

克瘤丸对结肠癌细胞 HT-29 细胞凋亡及细胞周期的影响

王瑞平 邹 奎* 黄舒然

(江苏省中医院肿瘤科, 江苏省南京市汉中路 155 号, 210029)

基金项目: 江苏省六大人才高峰资助项目(2008023); 江苏省中医药领军人才资助项目(LJ200908)

* 通讯作者: zxvery@126.com, 13851482251

[摘要] 目的 观察克瘤丸对人结肠癌细胞生长的影响及其作用机制。方法 将 4mg/ml、2mg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml 浓度克瘤丸作用于 HT-29 细胞 24~48h 后, 用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测克瘤丸对 HT-29 细胞增殖的影响, Annexin V 单染法检测克瘤丸对 HT-29 细胞凋亡的影响, 流式细胞仪检测细胞周期的分布情况。结果 与对照组比较, 浓度为 4、2、1、0.5mg/ml 克瘤丸作用 HT-29 细胞 48h, OD 值、48h 抑制率差异均有统计学意义($P < 0.01$); 4、2、1mg/ml 浓度克瘤丸作用 HT-29 细胞 48h, OD 值、48h 抑制率均明显优于 0.25mg/ml 及 0.5mg/ml 浓度克瘤丸($P < 0.01$)。与 1mg/ml 浓度比较, 2mg/ml、4mg/ml 组凋亡率差异有统计学意义($P < 0.05$)。4mg/ml 时 G0/G1 期前出现明显的亚二倍体区, 与 1mg/ml、2mg/ml 组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 克瘤丸对人结肠癌细胞 HT-29 的增殖具有抑制作用并能够引起该细胞的凋亡。

[关键词] 克瘤丸; 结肠癌细胞 HT-29; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞周期

Effect of Kelio Pill on the Apoptosis and Cell Cycle of Human Colon Carcinoma Cell Line HT-29

WANG Ruiping, ZOU Xi, HUANG Shuran

(Jiangsu Provincial Hospital of TCM, Nanjing 210029)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect and mechanism of Kelio Pill (antitumor pill) on the growth of human colon carcinoma cell. **Methods** The cell proliferation was assessed by methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT) assay after 24 to 48 hours of treatment with different concentrations (4, 2, 1, 0.5 or 0.25mg/ml) of Kelio Pill on HT-29 cells. The apoptosis was determined with Annexin V staining and cell cycle and was determined with flow cytometry (FCM). **Results** Comparing with the control group, Kelio Pill at different concentrations (0.5 to 4 mg/ml) could significantly inhibit the proliferation of HT-29 cells, with statistical significance in the 48h cellular proliferation inhibition rate (CPIR) and optical density (OD) value ($P < 0.01$). The OD values and 48h CPIRs of Kelio Pill at high concentrations (1mg/ml to 4mg/ml) were superior to those at low concentrations (0.25mg/ml and 0.5mg/ml), with statistical significance ($P < 0.01$). Comparing with the group of 1mg/ml, the apoptosis rates were significantly increased in group of 2 and 4mg/ml of Kelio Pill ($P < 0.05$). The apparent hypodiploid area appeared before G0/G1 phase after treatment with 4mg/ml of Kelio Pill, with significant difference as compared with 1mg/ml and 2mg/ml of Kelio Pill ($P < 0.05$). **Conclusion** Kelio Pill could inhibit the proliferation and induce the apoptosis of human colon carcinoma cell line HT-29.

