

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE**JOURNAL OF DIGESTOLOGY****Shijie Huaren Xiaohua Zazhi****2003 年 7 月 15 日 第 11 卷 第 7 期****(Volume 11 Number 7)****7/2003**

ISSN 1009-3079



名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports, Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2002 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 2.532. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2003 年 7 月 15 日 第 11 卷 第 7 期 (总第 111 期)

述 评

- 881 一种新型传染病: 严重急性呼吸综合征 聂青和, 罗新栋, 惠武利
888 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制 成军
897 老年消化系疾病的中西医结合治疗 张万岱

肝 癌

- 900 经动脉灌注蜂毒素-聚乳酸/羟乙酸微球治疗大鼠肝肿瘤 凌昌全, 李琦, 刘晓华, 陈庆华, 彭永海, 罗若茵, 黄雪强
904 大鼠肝癌形成过程中癌基因表达变化的意义 薛玲, 廖冰, 赵国强, 胡瑞德, 车丽洪, 董郡
908 参白胶囊诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡 吴苏冬, 刘长利, 王慧川, 鲍德虎
912 肝细胞癌肝动脉化疗栓塞后 PCNA 和 nm23-H1/NDPK 的研究 冯勇, 赵玲, 张爱华, 刘康达, 刘来村, 王彦辉, 尹进强, 杨秉辉
916 TDI-FP 法分析肝细胞癌组织中 HBV 核心启动子双突变 吕贯廷, 卢冰, 白玉杰, 张剑, 阎小君

病毒性肝炎

- 920 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白反式调节基因 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩
925 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因 10 的克隆化研究 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚
930 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 反式调节靶基因 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩
935 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 10 的克隆化研究 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚
939 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式调节基因的研究 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军
943 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军
947 丙型肝炎病毒核心蛋白上调细胞周期调节蛋白 Wee1 基因表达研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰
951 丙型肝炎病毒核心蛋白上调 NIP3 基因表达研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰
955 丙型肝炎病毒核心蛋白上调层粘蛋白 B1 链基因启动子表达活性的研究 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 杨艳杰, 张树林
959 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 上调新生多肽相关复合物 α 多肽基因的表达 杨倩, 刘妍, 成军, 李克, 王建军, 洪源, 张树林
963 乙型肝炎肝纤维化及癌变时脾脏超声影像, HBV e 系统及 APF 水平 柯伟民, 林国莉, 叶一农, 赖菁, 李建国
966 乙型肝炎病毒核壳蛋白变异株在 HepG₂ 细胞的 HLA-I 表达 陈伟红, 何海棠, 张明霞, 刘志华, 周永兴

基础 研究

- 970 联合应用粉防己碱与甘草酸抑制肝纤维化大鼠细胞外基质表达 王志荣, 陈锡美, 李定国, 魏红山, 黄新, 展玉涛, 陆汉明
975 复方红景天干预肝纤维化大鼠胶原代谢 曾维政, 吴晓玲, 蒋明德, 邓桂英, 陈晓斌, 张勇, 秦建平, 徐辉
979 选择性环氧合酶-2 抑制剂 Celebrex 对胰腺癌 PGE₂ 和血管内皮因子表达的影响 谢传高, 王兴鹏, 董育玮, 杜勤, 蔡建庭, 钱可大
982 早期肠道营养减轻烧伤后肠黏膜损伤的机制研究 彭毅志, 袁志强, 肖光夏
986 胃肠道平滑肌细胞作为 eNOS 基因转移靶细胞的研究 宁守斌, 张忠兵, 沈茜, 谢渭芬, 杨秀疆, 赵新, 信栓力
990 内皮素-1 特异性抗体对应激性胃黏膜损伤的保护作用 段义民, 李兆申, 湛先保, 龚燕芳, 许国铭
994 肠三叶因子在胃黏膜应激性损伤中的修复作用 李兆申, 聂时南, 湛先保, 龚燕芳, 屠振兴, 许国铭
997 p⁵³ 突变与 VEGF 在大鼠胃癌中的表达及中药胃康宁的防治作用 李庆明, 余谦, 闵存云

