

清热消积方对人肺腺癌细胞诱导的人脐静脉内皮细胞增殖凋亡的影响

陈培丰 潘 磊 金莹祺

摘 要 **目的** 研究清热消积方对体外肿瘤细胞诱导的人脐静脉内皮细胞增殖凋亡的影响。**方法** 将不同浓度清热消积方与人肺腺癌细胞 SPC-A-1 和人脐静脉内皮细胞 HUVEC 共同作用,用 MTT 法检测清热消积方对 SPC-A-1 及 HUVEC 细胞增殖的影响;流式细胞术检测对 HUVEC 细胞周期及凋亡的影响。**结果** 不同浓度的清热消积方能够抑制 SPC-A-1 及 HUVEC 细胞的增殖($P < 0.01$),呈现一定的剂量依赖性;并对两者存在差异细胞毒作用,对 HUVEC 细胞的增殖抑制显著高于 SPC-A-1 细胞($P < 0.01$);可将 SPC-A-1 细胞诱导的 HUVEC 细胞阻滞于细胞周期 $G_2 \sim M$ 期;并引起 HUVEC 细胞凋亡。**结论** 清热消积方可抑制 SPC-A-1 及 HUVEC 细胞的增殖、阻滞 SPC-A-1 诱导的 HUVEC 细胞周期,并引起该细胞凋亡,清热消积方可能具有抗肿瘤血管形成效应。

关键词 清热消积方 人肺腺癌细胞 人脐静脉内皮细胞 凋亡

Proliferation and Apoptosis Effect on Human Umbilical Vein Endothelial Cell Induced by Human Lung Adenocarcinoma Cells Treated with Qingrexiaoji Recipe. Chen Peifeng, Pan Lei, Jin Yingqi. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang 310006, China

Abstract **Objective** To study the proliferation and apoptosis effect on human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) induced by human lung adenocarcinoma cells (SPC-A-1) treated with Qingrexiaoji Recipe. **Methods** SPC-A-1 and HUVEC cell were treated together with different concentrations of Qingrexiaoji Recipe, then we used MTT method to test the proliferation effect on both cells, and used flow cytometry to test the effect on cell cycle and apoptosis on HUVEC. **Results** Different concentrations of Qingrexiaoji Recipe had inhibit effect on proliferation of SPC-A-1 and HUVEC cells, and showed a dose-effect dependent curve, which was different and notable on HUVEC cell ($P < 0.01$). The Recipe can also block the cycle of HUVEC cell which induced by SPC-A-1 at $G_2 \sim M$ period, then induce cell apoptosis. **Conclusion** Qingrexiaoji Recipe can inhibit the proliferation of SPC-A-1 and HUVEC cells, block the cycle of HUVEC cell which induced by SPC-A-1, then induce the cell apoptosis, which indicates that the recipe may probably have effect of anti tumor angiogenesis.

Key words Qingrexiaoji recipe; SPC-A-1; HUVEC; Apoptosis

清热消积方(QRXJ)为笔者医院肿瘤科常用的抗癌复方,全方以清热解毒、化痰消积为治则,选用的蛇六谷,性寒味辛,消肿散结、解毒止痛;白花蛇舌草,性寒味苦,清热解毒、利湿消肿;半枝莲,性寒味辛、苦,清热解毒、化痰利尿;绞股蓝,性微寒味甘、苦,清热解毒、止咳消痰、益气健脾;猫爪草,性微温味甘、辛,化痰散结、解毒消肿;猫人参,性凉味苦、涩,清热解毒、消肿抗癌。诸药合用,共除热毒痰积,邪去而正安。在前期研究中证实,该复方对恶性肿瘤患者有减轻症状、稳定病灶、改善血象以及提高免疫功能等良好的临床疗效,并且显示出一定的体外抑制血管生成作

用,但其具体机制尚需进一步研究^[1,2]。本研究通过体外实验,检测清热消积方对人肺腺癌细胞诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)增殖凋亡的影响,进一步阐明清热消积方抗肿瘤增殖转移及抑制肿瘤血管生成的作用机制。