Keywords Kelio Pill; human colon carcinoma cell line HT-29; cell proliferation; apoptosis; cell cycle

大肠癌包括结肠癌和直肠癌, 是常见的消化道恶性肿瘤之一, 为世界范围内发病率居于第 4 位的恶性肿瘤^[1]。在我国, 大肠癌近年来的发生率呈上升趋势, 已成为严重威胁我国人民身体健康的主要恶性肿瘤。克瘤丸为江苏省中医院肿瘤内科研制出的抗肿瘤制剂, 由斑蝥、壁虎、水蛭等 7 味中药组成^[2]。鉴于前期对其进行的临床及实验研究, 我们已明确其具有抑制瘤体生长及抗肿瘤转移等功效, 与化疗药物同用可起到减毒增效的作用, 并改善肿瘤患者生活质量^[3-7]。本实验将克瘤丸作用于人结

肠癌细胞 HT-29 细胞, 观察其对 HT-29 细胞生长、细胞凋亡及细胞周期的影响, 旨在探索克瘤丸对结肠癌细胞生长的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 人结肠癌细胞株 HT-29 由江苏省南京市鼓楼医院肿瘤科实验室惠赠, 江苏省中医院肿瘤科实验室常规培养。用含 10% 小牛血清的 1640 培养基, 在 37℃、5% CO₂、完全饱和湿度条件下常规培养, 取对数生长期细胞进行实验。

1.1.2 药物及试剂 克瘤丸购自江苏省中医院药房(苏药制字 Z04000531,批号:20101201),采用组合提取法,取 200g 粗粉 CO_2 超临界萃取后,药渣醇提(70%乙醇)后合并提取液,微波真空干燥^[5],将上用生理盐水于实验前稀释后得终浓度为 1g/ml,实验前用完全培养液稀释后得 5 种终浓度:4mg/ml、2mg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml 供实验用;1640 培养液购自 Gibco 公司;小牛血清购自杭州四季青公司;二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自 Biosharp 公司;Annexin V-FITC 染料、溴化乙锭(PI)染料均为凯基公司产品。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测克瘤丸对 HT-29 细胞增殖的影响 取对数生长期细胞接种于 96 孔板中, 5×10^3 /孔,培养 24h 后,实验组加入含不同浓度克瘤丸(4mg/ml、2mg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml)的 1640 培养液,共设 5 组,每组 6 个复孔;对照组加入无药物的 1640 培养液,继续培养 48h 后,倾倒培养液,PBS 洗 2 次,每孔加入 100 μ l 1640 培养液+20 μ l MTT 溶液,继续培养 4h。倒掉上清,每孔加入 150 μ l DMSO,置摇床上低速振荡 10min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 490nm 处测量各孔的吸光值。抑制率=(1-实验组值/对照组值) $\times 100\%$,重复 3 次计算。

1.2.2 Annexin V 单染法检测克瘤丸对 HT-29 细胞凋亡的影响 将 HT-29 细胞用 1640 培养液稀释细胞浓度为 2×10^5 /ml,每 3ml 细胞悬液接种于 60mm 培养皿中,贴壁 12h 后吸弃培养基,分别加入浓度为 4mg/ml、2mg/ml、1mg/ml 的克瘤丸(用含 10%小牛血清 1640 配制),继续培养 24h 后以不含 EDTA 的胰酶消化并收集细胞于流式管,1000r/min 离心 5min,弃上清,4℃ 预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,离心弃上清,用结合缓冲液(Binding Buffer)500 μ l 重悬细胞,加入 5 μ l Annexin V-FITC 混匀后,室温、避光、震荡 15min,流式细胞仪检测细胞凋亡情况,Annexin V 染色阳性的细胞被认为是凋亡的细胞,所占的百分比即为凋亡率。

1.2.3 细胞周期检测^[8] 将 HT-29 细胞用 1640 培养液稀释细胞浓度为 2×10^5 /ml,每 9ml 细胞悬液接种于 10cm 培养皿中,贴壁 12h 后将含 10%小牛血清的 1640 培养液换成无血清的培养基,继续培养 24h,然后吸去培养基,分别加入浓度为 4mg/ml、2mg/ml、1mg/ml 克瘤丸(用含 10%小牛血清 1640

