

中药复方肝癌宁对肝癌细胞生长和AFP分泌的抑制作用

袁冬生, 王新华, 刘东辉, 朱彩平, 石磊

■背景资料

肿瘤细胞的无限增殖造成人体的损伤, 甲胎蛋白(AFP)是肝癌的主要血清学标志物。因此, 观察中药抗肝癌活性时, 检测药物的抑瘤作用以及对肝癌细胞分泌AFP的抑制作用, 是肝脏肿瘤的基础和临床研究中的重要研究方法。

袁冬生, 刘东辉, 广州中医药大学职业技术学院 广东省广州市 510405

王新华, 广州中医药大学校长办公室 广东省广州市 510405

朱彩平, 石磊, 广州中医药大学05级硕士生 广东省广州市 510405

广东省科技厅科技计划资助项目, No. 2005B33001032

通讯作者: ydshy@21cn.com

: 020-36585519 : 020-36585521

: 2006-02-22 : 2006-03-07

Inhibitory effect of composite Gan'aining on growth and alpha-fetoprotein secretion of human hepatoma cells

Dong-Sheng Yuan, Xin-Hua Wang, Dong-Hui Liu, Cai-Ping Zhu, Lei Shi

Dong-Sheng Yuan, Dong-Hui Liu, Professional Technology College, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China
Xin-Hua Wang, Headmaster's Office, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Cai-Ping Zhu, Lei Shi, Postgraduate of Grade 2005, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Supported by the Science and Technology Programs of Guangdong Province, No. 2005B33001032

Correspondence to: Dong-Sheng Yuan, Professional Technology College, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 10405, Guangdong Province, China. ydshy@21cn.com

Received: 2006-02-22 Accepted: 2006-03-07

Abstract

AIM: To investigate the effects of composite Gan'aining (CGN) on the growth and alpha-fetoprotein (AFP) secretion of human hepatoma cells.

METHODS: Mice bearing human hepatoma were treated with CGN (10, 5, and 2.5 g/kg per day), and the tumor growth was observed. *In vitro* inhibitory effect of CGN (45 g/L) was detected by MTT assay, and the secretion of AFP was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: CGN inhibited the growth of the transplanted hepatoma in a dose-dependent

manner ($r = 10, P < 0.01$), and the tumor inhibition rate was 54.5% ($P < 0.01$) when 10 g/kg CGN was used. In comparison with that in the controls, the growth of HepG₂ cells was significantly inhibited at 4, 5 and 6 d (7.0 ± 1.3 vs $10.3 \pm 0.9, P < 0.05$; 12.1 ± 0.4 vs $21.3 \pm 0.9, P < 0.01$; 15.2 ± 0.3 vs $45.6 \pm 0.6, P < 0.01$), and the secretion of AFP was decreased (39.6 ± 1 vs 54.5 ± 3 ; 20.8 ± 2 vs 45.6 ± 4 ; 18.5 ± 2 vs 40.2 ± 3 ; all $P < 0.01$).

CONCLUSION: CGN can inhibit the growth of hepatoma cells HepG₂ *in vitro* and *in vivo*, and also decrease AFP secretion of HepG₂ cells.

Key Words: Composite Gan'aining; Liver cancer; Alpha-fetoprotein

Yuan DS, Wang XH, Liu DH, Zhu CP, Shi L. Inhibitory effect of composite Gan'aining on growth and alpha-fetoprotein secretion of human hepatoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(19):1912-1915

摘要

目的: 研究中药复方肝癌宁对人肝癌细胞体内、外生长及其对甲胎蛋白(AFP)分泌的影响。

方法: 以小鼠移植人肝癌模型观察药物(每天10, 5, 2.5 g/kg)的体内抗肝癌作用。以MTT法测定复方肝癌宁(45 g/L)的体外抗肝癌活性, 以ELISA检测AFP分泌量。

结果: 10 g/kg对小鼠移植人肝癌HepG₂移植瘤的生长有明显抑制作用, 抑瘤率为54.5% ($P < 0.01$), 且呈量效关系($r = 10, P < 0.01$)。与空白对照组相比, 复方肝癌宁45 g/L作用4, 5, 6 d时体外培养的人肝癌HepG₂细胞株的生长明显抑制(7.0 ± 1.3 vs $10.3 \pm 0.9, P < 0.05$; 12.1 ± 0.4 vs $21.3 \pm 0.9, P < 0.01$; 15.2 ± 0.3 vs $45.6 \pm 0.6, P < 0.01$), AFP分泌量也明显减少(39.6 ± 1 vs 54.5 ± 3 ; 20.8 ± 2 vs 45.6 ± 4 ; 18.5 ± 2 vs 40.2 ± 3 ; 均 $P < 0.01$)。

