维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)05-0677-04

顺铂、氧化苦参碱对肝癌 QGY 细胞生长及端粒酶活性的影响

何　松[1]，左国庆[1]，张　燕[1]，汤为学[2]

(1.重庆医科大学附属第二医院消化内科，重庆　400010；2.基础医学院病理生理学教研室，重庆　400016)

【摘　要】目的：观察顺铂、氧化苦参碱对人肝癌细胞株 QGY 端粒酶活性的影响，进一步探讨两种药物的可能作用机制。方法：采用人肝癌细胞株 QGY 作为研究对象，MTT 法检测不同浓度和作用时间的药物对细胞增殖的抑制作用，以及对 QGY 细胞粘附能力的影响；流式细胞仪分析细胞周期的分布及凋亡；PCR-ELISA 法检测端粒酶活性的变化。结果：两种药物均具有抗 QGY 细胞增殖、阻滞细胞周期、诱导凋亡及抑制端粒酶活性的作用。结论：对端粒酶活性的抑制可能是两种药物发挥抗肿瘤作用的机制之一。

【关键词】肝细胞癌；端粒酶；顺铂；氧化苦参碱

【中国图书分类号】R735.7　　【文献标识码】A　　【文章编号】2006-03-06

Effects of cisplatin, oxymatrine on the cell growth and telomerase activity of QGY hepatoma cells

HE Song, et al

(*Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the anti-cancer mechanism of cisplatin, oxymatrine by observing their effects on telomerase activity. *Methods*: The inhibition of proliferation in QGY cells were estimated by MTT-test. Distribution of cell cycle and apoptosis were analysed using flow cytometry. The changes of telomerase activity were detected by PCR-ELISA method. *Results*: These two drugs could inhibit the proliferation of QGY cells, block the cell cycle, induce its apoptosis and inhibit the activity of telomerase. *Conclusion*: The inhibition of telomerase activity may be one of the mechanisms for the anti-cancer effect of the two drugs.

【Key words】Hepatocellular carcinoma; Telomerase; Cisplatin; Oxymatrine

端粒、端粒酶因与多数人类恶性肿瘤密切相关而受到广泛关注。端粒酶的活性与恶性肿瘤之间的高度相关性使其成为近年来肿瘤研究的热点，以端粒酶为靶点的肿瘤治疗成为抗肿瘤治疗的一个新途径。我们观察了抗肿瘤药物顺铂（cisplatin,CDDP）及氧化苦参碱（oxymatrine，OMT）对人肝癌细胞株 QGY 细胞生长及端粒酶活性的影响，以进一步探讨它们在肿瘤治疗中可能的作用机制。

1　材料与方法

1.1　细胞株

人肝癌细胞株 QGY 由重庆医科大学肝炎研究所提供，接种在含 10%小牛血清、青霉素 100μ/ml、链霉素 100μ/ml 的 RPMI 1640（G1BCO,美国）培养液中，置于 37℃、5% CO_2 培养箱（SHEL-LAB 2300 型,美国）内培养。

1.2　药品与试剂

CDDP（山东省德州制药厂），OMT（宁夏启元药业有限公司）。上述两种药物使用时均配制成五种终浓度（见表 1）。MTT（四甲基偶氮唑盐）（上海华舜生物工程有限公司）配制成 5mg/ml，过滤除菌分装备用。二甲基亚砜（DMSO，化学纯，重庆东方试剂厂）。Telomerase PCR-ELISA 试剂盒购自德国 Promega 生命科学公司。

1.3　MTT 法[1]测定不同浓度的 CDDP、OMT 作用不同时间对 QGY 细胞增殖的影响

选取对数生长期的细胞，用 0.1%胰酶消化，制成浓度为 5×10^4 个 /ml 的细胞悬液，接种于 96 孔培养板中，每孔 200μl。实验分为试剂对照组，细胞对照组，CDDP、OMT 五种不同浓度的实验组，每孔加药 20μl，每组设 5 个平行孔，置 37℃、5% CO_2 培养箱内，分别培养 24h、48h、72h，离心弃上清液加 1640 培养液 200μl 及 20μl MTT，再培养 4h，离心弃上

作者介绍：何　松(1965-　)，男，博士，副教授，主要研究方向：肝癌的基础与临床。

维普资讯 http://www.cqvip.com

清液，加 DMSO200μl，在自动酶标仪（Bio-Rad-550 型美国，波长 570nm）上测出各孔吸光度 A 值，计算实验组的抑制率。以上实验重复 3 次，取平均值。

