

BRM 释介素体外抑瘤作用与诱导癌细胞凋亡

刘朝阳¹, 王泽光², 刘兴京³, 田海梅¹,
Surapol⁴, 娜迪娅², 张一飞², 张伟¹

Antitumor Effect and Apoptosis Induction in Human Cancer Cell Lines by BRM-SJS

LIU Zhao-Yang¹, WANG Ze-Guang², LIU Xing-Jing³, Tian Hai-Mei¹,
Surapol⁴, Na Di-Ya², ZHANG Yi-Fei², ZHANG Wei¹

1. 中国医学科学院
中国协和医科大学
肿瘤研究所,
北京 100021
2. 北京临床肿瘤基因研究所,
北京 100022
3. 广州武警医院,
510507
4. 泰国 Salaya 医院

1. Cancer Institute of Chinese
Academy of Medical Sciences and
Peking Union Medical College,
Beijing, 100021,
P. R. China
2. Beijing Clinical Tumour
Gene Research Center,
Beijing, 100022,
P. R. China
3. Military Hospital of Guangzhou,
Guangzhou, Guangdong, 510507,
P. R. China
4. Salaya Hospital Thailand

通讯作者:王泽光

Correspondence to: WANG Ze-Guang

Tel: 86 - 10 - 67768889

E-mail: brm@brmwang.com

收稿日期:2004-08-25

修回日期:2004-09-10

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: It had been observed that BRM-SJS had antitumor effect in our clinical practice. This study was designed to investigate the antitumor activity of BRM-SJS, and mechanism of its action. METHODS: In vitro antitumor experiments with MTT method, meanwhile cell morphology, flow cytometry, and agarose gel electrophoresis were performed for determining apoptosis in several tumor cell lines. RESULTS: BRM-SJS had antitumor effects on human Suzhou human glioma (SHG-44), breast carcinoma (MCF-7), and human pancreas carcinoma (PANC1) in vitro, the IC₅₀ values of BRM-SJS were 0.299 mg/ml, 1.853 mg/ml and 9.416 mg/ml respectively. At the 2.5 mg of BRM-SJS on SHG-44 and MCF-7, marked morphological changes, including cell shrinkage and condensation of chromosomes, were observed with electric microscope. The increase of apoptosis in SHG-44 and MCF-7 cells treated with BRM-SJS extracts 0.625 - 2.5 mg for 14 - 48 h was observed by Annexin-V/PI flow cytometry analysis. Agarose gel electrophoresis of DNA from SHG-44 and MCF-7 cells treated with BRM-SJS extracts 1.25 - 5 mg for 24 h or 48 h showed marked DNA Ladder pattern. CONCLUSION: Antitumor activity of BRM-SJS may be related with inducement of apoptosis of tumor cells.

KEYWORDS: BRM-SJS; Cell apoptosis; Glioma; Breast neoplasms

【摘要】 背景与目的:BRM 释介素在临床上对一些肿瘤有一定疗效,但其机理仍不清楚。本研究旨在探讨中药复方胶囊 BRM 释介素诱导人神经胶质瘤细胞株 SHG-44, 人乳腺癌细胞株 MCF-7 的凋亡作用,及其抗肿瘤作用的机理。方法:运用 MTT 法检测 BRM 释介素体外对人癌细胞株的抑制作用;应用电镜、Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪分析、琼脂糖凝胶电泳观察 BRM 释介素诱导 SHG-44, MCF-7 细胞发生凋亡的作用。结果:BRM 释介素体外对 SHG-44, MCF-7, PANC1 细胞具有明显的抑制作用, IC₅₀ 值分别为 0.299 mg/ml, 1.853 mg/ml 和 9.416 mg/ml。SHG-44 和 MCF-7 在 BRM 水提液 (2.5 mg) 作用下发生细胞凋亡,表现为细胞固缩、核染色质靠边,出现马蹄形,半月形。Annexin V-FITC/PI 流式细胞仪分析, BRM (0.625 ~ 2.5 mg) 作用 14 ~ 48 h, 凋亡细胞明显增多。BRM 水提液 (1.25 ~ 5 mg) 作用 24 或 48 h, 细胞 DNA 裂解片段呈典型的梯带。结论:BRM 释介素的抗肿瘤活性与诱导细胞凋亡有关。

