

ISSN 1009-3079

CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE

JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003 年 9 月 15 日 第 11 卷 第 9 期

(Volume 11 Number 9)



9/2003

ISSN 1009-3079



9 771009 307001

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 9 月 15 日 第 11 卷

第 9 期 (总第 113 期)

述 评

- 1269 胃肠道肿瘤的影像诊断和介入治疗 程英升, 尚克中
1273 胃食管反流病的内镜缝合治疗 杨云生, 令狐恩强

胃 癌

- 1275 α -连接素表达与胃癌生物学行为的关系 徐采朴, 周永宁, 陈渝
1279 老年人胃癌前黏膜癌变的胃镜随访 王孟薇, 杨少波, 张子其, 祝庆孚, 王刚石, 李晖, 姚晨, 吴本俨, 尤纬缔
1282 内皮抑素-血管内皮细胞抑制因子重组腺病毒对荷胃癌裸鼠的治疗 潘欣, 李喆, 张珉, 王泳, 潘卫, 戚中田
1286 PKC β 1 和 PKC β 2 在早期胃癌中的表达 冯瑞娥, 陈杰, 崔全才, 詹阳, 王振宇
1290 二烯丙基二硫对人胃癌 MGC803 细胞生长的影响 张良运, 凌晖, 苏琦, 宋颖, 梁晓秋
1294 胃黏膜癌变过程中 PTEN 基因编码产物的表达及意义 李异玲, 何向民, 郑华川, 吴东璘, 杨雪飞, 辛彦, 傅宝玉
1297 进展期胃癌病理和预后影响因素的关系 黄海力, 吴本俨, 尤纬缔, 申明识
1302 雌激素诱导基因 PS2/TFF1 在胃癌及癌前病变中的表达 李俊美, 罗和生, 姚宏昌
1306 GSTM1, GSTT1 基因多态与胃腺癌及幽门螺杆菌感染的关联 张友才, 邓长生, 周燕, 朱尤庆
1310 基质金属蛋白酶-7 表达与胃癌临床病理生物学行为的关系 孙晋民, 郑华川, 杨雪飞, 辛彦, 张荫昌
1314 毒物代谢酶基因多态与胃癌的关联 叶梅, 刘君炎, 邓长生
1318 胃癌中医证型相关基因的表达谱 刘莺, 李俊军, 朱文锋, 刘平

肝 癌

- 1322 MUC1 基因免疫抑制 H22 肝癌生长的实验研究 袁时芳, 王岭, 李开宗, 颜真, 韩苇, 张英起
1326 纺锤体组装关卡基因 hsMAD2 在人肝细胞肝癌中的表达及其意义 李擒龙, 王文亮, 张晓晖, 晏伟
1329 GnRH 类似物诱导肝癌细胞凋亡的体外研究 刘庆元, 窦科峰, 张金山, 孙岚, 黄鲁豫, 张远强
1333 bFGF 对人肝癌细胞系 Bel-7402 的生长调控 于卉影, 孙利平, 孙黎光, 丁晓慧
1337 经肝动脉注射 5-FU 白苕微球治疗兔 VX₂ 移植性肝癌 李欣, 冯敦生, 郑传胜, 柳曦, 孔健
1341 KAI1 正反义基因对 MHCC97-H 肝癌细胞 KAI1 蛋白表达的影响 司遂海, 杨建民, 罗元辉, 房殿春, 周平
1345 中药复方胃肠安血清诱导肝癌 SMMC-7721 细胞分化 赵海磊, 刘成, 赵爱光
1349 肝癌患者乙型肝炎病毒 X 基因变异的研究 代志琰, 徐启桓, 李刚, 马会慧, 汤正好, 舒欣, 姚集鲁
1353 复方中药 99-克星超声介入治疗肝癌裸鼠移植瘤凋亡与增生 林晓东, 林礼务, 何以教, 高上达, 杨发端, 薛恩生
1357 羟基磷灰石纳米粒子诱导人肝癌细胞凋亡模型的构建 刘志苏, 唐胜利, 艾中立, 孙权, 钱群, 何跃明, 朱忠超
1362 β -catenin 和 Cyclin D1 在肝癌肝内转移中的作用 苏小康, 赵先明, 李锦清, 崔学教, 谢晓华, 杨海燕, 徐发彬, 石明
1365 DC 负载凋亡肝癌细胞后的免疫应答 郭建巍, 秦力维, 蔡美英, 吕同德
1369 TRAIL 诱导肝癌细胞系 SMMC-7721 的凋亡作用 李小安, 房殿春, 司佩任, 张汝刚, 杨柳芹, 秦建平

大 肠 癌

- 1372 大肠肿瘤组织线粒体形态结构定量研究 吴正蓉, 申洪
1375 IL-4 增强 IL-2 活化的 A-NK 细胞对人直肠癌 CC95 的抗肿瘤作用 王志华, 申宝忠, 史历
1378 人源性大肠癌抗原基因的 SEREX 筛选 刘宇虎, 张振书, 钟东, 武金宝, 但汉雷, 赖卓胜, 王亚东, 张亚历, 肖冰
1382 直肠癌组织 CD44v6, DNA 含量的联合检测及临床意义 丁志杰, 单吉贤, 都姝妍
1385 胃泌素拮抗剂增加 CD 自杀基因对结直肠癌细胞的杀伤作用 王小军, 马庆久, 赖大年, 黎成金, 李金茂, 武永忠, 王青
1389 aFGF 和 genistein 对大肠癌细胞株 CCL229 PKC 及 ERK 活性的影响 尚海, 张颐, 单吉贤

