·实验研究 Experiment research·

红藤脂酸钠对人肝癌细胞系 SMMC-7721 体外抑瘤作用的实验研究

刘 涛， 王执民， 韦建学

【摘要】 目的 研究中药制剂红藤脂酸钠在体外对人肝癌细胞系 SMMC-7721 的生长抑制作用并初步探讨其作用机制。方法 MTT 法测定 SMMC-7721 细胞生长的抑制百分率，并运用 Annexin V 法和 TUNEL 法检测凋亡发生率。结果 MTT 法测得对照组与红藤脂酸钠处理组吸光值（A 值）分别为：对照组（0.385 ± 0.03），红藤脂酸钠处理组中的 250 μg/ml 组（0.31 ± 0.019）、500 μg/ml 组（0.199 ± 0.022）、1 mg/ml 组（0.15 ± 0.033）和 2 mg/ml 组（0.048 ± 0.026）；各组间比较有显著性差异（$P < 0.01$）。Annexin V 法测定红藤脂酸钠（1 mg/ml 作用 1 h）处理后细胞凋亡 90%，对照组细胞凋亡 17.36%。TUNEL 法测定红藤脂酸钠（1 mg/ml 作用 1 h）处理后细胞凋亡（60.3 ± 6.0）%，与对照组细胞凋亡（6.6 ± 3.5）% 相比，差异有显著性（$P < 0.01$）。结论 红藤脂酸钠在体外对 7721 细胞生长有明显的抑制作用，其作用机制可能主要是诱导肿瘤细胞发生凋亡。

【关键词】 红藤脂酸钠；人肝癌细胞系 SMMC-7721；细胞凋亡

An experimental study of inhibitory effect of SFAS on human hepatic carcinoma cell line SMMC-7721 in vitro

LIU Tao, WANG Zhi-min, WEI Jian-xue. Department of Interventional Radiology, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, *China*

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the inhibitory effect of SFAS on the growth of human hepatic carcinoma cell line SMMC-7721 *in vitro* and discuss its mechanism. **Methods** The inhibitory fraction of SMMC-7721 cells was measured by MTT assay, and both of the Annexin V and TUNEL assays were used to determine the apoptotic proportion. **Results** The value of the control group was (0.385 ± 0.03), and that of the SFAS groups (250 μg/ml, 500 μg/ml, 1 mg/ml and 2 mg/ml) were (0.31 ± 0.019), (0.199 ± 0.022), (0.150 ± 0.033) and (0.048 ± 0.026) respectively, with significant difference statistically ($P < 0.01$). After the treatment with SFAS (1 mg/ml in 1 hour), the apoptotic proportion of 7721 cells was 90% measured by Annexin V assay, and that of the control group was 17.36%. After the treatment with SFAS (1 mg/ml in one hour), the apoptotic proportion of 7721 cells was (60.3 ± 6.0) % measured by TUNEL assay, and that of the control group was (6.6 ± 3.5)%, showing significant difference for statistically ($P < 0.01$). **Conclusions** The inhibitory effect of SFAS on hepatic carcinoma cell line SMMC-7721 is remarkable in vitro, and apoptosis of these cells induced by SFAS may play an important role in this inhibitory effect. (J Intervent Radiol, 2005, 14: 401-403.)

【**Key words**】 SFAS; Human hepatic carcinoma cell line; SMMC-7721; Apoptosis

经导管动脉化疗栓塞是目前治疗中晚期肝癌的主要手段，其疗效与肝癌细胞对化疗药物的敏感性有密切关系。临床上常用化疗药物，如阿霉素、5-氟尿嘧啶、丝裂霉素等，对肝癌的抑瘤作用有限，是中晚期肝癌患者疗效不佳的主要因素之一。因此，寻找新型的抗癌药物或提高已有化疗药物对肝癌的抑瘤效果是当务之急。

红藤脂酸钠（sargentgloryvine fatty acid sodium, SFAS）是中药提取物，分子式为 $C_{38}H_{46}O_8Na$。我们以人肝癌细胞系 SMMC-7721 为实验模型，研究红藤脂酸钠的体外抑瘤作用，发现 SFAS 能够明显抑制肿瘤的生长代谢、诱导肿瘤细胞发生凋亡，具有潜在的应用前景。现将结果报道如下。

