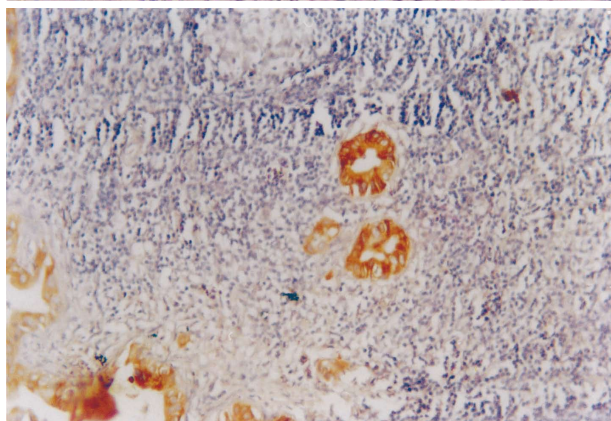
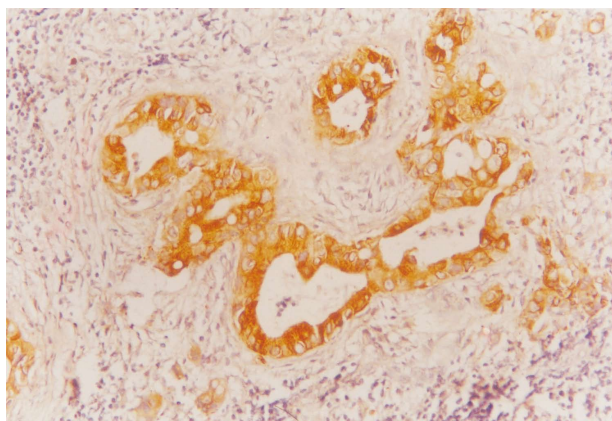
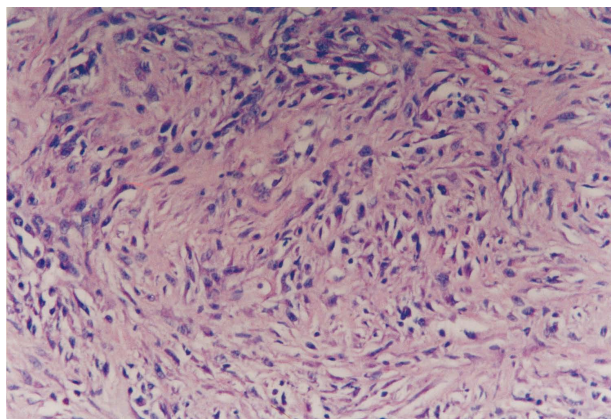
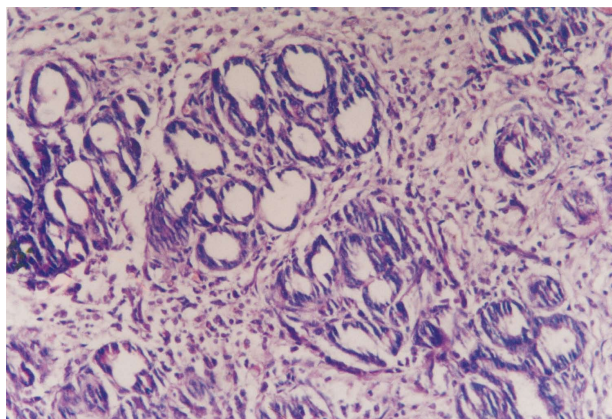


世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2005 年 9 月 28 日 第 13 卷 第 18 期 (Volume 13 Number 18)



18/2005

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,
2003年百种中国杰出学术期刊,

《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.

世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,
俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2005 年 9 月 28 日

第 13 卷

第 18 期

(总第146期)

述 评

- 2173 临床试验刍议 谭学瑞, 张学中
2179 RNA 干扰在肝病治疗中的研究进展 韩苏夏, 马瑾璐

基 础 研 究

- 2183 甘草甜素下调基质金属蛋白酶组织抑制因子-1基因的表达
王巧侠, 成军, 郭江, 李文凡, 魏红山
2188 改良聚合酶链反应检测 HBV 共价闭合环状 DNA 汤勃, 王宇明, 刘俊, 张瑞
2193 肝癌细胞 BEL7402 中神经元特异性烯醇化酶的表达
朱爱萍, 张青云, 王雅明, 徐建军, 孙丽
2197 肝移植前受体亚低温对急性肝衰大鼠移植肝脏的保护作用
王志东, 韩德恩, 崔云甫, 姜明山, 张新宇, 曾兆林
2201 慢性丙型肝炎患者 CD4⁺CD25⁺调节性T细胞表达增加 杨江华, 张永祥, 苏川, 孙南雄
2205 草苈蓉乙醇提取物对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化的治疗作用 朴熙绪, 黄红果, 朴东明
2210 树突状细胞在黏膜免疫模型鼠体内的分布及趋化因子的表达
谢遵江, 贺业春, 贾立敏, 刘颖, 刘丽
2213 塞来昔布对胃癌细胞生长及 ERK2 表达的影响
张勇, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 熊碧君, 翁敏
2217 益气活血软坚解毒含药血清诱导人肝癌细胞系 Bel-7402 细胞的凋亡
李东涛, 孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 林洪生
2222 肿瘤坏死因子- α 、细胞间黏附分子-1与扑热息痛肝损害
田丰, 王颖, 吴作艳, 王学清, 李岩
2227 SD 大鼠胰腺癌模型组神经生长因子 mRNA 表达
杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 李清龙, 范文涛, 梁珊, 苗雄鹰

