DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.04.016

β-榄香烯诱导人肝癌细胞株 SMMC-7721凋亡的研究

徐学军* 周子成 罗元辉 鲁 荣 门荣甫 房殿春 (第三军医大学附属西南医院消化内科)重庆,400038

提 要 目的:探索榄香烯对体外培养人肝细胞株的作用及其机制。方法:应用 MTT方法分析榄香烯对肝癌细胞株 SMMC-7721生长的影响。结果:榄香烯能明显抑制肝癌细胞生长,其半数生长抑制剂量为 37.4μg/ml;流式细胞术证实榄香烯能阻滞肝癌细胞从 G_0/G_1期进入 S期,并诱发细胞凋亡;透射电镜超微结构证实榄香烯能诱发肿瘤细胞凋亡的典型形态变化;免疫组化 SP法及流式细胞术定量分析榄香烯能使肝癌细胞癌基因 bcl-2 c-myc表达降低,抑癌基因 p53表达增强。结论:榄香烯能诱导肝癌细胞凋亡,其作用机制可能与癌基因 bcl-2 c-myc表达减少、p53表达增加有关。

关键词 榄香烯;细胞凋亡;肝细胞癌
中图法分类号 R329.25; R979.1

榄香烯系我国自行开发研制的广谱抗癌二类新药,其有效成分是从中药莪术中提取的以β-榄香烯为主要成分的榄香烯类化合物,该药毒副作用小,无骨髓抑制作用,具有广泛的临床应用前景[1,2]。本研究旨在探讨榄香烯对体外培养人肝癌细胞株的作用及其机制,为临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 药物与试剂

榄香烯乳注射液由大连金港制药有限公司提供。噻唑蓝(MTT)系华美生物公司分装。DMEM 培养基系 GIBCO公司产品。小牛血清为本校微生物教研室产品。Bcl-2/124单克隆抗体由英国 Davidy Mason教授惠赠,C-myc单克隆抗体购自福州迈新生物公司,p53 1801克隆抗体购自中山试剂公司。

1.2 细胞

人肝癌细胞株 SMMC-7721引自上海肿瘤研究所。

1.3 主要仪器

流式细胞仪 FACS420(美国),透射电子显微镜(日本),全自动酶标光度计(Beckman公司)。

1.4 方法

1.4.1 榄香烯的剂量反应曲线 噻唑蓝还原法(MMT法)测定[3]。

1.4.2 细胞周期时相中 DNA含量、凋亡率的测定 各组细胞分别于培养后不同时间(6、12、24 h)从孵箱中取出,常规消化离心,按文献[4]方法上机检测,检测结果以组方图显示,并输入计算机作数据处理,作细胞周期分析,并根据"亚 G_1峰"计算凋亡百分率。

1.4.3 细胞超微结构观察 细胞样品按常规固定处理后,在透射电镜下观察超微结构的变化。

1.4.4 免疫细胞化学及流式细胞仪检测 bcl-2、p53、c-myc表达。

1.4.4.1 应用链霉菌抗生物素蛋白过氧化酶连接法(SP法) 细胞以 2×10^3孔密度接种于 96孔培养基中,待细胞处于对数生长期时,加入不同处理因素,24 h后去上清,4%多聚甲醛固定 30 min。按 SP试剂盒操作,DAB显色,自来水冲洗,甘油-PBS封固。一抗分别为 bcl-2、c-myc、p53,阴性对照-一抗用 PBS代替。

1.4.4.2 FCM定量检测 按文献[4]方法检测,以荧光指数(FI)表示 bcl-2、c-myc、p53表达的相对含量。

2 结果

2.1 榄香烯对肝癌细胞生长的抑制作用

榄香烯对 SMMC-7721细胞的作用具有时间、剂量依赖关系,它明显抑制细胞生长,对 SMMC-7721细胞的 IC_{50}值为 37.4 μg/ml。

2.2 榄香烯对 SMMC-7721细胞周期及凋亡率的影响,见表 1

表 1 榄香烯对 SMMC-7721细胞周期的影响(%)

Tab 1 Effect of elemene on cell cycle of SMMC-7721 cells(%)

