DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.09.013
第25卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 9
774 2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)09-0774-04

丹参酮ⅡA抑制人肝癌细胞的生长及诱导其凋亡的实验研究

唐忠志,付立波,唐 瑛 (中国人民解放军广州军区武汉总医院医务部保健办,武汉 430070)

提 要:目的 研究丹参酮ⅡA对人肝癌细胞系BEL-7402的生长抑制及凋亡诱导作用。方法 0~10 μg/ml丹参酮ⅡA作用人肝癌细胞72 h后,用MTT比色法观察其细胞毒性,荧光显微镜、透射电镜检测细胞凋亡;流式细胞术(Flow cytometry, FCM)定量检测5 μg/ml丹参酮作用不同时间后的细胞凋亡率。结果 丹参酮ⅡA以剂量依赖的方式抑制肝癌细胞的生长,其IC_{50}值为6.28 μg/ml。1~10 μg/ml丹参酮ⅡA作用72 h后,肝癌细胞表现为细胞皱缩、核染色质浓缩、核碎裂、细胞出芽以及凋亡小体形成等凋亡特征性的形态学改变。流式细胞仪直方图上可见亚二倍体峰,5 μg/ml浓度作用12、24、36、48、72 h后的细胞凋亡率分别为(2.32±0.16)%、(3.01±0.35)%、(3.87±0.43)%、(6.73±0.58)%和(20.85±1.74)%,与对照组(1.07±0.13)%比较均有显著性差异。结论 在体外丹参酮ⅡA能诱导人肝癌细胞系BEL-7402凋亡,这可能为丹参酮ⅡA抑制其生长的机制。

关键词:丹参酮ⅡA;肝癌细胞系;细胞凋亡;流式细胞术
中图法分类号:R285.6;R730.53;R735.7 文献标识码:A

Inhibition of growth and induction of apoptosis in human hepatoma cell line by tanshinone ⅡA

TANG Zhong-zhi, FU Li-bo, TANG Ying (Wuhan General Hospital, Guangzhou Command of PLA, Wuhan 430070, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of tanshinone ⅡA on growth and apoptosis in human hepatoma cell line BEL-7402 *in vitro*. **Methods** The human hepatoma cell line BEL-7402 was treated with tanshinone ⅡA at various concentrations for 72 h. Cytotoxicity was evaluated by MTT assay, apoptosis-related alterations in morphology ascertained by cytochemical staining (Hoechst 33258) and transmission electron microscopy (TEM). Apoptotic rate was quantified by flow cytometry (FCM). **Results** Tanshinone ⅡA inhibited the growth of hepatoma cells in a dose-dependent manner, with IC_{50} values of 6.28 μg/ml. After treatment with 1~10 μg/ml tanshinone ⅡA for 72 h, BEL-7402 cell apoptosis with nuclear chromatin concentration and fragmentation as well as cell shrinkage and the formation of apoptotic bodies were observed. FCM analysis showed hypodiploid peaks on histogram and the apoptotic rates at 5 μg/ml concentration for 12, 24, 36, 48 and 72 h were (2.32±0.16)%, (3.01±0.35)%, (3.87±0.43)%, (6.73±0.58)% and (20.85±1.74)% respectively, which were all significantly higher than that of control group (1.07±0.13)%. **Conclusion** Tanshinone ⅡA can induce the apoptosis of human hepatoma cell line BEL-7402 *in vitro*, which may be related to the mechanism of growth inhibition of the human hepatoma cell line.

Key words: tanshinone ⅡA; hepatoma cell line; apoptosis; flow cytometry

丹参酮ⅡA是从中药丹参中提取的脂溶性有效成分,目前已发现其对多种肿瘤细胞具有生长抑制作用和分化诱导作用[1]。许多抗癌药物,包括中药[2,3],能以诱导细胞凋亡的方式抑制癌细胞生长,丹参酮能诱导HL-60细胞凋亡[4]。虽然已有研究表明丹参酮ⅡA对人肝癌细胞BEL-7402有生长抑制作用[5],但在诱导细胞凋亡方面国内外尚未见报道。本研究从丹参酮ⅡA诱导肝癌细胞BEL-7402凋亡的角度探讨其抑制癌细胞生长的机制,为丹参酮ⅡA的临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人肝癌细胞系BEL-7402(武汉大学中国典型培养物保藏中心提供),培养于含10%小牛血清、1×10^5 U/L

基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(2000J064)
作者简介:唐忠志(1966-),男,湖北省武汉市人,硕士,主治医师,主要从事中药在肿瘤治疗方面的研究,发表论文9篇。电话:(027)87879797-78122
收稿日期:2003-01-14;修回日期:2003-03-02