文 献 综 述

- 2231 乳酸杆菌作为一种新型活疫苗抗原递送载体 庾庆华, 杨倩
2235 一氧化氮和一氧化氮合酶与肿瘤放疗敏感性的关系 江春平, 丁义涛
2238 Id 基因家族对消化系统实体瘤作用的研究进展
杨海彦, 刘连新, 曲志博, 刘改云, 陈炜, 郭化鑫, 陈曦
2243 影响拉米夫定相关乙型肝炎病毒 YMDD 变异的因素 陆德云, 王甦, 赵连三
2246 成人间活体肝移植中小肝综合征的预防策略 马跃峰, 李相成
2251 肝细胞癌生物标志物的研究进展 王嘉信, 刘连新
2257 肠黏膜免疫调节紊乱介导炎症性肠病的发生 王旭丹, 袁学勤

研 究 快 报

- 2263 sp600125 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞凋亡及 Caspase-3 蛋白表达的影响 唐文, 蒋明德, 李小安
2266 血小板活化因子对幼鼠肠道免疫屏障功能的影响 王丽杰, 刘冬妍, 孙梅, 赵恂

临 床 经 验

- 2269 肝硬化患者食管静脉曲张的相关因素分析 501 例
崔春吉, 金永日, 朴熙绪, 裴凤郁
2272 中晚期肝门部胆管癌诊治15例
张宗明, 邢海林, 李刚, 刘凯, 朱建平, 宿砚明, 钟华, 郭金星
2275 肝病患者的 IgA 和 sIgA 含量变化的临床意义 刘冬妍, 刘沛
2278 全直肠系膜切除术切缘血管内皮生长因子检测的临床意义 战学雷, 田素礼
2281 善宁对急性胰腺炎患者血小板参数变化的影响 黄坚, 陆士奇, 陈建荣

病 例 报 告

- 2284 肝肾联合移植术治疗移植肾慢性失功伴肝硬化 1 例
朱建平, 张宗明, 管德林, 李刚, 黄庆荣, 宿砚明, 陈以安, 刘辉
2287 丙型肝炎肝硬化患者骨髓和血液同时分离出鼠伤寒沙门菌 1 例
郭微媛, 齐桂云, 多丽波, 闫立昕, 孙琪, 张和光

致 谢	2288 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2187 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会征文通知 2200 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛第一轮通知 2209 首届北京地坛感染病学术会议 2221 《世界华人消化杂志》欢迎投稿 2226 2006年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行 2234 WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通 2237 世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊 2250 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2256 2006年即将召开的国际会议 2262 消化道肿瘤外科治疗2006高级论坛征文通知 2286 中国生物医学基金论文摘要注册方法
封面故事	2227 SD 大鼠胰腺癌模型组神经生长因子 mRNA 表达 杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 李清龙, 范文涛, 梁珊, 苗雄鹰 世界华人消化杂志 2005;13(18):2227-2230 http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2227.asp
国际会议	13th United European Gastroenterology Week, UEGW October 15-20, 2005 American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting October 28-November 2, 2005 ISGCON 2005 November 11-15, 2005 isgcon2005@yahoo.co.in isgcon2005.com Advanced Capsule Endoscopy Users Course November 18-19, 2005 www.asge.org/education II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 gec@stradini.lv www.gastroenterologs.lv 2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases December 1-3, 2005 c.chase@imedex.com www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net

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
(半月刊)

创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2005-09-28
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生

编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁

英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪

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

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: 010-85381901
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, 北京市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: 010-85381901
传真: 010-85381893

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.

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.

2005年版版权归世界胃肠病学杂志社所有

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576.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

September 2005 Contents in Brief Volume 13 Number 18

EDITORIAL

Meager opinions on clinical experimentation

Tan XR, Zhang XZ 2173

Advancement of RNA intervention in the treatment of hepatic diseases

Han SX, Ma JL 2179

BASIC RESEARCH

Glycyrrhizin down-regulates expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1

Wang QX, Cheng J, Guo J, Li WF, Wei HS 2183

Detection of hepatitis B virus cccDNA with modified polymerase chain reaction

Tang B, Wang YM, Liu J, Zhang R 2188

Expression of human neuron-specific enolase gene in human hepatocellular cancer cells BEL7402

Zhu AP, Zhang QY, Wang YM, Xu JJ, Sun L 2193

Moderate hypothermia therapy for acute liver failure in rats before liver transplantation

Wang ZD, Han DE, Cui YF, Jiang MS, Zhang XY, Zeng ZL 2197

Increase of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood of patients with chronic hepatitis C

Yang JH, Zhang YX, Su CH, Sun NX 2201

Therapeutic role of ethanolic extract of *Boschniakia Rossica* in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats

Piao XX, Huang HG, Piao DM 2205

Distribution of dendritic cells and expression of chemokines in mouse models of mucosal immune *in vivo*

Xie ZJ, He YC, Jiao LM, Liu Y, Liu L 2210

Effects of celecoxib on cell proliferation and ERK2 expression of ERK2 in gastric cancer cells

Zhang Y, Jiang MD, Zeng WZ, Xu H, Xiong BJ, Weng M 2213

Growth inhibitory and apoptosis inducing effect on hepatocellular carcinoma Bel-7402 cell line by serum from rabbit fed with *Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu* decoction