结论: 中药复方肝癌宁能明显的抑制肝癌HepG₂细胞生长及AFP分泌水平。

关键词: 复方肝癌宁; 肝肿瘤; 甲胎蛋白

AFP

2006;14(19):1912-1915

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1912.asp>

0 引言

中药复方肝癌宁临床上应用于治疗肝癌,对抑制肿瘤生长,延缓肿瘤患者生命有很好的疗效.体外实验研究表明,复方肝癌宁具有很好的抑制HBsAg、HBeAg分泌和显著的抗HBV作用^[1].我们从复方肝癌宁体内对小鼠肝癌HepG₂移植瘤的抑制作用以及体外抑制人肝癌HepG₂细胞生长、降低AFP分泌水平方面再作进一步研究.

1 材料和方法

1.1 材料 分别称取叶下珠50 g、青蒿50 g、云芝40 g、广豆根20 g、莪术20 g、菟丝子40 g.上述药材使用地道药材,从本地医药公司购买,经本校中药鉴定教研室鉴定.实验用水煎剂,将叶下珠、青蒿、云芝、广豆根、莪术、菟丝子按上述药量置陶器内加水1 L浸泡1 h后煎煮,沸后1 h取出药液,药渣再加水1 L煎煮1 h,将2次药液混合后浓缩成1000 g/L浓度(即溶液内含生药1 g)的药液,用双层纱布过滤后4℃冰箱保存备用,实验时稀释成所需浓度.环磷酰胺(CTX),上海华联制药有限公司生产;DMEM, Hanms F12培养基干粉,美国Giacco公司产品;小牛血清, MTT, Sigma产品; AFP酶联免疫测定试剂盒,华美公司产品.选用NIH小鼠,4-5周龄,体质量18-22 g,雌雄各半,由本校实验动物中心提供.小鼠肝癌HepG₂细胞株由中山大学肿瘤研究所引进,具有很强的分泌AFP的生物学特性^[2].

1.2 方法

1.2.1 复方肝癌宁对小鼠肝癌HepG₂移植瘤的作用 取HepG₂瘤性腹水传代,以Hanks液1:3稀释,细胞计数,约含 3×10^9 个细胞/L,每只小鼠腋下接种0.2 mL.将50只小鼠随机分成5组,每组10只:药物高剂量组、药物中剂量组、药物低剂量组、空白对照组、环磷酰胺组.均行腋下接种HepG₂瘤性腹水液,24 h后,药物组按每日10 g, 5, 2.5 g/kg三组灌胃中药复方制剂,环磷酰胺组75 mg/kg,对照组生理盐水灌胃.连续给药7 d,停药后24 h处死小鼠取瘤,测量鼠质量和瘤体质量,计算平均值,并计算肿瘤抑制率.

1.2.2 复方肝癌宁对肿瘤细胞生长的影响 细胞株置在无菌及含150 mL/L小牛血清的DMEM培

养液中,2 d更换1次培养液;当细胞长到茂密时,用2.5 g/L胰酶消化传代.设空白对照组和复方肝癌宁组,观察不同浓度复方肝癌宁对HepG₂细胞生长的影响.

1.2.3 复方肝癌宁对HepG₂细胞AFP分泌量的影响 AFP含量采用ELISA方法检测.接种 1×10^7 /L细胞于24孔培养板中,设空白对照组和复方肝癌宁组(药物浓度为45 g/L).培养液每24 h更换1次,每天收集细胞上清液,测定细胞24 h的AFP分泌量,结果换算成 μg /细胞单位.具体步骤按照试剂盒说明书操作.

统计学处理 肿瘤抑制率采用方差分析、*t*检验进行比较分析;MTT法和ELISA法统计采用两组标本计量资料的*t*检验方法.

