DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.030
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
816 2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)07-0816-05

苦参碱诱导人肝癌细胞系 $HepG_2$ 凋亡的研究

司维柯,陈 安,李 鹏,刘 斌,高利宏,姚 婕 (第三军医大学医学检验系临床生物化学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察苦参碱是否能诱导人肝癌细胞系 $HepG_2$ 凋亡及凋亡相关基因的变化。方法 0~3.0 g/L 苦参碱处理 $HepG_2$ 细胞,光镜和电镜下观察细胞形态;TUNEL 法原位检测 DNA 断裂;流式细胞仪检测凋亡峰;AnnexinV-FITC/PI 双标记检测早期凋亡;免疫组化和原位杂交法检测 wp53,bcl-2,bax,c-myc,Fas 等凋亡相关基因的表达,采用真彩色图像分析仪定量检测。结果 1.5~3.0 g/L 苦参碱可诱导 $HepG_2$ 凋亡,并且使凋亡相关基因 wp53,bax,Fas 表达上调,而抗凋亡基因 bcl-2,c-myc 表达下调。结论 一定浓度的苦参碱可诱导人肝癌细胞 $HepG_2$ 凋亡,并且该凋亡与凋亡相关基因表达增强和抗凋亡相关基因表达减弱有关。

关键词:苦参碱;肝细胞癌;凋亡
中图法分类号:R284.1;R730.23;R735.7 文献标识码:A

Study on apoptosis of human hepatoma cell line $HepG_2$ induced by matrine

SI Wei-ke, CHENG An, LI Peng, LIU Bing, GAO Li-hong, YAO Jie (Department of Clinical Biochemistry, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the apoptosis of human hepatoma cell line $HepG_2$ induced by Matrine and to investigate the changes of apoptosis-associated genes. Methods $HepG_2$ cells were treated with 0-3.0 g/L matrine for 3 days, and observed under optical-microscope and electron microscope. DNA break was detected with TUNEL *in situ* assay, the apoptosis peaks were detected with flow cytometry, the early stage apoptosis was detected with Annexin V-FITC/PI double labelled assay, the expression of apoptosis-associated genes wp53, bcl-2, c-myc, bax and Fas were detected with immunohistochemical technique and *in situ* hybridization, all results were quantitatively analyzed with high-fidelity colored picture dissector. Results 1.5-3.0 g/L Matrine could induce $HepG_2$ apoptosis and up-regulate the expression of apoptotic genes wp53, bax, Fas and down-regulate the expression of anti-apoptotic genes bcl-2, c-myc. Conclusion Matrine in certain concentrations can induce apoptosis of $HepG_2$ cell and the apoptosis is related to the up-regulation apoptotic genes and down-regulation of anti-apoptotic genes.

Key words: matrine; hepatocellular carcinoma; apoptosis

苦参碱是中药苦参的化学成分之一,是抗肿瘤的活性成份,以往的研究表明在体外它可诱导 K_{562} 细胞向红系和粒系分化[1,2];可抑制鼠移植性肿瘤生长和诱导 SMMC-7721 细胞分化[3]。在体内,苦参及其生物碱也有抗肿瘤的报道,并且可治疗肝炎,毒副作用小,还能提高免疫力,故可能发展成为很好的抗癌新药。作者近来的研究表明:苦参碱可有效的抑制人肝癌细胞株 $HepG_2$ 的增殖[4,5] 并在细胞水平、代谢水平和基因水平上均诱导了细胞分化(见另篇报道),为进一步研究其抑制 $HepG_2$ 增殖的机制,为临床应用苦参碱诱导治疗肿瘤打下基础。作者进行了苦参碱诱导 $HepG_2$ 凋亡及相关基因变化的研究,目前国内外尚未有苦参碱诱导肿瘤细胞凋亡的报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 $HepG_2$ 细胞株,由重庆医科大学附二院肝炎研究所提供,并在含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中,37 ℃,5% CO_2 条件下培养。

1.1.2 试剂 苦参碱注射液(商品名:斯巴德康)10 g/L,5 ml/支,购自广州明兴制药厂,批号 980304。RPMI-1640 培养基和胰酶均为 GIBCO 产品。TUNEL 检测试剂盒为 德国 Boehinger Mannheim 公司产品。Annexin-V 试剂盒为法国国际免疫公司产品。p53、bax、bcl-2、c-myc、Fas 免疫组化和原位杂交试剂盒为博士德公司产品。

