盐(MTT)法计算抑瘤率;琼脂糖凝胶电泳观察凋亡细胞形成的DNA条带;流式细胞术检测Fas的表达;逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测SQ对半胱氨酸蛋白酶3(caspase-3)表达的影响。**结果** SQ对CNE细胞具有明显的直接杀伤作用;琼脂糖凝胶电泳可以检测到凋亡特征性条带;Fas表达上调;caspase-3表达增加。**结论** SQ可诱导人鼻咽癌细胞凋亡,可能与Fas/FasL介导的死亡受体途径有关。

[关键词] 参杞合剂;鼻咽癌;细胞凋亡;半胱氨酸蛋白酶3

Effect and Mechanism of Shenqi Mixture on CNE Cell Apoptosis of Nasopharyngeal Cancer

FAN Xiao-lei, DENG Guo-ying, ZHOU Hui-min, et al.

(Dalian Medical University, Dalian 116044)

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect of Shenqi Mixture(Mixture of Radix Codonopsis and Fructus Lycii) on CNE cell apoptosis and metastasis of nasopharyngeal cancer to study its mechanism for human tumor cells. **Methods** The methyl thiazolyl terrazolium (MTT) was applied to calculate the tumor inhibition rate. The agarose gel electrophoresis was adopted to observe the DNA band formed by apoptosis cells. The flow cytometry (FCM) was employed to test the Fas expression. The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to determine the effect of Shenqi Mixture on the expression of caspase-3. **Results** Shenqi Mixture could directly kill CNE cells. The apoptosis band was seen in the agarose gel electrophoresis. The increased expression of Fas and caspase-3 was observed. **Conclusion** Shenqi Mixture can induce the cell apoptosis of human nasopharyngeal cancer possibly through the Fas/FasL pathway.

Key Words Shenqi Mixture(Mixture of Radix Codonopsis and Fructus Lycii); Nasopharyngeal cancer; Cell apoptosis; Caspase-3

中药制剂能够促进肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤转移是目前中药抗肿瘤研究的重要机制之一。参杞合剂(SQ)是以传统中药参杞片为基础重新组方,旨在发挥中药复方制剂的协同效应,既往实验表明其具有良好的抗肿瘤效应^[1,2]。本实验采用SQ体外作用于人鼻咽癌细胞CNE,观察其对肿瘤细胞凋亡及转移的影响,旨在对中药抗肿瘤的作用机制作出更深一步的探讨。

1 材料

1.1 药物和试剂

SQ:将党参、枸杞子、黄芪、莪术、白花蛇舌草按质量比1:2:1:1:1常规水煎制,并浓缩成每毫升药液含生药1.0g备用。用前以直径为0.22μm的微孔滤膜过滤除菌,于4℃冰箱保存。实验时无菌生理盐水按所需浓度稀释。人鼻咽癌细胞株CNE由大连医科大学附属第二医院中心实验室提供。

1.2 主要试剂和仪器

RPMI-1640;GIBCO产品;小牛血清:杭州四季青生物工程材料研究所;DNA marker DL-2000;Takara;流式细胞仪:美国BD公司(大连医科大学附属第二医

院检验科流式细胞室提供);RT-PCR仪:美国艾本德公司;RT-PCR试剂盒:Takara;Fas抗体:美国BD公司。

2 方法

2.1 SQ对鼻咽癌细胞CNE体外抑制实验

采用四氮唑盐(MTT)法^[3]选CNE生长繁殖最佳期的细胞,调细胞数 5×10^5 ,加入96孔板,每孔100μl,然后加入不同浓度的SQ,共5组,1~5组浓度分别为0.03125g/ml、0.06250g/ml、0.12500g/ml、0.2500g/ml、0.50000g/ml,每组100μl作为实验组,生理盐水100μl作为对照组(6组),每组各设15个复孔,置于37℃,CO₂孵箱培养,分别于24小时、48小时、72小时弃上清,加MTT应用液(0.005g/ml)20μl,培养4小时,每孔再加二甲基亚砷溶解液100μl,充分振荡,使甲磺颗粒完全溶解,酶标仪测定每孔吸光度值(检测波长570nm),按公式计算抑瘤率。

