

作用. 本实验单从胃泌素指标来看全方组的作用不是最佳, 但从我们所做的一系列实验综合评价其疗效, 全方组最佳, 同时也说明胃溃疡的发生与愈合不只与胃泌素的表达相关, 而是多因素交互作用的结果. 全方是从多层次、多靶点进行整体调节的综合作用, 需要多学科、多角度对其配伍进行深入研究. 依单个药理指标评价全方有局限性.

#### 4 参考文献

- 1 Dockray GJ. Clinical endocrinology and metabolism. Gastrin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2004;18:555-568
- 2 李宇航, 王庆国, 牛欣, 顾立刚, 刘薇, 王新月, 贾玉森, 杨美娟, 王洪飞, 李成卫, 张冬梅, 钟相根. 半夏泻心汤配伍意义的拆方研究: 调节胃分泌作用的实验观察. *北京中医药大学学报* 1999;22:49-52
- 3 朱玉文, 李铁. 动物实验性溃疡的制备. *消化性溃疡病*. 北京: 人民卫生出版社, 1998:825-832
- 4 Chey WY, Chang TM. Secretin 100 years later. *J Gastroenterol* 2003;38:1025-1035
- 5 Konturek PC, Konturek SJ. The history of gastrointestinal hormones and the Polish contribution to elucidation of their biology and relation to nervous system. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54(Suppl3):83-98
- 6 Schmassmann A, Reubi JC. Cholecystokinin-B/gastrin receptors enhance wound healing in the rat gastric mucosa. *J Clin Invest* 2000;106:1021-1029
- 7 Peterson WL. The role of acid in upper gastrointestinal haemorrhage due to ulcer and stress-related mucosal damage. *Aliment Pharmacol Ther* 1995;9(Suppl 1):43-46
- 8 Lasky MR, Metzler MH, Phillips JO. A prospective study of omeprazole suspension to prevent clinically significant gastrointestinal bleeding from stress ulcers in mechanically ventilated trauma patients. *J Trauma* 1998;44:527-533
- 9 Tache Y, Yang H. Brain regulation of gastric acid secretion by peptides. Sites and mechanisms of action. *Ann N Y Acad Sci* 1990;597:128-145
- 10 Schmassmann A, Reubi JC. Cholecystokinin-B/gastrin receptors enhance wound healing in the rat gastric mucosa. *J Clin Invest* 2000;106:1021-1029
- 11 Chey WY, Chang TM. Neural control of the release and action of secretin. *J Physiol Pharmacol* 2003;54(Suppl 4):105-112
- 12 许琦, 王汝俊, 陈芝喜, 王建华, 刘晓玲. “脾虚”大鼠胃壁细胞胃泌素受体变化及补中益气汤的作用. *中药药理与临床* 2003;19:3-5
- 13 大本太一. 利用酶抑制活性探讨汉方处方—半夏泻心汤. *国外医学. 中医中药分册* 1988;10:37
- 14 高艳青, 刘晓霓, 高蔚, 司银楚, 牛欣. 半夏泻心汤及其类方不同配伍对正常大鼠胃酸分泌的影响. *数理医药学杂志* 2004;17:149-153
- 15 段天璇, 马长华, 侯艳霞, 刘舒萍, 陈韬, 伦丽辉, 小熊亮子, 李宇航. 半夏泻心汤不同配伍情况下部分化学成分变化. *中国中药杂志* 2002;27:363-365

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## CuSO<sub>4</sub> 对 2.2.15 细胞的影响

罗红雨, 杨旭, 雷建华, 田沂

罗红雨, 杨旭, 雷建华, 田沂, 中南大学湘雅二医院肝病研究中心  
湖南省长沙市 410011  
国家自然科学基金资助课题, No. 30170852  
通讯作者: 杨旭, 410011, 湖南省长沙市人民中路 139 号, 中南大学湘雅二医院肝病研究中心. yangxu@vip.163.com  
电话: 0731-5524222  
收稿日期: 2005-03-14 接受日期: 2005-04-08

#### 摘要

**目的:** 探讨硫酸铜(CuSO<sub>4</sub>)对 2.2.15 细胞代谢及 HBV 复制和表达的影响及其机制.

**方法:** 采用 MTT 法检测 CuSO<sub>4</sub> 对 2.2.15 细胞的毒性, 流式细胞仪检测细胞周期. 透射电镜法, Annexin V/PI 双染后双变量流式细胞仪观察 CuSO<sub>4</sub> 对 2.2.15 细胞凋亡的影响, 采用时间分辨荧光免疫分析技术(TRFIA)检测不同浓度的 CuSO<sub>4</sub> 作用后 2.2.15 细胞上清中 HBsAg, HBeAg 的 P/N 值, Taq man 荧光定量 PCR 检测不同浓度 CuSO<sub>4</sub> 作用后上清中 HBVDNA 滴度.