根据下列公式计算抑制率：

抑制率（fa）=（1- 实验组平均 A 值 / 细胞对照组平均 A 值）×100%

根据中效方程式计算药物的中效浓度（IC_{50}）：

fa/fu=（D/Dm）m

fa 为抑制率，fu（存活率）=1-fa，D 为药物浓度，Dm 为中效浓度即抑制率为 0.5 时所需药物浓度，m 为斜率。

1.4 MTT 法测定 CDDP、OMT 对 QGY 细胞粘附能力的影响

取对数生长期的 QGY，0.1%胰酶消化，制成细胞悬液，调整细胞浓度为 5×10^4 个 /ml，接种 20ml（1×10^6 个）于 200ml 培养瓶中，实验分为 3 组，即细胞对照组，CDDP、苦参碱 3 个实验组，置 37℃、5% CO_2 培养箱培养 72h，分别用 0.1%胰酶消化，调整细胞浓度为 2.5×10^5 个 /ml，接种于 96 孔培养板内，每孔 200μl（5×10^4 个 / 孔），每组接种 20 孔，置 37℃、5% CO_2 培养箱培养，分别于 30min、60min、90min、120min 吸取每组 4 孔培养液，用生理盐水轻轻洗 2 次，加入 RPMI 1640 培养液 200μl 备用。120min 加入 1640 培养液 200μl 后，96 孔培养板离心，吸去每组第 5 个 4 孔培养液（作为各组对照组），加入 200μl RPMI 1640 培养液，然后每孔均加 20μlMTT，再培养 4h，用 MTT 法测出各孔 A 值。计算三组在不同阶段粘附率。粘附率 = 各时段 A 值 / 对照组 A 值。以上实验重复 3 次，取平均值。

1.5 流式细胞仪分析 CDDP、OMT 对 QGY 细胞周期分布及凋亡的影响

选取对数生长期的细胞，用 0.1%胰酶消化，制成浓度为 5×10^4 个 /ml 的细胞悬液，接种 20ml 于 200ml 培养瓶内。实验分为 3 组，即对照组，CDDP、OMT3 个实验组，置 37℃、5% CO_2 培养箱培养 24h，48h，72h。分别收集各时段细胞，PBS 洗涤 2 次，将细胞悬液转入 EP 管中离心弃上清液，缓慢加入预冷的 70%乙醇固定 1h，PBS 洗涤 2 次，将等体积的细胞悬液和 PI 染液混合，4℃放置 30min，将样品放入 FCM 的样品室，以激发波长 488nm 测定，并用 Modfit LT2.0 软件分析细胞周期分布及凋亡情况。

1.6 CDDP、OMT 对 QGY 细胞端粒酶活性的影响

1.6.1 细胞样品制备 细胞培养及处理同流式细胞仪测定。分别收集各时段细胞，取 2×10^5 个细胞入消毒 EP 管中，重复 3 管。4℃低温离心，弃上清液，加 200μl 裂解液，冰浴 30min，4℃低温高速（14000r/min）离心 20min，吸取 175μl 上清液（细胞提取液）于消毒 EP 管中，-80℃保存备用。

1.6.2 阴性标本制备 取 2μl 阳性标本，65℃水浴 10min。

1.6.3 RT-PCR 取 10μl 细胞提取液，加入反应底物，总体积 50μl，30℃逆转录 20min，94℃灭活 5min，经 94℃ 30s 变性、50℃ 30s 退火、72℃ 90s 延伸，30 个循环，72℃扩增 10 min，产物 4℃保存。

1.6.4 ELISA 半定量检测端粒酶活性 取 5μl PCR 反应产物，加入到 20μl 变性液中，室温放置 10 min，再加入 225μl 杂交液充分混匀，取 100μl 加到链霉卵白素包被的 96 孔板内，进行 ELISA 检测。

1.6.5 结果判定 阴性对照 A < 0.2，阳性对照 A > 1.0 为有效测定。

1.7 统计分析

数据均用统计软件包 SAS6.12 版本分析，结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两样本均数比较采用 t 检验，不同处理组率的比较采用 χ^2 检验，显著性水平以 $P<0.05$ 判断。

