DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.06.018
第22卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 6
2000年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2000

文章编号:1000-5404(2000)06-0553-04

论著

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

司维柯[1],肖 桃元[2],康格非[3] (第三军医大学:[1]医学检验系临床检验教研室;[2]高原军事医学系中心实验室,重庆 400038;[3]重庆医科大学临床生物化学教研室,重庆 400046)

提 要:目的 观察苦参碱作用于 $HepG_2$ 细胞后,光镜和电镜下细胞形态结构改变以及 AFP、PCNA 和分裂指数的变化。方法 倒置显微镜下观察活细胞形态;光镜下观察 Wright 和苏丹Ⅲ染色的细胞形态和分裂指数;扫描和透射电镜观察细胞表面和内部超微结构改变;免疫组化和图像分析,检测 AFP 和 PCNA。结果 未用药细胞具有肿瘤细胞典型的形态特征,细胞的分裂指数为 53.8‰,胞浆内未见透明颗粒和空泡,苏丹Ⅲ染色为阴性。免疫组化染色 AFP 和 PCNA 为阳性。苦参碱处理细胞后,细胞数量减少,散在生长,形态呈多形性,细胞浆内充满圆形、透明的颗粒。Wright 染色,细胞浆呈空泡状,细胞核变小,核浆比减小,核仁变小、数目减少,细胞的分裂指数降低。苏丹Ⅲ染色,胞浆内有阳性的颗粒。电镜下,细胞表面微绒毛变短、变粗,甚至消失。核内异染色质增多,核仁变小、甚至消失。细胞浆内滑面内质网扩张,并有脂肪空泡和自噬小体形成。胞浆局部还出现了较多的板层状排列的粗面内质网。细胞核膜和胞膜均完整。AFP 和 PCNA 量,随用药浓度和作用时间的增加而降低。结论 苦参碱对 $HepG_2$ 细胞的生长增殖有抑制作用,使 $HepG_2$ 细胞的某些恶性增殖表型减弱或消失,反应了该细胞的恶性程度和侵袭力均减弱或消失。进一步说明了苦参碱可能是一种很好的抗癌药物。

关键词:苦参碱;肝细胞癌;细胞形态;电子显微镜;免疫组化
中图法分类号:R284.1;R735.7 文献标识码:A

Effects of matrine on cell morphology and related factors of hepatocellular carcinoma cell $HepG_2$ *in vitro*

SI Wei-ke, XIAO Tao-yuan, KANG Ge-fei (Department of Clinical Laboratory Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of matrine on the cell morphology, cell division index and the contents of alpha-fetoprotein (AFP) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) of human hepatocellular carcinoma cell $HepG_2$ *in vitro*. **Methods**: The morphology of the living cells and the cells after Wright or Sudan staining was observed with an inverted and an light microscope respectively. The surface and ultrastructures of the cells were studied with scanning and transmission electron microscope. Index of cell division was obtained with light microscope. The cellular content of AFP and PCNA were measured with immunohistochemical method and image analysis. **Results** $HepG_2$ cell without the treatment of matrine showed typical characteristics of cancer cells with an index of cell division of 53.8‰. No transparent granules or vacuoles were found in the cytoplasm. Sudan staining was negative and immunohistochemistry for AFP and PCNA was positive. $HepG_2$ cells treated with matrine decreased in number and growed in a scattered pattern. They were pleomorphic and their cytoplasm was filled with round and transparent granules. Wright staining revealed vacuoles existed in cytoplasm, the nucleoli were smaller in size, decreased in number and even disappeared and the index of cell division was decreased. Sudan staining showed positive particles in the cytoplasm. It was found with electron microscopy that the microvilli on cell surface became shorter and thicker and even disappeared, heterochromatin was increased in the nuclei, smooth endoplasmic reticulum was expanded and fat vacuoles and autophageosomes were formed, many rough endoplasmic reticula in lamellar arrangement were found in the cytoplasm and both

作者简介:司维柯(1958—),女,山西省晋城市人,博士研究生,讲师,主要从事肿瘤细胞增殖分化、凋亡及其机制、肿瘤的实验室诊断方面的研究,发表论文12篇。电话:(023)68752310

收稿日期:1999-12-09;修回日期:2000-03-14

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

nuclear and cell membranes were intact. The content of AFP and PCNA was independent on the dosage and the duration of matrine administration. **Conclusion** Matrine can inhibit the growth and proliferation of the $HepG_2$ cells *in vitro* and weaken, even eliminate its malignant phenotype. This finding suggests that the malignant degree decreases with the administration of matrine. Consequently, matrine may be a promising agent to treat cancers.