配制)培养,于 24h 后以不含 EDTA 的胰酶消化并收集细胞于流式管,1000r/min 离心 5min,弃上清,冷 PBS 洗涤细胞 3 次,离心弃上清,加入预冷 75%乙醇,于 4℃ 固定过夜。离心收集细胞,冷 PBS 洗涤细胞 3 次,加入 100 μ g/ml RNA 酶(Rnase 15ul),涡旋振荡混合均匀,4℃ 避光放置 15min,加入含 50 μ g/ml PI 的 PBS 共 500 μ l,4℃ 避光孵育 30min,流式细胞仪检测细胞周期分布情况。在二倍体细胞峰前出现一个亚二倍体峰判定为凋亡细胞峰,以凋亡率(AP)表示凋亡状态。

1.3 统计学方法

所有数据采用 SPSS 13.0 统计软件分析,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组之间比较采用 t 检验,多组之间的比较采用方差分析。

2 结果

2.1 不同浓度克瘤丸对 HT-29 细胞增殖的影响

表 1 示,与对照组比较,实验组浓度为 4、2、1、0.5mg/ml 的克瘤丸作用 HT-29 细胞 48h,OD 值、48h 抑制率差异均有统计学意义($P < 0.01$);实验组中浓度为 4、2、1mg/ml 克瘤丸作用 HT-29 细胞 48h,OD 值、48h 抑制率均明显优于浓度为 0.25、0.5mg/ml 的克瘤丸,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 不同浓度克瘤丸对 HT-29 细胞增殖的影响

组别	浓度(mg/ml)	OD 值	48h 抑制率(%)
实验组	4	0.521 $\pm$ 0.024* Δ	81* Δ
	2	0.461 $\pm$ 0.038* Δ	84* Δ
	1	0.398 $\pm$ 0.043* Δ	86* Δ
	0.5	1.346 $\pm$ 0.179*	52*
	0.25	2.536 $\pm$ 0.059	10
	0	2.804 $\pm$ 0.032	—
对照组	0	2.804 $\pm$ 0.032	—

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与 0.25mg/ml 及 0.5mg/ml 组比较, $\Delta P < 0.01$

2.2 不同浓度克瘤丸对 HT-29 细胞凋亡的影响

1、2、4mg/ml 浓度克瘤丸作用于 HT-29 细胞 24h 后,实验组凋亡率由 5.82%,分别上升为 13.04%、28.77% 和 30.93%;与 1mg/ml 浓度比较,2mg/ml、4mg/ml 组凋亡率差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 不同浓度克瘤丸对 HT-29 细胞周期的影响

与对照组比较,4、2、1mg/ml 浓度克瘤丸作用 HT-29 细胞 24h 后,S 期细胞比例下降,而 G0/G1 期及凋亡细胞比例明显增加($P < 0.05$),G2/M 期则变化不明显($P > 0.05$)。当药物浓度达 4mg/ml