2 结果

2.1 对小鼠HepG₂肝癌移植瘤的抑制作用 复方肝癌宁对人肝癌细胞移植瘤的抑制率(54.5%)不及环磷酰胺(69.8%),但复方肝癌宁高、中、低剂量组实验动物体质量增加(9.5%),环磷酰胺组实验动物体质量减少(9%);复方肝癌宁高、中、低剂量组与抑制率呈量效关系(表1).

2.2 体外对人肝癌细胞生长的影响 应用不同浓度的复方肝癌宁作用于人肝癌HepG₂细胞,发现当浓度为45 g/L时,对肝癌细胞生长产生明显的抑制作用.在接种后第6天,用药组细胞为对照组的1/3(表2).

2.3 复方肝癌宁对人肝癌细胞AFP分泌量的影响 复方肝癌宁在45 g/L对人肝癌HepG₂细胞生长产生明显的抑制作用,但细胞形态的改变不明显,因此选择此浓度观察对人肝癌HepG₂细胞AFP分泌的影响(表2).

3 讨论

目前,关于中药复方治疗肝癌的实验研究,主要从直接抑制肝癌细胞增长^[3-6]、调节免疫功能^[7-10]、诱导肝癌细胞凋亡和分化^[11-15]、对肝癌基因的表达^[16-17]以及抑制肝癌前病变^[18-21]等几方面进行.复方肝癌宁为纯中药复方制剂,由叶下珠、青蒿、云芝、广豆根、莪术、菟丝子等组成.研究表明该复方药物青蒿^[22-23]、莪术^[24-25]、叶下珠^[26]、广豆根^[27-31]、云芝^[32]等均有较好的抗肝癌作用.前期研究表明,我们发现复方肝癌宁在浓度为10 g/kg时对人肝癌HepG₂移植瘤的抑制率为54.5%,且呈量效关系.AFP是肝癌细胞分泌的最具特征性的癌胚抗原,在临床上作为

■ 创新盘点

目前,关于中药复方治疗肝癌的实验研究,主要从直接抑制肝癌细胞增长、调节免疫功能、诱导肝癌细胞凋亡和分化、对肝癌基因的表达以及抑制肝癌前病变等几方面进行.AFP是肝癌细胞分泌的最具特征性的癌胚抗原AFP对人肝癌HepG₂细胞亦有促生长作用.本研究从观察药物对肝癌HepG₂细胞分泌AFP的抑制作用着手,为中药复方肝癌宁的抗肝癌活性的机制和进一步临床治疗奠定了基础.

■应用要点

AFP在临床上作为原发性肝癌诊断的重要生化指标,也被视为评价抗癌疗效的一项重要重要标准.

表 1 复方肝癌宁对小鼠HepG₂肝癌移植瘤的抑制作用

分组	剂量[g/(kg·d)]	治疗前鼠质量(g)	治疗后鼠质量(g)	瘤质量(mean ± SD, g)	抑瘤率(%)
	0.2 mL	20.2	22.0	2.336± 0.434	
CTX	0.075	20.5	18.5	0.706± 0.387 ^a	69.8
	10	21.0	22.0	1.064± 0.523 ^a	54.5
	5	21.7	22.4	1.584± 0.502 ^a	32.2
	2.5	20.5	21.6	1.968± 0.387 ^b	15.8

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs

表 2 复方肝癌宁(45 g/L)对人肝癌HepG₂细胞生长的影响 (mean ± SD)

药物作用天数	肝癌HepG ₂ 细胞生长		AFP分泌量	
	空白对照组	复方肝癌宁	空白对照组	复方肝癌宁
1	2.2± 0.6	1.9± 0.4	58.6± 2	51.2± 2
2	1.5± 0.5	1.7± 0.3	96.4± 1	40.1± 1 ^b
3	5.5± 2.3	3.2± 1.5	51.5± 1	38.3± 2 ^b
4	10.3± 0.9	7.0± 1.3 ^a	54.5± 3	39.6± 1 ^b
5	21.3± 0.9	12.1± 0.4 ^b	45.6± 4	20.8± 2 ^b
6	45.6± 0.6	15.2± 0.3 ^b	40.2± 3	18.5± 2 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs

原发性肝癌诊断的重要生化指标. AFP对人肝癌HepG₂细胞亦有促生长作用^[33],能明显促进小鼠肝癌H22细胞及艾氏腹水瘤(EAC)细胞在体外的生长^[34],复方肝癌宁在体外具有抗肝癌活性,抑制肝癌细胞生长,与其对AFP的选择性抑制作用以及诱导细胞凋亡^[35]有关;在体内具有较强的抗肝癌活性,除与降低AFP分泌水平有关外,还与其全身作用有关.至于是否与抑制AFP基因表达,拮抗AFP对人肝癌HepG₂细胞的促进作用,有待进一步研究.