材料与方法

1. 实验材料:清热消积方药购自浙江中医药大学附属第一医院中药房。人肺腺癌细胞株(SPC-A-1)由浙江中医药大学细胞生物学实验室提供。人脐静脉内皮细胞株(HUVEC)购自武汉博士德生物工程有限公司。胰蛋白酶-EDTA 购自杭州吉诺生物医药技术有限公司;3-(4,5)-二甲基-2-噻唑-(2,5)苯基溴化四氮唑盐(MTT)购自美国 Sigma 公司;二甲基亚砜(DMSO)购自江苏鸿声化工厂;Annexin V 凋亡双染试剂盒购自北京博得得生物科技有限公司;碘化丙锭(propidium iodide, PI)购自深圳晶美生物工程公司。

基金项目:浙江省教育厅重点研究项目(Z2009-07128)

作者单位:310006 杭州,浙江中医药大学附属第一医院肿瘤科

2. 实验方法: (1) 细胞培养: 从液氮中分别取出冻存的 SPC - A - 1 与 HUVEC 细胞进行复苏。在 37℃ 水浴中快速晃动至完全融化, 经 1000r/min 离心 5min 后用含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液吹打成细胞悬液, 分别移入培养瓶中, 置于 37℃、5% CO₂ 及 95% 湿度培养箱中孵育, 隔天换液。待细胞进入对数生长期, 贴壁细胞覆盖培养瓶底面积约 70% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 按 1:2 或 1:3 传代至新培养瓶中, 如此反复继续培养备用。(2) 清热消积方原液的制备: 将按原方比例配伍的中药材粉碎过 30 目筛, 加入 8 倍量的水, 浸泡 30min; 加热至沸腾, 维持 1h; 中速滤纸过滤药液, 真空泵抽吸加快过滤速度; 再重复提取 1 次; 合并两次提取的药液, 以 20000r/min 高速离心 15min 后取上清液; 蒸发皿中浓缩, 定容至相当于生药量 1g/ml; 超净工作台内将药液经 0.22μm 微孔滤膜除菌, 得清热消积方原液, 4℃ 保存备用; 实验时, 将上述原液用培养液稀释后配置成所需终浓度后使用^[3,4]。(3) MTT 法: 按文献[5]方法, 根据预实验情况确定清热消积方有效抑制浓度范围, 分为 2.5、5、10、20、40mg/ml 5 个不同终浓度药物组, 及一个空白对照组, 每组设 5 个复孔。分别取对数生长期的 SPC - A - 1 细胞及 HUVEC 细胞, 用胰酶消化后, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液重悬细胞, 以每孔 1 × 10⁴ 个细胞接种于 96 孔板中, 每孔 100μl, 放入培养箱培养。24h 后, 细胞完全贴壁, 分别在各实验组培养孔中加入配置成以上不同浓度的清热消积方药液, 每孔调整终体积至 200μl; 对照组不加药, 加入等体积的培养液。培养板内设一调零孔, 不加细胞, 仅加入培养液。继续置于培养箱内培养 48h 后, 加 MTT 液 (5mg/ml) 20 微升/孔, 37℃ 孵育 4h, 弃去孔内培养液, 每孔加入 DMSO 150μl, 在摇床上振荡培养板 10min, 充分溶解结晶。用酶标仪检测 490nm 波长处的每孔 OD 值。细胞抑制率 (%) = (1 - 实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值) × 100%。并使用 SPSS 17.0 软件计算半数抑制浓度 (IC₅₀) 值。(4) 细胞周期检测: 条件培养液的制备: 用 RPMI 1640 培养液培养人肺癌细胞 SPC - A - 1, 待细胞生长进入对数生长期后收集上清液, 以 5000r/min 离心 5min, 再经 0.22μm 滤菌器过滤。按 1:1 混合培养上清与含 20% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液, 制备成人脐静脉内皮细胞 HUVEC 的条件培养液^[6]。调整 HUVEC 细胞密度至 1 × 10⁶/ml, 取 1ml 接种于 6 孔板上, 用上述条件培养液培养 24h 后, 细胞完全贴壁, 弃上清。加入含清热消积方终浓度分别为 5、10、20mg/ml 的条件培养液 5ml, 空白对照组加入不含药物的条件培养液, 继续培养 48h。将药物作用后的细胞用胰酶消化后重悬。PI (碘化丙锭) 单染法检测细胞周期: 每组分别取 1 × 10⁶ 个细胞, PBS 洗 2 次, 用预冷的 75% 冰乙醇 1ml 固定细胞, 4℃ 过夜; 以 3000r/min 离心 5min 后弃上清, 再用 PBS 重悬 5min, 重复离心 1 次; 弃上清后加入 PI 染液 1ml, 4℃ 避光 30min 后, 上流式细胞仪检测细胞周期。实验重复 3 次^[7]。(5) Annexin - V/PI 双染法检测细胞凋亡: 每组分别取 1 × 10⁶ 个细胞, 用 PBS 洗 2 次, 加入 10μl 的 Bind-