1.1.3 仪器 JEM-2000EX 透射电镜,AMRAY 1000B 扫描电镜,MD20 型真彩色图像分析仪,FACS 400 型流式细胞仪检测凋亡峰,COULTER ESP 型流式细胞仪检测细胞早期凋亡。

1.2 方法

1.2.1 细胞形态观察

光镜下形态:细胞预培养 6~12 h,细胞贴壁后更换新培养液并加苦参碱至终浓度为 1.5~3.0 g/L,培养 1~3 d,倒置显微镜下观察,悬浮细胞涂片,贴壁细胞取出载片干燥后 Wright's 染色,光学显微镜下观察。

电镜下形态:细胞培养同上,细胞离心后,4 ℃、3%的戊二醛固定细胞 2~4 h,1% 锇酸后固定,系列乙醇-丙酮脱水,环阳树脂包埋,常规制作切片,电子染色,60 kV 下观察。

1.2.2 原位检测 DNA 断裂 细胞培养在含 1.5、2.0 g/L 苦参碱的培养液中,3 d 后取出培养的载片用 PBS(pH 7.4 10 mmol/L)洗 2 次;悬浮细胞离心后,用 PBS 洗 2 次,涂片,干燥。用新鲜配制的 4%多聚甲醛固定细胞,室温 30 min,其余按 TUNEL 检测试剂盒说明书进行。

1.2.3 流式细胞仪检测凋亡峰

作者简介:司维柯(1958-),女,山西省晋城市人,博士,讲师,主要从事肿瘤细胞增殖调控及肝胆疾病实验室诊断方面的研究,发表论文 20 篇。电话:(023)68752314

收稿日期:2001-03-10;修回日期:2001-06-10

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

1.2.3.1　试剂　　PI 染色液(PI 100 g/L, 1.0% Triton X-100, 9 g/L NaCl); 1 g/L RNase A; 预冷的 70% 乙醇; 10 mmol/L PBS, pH 7.2。

1.2.3.2　标本预处理　　细胞分别培养在含苦参碱 0、0.8、1.5、2.0 g/L 的培养液中, 72 h 后收集细胞并制成 1×10^6/ml 的细胞悬液, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, PBS 洗 2 次后再将细胞调整为 1×10^6/ml。70% 的乙醇固定(按 1∶4 的比例)充分混匀, 待检。

1.2.3.3　荧光染色上机检测　　用 PBS 洗去固定液, 加 200 μl RNaseA, 37 ℃水浴 30 min, 再加 800 μl PI 染色液混匀, 4 ℃避光 30 min, 上机检测。

1.2.4　Annexin-V-FITC/PI 双标记法检测细胞早期凋亡

1.2.4.1　细胞培养　　细胞分别培养在含苦参碱 0、1.5、2.0、3.0 g/L 的培养液中, 6、12 h 后收集细胞并尽快分析。

1.2.4.2　荧光染色　　细胞用 PBS 洗 1 次, 4 ℃, 500× g, 离心 5 min, 再用稀释的 Binding 缓冲液(稀释 10 倍, 试剂盒中提供)洗 1 次。加稀释 Binding 缓冲液调细胞浓度为 $10^5\sim 10^6$/ml, 加稀释的 Annexin-V-FITC 溶液 5 μl 和 PI 染液 5 μl, 混匀, 冰浴中避光放置 10 min, 上机检测。

1.2.5　检测凋亡相关基因表达　　免疫组化法检测 wp53、bcl-2、bax、c-myc、Fas 蛋白的表达。

1.2.5.1　细胞培养　　1×10^5/ml 细胞悬液于放有载片的培养皿中, 培养在含苦参碱 0.8、1.5 g/L 的培养液中, 3 d 后 PBS 洗悬浮细胞和载片上的细胞 3 次, 悬浮细胞涂片, 干燥后, 4 ℃丙酮固定细胞 20~30 min, 自然干燥后作免疫组化。

1.2.5.2　免疫组化　　按操作说明书进行。阳性细胞为胞浆或/和核染为黄色或棕黄色, 阴性细胞不着色。

1.2.5.3　图像分析和统计处理　　真彩色图像分析仪上测定 50 个细胞的表面积 Area 和阳性色的积分光密度值 IOD, 求出每个细胞单位面积的光密度值即 $IOD/\mu m^2$, 用平均 $IOD/\mu m^2$ 反应蛋白质的量。用 Microsoft-Excel 软件统计学分析(单因素方差分析), 比较对照组细胞和试验组细胞间差异有无显著性。

