

肝癌-1号对大鼠巨噬细胞杀伤肝癌细胞能力的影响及机制

毕明星, 刘作金, 王华丽, 时毓君, 龚建平

■背景资料

茯苓、白术、黄芪、茵陈是临床实践中最常用到的、并有确切抗肝癌疗效的中药组分。为给临床治疗提供理论依据, 实现中药现代化, 本文观察了上述4种成分的复方制剂对体外巨噬细胞杀伤HepG₂肝癌细胞能力的影响。

毕明星, 王华丽, 重庆市奉节县中医院 重庆市 400010
刘作金, 时毓君, 龚建平, 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科 重庆市 400010
重庆市卫生局科研资助项目(渝卫科教), No.[2002]01-2-01
通讯作者: 龚建平, 400010, 重庆市渝中区临江路74号, 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科. gongjianping11@hotmail.com
电话: 023-63849075-2101 传真: 023-63849075
收稿日期: 2005-09-29 接受日期: 2005-12-02

Effect of Gan'ai-1 on competence of murine macrophage in killing hepatic carcinoma cells and its mechanism

Ming-Xing Bi, Zuo-Jing Liu, Hua-Li Wang, Yu-Jun Shi, Jian-Ping Gong

Ming-Xing Bi, Hua-Li Wang, Chinese Traditional Medicine Hospital of Fengjie County, Chongqing 400010, China
Zuo-Jing Liu, Yu-Jun Shi, Jian-Ping Gong, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China

Supported by the Scientific Foundation from Health Department of Chongqing, No. [2002]01-2-01

Correspondence to: Jian-Ping Gong, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, 74 Linjiang Road, Chongqing 400010, China. gongjianping11@hotmail.com

Received: 2005-09-29 Accepted: 2005-12-02

Abstract

AIM: To investigate the effect of Gan'ai-1 on the competence of macrophages' killing HepG₂ cells in Wistar rats, and to explore its possible mechanism.

METHODS: After isolation from Wistar rats, the macrophages were treated with different concentrations of Gan'ai-1 (0, 25, 50, 75, 100 μmol/L) for 24 h, and the killing effect of the macrophages on HepG₂ cells was evaluated by MTT assay. The mRNA expression of rat macrophage cytokine tumor necrosis factor-α (TNF-α), nuclear factor-κB (NF-κB) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The inhibitory rates of rat mac-

rophages on the growth of HepG₂ cells were increased with the elevated concentrations of Gan'ai-1 and the rates were 28.0% ± 4.5% and 23.5% ± 3.4%, respectively, when 100 and 75 μmol/L Gan'ai-1 were used, which were significantly higher than that in the empty control ($P < 0.05$). The mRNA expression of TNF-α, NF-κB and iNOS were also increased with the increase of Gan'ai-1 level.

CONCLUSION: Gan'ai-1 can promote the killing ability of rat macrophages to HepG₂ cells by induction of TNF-α, NF-κB and iNOS expression.

Key Words: Gan'ai-1; Hepatic Carcinoma; Macrophage; Killing competence

Bi MX, Liu ZJ, Wang HL, Shi YJ, Gong JP. Effect of Gan'ai-1 on competence of murine macrophage in killing hepatic carcinoma cells and its mechanism. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(5):526-529

摘要

目的: 研究中药复方肝癌-1号对Wistar大鼠巨噬细胞杀伤肝癌细胞HepG₂能力的影响并探讨其可能机制。

方法: 用0, 25, 50, 75, 100 μmol/L肝癌-1号提纯液处理Wistar大鼠巨噬细胞24 h后, 用四甲基偶氮唑盐法(MTT), 检测不同浓度药物处理后的巨噬细胞对HepG₂细胞的杀伤能力; RT-PCR法检测各组巨噬细胞TNF-α, NF-κB和iNOS mRNA表达。