ing Buffer 及 FITC 标记的 Annexin - V (20μg/ml), 室温下避光孵育 30min; 以 3000r/min 离心 5min 后收集细胞, 将细胞再次重悬在 1 × Binding Buffer 中, 加入 PI 染液 (50μg/ml) 5μl; 混匀后, 上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。实验重复 3 次^[7]。
3. 统计学方法: 应用 SPSS 17.0 软件进行实验数据统计分析。统计描述, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间均数比较用 *t* 检验; 多组间均数比较用方差分析, 组间两两比较用 *q* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 清热消积方对 SPC - A - 1 及 HUVEC 细胞增殖的抑制作用: (1) 对 SPC - A - 1 细胞增殖的抑制: 实验结果显示, 2.5、5、10、20、40mg/ml 5 个不同浓度的清热消积方药液对 SPC - A - 1 细胞增殖均有不同程度的抑制作用。各实验组与对照组、各实验组之间比较均有非常显著的差异 (*P* < 0.01)。且对 SPC - A - 1 细胞增殖的抑制率随着药物浓度的增加而升高, 呈现出良好的量效关系。由此可得出, 清热消积方对 SPC - A - 1 细胞半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 13.8mg/ml (表 1、图 1)。(2) 对 HUVEC 细胞增殖的抑制: 实验结果显示, 2.5、5、10、20、40mg/ml 5 个不同浓度的清热消积方药液对 HUVEC 细胞增殖均有不同程度的抑制作用。各实验组与对照组比较均有非常显著的差异 (*P* < 0.01); 10mg/ml 组与 20mg/ml 组比较有显著差异 (*P* < 0.05), 其余各实验组之间两两比较均有非常显著差异 (*P* < 0.01)。且对 HUVEC 细胞增殖的抑制率随着药物浓度的增加而升高, 呈现出良好的量效关系。由此可得出, 清热消积方对 HUVEC 细胞半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 5.9mg/ml (表 2、图 1)。(3) 对 SPC - A - 1 细胞和 HUVEC 细胞增殖抑制的比较: 相同浓度的清热消积方药液对 SPC - A - 1 细胞和 HUVEC 细胞增殖的抑制作用存在非常显著的差异 (*P* < 0.01), 同浓度组药物对 HUVEC 细胞增殖的抑制作用大于对 SPC - A - 1 细胞的抑制作用 (表 1、表 2、图 1)。

表 1 QRXJ 对人肺癌细胞 SPC - A - 1 的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	OD 值	抑制率 (%)	IC ₅₀ (mg/ml)
对照组	0.998 ± 0.079	-	
2.5mg/ml 组	0.879 ± 0.036 *▲	11.92	13.8
5mg/ml 组	0.778 ± 0.022 *▲	22.04	
10mg/ml 组	0.549 ± 0.051 *▲	44.99	
20mg/ml 组	0.394 ± 0.069 *▲	60.52	
40mg/ml 组	0.274 ± 0.056 *▲	72.55	

