

• 基础研究 •

艾叶水提取物对肝癌细胞的抑制作用及对 Bcl-2 和 HSP70 蛋白表达的影响

陆树桐, 詹世林[△], 陈建雄

(广州军区广州总医院肝胆外科, 广州 510000)

摘要:目的 观察艾叶水提取物对 H27 人肝癌细胞抑制作用及对 Bcl-2、热休克蛋白(HSP70)蛋白表达的影响。方法 从细胞的形态学观察,并进一步使用免疫细胞化学剂、蛋白免疫印迹法(Western blotting)等分析方法研究癌基因 Bcl-2 及 HSP70 蛋白的表达情况。结果 60 mg/mL 的艾叶水提取物处理肝癌细胞 12 h 后,肝癌细胞均出现严重皱缩、固缩、细胞质膜突出等,免疫组化及 Western blotting 分析显示实验过程中伴随着癌基因 Bcl-2 表达的减弱($P < 0.05$),而 HSP70 蛋白表达则无明显变化($P > 0.05$)。结论 艾叶水提取物能够诱导体外人肝癌细胞凋亡,而这个凋亡过程可能跟癌基因 Bcl-2 有关,与 HSP70 的表达关系不明显。

关键词:肝肿瘤;HSP70 热休克蛋白质类;艾叶水提取物;Bcl-2

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.33.034

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)33-4062-02

Leaves water extract on the liver human hepatocellular carcinoma xenografts and protein expression of Bcl-2 and HSP70

Lu Shutong, Zhan Shilin[△], Chen Jianxiong

(Department of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of People's Liberation Army,

Guangzhou Military Area, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

Abstract: Objective To explore the leaves water extract on the liver human hepatocellular carcinoma xenografts and protein expression of Bcl-2 and HSP70. **Methods** From cell morphology and DNA agarose gel electrophoresis the observation leaves water extract the characteristics of the material role in human hepatoma cells, further use of immunocytochemistry agent Western blotting analysis method oncogene Bcl-2 and tumor suppressor genes HSP70 expression. **Results** After the processing of the the 60 mg/mL leaves water extract of liver cancer cells after 12 h, liver cells showed severe shrinkage, pyknosis, highlight the cell plasma membrane, immunohistochemistry and Western blotting analysis showed that during the experiment along with the oncogene Bcl-2 expression weakened ($P < 0.05$), while the expression of tumor suppressor genes HSP70 had no obvious change ($P < 0.05$). **Conclusion** Water extract of the leaves can be induced in vitro human liver cancer cell apoptosis, and the apoptotic process may be followed by the oncogene Bcl-2, tumor suppressor gene expression of HSP70 relationship.

Key words: liver neoplasms; HSP70 heat-shock proteins; water extract of the leaves; Bcl-2

原发性肝癌居全球癌症死亡率第 3 位,在我国由于乙型肝炎病毒性肝炎高发率、低控制率,其发病率远远高于世界平均水平,与其相关的肝癌的发病率也远远高于世界平均水平,全球约 50% 的肝癌发生在我国^[1],我国已经成为肝癌发病率居全世界第 2 位的国家^[2]。热休克蛋白(HSP)70 及 Bcl-2 在肝癌的发病中起重要作用^[3],但是目前并无针对这些基因的靶向药物调控 Bcl-2 的表达及 HSP70 的分泌,给治疗带来了难度,同时肝癌病理绝大部分起病隐匿,就诊时就已经失去手术机会,预后极差,治疗效果不理想^[4-5]。而目前针对肝癌的治疗手段均有较大的不良反应,给肝癌的治疗带来了极大的困难,然而近期研究发现中成药在治疗肝癌的过程中具有一定的作用^[6-7],尤其是含有艾叶的复方制剂在肝癌治疗方面的逐渐推广。但是由于中药成分的复杂性,具体机制尚不明确,本文主要研究艾叶水提取物在抑制肝癌细胞生长增殖、对 HSP70 及 Bcl-2 作用的机制。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 细胞株 H27 人肝癌细胞,由广州医科大学肝炎研究所惠赠。

1.1.2 试剂及仪器 艾叶水提取物(西安昌岳植物化工有限公司提取),DMEM(广州华瑞生物有限公司),胎牛血清(广州华瑞生物有限公司),人抗 HSP70 单克隆抗体、免疫人 Bcl-2 纯化抗

体、SABC 免疫组化试剂盒均购自重庆市生物科技有限公司, Bcl-2、HSP70 免疫组化和原位杂交试剂盒购自博士德公司,美国康塔图像分析仪系统(2.5 版本)由广州医科大学提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌细胞 H27 细胞用含有 10% 新生小牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的链霉素及青霉素的 DMEM 培养基,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内进行培养,0.25% 的胰蛋白酶消化并进行传代^[8]。