抑瘤率 = $(1 - OD_{\text{实验孔}} / OD_{\text{阴性对照孔}}) \times 100\%$

2.2 SQ对鼻咽癌细胞CNE凋亡的影响

2.2.1 SQ诱导鼻咽癌细胞CNE凋亡的形态学检测 将 5×10^6 个细胞用PBS清洗,离心5分钟,弃上清液。先后加入细胞裂解液及RNA酶,室温下离心,向上

清液中加入苯酚氯仿(1:1)、苯酚氯仿异丙醇(25:24:1)和氯仿中各抽提1次。保存上清液,离心收集样品。1%的琼脂糖凝胶电泳后,观察成像。

2.2.2 SQ 对鼻咽癌细胞 CNE Fas 表达的影响

CNE 细胞连续传代两次后,以 0.25%胰蛋白酶消化,制成细胞悬液并调整细胞数为 5×10^5 。加入不同浓度的 SQ (0.03125g/ml、0.06250g/ml、0.12500g/ml) 各 1ml,加入等量生理盐水为对照组,置于 37℃、CO₂ 孵箱培养 48 小时,收集细胞,每份样品的细胞数 10^6 ,PBS 洗涤后,向各测试管加 Fas-FITC 单抗 5 μl,阴性对照管加同型单抗 5 μl,向各管加入待测细胞 40 μl,避光 25℃,20 分钟,加入生理盐水 500 μl,上机测定。

2.2.3 SQ 对鼻咽癌细胞 CNE 半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3) 表达的影响 分组用药,实验组(1 组和 2 组)和 6 组,6 组加入等量的生理盐水,作用 48 小时,收集细胞,常规方法提取 RNA。caspase-3 及内参照 β 肌动蛋白(βactin)引物序列参考文献[4]设计,并经 Genbank 验证, caspase-3 forward 5'-TTTGTTCGTGTGCTTCTGAGCC-3', 反 转 5'-ATTCTGTTGC-CACCTTTCGG-3', 扩增产物长度为 400bp。βactin forward 5'-TCCTGTGGATCACGAACT-3', 反 转 5'-GAAGCATTTCGCGTGGACGAT-3', 扩增产物长度为 315bp。按试剂盒说明进行逆转录聚合酶联反应(RT-PCR),按以下反应条件进行 50℃ 15 分钟,94℃ 2 分钟,94℃ 30 秒,60℃ 30 秒,72℃ 1 分钟 30 个循环,72℃ 延伸 5 分钟。产物经琼脂糖凝胶电泳紫外灯下观察,拍照。采用 Labwork 3.0 软件分析结果。

2.3 统计学方法

应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,两组间均数比较应用 t 检验,两组以上均数比较应用方差分析。

3 结果

3.1 SQ 对 CNE 细胞株体外作用的研究结果

表 1 示, SQ 对 CNE 细胞生长具有明显的直接抑制作用,其作用强度在一定范围内呈现出对浓度和时间的依赖性。随时间延长和浓度增加,其抑瘤作用逐渐增强。

3.2 SQ 对 CNE 细胞凋亡的实验研究

3.2.1 SQ 诱导鼻咽癌细胞 CNE 凋亡的形态学检测

SQ 0.06250g/ml 作用鼻咽癌细胞 48 小时,1%琼脂糖凝胶电泳获得较清晰的凋亡特征性梯形条带,提示 SQ 能够诱导人鼻咽癌细胞凋亡。

3.2.2 SQ 对 CNE 细胞 Fas 表达的影响

流式细胞仪检测结果显示, SQ 可以通过调节凋亡途径中的重要蛋白,促进肿瘤细胞凋亡。这可能是目前其诱导肿瘤细胞凋亡的机制之一。

可以上调 Fas 的表达水平。

表 1 不同浓度参杞合剂体外直接细胞毒作用($\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	剂量(g/ml)	光吸收值		
			24 小时	48 小时	72 小时
1	15	0.03125	25.12±1.54	38.25±1.28	50.36±2.35
2	15	0.06250	30.69±1.68*	50.80±2.13△	65.48±1.69△△
3	15	0.12500	56.35±2.13*	63.78±1.64△	80.54±2.06△△
4	15	0.25000	72.57±2.37**	77.10±1.65	90.17±1.54
5	15	0.50000	81.30±1.26	90.16±2.01	95.63±1.58
6	15	—	20.78±1.62	28.25±1.40	40.26±1.65

与 6 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与本组 24 小时比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

表 2 各组 Fas 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	用药浓度(g/ml)	光吸收值
1	15	0.03125	44.11±1.71*
2	15	0.06250	57.32±1.16*
3	15	0.12500	63.65±1.09**
6	15	—	28.49±1.04