Li DT, Shun GZ, Pei YX, Qi X, Li J, Ling HS 2217

Association of tumor necrosis factor- α and intercellular adhesion molecule-1 with acetaminophen-induced liver damages

Tian F, Wang Y, Wu ZY, Wang XQ, Li Y 2222

Expression of nerve growth factor messenger RNA in pancreatic cancer tissues in Sprague Dawley rats

Yang ZL, Deng XH, Yang LP, Li QL, Fan WT, Liang S, Miao XY 2227

REVIEW

Lactobacillus as a new living vaccine carrier in delivery of antigen

Yu QH, Yang Q 2231

Influence of nitric oxide and nitric oxide synthase on tumor radiotherapy sensitivity

Jiang CP, Ding YT 2235

Advance in effect of Id family gene on solid tumor in digestive system

Yang HY, Liu LX, Qu ZB, Liu GY, Chen W, Guo HX, Chen X 2238

Influential factors of Lamivudine associated YMDD variations of hepatic B virus

Lu DY, Wang S, Zhao LS 2243

Preventive methods for small-for-size liver syndrome in adult-to-adult living-donor liver transplantation

Ma YF, Li XC 2246

Advance in research of biological markers of hepato-cellular carcinoma

Wang JB, Liu LX 2251

Occurrence of inflammatory intestinal disease mediated by intestinal mucosal immunoregulation disturbance

Wang XD, Yuan XQ 2257

BRIEF REPORT

Effects of sp600125 on acetaldehyde-induced apoptosis of hepatic stellate cells and expression of Caspase-3 protein in rats

Tang W, Jiang MD, Li XA 2263

Effect of platelet activating factor on intestinal immunological barrier in young rat

Wang LJ, Liu DY, Sun M, Zhao X 2266

CLINICAL PRACTICE

Correlative factors of esophageal varices in patients with hepatocirrhosis: an analysis of 501 cases

Cui CJ, Jin YR, Piao XX, Pei FY 2269

Diagnosis and treatment for advanced hilar cholangiocarcinoma: an analysis of 15 cases

Zhang ZM, Xing HL, Li G, Liu K, Li G, Zhu JP, Su YM, Zhong H, Guo JX 2272

Changes of IgA and sIgA and its clinical significant in hepatic diseases

Liu DY, Liu P 2275

Clinical significance of detection for vascular endothelial growth factor in resection margin following total mesorectal excision

Zhan XL, Tian SL 2278

Effects of octreotide on platelet parameters in patients with acute pancreatitis

Huang J, Lu SQ, Chen JR 2281

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology Monthly

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date September 28, 2005

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wcjd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2005 by The WJG Press

益气活血软坚解毒含药血清诱导人肝癌细胞系 Bel-7402 细胞的凋亡

李东涛, 孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 林洪生

李东涛, 第二军医大学附属长海医院中医科上海市 200433
孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 林洪生, 中国中医研究院广安门医院
肿瘤科北京市 100053
李东涛, 1966-06-12生, 山东省汶上县人, 汉族, 2003年中国中医研究院博士, 主治医师, 现在第二军医大学从事博士后工作, 主要研究方向中西医结合治疗肝癌的基础与临床, 中医核心理论及虚弱体质研究工作。
通讯作者: 孙桂芝, 100053, 北京市宣武区北线阁5号, 中国中医研究院广安门医院肿瘤科. whongzhong@263.net.
电话: 010-88001630
收稿日期: 2004-12-31 接受日期: 2005-01-08

Growth inhibitory and apoptosis inducing effect on hepatocellular carcinoma Bel-7402 cell line by serum from rabbit fed with *Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu decoction*

Dong-Tao Li, Gui-Zhi Sun, Ying-Xia Pei, Xin Qi, Jie Li, Hong-Sheng Ling

Dong-Tao Li, Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
Gui Zhi-Sun, Ying-Xia Pei, Xin Qi, Jie Li, Hong-Sheng Ling, Guannanmen Hospital, China Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100053, China
Correspondence to: Gui Zhi-Sun, Guannanmen Hospital, China Institute of Traditional Chinese Medicine, 5 Beixiang, Xuanwu District, Beijing 100053, China. whongzhong@263.net
Received: 2004-12-31 Accepted: 2005-01-08

Abstract

AIM: To investigate the growth inhibitory and apoptosis inducing effects on hepatocellular carcinoma Bel-7402 cell line by serum from rabbit fed with *Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu decoction*(YHRJ decoction).

METHODS: Serum was collected from New Zealand rabbits fed with *YHRJ decoction*, and used for Bel-7402 cell culture. Cell growth inhibition was assayed by MTT method. Invert, fluorescence, and laser microscopes were applied to examine cell morphology. Cell cycle and apoptosis were detected by annexinV and propidium iodide (PI) double staining and flow cytometry.

RESULTS: Serum from *YHRJ*-fed rabbits suppressed Bel-7402 cell growth. The inhibitory rate was 49.1%, when 20% serum was added to the culture. Typical apoptosis of morphological changes were also ob-

served in *YHRJ* serum treated cells. The G₀/G₁ arrest and apoptosis peak were shown by flow cytometry. Early, medium/late-term apoptosis was detected by annexinV-PI double staining.

CONCLUSION: *YHRJ decoction* containing serum can inhibit growth and induce apoptosis of Bel-7402 cells.