作者单位：710038 西安 第四军医大学唐都医院介入放射科
通讯作者：刘 涛

万方数据

材料和方法

一、材料

SMMC-7721 细胞株购自本校细胞工程中心；红藤脂酸钠注射液(100 mg/瓶)，由陕西靓帝生物科技有限责任公司提供；Annexin V 凋亡检测试剂盒及 TUNEL 原位凋亡检测试剂盒购自美国 R&D 公司。

二、细胞培养

SMMC-7721 细胞以常规法置于 PRMI-1640 全培养液中(含 100 ml/L 胎牛血清)，于 37 ℃、50 ml/L CO_2 和充分湿度条件下的恒温培养箱中培养，隔 2 d 传代 1 次.取对数生长期的细胞用于实验。

三、MTT 药敏实验

以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板中，培养 24 h 后换用含不同浓度红藤脂酸钠(阴性对照组为培养液)处理 1 h，再改用培养液培养 24 h；每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl 继续培养 4 h，去上清液后加入二甲基亚砜(DMSO)150 μl/孔，振荡 10 min；上酶联免疫检测仪，于波长 490 nm 处测每孔的吸光值(*A* 值)，根据 *A* 值判定药物对细胞增殖的影响。每组设 3 个复孔，实验重复 3 次。

四、Annexin V 法检测细胞凋亡

以每孔 5×10^4 个细胞接种于 12 孔培养板，培养 24 h 后换用含 1 mg/ml 红藤脂酸钠的培养液处理 1 h(阴性对照组为培养液)，再改用培养液培养 24 h；用 0.25% 胰酶消化收集细胞，按照 Annexin V 凋亡检测试剂盒说明操作，上流式细胞仪检测。

五、TUNEL 法检测细胞凋亡

将无菌盖玻片置于 6 孔培养板底部，每孔接种 1×10^5 个细胞，培养 24 h 后换用含 1 mg/ml 红藤脂酸钠的培养液处理 1 h(阴性对照组为培养液)，再改用培养液培养 24 h；用眼科镊取出盖玻片粘在载玻片上，按照 TUNEL 原位凋亡检测试剂盒说明操作，DAB 显色后，倒置显微镜下(40×10)随机选取 5 个视野，记数显色和未显色细胞，分别计算细胞凋亡率：细胞凋亡率 = 显色细胞数/(显色细胞数 + 未显色细胞数) ×100%。

六、数据处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，统计学处理采用方差分析和 *t* 检验。

结　果

一、MTT 药敏实验

红藤脂酸钠对 SMMC-7721 细胞生长具有明显抑制作用，并有剂量依赖性。当红藤脂酸钠浓度达到 2 mg/ml 时，其对肿瘤细胞的抑制率为 87.5%(表 1)。

表 1　不同浓度红藤脂酸钠(作用时间 1 h)对 SMMC-7721 细胞生长的抑制作用($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

分组	浓度(mg/ml)	*A* 值	抑制率(%)
阴性对照组		$0.385\pm0.030^{\triangle\triangle}$	
红藤脂酸钠	0.25	$0.310\pm0.019^{\triangle\triangle}$	19.5%
	0.5	$0.199\pm0.022^{\triangle\triangle}$	48.3%
	1	$0.150\pm0.033^{\triangle\triangle}$	61.0%
	2	$0.048\pm0.026^{\triangle\triangle}$	87.5%

$^{\triangle\triangle}P<0.01$

二、Annexin V 法检测结果

阴性对照组：①细胞存活 81.85%；②坏死 0.79%；③凋亡早期 4.17%；④凋亡晚期 13.19%，凋亡总计③ + ④ = 17.36%。红藤脂酸钠(1 mg/ml 作用 1 h)处理组：①细胞存活 9.84%；②坏死 0.16%；③凋亡早期 1.27%；④凋亡晚期 88.73%，凋亡总计③ + ④ = 90%。见图 1。