与 6 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.2.3 SQ 对 CNE 细胞 caspase-3 表达的影响 随药物浓度的增加, caspase-3 mRNA 条带变粗变亮, 6 组和 SQ 浓度为 0.03125g/ml、0.06250g/ml 组(即 1、2 组)与内参照光密度积分值之比(caspase-3/βactin) 分别为 0.268 ± 0.043 、 0.326 ± 0.056 、 0.424 ± 0.036 , 呈随浓度增加而增高的趋势, 1、2 组与 6 组之间差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

4 讨论

参杞片具有健脾益气、滋阴补血之功效,而莪术、白花蛇舌草对肿瘤细胞具有直接抑杀作用。本研究结果表明, SQ 能够促使人鼻咽癌细胞凋亡,在琼脂糖凝胶上形成了典型的 DNA 条带。SQ 能上调 Fas 蛋白的表达水平。Fas 又称 Apo-1 或 CD95, Fas/FasL 介导的信号传导通路是目前发现的介导细胞凋亡的主要形式。细胞膜表面的 Fas 分子与 FasL 结合后,双方可形成六聚体复合物,向细胞内传递死亡信号,进而启动半胱氨酸蛋白酶级联反应,在数小时内引起细胞死亡[5]。

caspase-3 是近年来发现的与细胞凋亡密切相关的蛋白。caspase-3 属效应 caspase, 参与凋亡过程, 它参与凋亡降解中发生的重要底物如 DNA 片断 45 的剪切, 导致 DNA 修复的抑制并启动降解[6]。因此 caspase-3 被认为是细胞凋亡中的关键蛋白酶, 是此凋亡途径的关键环节, 是发挥效应的部分。既往研究[7]证实, 益气养阴方(黄芪、太子参、白花蛇舌草等)可以上调白血病细胞 caspase-3 的表达, 通过调节这一重要的蛋白因子促进肿瘤细胞的凋亡。本研究将 SQ 作用于 CNE 细胞, 结果显示, SQ 可以通过调节凋亡途径中的重要蛋白, 促进肿瘤细胞凋亡。这可能是目前其诱导肿瘤细胞凋亡的机制之一。

综上所述,体外实验证实SQ 对人鼻咽癌细胞具有很好的抑杀作用,作用机制可能为诱导肿瘤细胞凋亡,或直接抑制肿瘤细胞,或通过Fas/FasL 介导的死亡受体途径。

参考文献

- [1]李红喆,范晓磊,李庆.参杞合剂对小鼠腹水型肝癌细胞株H22 细胞周期及凋亡的影响.细胞与分子免疫学杂志,2003,19(4):361~363.
- [2]李红喆,范晓磊,张丽.参杞合剂对荷瘤小鼠免疫功能及细胞周期的影响.中国免疫学杂志,2003,19(6):397~400.
- [3]周慧敏.实用细胞培养技术.北京:人民卫生出版社,1999:96.

- [4]Pelicano L, Brumpton C, Pitha PM, et al. Retinoic acid resistance in NB4 APL cells is associated with lack of interferon alpha synthesis Stat 1 and p48 induction. Oncogene, 1999, 18(27):3944~3953.
- [5]翟中和,王喜忠.细胞生物学.北京:高等教育出版社,2003:458.
- [6]管增伟,王盛兰.半胱氨酸蛋白酶与细胞凋亡.国外医学肿瘤分册,2000,27(5):280~282.
- [7]徐瑞荣,罗忻.益气养阴方对白血病细胞半胱氨酸蛋白酶(caspase-3)及Bcl-2 表达的影响.中国中医药信息杂志,2004,11(8):686~687.