1.2.2 显微镜观察 实验设计分为两个组,艾叶水提取物组及对照组,取对数生长期的 H27 肝癌细胞,接种于培养瓶中,并培养 24 h,待细胞贴壁后,艾叶水提取物组更换成 60 mg/mL 艾叶水提取物培养液,对照组换用含有溶媒水的培养液继续培养,并在显微镜下观察细胞的生长情况及细胞形态学变化。

1.2.3 MTT 法测定 取对数期的 H27 肝癌细胞,以密度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 96 孔板,预培养 24 h 后,实验组给予艾叶水提取物培养,终体积为每孔 0.2 mL,各组分别设置 3 个复孔,每隔 12 h 使用 MTT 法检测各组细胞的 A600 处吸光度值,连续检测 72 h,绘制曲线,并计算抑制率,计算抑制率公式:细胞生长抑制率=(对照组吸光度平均值-实验组吸光度平均值)/对照组吸光度平均值 $\times 100\%$ ^[9]。

1.2.4 Western blot 检测 H27 HSP70、Bcl-2 蛋白表达的变化

将收集的 H27 细胞膜成分蛋白进行 SDS-PAGE,电泳结束后,按照电转移装置中的操作说明做滤纸-胶-膜电转移。转膜结束后,将 PVDF 膜用含有 5% 的脱脂奶粉 TBST 缓冲液封闭 1.5 h, TBST 冲洗 3 次,然后将 Bcl-2、HSP70 抗体与二抗作用,37 °C 避光孵育 1.5 h,然后加入 1×TBST 摇床洗膜 3 次,每次 10 min,最后经过蓝化、脱水、透明、封固等处理,最后照片。

1.3 统计学处理 使用 SPSS18.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较进行 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 电镜结果 电镜下观察可见经含艾叶水提取物处理 12 h 后细胞体积缩小,染色质凝聚并向周边聚集,而细胞核膜、细胞膜仍完整,为凋亡细胞的特征性表现,根据癌细胞生长抑制率的计算方法发现,艾叶水提取物 48 h 对肝癌细胞的生长抑制率为 10.7%,72 h 抑制率为 38.5%,抑制效应呈时间依赖性。72 h 细胞凋亡及细胞周期变化见表 1。

表 1 两组凋亡率及肿瘤细胞所处细胞周期比例的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Apo(%)	G ₀ /G ₁ (%)	S(%)	G ₂ /M(%)
艾叶水提取物组	38.5±0.2	87.7±4.2	8.2±2.1	4.1±2.2
对照组	13.1±0.1	71.3±3.9	12.5±2.6	6.2±1.5

2.2 细胞增殖曲线 根据波长为 A600 处吸光度值绘制增殖曲线,艾叶水提取物组细胞增殖曲线平台期与对照组对比明显缩短,见图 1。

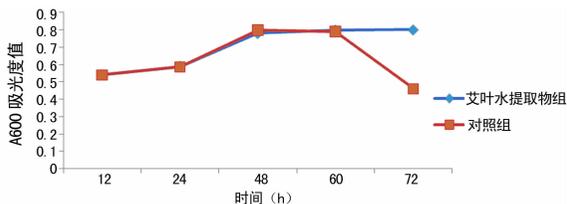
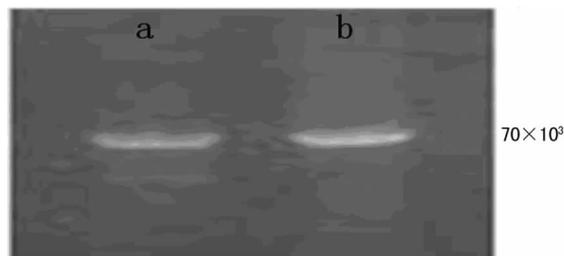


图 1 两组 A600 处细胞增殖曲线



a: 艾叶水提取物组; b: 对照组。

图 2 两组 Bcl-2 蛋白表达比较



a: 艾叶水提取物组; b: 对照组。

图 3 两组 ASP70 蛋白表达比较

2.3 两组 Bcl-2、HSP70 蛋白表达 艾叶水提取物组 Bcl-2 蛋白条带较对照组明显减弱 ($P < 0.05$), HSP70 蛋白条带变化不明显 ($P > 0.05$)。见图 2、3。