基础 研究

- 1392 牛磺酸对 CCl₄ 诱导的太鼠肝纤维化的保护作用及其机制的研究 梁健, 杨光业, 张锡流, 庞玉生, 袁海峰, 梁劲松, 黄仁彬, 韦新, 韦明
1396 胰腺移植 ICAM-1 的表达及信号转导的因素 梁健, 王凤山, 刘永锋, 刘利民, 刘树荣, 崔宏, 邵春泉, 何三光

临床研究	1399 聚乙二醇 4 000 治疗老年人功能性便秘 85 例 张长青, 张国伟, 张葵玲, 付奕其
焦点论坛	1402 胃肠道肿瘤的影像诊断和介入治疗 程英升 1402 胃肠道肿瘤的 X 线诊断 尚克中, 程英升, 吴春根 1404 胃肠道肿瘤 CT 诊断 吴春根, 程英升, 尚克中 1406 胃肠道肿瘤 MRI 诊断 吴春根, 程英升, 尚克中 1408 胃肠道肿瘤超声诊断 胡兵, 周进祝 1410 胃肠道肿瘤核素诊断 陆汉魁 1413 胃肠道肿瘤血管和非血管双介入治疗 程英升, 尚克中
治疗指南	1416 肝细胞癌的诊断和治疗 陆嵘, 房静远
文献综述	1420 DNA 高甲基化与抑癌基因 刘仲敏, 刘芝华, 吴旻 1425 胃癌供血及其动脉介入化疗的研究进展 沈波, 朱金水 1429 腹膜粘连的分子机制及药物防治 曾健, 李晓辉 1433 肿瘤多药耐药和进展期大肠癌耐药细胞株建立研究进展 姚学清, 林锋 1436 肽转运载体的分子特征 韩飞, 施用晖, 乐国伟, 王立宽 1443 肝星状细胞与肝纤维化的研究进展 蒋业贵, 李兆申 1447 环氧化酶-2 与结直肠癌 姚红兵, 吴爱国, 朱卉娟 1451 幽门螺杆菌疫苗的研究进展 姜政, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙 1457 脂肪酸结合蛋白研究进展 冯爱娟, 陈东风 1460 肝移植后乙型肝炎病毒再感染相关因素的研究进展 王永刚, 王宇明
读者来信	1352 陈祖林 1368 汤伟
消息	1301 欢迎订阅 2004 年度世界华人消化杂志 1332 欢迎订阅 2004 年度 World Journal of Gastroenterology® 1424 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊 1450 WJG 搭建我国消化基础 and 临床研究惟一国际交流的平台 1464 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
封面故事	巴松湖又名错宗湖, 在藏文里又是绿色湖水的意思, 位于西藏林芝地区工布江达县境内, 该湖湖面海拔 3464 m, 是川藏东部最大的淡水堰塞湖之一。湖水清澈见底, 四周雪山倒映其中, 湖周原始森林密布, 群山环绕, 景美如画。湖中央飘着一座秀丽的湖心小岛, 湖心岛上有一座错宗寺, 建于唐代末年。(马俐 马娜 摄影)。

世界华人消化杂志

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 2003-09-15

原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀

黄象谦

黎介寿

刘耕陶

裘法祖

汤钊猷

王宝恩

危北海

吴孟超

吴成中

张金哲

张学庸

赵东海

周殿元

社长总编辑 马连生

中文编辑 潘伯荣

王瑾晖

英文编辑 王先林

排版 李少华

校对 李天华

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: wjcd@wjgnet.com

出版 世界胃肠病学杂志社

100023, 北京市 2345 信箱

E-mail: wjcd@wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

电话 (010)85381892

传真 (010)85381893

印刷 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

本刊已被国内外

检索系统收录

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(PJ)》

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)

特别声明

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

羟基磷灰石纳米粒子诱导人肝癌细胞凋亡模型的构建

刘志苏, 唐胜利, 艾中立, 孙权, 钱群, 何跃明, 朱忠超

刘志苏, 唐胜利, 艾中立, 孙权, 钱群, 何跃明, 朱忠超, 湖北武汉大学中南医院普外科 湖北省武汉市 430071

刘志苏, 男, 1953-06-20 生, 湖北省罗田人, 汉族. 1977 年湖北医科大学临床医学系本科毕业, 1992 年华西医科大学博士研究生毕业, 主任医师、教授、博士研究生导师. 主要从事肝、胆、胰疾病的研究.

项目负责人: 刘志苏, 430071, 湖北省武汉市武昌区东湖路 169 号, 湖北武汉大学中南医院普外科. hyfr@mail.wh.cei.gov.cn

电话: 027-87331752 传真: 027-87330795

收稿日期: 2002-12-24 接受日期: 2003-01-08

Establishment of apoptotic model induced by hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma cell line BEL-7402

Zhi-Su Liu, Sheng-Li Tang, Zhong-Li Ai, Quan Sun, Qun Qian, Yue-Ming He, Zhong-Chao Zhu

Zhi-Su Liu, Sheng-Li Tang, Zhong-Li Ai, Quan Sun, Qun Qian, Yue-Ming He, Zhong-Chao Zhu, Department of General Surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China.

Correspondence to: Zhi-Su Liu, Department of General Surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China. hyfr@mail.wh.cei.gov.cn

Received: 2002-12-24 Accepted: 2003-01-08

Abstract

AIM: To establish an apoptotic model induced by hydroxyapatite (HAP) nanoparticles in human hepatoma cell line *in vitro* in order to explore the mechanism of nanoparticles-induced apoptosis.