(收稿日期:2006-12-19;修回日期:2007-06-12)

[编辑:叶 晨]

醒脑开窍针刺法合长春西汀注射液治疗颈性眩晕 40 例

崔 培 秀

(天津市塘沽区中医医院针灸科,天津市塘沽区杭州道 90 号,300451)

颈性眩晕是指因颈椎病变压迫椎动脉,导致椎-基底动脉供血不足而出现的眩晕、恶心甚则呕吐等症状。该病以中老年人多发,亦可发生于青年人,常反复发作,影响患者日常生活和工作。笔者运用醒脑开窍针刺法配合静脉滴注长春西汀治疗该病 40 例,疗效满意,现总结如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

77 例均为我院 2006 年 1 月~2007 年 10 月门诊患者。按就诊顺序随机分为两组。治疗组 40 例,其中男 19 例,女 21 例,年龄 26~70 岁,病程 2 天~13 年。对照组 37 例,其中男 19 例,女 18 例,年龄 25~71 岁,病程 2 天~12 年。两组患者的性别、年龄、病程差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 诊断、纳入及排除标准

符合以下椎动脉型颈椎病诊断标准:(1)眩晕、恶心呈发作性,常因体位变化、头部过度旋转屈曲诱发或加剧;(2)旋颈试验阳性;(3)X 线摄片或 CT、MRI 显示颈椎生理曲度消失或反弓,颈椎出现骨质增生、椎间隙狭窄或韧带钙化等退行性改变;(4)经颅多普勒检查(TCD)提示椎-基底动脉供血不足;(5)除外耳源性、眼源性眩晕,排除血液病、颅内肿瘤等。

2 方法

2.1 治疗方法

治疗组采用静脉注射长春西汀注射液每次 20mg,每日 1 次,连用 10 天,同时加石学敏院士“小醒脑”开窍针刺法治疗。取穴:印堂、上星、百会、内关、三阴交、风池、风府、天柱和颈 3~7 夹脊。常规消毒后,先刺印堂穴,刺入皮下后使针直立,采用轻雀啄手法(泻法),以流泪或眼球湿润为度,继选 3 寸毫针由上星穴刺入,沿皮至百会穴后,针柄旋转 90°,转速 120~160 次/分钟,行手法 1 分钟,双侧内关直刺 0.5~1 寸,采用捻转提插相结合的泻法,施手法 1 分钟;双侧三阴交沿胫骨内侧缘与皮肤呈 45°斜刺,进针 1~1.5 寸,用提插补法,使患侧下肢抽动 3 次为度。风池、完骨、翳风均斜向喉结,进针 2~2.5 寸,采用小幅度高

频率捻转补法,每穴施手法 1 分钟,最后刺颈 3~7 夹脊穴,用平补平泻手法。以上各穴均在得气后施行手法,留针 30 分钟,中间行针 2 次,每日 1 次,连续治疗 10 天后评价疗效。对照组静脉滴注长春西汀注射液,每次 20mg,每日 1 次,连用 10 天。

2.2 疗效判定标准

参照《中医病证诊断疗效标准》。治愈:原有症状、体征消失,能正常工作和生活;显效:原有症状、体征基本消失,不影响正常工作和生活;好转:原有症状减轻,体征有所改善,生活能够自理;无效:原有症状、体征无改善。

3 治疗结果

治疗组 40 例,治愈 10 例,显效 28 例,好转 2 例,无效 0 例,愈显率为 95%;对照组 37 例,分别为 6 例、22 例、9 例、0 例、75.7%。治疗组愈显率优于对照组($P<0.05$)。

4 讨论

颈性眩晕属中医“眩晕”范畴,中医学认为,颈性眩晕乃由风、火、痰、虚、瘀等引起清窍失养,其病位在清窍,清窍所在为脑。醒脑开窍针刺法的方 II 即“小醒脑”,以印堂、上星、百会、内关、三阴交为主穴,有开窍启闭、改善元神之府功能。印堂为经外奇穴,是醒神调神、宁心益智的重要腧穴;百会为督脉与手少阳、足少阳、足太阳及足厥阴之交会穴,可升阳降浊、健脑安神;内关为八脉交会穴之一,属手厥阴心包之络穴,通阴维脉,有疏通气血、和胃安神之功,三阴交为足三阴经脉交会穴,既能行气活血,改善气血闭阻状况,又可补肾益精,肾精足则脑髓充。诸穴相配可疏通气血、益肾填髓,醒脑开窍。辅以风池、风府、天柱及颈 3~7 夹脊穴等局部穴位,具疏通局部经气、祛风止眩之效。长春西汀注射液能够明显改善椎-基底动脉供血不足性眩晕症状,可显著改善脑血流动力学,是治疗椎-基底动脉供血不足的理想用药。本组资料显示,用长春西汀注射液同时加用醒脑开窍针刺法治疗颈性眩晕,针药并用,效果相得益彰,优于单纯使用长春西汀注射液。

(收稿日期:2007-12-14)

[编辑:黄 健]