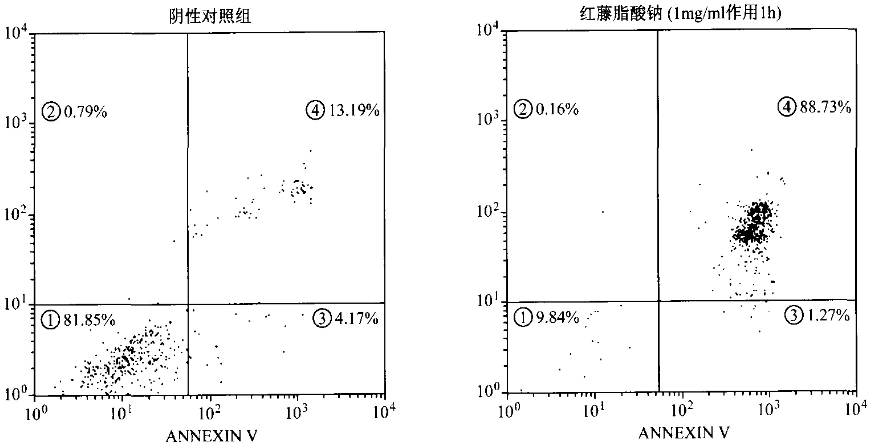

图 1　红藤脂酸钠(1 mg/ml 作用 1 h)诱导 SMMC-7721 细胞凋亡的流式细胞仪结果

万方数据

三、TUNEL 法检测结果

红藤脂酸钠(1 mg/ml 作用 1 h)处理组细胞的凋亡百分率为(60.3±6.0)%,阴性对照组细胞的凋亡百分率为(6.6±3.5)%,经统计学处理差异有显著性($P<0.01$)。

讨 论

红藤脂酸钠是红藤、淫羊藿等为主组成的中药复方制剂提取物,临床用于消化系统、呼吸系统和妇科肿瘤的治疗,能明显延长患者生存时间和改善患者生存质量。本实验证明红藤脂酸钠在体外对 SMMC-7721 细胞具有明显的抑制或致死作用,其作用机制主要是可以诱导 SMMC-7721 细胞发生凋亡。

凋亡是描述细胞死亡的一种特殊类型[1]。近年研究发现细胞凋亡与肿瘤发生、生长关系密切,机体能够以凋亡的方式清除不需要的、受损伤的或有癌前病变的细胞;于细胞发生凋亡过程中,由于各种因素可使凋亡过程受到抑制,致使这些未凋亡的细胞得以继续生长,最终导致肿瘤的发生[2]。此外,肿瘤细胞的凋亡是决定肿瘤生长快慢的主要因素之一。本实验采用 Annexin V 和 TUNEL 两种方法研究红藤脂酸钠处理后的 SMMC-7721 细胞,均证实出现了大量细胞凋亡,提示红藤脂酸钠可能成为极具应用前景的肿瘤细胞凋亡诱导剂。

细胞凋亡是一个复杂的多因素引起的生理病理过程,受到多种内外因素的调控;目前已知细胞的凋亡主要通过两条基本途径——死亡受体途径和线粒体途径来完成[3]。死亡受体途径也称为"外部途径",即细胞外相应的配体与细胞膜上的受体结合引发细胞内凋亡通路的激活,目前已经明确的死亡配体有 FasL、TNF-α、Apo-3L 和 TRAIL[4,5]。线粒体途径又被称为"内部途径":线粒体膜由内、外两层构成,两层间形成膜间隙,细胞色素 C、凋亡诱导因子(AIF)以及其他一些促凋亡因子存在于膜间隙中;当细胞内环境改变引起线粒体膜通透性增高时,上述因子释放则可引起细胞凋亡[6]。红藤脂酸钠的结构与已知的死亡配体无相似性,可能是通过线粒体途径导致 SMMC-7721 细胞凋亡,但是其作用机制还有待进一步研究。

抗癌中药一直是国内医药研究的热点之一。近年来研究较多的有槐耳、黄芪等中药[7-11],但是其成品均为口服制剂,无法通过介入治疗方式使人体肿瘤局部达到极高的药物浓度。然而,红藤脂酸钠的剂型为注射液,可以通过动脉灌注或与碘油配比成乳剂给药;通过本实验研究表明:药物作用 1 h 的条件下,红藤脂酸钠对 SMMC-7721 细胞生长的抑制率随药物浓度的增加明显上升。这一研究结果为将来临床使用红藤脂酸钠进行动脉化疗栓塞提供了实验依据。

[参考文献]

[1] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer, 1972, 26: 239-257.

[2] Marx J. Cell death studies yield cancer clues. Science, 1993, 259: 760.

[3] Green DR. Apoptosis pathways: the road to ruin. Cell, 1998, 94: 695-698.