3 讨 论

肝癌是常见的恶性肿瘤之一,发病率及病死率均较高,由于肝癌具有发病隐匿,一旦发现多为晚期,而由于其发展快、转移早、侵袭性强及预后极差的特点,备受世界卫生组织重视,在我国每年因为肝癌死亡的人数就高达 30 万,占全世界肝癌死亡人数的 45% 以上^[1],然而,目前针对肝癌的治疗,仍以手术为主,但是切除后复发率极高,且放化疗有效率低,不良反应极大,患者痛苦大,并发症多,因此,寻找新的治疗方案已经迫在眉睫。

随着基因技术及分子生物学技术的发展,针对基因的靶向治疗日益受到重视,尤其是对致癌基因及抑癌基因研究的迅猛发展,被认为是肿瘤治疗的 5 种模式的基因治疗越来越受到世界的重视^[10]。Bcl-2 是细胞凋亡中的重要癌基因之一,由于 Bcl-2 能够抑制多种细胞毒因素所知的细胞正常凋亡,因此, Bcl-2 的过度表达就能增强所观察细胞对大多数细胞毒素的抵抗性。有研究证明发现 Bcl-2 可增强细胞对大多数 DNA 损伤因子的抵抗性,抑制大多数化疗药物所引起的细胞凋亡,减弱化疗药物的不良反应,同时促进 DNA 的修复,促进癌细胞的增殖^[11]。而与其相反, HSP70 则一直被认为主要在维护蛋白质正常结构,调整蛋白质的折叠、装配,参与应急状态下细胞的保护作用。近期研究发现,肝癌细胞内 HSP70 表达增多与肝癌的发病及转归有着密切的关系^[12-14], HSP70 可以增强肝癌细胞的免疫原性,从而加强肝癌的治疗效果。

近期研究发现艾叶的复方制剂在肝癌治疗中有一定作用,其作用机制,目前尚不清楚,本实验研究发现艾叶水提取物不仅能够加快肝癌细胞体外的凋亡速度,抑制增殖,改变增殖平台期时间,而且可以抑制癌基因 Bcl-2 表达,抑制 36×10^3 处蛋白的表达,从而达到促进肝癌细胞凋亡的作用,但是对 HSP70 的分泌并无明显影响。研究结果初步显示,艾叶在肝癌治疗中的作用,很有可能是因为其能够抑制癌基因 Bcl-2 的表达引起从而促进细胞凋亡,达到体外抑制癌细胞增殖的作用,然而由于目前尚缺少动物实验的支持,其具体机制及原因仍需要进一步探讨。

参考文献:

[1] 钦伦秀,孙惠川,汤钊猷. 原发性肝癌研究进展[J]. 中华外科杂志,2006,44(15):1070-1074.
 [2] 张振宇,张刺志,许汗林,等. 皂荚提取物对人肝癌细胞相关癌基因表达的调控作用及端粒酶的影响[J]. 中国临床药理与治疗学,2005,10(1):52-56.
 [3] 胡玲,王洪琪,催娜娟,等. 白花蛇舌草诱导 HSP 表达对 H22 肝癌细胞移植瘤的干预作用[J]. 中药药理与临床,2006,17(6):409-412.
 [4] Liu ZT, Li Qi. Dictionary of Chinese traditional drugs [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers,1977:84-85.
 [5] Cory S, Adams JM. Killing cancer cells by flipping the Bcl-2/Bax switch[J]. Cancer Cell,2005,8(1):5-6.
 [6] Terada T, Nakanuma Y. Expression of apoptosis, pro-liferating cell nuclear antigen, and apoptosis-related antigen (bcl-2, c-myc, Fas, Lewis(y) and p53) in human cholangiocarcinomas and hepatocellular carcinomas [J]. Pathol Int,1996,46(10):764-770.
 [7] Kamano Y, Nogawa T, Yamashita A, (下转第 4066 页)

术单位费用最低为 573.55 元,最高为 928.71 元,相差 1.6 倍。其差别的原因可能是:(1)包皮环切推广模式在不同人群中推广需要一个过程,包括项目规划、工作人员培训等。项目前期部分的投入在后期才能逐渐得到体现,这种作用可用 Malmquist 生产率变化指数分解后的生产技术的变化,即生产前沿的移动来说明^[10]。项目在第 2 周期开始生产技术处于提高的状态,说明前期投入的效应在第一次随访后得以体现。(2)项目资金在各人群和各周期的分配相对固定,因此项目的产出对单位费用的变化起着决定性作用,而项目管理对于提高项目的产出具有重要的促进作用。随着项目的推进,投入的资金总量有所下降,手术意愿改变的人数不断上升,故手术意愿改变单位费用的时间序列呈现下降趋势。而手术单位费用的时间序列依次呈现下降期和上升期变化,与手术人数不断下降,早期其下降趋势大于资金投入总量,而晚期则小于资金投入总量有关。