Key Words: *Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu decoction*; Hepatocellular carcinoma; Bel-7402 cells

Li DT, Shun GZ, Pei YX, Qi X, Li J, Ling HS. Growth inhibitory and apoptosis inducing effect on hepatocellular carcinoma Bel-7402 cell line by serum from rabbit fed with *Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu decoction*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(18):2217-2221

摘要

目的: 研究益气活血软坚解毒(YHRJ)含药血清对人肝癌细胞系Bel-7402生长抑制及诱导凋亡作用。

方法: 将YHRJ含药血清作用于人肝癌细胞系Bel-7402细胞, 应用MTT检测对肝癌细胞生长抑制作用, 倒置显微镜、荧光显微镜、激光共聚焦扫描显微镜等影像学方法观察细胞形态学变化, 以及PI染色单染、AnnexinV-PI双染后, 流式细胞术检测对细胞周期影响及诱导细胞凋亡程度。

结果: MTT法检测结果显示: YHRJ含药血清具有抑制Bel-7402肿瘤细胞生长作用(其中20%YHRJ等效剂量抑制率49.1%,与NS比, $P < 0.01$); 荧光显微镜及激光共聚焦显微镜可观察到典型的凋亡形态学变化。流式细胞术检测结果, 细胞周期出现G₀/G₁期阻滞, 并出现典型的凋亡峰, AnnexinV-PI双染法检测到早期及中晚期细胞凋亡。

结论: YHRJ含药血清有抑制人肝癌细胞系Bel-7402细胞生长并有诱导细胞凋亡作用。

关键词: 益气活血软坚解毒; 肝癌; Bel-7402细胞

李东涛, 孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 林洪生. 益气活血软坚解毒含药血清诱导人肝癌细胞系Bel-7402细胞的凋亡. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2217-2221
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2217.asp>

0 引言

益气活血软坚解毒法是导师孙桂芝教授在临床上治疗原发性肝癌的重要治则治法,以往相关的研究结果表明,该法具有抑制荷H22瘤小鼠肿瘤生长及促进人肝癌细胞系Bel-7402细胞凋亡作用^[1,2]。为了深入研究其作用机制,我们拟从体外培养细胞的血清药理学实验方面,从细胞分子水平研究其作用特点。

1 材料和方法

1.1 材料 新西兰大白兔12只,♀,体重2.45-2.7 kg,购于中国药品及生物制品检定所,对数生长期的Bel-7402细胞,由中国中医研究院广安门医院提供。益气活血软坚解毒(YHRJ)方水煎剂:组方为生黄芪、炒白术、田三七、水红花子、藤梨根、凌霄花、炮山甲、白花舌蛇草、半枝莲,常规水提取,生药浓度3.4 kg/L,4℃保存备用。YHRJ含药血清的制备。健康新西兰大白兔12只,随机分为NS、YHRJ等效剂量(约为人用量的5倍)、YHRJ高剂(约为人用量的10倍)3组,每组4只,8:00、14:00点各给药1次,中药每只每次稀释成10 mL灌喂,重复给药5次,末次给药前12 h禁食不禁水,末次给药后1-1.5 h之内分别从耳中央动脉无菌采血10 mL,室温静置2 h,冷冻离心机1500 r/min离心10 min,吸取血清,56℃30 min灭活,22 μm针式微孔滤膜过滤,-20℃冰箱保存备用。顺氯氨铂(DDP):山东齐鲁制药厂产品。RPMI1640完全培养液:RPMI培养干粉(GIBCO)内含2 mmol/L谷氨酰胺,青霉素100 kU/L、链霉素100 mg/L,应用时加入100 mL/L灭活的小牛血清。四甲基偶氮唑盐(MTT)、碘化丙啶(PI)、RNAA酶、吖啶橙(AO):美国Sigma公司产品。AnnexinV-FITC试剂盒:北京宝赛生物技术有限公司生产。全自动酶标仪(Microplate AUTO Reader)EL311:美国BioTek公司产品。BH2-RFC落射式荧光显微镜:Olympus公司产品。激光共聚焦扫描显微镜(Radiance2000):美国BioRad公司产品。FACSort流式细胞仪(FCM):美国Becton-Dicknson公司生产。

1.2 方法

1.2.1 YHRJ含药血清对人肝癌细胞系Bel-7402生长抑制作用(MTT法)的表达 处于对数生长期的人肝癌细胞Bel-7402经2.5 g/L胰酶消化后,接种于96孔板中,每孔100 μL(1×10^5 /L),孵育24 h,分组为NSD、NSG、YHRJDD、YHRJDG、YHRJGD、YHRJGG、DDP 7组,分别加入生理盐水兔血清至终浓度为100 mL/L、200 mL/L、RHRJ等效剂量兔血清至终浓度为100 mL/L、200 mL/L、RHRJ高剂量兔血清至终浓度为100 mL/L、200 mL/L、DDP 2 mg/L,另设对照组单纯加入培养液100 μL、设培养液空白孔,每组复孔为6个,置于37℃,50 mL/L湿化的CO₂培养箱中孵育72 h后,

沿培养孔边缘轻轻吸出上清100 μL,加入MTT储液10 μL 1(5 g/L),继续培养4 h,加入二甲基亚砷(DMSO)100 μL,震荡器轻微震荡后,用EL311型全自动酶标仪测其A值,测定波长570 nm,参考波长630 nm,计算对细胞的抑制率(%)={ (对照组平均A值-空白组平均A值)-(药物平均A值-空白组平均A值)}÷(对照组的平均A值-空白组平均A值)×100%。