结果: 肝癌-1号处理后, 巨噬细胞对肿瘤抑制率随药物剂量的升高而升高, 与0 μmol/L组相比, 100, 75 μmol/L浓度时, 巨噬细胞对HepG₂细胞具有明显的杀伤作用, 肿瘤细胞抑制率分别为28.0% ± 4.5%、23.5% ± 3.4% ($P < 0.05$); 同时TNF-α, NF-κB和iNOS mRNA表达增强。

结论: 肝癌-1号通过诱导巨噬细胞TNF-α, NF-κB和iNOS mRNA的表达, 增强巨噬细胞对肝癌细胞HepG₂的杀伤能力, 其抗癌效应可

能与其参与机体免疫调节作用有关.

关键词: 肝癌-1号; 肝癌; 巨噬细胞; 杀伤能力

毕明星, 刘作金, 王华丽, 时毓君, 龚建平. 肝癌-1号对大鼠巨噬细胞杀伤肝癌细胞能力的影响及机制. 世界华人消化杂志 2006;14(5):526-529

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/526.asp>

0 引言

目前, 中药仍是治疗中、晚期肝癌的重要辅助手段. 茯苓、白术、黄芪、茵陈是临床实践中最常用到的、并有确切抗肝癌疗效的中药组分^[1-3]. 我们将上述4种药物制成“肝癌-1号”复方制剂. 为给临床治疗提供理论依据, 我们观察了肝癌-1号胶囊对Wistar大鼠巨噬细胞杀伤HepG₂肝癌细胞能力的影响, 并对相关机制进行了进一步的研究.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器和试剂 HepG₂细胞株(由本实验室传代培养); Wistar大鼠(♂, 8-12 wk, 重庆医科大学实验动物中心); CO₂培养箱(Forma, 3131, 美国); RPMI 1640培养基(Gibco公司); 新生牛血清(华美公司); 肝癌-1号提取液(由本实验室提纯); RT-PCR试剂盒, Trizol RNA提取试剂盒(Gibco公司).

1.1.2 大鼠腹腔巨噬细胞收集、纯化和培养 Wistar鼠腹腔注射可溶性淀粉(45 g/L)2 mL/只, 3 d后收集腹腔液, 1 000 r/min 离心 5 min, 以Hang's液洗3次, RPMI 1640培养液调节细胞浓度为 1×10^6 个/L, 加入24孔培养板, 在37℃, 50 mL/L的CO₂培养箱内培养2 h. 去除非黏附细胞, 所剩贴壁细胞, 经特异性酯酶染色, 证实95%以上为巨噬细胞.

1.2 方法

1.2.1 肝癌-1号对Wistar大鼠巨噬细胞杀伤HepG₂细胞能力的影响 采用四甲基偶氮唑盐法(MTT). 稀释后的巨噬细胞, 加入24孔培养板, 每孔1 mL, 每组6个平行孔, 置37℃, 50 mL/L CO₂温箱孵育2 h, 加入肝癌-1号提取液, 并调至终浓度分别为0, 25, 50, 75, 100 μmol/L, 继续孵育24 h, 弃去培养液, PBS洗2遍, 加入1 mL浓度为 2×10^8 个/L的HepG₂细胞, 再孵育24 h, 于培养结束前4 h每孔加入20 μL MTT, 37℃温育, 吸出上清液, 加入200 μL二甲基亚砷, 溶解并摇匀, 用酶

标仪在490 nm处测定每个小孔的吸光度(A)值, 肿瘤细胞抑制率 = 实验组细胞A值/对照组细胞A值 $\times 100\%$.