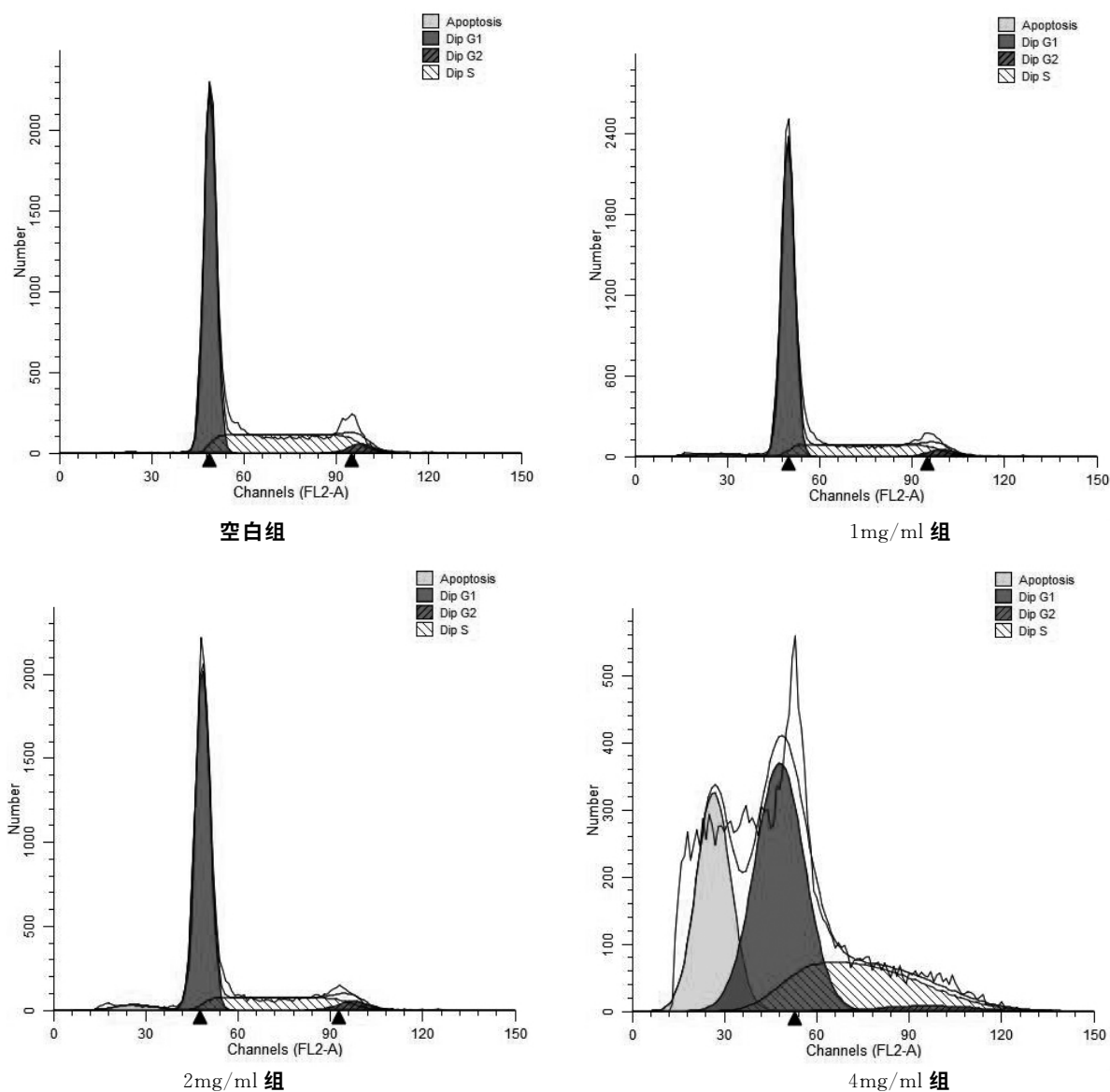


图1 不同浓度克瘤丸作用后流式细胞周期检测图

时 G0/G1 期前出现明显的亚二倍体区,与 1mg/ml、2mg/ml 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见图 1、表 2。

表2 不同浓度克瘤丸对 HT-29 细胞周期的影响(%)

组别	浓度 (mg/ml)	G0/G1 期	G2/M 期	S 期	AP
实验组	4	65.08*	2.80	32.12*	28.44
	2	74.32* Δ	3.96	21.71*	3.04 Δ
	1	72.32* Δ	3.21	24.47*	2.07 Δ
对照组	0	65.27	3.21	31.52	0.25

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 4mg/ml 比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

克瘤丸为江苏省中医院院内制剂,由莪术、斑蝥、壁虎、山豆根、水蛭、土鳖虫、黄芪组成。方中莪术、水蛭、土鳖虫活血祛瘀、破积通络;斑蝥、壁虎、山

豆根消癥散结、解毒抗癌;重用黄芪以益气扶正,使祛邪不伤正,助正以祛邪。诸药合用,共奏活血祛瘀、软坚散结、解毒抗癌、益气扶正之功效。临床实践证明,克瘤丸具有一定的稳定瘤体、抑制肿瘤生长的效果,与化疗合用具有提高疾病控制率的作用^[2-3]。实验研究显示,克瘤丸对动物移植性肿瘤有明显的抑制作用^[4-5]。克瘤丸对人肺癌细胞株 A549 有明显的抑制作用;具有显著抑制鸡胚尿囊膜血管生成作用;能抑制 Lewis 肺癌小鼠的肿瘤生长及肺转移,下调 Lewis 肺癌小鼠微血管密度(MVD)、血管内皮生长因子(VEGF)的表达^[9]。提示克瘤丸可能通过抑制肿瘤血管生成而发挥抑瘤抗转移作用。我们在临床观察中发现,克瘤丸对于大肠癌也有明显的疗效,故而我们对于其机制进行了研究。