关键词:BRM 释介素; 细胞凋亡; 神经胶质瘤; 乳腺肿瘤

中图分类号:R73-3-354 文献标识码:A

文章编号:1000 - 467X(2004)11s - 1386 - 04

细胞凋亡 (apoptosis) 是不同于细胞坏死的生理过程, BRM 释介素是一种中药复方制剂, 由郁金、半支莲、山桃叶、三棱等中药提取制成, 临床应用对一些肿瘤有效。近年来, 随着分子生物学的发展, 人们发现抗肿瘤药, 特别是临床上常用的一些抗肿瘤药可诱导肿瘤细胞凋亡^[1]。新

的观点认为肿瘤的发生不仅是分裂失控导致的细胞过度增生,同时也可能是细胞凋亡通路受阻,使本该死亡的细胞继续存在而产生肿瘤。为进一步揭示 BRM 抗肿瘤作用机制,我们研究观察了 BRM 体外抗肿瘤作用,及诱导肿瘤细胞凋亡。

1 材料与方 法

1.1 药 物

BRM 释介素由北京临床肿瘤基因研究所提供,为胶囊剂,批号 2001-5。BRM 提取液,棕黄色液体,于 -20℃ 冰箱保存,盐酸阿霉素 (ADM) 汕头经济特区明治医药有限公司制造,批号 010302,顺铂 (CDDP) 山东齐鲁制药厂产品,批号 0111034,5-氟尿嘧啶 (5-FU) 上海华联制药公司产品,批号 012065。

1.2 癌 细 胞 株

SHG-44: 人脑恶性胶质瘤细胞株; MCF-7: 人乳腺癌细胞株; PANC1: 人胰腺癌细胞株本室常规液氮保存。

1.3 主 要 仪 器

Philips EM-410 型透射电镜、Coulter Elite Esp 流式细胞仪、日本 NIKON 倒置显微镜、Olympus/PM-6 显微镜。

1.4 BRM 释介素体外抑瘤活性的测定^[2]

用 10% FCS RPMI-1640 培养,在细胞处于对数生长期,用台盼蓝染色,计算活细胞数,铺板。实验用 96 孔培养板为 Denmark 进口。在无菌条件下,按 0.5 的级差,将 BRM 释介素提取液稀释到所需浓度,分别加到 96 孔中每个浓度 3 个平行孔,37℃ 5% CO₂ 培养 48 h 后,去上清,每孔加入 MTT 100 μl (MTT 5 mg/ml,使用时用 RPMI-1640 做 1:10 稀释),继续培养 4 h,弃上清,每孔加入 100 μl 二甲基亚砷 (DMSO),充分混匀,用 Bio-RAD 450 型酶标仪,波长 570nm 测定 A 值,计算每个浓度抑制率,用 SPSS 统计软件包的概率单位法 (PROBIT) 计算 IC₅₀。

1.5 BRM 释介素对细胞超微结构的影响

取上述对数生长期的细胞,调细胞浓度为 1 × 10⁷/ml,1 ml 种植于 200 ml 培养瓶中,在 5% CO₂,37℃ 条件下,细胞培养箱中培养,设阴性对照组 (不加药物),阳性对照组 (加顺铂或阿霉素),及 BRM 2.5 mg 剂量组。药物作用结束后,离心,弃上清,常规电镜样品制备,细胞用 2.5% 戊二醛预固定,1% 锇酸后固定,环氧树脂包埋,超薄切片,醋酸铅-铀双染色,透射电镜观察,并摄片。