Treatment		Cell cycle			Apoptosis(%)
		G_0/G_1	S	G_2/M	
6 h	Control	63.17	16.33	20.50	7.6
	20μg/ml	57.97	24.56	17.46	
12 h	Control	62.61	19.36	18.03	13.0
	20μg/ml	66.96	16.09	16.95	
24 h	Control	62.89	17.85	19.26	19.1
	20μg/ml	72.71	14.02	13.27	

* 徐学军,女,24岁,住院医师,硕士,现广州军区武汉总医院消化内科 武汉,430000

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

由表 1可见,榄香烯 20μg/ml处理,在早期(6 h)对 S期有短暂的影响,当随着作用时间的延长, G_0/G_1期细胞明显增多,并引起细胞凋亡, DNA组方图上出现典型的凋亡峰(Apo峰),凋亡百分率逐渐增高。

2.3 形态学观察

光镜下对照组细胞散在或聚集生长,有多层生长现象,细胞大小不一,多形性;处理组细胞生长缓慢,呈单层生长,细胞变为梭形,变细变长,部分细胞变圆,表面有出芽现象,见图 1,2

透射电镜下可观察到榄香烯处理组出现细胞凋亡特征性的形态学变化:染色质边集、核浓缩、核碎裂,凋亡小体形成(完整的细胞膜包绕着一部分细胞器),见图 3,4



图 1　对照组细胞多层生长,细胞多形性　(倒置显微镜× 100)

Fig 1　Multilayer growth and polymorphism of the cell in control group　(inverted microscope× 100)

图 2　处理组细胞单层生长,部分细胞变圆,细胞表面发芽现象　(倒置显微镜× 100)

Fig 2　Cell molayer growth, part of cell becoming round and appeating germinative phenomenon on cell surface in treatment group　(inverted microscoper× 100)



图 3　对照组细胞表面绒毛,核不规则,有深切迹　(TEM× 4 000)

Fig 3　Showing cell microvilli, nuclear irregular with deep incisare in control group　(TEM× 4 000)



图 4　细胞处理 24 h后表面微绒毛减少,凋亡小体形成　(TEM× 6 000)

Fig 4　Showing cell microvilli reduced and apoptotic body fromed after 24 hrs´treatment　(TEM× 6 000)

2.4 Bcl-2、C-myc、P53检测结果

2.4.1　SP法免疫组化染色定位　本实验显示 Bcl-2阳性物质位于胞浆内, C-myc阳性物质主要位于胞核及部分胞浆内, P53阳性颗粒位于胞核及部分胞浆内。经榄香烯作用后, Bcl-2、C-myc表达均减弱,阳性细胞数减少,阳性着色减弱;而 P53表达增强,表现为阳性细胞数增多,阳性着色加深。

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

表 2 榄香烯处理对 SMMC-7721细胞 Bcl-2 C-myc P53蛋白 FI的影响

Tab 2 Effects of elemene on expression of Bcl-2, C-myc, P53 in SMMC-7721 cells

Group	Bcl-2	C-myc	P53
Control	1.63	1.40	1.19
Treatment	1.25	1.08	1.31

2.4.2 流式细胞仪定量检测 由表 2可见,榄香烯 20μg/ml处理 24 h后,Bcl-2 C-myc蛋白明显低于对照组,而 P53蛋白则高于对照组。

3 讨论

越来越多的研究表明肿瘤的发生不仅与细胞增殖异常有关,亦与细胞凋亡异常有关。化疗是通过杀伤肿瘤细胞、抗肿瘤细胞增殖、促进细胞分化和/或促进细胞凋亡途径实现的。因此,细胞凋亡被视为评估疗效的一项新指标[5]。如何诱导和调控肿瘤细胞凋亡已成为目前抗癌治疗研究的热点。榄香烯是国家二类抗癌新药,临床观察,对肺、肝、脑肿瘤等有较好疗效,该药毒副作用小,对肝肾功能无损害,无骨髓抑制作用。以往研究发现,榄香烯对多种肿瘤细胞的生长、癌细胞 DNA、RNA和蛋白质合成均有抑制作用,直接杀伤肿瘤细胞。杨骅等[6]研究发现榄香烯具有阻滞白血病细胞从 S期进入 G_2/M期,并诱发其发生细胞凋亡的作用,从而证实榄香烯诱发细胞凋亡是其抗肿瘤作用机制的重要方面之一。在此基础上,我们则对榄香烯对人肝癌细胞作用进行了深入研究,结果发现:榄香烯对肝癌细胞生长有直接抑制作用,阻滞肝癌细胞从 G_0/G_1期进入 S期,抑制其增殖并发生细胞凋亡,这提示不同肿瘤细胞对榄香烯的敏感性不一致,细胞凋亡的启动可能存在多个调控点,其具体机制还有待进一步研究。