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

青霉素、链霉素的 RPMI1640 培养液中, 37 ℃, 5%CO_2 培养箱内常规传代培养。

1.1.2　试剂　　丹参酮ⅡA(Tanshinone ⅡA)为中国药品生物制品检定所的标准品, 用二甲亚砜 (DMSO)溶解, 终浓度为 0.02%(一般认为 DMSO≤0.1 %时, 不引起细胞生物学性状的改变), 4 ℃冷藏备用。RNase 酶、蛋白酶 K、碘化丙啶(PI)及 Hoechst 32258 荧光染色剂购于美国 Sigma 公司。RPMI1640 培养基、小牛血清、MTT 购自美国 Gibco 公司。

1.1.3　仪器　　BH-2 型荧光显微镜, 日本 Olympus 公司; Hitachi-600 型透射电镜, 日本日立公司; FACSort 流式细胞仪, 美国 Becton Dickinson 公司。

1.2　方法

1.2.1　细胞毒性实验(MTT 比色法)　　BEL-7402 细胞计数浓度 2×10^5 个/ml, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μl, 24 h 后, 换含药的新培养液, 终浓度为 0、0.5、1、2、5、10 μg/ml。设 0 μg/ml 为对照, 每浓度 8 个复孔, 作用 72 h 后, 加入新配制的 MTT 液, 置 37 ℃ CO_2 培养箱内培养作用 4 h, 加入二甲亚砜, 5 min 后, 用酶标仪于 490 nm 处测吸光度值(A)。取 8 孔平均值, 计算抑制率。根据公式: 细胞抑制率=(1−实验组 A 值/对照组 A 值)×100%。

1.2.2　荧光显微镜观察　　收集浓度为 0、0.5、2、10 μg/ml 的药物作用 72 h 的肝癌细胞, 甲醇/冰醋酸固定液固定 5 min 后, 加入荧光染液 hochest 33258 重悬细胞, 室温避光 1 h, 将细胞悬液滴 1、2 滴于载玻片上, 完全干燥后用甘油封片, 置 BH-2 荧光显微镜下观察并摄影。

1.2.3　透射电镜观察凋亡　　细胞培养于 T-25 培养瓶内, 经浓度为 0、1、5 μg/ml 的药物处理 72 h 后, 用刮刀将其从瓶底刮下, 3%戊二醛固定, 再用 1%锇酸固定, 逐级酒精脱水, 氧化丙烯浸透, 树脂包埋, 超薄切片机切片, 于透射电子显微镜下观察并摄影。

1.2.4　流式细胞仪检测　　收集经浓度为 5 μg/ml 丹参酮ⅡA 处理 0、12、24、36、48、72 h 后的细胞, 制成单细胞悬液, 离心弃上清, 沿管壁缓慢加入 70%预冷(−20 ℃)乙醇固定, 4 ℃过夜。上机检测前 RNA 酶消化, 再加入 PI 染色液, 4 ℃避光 30 min。采用 FACScort 流式细胞仪对样品进行检测, 每次计细胞数 6 000 个, 激发波长 488 nm, 分析软件 CellQuest 计算凋亡率。

1.3　统计学处理

实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 SPSS 11.0 软件进行 t 检验、相关回归分析。

2　结果

2.1　丹参酮ⅡA 对细胞生长的影响

见表 1, 不同浓度丹参酮ⅡA 作用细胞 72 h 后, 细胞生长受到抑制, 并且浓度与抑制率间呈现明显的依赖效应, 相关回归分析示两者呈正相关(r= 0.980, P< 0.01); 回归方程为 y(抑制率)= $0.06x_{浓度}+0.13$, 计算可得作用 72 h 的半数有效抑制浓度 IC_{50}= 6.28 μg/ml。各处理组间比较皆有显著性差异(P< 0.01)。

表 1　丹参酮ⅡA 对肝癌细胞生长的影响

Tab 1　Effects of tanshinone ⅡA on hepatoma cells

Concentration(μg/ml)	A_{490}(nm, $\bar{x}\pm s$)	Inhibition rate(%)
0	0.889±0.041	
0.5	0.812±0.032 *	9.42
1	0.698±0.035 **	21.36
2	0.627±0.030 **	30.54
5	0.512±0.033 **	42.71
10	0.262±0.036 **	70.72