2 结 果

2.1 CDDP、OMT 对 QGY 细胞增殖的抑制作用

MTT 法结果表明：CDDP、OMT 对 QGY 细胞的增殖均具有抑制作用。抑制率随着药物浓度的增加而增加，具有剂量依赖关系；随着时间的延长而增加，具有时间依赖关系。CDDP 组各浓度及时间之间 $P<0.001$，OMT 组各浓度及时间之间 $P<0.001$。见表 1。

表 1 MTT 法检测 CDDP、OMT 对 QGY 细胞增殖的抑制率（$\bar{x}\pm s$）

药物剂量（mmol/L）		24h	48	72h
CDDP	0.0083	0.0588 ± 0.0024	0.5448 ± 0.0124	0.7411 ± 0.0078
	0.0166	0.1170 ± 0.0091	0.6659 ± 0.0097	0.8227 ± 0.0067
	0.0322	0.3167 ± 0.0109	0.7814 ± 0.0111	0.8828 ± 0.0119
	0.0664	0.4456 ± 0.0194	0.8179 ± 0.0210	0.9315 ± 0.0199
	0.1328	0.6802 ± 0.0095	0.8716 ± 0.0067	0.9659 ± 0.0193
OMT	2.1544	0.0027 ± 0.0006	0.0529 ± 0.0032	0.1663 ± 0.0108
	4.3088	0.0230 ± 0.0041	0.2059 ± 0.0083	0.3277 ± 0.0175
	8.6176	0.0865 ± 0.0081	0.2395 ± 0.0091	0.5327 ± 0.0113
	17.2352	0.1191 ± 0.0110	0.3322 ± 0.0117	0.6591 ± 0.0142
	34.4704	0.4517 ± 0.0131	0.7240 ± 0.0133	0.9340 ± 0.0049

根据 MTT 法结果及中效方程式计算出 CDDP、OMT 作用 QGY 细胞 72h 的中效浓度（Dm）分别为 0.0025mmol/L、7.3822mmol/L，说明 CDDP 对 QGY 细胞的抑制作用大于 OMT。

2.2 CDDP、OMT 对 QGY 细胞粘附能力的影响

MTT 法测得 QGY 细胞粘附率的变化情况。随着时间的延长，对照组细胞的粘附能力增加，比相应的给药组（CDDP 及 OMT）细胞粘附率有更明显的增加。见表 2。

从表 2 可见，对照组各时段之间 $P<0.001$。CDDP 组各时段 $P<0.001$，OMT 组各时段 $P<0.001$；CDDP 组粘附率 < OMT 组粘附率。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 CDDP、OMT 对 QGY 细胞粘附率的影响（$\bar{\chi} \pm s$）

实验组	30min	60 min	90 min	120 min
对照组	0.5247 ± 0.0177	0.6512 ± 0.0239	0.8484 ± 0.0481	0.9136 ± 0.0071
CDDP组	0.3072 ± 0.023	0.3503 ± 0.0125	0.4454 ± 0.0050	0.5856 ± 0.0141
OMT组	0.3159 ± 0.0129	0.3840 ± 0.0079	0.4990 ± 0.0183	0.6495 ± 0.0158

2.3 CDDP、OMT 对 QGY 细胞周期分布的影响

流式细胞仪分析结果表明：经 CDDP 作用 QGY 细胞 24h 后，使 G_0/G_1 期细胞减少，细胞阻滞于 S 期；作用 48h 及 72h 后，G_0/G_1 期细胞减少，出现 S 及 G_2/M 期阻滞，在 DNA 直方图上 G_1 峰前出现的亚二倍体峰（Sub-G_1）表示 DNA 降解，又称细胞凋亡峰，分别达到 4.58%和 6.33%。OMT 作用 QGY 细胞 24h 后，将细胞周期阻滞于 G_0/G_1 和 S 期，48h 及 72h 为 S 期，凋亡率分别为 18.27%和 16.28%。说明两种药物均能阻滞 QGY 细胞的细胞周期进程同时诱导细胞凋亡。经 χ^2 检验，不同时间正常细胞组和药物处理组的凋亡峰 $P<0.01$，差别有显著性意义。

表 3 CDDP、OMT 对 QGY 细胞周期分布及凋亡的影响(%)