在项目后期,技术效率有所下降,可能的原因包括:(1)随着项目的进展,推广模式方案的调整,所需的资金投入量不断地增加。而目标人群经过长时间的参与到项目中,到后期可能出现厌烦情绪,手术意愿改变人数及手术人数增加幅度不大,因此费用出现相应增加。(2)项目管理上的松懈会导致效率的下降。(3)工作人员不足。在我国绝大多数艾滋病防治机构的人员数量和资质不能满足工作需要,艾滋病防治工作人员中,“满负荷工作”及“超负荷工作”的人员占 97.15%^[11]。当资金数量的持续增长超过了人力资源的执行能力时,就会表现出资金相对过剩,资金使用效率下降的情况^[10]。

尽管本研究从技术效率角度评价项目的效果对项目规划和管理具有指导意义,但在评价过程中并未考虑推广模式的干预质量,而干预质量的好坏直接影响到项目的产出。此外,若能分析足够长的时间数据,将能充分观察完整的技术效率时间序列变化规律。

综上所述,本研究从项目投入角度分析包皮环切在各人群推广模式的使用效率,可在一定程度上为项目管理者 and 决策者提供科学依据。

参考文献:

[1] Maria JW, Steven JR, David S, et al. Might male circumci-

sion be more protective against HIV in the highly exposed, an immunological hypothesis [J]. AIDS, 2005, 18 (19):2181-2182.

[2] Siegfried N, Muller M, Volmink J, et al. Male circumcision for prevention of heterosexual acquisition of HIV in men [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2003(3):CD003362.

[3] Auvert B, Taljaard D, Lagarde E, et al. Randomized, controlled intervention trial of male circumcision for reduction of HIV infection risk; the ANRS 1265 Trial [J]. PLoS Med, 2005, 2(11):1112-1122.

[4] Gray RH, Kigozi G, Serwadda D, et al. Male circumcision for HIV prevention in men in rakai, uganda; a randomised trial [J]. Lancet, 2007, 369(9562):657-666.

[5] Bailey RC, Moses S, Parker CB, et al. Male circumcision for HIV prevention in young men in kisumu, kenya; a randomized controlled trial [J]. Lancet, 2007, 369(9562):643-656.

[6] Charnes A, Cooper WW, Rhodes E. Measuring the efficiency of decision making units [J]. Euro J Oper Res, 1978, 2(6):429-444.

[7] Seiford LM. Data envelopment analysis: the evolution of the state of the art(1978-1995) [J]. J Prod Anal, 1996, 6 (7):99-137.

[8] Cook WD, Seiford LM. Data envelopment analysis(DEA)-thirty years on [J]. Euro J Oper Res, 2009, 192(1):1-17.

[9] Fare R, Grosskopf S, Love IK. Production frontiers [M]. England: Cambridge Cambridge University Press, 1994.

[10] 成刚, 钱振华, 胡军. 艾滋病项目自愿咨询检测的技术效率分析 [J]. 北京大学学报, 2009, 41(2):135-140.

[11] 葛利荣, 刘昆仑, 刘康迈, 等. 全国省级疾病预防控制中心艾滋病预防控制人力资源现状调查 [J]. 中国艾滋病性病, 2007, 13(3):195-197.

(收稿日期:2013-07-09 修回日期:2013-08-25)

(上接第 4063 页)

et al. Isolation and structure of a 20,21-epoxybufenolide series from chan su [J]. J Nat Prod, 2002, 65(7):1001-1005.

[8] Wang GT. Combined use of traditional Chinese and western medicine practical digestive oncology [J]. Shanghai Keji, 2009, 45(21):124-126.

[9] Cox LS, Lane OP. Kinases and clamps; how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage [J]. Tumour Suppressors, 2007, 31(1):23-37.

[10] Xu LZ, Yang WT. The diagnostic criteria of immunohistochemical reaction [J]. Zhongguo Ai Zheng Za Zhi, 1996, 6(2):229-231.

[11] Cox LS, Lane OP. Tumour suppressors, kinases and clamps; how p53 regulates the cell cycle in response to

DNA damage [J]. Bioassays, 1995, 17(4):501-508.

[12] Yeh JY, Huang WJ, Kan SF, et al. Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells [J]. Prostate, 2003, 54(2):112-124.

[13] Li H, Sui C, Kong F, et al. Expression of HSP70 and JNK-related proteins in human liver cancer; potential effects on clinical outcome [J]. Dig Live Dis, 2007, 39(7):663-670.

[14] Lan YH, Li YG, Liang ZW. A DNA vaccine against chimeric AFP enhanced by HSP70 suppresses growth of hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Immunol Immunother, 2007, 56(7):1009-1016.

(收稿日期:2013-07-12 修回日期:2013-08-20)