焦 点 论 坛

- 1001 乙型和丙型肝炎病毒蛋白反式激活作用机制及其意义的研究进展 成军
1002 乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 结构及调节研究 李强, 成军, 程明亮, 钟彦伟
1004 乙肝病毒表面抗原基因启动子 II 的结构及调节研究 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮
1006 乙型肝炎病毒核心启动子的结构及调节研究 杨艳杰, 成军, 陈东风, 刘妍, 杨倩, 王建军
1008 乙型肝炎病毒增强子的结构和调控研究 王建军, 成军, 刘妍, 张忠东, 杨倩, 杨艳杰
1011 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活作用的研究 杨艳杰, 成军, 陈东风, 钟彦伟, 张忠东, 李强

文献综述

1014 丙型肝炎病毒复制子的研究 纪冬, 成军, 王建军

1018 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的反式激活作用研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰

1020 丙型肝炎病毒 5' - 非翻译区的结构与功能研究 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林

1023 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对 14-3-3 蛋白信号转导的影响 成军

1027 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对蛋白酪氨酸激酶信号转导的影响 张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林

1031 北京大学医学部研究生分子肿瘤学课堂讨论及学术论坛纪要 吕有勇, 许小青

1035 骨髓源性肝干细胞的研究进展 杨明智, 彭志海

1037 ERK 信号传导通路与肝星状细胞周期调控 蒋明德, 马洪德, 解方为

1040 趋化因子与肝病的研究进展 胡迎宾, 田德安, 刘南植

1043 游离脂肪酸、胰岛素抵抗与非酒精性脂肪性肝炎 高志强, 陆付耳

1046 KAI1 基因在胰腺癌中抗转移作用的研究 任丽楠, 刘民培, 郭晓钟, 徐建华, 安天义

1050 结直肠癌发病率及解剖部位变化趋势 谢正勇, 卿三华

1054 微阵列技术及其在消化系疾病研究中的应用进展 李新华, 张万岱, 肖冰, 张振书

1059 NO 和 VIP 与胃肠电-机械活动的关系 章敏, 曲瑞瑶

1064 TK 基因治疗胃肠道肿瘤的研究进展 刘占奎, 张超

1068 自由基损伤在幽门螺杆菌相关胃病中的作用 陶惠, 朱道银, 邹全明, 毛旭虎

907 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志
915 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology®
946 世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册
950 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快
954 世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次
985 美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单
993 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003-2004 年国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助
1030 世界胃肠病学杂志英文版获得第二届国家期刊奖百种重点期刊
1053 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台
1058 提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版
1063 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊
附 1 Journal Citation Reports 2002-China
附 2 Journal Citation Reports 2002-GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY
附 3 2003 年 Index Medicus 收录中国期刊
附 4 2003 年 ISI 收录中国科技期刊

970 联合应用粉防己碱与甘草酸抑制肝纤维化大鼠细胞外基质表达 王志荣, 陈锡美, 李定国, 魏红山, 黄新, 展玉涛, 陆汉明

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平	题写封面刊名
陈可冀	题写版权刊名
	(月刊)

创刊 1993-01-15

改刊 1998-01-25

出版 2003-07-15

原刊名 新消化病学杂志

总顾问	陈可冀
	黄象谦
	黄志强
	黎介寿
	刘耕陶
	裘法祖
	汤钊猷
	王宝恩
	危北海
	吴孟超
	吴咸中

张哲	张学庸	赵东海	周殿元	马连生	潘伯荣	王瑾晖	张建中	李少华	李天华
社长总编辑	中文编辑	英文编辑	排版	校对					

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街 77 号
E-mail:wcjd@wjgnet.com

出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市 2345 信箱
E-mail: wcjd @ wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

电话 (010)85381892

传真 (010)85381893

北京科信印刷厂

发行 国内 北京报刊发行局
国外 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京 399 信箱)

订购 全国各地邮电局
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市 2345 信箱)

电话:(010)85381892

传真:(010)85381893

2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

- 美国《化学文摘(CA)》
- 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》
- 俄罗斯《文摘杂志(PЖ)》
- 中国科技论文统计与分析
- 中国学术期刊文摘
- 中国中医药信息服务网
- 中国生物医学文献光盘数据库
- 《中文科技资料目录(医药卫生)》
- 中国生物医学期刊目次数据库
- 中国医学文摘外科学分册(英文版)
- 中国医学文摘内科学分册(英文版)

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点,除非特别声明.本刊如有印装质量问题,请向本刊编辑部调换.