METHODS: The selected human hepatoma cell line BEL-7402 was treated with HAP nanoparticles at different concentrations and for various durations of time. Growth suppression was evaluated by MTT method. Apoptosis-related alterations in morphology and biochemistry were ascertained under cytochemical staining (Hoechst 33 258), transmission electron microscopy (TEM), and DNA agarose gel electrophoresis. Flow cytometry (FCM) was used to investigate the apoptotic rate.

RESULTS: HAP nanoparticles inhibited the growth of hepatoma cells in a dose and time-dependent manner. After BEL-7402 cells were treated with 50-200 mg/L HAP nanoparticles for 48 h, apoptosis with nuclear chromatin condensation and fragmentation as well as cell shrinkage were observed using fluorescent staining and TEM. DNA ladder could be demonstrated on DNA electrophoresis. By FCM analysis, the apoptotic rates at concentrations of 0 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L were 2.2 %, 20.3 %, 25.3 %, 29.8 %, 45.1 % and 53.1 %, respectively. Cell apoptosis began approximately at 12h after administration of 50 mg/L and peaked at 48 h following treatment. The rates at 12, 24, 36, and 48 h were 2.7 %, 3.5 %, 6.3 %, and 21.4 %, respectively.

CONCLUSION: HAP nanoparticles not only inhibit proliferation but also induce apoptosis of human hepatoma cell line BEL-7402 *in vitro*. The successful establishment of this model will help further explore the molecular mechanism of hepatoma cells apoptosis.

Liu ZS, Tang SL, Ai ZL, Sun Q, Qian Q, He YM, Zhu ZC. Establishment of apoptotic model induced by hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma cell line BEL-7402. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(9):1357-1361

摘要

目的: 建立羟基磷灰石纳米粒子体外诱导人肝癌细胞凋亡的模型, 为进一步研究纳米粒子诱导肝癌细胞凋亡的分子机制奠定基础.

方法: 用羟基磷灰石纳米粒子以不同终浓度、不同时间作用于人肝癌 BEL-7402 细胞, 用细胞毒性实验(MTT 比色法)观察其细胞毒性, 倒置相差显微镜、荧光显微镜、透射电镜、DNA 琼脂糖凝胶电泳等方法观察凋亡在形态学和生化方面的变化. 流式细胞仪分析以进一步了解凋亡发生的时间和程度.

结果: 羟基磷灰石纳米粒子以剂量依赖和时间依赖的方式抑制 BEL-7402 细胞的生长. 50-200 mg/L 的纳米粒子处理 48 h 后, 形态学上, 肝癌细胞表现为细胞皱缩、核质浓缩、核碎裂、细胞起泡以及凋亡小体形成等凋亡特征. 琼脂糖凝胶电泳观察到 DNA “梯带”. 流式细胞仪定量分析, 0, 50、75、100、150、200 mg/L 浓度下调亡率分别为 2.2 %, 20.3 %, 25.3 %, 29.8 %, 45.1 % 和 53.1 %. 50 mg/L 作用 12 h 后肝癌细胞出现凋亡, 48 h 达高峰, 12, 24, 36, 48 h 细胞凋亡率分别为 2.7 %, 3.5 %, 6.3 % 和 21.4 %.

结论: 羟基磷灰石纳米粒子既能抑制人肝癌 BEL-7402 细胞增生, 又能诱导其凋亡, 该凋亡模型的成功建立将有助于进一步探讨纳米粒子诱导肝癌细胞凋亡的分子机制.

刘志苏, 唐胜利, 艾中立, 孙权, 钱群, 何跃明, 朱忠超. 羟基磷灰石纳米粒子诱导人肝癌细胞凋亡模型的构建. *世界华人消化杂志* 2003;11(9):1357-1361
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1357.asp>

0 引言

纳米技术 1990 年代取得了突破性进展, 其在医学领域的应用开创了纳米医学研究的新篇章. 羟基磷灰石纳米粒子(hydroxyapatite nanoparticles)是随之发展起来的一种新型纳米材料. 已有研究发现其对癌细胞的生长有抑制

作用,且抗瘤谱广,但在诱导癌细胞凋亡方面国内外尚未见报道.我们从羟基磷灰石纳米粒子诱导人肝癌 BEL-7402 细胞凋亡的角度探讨其抑制癌细胞生长的机制,为纳米材料用于临床提供理论依据和实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 羟基磷灰石纳米粒子由华东理工大学生物材料中心提供,用培养液配制成浓度 400 mg/L 的溶胶,0.22 μ m 滤膜过滤除菌备用; RNase 酶、蛋白酶 K、碘化丙啶(PI)及 Hoechst 32258 荧光染色剂购于 Sigma 公司; RPMI1640 培养基、小牛血清、MTT 购自 Gibco 公司; MODEL2300 型 CO₂ 培养箱, Shellab 公司; BH-2 型荧光显微镜, Olympus 公司; Hitachi-600 型透射电镜,日立公司; FACSort 流式细胞仪, Becton Dickinson 公司. 人肝癌细胞系 BEL-7402, 武汉大学中国典型培养物保藏中心(CCTCC)提供,培养于含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养液中, 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂ 培养箱内常规传代培养. 细胞贴壁生长 24 h, 至 70-80% 单层后更换含药培养基进行实验.