与对照组比较, * *P* < 0.01; 各实验组之间两两比较, ▲ *P* < 0.01

表 2 QRXJ 对人脐静脉内皮细胞 HUVEC 的

增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	OD 值	抑制率 (%)	IC ₅₀ (mg/ml)
对照组	0.988 ± 0.100	—	
2.5 mg/ml	0.686 ± 0.074 *●	30.57	5.9
5 mg/ml	0.548 ± 0.039 *●	44.53	
10 mg/ml	0.328 ± 0.051 *	66.80	
20 mg/ml	0.229 ± 0.039 *▲●	76.82	
40 mg/ml	0.108 ± 0.020 *●	89.07	

与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 10 mg/ml 组比较, ▲ $P < 0.05$; 其余各实验组之间两两比较, ● $P < 0.01$

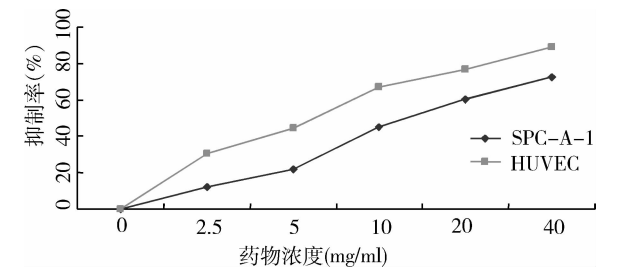


图 1 QRXJ 对 SPC - A - 1 及 HUVEC 细胞增殖抑制作用的比较

2. 清热消积方对 SPC - A - 1 细胞上清培养的 HUVEC 细胞周期及凋亡的影响: (1) 对 HUVEC 细胞周期的影响: 实验结果显示, 不同浓度的清热消积方药液均能不同程度地阻滞经 SPC - A - 1 细胞上清干预的 HUVEC 细胞周期。与对照组比较, 各实验组 HUVEC 细胞 $G_0 \sim G_1$ 期细胞比例下降, $G_2 \sim M$ 期细胞比例上升, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.05$); S 期的细胞比例变化, 实验组与对照组无明显统计学差异 ($P > 0.05$)。在流式图上表现为 $G_2 \sim M$ 期出现一个明显的高峰。表明清热消积方可将 SPC - A - 1 细胞诱导的 HUVEC 细胞阻滞于细胞周期 $G_2 \sim M$ 期 (表 3、图 2)。(2) 对 HUVEC 细胞凋亡的影响: 实验结果显示, 不同浓度的清热消积方药液均能不同程度地诱导经 SPC - A - 1 细胞上清干预的 HUVEC 细胞凋亡。各实验组细胞早期凋亡率与对照组比较、各实验组之

表 3 QRXJ 对人脐静脉内皮细胞 HUVEC 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	G_0/G_1 (%)	S (%)	G_2/M (%)
对照组	86.81 ± 2.87	8.74 ± 2.84	4.45 ± 0.48
5 mg/ml 组	79.65 ± 0.67 *	12.03 ± 0.33	8.32 ± 0.98 *
10 mg/ml 组	72.68 ± 5.05 *▲	14.66 ± 2.27	12.66 ± 2.86 *▲
20 mg/ml 组	51.54 ± 4.42 *▲●	14.85 ± 1.96	33.61 ± 3.25 *▲●

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 5 mg/ml 组比较, ▲ $P < 0.05$; 与 10 mg/ml 组比较, ● $P < 0.05$