ISSN 1009-3079

CN 14-1260/R

邮发代号

82-262

国外代号

M 4481

国内定价

每期 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营许可证

1401004000050

www.wjgnet.com

参白胶囊诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡

吴苏冬, 刘长利, 王慧川, 鲍德虎

吴苏冬, 海军总医院肿瘤科 北京市 100037
刘长利, 北京市红十字血液中心 北京市 100088
王慧川, 陕西省中医医院肿瘤科 陕西省西安市 710003
鲍德虎, 西安交通大学医学院免疫学教研室 陕西省西安市 710061
吴苏冬, 女, 1976-09-05 生, 陕西省咸阳市人, 汉族. 2002 年西安交通大学医学院硕士毕业, 主要从事肿瘤内科的临床工作.
陕西省科委基金资助课题, No.97K12G22
项目负责人: 王慧川, 710003, 陕西省西安市, 陕西省中医医院肿瘤科.
电话: 13691002919
收稿日期: 2002-01-11 接受日期: 2002-02-07

Apoptosis of human liver cancer cell line SMMC-7721 induced by Senjiu capsule

Su-Dong Wu, Chang-Li Liu, Hui-Chuan Wang, De-Hu Bao

Su-Dong Wu, Department of Oncology, Navy Hospital, Beijing 100037, Beijing, China
Chang-Li Liu, Beijing Red Cross Blood Center, Beijing 100088, Beijing, China
Hui-Chuan Wang, Department of Oncology, Traditional Chinese Medical Hospital of Shaanxi Province, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China
De-Hu Bao, Department of Immunology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China
Supported by the Natural Scientific Foundation of Shaanxi Province, No.97K12G22
Correspondence to: Hui-Chuan Wang, Department of Oncology, Traditional Chinese Medical Hospital of Shaanxi Province, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China.
Received: 2002-01-11 Accepted: 2002-02-07

Abstract

AIM: To study the apoptosis of human liver cancer cell line SMMC-7721 induced by Senjiu Capsule.

METHODS: Apoptosis was detected by HE staining, electron microscopy (TEM) and TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL).

RESULTS: SJ significantly inhibited the growth of SMMC-7721 cells and the inhibitory effect was positively related to the concentration and exposure time to SJ. And SJ could induce extensive apoptosis of SMMC-7721 cells. After exposure with 10 μ g/ml SJ for 48 h, the cells showed classical morphological and biochemistry features of apoptosis under light microscope and electron microscope. Apoptosis cells in different phases were observed by TUNEL.

CONCLUSION: SJ significantly inhibited the growth of human cancer cells, but also induced extensive apoptosis. The apoptotic effect of SJ on tumor cells might play a key role in its anticancer activities. SJ could be used as a potential natural apoptosis-inducer in liver cancer therapy.

Wu SD, Liu CL, Wang HC, Bao DH. Apoptosis of human liver cancer cell line SMMC-7721 induced by Senjiu capsule. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(7):908-911

摘要

目的: 研究“参白胶囊”(SJ)诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的作用。

方法: 采用 HE 染色、透射电镜观察、原位末端标记技术 (TUNEL) 等方法, 观察 SJ 作用于 SMMC-7721 细胞后细胞形态的改变。

结果: HE 染色及透射电镜分别从微观、超微观水平观测肿瘤细胞经 SJ 作用后的形态学变化: 细胞变圆、缩小, 折光性增强, 细胞破碎, 经 HE 染色后, 细胞核呈兰黑色, 胞质呈淡红色, 细胞出现凋亡改变, 单个散在分布, 表现为核染色质致密浓缩, 核碎裂或核染色质断裂, 形成大小不等的凋亡小体, 证实 10 μ g/mL SJ 作用 SMMC-7721 48 h 后细胞出现典型的凋亡征象; TUNEL 法检测到发生在各期的凋亡细胞。

结论: SJ 可诱导 SMMC-7721 细胞凋亡, 可望作为一种新的细胞凋亡诱导剂用于肝癌的治疗。

吴苏冬, 刘长利, 王慧川, 鲍德虎. 参白胶囊诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2003;11(7):908-911