1.2 方法 细胞毒性实验(MTT 比色法)参考(Hussain J Immunol Methods 1993; 160: 89)方法,取密度为 2×10^5 /L 的细胞接种于 96 孔培养板中每孔 200 μ L, 培养 24 h 后,弃原培养液,加含不同浓度药物的新培养液,各为 200, 50, 12.5 mg/L 及对照(0 mg/L),每浓度设 8 个复孔,分别作用 24, 48, 72 h 后,加入新配制的 MTT 液每孔 20 μ L,置 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱内培养作用 4h,小心吸去上清液,加入二甲亚砜(DMSO) 150 μ L,在振荡器上轻轻振荡 5 min 后,用酶标仪于 490 nm 处测吸光度值(A 值).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) \times 100%,以横坐标为时间,纵坐标为抑制率,绘制细胞生长抑制曲线.预定时间倒置相差显微镜观察不同浓度作用的细胞的生长情况.收集 200, 150, 100, 75, 50, 0 mg/L (对照)药物作用 48 h 后的肝癌细胞,离心, PBS 缓冲液洗涤, 3:1 甲醇/冰醋酸固定液固定 10 min,再离心,留取少量固定液悬浮细胞;于盖玻片上用荧光染液 Hoechst33258 染色 45 min;将有细胞一面的盖玻片封盖在预滴封片液的载玻片上,自然晾干,在 BH-2 荧光显微镜下观察并摄影.收集接种于 T-25 培养瓶内,经 100 mg/L 药物处理 48 h 后的细胞, 30 g/L 戊二醛固定,再用 10 g/L 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.细胞溶解于裂解缓冲液 400 μ L 中, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清,加蛋白酶 K 及 RNase 置 50 $^{\circ}$ C 孵育 2 h.再加入 NaCl 及同体积异丙醇 -20 $^{\circ}$ C 过夜,离心去上清,700 mL/L 乙醇溶解沉淀,离心后空气干燥.加 TE 9 μ L 和载样缓冲液 1 μ L, 15 g/L 琼脂糖凝胶, 35 V 电压,电泳 2 h.紫外灯下观察并摄影.收集经羟基磷灰石纳米粒子(0, 50, 75, 100, 150, 200 mg/L)处理 48 h 和

50 mg/L 浓度处理 12, 24, 36, 48 h 的细胞,用胰酶消化制成单细胞悬液,离心弃上清,沿管壁缓慢加入 700 mL/L 预冷(-20 $^{\circ}$ C)乙醇 1 mL 固定,(注意边加边振荡,以免细胞成团),4 $^{\circ}$ C 过夜后再经 PBS 洗 2 次, 100 μ L RNA 酶(100 mg/L)消化, 37 $^{\circ}$ C 30 min,再加入 50 mg/L PI 染色液 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 避光 30 min 后上机测试,采用 FACSort 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.

统计学处理 所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,实验组与对照组比较行 t 检验.

2 结果

2.1 羟基磷灰石纳米粒子对细胞生长的影响 MTT 检测结果显示纳米粒子对肝癌细胞的抑制率均随着剂量的增大和作用时间的延长而增强,同时间不同浓度组与其对照组比较均有极显著性差异(表 1).

表 1 羟基磷灰石纳米粒子对 BEL-7402 细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s$, A_{490nm}, n=8)

t/h	浓度 (mg/L)			
	0	12.5	50	200
24	0.721 \pm 0.041	0.536 \pm 0.035	0.485 \pm 0.036 ^b	0.425 \pm 0.030 ^b
48	0.933 \pm 0.035	0.501 \pm 0.088 ^b	0.395 \pm 0.040 ^b	0.259 \pm 0.027 ^b
72	0.973 \pm 0.021	0.438 \pm 0.040 ^b	0.345 \pm 0.035 ^b	0.201 \pm 0.031 ^b

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 0 mg/L.

2.2 显微镜观察 倒置相差显微镜下见对照组肝癌细胞贴壁生长,核膜、核仁轮廓明显,核糖体颗粒丰富胞质饱满,相邻细胞生长融合成片;经 HAP 处理的各组细胞, 24 h 后观察见细胞逐渐由贴壁而脱落, 48 h 脱落更明显,脱落细胞悬浮于培养液中,细胞形态变圆,折光性差,生长增生明显受抑.细胞经 Hoechst 33258 染色后,荧光显微镜下见对照组 BEL-7402 细胞胞膜完整,胞质丰富,核形态饱满,表现为弥散均匀的蓝色荧光.而处理组可见核体积缩小,荧光染色增强,染色质呈致密浓染的块状或颗粒状荧光以及凋亡小体形成,呈现典型的凋亡形态特征.而且随浓度增加凋亡细胞增多(图2).镜下计算各浓度组凋亡率, 50, 75, 100, 150, 200 mg/L 分别为 18.7%、22.3%、33.5%、49.0% 和 57.2%.透射电镜观察下对照组细胞胞质密度高,细胞器正常,染色质均匀分散、密度一致,核膜完整,核仁大且完整(图3A);而经羟基磷灰石纳米粒子处理的细胞发生皱缩,胞质空泡形成,细胞核固缩、染色质凝集、染色质聚集于核膜周边形成数个团块或境界分明的新月形小体(图3B).

2.3 琼脂糖凝胶电泳 不同浓度羟基磷灰石纳米粒子作用 48 h 后,对照组仅显示基因组,当浓度为 100 mg/L, 200 mg/L 时出现典型的梯状带.

2.4 流式细胞仪检测 DNA直方图上可见亚二倍体峰(即AP峰apoptotic peak), 此一低DNA含量的亚二倍体峰的百分比, 即为细胞的凋亡率(图4). 0、50、75、100、150、200 mg/L 羟基磷灰石纳米粒子作用48 h后的细胞凋亡率分别为2.2%, 20.3%, 25.3%, 29.8%, 45.1%和53.1%. 相关分析示二者呈高度正相关($r=0.994$, $P<0.01$); 回归方程为 $y_{\text{凋亡率}}=0.0842+0.0023 \times \text{浓度}$, 计算得半数有效凋亡浓度 $EC_{50}=181.82 \text{ mg/L}$. 50 mg/L 作用12, 24, 36, 48 h 凋亡率为2.7%, 3.5%, 6.3%和21.4%.