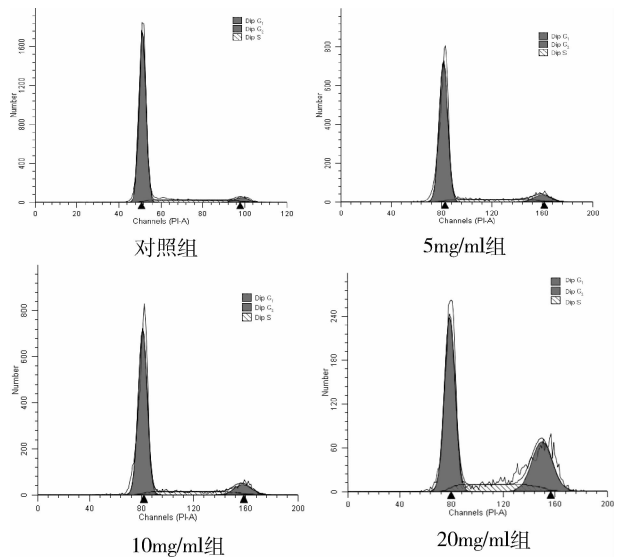


图 2 QRXJ 对 HUVEC 细胞周期影响的流式图

间比较均有显著差异 ($P < 0.05$), 且凋亡率呈浓度依赖性, 随着药物浓度的增加而上升 (表 4、图 3)。表明清热消积方可引起由 SPC - A - 1 细胞诱导的 HUVEC 细胞发生凋亡。

表 4 QRXJ 对人脐静脉内皮细胞 HUVEC 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Test1	Test2	Test3	早期凋亡率 (%)
对照组	2.2	3.0	1.9	2.4 ± 0.6
5 mg/ml 组	7.4	8.1	7.8	7.8 ± 0.4 *
10 mg/ml 组	10.0	8.9	12.3	10.4 ± 1.7 *▲
20 mg/ml 组	19.6	20.8	23.4	21.3 ± 1.9 *▲●

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 5 mg/ml 组比较, ▲ $P < 0.05$; 与 10 mg/ml 组比较, ● $P < 0.05$

讨 论

肿瘤血管生成是从血管内皮细胞的活化、增殖和迁移开始的; 而内皮细胞的增殖速度实际上决定了肿瘤的倍增速度^[8]。因此, 作为血管生成物质基础的内皮细胞成为了抑制血管生成的最佳靶点之一, 抑制血管内皮细胞生成或促其凋亡也是目前西医抗肿瘤血管生成治疗主要途径之一^[9]。近年来, 运用分子生物学等高新技术, 对传统中药进行深入研究, 对中医药抗肿瘤血管生成有了更新的认识, 如郭建忠等^[10]通过实验证实, 小剂量 β - 榄香烯可诱导人脐静脉内皮细胞 (ECV - 304) 的凋亡, 而大剂量 (100 μ g/ml) 则可引起明显的细胞毒作用。李悦等^[11]也实验表明: β - 榄香烯能直接抑制人脐静脉内皮细胞 ECV - 304 细胞的增殖。本实验结果提示, 清

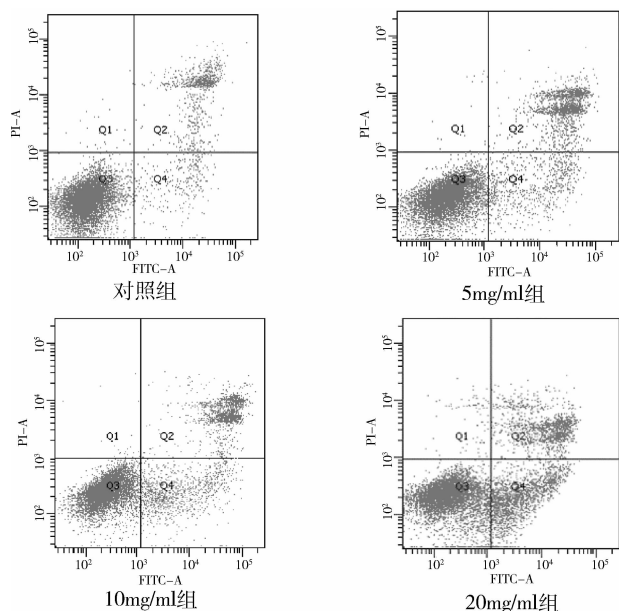


图 3 QRXJ 对 HUVEC 细胞凋亡影响的流式图

Q1. 死亡细胞; Q2. 晚期凋亡细胞; Q3. 正常细胞; Q4. 早期凋亡细胞

热消积方能有效抑制 SPC - A - 1 及 HUVEC 细胞的增殖, 并且呈现出良好的量效关系, 说明清热消积方亦可能通过抑制肿瘤血管内皮细胞增殖而起到抗肿瘤血管生成作用。