1.2.6　原位杂交检测 wp53、bcl-2、bax、c-myc mRNA 的表达

1.2.6.1　玻片处理　　载片洗液浸泡 24 h, 自来水、蒸馏水充分洗涤, 沥干后, 95% 酒精浸泡 24 h, 烘干, 15 磅高压灭菌 20 min, 其它器械用品如镊子、玻片、微量吸头等均高压消毒, 以灭活 RNA 酶。所用试剂均用含有 1/1 000 DEPC 的蒸馏水配制, 以防止 RNA 酶对 mRNA 的降解。

1.2.6.2　细胞培养　　与免疫组化实验中细胞培养相同, 只是用上述处理的载片培养细胞, 操作时注意防止 RNA 酶污染。

1.2.6.3　原位杂交实验　　用含 1/1000 DEPC 的 0.1 mol/L PBS (pH 7.4)洗载片 3 次, 4% 多聚甲醛液固定细胞, 室温 30 min, 蒸馏水洗, 其余按操作说明书进行。实验采用地高辛标记的寡核苷酸作探针, 其中 wp53 基因的表达同时采用了寡核苷酸和cDNA两种探针进行原位杂交检测。

2　结果

2.1　细胞形态观察

2.1.1　光镜形态　　1.5~3 g/L 苦参碱作用 $HepG_2$ 细胞, 随苦参碱浓度和作用时间增加悬浮细胞增多, 并且细胞体积缩小变圆。苦参碱浓度达 2.0 g/L 和 3.0 g/L 时培养 3 d, 悬浮细胞几乎达 100%。涂片 Wright's 染色, 见细胞有浆浓缩、核浓缩和核碎裂现象, 类似凋亡细胞[9]。

2.1.2　电镜下形态　　透射电镜下, 1.5 g/L 苦参碱作用细胞 3 d, 形态似凋亡细胞, 表现为: 核浓缩、核碎裂, 胞浆出现自噬体和少量空泡, 胞浆有出芽并包裹有核向外突起, 并且细胞表面微绒毛消失, 见图 1。

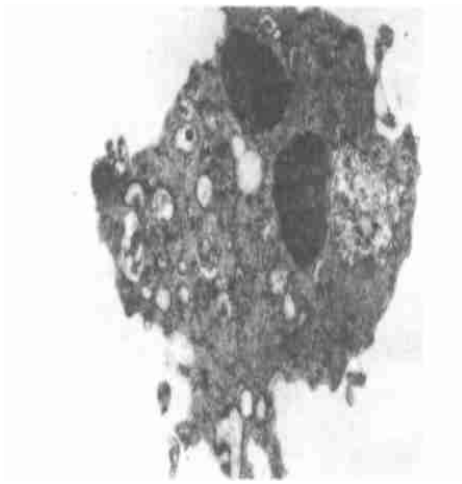


图 1　透射电镜下苦参碱诱导 $HepG_2$ 细胞凋亡 (TEM× 4 000)

Fig 1　Apoptosis of $HepG_2$ cell after matrine treatment (TEM× 4 000)

2.2　原位检测 DNA 断裂

显微镜下计数染棕黄色的阳性细胞百分率, 计数 3 次取平均值。随着苦参碱浓度增加, 阳性细胞增多, 特别是苦参碱大于 1.5 g/L 时, 增多明显。

2.3　流式细胞仪检测凋亡峰

未用药时, 凋亡细胞仅占 1.44%, 并且未出现凋亡峰。当 0.8、1.5、2.0 g/L 苦参碱处理细胞 3 d 后均出现了凋亡峰(亚二倍体峰), 凋亡细胞百分率为 10.57%、16.37%、10.85%。2.0 g/L苦参碱时, 凋亡细胞减少, 可能与同时出现细胞坏死或 G_2/M 期出现了凋亡细胞有关, 因该方法仅能检查出 G_1 期凋亡的细胞, 见图 2。