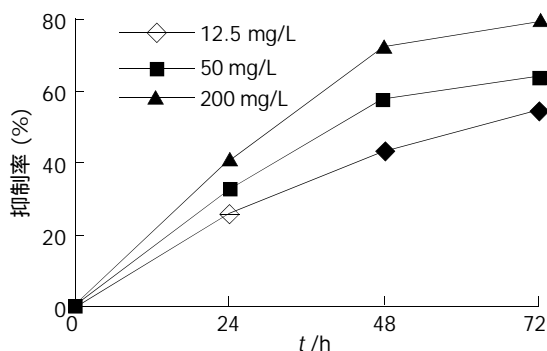


图1 不同浓度羟基磷灰石纳米粒子和作用时间对BEL-7402细胞的生长抑制作用.

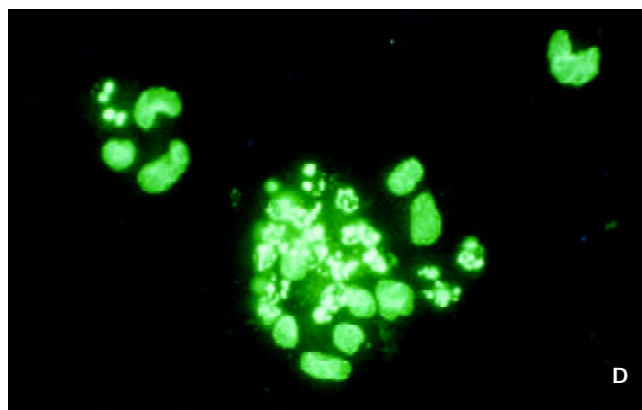
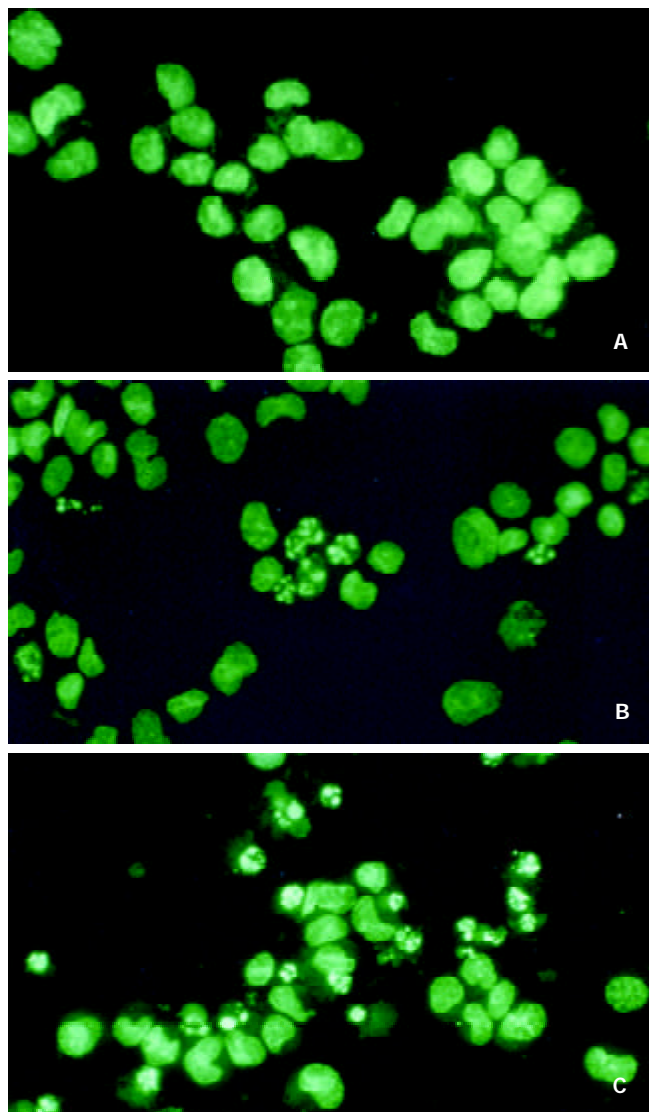
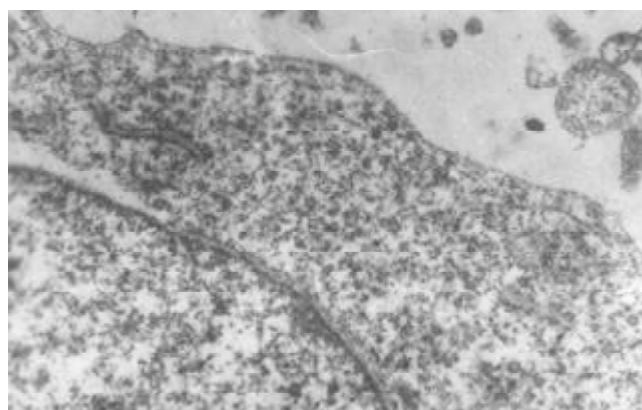
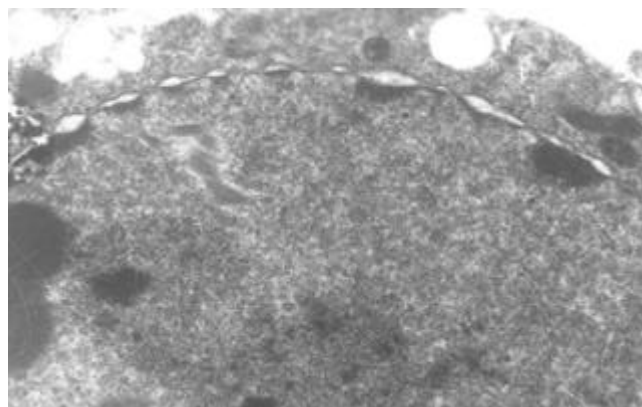


图2 HAP 纳米粒子作用48h后BEL-7402细胞凋亡的荧光显微镜检查 $\times 200$.
A 对照组; B 50 mg/L; C 100 mg/L; D 200 mg/L.