1.6 Annexin-V/PI 双染的流式细胞仪分析

正常活细胞,磷脂酰丝氨酸 (PS) 位于细胞膜内侧,但在早期凋亡的细胞 PS 从细胞膜内侧翻转到细胞膜表面,暴露在细胞外环境中,以荧光素 FITC 标记的 Annexin-V 为探针,可利用流式细胞仪检测细胞凋亡的发生。碘化丙啶 (PI) 是一种核酸染料,它不能透过完整的细胞膜,但在凋亡晚期的细胞和坏死细胞,PI 可透过而红染。因此将 Annexin-V 和 PI 联合使用,可检测并区分出凋亡的早期、中晚期和坏死细胞。实验前将培养到对数生长期,计数好的细胞分组为 (1) 阴性对照组, (2) 阳性药对照组, (3) BRM 高、低剂量组,分别加入药物后作用,14 h、24 h、38 h、48 h 后胰酶消化,分别收取细胞,用 Annexin-V 细胞凋亡检测试剂盒对细胞进行 Annexin-V-FITC 和 PI 标记,然后上机 (流式细胞仪) 检测。

1.7 DNA 琼脂糖凝胶电泳^[3,4]

取对数生长期的 SHG-44 细胞及 MCF-7 细胞,每瓶接种 1 × 10⁷ 细胞,设溶剂对照组、阳性药对照组、BRM 高、低剂量组,于接种细胞后 24 h 分别加入药物,作用 24 h 至 48 h 后分别收集细胞, PBS 洗 1 次,离心,沉淀中加入 0.2 ml 细胞裂解液 (10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, 0.4% SDS, 300 μg/L Proteinase K), 50℃ 水浴温育 8 h, 然后加入等体积酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 室温作用 5 min, 抽提 1 次, 10 000 r/min 离心 10 min 后,取上层液再加入 100 μg RNase, 37℃ 水浴 30 min 后,在 1.8% 琼脂糖凝胶上电泳 (电压 60mV) 3 h, 紫外检测仪下观察, 摄影。

2 结 果

2.1 BRM 释介素体外细胞生长抑制作用

BRM 释介素对人脑神经胶质瘤 (SHG-44)、人乳腺癌 (MCF-7)、细胞生长有明显抑制作用,随药物浓度增加,抑制率逐渐加大,在 10 mg 浓度下,抑制率分别为 92.2% 和 85.1%,抑制作用明显,对人胰腺癌细胞株 PANC1 也有一定的抑制作用,结果见表 1。

2.2 SHG-44 细胞、MCF-7 细胞超微结构观察

BRM 2.5 mg 作用于 SHG-44 细胞, MCF-7 细胞 48 h 后,细胞出现凋亡的特征形态学改变,电镜下可见: 凋亡细胞皱缩,细胞质膜起泡,染色质浓缩聚集于核膜呈境界分明的块状、新月形小体,出现空泡变性,与 CDDP 相比,可以判定 BRM 在上述浓度,条件下可以引起 SHG-44 细胞, MCF-7 细胞凋亡。结果见图 1, 图 2。

表 1 BRM 释介素对人癌细胞株生长的抑制作用

Table 1 Inhibitive effect of BRM-SJS on human cancer cells in vitro

Cell line	Dose(mg/ml)				Inhibition rate(%)				IC ₅₀ (mg/ml)
	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.078	
SHG-44	92.2	82.9	71.2	68.3	66.6	53.4	42.2	27.6	0.299
MCF-7	85.1	74.5	43.6	31.2	29.3	23.0	18.6	9.4	1.853
PANC1	60.5	42.3	31.0	25.3	10.4	0	0	-	9.416