Key words: matrine; hepatocellular carcinoma; cell morphology; electron microscope; immunohistochemitry

苦参碱是天然药物——苦参根提取物中的一种纯成份[1,2]。我们曾用苦参碱作用于人肝癌细胞株$HepG_2$,发现它可明显抑制该细胞的增殖,并且抑制作用呈剂量和时间依赖性,为进一步了解该抑制作用的机制,本实验观察了未用药细胞和用药细胞的形态、分裂指数、甲胎蛋白(Alpha-fatoprotein, AFP)和增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)量的变化。

1 材料和方法

1.1 药物及主要试剂

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,AFP 和 PCNA 免疫组化试剂盒购自博士德公司。

1.2 主要仪器设备

COIC-XSZ-D_2 倒置显微镜和光学显微镜,JEM-2000EX 透射电镜,AMRAY1000B 扫描电镜,MD20 型真彩色图像分析仪。

1.3 细胞株及其培养

$HepG_2$ 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 培养液中培养,37°C, 5% CO_2 条件下培养 48 h,胰酶消化后,制成 1×10^5 cell/ml 细胞悬液,细胞培养瓶中加入细胞液和一定浓度的苦参碱。对照瓶同样操作,只是用 pH7.4, 0.01 mol/L 的 PBS 液代替苦参碱,培养 72 h 后,倒置显微镜下观察活细胞形态。胰酶消化、收集细胞,用于透射电镜分析。于放有载片的小培养皿中加入细胞悬液和一定浓度的苦参碱,培养 72 h 后,取出载片用于扫描电镜、AFP、PCNA、染色细胞形态结构分析等。

1.4 光镜观察

倒置显微镜下观察培养瓶中的活细胞形态。Wright 或苏丹 III染色载片培养的细胞,光镜下观察并记数分裂指数。

1.5 电镜观察

透射电镜标本制作:用 4°C 预冷的 3% 戊二醛固定细胞 2~4 h, 1% 锇酸后固定,系列乙醇一丙硐脱水,环氧树脂包埋,常规制作切片,电子染色,60 kV 下观察。扫描电镜标本制作:4°C 预冷的 3% 戊二醛固定载片, 1% 锇酸后固定,系列乙醇一丙酮脱水,临界点干燥,喷碳、喷金后,20 kV 下观察。

1.6 AFP 和 PCNA 的分析

取出载片培养的细胞,立即于 4°C 的纯丙酮中固定,20~30 min 后,干燥,按试剂盒说明书操作。先光镜下观察,再于真彩色图像分析仪上测定阳性细胞光密度值,反应 AFP 和 PCNA 量的变化。

2 结果

2.1 光镜下活细胞和染色细胞形态

对照细胞,倒置显微镜下,形态似上皮细胞样,细胞间相互连接,密集成片生长,细胞浆内未见透明颗粒。Wright 染色,细胞核大,核浆比大,有 2~5 个大核仁,细胞浆内无空泡。苏丹 III染色,细胞浆内未见阳性颗粒。用药细胞,在药物终浓度为 0.3~1.5 g/L 之间时,作用 6 h,细胞浆内即出现圆形透明颗粒,细胞散在生长,相互间无连接,折光加强,细胞形态为三角形、多边形和圆形。细胞染色后,胞浆内呈空泡状,核浆比减小,核仁减少或消失,核染色质变粗糙。苏丹 III染色,胞浆内有阳性颗粒。小于 0.3 g/L,即使作用 6 d 也未出现颗粒,并且形态也与对照细胞相似。大于 1.5 g/L,细胞体积明显缩小、呈圆形并悬浮生长,未见典型的凋亡形态。

2.2 分裂指数的变化

各记数 Wright 染色的对照和加药细胞中 1 000 个细胞中,分裂相细胞占有的千分率,即为分裂指数。每个浓度记数 3 次,结果取平均值。则对照和加药细胞(苦参碱的终浓度为 0.3, 0.8, 1.5 g/L)培养 72 h 的分裂指数分别为 53.8‰, 20.1‰, 0‰, 0‰。