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/908.asp>

0 引言

恶性肿瘤与细胞凋亡调节紊乱、细胞增生分化/死(凋亡)平衡失调等多种因素有关^[1-4]. 细胞凋亡在肿瘤形成的不同阶段均具有十分重要的作用, 他可以在基因水平被多种生物和理化因素诱导而启动, 通过自主清除恶变的或者可能恶变的细胞而调控肿瘤的发生发展^[5-11]. 近年来, 诱导肿瘤细胞凋亡已成为筛选抗癌药物的一个新的指标, 开发低毒并可诱导肿瘤细胞凋亡的新药及设计相应的新疗法已成为肿瘤化疗、放疗、生物治疗、基因治疗、诱导分化治疗研究的新领域. 中药复方参白胶囊(SJ)在长期临床实践中收到了较为满意和可靠的疗效, 并获陕西省科委基金资助, 对其抗癌作用及其机制进行研究. 初期实验发现该方剂具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用, 显示了该药广阔的应用前景与价值. 我们分别从细胞、亚细胞、分子水平研究了 SJ 诱导肝癌细胞凋亡的机制, 为该药的进一步开发和应用提供了必要的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 SJ 由陕西省中医药研究院附属医院王慧川主

任医师提供, 具体药物如下: 人参, 补骨脂, 郁金, 桃耳七, 半枝莲, 水蛭, 甘草. SJ 制备: 以上各味中药按一定比例, 制成粉剂, 于冷水中浸泡 2 h 后, 加热煮沸 2 h, 定量, 调整浓度为 1 kg/L (相当于生药浓度), 8 000 r/min \times 10 min 离心, 上清高压灭菌后, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存. 使用前, 无菌条件下以培养液梯度稀释成所需浓度. 人肝癌细胞株 SMMC-7721 由第四军医大学口腔医院生物学教研室吴军正教授提供. RPMI1640 培养基为 Gibco 公司产品, 按说明用三蒸水配制, 并添加 100 mL/L (V/V) 胎牛血清、100 kU/L 青霉素和 100 kU/L 链霉素, 0.22 U 滤器除菌, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存; 胎牛血清为浙江省金华市清湖犊牛应用研究站产品; MTT[3-(4, 5)-双甲基-乙-噻唑-(2, 5)-二甲基溴化四氮唑蓝] 为美国 Sigma 公司产品, 以磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH7.4, PBS)配成 5 g/L 的溶液, 过滤除菌, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存; TUNEL 原位末端标记试剂盒[terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)]为美国 Promega 公司产品; DIG-dUTP 为德国 B.M. 公司产品; Anti-DIG-Biotin 为美国 Sigma 公司产品; SABC 及 DAB kit 均为武汉博士德公司产品. CO₂ 恒温孵箱: 美国 Forma Scientific 公司; IMT-2 型倒置生物显微镜: 日本 Olympus 公司; YJ-875 型超净工作台: 苏州净化设备厂; 透射电子显微镜: 日本产 JEM-2000EX 型; 96 孔及 24 孔细胞培养板: 丹麦 Costar 公司.

1.2 方法 人肝癌细胞株 SMMC-7721 常规培养于 RPMI1640 完全培养液内, 置 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂ 孵箱, 2-3 d 传代 1 次. 取指数生长期细胞供实验. 盖玻片泡酸处理, 高压灭菌后, 放入新 24 孔板内, 每孔 1 片; 取对数生长期 SMMC-7721 细胞, 常规消化, 调密度至 10^7 /L, 加样, 1 mL/孔; 24 h 后, 各孔加入 10 mg/L SJ 1 mL, 设无药培养液组为对照; SJ 与细胞分别作用 4, 8, 12, 24, 32, 48, 60, 72 h 后, 在倒置显微镜下观察记录后, 作 HE 染色: 培养终止, 取出盖玻片, PBS 小心冲洗 3 遍, 放入预冷的 950 mL/L 酒精中, 4 $^{\circ}$ C 固定, 用透明胶背面粘于载玻片上, 细胞面向上, 37 $^{\circ}$ C 烘干, PBS 冲洗, 置苏木精染液中 5-10 min, 水浸洗, 置稀盐酸酒精中数秒分色, 水浸洗, 淡氨水中 3-5 min, 水浸洗, 伊红染液中浸 5-10 min, 水浸洗后, 500, 800, 900 mL/L 酒精梯度脱水各 1-2 min, 950 mL/L 酒精 2 次各 1-2 min, 1 L/L 无水酒精 3 次各 2 min, 透明, 二甲苯中 3 次各 2 min, 树胶封片观察.