时间	实验组	G_0/G_1	S	G_2/M	Apoptosis
24h	对照组	70.74	17.95	11.30	-
	CDDP	55.04	44.96	0	9.22
	OMT	44.36	25.69	29.95	7.56
48h	对照组	67.25	19.50	13.25	-
	CDDP	42.22	36.76	21.76	4.58
	OMT	69.00	25.41	5.6	18.27
72h	对照组	71.51	21.32	7.17	-
	CDDP	53.54	21.44	25.02	6.33
	OMT	58.05	31.53	10.42	16.28

2.4 CDDP、OMT 对 QGY 细胞端粒酶活性的影响

通过实验发现，两种药物作用 QGY 细胞 24h 后均出现 QGY 细胞端粒酶的活性的抑制，72h 后端粒酶的活性明显降低。这一结果说明两种药物均可抑制肝癌细胞端粒酶的活性，该抑制作用随着作用时间的延长及药物浓度的增加而增强，具有时间和剂量依赖性。48h、72h 与对照组之间均有显著性差异（$P<0.001$）。见表 4。

表 4 CDDP、OMT 对 QGY 细胞端粒酶活性的影响(A 值)

实验组	24h	48h	72h
对照组	1.7567 ± 0.0103	1.7673 ± 0.0156	1.7763 ± 0.0088
CDDP组	1.7053 ± 0.0054	1.5363 ± 0.0104	1.2160 ± 0.0075
OMT组	1.7424 ± 0.0035	1.6943 ± 0.0087	1.5423 ± 0.0115

3 讨 论

端粒是真核细胞线形染色体末端的重复 DNA 序列，端粒长度被认为是细胞衰老和癌变的一个“有丝分裂时钟”。端粒长度的维持需要端粒酶的激活。在肿瘤的发生过程中，由于细胞过度增殖，端粒酶被激活，重新调整了“有丝分裂时钟”而阻止端粒的缩短。目前，端粒酶在肿瘤发生过程中的作用已日益为人们所关注。研究结果表明，人正常肝细胞中无端粒酶活性表达，而肝癌细胞中端粒酶阳性表达率为 85%以上，且随分化程度的降低端粒酶活性逐渐增强。切除的肝癌组织的端粒酶活性越强，其复发率越高。端粒酶在肿瘤细胞中起着重要的作用，其功能是添加重复序列于 DNA 端粒末端，阻止端粒随细胞分裂而缩短，稳定染色体 DNA。抑制端粒酶活性可能会恢复肿瘤细胞的衰老程序。因此，许多学者推测，端粒酶可能是肿瘤治疗最佳靶点之一[2]。

我们实验的 MTT 法结果显示：CDDP、OMT 对 QGY 细胞的增殖均具有抑制作用，抑制率随着药物浓度的增加而增加，具有剂量依赖关系；随着时间的延长而增加，具有有时间依赖关系。CDDP、OMT 可以降低 QGY 细胞的粘附能力，且 CDDP 较 OMT 有更强的粘附抑制作用。通过 PCR-ELISA 法检测 CDDP、OMT 对肝癌细胞株 QGY 端粒酶活性的影响，发现一定浓度的 CDDP、OMT 都可以不同程度地抑制 QGY 细胞端粒酶活性并且同样具有剂量和时间依赖性。顺铂对 QGY 细胞的增殖及端粒酶活性的抑制作用均较 OMT 强。顺铂同 DNA 的联结方式主要为 G-Pt-G 和 A-Pt-G 的形式，而端粒和端粒酶 RNA(human telomerase RNA,hTR)的碱基顺序正是富含这种结构，因此顺铂抑制了 hTR 的表达从而对端粒酶活性进行了调节，但有的研究说明 hTR 的表达和端粒酶活性的关系并无相关性[3]，因此抑制 hTR 对端粒酶活性是不是有直接的影响尚不能肯定。

我们在实验中观察到 CDDP、OMT 在抑制 QGY

维普资讯 http://www.cqvip.com

细胞增殖及端粒酶活性的同时，也诱导细胞凋亡，提示两药对肿瘤的抑制作用与端粒酶活性的调节以及凋亡有关。但是端粒酶活性的降低是凋亡的原因还是结果，尚不能明确，有待进一步研究。至于凋亡启动后端粒酶活性发生改变的机制，可能是由于凋亡过程中细胞的完整性受到破坏而影响到端粒酶的活性和表达，或端粒酶受凋亡相关基因的调控所致。最近的研究表明，凋亡相关基因如 c-Myc，Bcl-2 和 p53 等直接或间接参与端粒酶活性的调控[4]。