Miller 等^[12] 提出判断具有抗血管生成药物的标准时认为, 该类药物必须具备差异细胞毒作用, 即抗血管生成药物对内皮细胞的杀伤所需毒性剂量应低于肿瘤细胞。根据本实验数据, 清热消积方对 HUVEC 细胞的增殖抑制率显著高于 SPC - A - 1 肺癌细胞, 并且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); HUVEC 细胞的药物半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 5.9mg/ml, SPC - A - 1 细胞则为 13.8mg/ml。表明清热消积方对该两种细胞存在差异细胞毒作用, 符合抗血管生成药物的判断标准。

本实验使用含 SPC - A - 1 肺癌细胞培养上清作为 HUVEC 内皮细胞的条件培养基, 以模拟肿瘤血管生成的体内环境。利用肺癌细胞培养上清中特有的一些促血管生长因子, 活化 HUVEC 内皮细胞。在此基础上研究清热消积方对血管内皮细胞的作用, 能更贴近肿瘤血管生成的病理特性^[13]。

本实验结果表明, 清热消积方对经肺癌细胞上清干预的 HUVEC 内皮细胞有明显诱导凋亡作用, 并呈现浓度依赖性。并可阻滞 SPC - A - 1 细胞诱导的 HUVEC 细胞的 DNA 合成后期及有丝分裂期, 所以可推断该作用可能是清热消积方抑制 HUVEC 细胞体外增殖的内在机制之一。

综合以上实验结果得出结论, 清热消积方可有效抑制 SPC - A - 1 及 HUVEC 细胞的增殖、阻滞 SPC - A - 1 诱导的人脐静脉内皮细胞周期及引起该细胞凋亡, 并呈剂量依赖性, 显示清热消积方可能具有抗肿瘤血管形成效应, 其机制值得进一步深入研究。

参考文献

- 1 陈培丰, 孙维刚. 清热消积方治疗胃癌的临床疗效观察[J]. 辽宁中医杂志, 2003, 6(1): 27 - 28
- 2 陈培丰, 丁志山, 黄仁宝. 清热消积方含药血清对人胃癌细胞 SGC - 7901 及牛血管内皮细胞增殖和迁移的影响[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(1): 9 - 12
- 3 温雅, 毕蕾, 张义彪, 等. 丹参水提液对肺癌 A549 细胞增殖的抑制作用[J]. 中医药导报, 2010, 16(1): 2 - 5
- 4 季秀海. 中药叶下珠抗血管生成作用的筛选及机理研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2010: 3 - 4
- 5 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 1996: 186 - 187
- 6 李峻, 许玲, 魏品康. 消痰散结方对体外肿瘤诱导的血管内皮细胞生长的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(6): 200 - 201
- 7 姜泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 170 - 183
- 8 林卫, 彭芝兰. 肿瘤的抗血管生成治疗[J]. 实用癌症杂志, 2003, 18(4): 436 - 438
- 9 汤秀红. 中药制剂抗肿瘤血管形成的基础研究现状与进展[J]. 吉林中医药, 2010, 20(9): 825 - 828
- 10 郭建忠, 张世渊, 吉宏明, 等. β - 榄香烯诱导 ECV - 304 细胞早期凋亡的实验研究[J]. 内蒙古民族大学学报, 2009, 15(5): 24 - 26
- 11 李悦, 杨向红, 刘政操. β - 榄香烯对血管内皮细胞增殖及成血管能力的影响[J]. 山西医药杂志, 2009, 38(10): 870 - 871
- 12 Miller KD, Sweeney CJ, Sledge GW, et al. Redefining the target: chemotherapeutics as antiangiogenics[J]. J Clin Oncol, 2001, 19: 195 - 1206
- 13 刘萍, 沈培强, 吴东方. 参麦注射液增强羟基喜树碱对肿瘤血管生成的抑制作用研究[J]. 中国药房, 2011, 22(3): 203 - 205

(收稿日期: 2012 - 06 - 13)

(修回日期: 2012 - 07 - 04)