1.2.2 肝癌-1号对Wistar大鼠巨噬细胞NF-κB, TNF-α和iNOS mRNA表达的影响 采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR). 收集经不同浓度肝癌-1号提取液处理24 h的巨噬细胞, 参照Trizol试剂盒说明提取总RNA并逆转录为cDNA. 将逆转录产物行PCR: PCR反应体系20 μL, 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dNTP, 2.0 U Taq polymerase. PCR条件: 94℃变性5 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 60 s, 共30个循环. 最后72℃延伸10 min. 相应扩增引物序列如下: TNF-α上游引物: 5'-CC CTCACACTCAGATCATCTTCTCAA-3', 下游引物: 5'-TCTAAGTACTTGGGCAGGTTGACCTC-3'; NF-κB上游引物: 5'-ACGATCTGTTTCCCCT CATC-3', 下游引物: 5'-TGCTTCTCTCCCCAGC AATA-3'; iNOS上游引物5'-ACAACGTGGAGA AAACCCAGGTG-3', 下游引物5'-ACAGCTCC GGGCATCGAAGACC-3' (由美国Gibco公司合成). 在检测各样本NF-κB, TNF-α和iNOS mRNA之前, 先采用β-actin引物扩增各样本, 以对各样本的RNA进行计量标准化评估. PCR产物经20 g/L琼脂糖电泳后, 用凝胶分析系统进行分析.

统计学处理 采用SSPS 10.0软件分析数据, 结果用mean \pm SD表示, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 认为有显著性差异.

2 结果

2.1 MTT法检测肝癌-1号对Wistar大鼠巨噬细胞杀伤HepG₂细胞能力的影响 与肝癌-1号药物浓度为0%组相比, 在100 μmol/L、75 μmol/L浓度时, 巨噬细胞对HepG₂细胞具有明显的杀伤作用, 肿瘤细胞抑制率分别为28%, 23.5% ($P < 0.05$); 而50 μmol/L和25 μmol/L的药物浓度不能使巨噬细胞显著杀伤HepG₂细胞($P > 0.10$)(表1).

2.2 肝癌-1号对Wistar大鼠巨噬细胞NF-κB, TNF-α和iNOS mRNA表达的影响 各实验浓度下, 均可见NF-κB, TNF-α和iNOS mRNA表达, 且随浓度增加, 表达呈增高趋势(图1).

3 讨论

传统中医认为肝癌为气滞血瘀、湿热聚毒、脾虚湿困、痰瘀毒阻结于胁下而成, 属本虚标实之证, 统计分析表明祛湿健脾理气为治疗肝癌的常用治法, 茯苓、白术、党参、黄芪等益气健脾

■创新盘点

从分子生物学角度, 观察了传统经验用中药对肿瘤杀伤细胞巨噬细胞活性的影响, 从而具体阐述了传统中药的抗癌机制.

■应用要点

本组方为低毒的传统肝癌用药,具有价廉、毒性低的优势,作为肝癌的辅助治疗手段,具有广泛的研究和推广价值。

表 1 肝癌-1号对Wistar大鼠巨噬细胞杀伤HepG₂细胞能力的影响 (mean ± SD)

肝癌-1号药物浓度 (μmol/L)	A值	抑制率 (%)
100	0.10 ± 0.01 ^a	28.0 ± 4.5
75	0.11 ± 0.02 ^a	23.5 ± 3.4
50	0.14 ± 0.02	6.4 ± 1.8
25	0.15 ± 0.01	3.2 ± 0.7
0	0.15 ± 0.01	0

^aP<0.05 vs 空白对照。

祛湿中药为首选药物^[1-3],通过健脾理气、化痰散坚、清热解毒、扶正固本、祛湿等达到治疗目的。作为中、晚期肝癌的辅助疗法,上述药物的确有一定的临床疗效,但具体作用的分子机制,尚有待进一步的研究。巨噬细胞是重要的免疫效应细胞,研究表明许多抗癌中药是通过激活巨噬细胞,增强巨噬细胞分泌细胞因子IL-1、IL-6、TNF-α,释放NO等,从而发挥其抗肿瘤的活性^[4]。