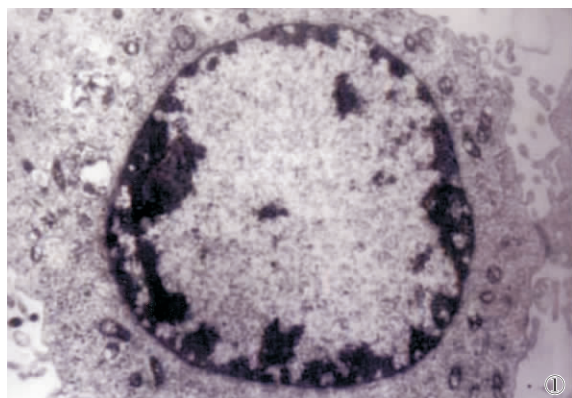


图 1 BRM-SJS 释介素 2.5 mg 处理 48 h 的 SHG-44 细胞超微结构

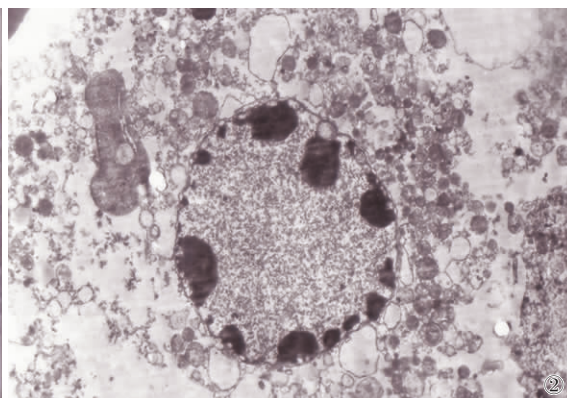


图 2 BRM-SJS 释介素 2.5 mg 处理 48 h 的 MCF-7 细胞超微结构

Figure 1 Morphological change of apoptosis in SHG-44 cells, treated with 2.5 mg of BRM for 48 h.

The chromatin of apoptotic cells condensed and formed crescentic nucleus. $\times 4\ 400$

Figure 2 Morphological change of apoptosis in MCF-7 cells, treated with 2.5 mg of BRM-SJS for 48 h.

The chromatin of apoptotic cells condensed and formed crescentic nucleus. $\times 4\ 400$

2.3 SHG-44 细胞流式细胞仪检测

本实验结果表明 BRM 释介素对 SHG-44 细胞随药物作用时间的增加,早、中晚期凋亡细胞率逐渐增加,14 h, BRM 1.25 mg 早、中晚期凋亡率为 5.8%,24 h 时为 12.7%。而 48 h 时早、中晚期凋亡率为 35.6%,坏死率由 14 h 的 5.0% 增加到 8.3%。而药物作用 14 h 时 BRM 各浓度凋亡率发生均较低,结果见表 2。

2.4 SHG-44 细胞 DNA 凝胶电泳结果

5-氟脲嘧啶 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 作用 40 h, 分别出现典型的 DNA 梯带。BRM 2.5 mg 作用 24 h, 及 BRM 1.25 mg、2.5 mg 作用 40 h, 表现出随药物浓度的加大及作用时间的延长, DNA 梯带逐渐增多。而 BRM 1.25 mg 作用 24 h 没有出现 DNA 梯带, 由此提示 DNA 梯带与 BRM 作用的时间更为密切, 结果见图 3。

2.5 MCF-7 细胞流式细胞仪检测

本实验结果显示, BRM 作用 38 h 后, (1) BRM 随浓度的增加 (1.25 mg 到 2.5 mg) 早、中晚期凋亡率由 11.2% 提高到 44.8%。(2) BRM 2.5 mg 组随作用时间的延长, 由 14 h、24 h 到 38 h 凋亡率逐渐提高, 分别为 5.5%、7.1% 和 44.8%。结果见表 3。

表 2 BRM 释介素对 SHG-44 细胞诱导凋亡 (Annexin-V/PI) 作用

Table 2 BRM-SJS induced SHG-44 cells apoptosis action (Annexin-V/PI)