**结果:** MTT 实验确定 CuSO<sub>4</sub> 在培养液中对 2.2.15 细胞的最大无毒剂量是 128 μmol/L. CuSO<sub>4</sub> 作用后可引起细胞周期的改变, 肝癌细胞被阻滞在 G2+M 期, 且呈量效相关性. 但是未发现 CuSO<sub>4</sub> 有诱导凋亡的作用, CuSO<sub>4</sub> 干预 12 d 的结果显示 2.2.15 细胞上清中 HBsAg, HBeAg 的滴度及 HBVDNA 的复制水平与对照组无明显差别.

**结论:** CuSO<sub>4</sub> 有明显的细胞毒作用, 可引起肿瘤细胞周期的改变及细胞坏死, 提示了铜的抗癌作用的分子机制, CuSO<sub>4</sub> 短期处理 2.2.15 细胞后暂未发现其对 HBV 复制和表达的影响.

罗红雨, 杨旭, 雷建华, 田沂. CuSO<sub>4</sub> 对 2.2.15 细胞的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13(10):1225-1227  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1225.asp>

#### 0 引言

肝豆状核变性又称 Wilsons 病(WD), 是一种可以治疗的

先天性铜代谢障碍的隐性遗传病,病理基础是铜呈正平衡<sup>[1]</sup>,其肝铜浓度可达正常人的30-50倍,多年的临床总结发现,肝豆状核变性的患者中极少有HBV感染者,而我国是乙肝高发区,这种现象很难用巧合来解释,因此大胆假设是否铜的高聚集可能影响乙肝病毒的感染,研究肝病和铜关系近30 a的Sternlieb发现,Wilson病罕见有原发性肝癌的发生<sup>[2]</sup>,而血色病好发肝癌,这种现象不能用Wilson病患者寿命短来解释,而且Wilson病患者肝硬化发生比血色病早,虽然铜的抑癌作用已被动物实验证实,但铜与肿瘤关系的研究结果并不一致<sup>[3-6]</sup>,且其具体的抑癌分子机制也不清楚.为此,我们利用2.2.15细胞,就铜与肿瘤细胞及HBV的关系进行有关的探讨.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2.2.15细胞和HepG2细胞由我室保存,DMEM、G418、胰酶、胎牛血清均购自GIBCO公司,MTT、RNA酶A和蛋白酶K均购自华美公司,DNA markers购自大连宝生物公司.Taq酶,dNTPs,PEG8000购自上海生物工程公司.FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit购自BioVision公司,硫酸铜( $\text{CuSO}_4$ )采用分析纯,由中南大学湘雅二院药剂科配制为1%(M/V)的储存液备用.时间分辨荧光免疫分析仪及乙肝检测试剂盒由上海新波技术开发有限公司提供.HBV DNA定量检测采用美国Perkin Elmer公司的自动荧光定量PCR仪(PE5700型),试剂采用中山医科大学达安公司的Taq man荧光定量试剂盒.

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 2.2.15细胞用DMEM液培养,培养液加100 mL/L胎牛血清,0.03%(W/V)谷氨酰胺, $10^5$ U/L青霉素, $10^5$ U/L链霉素,200 mg/L G418,置37℃、50 mL/L  $\text{CO}_2$ 孵箱中传代培养,每4-5 d传代一次,取对数生长期细胞用于试验.