4 参考文献

1 2004; 12: 1292-1294

2 Darlington GJ, Kelly JH, Buffone GJ. Growth and hepatospecific gene expression of human hepatoma cells in a defined medium. *In Vitro Cell Dev Biol* 1987; 23: 349-354

3 2000; 19: 837-838

4 2000; 16: 36-37

5 1997; 26: 126-129

6 " " " " " "

2002; 14: 147-151

7 " " " " " " 6 H₂₂

2006; 26: 92-93

8 (APS) 1995; 2: 22-25

9 " " " " " " 2000; 11: 1065-1066

10 IL-2 NK 2000; 15: 477-478

11 " " " " " " 2006; 26: 144-147

12 旻, HepG2 2006; 16: 18-20

13 " " " " " " 1999; 9: 25-26

14 " " " " " " 2002; 18: 6-8

15 " " " " " " 2005; 23: 285-286

16 " " " " " " 1997; 17: 268-270

17 p21^{ras} bcl-2 p⁵³ AC₉₆₀ 2000; 7: 10-12

18 " " " " " " " " " " " "

19	1995; 5: 25-27	HBV	27	H ₂₂	2005; 30: 178-182
	AFB ₁	1998; 30:			
	27-29		28	HepG2 QGY	2005; 11: 126-129
20		DEN			
	1999; 9: 19-21		29		
21			30		
	1999; 9: 22-24			2006; 40: 60-61	
22			31		
	Heps			2005; 13: 280-282	
	2004; 13: 375-378				
23			32		
	2006; 22: 600-601			2003; 26: 22-23	
24			33		
	SMMC-7721			1997; 16: 425-427	
	2003; 20: 48-51			Semenkova LN, Dudich EI, Dudich IV. Induction of apoptosis in human hepatoma cells by alpha-fetoprotein. <i>Tumour Biol</i> 1997; 18: 261-273	
25			34		
	2005; 28: 152-156			Wang XW, Xu B. Stimulation of tumor-cell growth by alpha-fetoprotein. <i>Int J Cancer</i> 1998; 75: 596-599	
26			35		
				HepG ₂	2006; 14: 522-525
	2002; 9: 289-291				

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

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通知

本刊讯 第二届国际肝胆胰协会中国分会学术会议将于2006-10在武汉举行。

在各方面的大力支持下, 国际肝胆胰协会中国分会第一届学术研讨会已于2004-12在武汉成功举办, 与会代表一千余人, 中国人大副委员长吴阶平院士、国际肝胆胰前主席刘允怡教授、Jim Tooli教授, 国际肝胆胰协会候任主席Büechler教授和欧洲肝胆胰协会主席Broelsch教授等亲自到会。会议受到国内外专家及到会代表的一致赞赏, 并受到国际肝胆胰协会的通报好评, 会议取得巨大成功。

第二届会议将邀请国外和国内著名专家做专题讲座, 针对国际国内肝胆胰外科进展及近年来的热点、难点问题进行讨论; 并交流诊治经验, 推广新理论、新技术、新方法, 了解国内外肝胆胰疾病诊断、治疗发展趋势; 同时放映手术录像。大会热烈欢迎全国各地肝胆胰领域的内科、外科、影像科各级医师以及科研人员积极投稿和报名参加。

会议同时召开第三届全国普外科主任论坛, 因此也欢迎从事医疗卫生管理的各级医院正、副院长及正、副主任积极投稿和报名参加。

本次会议已列入2006年国家继续医学教育项目, 参会代表均授予国家级继续医学教育学分10分。

来稿要求: 寄全文及500-800字论文摘要, 同时寄论文的软盘一份或发电子邮件。以附件的形式发送至 chenxp@medmail.com.cn, 也可将稿件打印后寄至: 武汉市解放大道1095号, 武汉华中科技大学附属同济医院肝胆胰外科研究所张志伟、黄志勇副教授(收), 邮编: 430030; 联系电话: 027-83662599。