[4] Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. J Cell Mol Med, 2004, 8: 445-454.

[5] Yagita H, Takeda K, Hayakawa Y. TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy. Caner Sci, 2004, 95: 777-783.

[6] Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. Science, 2004, 305: 626-629.

[7] 程若川, 汤礼贵, 兰丽琴, 等. 槐耳清膏诱导人直肠癌 HR8348 细胞凋亡的实验研究. 中国普外基础与临床杂志, 2003, 10: 568-571.

[8] 黄 涛, 孔庆志, 卢宏达, 等. 槐耳清膏诱导人肺腺癌细胞 A_{549} 凋亡的实验研究. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24: 503.

[9] 张哲民, 李德仁. 黄芪在非小细胞肺癌化疗时应用的临床观察. 上海医药, 1999, 20: 18-19.

[10] 杨 雁, 陈敏珠. 黄芪总苷对肝癌细胞凋亡及 wtp53 基因表达的影响. 中国药理学通报, 2001, 17: 447-451.

[11] 许杜娟, 吴 强, 杨 雁, 等. 黄芪总苷的抑瘤作用及其作用机制. 中国药理学通报, 2003, 19: 823-826.

(收稿日期:2005-03-07)

万方数据

红藤脂酸钠对人肝癌细胞系SMMC-7721体外抑瘤作用的实验研究

万方数据 WANFANG DATA 文献链接

作者： 刘涛， 王执民， 韦建学， LIU Tao， WANG Zhi-min， WEI Jian-xue
作者单位： 710038,西安,第四军医大学唐都医院介入放射科
刊名： 介入放射学杂志 ISTIC PKU
英文刊名： JOURNAL OF INTERVENTIONAL RADIOLOGY
年，卷(期)： 2005，14(4)
被引用次数： 1次

参考文献(11条)

1. Kerr JF.Wyllie AH.Currie AR Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics 1972

2. Marx J Cell death studies yield cancer clues 1993

3. Green DR Apoptosis pathways: the road to ruin 1998

4. Ding WX.Yin XM Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury 2004

5. Yagita H.Takeda K.Hayakawa Y TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy 2004

6. Green DR.Kroemer G The pathophysiology of mitochondrial cell death 2004

7. 程若川.汤礼贵.兰丽琴 槐耳清膏诱导人直肠癌HR8348细胞凋亡的实验研究[期刊论文]-中国普外基础与临床杂志 2003

8. 黄涛.孔庆志.卢宏达 槐耳清膏诱导人肺腺癌细胞A549凋亡的实验研究[期刊论文]-中华结核和呼吸杂志 2001

9. 张哲民.李德仁 黄芪在非小细胞肺癌化疗时应用的临床观察 1999

10. 杨雁.陈敏珠 黄芪总苷对肝癌细胞凋亡及wtp53基因表达的影响[期刊论文]-中国药理学通报 2001(01)

11. 许杜娟.吴强.杨雁 黄芪总苷的抑瘤作用及其作用机制[期刊论文]-中国药理学通报 2003(01)

相似文献(1条)

1. 学位论文 刘涛 红藤脂酸钠注射液抗癌作用的实验研究 2005

红藤脂酸钠注射液是以红藤为主组成的中药复方制剂提取物，该中药方剂是民间中医治疗肿瘤的一个偏方，对消化系统、呼吸系统和妇科恶性肿瘤有较好的疗效。本文以人肝癌细胞系SMMC-7721为实验模型研究红藤脂酸钠注射液对SMMC-7721生长的影响，初步探讨其作用机制。研究表明，红藤脂酸钠是一种具有抗癌活性的新药，对人肝癌细胞系SMMC-7721细胞生长有很强的抑制作用。这种抑制作用与药物浓度和药物作用时间成正相关。红藤脂酸钠抑制SMMC-7721细胞生长的机制是诱导肿瘤细胞发生凋亡。

引证文献(1条)

1. 黄立军.王小平.田玉兔.闫小龙.高坤祥.张志培 回苏宝液对A549细胞抑制作用及其机制的初步探讨[期刊论文]-现代肿瘤医学 2009(11)

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_jrfsxzz200504021.aspx
授权使用：qkxbl1(qkxbl1)，授权号：3109f364-01ab-47a0-8a63-9e2f00fedf9a

下载时间：2010年11月15日