1.2.2 影像学观察方法^[3,4] 处于对数生长期的人肝癌细胞Bel-7402细胞,经2.5 g/L胰酶消化后,分瓶,传代细胞处于对数生长期时分组为NSD、NSD+DDP、YHRJDD、YHRJDD+DDP、YHRJGD、YHRJGD+DDP 6组,加血清如1.2.1,加DDP各组DDP终浓度为4.5 mg/L,50 mL/L湿化的CO₂培养箱中孵育。PBS液离心洗涤1次,取少量细胞涂片,速入950 mL/L冷乙醇固定10-15 min,稍干;10 g/L醋酸酸化30 S,0.1 g/L AO染色8 min;PBS液(pH4.8)洗涤1 min后,0.01 mol/L CaCl₂分化2 min,再入3个含PBS液(pH4.8)的染色缸洗3次,每次数秒;PBS液临时封固,置荧光显微镜观察,蓝光激发,照相。另染色方法同AO染色,置激光共聚焦扫描显微镜观察^[5],蓝光激发(B,488 nm),阻挡滤片530/30 Bp,630/30 Bp,发射波长515 nm(DNA,绿光)、630 nm(RNA,红光);采用该仪器的双染色样品扫描分析软件分析,照相。

1.2.3 YHRJ含药血清对人肝癌细胞系Bel-7402细胞周期影响及凋亡诱导^[6] 传代细胞处于对数生长期时分组为NSD、NSG、YHRJDD、YHRJDG、YHRJGD、YHRJGG 6组,加血清如1.2.1,分别于孵育12,24,48,72 h时处理细胞,0.1 mol/L PBS液离心洗涤(1 000 r/min,5 min)2次后,加入700 mL/L冷乙醇4 mL,40℃固定24 h。检测前弃去乙醇,PBS液离心洗涤2次,加入RNA A酶(20 mg/L)及PI(50 mg/L)混合染液1 mL,4℃避光染色30 min。350目尼龙筛网过滤,调整瘤细胞浓度 1×10^5 /L,FACSort流式细胞仪检测,计算出DNA含量,得出细胞周期(G₀/G₁,S,G₂+M)的百分比和凋亡细胞的比例。处理细胞同1.2.2,于孵育24h时处理细胞。将培养液倒入5 mL离心管,加入2.5 g/L的胰酶消化,加入原培养液,混合后,1 000 r/min 4℃离心10 min,弃上清。加入冷PBS 1 mL,轻轻震荡使细胞悬浮。1 000 r/min 4℃离心10 min,弃上清,重复上述步骤两次。将细胞重悬于200 μL Binding Buffer。加入AnnexinV-FITC 10 μL和PI5 μL,轻轻混匀,避光室温反应15 min或4℃反应30 min。加入Binding Buffer 300 μL,立即流式细胞仪分析。

2 结果

2.1 YHRJ含药血清对人肝癌细胞系Bel-7402生长抑

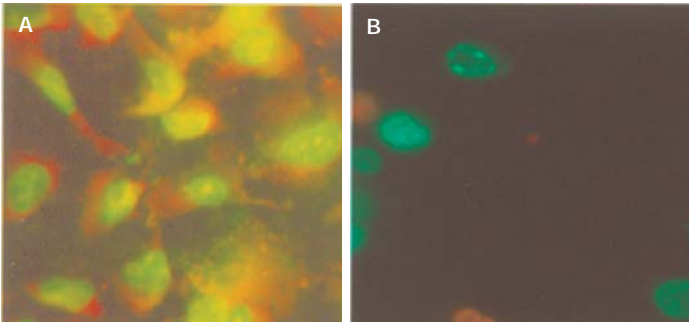


图1 AO染色, 荧光显微镜下观察细胞形态变化. A: NSD组 B: YHRJDD组.

制作用 YHRJ含药血清均有不同程度抑制肿瘤生长作用, 以20%YHRJ等效剂量组含药血清作用显著, 与NS组比较, 差异显著($P<0.01$), 但与化疗药物DDP相比, 还有一定差距(表1).

表1 MTT法测定YHRJ含药血清对人肝癌细胞系Bel-7402体外生长抑制

分组	药物剂量	A值	抑制率(%)
空白对照	100 mL/L 胎牛血清	0.0955 ± 0.0072	
对照	100 mL/L 胎牛血清	0.4548 ± 0.123	
NSD	100 mL/L NS 兔血清	0.3803 ± 0.0848	20.73
NSG	100 mL/L NS 兔血清	0.3795 ± 0.1276	16.56
YHRJDD	100 mL/L YHRJ 等效剂量兔血清	0.3510 ± 0.1322	22.82
YHRJGD	200 mL/L YHRJ 等效剂量兔血清	0.2317 ± 0.0592	49.06 ^b
YHRJGD	100 mL/L YHRJ 高剂量兔血清	0.2028 ± 0.0189	19.86
YHRJGG	200 mL/L YHRJ 剂量兔血清	0.2270 ± 0.0509	28.51
DDP	100 mL/L 胎牛血清+DDP	0.1402 ± 0.0084	69.18 ^b

^b $P<0.01$ vs NSD组.