r= 0.980, P< 0.01; *: P< 0.05, **: P< 0.01 *vs* control group

2.2　荧光显微镜观察结果

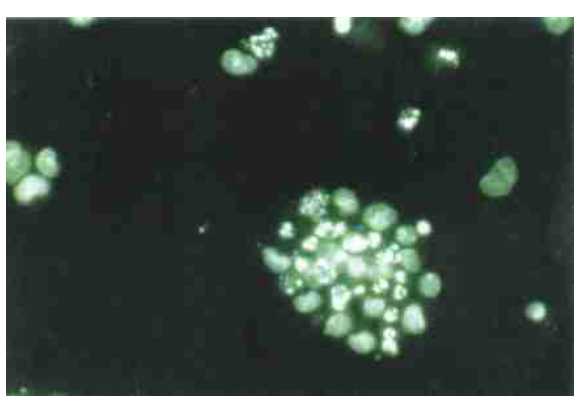
对照组细胞膜完整, 胞质丰富饱满, 见图 1; 而各处理组可见部分细胞膜皱缩, 细胞核发生浓聚并碎裂呈大小不等, 形似多边形、圆形或花瓣状的细胞碎片, 此即凋亡小体, 呈现典型的凋亡形态特征。随浓度增加凋亡细胞增多, 见图 2。



Control group: 0 μg/ml

图 1　丹参酮ⅡA 作用 72 h 后 BEL-7402 细胞凋亡的荧光显微镜检查结果　(×200)

Fig 1　Results by fluorescence microscopy for apoptosis induced by tanshinone ⅡA for 72 h　(×200)



Treated group: 10 μg/ml

图 2　丹参酮ⅡA 作用 72 h 后 BEL-7402 细胞凋亡的荧光显微镜检查结果　(×200)

Fig 2　Results by fluorescence microscopy for apoptosis induced by tanshinone ⅡA for 72 h　(×200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.3 透射电镜观察

经丹参酮ⅡA 5 μg/ml 处理后的细胞胞膜皱缩，胞质出芽，核膜皱缩，染色质固缩，发生碎裂，见图3。

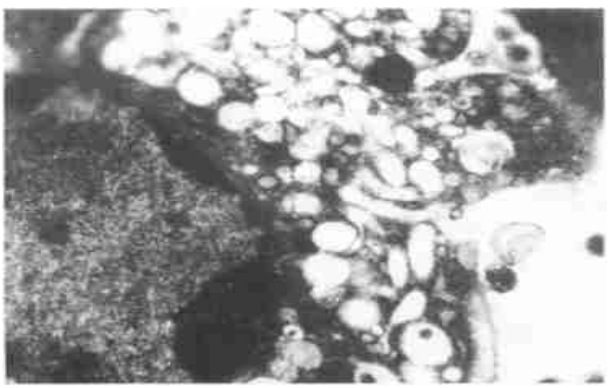


图3 5 μg/ml 丹参酮ⅡA 作用 72 h 后 BEL-7402 细胞凋亡改变 （TEM× 10 000）

Fig 3 Changes of BEL-7402 cells treated with 5 μg/ml tanshinone ⅡA for 72 h （TEM× 10 000）

2.4 流式细胞仪检测结果

DNA 直方图上可见亚二倍体峰。FCM 定量显示，5 μg/ml 丹参酮ⅡA 作用后，随时间的延长，凋亡细胞增多，与对照组比较，各处理组都有显著性差异（$P<0.05$），见表2。与 12 h 处理组比较，除 24 h 组外，都有显著性差异（$P<0.05$）。

表2 5 μg/ml 丹参酮ⅡA 作用不同时间对肝癌细胞凋亡的影响

Tab 2 Effects of 5 μg/ml tanshinone ⅡA on apoptotic rates of hepatoma cells at different time

Time (h)	Apoptotic rate ($\bar{x}\pm s$, %)
0	1.07±0.13
12	2.32±0.16 *
24	3.01±0.35 **
36	3.87±0.43 **△
48	6.73±0.58 **△△
72	20.85±1.74 **△△

*：$P<0.05$ **：$P<0.01$ *vs* control group；△：$P<0.05$ △△：$P<0.01$ *vs* 12 h group

3 讨论

自 1972 年 Kerr 等[6] 首先提出细胞凋亡的概念以来，随着对凋亡分子机制的逐步认识，人们发现诱导肿瘤细胞凋亡是一条有效的肿瘤治疗途径。迄今为止，已证实化疗药物、生长抑素类似物[7] 及多种中药成分[3] 都能以诱导细胞凋亡的方式抑制肿瘤细胞生长。