1.2.1 细胞超微结构改变 取对数生长期 7721 细胞分别接种于 4 个 100 mL 细胞培养瓶内, 24 h 后前 3 瓶细胞分别加入 10 mg/L SJ 10 mL, 第 4 瓶加入培养液 10 mL. 分别作用 24, 48, 72 h 后收集细胞, 置离心管中, PBS 洗 2 遍, 离心 2 000 r/min \times 20 min, 使细胞形成团块贴于管底, 加入 25 mL/L 戊二醛固定液(取 250 mL/L 戊二醛原液 10 mL, 加 pH7.2, 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 50 mL, 再加蒸馏水 40 mL 混匀, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存), 4 $^{\circ}$ C 固定 2 h, 0.1 mol/L PBS 浸洗后, 10 g/L 锇酸(OsO₄)固定 10 min,

用 Epon812 常规方法包埋, 制成半薄切片, 甲苯胺兰染色, 光镜下定位, LKB-5 型超薄切片, 铀-铅双染色, 透射电镜下观察照相.

1.2.2 原位末端标记法检测细胞凋亡 常规接种 SMMC-7721 细胞于 24 孔板中的载玻片上, 每孔 1×10^7 /L (载玻片预先用多聚赖氨酸处理), 24 h 后加入 SJ 药液(10 mg/L), 以不加药组为对照, 药物作用 24 h 或 48 h; 将 24 孔板离心 2 000 r/min \times 5 min, 取出载玻片, 40 mL/L 多聚甲醛室温固定 30 min. 0.1 mol/L pH7.4 PBS 洗 2 min \times 2 次, 蒸馏水洗涤 2 min \times 2 次, 新鲜配制 30 mL/L H₂O₂, 室温处理 10 min, 蒸馏水洗涤 2 min \times 3 次, 标本片加 0.01 mol/L pH7.5 TBS(1L 双蒸馏水中加入氯化钠 8.5 g, Tris 1.2 g 和纯乙酸 0.45-0.5 mL), 1:200 新鲜稀释 Proteinase K 37 $^{\circ}$ C 消化 5 min, 蒸馏水洗涤 2 min \times 3 次, 甩去玻片上多余液体, 加标记缓冲液(labelling buffer) 20 μ L/样本以保持玻片湿润, 甩片后, 加标记液(TdT 1 μ L 和 DIG-d-UTP 18 μ L 混匀), 20 μ L/样本, 样本置湿盒内, 4 $^{\circ}$ C 标记过夜后, 37 $^{\circ}$ C 标记 2 h, TBS 洗 2 min \times 3 次, 加封闭液 50 μ L/样本, 室温 30 min, 甩掉封闭液, 加封闭液 1:100 稀释生物素化抗地高辛抗体, 50 μ L/样本, 置湿盒中, 37 $^{\circ}$ C 30 min, TBS 洗 2 min \times 3 次, 加 TBS 1:100 稀释 SABC, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min, TBS 洗 5 min \times 4 次, DAB 显色 15 min, 水洗, 苏木素轻度复染, TBS 洗, 蒸馏水洗, 脱水, 透明, 封片. 显微镜观察, 成像.

2 结果

2.1 肿瘤细胞形态学改变 细胞经 SJ 作用 24 h 后, 在倒置显微镜下可见细胞变圆、缩小, 折光性增强, 细胞破碎, 漂浮在培养液中. 经 HE 染色后, 细胞核呈兰黑色, 胞质呈淡红色, 部分细胞出现凋亡改变, 单个散在分布, 表现为核染色质致密浓缩, 核碎裂或核染色质断裂, 形成大小不等的凋亡小体. 48 h 组凋亡细胞进一步增多, 形态学特征更加典型. 72 h 组细胞则主要表现为均质红染的无结构物质, 核染色消失, 凋亡小体解体(图 1、2).

2.2 细胞超微结构变化 透射电镜观察 SJ 作用的细胞超微结构变化, SJ 作用 24 h 组部分细胞出现细胞凋亡现象, 48 h 组凋亡改变典型: 细胞核缩小, 核膜皱缩, 染色体密集于核膜下, 形成新月体或聚集于核膜呈境界分明的块状边集现象, 细胞质浓缩或裂解成质膜包裹的碎片; 72 h 组以细胞裂解表现居多, 同时又有大量凋亡小体并见. 凋亡小体为以核膜消失, 染色体断裂成碎片, 与细胞器等胞质成分聚集为特征, 而坏死细胞则出现染色质减少, 呈细颗粒状, 细胞器肿胀破裂, 染色质分布无规律, 边界不清等(图 3-6).