2.2 影像学观察结果 荧光显微镜下AO染色除NS组外, 各用药组均可发现明显的凋亡细胞, 核染色质浓缩, 早期染色质聚集于核周边部而呈新月形, 晚期细胞核浓缩, 并碎裂成大小不等的片段, 晚期凋亡细胞进一步碎裂形成由质膜包绕的含有多少不等的核碎片的凋亡小体, 细胞的细胞核染色质形成明亮的凝聚块, 以各加DDP组最为明显(图1). 激光共聚焦扫描显微镜下细胞的形态变化NS组细胞大小相对均匀, 为圆形, 无缺损或破坏, DNA荧光强度分布地形图显示细胞分布

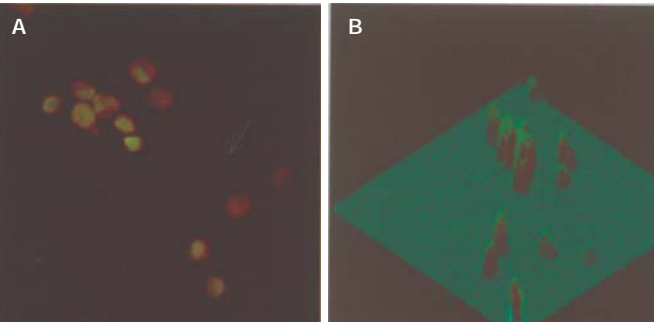


图2 YHRJGD组激光共聚焦扫描显微镜下细胞的形态变化. A: 平面图 B: 地形图.

茂密, 整个结构形态充满, 自核边缘至核中央荧光强度逐次递强, 完整无损. 各加药组细胞形态不规则, 荧光强度分布不均, 大面积出现荧光强度减低, 各组均能发现细胞凋亡表现, 以各加DDP组最为明显, 单纯中药组以YHRJGD最为明显(图2).

2.3 YHRJ含药血清对人肝癌细胞系Bel-7402细胞周期影响及凋亡诱导 在12 h点上, 与NS组相比, 各加药组出现G₀/G₁期阻滞, 以YHRJDD最为明显, 未出现细胞凋亡现象. 在24 h点上, 各中药组均出现不同程度的细胞凋亡现象, 以YHRJGD最为明显, 为16.18%, 并出现明显G₀/G₁期阻滞. 在48 h点上, 各加药组仍有一定数量凋亡细胞, 以YHRJGG最高, 为15.54%, 但总体趋势减低. 在72 h点上, 凋亡细胞数量明显减少, 但仍有G₀/G₁阻滞现象, 由于此时出现细胞饥饿现象, NSD开始出现部份细胞凋亡(表2, 图3). YHRJDD及YHRJGD组24 h点早期凋亡率并不高, 但中晚期凋亡数量较高, 因此凋亡总数比NS组高, 有显著差异($P<0.001$). 另外, 中药加DDP比单纯用DDP凋亡总数明显增高, 差异显著($P<0.001$), 显示中药与DDP的协同作用(表3, 图4).

3 讨论

细胞凋亡是中药作用机制研究的热门课题, 也是中药抗癌的主要作用机理^[7,8]. 李杰 *et al*^[2]研究发现, 以益气活血软坚解毒为组方的肝康冲剂可阻止肝癌细胞系Bel-7402细胞G₀/G₁期进入S期, 24 h即有细胞分

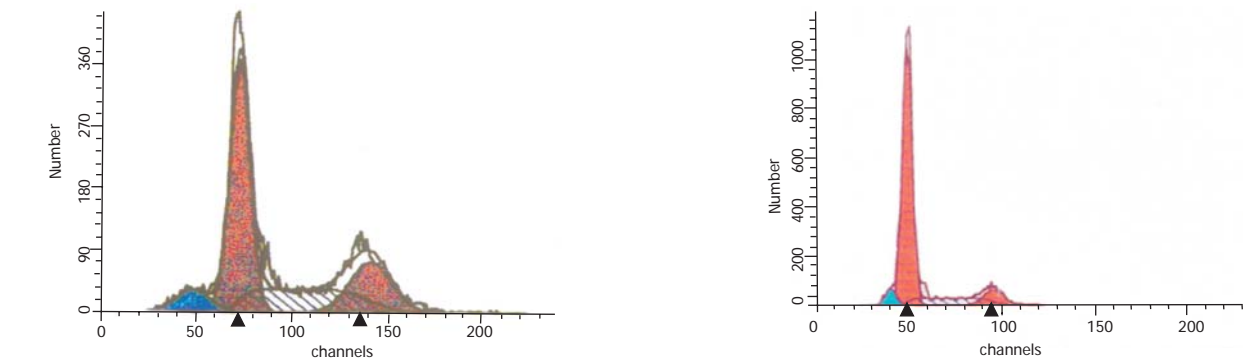


图3 PI染色FCM测定含药血清对Bel-7402细胞周期影响及细胞凋亡的诱导. A: YHRJDD, 24 h B: YHRJGD, 48 h

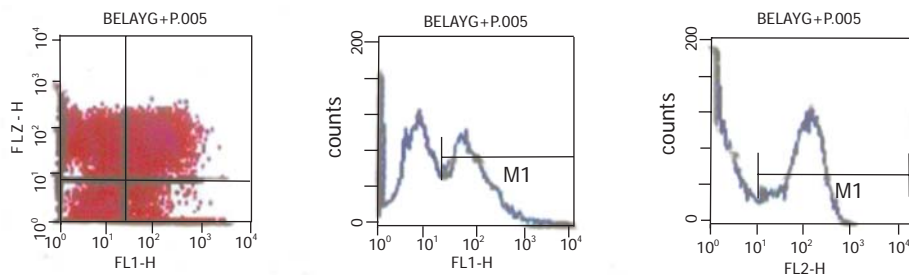


图4 AnnexinV-PI染色测定含药血清对人肝癌细胞系Bel-7402早期凋亡诱导, YHRJGD+DDP组.