Group	Dose	Time (h)	Normal (%)	Necrosis (%)	Apoptosis (%)		
					Early apo.	Middlelate apo.	Total
Negative	-	14	89.7	1.0	3.8	5.6	9.4
	-	24	99.1	0.1	0.9	0.0	0.9
	-	38	87.8	1.4	4.5	6.3	10.8
	-	48	74.9	9.6	7.1	8.4	15.5
Positive CDDP (μg)	3	14	89.6	0.9	3.2	6.3	9.5
	3	24	68.6	0.2	25.7	5.6	31.3
	3	38	15.6	0.2	35.2	49.0	84.2
	3	48	53.1	2.3	35.6	9.0	44.2
BRM-SJS (mg/ml)	1.25	14	89.2	5.0	0.6	5.2	5.8
	1.25	24	84.0	3.4	9.3	3.4	12.7
	1.25	38	74.9	0.2	19.4	5.5	24.9
	1.25	48	56.2	8.3	16.3	19.3	35.6
BRM-SJS (mg/ml)	0.625	14	89.8	4.8	0.8	4.6	5.4
	0.625	24	91.6	1.9	5.0	1.4	6.4
	0.625	38	76.3	0.2	17.3	6.3	23.6
	0.625	48	45.7	9.3	17.4	27.6	45.0

2.6 MCF-7 细胞 DNA 凝胶电泳结果

阿霉素 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 作用 48 h, 出现典型的 DNA 梯带。BRM 2.5 mg 作用 48 h, 及 BRM 5 mg, 作用 40 h 和 48 h 表现出典型的 DNA 梯带。而 BRM 2.5 mg

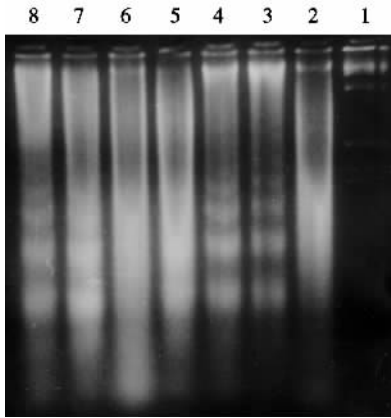


图3 BRM 释介素诱导 SHG-44 细胞凋亡时凝胶电泳分析

Figure 3 Apoptotic DNA fragmentation in SHG-44 cells induced by BRM-SJS for 24h and 40h, respectively.

1. Marker; 2. Normal; 3. 5-FU 7.5 μg/ml 40 h; 4. 5-FU 15 μg/ml 40 h; 5. BRM 2.5 mg 24 h; 6. BRM 1.25 mg 24 h; 7. BRM 2.5 mg 40 h; 8. BRM 1.25 mg 40 h

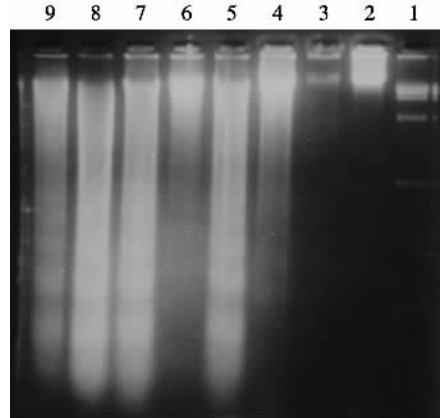


图4 BRM 释介素诱导 MCF-7 细胞凋亡凝胶电泳分析

Figure 4 Apoptotic DNA fragmentation in MCF-7 cells induced by BRM-SJS for 40h and 48h, respectively.

1. Marker; 2. Normal; 3. ADM 0.3 μg/ml 40 h; 4. ADM 0.6 μg/ml 48 h; 5. BRM 5 mg 24 h; 6. BRM 2.5 mg 40 h; 7. BRM 5 mg 40 h; 8. BRM 2.5 mg 48 h; 9. BRM 5 mg 48 h

表3 BRM 释介素对 MCF-7 细胞诱导凋亡 (Annexin-V/PI) 作用

Table 3 BRM-SJS induced MCF-7 cells apoptosis action (Annexin-V/PI)