1.2.2 MTT法检测 $\text{CuSO}_4$ 对2.2.15细胞毒性 取对数生长期2.2.15细胞,用2.5 g/L胰酶分散细胞后计数,调整浓度为 $5 \times 10^7$ /L,置入96孔细胞培养板,200  $\mu\text{L}$ /孔,待细胞贴壁后,分别加入终浓度为512、256、128、64、32、16、8、4  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CuSO}_4$ ,每组均含4个平行孔,同时设不加药物的细胞对照组及空白组,置50 mL/L  $\text{CO}_2$ 孵箱内培养48 h,结束前4-6 h,每孔加入MTT(5 g/L)10  $\mu\text{L}$ ,小心去除上清液,加入DMSO 100  $\mu\text{L}$ ,轻轻震荡至MTT沉淀完全溶解,在多孔扫描分光光度计上,测定570 nm波长下吸光度A值.取4孔A值平均数.

细胞杀伤率 = (对照孔A值 - 实验孔A值) / 对照孔A值  $\times$  100%.

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期 在已准备好的2.2.15和HepG2细胞瓶中加 $\text{CuSO}_4$ (浓度为128、64、32  $\mu\text{mol/L}$ ,并设不加药物的细胞组作为对照组),另设一瓶不加药物为对照,50 mL/L  $\text{CO}_2$ 孵箱分别培养48 h,用2.5 g/L胰酶将细胞消化脱壁,PBS洗涤2次,用冷PBS制备成细胞悬液0.5 mL,加5 mL 750 mL/L冷乙醇固定,4℃

过夜,送北京鼎国生物技术有限公司用流式细胞仪检测细胞周期.数据用multicycle分析软件处理.

1.2.4 透射电镜观察细胞超微结构改变 取状态良好的处于对数生长期的2.2.15细胞,胰酶消化后,按 $10^6$ /L种板,24 h后加入 $\text{CuSO}_4$ (浓度为128、64、32  $\mu\text{mol/L}$ ,并设不加药物的细胞组作为对照组)作用48 h后,收集细胞,用PBS洗涤2次,用2.5%戊二醛(V/V)、2%锇酸(W/V)固定,脱水后用纯环氧树脂包埋,超薄切片,铅-铀双染色,透射电镜下观察细胞超微结构并照相.

1.2.5 Annexin V/PI双染后双变量流式细胞仪检测细胞凋亡率 细胞处理同上,按FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit操作,进行流式细胞仪分析及激光共聚焦显微镜观察.

1.2.6 采用时间分辨荧光免疫分析技术(TRFIA)检测不同浓度的 $\text{CuSO}_4$ 作用后2.2.15细胞上清中HBsAg, HBeAg的P/N值.2.2.15细胞种40 mL培养瓶,每瓶加5 mL培养基,用时间分辨荧光免疫分析仪及乙肝检测试剂盒提供的说明书操作,结果以实验孔A值/阴性对照孔A值(P/N)表示.

1.2.7 细胞上清病毒DNA的制备<sup>[4]</sup> 取上述培养液,每瓶5 mL,1 000 r/min离心10 min,收集上清,加10%(W/V)PEG8000,10 000 g离心10 min,取沉淀,重悬于TNE(10 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 100 mmol/L, NaCl, 1 mmol/L EDTA)中,加蛋白酶K(200  $\mu\text{g/L}$ ),55℃孵浴2 h,常规苯酚氯仿抽提,常规乙醇沉淀,溶于50  $\mu\text{L}$  TE中.-20℃保存备用.

1.2.8 Taq man 荧光定量PCR检测 $\text{CuSO}_4$ 作用后上清中HBVDNA滴度 取上述各组DNA提取液2.2  $\mu\text{L}$ 加入PCR反应管中,按说明书操作.

统计学处理 检测数据均采用mean  $\pm$  SD表示,采用SPSS10.0版统计软件包进行方差分析.

## 2 结果

2.1  $\text{CuSO}_4$ 对2.2.15细胞的毒性作用 有显著的细胞毒性,且与剂量成正比,512  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CuSO}_4$ 细胞杀伤率为100%, $\text{CuSO}_4$ 对细胞生长的半数毒性浓度( $\text{TC}_{50}$ )为256  $\mu\text{mol/L}$ , $\text{CuSO}_4$ 在培养液中对2.2.15细胞的最大无毒剂量是128  $\mu\text{mol/L}$ .