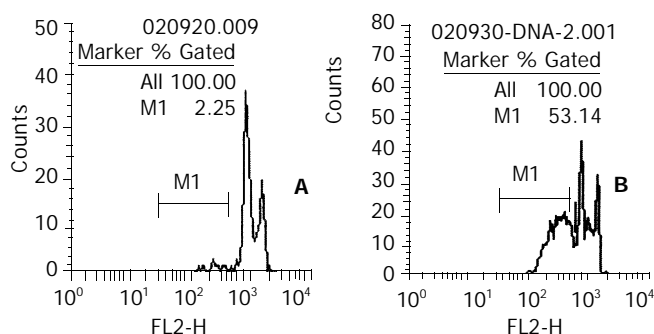


A 对照组;



B 100 mg/L.

图3 HAP 纳米粒子作用48 h后BEL-7402细胞凋亡的透射电镜检查 $\times 15000$.



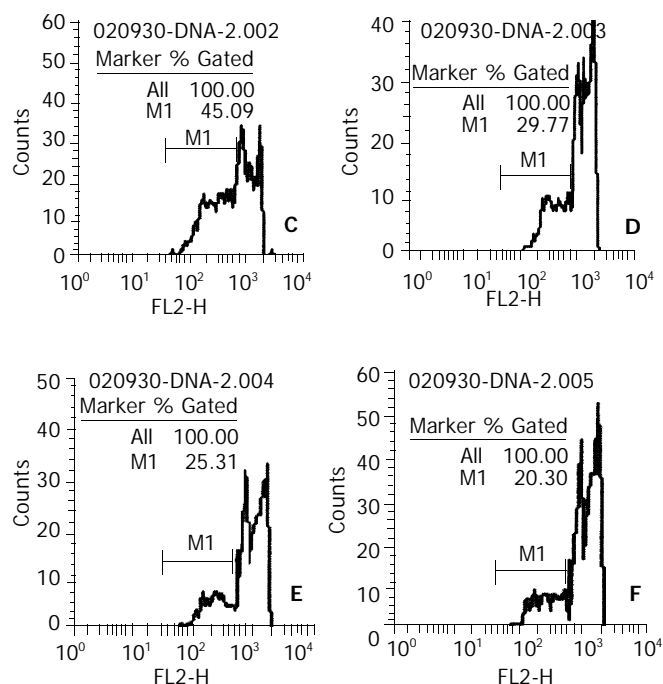


图4 HAP纳米粒子作用48 h后BEL-7402细胞凋亡的流式细胞术分析。A 对照组; B 50 mg/L; C 75 mg/L; D 100 mg/L; E 150 mg/L; F 200 mg/L。凋亡率分别为2.2 %; 20.3 %; 25.3 %; 29.8 %; 45.1 %; 53.1 %。

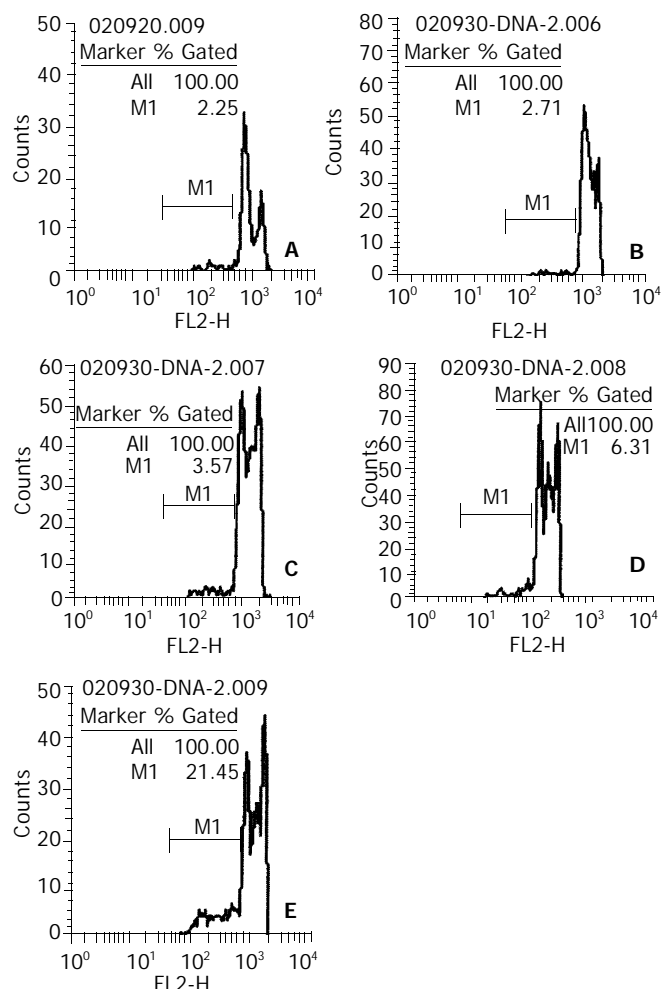


图5 50 mg/L HAP纳米粒子作用不同时间后BEL-7402细胞凋亡的流式细胞术分析。A 对照组; B 12 h; C 24 h; D 36 h; E 48 h。凋亡率分别为2.2 %; 2.7 %; 3.6 %; 6.3 %; 21.4 %。