本实验中通过MTT法证实,肝癌-1号也可活化巨噬细胞,随药物浓度的增加,Wistar大鼠巨噬细胞杀伤HepG₂细胞能力显著增强。并且随药物浓度的增加,巨噬细胞NF-κB, TNF-α和iNOS mRNA表达增多。NF-κB是普遍存在于细胞质中的一种快反应转录因子,参与多种细胞因子基因的转录调控,与免疫反应有密切关系。静止状态下,巨噬细胞内的NF-κB与抑制蛋白IκB结合,以非活性的状态存在于大多数细胞的胞质中。TNF-α可激活NF-κB,使IκB迅速磷酸化和降解,被激活的NF-κB会进行核转移,与DNA启动子上特定的认知序列结合,转录靶基因,诱导细胞产生更多的细胞因子如TNF-α^[5,6], IL-2等及增强FC受体、Ia抗原表达,显示出抗癌活性。TNF-α对肿瘤细胞具有直接溶解及抗增殖作用,进而引起肿瘤细胞坏死或导致肿瘤细胞凋亡^[7-9]。此外, TNF-α还具有免疫调节作用。在TNF-α的作用下,活化的巨噬细胞大量的表达iNOS并产生NO^[10],而NO是巨噬细胞杀灭肿瘤细胞的主要效应分子,不仅可阻断肿瘤细胞的能量代谢和DNA复制,抑制肿瘤细胞生长,同时还诱导肿瘤细胞凋亡^[11-15]。

因此,我们推测肝癌-1号可通过激活巨噬细胞,增强其NF-κB, TNF-α及iNOS mRNA的表达,进而直接杀灭或诱导肿瘤细胞凋亡,来发挥其抗癌效应。由于该组方为低毒的传统肝癌用药,

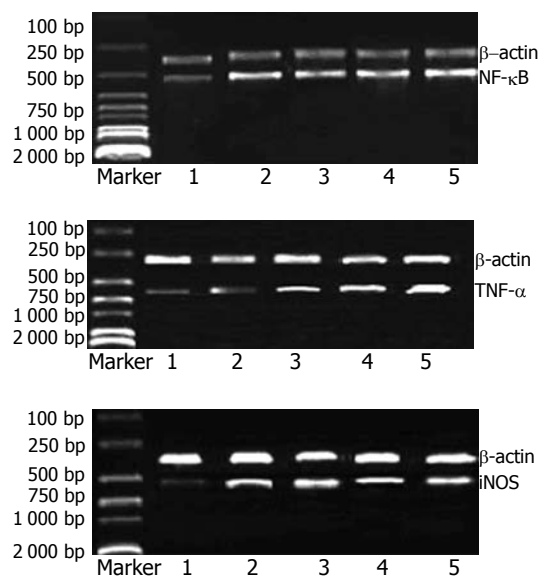


图 1 不同药物浓度对巨噬细胞NF-κB, TNF-α和iNOS mRNA表达的影响。A-E泳道药物浓度分别为: 100, 75, 50, 25, 0 μmol/L。