丹参酮ⅡA 是从活血化淤药丹参中提取的一种脂溶性成分，研究显示具有抗肿瘤活性，但其作用机制仍在进一步探讨中。本研究中，细胞毒性实验显示丹参酮ⅡA 对人肝癌细胞 BEL-7402 的生长增殖具有较强抑制作用，10 μg/ml 浓度时其抑制率达70%，且浓度与抑制率呈明显的依赖效应。72 h 时半数有效抑制浓度 $IC_{50}=6.28$ μg/ml，与李庆彦等[5] 报道的（5.96±2.46）μg/ml 相符。荧光显微镜和透射电镜示细胞凋亡形态学上的变化，可见细胞体积缩小，胞膜皱缩，核固缩，核染色质沿核膜浓缩边集，形成数个团块或境界分明的新月形小体，有的细胞核碎裂，形成由膜状物包裹内容物凋亡小体，从而证实丹参酮ⅡA 能诱导 BEL-7402 细胞凋亡。荧光显微镜下记数结果亦显示随浓度的增加细胞凋亡数增多，与细胞毒性实验结果一致。流式细胞仪检查发现典型的凋亡峰，丹参酮ⅡA 作用 48 h 前的凋亡发生率虽然较对照组有显著性差异，但凋亡率都较低，72 h 才是凋亡发生的高峰时期。此结果对丹参酮的应用有重要的指导作用。另外发现 5 μg/ml 丹参酮作用 72 h 后，细胞抑制率高于凋亡率，说明丹参酮ⅡA 除诱导细胞凋亡外，还有其它抑制细胞生长的方式。

现代遗传学和分子生物学研究表明：细胞凋亡的途径是高度保守的，且受基因调控。与其密切相关的基因有 p53、*bcl*-2、*bax* 等。p53 基因是促凋亡基因，当细胞 DNA 受损伤时，受损细胞启动一个转录信号使 p53 表达增加，引起细胞 G_1 期阻滞以修复损伤的 DNA，或启动凋亡以清除受损细胞。*bcl*-2 为重要的细胞凋亡抑制基因，而 *bax* 与 *bcl*-2 的作用恰恰相反，促进细胞凋亡，*bcl*-2 与 *bax* 调节细胞凋亡，不仅取决于自身表达的高低，还与 *bax*/*bcl*-2 的比率有关，当比率增大时，细胞趋于凋亡。丹参酮ⅡA 诱导肿瘤细胞凋亡的发生，可能与上述凋亡相关基因表达变化有关，从而在基因水平上调控细胞凋亡。其具体机制，尚有待于进一步研究。

肿瘤的发生和发展不仅与细胞的分化异常及增殖过度有关，而且与细胞凋亡的减少密切相关，而一旦细胞增殖与凋亡失控，则可导致肿瘤的发生[8]。因此，开发诱导肿瘤细胞凋亡的新药，成为肿瘤治疗的新方向。本研究将丹参酮ⅡA 作用于人肝癌 BEL-7402 细胞后，发现其能抑制癌细胞的生长，并能诱导其凋亡，这为传统中药在肿瘤治疗方面的研究和应用开拓了新的思路。

参考文献：

[1] Chang W L, Chen C F. Cytotoxic, activity of tanshinone against human carcinoma cell lines[J]. Am J Chin Med, 1991, 19(3): 207－212.

[2] 司维柯，张广运，马立强，等. 苦参碱对 $HepG_2$ 细胞系增殖能力的影响[J]. 第三军医大学学报，2000, 22(5): 451－458.

[3] 司维柯，陈 安，李 鹏，等. 苦参碱诱导人肝癌细胞系 $HepG_2$ 凋亡[J]. 第三军医大学学报，2001, 23(7): 816－820.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[4] 黄韧敏, 袁淑兰, 宋 毅, 等. 丹参酮ⅡA 诱导 HL-60 细胞凋亡[J]. 癌症, 1998, 17(3): 164—166.
[5] 李庆彦, 李春忠, 黄智武, 等. 3种丹参制剂对 BEL-7402 细胞和外周血干细胞生长的影响[J]. 实用癌症杂志, 2001, 16(5): 467—468.
[6] Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A H, *et al*. Apoptosis, a basic biological phenomenon with wider implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26(4): 239—257.
[7] 陈 华, 何振平, 马宽生, 等. 生长抑素类似物诱导人胆管癌细胞株凋亡及对胞内游离钙的影响[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(5): 588—590.
[8] Thompson C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. Science, 1995, 267(5203): 1456—1462.