2.3 细胞凋亡 阴性对照组细胞染色阴性, SJ 作用 48 h 组可见许多 SMMC-7721 细胞核中出现棕黄色颗粒, 此即为凋亡细胞, 部分凋亡细胞也有因核 DNA 碎片的

逸出呈核外阳性着色. 少量阴性细胞可呈非特异性核外着色(图7、8).

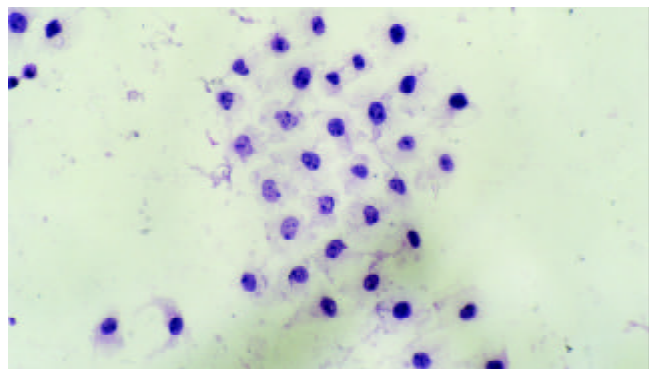


图1 对照组SMMC-7721细胞HE染色片.

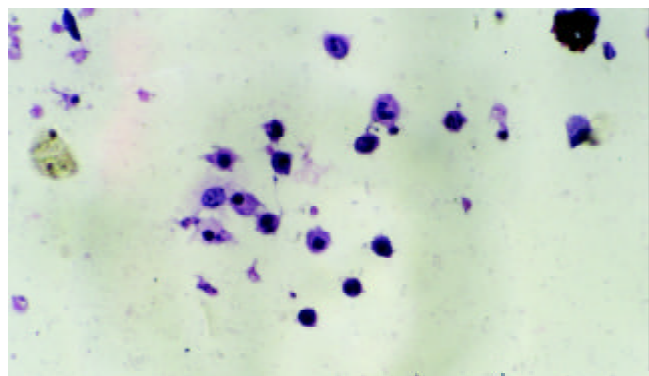


图2 实验组SMMC-7721HE染色出现的凋亡细胞.

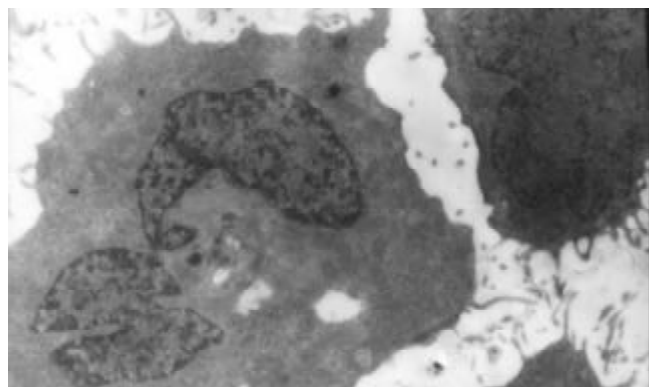


图3 对照组SMMC-7721细胞超微结构($\times 5\ 000$).

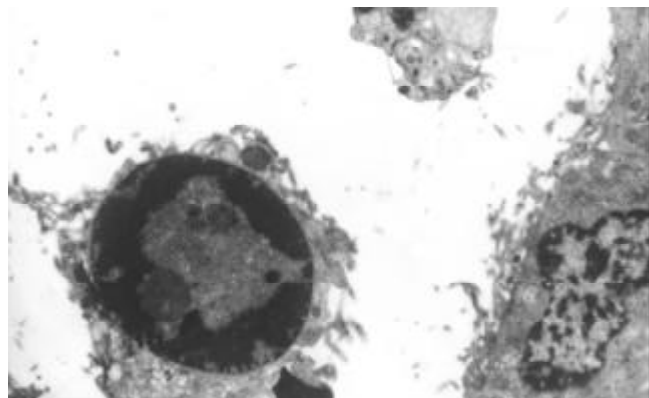


图4 48 h组凋亡SMMC-7721细胞超微结构($\times 5\ 000$).