2.3 AFP 和 PCNA 的变化

免疫组化染色,对照细胞 AFP 和 PCNA 均为阳性,AFP 主要分布在胞浆中,使胞浆呈棕黄色。PCNA 主要分布在核仁和核膜周围,呈棕色。加药细胞中的 AFP 和 PCNA 主要分布在胞浆中,呈黄色,并随用药浓度增加而阳性程度减弱。若药物浓度大于 1.5 g/L 时,AFP 和 PCNA 均为阴性。配合真彩色图像分析,每个浓度测量 20 个以上细胞阳性色的光密度值(IOD),换算成每个细胞阳性色的光密度值(IOD/cell),间接反应 AFP 和 PCNA 的量。则对照和加药细胞(苦参碱的终浓度为 0.3, 0.8, 1.5 g/L)培养 72 h, AFP 和 PCNA 的光密度值(IOD/cell)分别为 289.4, 213.9, 114.0, 0; 192.6, 179, 102, 0。

2.4 细胞超微结构变化

透射电镜下,未用药细胞具有癌细胞的一般特征,见图 1。细胞核大,有内折,常染色质多,异染色质少,核浆比大,有多个大核仁,形态不规则,电子密度不均,常见核仁边移现象。细胞内无退变的细胞器,细胞浆基质密度均匀。细胞表面微绒毛细长且密集。用药后(0.8 g/L 苦参碱,作用细胞 72 h),细胞核明显缩小,见图 2,核浆比减小,核仁减少、浓缩甚至消失,核内异染色质明显增多,并沿核膜边缘聚集增多,核膜完整。细胞浆内充满大小不等空泡,有的有膜包裹,系扩张的滑面内质网,有的无膜包裹,系脂肪空泡。胞浆有部分溶解,出现了自噬体,内

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

有吞噬的退变细胞器。细胞浆局部粗面内质网丰富, 并呈板层状排列。线粒体形态基本未变。细胞表面微绒毛变粗变短, 数量减少甚至消失。细胞膜及核膜均基本完整, 见图 3。扫描电镜下, 未用药的细胞表面不规则, 并有细长微绒毛。用药后细胞表面较光滑, 微绒毛减少甚至消失, 有的细胞表面有凹陷, 见图 4, 5。

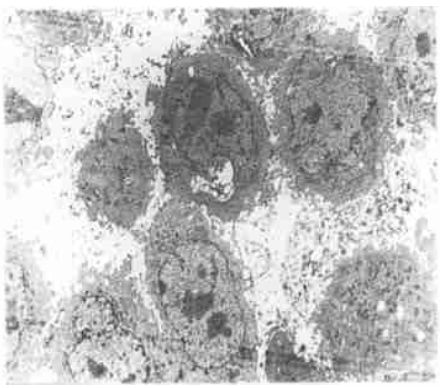


图 1　透射电镜下未处理的 $HepG_2$ 细胞, 核大、核内异染色质少、核浆比大、有多个形态不规则的大核仁并有边移现象 (TEM× 3 000)

Fig 1　Untreated $HepG_2$ cells under transmission electron microscope. Nucleus was bigger and had less heterochromatin in it. The ratio of nucleus and cytoplasm was higher. There were several bigger and abnormally shape nucleoli and nucleolar margiantion in nucleus (TEM× 3 000)

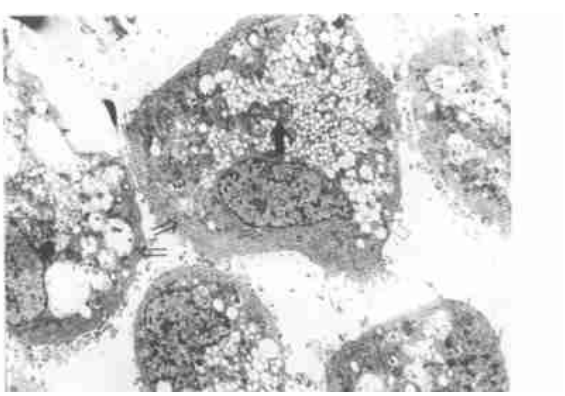


图 2　透射电镜下苦参碱处理的 $HepG_2$ 细胞, 核变小、异染色质增多、核浆比减小、核仁减少甚至消失。胞浆内滑面内质网扩张(➡)并有脂滴(⇨)和自噬体(⇒)形成 (TEM× 3 000)

Fig 2　Matrine-treated $HepG_2$ cells under transmission electron microscope. Nucleus became smaller and heterochromatin in it increased. The ratio of nucleus and cytoplasm decreased, nucleoli decreased in number even disappeared. Smooth endoplasmic reliculum (➡) expanded and fat vacuoles(⇨) and autophagosome(⇒) formed in cytoplasm (TEM× 3 000)