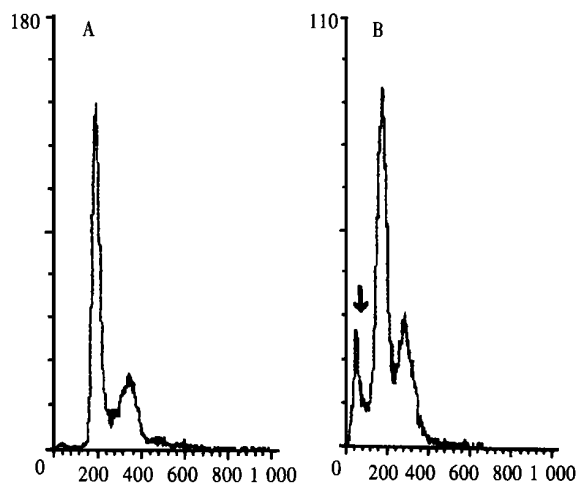


图 2　苦参碱诱导 $HepG_2$ 细胞凋亡的凋亡峰(→)

Fig 2　Apoptotic peaks (→) of $HepG_2$ cells after matrine treatment

A: Control (0 g/L); B: 1.5 g/L

2.4　Annexin-V-FITC/PI 双标记法检测细胞早期凋亡

苦参碱为 2.0 g/L 作用 6 h, 即出现了凋亡细胞, 达 7.7%。1.5 g/L 时, 作用 12 h 才出现凋亡细胞, 达 8.6%。3.0 g/L 作用 12 h, 达 15.7%, 同时坏死细胞增多, 达 21.9%, 见图 3。

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

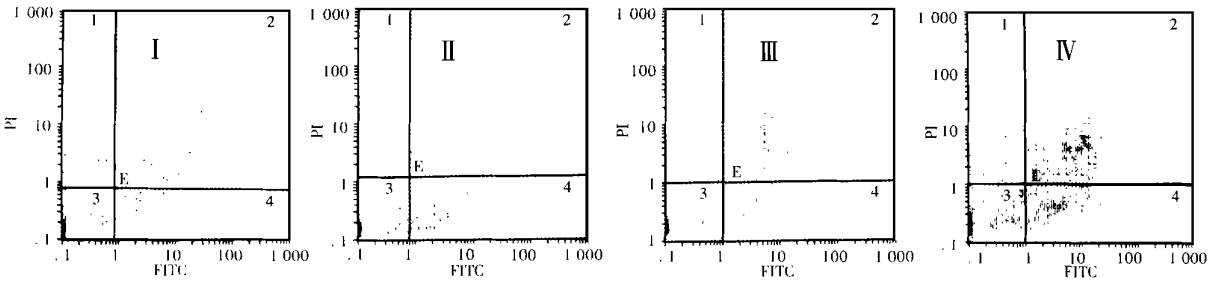


图 3 Annexin V-FITC/PI 双标记法检测苦参碱处理 $HepG_2$ 细胞早期凋亡

Ⅰ：未处理的 $HepG_2$ 细胞培养 12 h；Ⅱ：1.5 g/L 苦参碱处理 $HepG_2$ 细胞 12 h；Ⅲ：3.0 g/L 苦参碱处理 $HepG_2$ 细胞 6 h；Ⅳ：3.0 g/L 苦参碱处理 $HepG_2$ 细胞 12 h

Fig 3 Early stage apoptosis detected with Annexin V-FITC/PI double labelled assay in matrine-treated $HepG_2$ cells

Ⅰ: Untreated $HepG_2$ cells (12 h); Ⅱ: 1.5 g/L matrine-treated $HepG_2$ cells (12 h); Ⅲ: 3.0 g/L matrine-treated $HepG_2$ cells (6 h); Ⅳ: 3.0 g/L matrine-treated $HepG_2$ cells (12 h)

2.5 检测凋亡相关基因表达

免疫组化法检测 wp53、bcl-2、bax、c-myc、Fas 蛋白的表达。用药后 wp53、bax、Fas 蛋白的表达增加；bcl-2、c-myc 蛋白表达减弱，特别是 2.0 g/L 时 bcl-2 蛋白表达降低明显。结果见表 1，图 4～7。

表 1 苦参碱作用 $HepG_2$ 细胞时相关凋亡基因蛋白的表达（IOD/μm^2）

Tab 1 Expression of apoptosis-associated protein in matrine-treated $HepG_2$ cells (IOD/μm^2)