包括结肠癌在内的恶性肿瘤的特征之一就是肿瘤细胞的失控性生长,其可能与细胞周期紊乱、增殖过快及凋亡减少有关。如何诱导肿瘤细胞的凋亡在新药的研发及肿瘤的治疗中已受到重视。然而,凋亡是多基因严格控制的过程,迄今为止凋亡过程确切机制尚不完全清楚。从分子生物学角度看,几乎所有的癌基因、抑癌基因的功能效应,最终都是从不同的途径汇聚到细胞周期机制上来。本实验通过将不同浓度克瘤丸处理 HT-29 细胞后,运用流式细胞技术分别通过 AnnexinV 单染及细胞周期的检测证明了克瘤丸具有诱导细胞凋亡的作用,并且具有浓度依赖性,当药物浓度达到 4mg/ml 时,HT-29 细胞的凋亡达到高峰,通过细胞周期的检测证实克瘤丸可将 HT-29 细胞阻滞于 G₀/G₁ 期,本实验仅初步证实了克瘤丸有抑制结肠癌细胞增殖、诱导该细胞凋亡的作用,具体通过何种机制诱导凋亡有待进一步研究。

参考文献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006 [J]. CA Cancer J Clin, 2006, 56(2): 106-130.
- [2] 戴虹, 王居祥, 王瑞平, 等. 克瘤丸治疗恶性肿瘤的临床疗效观察[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(11): 24-26.
- [2] 杨晨, 王瑞平. 克瘤丸治疗晚期非小细胞肺癌的临床观察[J]. 中医药学刊, 2004, 22(11): 2090-2091.
- [4] 朱超林, 王居祥, 王瑞平, 等. 克瘤丸对小鼠移植性肝癌 H₂₂ 腹水转实体瘤的抑制作用[J]. 实用中医内科杂志, 2006, 20(4): 378.
- [5] 朱超林, 王居祥, 王瑞平, 等. 克瘤丸对移植性肉瘤 S180 小鼠体质量、胸腺脾脏质量及指数的影响[J]. 山东中医杂志, 2007, 26(6): 411-412.
- [6] 邹玺, 王瑞平, 胡玥. 克瘤丸体外对人肺癌细胞株 A549 的抑制作用研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2439-2440.
- [7] 王瑞平, 邹玺, 胡玥. 克瘤丸对鸡胚尿囊膜血管生成的抑制作用[J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(7): 1230-1231.
- [8] Coudreuse D, Nurse P. Driving the cell cycle with a minimal CDK control network[J]. Nature, 2010, 468(7327): 1074-1079.
- [9] 王瑞平, 邹玺, 胡玥, 等. 克瘤丸对 Lewis 肺癌生长转移及 VEGF、MVD 表达的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(1): 38-41.

(收稿日期: 2012-02-15; 修回日期: 2012-08-31)

[编辑: 侯建春]

浓缩包装 1+1 膏剂生产全自动

—真空浓缩收膏机 开启膏方制作自动化新革命

东华原医疗历经数年精心研制而成的全新产品。采用真空浓缩、低温提取技术, 科技含量更高、功能更强大; 产品兼具压力和无压力双重煎煮功能, 每小时可实现3000—4000毫升收膏量, 远超传统膏方制作工艺; 根据需求, 全自动化包装机可进行10—50毫升不同容量产品的包装, 更实用更便捷!



YZN50
多功能真空浓缩收膏机



YB10-50A
膏体包装机

北京东华原医疗设备有限责任公司 网址: www.donghuagroup.com / www.donghuayuan.com 400-888-0258 800-810-0359