流式细胞仪检测结果显示 CDDP、OMT 影响了 QGY 细胞的周期分布。作用 72h 后，CDDP 出现 S 及 G_2/M 期阻滞；OMT 则以 S 期阻滞为主，说明两种药物均能阻滞 QGY 细胞的细胞周期进程同时诱导细胞凋亡。较多的实验表明端粒酶活性的调节亦具有细胞周期依赖性，在细胞周期的不同阶段端粒酶的表达发生明显变化。但是 Holt 等[5]指出，端粒酶活性的表达在细胞周期的各个阶段中并不发生明显变化，端粒酶活性通常与肿瘤细胞的增长速率密切相关，退出细胞周期而处于静止期后端粒酶活性受到抑制。两药对肝癌细胞周期的影响与下调端粒酶表达的关系有待进一步研究.

Kondo 等[6]研究表明，抑制端粒酶活性能增强顺铂诱导神经胶质瘤细胞系 U251-MG 凋亡的敏感性，提示端粒酶可能与化疗敏感性有关。应用端粒酶抑制剂抑制肿瘤细胞端粒酶活性能增加化疗药物如 CDDP 的敏感性，将低细胞毒性的端粒酶抑制药物如苦参碱和化疗药物联合应用不仅能够降低化疗药物的剂量以减少毒副作用，而且能够提高肿瘤治疗的效果，为肿瘤治疗提供了一条新途径。

从本研究结果看，CDDP、OMT 在体外通过阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用，其在诱导凋亡的同时又伴有端粒酶活性的下降，这提示对端粒酶活性的抑制可能是两种药物发挥抗肿瘤作用的机制之一，也为联合促进凋亡、抑制端粒酶活性及提高化疗敏感性的这一治疗途径提供了理论依据。

参 考 文 献

[1] 汤为学，骆云鹏，王瑞雪.人实体瘤抗癌药物敏感试验 MTT 法的建立[J]. 重庆医科大学学报，1992；17(21)：103-108.

[2] Cai X,Shen YL,Zhu Q,et al.Arsenic trioxide-induced apoptosis and differentiation are associated respectively with mitochondrial transmembrane potential collapse and retinoic acid signaling pathways in acute promyelocytic leukemia [J]. Leukemia,2000;14(2):262-270.

[3] Kyo S,Kanaya T,Takakura M,et al.Expression of human telomerase subunits in ovarian malignant,borderline and benign tumors[J].Int J Cancer,1999;80(6):804-809.

[4] Li H,Cao Y,Berodt MC,et al.Molecular interactions between telomerase and the tumor suppressor protein p53 in virtro[J].Oncogene,1999;18(48):6785-6794.

[5] Holt SE,Wright WE,Shay JW.Regulation of telomerase activity in immortal cell lines[J].Mol Cell Biol,1996;16(6):2932-2939.

[6] Kondo Y,Kondo S,Tanake Y, et al.Inhibition of telomerase increases the susceptibility of human malignant glioblastoma cells to cisplatin-induced apoptosis [J].Oncogene,1998;16(17):2243-2248.

(上接第 654 页)

signal [J]. EMBO J, 2003;22:2104-2116.

[10] 刘亮明，罗 文，刘晶美，等.HBx 在原发性肝癌发病中的作用及其生物治疗策略[J].世界华人消化杂志，2005；13(4)：432-439.

[10] Liu ML, Luo W, Liu JM, et al. The role of HBx protein played in the development of primary hepatocellular carcinoma and the biological therapy strategy aimed at it [J]. World Chin J Digestol, 2005;13(4):432-439.

[11] 张 瑞，顾长海，张绪清，等.HBV 前 S1/S2 基因变异所致大、中、小蛋白的比例变化与肝细胞损伤的关系[J].中华肝脏病杂志，1999；7：146-148.

[11] Zhang R, Gui CH, Zhang XQ, et al. The relationship between the hepatocytes damage and the ratio change of the large,middle and small protein resulted from the pre-S1/S2 gene mutation[J]. Chin J Hepatol, 1999;7:146-148.

[12] Chalfie M. Green fluorescent protein [J].Photochem Photobiol, 1995;62(4):6512-6656.