3 讨论

肿瘤的发生和发展不仅与细胞的分化异常及增生过度有关,而且与其细胞凋亡的减少密切相关^[1-8]。而一旦细胞增生与凋亡失控,则可导致肿瘤的发生^[9-25]。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。迄今为止,已证实化疗药物、生长抑素类似物、砷剂及多种中药成分^[26-37]都能以诱导细胞凋亡的方式抑制肿瘤细胞生长。羟基磷灰石 $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ 简称HAP是人类骨无机组成的主要成分,有很好的组织相容性及黏附性,其粉末用作骨缺损部位的填补材料已被广泛应用于临床。本研究用羟基磷灰石纳米粒子由溶胶-凝胶法合成,其粒径为50 nm左右,介于0.1-100 nm(纳米级范围)间,表现出纳米粒子所独有的小尺寸效应,表面与界面效应,量子尺寸效应,宏观量子隧道效应,具有高溶解度,高表面能,强的离子交换能力,强极化力等特性。作用于体外培养的人肝癌BEL-7402细胞后,MTT毒性实验显示其对肝癌细胞的生长增生具有较强的抑制作用,呈明显的剂量效应和时间效应关系。低浓度时即有明显的抑制作用,高浓度时此作用更强;24 h时细胞抑制率都未达到50%,48 h时是BEL-7402细胞对羟基磷灰石纳米粒子作用较敏感的时期,抑制率升高非常明显,作用72 h抑制率继续升高,但增幅并不大。这一结果与文献报道羟基磷灰石溶胶(HAP Sol)对W-256癌肉瘤细胞和艾氏腹水瘤细胞作用24 h后,半数有效抑制浓度分别为189 mg/L和210 mg/L相当。MTT毒性实验结果有助于指导羟基磷灰石纳米粒子的实际应用,便于选择合适的浓度和作用时间。

倒置相差显微镜亦显示羟基磷灰石纳米粒子作用后,肝癌细胞贴壁能力下降,细胞悬浮于培养液中,浓度越高,作用时间越长,悬浮细胞越多,与MTT毒性实验结果相一致。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。琼脂糖凝胶电泳显示DNA梯状带型,呈细胞凋亡典型的生化改变,并且浓度越高,梯状带型越明显。

FCM分析则定量检测细胞凋亡,其结果与MTT法所示剂量依赖效应和时间依赖效应相一致。不同浓度作用48 h后细胞凋亡率与荧光显微镜下计数结果相符合,相关分析示细胞凋亡率与浓度呈高度正相关;回归分析得半数有效凋亡浓度 $\text{EC}_{50}=181.82 \text{ mg/L}$,而在MTT毒性实验中,同一浓度作用48 h后的细胞抑制率接近70%。此结果表明羟基磷灰石纳米粒子对人肝癌BEL-7402细胞的抑制作用中,诱导细胞凋亡占主要作用。纵观不同浓度的细胞抑制率和凋亡率,纳米粒子浓度越高,诱导细胞凋亡作用越强。浓度为50 mg/L的纳米粒子作用不同时间后,36 h凋亡率都较低,小于10%,48 h增至21.64%,说明48 h后羟基磷灰石纳米粒子对BEL-7402细胞的凋亡诱导作用可达到高峰。因此实际