表2 PI染色FCM测定含药血清对BEL-7402细胞1万个周期影响及细胞凋亡的诱导(%)

分组	G ₀ /G ₁	S	G ₂ -M	APO
12 h NSD	40.0	48.8	11.2	0
NSG	40.1	48.0	11.9	0
YHRJDD	61.4	21.4	17.2	0
YHRJDG	52.6	30.6	16.8	0
YHRJGD	59.5	18.1	22.4	0
YHRJGG	44.8	41.7	13.5	0
24 h NSD	74.0	8.2	17.8	0
NSG	59.3	17.7	23.0	0
YHRJDD	53.9	24.8	21.3	7.1
YHRJDG	63.0	9.2	17.8	4.2
YHRJGD	75.6	14.2	10.2	16.2
YHRJGG	67.3	21.0	11.8	1.7
48 h NSD	73.5	10.9	15.6	0
NSG	59.1	18.9	22.0	0
YHRJDD	62.1	19.7	18.2	2.9
YHRJDG	43.4	35.8	21.1	5.4
YHRJGD	76.6	14.5	8.9	5.1
YHRJGG	76.0	13.5	10.5	15.5
72 h NSD	67.4	10.0	22.7	2.3
NSG	50.4	7.4	32.2	0
YHRJDD	72.7	3.8	23.5	0
YHRJDG	70.5	6.7	22.8	1.1
YHRJGD	79.9	2.7	17.4	0
YHRJGG	75.6	17.8	6.6	1.3

裂出凋亡小体. 陈瑜 *et al* 补肾及健脾复方对皮质酮大鼠T细胞凋亡信号相关基因群具有调控作用^[9]. 孟志强 *et al*^[10] 研究发现, 健脾理气药对肝癌细胞株 SMMC-7721 具一定的诱导凋亡及抑制肝癌细胞效应, 能上调P53, P21WAF1/CIP1基因的表达, 且对肿瘤细胞端粒酶活性有抑制作用. 杨雁 *et al*^[11] 研究发现黄芪总甙具有诱导肝癌细胞株HepG2细胞和Bel-7402细胞凋亡的作用, 能上调肝癌细胞的wt p53表达. 王三龙 *et al*^[12] 研究发现中药苏木提取物诱导K562细胞凋亡的研究. 我们的结果显示, 益气活血软坚解毒法有抑制人肝癌系Bel-7402细胞生长作用, 影像学提示有诱导细胞凋亡作用, 说明诱导细胞凋亡是中药抑制肿瘤的主要作用机理.

引起细胞凋亡典型形态学变化的机制在于Ca²⁺, Mg²⁺依赖性核酸内切酶的激活导致染色质DNA在核小

表3 YHRJ含药血清对Bel-7402细胞1万个早期凋亡的诱导(AnnexinV,PI双染,%)

分组	正常	早期凋亡	中晚期凋亡	死亡	凋亡总
24h NSD	94.0	1.38	3.7	0.9	5.2
NSD+DDP	39.1	8.1	39.1	13.3	47.5 ^b
YHRJDD	89.8	1.2	5.4	3.6	6.6 ^b
YHRJDD+DDP	31.6	35.4	23.8	9.9	59.2 ^b
YHRJGD	89.2	1.1	6.6	2.8	8.0 ^b
YHRJGD+DDP	10.8	13.7	47.4	28.0	61.1 ^b

$P < 0.001$ vs NSD组.

体连接部位断裂, 形成以180-200 bp为最小单位的单体或寡聚体片段. 流式细胞仪PI染色法可以检测DNA降解, 在正常的G₀/G₁峰之前出现的一亚二倍体峰为凋亡峰. 我们的研究结果显示, 在药物作用24 h后, 能出现明显的凋亡峰. 近年来, 通过对细胞凋亡的进一步研究发现: 各种细胞受到诱导后产生凋亡的初期, 均会出现膜内外层面磷脂酰丝氨酸(PS)重新分布, 即膜内表面的PS发生不可逆转的外露, 其明显早于核内DNA固缩、变性、裂解^[13], 检测外表面的PS, 可了解凋亡的早期状况. AnnexinV与PS有较强的亲和力, 具有钙依赖性. 由于坏死细胞的PS也有外露现象^[14], 因此, AnnexinV和能够进入破损细胞膜内与降解DNA结合的PI法联合应用才可以区分凋亡和坏死^[15,16]. 我们采用AnnexinV/PI法双染色法观察了用药24 h后早、中、晚期凋亡细胞分布, 结果显示, YHRJ中药组中、晚期凋亡细胞较多, 说明早期凋亡发生于24 h之前. 以上说明, 诱导肝癌细胞凋亡是益气活血软坚解毒法抑制肿瘤生长的重要作用机制.