Matrine (g/L)	wp53	bcl-2	bax	c-myc	Fas
Control (0)	0	0.494±0.06	0.251±0.04	0.37±0.01	0.265±0.05
0.8	0.157±0.02 **	0.318±0.04 *	0.387±0.03 *	0.31±0.06 *	0.309±0.04 *
1.5	0.254±0.04 **	0.268±0.05 **	0.558±0.06 **	0.265±0.04 *	0.456±0.04 **

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

2.6 原位杂交检测 wp53、bcl-2、bax、c-myc mRNA 的表达

阳性细胞为胞浆或/和核染为蓝色（用蓝色 DAB 显色试剂盒显色），阴性细胞不着色。随着苦参碱作用浓度增加，wp53 无论用 p53 的寡核苷酸探针还是 p53 cDNA 探针进行原位杂交，均检测到其 mRNA 表达增强；bax 基因 mRNA 表达也增加。bcl-2、c-myc mRNA 的表达降低，说明苦参碱诱导 $HepG_2$ 凋亡，可能与凋亡抑制基因 bcl-2 被下调，促凋亡基因 bax 被上调有关，并且凋亡可能与 Fas 通路有关。这些机制均可能与 wp53 基因的激活有关。见表 2，图 8～11。

表 2 苦参碱作用于 $HepG_2$ 细胞时相关凋亡基因 mRNA 的表达（IOD/μm^2）

Tab 2 Expression of apoptosis-associated gene mRNA in matrine-treated $HepG_2$ cells (IOD/μm^2)

Matrine (g/L)	wp53		bcl-2	bax	c-myc
	p53	p53cDNA			
Control (0)	0.418±0.11	0.222±0.023	0.407±0.10	0.317±0.10	0.827±0.09
0.8	0.489±0.06 *	0.289±0.08 **	0.351±0.04 *	0.345±0.07 *	0.756±0.09 **
1.5	0.508±0.09 *	0.511±0.12 **	0.175±0.04 **	0.30±0.12 **	0.589±0.14 **

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

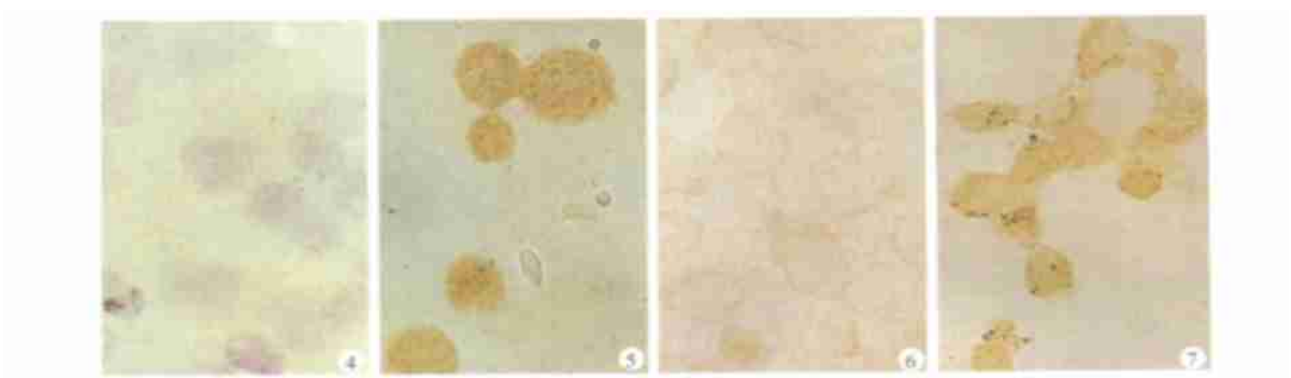


图 4 未处理的 $HepG_2$ 细胞 p53 免疫细胞化学染色 (S-P× 400)

Fig 4 Immunocytochemistry staining of p53 in untreated $HepG_2$ cells (S-P× 400)

图 5 1.5 g/L 苦参碱处理 $HepG_2$ 细胞 p53 免疫细胞化学染色 (S-P× 400)

Fig 5 Immunocytochemical staining of p53 in 1.5 g/L matrine treated $HepG_2$ cells (S-P× 400)

图 6 未处理的 $HepG_2$ 细胞 bax 免疫细胞化学染色 (S-P× 400)

Fig 6 Immunocytochemical staining of bax in untreated $HepG_2$ cells (S-P× 400)