应用中作用时间应以 48 h 或更长时间为宜, 以达到较好的凋亡诱导率。

总之, 本实验结果表明在体外羟基磷灰石纳米粒子能以诱导细胞凋亡的方式抑制肝癌细胞的生长。该凋亡模型的成功建立, 为进一步探讨细胞凋亡发生的机制奠定了基础。

4 参考文献

- He SW, Shen KQ, He YJ, Xie B, Zhao YM. Regulatory effect and mechanism of gastrin and its antagonists on colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 1999;5:408-416
- Tian G, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Yue H, Li JY, Mei Q. Effect of nimesulide on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:483-487
- Tao HQ, Zou SC. Effect of preoperative regional artery chemotherapy on proliferation and apoptosis of gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:451-454
- Liu S, Wu Q, Ye XF, Cai JH, Huang ZW, Su WJ. Induction of apoptosis by TPA and VP-16 is through translocation of TR3. *World J Gastroenterol* 2002;8:446-450
- Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:385-392
- Tanaka S, Akaike T, Fang J, Beppu T, Ogawa M, Tamura F, Miyamoto Y, Maeda H. Antiapoptotic effect of haem oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumour. *Br J Cancer* 2003;88:902-909
- Shigeno M, Nakao K, Ichikawa T, Suzuki K, Kawakami A, Abiru S, Miyazoe S, Nakagawa Y, Ishikawa H, Hamasaki K, Nakata K, Ishii N, Eguchi K. Interferon-alpha sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and NF-kappaB inactivation. *Oncogene* 2003;22:1653-1662
- Perez EA, Gandara DR, Edelman MJ, O'Donnell R, Lauder II, DeGregorio M. Phase I trial of high-dose tamoxifen in combination with cisplatin in patients with lung cancer and other advanced malignancies. *Cancer Invest* 2003;21:1-6
- Lin HL, Lui WY, Liu TY, Chi CW. Reversal of Taxol resistance in hepatoma by cyclosporin A: involvement of the PI-3 kinase-AKT 1 pathway. *Br J Cancer* 2003;88:973-980
- Yamashita H, Iwase H, Toyama T, Fujii Y. Naturally occurring dominant-negative Stat5 suppresses transcriptional activity of estrogen receptors and induces apoptosis in T47D breast cancer cells. *Oncogene* 2003;22:1638-1652
- Shen ZY, Shen J, Li QS, Chen CY, Chen JY, Yi Z. Morphological and functional changes of mitochondria in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenic trioxide. *World J Gastroenterol* 2002;8: 31-35
- Shen ZY, Shen WY, Chen MH, Shen J, Cai WJ, Yi Z. Nitric oxide and calcium ions in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenite. *World J Gastroenterol* 2002;8:40-43
- Sun ZJ, Pan CE, Liu HS, Wang GJ. Anti-hepatoma activity of resveratrol in vitro. *World J Gastroenterol* 2002;8:79-81
- Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu JY. Growth inhibition and apoptosis induction of Sulindac on Human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7: 796-800
- Li J, Yang XK, Yu XX, Ge ML, Wang WL, Zhang J, Hou YD. Overexpression of p27 (KIP1) induced cell cycle arrest in G (1) phase and subsequent apoptosis in HCC-9204 cell line. *World J Gastroenterol* 2000;6:513-521
- Chen YN, Chen JC, Yin SC, Wang GS, Tsauer W, Hsu SF, Hsu SL. Effector mechanisms of norcantharidin-induced mitotic arrest and apoptosis in human hepatoma cells. *Int J Cancer* 2002;100:158-165
- Sun BH, Zhao XP, Wang BJ, Yang DL, Hao LJ. FADD and TRADD expression and apoptosis in primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2000;6:223-227
- Pals DR, Thompson CB. Cell metabolism in the regulation of programmed cell death. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:75-78
- Shan CM, Li J. Study of apoptosis in human liver cancers. *World J Gastroenterol* 2002;8:247-252
- Misawa M, Tauchi T, Sashida G, Nakajima A, Abe K, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Inhibition of human telomerase enhances the effect of chemotherapeutic agents in lung cancer cells. *Int J Oncol* 2002;21:1087-1092
- Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *Int J Oncol* 2003;22:107-113
- Satomi D, Takiguchi N, Koda K, Oda K, Suzuki H, Yasutomi J, Ishikura H, Miyazaki M. Apoptosis and apoptosis-associated gene products related to the response to neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer. *Int J Oncol* 2002;20:1167-1171
- Tu SP, Zhong J, Tan JH, Jiang XH, Qiao MM, Wu YX, Jiang SH. Induction of apoptosis by arsenic trioxide and hydroxy camptothecin in gastric cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2000;6:532-539
- Zhao AG, Zhao HL, Jin XJ, Yang JK, Tang LD. Effects of Chinese Jianpi herbs on cell apoptosis and related gene expression in human gastric cancer grafted onto nude mice. *World J Gastroenterol* 2002;8:792-796
- Li JM, Zhou H, Cai Q, Xiao GX. Role of mitochondrial dysfunction in hydrogen peroxide-induced apoptosis of intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:562-567
- Ma L, Tai H, Li C, Zhang Y, Wang ZH, Ji WZ. Photodynamic inhibitory effects of three perylenequinones on human colorectal carcinoma cell line and primate embryonic stem cell line. *World J Gastroenterol* 2003;9:485-490
- Zhang JK, Li J, Zhang J, Chen HB, Chen SB. Antitumor immunopreventive and immunotherapeutic effect in mice induced by hybrid vaccine of dendritic cells and hepatocarcinoma in vivo. *World J Gastroenterol* 2003;9:479-484
- Li QF, Ou-Yang GL, Peng XX, Hong SG. Effects of tachyplesin on the regulation of cell cycle in human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:454-458
- Zhou HB, Zhu JR. Paclitaxel induces apoptosis in human gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:442-445
- Zhou HB, Yan Y, Sun YN, Zhu JR. Resveratrol induces apoptosis in human esophageal carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:408-411
- Liu WB, Yang CQ, Jiang W, Wang YQ, Guo JS, He BM, Wang JY. Inhibition on the production of collagen type I, III of activated hepatic stellate cells by antisense TIMP-1 recombinant plasmid. *World J Gastroenterol* 2003;9:316-319
- Huang ZH, Fan YF, Xia H, Feng HM, Tang FX. Effects of TNP-470 on proliferation and apoptosis in human colon cancer xenografts in nude mice. *World J Gastroenterol* 2003;9:281-283
- Wu BW, Wu Y, Wang JL, Lin JS, Yuan SY, Li A, Cui WR. Study on the mechanism of epidermal growth factor-induced proliferation of hepatoma cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:271-275
- Chen C, Liu FK, Qi XP, Li JS. The study of chemiluminescence in gastric and colonic carcinoma cell lines treated by anti-tumor drugs. *World J Gastroenterol* 2003;9:242-245
- Xie DP, Chen LB, Liu CY, Liu JZ, Liu KJ. Effect of oxytocin on contraction of rabbit proximal colon in vitro. *World J Gastroenterol* 2003;9:165-168
- Shi M, Wang FS, Wu ZZ. Synergetic anticancer effect of combined quercetin and recombinant adenoviral vector expressing human wild-type p53, GM-CSF and B7-1 genes on hepatocellular carcinoma cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2003; 9:73-78
- Liu JW, Tang Y, Shen Y, Zhong XY. Synergistic effect of cell differential agent-II and arsenic trioxide on induction of cell cycle arrest and apoptosis in hepatoma cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:65-68



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