4 参考文献

- 1 李杰, 孙桂芝, 朴炳奎, 陈长怀, 刘玉琴, 顾蓓, 薛克勋, 高进, 苑景春, 李江, 陆丽珠. 肝康冲剂抑瘤作用观察及机理探讨. 中国实验方剂杂志 1998;5:32-35
- 2 李杰, 孙桂芝, 朴炳奎, 刘玉琴, 顾蓓, 薛克勋, 高进. 中药肝康冲剂提取诱导人肝癌细胞系BEL-7402细胞凋亡的实验研究. 中国肿瘤生物治疗杂志 1997;4:234
- 3 潘耀谦, 于艳, 夏志平. 检测细胞凋亡的常用方法. 动物医学进展 2001;2:32-36
- 4 王莉, 李健, 张健, 段相林. 细胞凋亡机制与方法学研究进展. 解剖科学进展 2002;8:170-174
- 5 刘畅, 顾玲. 激光扫描共聚焦显微镜在细胞凋亡研究中的应用. 医

- 学综述 2001;7:583-584
- 6 Benderitter M, Vincent-Genod L, Berroud A, Voisin P. Simultaneous analysis of radio-induced membrane alteration and cell viability by flow cytometry. *Cytometry* 2000;39:151-177
- 7 陈坚. 中药诱导肝癌细胞凋亡的实验研究进展. 中西医结合学报 2004;2:301-303
- 8 程卫东, 徐瑞峰, 赵健雄. 中药诱导肝癌细胞凋亡的研究进展. 甘肃中医 2004;4:44-47
- 9 陈瑜, 沈自尹, 陈伟华. 补肾及健脾复方对皮质酮大鼠T细胞凋亡信号相关基因群调控模式的对比研究. 中西医结合学报 2004;2:346-349
- 10 孟志强, 郭伟剑, 于尔辛, 宋明志, 黄雯霞. 健脾理气方药物血清对肝癌细胞端粒酶活性及凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:879-882
- 11 杨雁, 陈敏珠. 黄芪总甙对肝癌细胞凋亡及wtp53基因表达的影响. 中国药理学通报 2001;17:447-451
- 12 王三龙, 蔡兵, 崔承彬, 张华凤, 姚新生, 曲戈霞. 中药苏木提取物诱导K562细胞凋亡的研究. 癌症 2001;20:1376-1379
- 13 Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *Blood* 1997;89:1121-1132
- 14 Peng L, Liu JJ. A novel method for quantitative analysis of apoptosis. *Lab Invest* 1997;77:547-555
- 15 胡庆柳, 朴英杰, 周美娟. 一种检测早期凋亡的细胞的方法. 细胞生物学杂志 2000;22:155-157
- 16 彭黎明. 用Annexin法定量分析淋巴瘤细胞凋亡与坏死. 中华医学检验杂志 1999;22:49

电编 李琪 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》欢迎投稿

本刊讯 《世界华人消化杂志》2006 年重点报道消化内科, 肝、胆、胰、胃肠外科, 介入、中医、中西医结合治疗, 内镜, 护理, 医学影像, 检验, 预防医学, 误诊误治, 康复, 微创, 肿瘤等相关内容的文章. 欢迎各位踊跃投稿, 促进我国消化临床研究的快速发展. 为适应我国消化病学研究领域的飞速发展, 从 2006-01-01 起《世界华人消化杂志》改为旬刊出版发行, 160 页, 每月 8、18、28 出版.

2006 年,《世界华人消化杂志》在线办公系统将正式开通 (<http://www.wjgnet.com/wjg/index.jsp>), 从投稿到出版所有环节一律在网上实现, 将会大大缩短从投稿到出版的时间.

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 我们对所有来稿均进行同行评议. 采用匿名方式, 通常每篇文章邀请 3 位专家进行同行评议. 至少二位同行评议人通过为录用, 否则为退稿. 每期的最后一页致谢本期所有的同行评议人 (包括退稿). 每期在印刷版和电子版固定位置刊登全体《世界华人消化杂志》的同行评议专家的名单.

据中国科技期刊引证报告 (潘云涛, 马峥著. 北京: 科学技术文献出版社, 2004: 1-289) 统计,《世界华人消化杂志》2003 年发表文章 594 篇, 地区分布 25 个, 机构分布 191 个, 基金论文比 31%, 总被引频次 5249 次, 影响因子 2.924, 即年指标 0.529, 引用期刊数 260 种, 被引半衰期 3.06. 中国科学技术信息研究所每年出版的《中国科技期刊引证报告》定期公布收录的中国科技论文统计源期刊的 10 个科学计量指标, 并根据此指标评选出中国百种杰出学术期刊.《世界华人消化杂志》获得 2001 年和 2003 年中国百种杰出学术期刊.

据《中文核心期刊要目总览 2004 年版》(戴龙基, 蔡蓉华主编. 北京: 北京大学出版社, 2004: 1-678), 采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等 7 个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库有 51 种, 统计到的文献数量共计 9435301 篇次, 涉及期刊 39893 种次. 参加核心期刊评审的学科专家达 1873 位. 经过定量筛选和专家定性评审, 从中国正在出版的近 1 万 2 千种中文期刊中评选出 1800 种核心期刊.《世界华人消化杂志》入选中文核心期刊要目总览.

《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘 (Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库 / 医学文摘 (EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志 (Abstracts Journals)》收录. 2005 年,《世界华人消化杂志》正式向 The National Library of Medicine for MEDLINE 递交申请, 计划在 2006 年初进入 MEDLINE, 以进一步实现国际索引.

总之,《世界华人消化杂志》将始终贯彻质量第一的方针, 满足广大作者和读者的需求. 在此, 我们热烈欢迎再次投稿.