图 7 1.5 g/L 苦参碱处理 $HepG_2$ 细胞 bax 免疫细胞化学染色 (S-P× 400)

Fig 7 Immunocytochemical staining of bax in 1.5g/L matrine treated $HepG_2$ cells (S-P× 400)

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

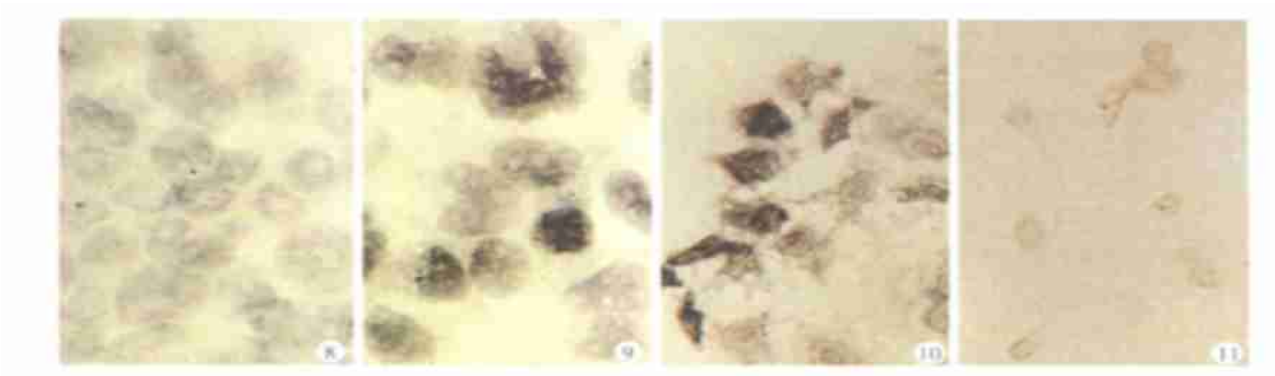


图 8　未处理的 $HepG_2$ 细胞 p53 原位杂交实验　(寡核苷酸作探针× 400)

Fig 8　*In situ* hybridization staining of p53 mRNA in untreated $HepG_2$ cells　(oligoprobe serves as probe× 400)

图 9　1.5 g/L 苦参碱处理的 $HepG_2$ 细胞 p53 的原位杂交实验　(寡核苷酸作探针× 400)

Fig 9　*In situ* hybridization staining of p53 in 1.5g/L matrine treated $HepG_2$ cells　(oligoprobe serves as probe× 400)

图 10　未处理的 $HepG_2$ 细胞 bcl-2 原位杂交实验　(× 400)

Fig 10　*In situ* hybridization staining of Bcl-2 in untreated $HepG_2$ cells　(× 400)

图 11　1.5 g/L 苦参碱处理的 $HepG_2$ 细胞 Bcl-2 的原位杂交实验　(× 400)

Fig 11　*In situ* hybridization staining of bcl-2 in 1.5 g/L matrine treated $HepG_2$ cells　(× 400)

3　讨论

中药抗肿瘤作用除了与特定药物性质有关外, 还与药物浓度和作用时间有关, 并且不同的肿瘤细胞对同种抗癌药物的反应不一, 如苦参碱 0.1 g/L 时能抑制 K_{562} 细胞增殖并诱导其分化[5]; 0.2 g/L 能诱导 SMMC-7721 细胞分化[7]。而作者以往的研究表明: 苦参碱小于 0.3 g/L 时对 $HepG_2$ 无抑制作用, 0.8 g/L 时, 作用3 d, 细胞存活率为 50%, 并且以细胞分化为主; 大于 1.5 g/L, 以诱导凋亡为主; 大于 3.0 g/L, 以细胞坏死为主[4~6]。诱导分化、凋亡、坏死均为肿瘤细胞生长抑制的方式, 而在临床上, 这些抑制方式对肿瘤治疗有指导意义。如诱导分化, 对正常细胞杀伤小, 安全, 但因存在"反分化现象", 故可能存在复发与耐药问题[8,9]。诱导凋亡, 药物用量比诱导分化大, 对正常细胞可能有影响, 但细胞凋亡属不可逆死亡, 不存在复发, 能彻底治愈癌症并可解决耐药问题[10]。而细胞坏死, 一般药物用量大, 正常细胞也被杀伤, 并且坏死产生的物质会引起炎症反应而进一步破坏周围组织, 故在治疗中应避免这种现象发生, 故目前诱导凋亡治疗肿瘤日益受到重视。