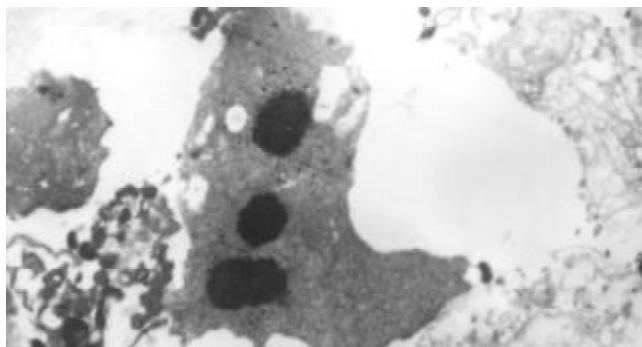


图5 72 h组出现的凋亡小体($\times 5000$).

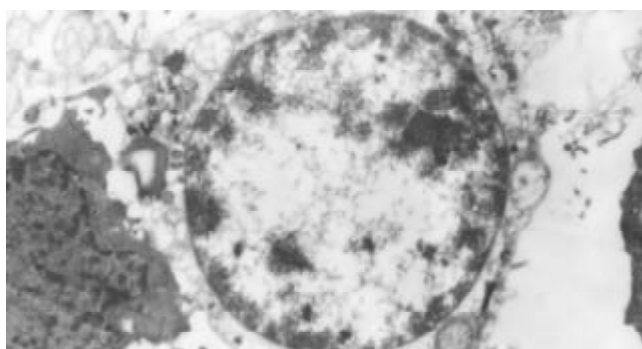


图6 坏死的SMMC-7721细胞($\times 5000$).

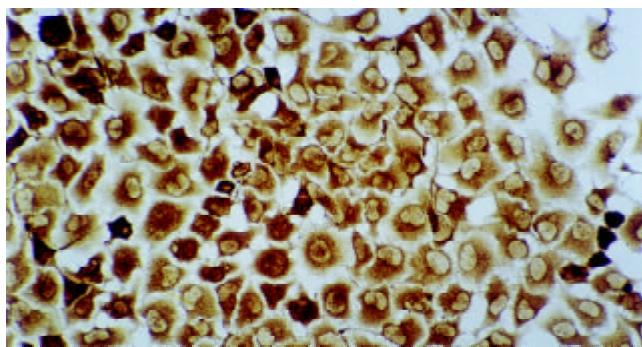


图7 对照组SMMC-7721细胞TVNET染色.

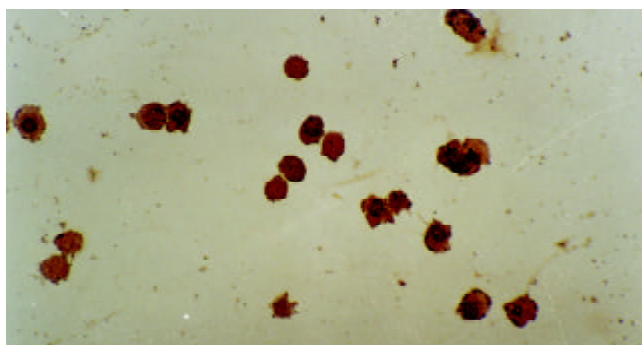


图8 SJ作用48h组凋亡细胞TVNEL染色.

3 讨论

肿瘤细胞经SJ作用后, 出现典型的凋亡征象, 说明诱导肿瘤细胞凋亡可能是SJ抗肿瘤作用的重要机制. 过去认为, 化疗药物引起细胞坏死是其抗肿瘤的主要机制, 但多数情况下, 药物有效浓度对肿瘤细胞的杀灭效率不足以解释其实际治疗效应, 随着细胞凋亡机制

研究的深入,发现许多抗肿瘤药物都具有诱导细胞凋亡的作用^[12,13].我们的观察证实SJ同样具此作用,分析这可能与SJ的主药鬼臼中内含鬼臼毒素^[14-17],可干扰细胞有丝分裂,抑制DNA合成而诱发凋亡有关.凋亡细胞由于内源性核酸内切酶被激活,细胞自身的染色质或DNA被切割,出现单链或双链缺口,并产生与DNA断点数目相同的3'-OH末端.末端脱氧核糖核酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transterase)可将地高辛标记的dUTP(DIG-dUTP)标记至3'-OH末端, DIG-dUTP结合在DNA断点部位,加入生物素标记的抗地高辛抗体(anti-DIG-biotin),再结合链酶亲和素-一过氧化物酶(SABC),最后加入底物DAB显色.原位末端标记技术(又称TUNEL法)即是依此原理建立起来的,这是目前公认的且已被各实验室采用的用于检测细胞凋亡的一种较为敏感和特异的检测技术.我们采用本法检测凋亡细胞.取片固定前加作一步离心涂片,再固定、染色,结果于SJ作用48 h组,镜下可见大量细胞核着棕黄色的凋亡细胞,进一步证实了SJ可诱导SMMC-7721细胞凋亡的作用.