具有价廉、毒性低的优势,作为无法手术切除的中、晚期肝癌的辅助治疗手段,显然具有进一步研究和推广的价值。

4 参考文献

- 鞠立霞, 陈喆, 任荣政. 活血化痰中药治疗原发性肝癌研究进展. 中西医结合学报 2005; 3: 491-494
- 蒋莲秀, 赵一. 常用治疗肝癌中药及作用机制研究进展. 广西中医学院学报 2005; 8: 73-77
- 李秀娟. 中药防治肝癌机制探讨. 河北中医 2005; 27: 236-238
- Shishodia S, Gutierrez AM, Lotan R, Aggarwal BB. N-(4-hydroxyphenyl)retinamide inhibits invasion, suppresses osteoclastogenesis, and potentiates apoptosis through down-regulation of I(kappa)B(alpha) kinase and nuclear factor-kappaB-regulated gene products. *Cancer Res* 2005; 65: 9555-9565
- Ichikawa H, Takada Y, Murakami A, Aggarwal BB. Identification of a novel blocker of I kappa B alpha kinase that enhances cellular apoptosis and inhibits cellular invasion through suppression of NF-kappa B-regulated gene products. *J Immunol* 2005; 174: 7383-7392
- Lee SB, Schorey JS. Activation and mitogen-activated protein kinase regulation of transcription factors Ets and NF-kappaB in Mycobacterium-infected macrophages and role of these factors in tumor necrosis factor alpha and nitric oxide synthase 2 promoter function. *Infect Immun* 2005; 73: 6499-6507
- Campa VM, Iglesias JM, Carcedo MT, Rodriguez R, Riera J, Ramos S, Lazo PS. Polyinosinic acid induces TNF and NO production as well as NF-kappaB and AP-1 transcriptional activation in the monocytemacrophage cell line RAW 264.7. *Inflamm Res* 2005; 54: 328-337
- Mishra S, Mishra JP, Gee K, McManus DC, LaCasse EC, Kumar A. Distinct role of calmodulin and calmodulin-dependent protein kinase-II in lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-

- alpha-mediated suppression of apoptosis and antiapoptotic c-IAP2 gene expression in human monocytic cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 37536-37546
- 9 Lyu SY, Park WB. Production of cytokine and NO by RAW 264.7 macrophages and PBMC *in vitro* incubation with flavonoids. *Arch Pharm Res* 2005; 28: 573-581
- 10 Hong SH, Seo SH, Lee JH, Choi BT. The aqueous extract from *Artemisia capillaris* Thunb. inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through preventing NF-kappaB activation in human hepatoma cell line and rat liver. *Int J Mol Med* 2004; 13: 717-720
- 11 Xidakis C, Kolios G, Valatas V, Notas G, Mouzas I, Kouroumalis E. Effect of octreotide on apoptosis-related proteins in rat Kupffer cells: a possible anti-tumour mechanism. *Anticancer Res* 2004; 24: 833-841
- 12 Chattopadhyay S, Das T, Sa G, Ray PK. Protein A-activated macrophages induce apoptosis in Ehrlich's ascites carcinoma through a nitric oxide-dependent pathway. *Apoptosis* 2002; 7: 49-57
- 13 Baratin M, Ziol M, Romieu R, Kayibanda M, Gouilleux F, Briand P, Leroy P, Haddada H, Renia L, Viguier M, Guillet JG. Regression of primary hepatocarcinoma in cancer-prone transgenic mice by local interferon-gamma delivery is associated with macrophages recruitment and nitric oxide production. *Cancer Gene Ther* 2001; 8: 193-202
- 14 Nishikawa M, Sato EF, Kuroki T, Utsumi K, Inoue M. Macrophage-derived nitric oxide induces apoptosis of rat hepatoma cells *in vivo*. *Hepatology* 1998; 28: 1474-1480
- 15 Maekawa H, Iwabuchi K, Nagaoka I, Watanabe H, Kamano T, Tsurumaru M. Activated peritoneal macrophages inhibit the proliferation of rat ascites hepatoma AH-130 cells via the production of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide. *Inflamm Res* 2000; 49: 541-547

■同行评价

探讨中药的作用机理对于我国中药的发展非常重要。本文对肝癌杀伤的作用机制进行了细胞学水平研究, 立题新颖, 具有一定的研究价值和指导意义。

电编 张敏 编辑 管鑫妍

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

技法与经验

《世界华人消化杂志》2006年设置“技法与经验”专栏, 及时报道微创、内镜下治疗消化病新的技术和方法及成熟的经验。我们热烈欢迎各位作者踊跃投稿, 免费刊登彩色照片。写作格式如下:

结肠镜下黏膜剥离切除术

0 引言

1 技术方法

1.1 原理

1.2 适应证

1.3 器材准备

1.4 步骤

1.5 实例

2 结果

3 讨论

3.1 并发症

3.2 优点和缺点

3.3 经验与技巧

4 参考文献