本研究采用了 4 种方法检测凋亡, 较肯定的证明了一定浓度的苦参碱可诱导 $HepG_2$ 细胞凋亡。苦参碱为 1.5 g/L 时作用 12 h 即出现了 8.6%凋亡细胞; 3.0 g/L 作用 6 h 凋亡细胞达 12.6%; 作用 12 h 达 15.7%, 同时坏死细胞增多, 达 21.9%。说明凋亡、坏死相伴存在, 呈剂量和时间依赖性。同时检测了凋亡相关基因 wp53, c-myc, bcl-2, bax 和 Fas 受体的表达。$HepG_2$ 细胞具有野生型的 p53 基因, 为弄清苦参碱是否诱导了 wp53 基因的表达, 分别采用了 p53 的寡核苷酸探针和 p53 cDNA 探针进行原位杂交检测 wp53 mRNA, 两种探针检测结果均显示: 随苦参碱浓度增加, wp53 mRNA 表达增强。证实了苦参碱可诱导抑癌基因wp53 mRNA 表达。周小舟等[7] 也报道"抗癌方"诱导了 $HepG_2$ 细胞 p53 蛋白的表达, 这也许是某些抗癌药物抑制肿瘤细胞生长的机制之一。wp53 与凋亡有关, 除了介导 p21(WAF)通路外, 可通过尚未完全阐明的机制诱导凋亡, 如 wp53 表达增加可激活 bax 基因, 抑制 bcl-2 基因, 从而改变 bcl-2/bax 比例而致细胞凋亡。wp53 有上调 Fas 表达的功能, 1998 年 Muller 报道, Bleomycin 处理 $HepG_2$ 细胞后, 导致核中 wp53 的积聚和细胞表面 Fas 的表达。而在无 wp53 基因或为突变型 p53 基因的肝癌细胞株中却不能上调 Fas 的表达, 推测可能 wp53 激活并调节 Fas 受体基因的转录因子。Sheard 等[11] 采用分步照射具有功能性 p53 的肿瘤细胞, 发现均诱导并延长了 Fas 的表达, 而在含突变型 p53 的肿瘤细胞株中却没有 Fas 的上调。这些均说明 Fas 受体的表达与 wp53 基因有关。并且认为药物引起的细胞毒作用, 是 Fas 介导凋亡的普遍现象[12]。高表达 Fas 受体的细胞易接受死亡信号而凋亡, 而大多数良性肿瘤的 Fas 表达水平略低于正常组织, 而恶性肿瘤的 Fas 表达显著下降或丢失, 发生转移的恶性肿瘤, Fas 表达将完全丧失[13]。已证明一些药物诱导肿瘤细胞的 Fas 表达, 是药物杀伤癌细胞的机制之一, 如顺铂、阿霉素等使 Fas 上调并可能克服癌细胞的耐药性。bcl-2 与 Fas 关系, 研究表明, bcl-2 可干扰 wp53 和 Fas 系统。在外周淋巴细胞和激活的外周血 T、B 细胞中, bcl-2 的表达下降, 而 Fas 表达却上调, 提示 bcl-2 与 Fas

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

是一对具有相反作用的分子，即bcl-2具有抑制Fas介导的凋亡作用。

本研究中苦参碱诱导$HepG_2$细胞凋亡时，wp53，bax mRNA和蛋白表达均增加，Fas蛋白表达也增加，而bcl-2 mRNA和蛋白表达均减弱，表明苦参碱可能诱导了wp53的表达，从而激活了bax基因，抑制了bcl-2基因；并且wp53还可能诱导了Fas的表达，最终导致细胞凋亡。

参考文献：

[1] 司维柯，韩 风，秦建平，等. 苦参提取液诱导K_{562}细胞分化的细胞化学观察[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志，1997，6(2)：200－205.

[2] Zhang Y, Jiang J K, Liu X S, *et al*. Differentiation and apoptosis in K_{562} erythroleukemia cells induced by matrine[J]. Nat Med, 1998, 52(4): 295－299.

[3] 张燕军，夏 天，赵建斌. 苦参碱对SMMC-7721细胞系的诱导分化作用[J]. 第四军医大学学报，1998，19(3)：340－343.