2.2 透射电镜观察未加铜处理的2.2.15细胞密集,正常,偶见线粒体轻度水肿和凋亡,无坏死,铜处理48 h后,256  $\mu\text{mol/L}$ 浓度组镜下可见较多的细胞坏死和少量的凋亡,128  $\mu\text{mol/L}$ 及以下各浓度之间无明显差别,结果均为:可见极少量坏死,细胞器较好,偶见线粒体轻度水肿,空泡变,偶见凋亡.以下的实验中我们均选择 $\text{CuSO}_4$ 的浓度为128, 64, 32  $\mu\text{mol/L}$ .

2.3 铜处理组流式细胞仪测定未见典型的凋亡峰,Annexin V/PI双染后双变量流式细胞仪检测结果显示对照组比较,未见早期凋亡和晚期凋亡细胞.

2.4 流式细胞仪分析 2.2.15细胞和HepG2细胞周期的

结果见表1,  $\text{CuSO}_4$  作用 48 h 后 S 期和 G1 期变化不明显, G2+M 期细胞数明显增加, 且呈量效相关性. 上述现象在 2. 2. 15 细胞中更明显.

表1 流式细胞仪分析 2.2.15 细胞和 HepG2 细胞周期的结果

	2.2.15 细胞(%)			HepG2 细胞(%)		
	G1	S	G2/M	G1	S	G2/M
对照组	65	27.1	7.9	56.5	23.7	19.8
128 $\mu\text{mol/L}$	36.8	30.0	33.1	54.1	16.8	29.1
64 $\mu\text{mol/L}$	44.4	31.5	24.1	55.0	19.7	25.3
32 $\mu\text{mol/L}$	54.0	17.6	28.3	65.1	12.2	22.7

2.5  $\text{CuSO}_4$  作用后对 2.2.15 细胞 HBV 复制和表达的影响见表 2. HBsAg, HBeAg 的滴度在传代后逐渐上升, 7~10 d 左右滴度最高, 12 d 以后下降. 对照组和处理组比较,  $P$  值  $>0.05$ , 无统计学意义. 上清 HBVDNA 结果显示: 培养细胞长满瓶后其含量均可达到  $10^{10}$ ~ $10^{11}$ /L, 各组之间无明显的差异.

表2  $\text{CuSO}_4$  作用后细胞上清 HBsAg, HBeAg 的滴度

$\text{CuSO}_4$ 浓度	HBsAg/HBeAg(P/N)				
	2 d	4 d	7 d	10 d	12 d
128 $\mu\text{mol/L}$	2.72/0.67	5.06/0.78	11.54/1.61	12.80/2.31 <sup>b</sup>	2.86/0.64
64 $\mu\text{mol/L}$	2.76/0.58	4.10/0.76	11.15/1.80	12.18/2.26 <sup>b</sup>	2.17/0.59
32 $\mu\text{mol/L}$	2.61/0.56	5.18/0.68	11.43/1.92	13.11/2.17 <sup>b</sup>	3.12/0.66
对照组	2.68/0.61	4.24/0.75	12.18/1.72	13.06/2.35	2.25/0.52

<sup>b</sup>  $P < 0.01$  vs 对照组.

### 3 讨论

铜有很强的细胞毒性, 很高浓度的铜可导致肝细胞的迅速坏死, 本文结果显示,  $\text{CuSO}_4$  在培养液中对 2. 2. 15 细胞的最大无毒剂量为 128  $\mu\text{mol/L}$ , 且文献报道<sup>[7]</sup>, 此浓度作用后细胞内  $\text{CuSO}_4$  的浓度与肝豆状核变性患者体内的肝铜含量相当, 故用其作为细胞模型, 同时发现此浓度以下处理细胞后, 可导致细胞周期改变, 肝癌细胞被阻滞在 G2+M 期, 且呈量效相关性. 并未发现有诱导凋亡的作用. 说明铜对肿瘤细胞的损伤, 首先表现为细胞周期的改变, 细胞阻滞在 G2+M 期, 进行有丝分裂前的修复, 提示如果长期处在高铜的恶劣环境中, 肿瘤细胞则难以存活. 也为解释 Wilson 病患者肝硬化多见而肝癌少见的现象提供了依据. 上述细胞阻滞现象在 2. 2. 15 细胞中更明显, 说明携带了 HBV 基因组的肝癌细胞更加脆弱, 更易受到毒性物质的伤害.