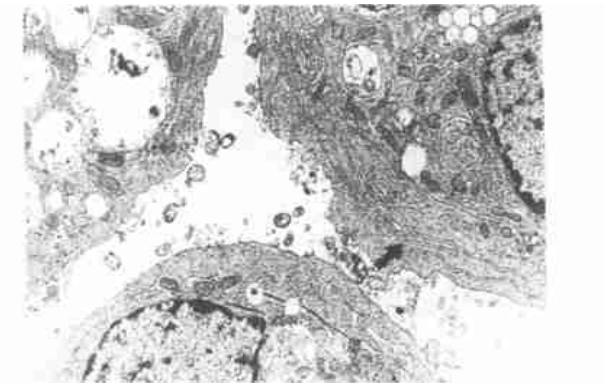


图 3　透射电镜下处理了的 $HepG_2$ 细胞中粗面内质网呈板层状排列(➡) (TEM× 10 000)

Fig 3　Rough endoplasmic reliculum in lamellar arrangement(➡) in treated $HepG_2$ cells under transmission electron microscope (TEM× 10 000)

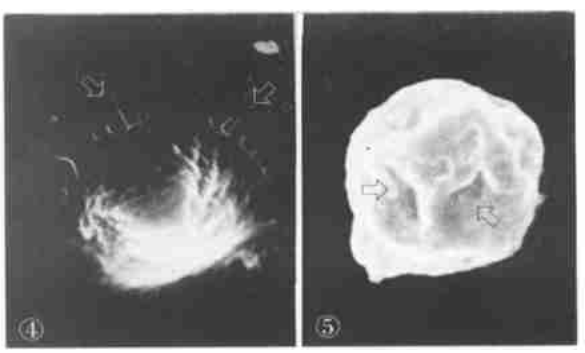


图 4　扫描电镜下未处理的 $HepG_2$ 细胞表面有细长的微绒毛(⇨) (SEM× 2 500)

Fig 4　Untreated $HepG_2$ cells under scanning electron microscope. Long and thin microvili(⇨) were on cell surface (SEM× 2 500)

图 5　扫描电镜下苦参碱处理的 $HepG_2$ 细胞表面微绒毛消失, 细胞表面较光滑并有凹陷(⇨) (SEM× 3 200)

Fig 5　Treated $HepG_2$ cell under scanning electron microscope. Microvili disappeared and cell surface was smooth and having hollow(⇨) (SEM× 3 200)

3　讨论

苦参提取液有抗鼠艾氏腹水瘤细胞生长的作用, 并可诱导 K562 和 HL60 细胞分化[3~5]。近来研究证实苦参碱是苦参抗肿瘤的活性成份之一[1,2]。我们也发现苦参碱能有效的抑制人肝癌细胞 $HepG_2$ 的增殖, 在药物浓度达 0.8 g/L 时, 作用 3 d, 细胞存活率为 50%, (小于 0.2 g/L 时, 即使作用 6 d, 抑制作用仍很小, 细胞存活率仍大于 80%), 并可抑制 DNA 的合成(见另文报道)。光学显微镜下细胞形态发生明显改变, 细胞数

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

量减少、散在生长、细胞轮廓清楚、折光加强，特别是药物浓度大于等于0.3 g/L时，胞浆内开始出现圆形、透明、折光很强的颗粒，后经苏丹Ⅲ染色证实有脂肪颗粒，而未用药细胞却无该颗粒。此外，核分裂像细胞减少，分裂指数降低直至为零。进一步电镜观察，未用药细胞具肿瘤细胞典型特征，如多个大核仁并有核仁边移现象，核有内褶，核浆比增大等，这些均为肿瘤细胞快速生长的标志。细胞表面微绒毛密集、细长，此为肿瘤扩大与外界的物质交换，以满足其恶性增殖的需要，并且也为转移和附着于其它组织提供方便。用药后细胞的恶性形态表型减弱甚至消失，如胞核变小，核浆比减小，核仁减少、浓缩甚至消失，无核仁边移，异染色质增多。细胞表面微绒毛变粗、变短，数量减少甚至消失。粗面内质网增多，呈区域性板层状排列，这些均为肿瘤细胞生长速度减慢，恶性程度降低的表现[6,7,10]。此外细胞浆内，滑面内质网扩张，这可能是细胞浆对药物的适应性反应，因肝细胞内滑面内质网是生物转化场所，内质网增多是为了增强对药物的处理。脂滴增多，可能因苦参碱干扰或破坏了细胞的脂肪代谢所致。如影响脂肪酸的氧化；影响脂蛋白合成；或细胞结构破坏，结构脂蛋白崩解，脂质析出成为可见性脂滴，即脂肪显现(Fat phanerosis)等[7~9]。另外胞浆有溶解，可能是溶酶体吞噬苦参碱破坏的细胞器所致。值得一提的是，无论是光镜还是电镜观察，均未发现核膜和细胞膜破裂现象，这也许与苦参碱能提高细胞膜的稳定性，对实验性肝损害有保护作用有关[10]。AFP是肝癌细胞的标志物，PCNA在增殖旺盛的肿瘤细胞中表达，主要表达在G1后期和S期。影像分析发现，PCNA阳性与肿瘤细胞核浆比率增加有关[11]，可作为肝细胞癌侵袭力预报，在临床已作为肿瘤组织学分级和细胞增殖恶性度的重要指标。总之，一定浓度的苦参碱对$HepG_2$细胞增殖有抑制作用，主要为直接杀伤作用，从而影响了$HepG_2$细胞的代谢，AFP、PCNA、分裂指数降低，恶性形态表型消失，使肿瘤细胞恶性程度和侵袭力减弱，进一步说明苦参碱可能是一个很好的抗癌药物。