Group	Dose	Time (h)	Normal (%)	Necrosis (%)	Apoptosis (%)		
					Early apo.	Mid-late apo.	Total
Negative	-	14	96.2	2.5	0.5	0.9	1.4
	-	24	95.0	3.6	0.4	1.1	1.5
	-	38	95.1	2.8	0.7	1.4	2.1
Positive (Adm) (μg)	7	14	96.7	1.4	0.5	1.4	1.9
	7	24	82.7	9.8	5.7	1.7	7.4
	7	38	12.4	1.9	35.5	50.2	82.6
BRM-SJS (mg/ml)	1.25	14	95.7	2.6	0.7	1.1	1.8
	1.25	24	93.5	2.8	1.1	2.6	3.7
	1.25	38	85.9	2.9	4.7	6.5	11.2
BRM-SJS (mg/ml)	2.5	14	88.2	6.4	1.0	4.5	5.5
	2.5	24	89.4	3.5	3.2	3.9	7.1
	2.5	38	54.0	1.3	20.9	23.9	44.8

作用 40 h 没有出现 DNA 梯带,结果见图 4。

3 讨论

抗肿瘤药物研究已经过了一个漫长过程,自 1972 年 Kerry 等提出细胞凋亡概念以来,人们逐步认识到多种抗肿瘤药物可引起肿瘤细胞凋亡^[5]。肿瘤是全身性疾病的局部表现,是受内外各种因素交互作用,多种基因参与和多步骤积累的结果。祖国传统医学在肿瘤治疗上主张从整体出发,进行辨证施治。BRM 释介素是一中药复方,临床应用对一些晚期恶性肿瘤可改善患者生存质量,使患者食欲增加,疼痛缓解,肿瘤得到控制。方中郁金辛、苦、寒长于行气解郁,活血祛瘀,半支莲辛、平有解毒之效,三棱具破血

行气、散消淤血气结增加复方活血祛瘀功能。细胞凋亡的发展具有多因素,多基因作用特点。目前,检测凋亡方法多种多样,但形态学方法是证明细胞凋亡的直接证据^[6,7]。本研究体外抑瘤实验结果显示,BRM 释介素对人三种肿瘤细胞株具有不同程度的生长抑制作用,对人神经胶质瘤细胞株 SHG-44 最为敏感,并且不同肿瘤细胞株对 BRM 诱导细胞死亡显示出不同的敏感性,表现出生长抑制,细胞溶解,细胞固缩、核致密,新月体的出现等细胞形态学方面的变化,SHG-44 及 MCF-7 细胞 Annexin-V/PI 双染的流式细胞仪分析,随药物浓度的加大或作用时间的延长凋亡百分率逐渐升高,琼脂糖凝胶电泳可见典型的 DNA 梯带。以上结果说明 BRM 可诱导 SHG-44 及 MCF-7 肿瘤细胞凋亡,为进一步研究癌细胞凋亡分子机制提供了依据。

[参 考 文 献]

[1] 刘朝阳,王德昌. 细胞凋亡在肿瘤药物治疗中的作用[J]. 医学研究通讯,1999,28(4): 25-27.
 [2] 刘朝阳,王德昌. 奥沙利铂抗肿瘤作用的研究[J]. 实用癌症杂志,2000,15(2): 151-153.
 [3] Jennifer L, Gooch Douglas Y. Strain-specific differences in formation of apoptotic DNA ladders in MCF-7 breast cancer cells [J]. Cancer Letters,1999,144(1): 31-37.
 [4] 刘文哲,胡义德. 人肺腺癌 A549/DDP 耐药细胞减弱顺铂诱导的细胞凋亡[J]. 癌症,2000,19(4): 325-327.
 [5] 李 达,刘瑞萍,杨淑莲,等. 中医药诱导肿瘤细胞凋亡的可能性探讨[J]. 中国中西医结合杂志,1996,16(7): 433-434.
 [6] Zhu XF, Xie BF, Li ZM, et al. Mechanism of apoptosis induced by squamocin in leukemia cells [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2001,7: 498-501.
 [7] 王树滨,杨纯正. 肿瘤化疗药物诱导细胞凋亡的研究进展[J]. 癌症,2000,19(12): 1173-1176.