目前公认对细胞凋亡具有调控作用的基因有 bcl-2、c-myc和 p53等。bcl-2基因为凋亡抑制基因,编码 Bcl-2蛋白,在正常肝细胞中无表达,其高表达可以引起肿瘤且明显延长细胞的生长期[7],还可与参与肿瘤耐药性产生有关。c-myc原癌基因对细胞凋亡的作用表现为促进和抑制两方面,即双信号假说[8],但 c-myc调节细胞增殖、转化及凋亡机制仍需深入研究。p53基因为抑癌基因,在细胞生长过程中作为一种分子感受器,当细胞内 DNA受损时,P53蛋白水平增高,以中止增殖,使受损细胞获得修复 DNA的时间。如无法修复,则 P53蛋白持续增高引起细胞凋亡[9]。本实验对凋亡调控基因的检测发现,经榄香烯处理后,癌基因 bcl-2、c-myc表达降低,抑癌基因 p53表达增加,表明榄香烯诱导肝癌细胞凋亡的作用机制可能与 bcl-2、c-myc表达的减少、p53表达的增加有关,但此 3种基因改变的主次关系、先后作用关系及相互作用还不清楚,有待于进一步研究。因而,进一步探讨 β-榄香烯诱导人肝癌细胞凋亡时细胞周期及相关基因表达及影响其表达的因素,将对肝癌的发生及治疗起积极作用。

参考文献

1 傅乃武,全兰萍,郭永泗,等.β-榄香烯的抗肿瘤作用和药理学研究.中药通报,1984,9(1):35

2 时继慧,李成章,刘德兰,等.温莪术挥发油的实验药理研究 β-榄香烯的抗肿瘤作用的研究.中药通报,1981,6(1):36

3 朱文菁,金慰芳,张丽丽,等. MTT法分析培养成骨细胞的存活和增殖能力.上海医科大学学报,1995,22(4):254

4 左连富 主编,流式细胞术与生物医学.沈阳:辽宁科学技术出版社,1996.240~374

5 Alison M R, Sarraf C E. Apoptosis: regulation and relevance to toxicology. Hum Exp Toxicol, 1995, 14(3): 234

6 杨 骅,王仙平,郁琳琳,等.榄香烯抗癌作用与诱发肿瘤细胞凋亡.中华肿瘤杂志,1996,18(3):169

7 Charotte F, L'Hermine A, Martin N, *et al*. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver. Am J Pathol, 1994, 144(3): 460

8 Evan G I, Wyllie A H, Gilbert C S, *et al*. Induction of apoptosis in fibroblast by C-myc protein. Cell, 1992, 69(1): 119

9 Clarke A R, Purdie C A, Harrison D J, *et al*. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathway. Nature, 1993, 362(6 423): 849

(收稿:1998-05-06;修回:1999-01-25)

(编辑 冷怀明)