参考文献：

[1] 李先荣，刘德宽，张 焱，等. 苦参生物碱抗小鼠移植性肿瘤研究[J]. 中西医结合杂志，1982，2(1)：42－43.

[2] Zhang Yan，Jiang Jikai，Liu xial shan，*et al*. Defferentiation and apoptosis in K562 Erythroleukemia Induced by matrine[J]. Natured Medicine，1998，52(4)：295－299.

[3] 肖诗鹰. 苦参抗肿瘤方面的应用与研究[J]. 实用中西医结合杂志，1991，4(9)：564－566.

[4] 司维柯，韩 风，秦建平，等. 苦参提取液诱导K562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)：198－204.

[5] 徐建国，马俊英，杨贵生，等. 苦参煎液对人早幼粒白血病细胞诱导分化研究[J]，1991，4(9)：594－595.

[6] 王蘅文 主编. 实验肿瘤基础[M]. 北京：人民卫生出版社，1992. 177－178.

[7] 杭振镳，魏于全，赵 霞. 15例肝细胞癌的电镜观察——与早期人胚肝的超微结构对比分析[J]. 华西医科大学学报，1996，27(3)：332－336.

[8] 武患弼 主编. 超微病理学基础[M]. 北京：人民卫生出版社，1990. 48－50.

[9] 董 郡 主编. 病理学[M]. 第2版. 北京：人民卫生出版社，1996. 9－11.

[10] 彭 红，黄自存. 吗特灵治疗急忆性肝炎107例[J]. 中西医结合肝病杂志，1994，4(3)：30－31.

[11] Taniai M，Tomimatsu M，Saito A，*et al*. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma：relationship to histological grade[J]. J Gastroenterol Hepatol，1993，8(5)：420－425.

（编辑 潘式文）

（上接552页）

皮样囊肿和畸胎瘤各1例，均位于腰骶部，T_1WI和T_2WI均信号混杂，未见脊柱畸形。

3 讨论

髓外硬膜下肿瘤的共同特征为：脊髓受压变形，向对侧移位；肿瘤对侧蛛网膜下腔变窄，肿瘤侧蛛网膜下腔增宽；肿瘤一般都有明显强化[1,2]。结合这些特征，加之MRI的三维成像能力，故MRI对髓外硬膜下肿瘤有着很高的定位准确率。本组病例定位准确率达94.6%，与文献[2,3]报道基本一致，比脊髓造影和CT等的定位准确率有较大提高。此外，在横断位定位较困难时，冠状位扫描可提供较大的帮助。

MRI对髓外硬膜下肿瘤的定性诊断尚有一定限度，单纯依据病灶的形态及信号特点，乃至于综合临床资料也不能全部做出准确诊断。本组病例的定性准确率达71.4%。但在我们的研究中发现，这些肿瘤还是有些相对可靠的特征。

关键词：髓外硬膜下肿瘤；磁共振成像
中图法分类号：R739.410.4 文献标识码：B

参考文献：

[1] 隋邦森，吴恩惠，陈雁宾. 磁共振诊断学[M]. 北京：人民卫生出版社，1993. 22－25.

[2] 刘鹏飞，张书阳，王柱石. 椎管内肿瘤MRI诊断研究[J]. 中国医学影像技术，1993，9(4)：47－49.

[3] Li M H，Holtas S，Larsson E M，*et al*. MR imaging of intradural extramedullary tumors[J]. Acta Radiol，1992，33(2)：207－209.

（编辑 冷怀明）

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