2. 2. 15 细胞以整合型 HBVDNA 分子为主, 细胞总 HBVDNA 含量的变化主要取决于细胞本身, 难以衡量 2. 2. 15

细胞内 HBV 的变化. 为此, 我们选择上清中 HBVDNA 作为观察 HBVDNA 复制的指标, 同时确定了 HBVDNA 提取和定量检测的可行方法<sup>[8]</sup>. 2. 2. 15 细胞表达产物用常规的 ELISA 乙肝两对检测试剂盒难以检测到, 我们采用时间分辨荧光免疫分析技术<sup>[9]</sup>检测上清中的 HBsAg, HBeAg, 特异性强, 灵敏度高, 定量准确且范围广.

本实验干预 12 d 后的结果显示 HBV 的复制和表达水平平均无明显差别. 其可能的解释为 (1) 虽然既往的研究表明铜可导致核 DNA 的损伤<sup>[10-11]</sup>, 但短期作用所造成的损害并不会直接影响到 HBVDNA 的复制和表达. (2) HBV 感染的机制是复杂的, 可以作用的途径也是多方面的, 肝细胞的任何成分包括细胞膜, 细胞器都易受到高铜的损害, 产生功能和结构的改变, 文献<sup>[12]</sup>报道铜可引起细胞膜阴离子结合部位的转移, 从而影响细胞膜上的载体转运的结合部位. 那么理论上铜的高聚集不仅可能影响 HBV 生存的宿主环境, 也可能影响 HBV 侵入肝细胞的过程. Wilson 病患者的铜聚集是一个长期的过程, 而细胞培养中作用的时间较短, 此结果暂不能完全否定  $\text{CuSO}_4$  对 HBV 感染的影响.

### 4 参考文献

- Ala A, Schilsky ML. Wilson disease: pathophysiology, diagnosis, treatment, and screening. *Clin Liver Dis* 2004;8: 787-805
- Sternlieb I. Copper and the Liver. *Gastroenterology* 1980;78: 1615-1628
- Reiners JJ Jr, Colby AB. Survey of cytotoxicities and antimutagenic and antitumor initiating activities of Cu (II) (3, 5-diisopropylsalicylate) 2 and its analogs in a keratinocyte mediated mutation assay and the murine shin multistage carcinogenesis model. *Carcinogenesis* 1988;9:629-632
- Nasulewicz A, Mazur A, Opolski A. Role of copper in tumour angiogenesis-clinical I implications. *J Trace Elem Med Biol* 2004;18:1-8
- Wilkinson ML, Portmann B, Williams R. Wilson's disease and hepatocellular carcinoma: possible protective role of copper. *Gut* 1983;24:767-771
- Pan Q, Bao LW, Merajver SD. Tetrathiomolybdate inhibits angiogenesis and metastasis through suppression of the NF $\kappa$ B signaling cascade. *Mol Cancer Res* 2003;1:701-706
- Aston NS, Watt N, Morton IE, Tanner MS, Evans GS. Copper toxicity affects proliferation and viability of human hepatoma cells (HepG2 line). *Hum Exp Toxicol* 2000;19:367-376
- 罗红雨, 杨旭, 邹文, 黄力. 2. 2. 15 细胞上清 HBVDNA 定量检测方法的比较. *中国现代医学杂志* 2005;15:383-384
- Wu FB, Han SQ, He YF. Time-resolved immunofluorometry of serum hTSH with enhanced sensitivity. *J Immunoassay Immunochem* 2002;23:191-210
- Tsang SY, Tam SC, Bremner I, Burkitt MJ. Research communication copper-1, 10-phenanthroline induces internucleosomal DNA fragmentation in HepG2 cells, resulting from direct oxidation by the hydroxyl radical. *Biochem J* 1996;317(Pt 1):13-16
- Saleha Banu B, Ishaq M, Danadevi K, Padmavathi P, Ahuja YR. DNA damage in leukocytes of mice treated with copper sulfate. *Food Chem Toxicol* 2004;42:1931-1936
- Demidchik V, Sokolik A, Yurin V. Characteristics of non-specific permeability and H<sup>+</sup>-ATPase inhibition induced in the plasma membrane of *Nitella flexilis* by excessive Cu<sup>2+</sup>. *Planta* 2001;212:583-590