[4] 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.

[5] 司维柯，肖桃元，康格非. 苦参碱对人肝癌细胞$HepG_2$的细胞形态影响和相关增殖因素的变化[J]. 第三军医大学学报，2000，22(6)：553－556.

[6] 司维柯，潘 静，陆 华. 苦参碱抑制$HepG_2$细胞增殖及其剂量与抑制方式关系的研究[J]. 世界华人消化杂志，2001，9(2)：185－189.

[7] 周小舟，郭振球. 抗癌方对$HepG_2$人肝癌细胞株p53蛋白表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志，1999，5(3)：21－23.

[8] Katherine P P. Analysis of liver development, regeneration, and carcinogenesis by genetic marking studies[J]. FASEB J, 1996, 674(10): 673－682.

[9] Malcolm A, Catherine S. Hepatic stem cells[J]. J Hepatology, 1998, 29(3): 676－682.

[10] Hidetsugu S, Hirotoshi E, Masahiko T, *et al*. Loss of butyrate-induced apoptosis in human hepatoma cell lines HCC-M and HCC-T having Substantial bcl-2 expression[J]. Hematology, 1998, 27(5): 1 233－1 240.

[11] Sheard M A, Krammer P H, Zaloudhk J. Fractionated γ-irradiation renders tumour cells more responsive to apoptotic signals through CD95[J]. Br J Cancer, 1999, 80(11): 1 689－1 696.

[12] Martina M, Susanne S, Hubert H, *et al*. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/Ligand system and involves activation of Wild-type p53[J]. J Clin Invest, 1997, 99(3): 403－413.

[13] Ieithauser F, Dhein J, Mechtershimer G, *et al*. Constitutive and induced expression of Apo-1, A new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells[J]. Lab Invest, 1993, 69(4): 415－429.

（编辑 汪勤俭）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2001)07-0820-01

黛安神治疗慢性天天头痛

Treatment of chronic daily headache with DaiAnShen

邵淑琴，史树贵 （第三军医大学附属西南医院神经内科，重庆 400038）

慢性天天头痛(Chronic daily headache, CDH)[1]是临床实践中经常遇到的一种综合征。我们采用联合用药治疗30例CDH患者，报告如下。

1 资料与方法

1998年10月至1999年10月在门诊筛选CDH病人42例，病程1年以上，除外癫痫、脑血管病、颅内占位性病变，长期服用头痛粉、散利痛、川芎素等效差；其中12例在观察期间失访，余30例中慢性紧张性头痛17例，偏头痛变异型9例，持续性半侧头痛4例；男2例，女28例，年龄27～55岁，平均41.6岁。30例患者均无神经系统定位体征，颈椎片与头颅CT检查正常，EEG轻度异常7例，TCD血流速度异常5例。服药前后行抑郁自评量表(SDS)评分。服药方法：必理通1片，2～3/d，1～2周；川芎素2片，3/d；黛安神2片，每晨1片，观察8周。

作者简介：邵淑琴(1941－)，女，辽宁省绥中县人，主任医师，教授，主要从事脑血管性疾病、癫痫和头痛等方面的研究，发表论文30余篇。电话：(023)68754391

收稿日期：2000-03-08；修回日期：2000-09-10

2 结果

头痛发作减少50%以上为有效。用药后2、4、6、8周的疗效分别为76.7%、86.7%、93.3%、96.7%。用药前SDS评分，40～45分17例，45～50分13例。用药后25～30分18例，31～35分5例，36～40分7例，用药前后差别显著($P<0.01$)。副作用：口干2例，心神不定4例，于第3周消失。

3 讨论

CDH是门诊的常见病之一，多次门诊，多次用药，常无满意效果。主要原因一是长期服用止痛药，易产生耐受性，二是常合并有抑郁或焦虑。抑郁或焦虑的程度与头痛的严重程度一致，且也是头痛发作的重要诱因。所以除治疗头痛外，还应治疗抑郁和焦虑。

我们采用联合治疗方案：服用必理通、川芎素的同时，联合服用黛安神。取得了明显的效果。必理通系对乙酰胺基酚，通过作用于中枢和外周产生止痛作用，对胃无刺激。川芎素具有活血行气，祛风止痛、缓解血管痉挛、抗血小板聚集的功能，对

（下转823页）

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