（编辑　张大春）

文章编号: 1000-5404(2003)09-0777-02

个案与短篇

恶劣心境障碍患者听觉 P300 变化的临床研究

A clinical study of the effect of composite therapy on patients with dysthymic disorder

戴光明, 肖道宏, 张雪松, 代　芬　（第三军医大学附属新桥医院神经内科, 重庆 400037）

抑郁障碍发病率在世界范围内呈上升趋势, 随着我国的现代化, 生产和生活节奏的加速, 抑郁障碍发病率日渐增高, 其患病率占一般人群的 5.8%, 神经科住院病人的 22% ~ 33%。预测 2020 年, 造成伤残调整生命年(Disability-adjusted life year, DALY)减少的中国疾病负担中抑郁障碍排第二位[1]。抑郁障碍中绝大多数为恶劣心境障碍, 原称抑郁性神经症, 还包括人格障碍之抑郁类型[2], 是一种以持久心境低落状态为主的轻型抑郁, 由于其临床表现和治疗基本与抑郁症相同, 故在 CCMD-3 分类中已归于情感性精神障碍(心境障碍)。听觉事件诱发电位(P300)是反映被试者认知功能有价值的电生理指标, 既往多用于各种器质性脑部病变所引起的认知功能障碍的研究。近年已广泛应用于精神医学领域, 本研究拟探讨恶劣心境障碍患者(不含抑郁性人格障碍)综合治疗前后 P300 的变化。

1　资料与方法

1.1　临床资料

恶劣心境障碍患者 150 例, 男 54 例, 女 96 例。平均年龄 34.5 岁。病程(2.8±1.4)年。均符合 CCMD-3 恶劣心境障碍的诊断标准。治疗前和治疗 8 周末进行汉密顿抑郁量表(HAMD)、抑郁自评量表(SDS)和听觉 P300 测查。全部病例口服盐酸氟西汀(百忧解)20 mg/d, 共 8 周。伴焦虑和睡眠障碍者, 予阿普唑仑片 0.4 ~ 1.6 mg/d, 持续 1 ~ 3 周后渐减量至停药。极少数病人予小剂量倍他乐克或心得安以对抗交感神经过度兴奋症状。同时进行行为治疗(放松训练法), 患者自行放松训练治疗 2 次/d, 每 1 ~ 2 周指导、检查 1 次。应用丹麦 DISA 产 Evomatic-4000 型诱发电位仪。按照国际脑电学会规定的 10/20 系统安置电极、进行常规 P300 检查。

应用上海惠诚咨询有限公司的"心理测试电脑软件系统"对 150 例恶劣心境障碍患者治疗前、后分别进行 HAMD 和 SDA 测定。

1.2　统计学处理

所有资料均采用 SPMR 统计软件进行统计处理。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本比较采用 t 检验。

2　结果

见表 1, 治疗后患者 SDS 和 HAMD 测评总分均明显降低, 和治疗前相比相差非常显著; 同时听觉 P300 潜伏期亦明显缩短、波幅增高, 和治疗前比较, 亦达到显著性水平。

表 1　150 例恶劣心境障碍患者治疗前后抑郁程度和 P300 变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

	SDS 总分	HAMD 总分	P300 潜伏期(ms)	P300 波幅(μv)
治疗前	55.1±9.1	30.8±6.8	355.0±20.3	6.9±3.9
治疗后	32.1±6.7*	15.2±5.7*	328.3±24.8*	28.7±4.5*

*: $P < 0.01$ 与治疗前比较

3　讨论

3.1　恶劣心境障碍患者的 P300 改变

结果显示恶劣心境障碍患者治疗前不仅 SDS 和 HAMD 总分增高, 而且 P300 潜伏期延长、波幅低, 和近年研究抑郁病人的事件相关电位与正常对照组有显著差异的发现一致。

人类认知功能除了与年龄、智力智商[3]、社会实践、文化程度等关系密切外, 还与精神情绪相关, 后者又构成人的情感智商。精神情绪能通过下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)、下丘脑-垂体-甲状腺轴(HPT)和下丘脑-垂体-生长素轴(HPG)[4]调控人们的生理机能(含智力行为等)。恶劣心境障碍患者长期处于持续情绪低落、紧张焦虑、缺乏内在动力状态, 以致大脑皮层对各种刺激信息的注意、理解、判断、分析、记忆等认知加工过程减弱而出现听觉 P300 潜伏期延长。同理 P300 波幅发生机制复杂, 影响因素众多, 但仍与精神情绪密切。本研究发现恶劣心

（下转 781 页）

作者简介: 戴光明(1950—), 女, 山西省孟县人, 主任医师, 教授, 主要从事脑血管疾病和轻型精神障碍等方面的研究。电话: (023)65200499

收稿日期: 2002-07-19; 修回日期: 2002-12-29

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net