近年来,关于中药抗癌作用及其机制的研究已成为抗肿瘤研究的新热点.我们之所以研究复方中药SJ抗肿瘤作用及其机制,主要是基于其长期可靠的临床疗效,试图从复方整体角度出发,在细胞和分子水平研究其抑癌作用及其机制,虽有些以管窥豹之意,但也可为SJ在临床治疗中的应用提供必要的理论依据,并力图探索一条从相关性、整体性角度出发进行复方研究的新思路,使富有哲理的中医理论具有现代科学内涵,研制出疗效更为确切的抗癌新药.

4 参考文献

- 1 沈云芳,庄蕙,沈健伟,陈士葆. 细胞凋亡与肿瘤. 世界华人消化杂志 1999;7:267-268
- 2 王炳元. 细胞凋亡与肝癌. 世界华人消化杂志 2002;10:425-427
- 3 刘丽娜. 细胞凋亡的分子机制. 世界华人消化杂志 2002;10:422-423
- 4 梁卫江,张万岱. 肿瘤坏死因子诱导细胞凋亡的信号传导机制. 世界华人消化杂志 2000;8:329-331
- 5 吕鹏,罗和生,余保平. 细胞凋亡与肝脏疾病. 世界华人消化杂志 2000;8:1157-1159
- 6 薛绪潮,方国恩,华积德. 胃癌与细胞凋亡. 世界华人消化杂志 1999;7:359-361
- 7 高虎,张方信,梁君蓉. 药物诱导细胞凋亡与胃癌治疗. 世界华人消化杂志 2000;8:795-796
- 8 郭玉庆,朱兆华,黎锦芳. 流式细胞术分析胃癌及癌前病变中细胞凋亡与增生. 世界华人消化杂志 2000;8:983-987
- 9 王立生,潘令嘉,陈村龙,李明松,孙勇,张亚历,周殿元. 双歧杆菌对裸鼠移植大肠癌增生与凋亡的原位研究. 世界华人消化杂志 2000;8:429-431
- 10 王剑明,邹倩,邹声泉. Bcl-2基因在阻塞性黄疸大鼠肝组织细胞凋亡中作用的研究. 世界华人消化杂志 1999;7:1035-1037
- 11 陈绪军,艾中立,刘志苏. 细胞凋亡-丝裂霉素致人肝细胞损伤机制的研究. 世界华人消化杂志 2000;8:746-750
- 12 郭伟剑,于尔辛,郑颂国,沈兆忠,罗建明,吴国华,夏士安. 健脾理气药诱导人肝癌细胞SMMC7721凋亡的研究. 世界华人消化杂志 2000;8:52-55
- 13 许岸高,李韶光,刘集鸿,沈剑刚,甘爱华. 黄参胶囊治疗胃癌的细胞凋亡及一氧化氮机制研究. 世界华人消化杂志 1999;7:364-365
- 14 杨璐璐,秦兴卫,杨倩. 桃耳七的研究现状及开发利用. 解放军药学报 2000;16:51-52
- 15 尚明英,徐珞珊,李萍,徐国钧,王俏先,蔡少青. 鬼臼类中药及其木脂素类成分的药效学研究. 中草药 2002;33:722-723
- 16 齐社宁,王镜. 4-[4''-(2'',2'',6'',6''-四甲基嘧啶氮氧自由基)氨基]-4'-去甲表鬼臼毒素诱导Raji肿瘤细胞凋亡的实验研究. 中国药理学通报 1999;15:187-188
- 17 陈再新,马维勇,王金娣,陈秀华,张椿年. 4-β-酯取代-4'-脱氧-4'-去甲表鬼臼毒素衍生物的合成及其抗肿瘤活性. 药理学学报 2000;35:353-357



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