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

Elemene-induced apoptosis of SMMC-7721 cells of human hepatocellular carcinoma

Xu Xuejun, Zhou Zicheng, Luo Yuanhui, Lu Rong, Men Rongfu, Fang Dianchun (Department of Gasenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objcetive: To determine whether elemene can induce apoptosis of SMMC-7721 cells *in vitro* and to analyze the potential role of Bcl-2, C-myc and P53 proteins in the regulation of the cellular apoptosis. Methods: SMMC-7721 cells were determined with MTT assay. Flow cytometry (FCM) analysis was carried out to quantify cellular apoptosis and the changes of cell cycle. Expression of Bcl-2, C-myc and P53 proteins was detected with immunocytochemical technique and FCM. Results: Exposure of SMMC-7721 cells to elemene resulted in an inhibition of cell growth. The IC_{50} value of elemene for SMMC-7721 cells was 37.4 μg/ml. The inhibition of elemene on the proliferation of SMMC-7721 cells consisted of cell cycle arrest in the transition from G_0/G_1 to S phase to induce apoptosis of the cells, which was confirmed by characteristic ultrastructural changes and by apo hypodipoid DNA peak on FCM. After 24 hours of exposure to elemene, FCM revealed that bcl-2 and c-myc were significantly downregulated while p53 up-regulated. Conclusion: Elemene might exert effects on SMMC-7721 cel line of human hepatocellular carcinoma through an inhibition on cell-proliferation to induce apoptosis. The mechanism might be related to the combination of down-regulation of bcl-2 and c-myc and an up-regulation of p53.

Key words elemene; apoptosis; hepatocellular carcinoma

1例血管免疫母细胞性淋巴结病的影像诊断

Imging diagnosis of 1 case of angio-immunoblastic lymphadenopathy

戚跃勇* 孙清荣 张 曦** (第三军医大学附属新桥医院放射科) 重庆, 400037

患者女性, 61岁。反复发热,淋巴结肿大 2月伴皮疹入院。查体: 轻度贫血貌,双下肢出现对称密布的鲜红色点状皮疹。双侧颈后、腋窝及腹股沟处可扪及数个 2 cm× 2 cm大小的淋巴结,呈串珠状排列、质韧、活动,有触痛。取右颈后淋巴结活检,病理诊断: 血管免疫母细胞性淋巴结病。

胸部正侧位片示右上纵隔增宽,双肺门影增大模糊,中纵隔气管旁淋巴结肿大。双肺野满布斑点斑片状模糊阴影,以双肺野内中带为重。心影轻度增大,左侧肋膈角及左膈面掩盖。CT扫描: 主肺动脉窗及左肺门区多个肿大的淋巴结,与左肺门血管分界不清,大者 1.8 cm× 1.4 cm,左侧胸腔可见少量积液。

讨论

血管免疫母细胞性淋巴结病是 1974年 Fri-zzera等首先报道的[1]。它是一种不明原因的 T细胞抑制减少, B细胞增生引起的全身性疾病。主要临床表现为全身淋巴结肿大伴皮疹。

该病的胸部影像学特点为:① 肺门双侧增大和/或伴有纵隔增宽;② 双肺间质性炎症改变,甚至演变为斑片状或大片状渗出性炎症;③ 胸腔少至中量积液;④ CT或 MRI检查可清楚显示肿大的淋巴结主要位于双肺门及气管旁中纵隔区[1]。腹部影像学表现为腹腔淋巴结肿大及肝脾肿大[2]。

本例 3次胸片示肺部病变由双下肺间质性改变演变为全肺实质性表现,误诊为一般肺炎。但抗炎治疗病变逐渐加重,可能与长期应用激素及免疫抑制剂治疗,机体抵抗力降低,伴发霉菌感染有关。同时对本病临床特点及 X线、CT表现认识不足亦是导致误诊的原因。总之,血管免疫母细胞性淋巴结病影像学定性诊断较困难,确诊需靠淋巴结活检。文献[2]报道国内100多例该类病变多依据淋巴结活检证实。因此,对疑有该病者应尽早取浅表淋巴结活检,以期早期诊断、早期治疗。

关键词 血管免疫母细胞性淋巴结病; 放射摄影术; 断层摄影; X线计算机

中图法分类号 R816.4

参考文献

1 Limpert J, MacMahon H, Variakojis D. Angioimmunoblastic lymphadenopathy: clinical and radiological features. Radiology, 1984, 152(1): 27

2 李 晖,任小华.血管免疫母细胞性淋巴结病误诊为肝结核1例.中国实用内科杂志, 1998, 18(1): 56

(收稿: 1998-06-24;修回: 1999-03-18)

(编辑 汪勤俭)

* 戚跃勇,男, 29岁,住院医师,学士

** 血液科 重庆, 400037

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