

熊去氧胆酸选择性诱导人肝肿瘤细胞凋亡及抑制增殖的实验研究

刘 慧 韩国庆 孟 玫
秦成勇 许洪伟 赖 宁* (山东大学山东省立医院 山东济南 250021)

【摘要】 目的 探讨熊去氧胆酸(UDCA)诱导肝肿瘤细胞株凋亡并抑制其增殖的作用和机制。方法 用噻唑蓝法、流式细胞术、TUNEL 法、Wright-Giemsa 染色法、电镜及免疫细胞化学等方法,观察 UDCA 对肝肿瘤细胞株 HepG2、BEL7402 和正常人肝细胞株 L-02 的生长活力、细胞凋亡、细胞周期及 Bax/bcl-2 基因表达的影响。结果 UDCA 对 HepG2、BEL7402 细胞株具有显著的抑制生长、诱导凋亡、阻滞细胞周期于 S 期、降低 bcl-2 和提升 Bax 表达的作用。结论 UDCA 对 HepG2、BEL7402 细胞株有显著的抑制增殖及诱导凋亡作用,该作用可能与 UDCA 阻滞细胞周期、降低 bcl-2 和提升 Bax 的表达有关。

【关键词】 肝肿瘤 细胞株 熊去氧胆酸 细胞凋亡

【Abstract】 Objective To investigate the effect of UDCA in inducing apoptosis and inhibiting proliferation on hepatoma cell lines, and their mechanisms. **Methods** UDCA effect of cell proliferation, apoptosis, cell cycle and the expression of Bax/bcl-2 genes on two human hepatoma cell lines HepG2 and BEL7402, and normal human hepatic cell line L-02 in vitro were detected by MTT assay, flow cytometry, TUNEL assay, Wright-Giemsa staining, electron microscopy and immunocytochemistry. **Results** UDCA could strongly inhibit the proliferation, induce apoptosis, arrest cell cycle to S phase, down-regulate bcl-2 and up-regulate Bax gene expression of HepG2 and BEL7402 cell lines. UDCA had no obvious effect on L-02 cell line. **Conclusions** UDCA may selectively inhibit proliferation and induce apoptosis of HepG2 and BEL7402 cell lines by blocking cell cycle and regulating the expression of Bax/bcl-2 genes.

【Key words】 Hepotoma Cell lines UDCA Apoptosis

中图分类号:R735.7 文献标识码:A

熊去氧胆酸(UDCA)是临床常用的溶石利胆药,对原发性胆汁性肝硬化及慢性肝炎亦有良好疗效。研究发现,UDCA 可以预防及减少实验动物发生结肠癌;亦有诱导乳腺癌细胞凋亡的作用^[1]。2004 年 4~8 月,我们以 UDCA 处理人肝肿瘤 HepG2 及 BEL7402 细胞,旨在探讨其抑制细胞增殖及诱导细胞凋亡的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株及试剂 本试验所用人肝肿瘤细胞株 BEL7402、HepG2 及正常人肝细胞株 L-02 购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库,UDCA、噻唑蓝(MTT)为 Sigma 产品,鼠抗人 bcl-2 蛋白单克隆抗体(mAb)和鼠抗人 Bax 蛋白(mAb)为 Oncogene 产

品,免疫组化 ABC 试剂盒为 Vector 产品,5-氟尿嘧啶(5-FU)为 SantaCruz 产品,TUNEL 法检测试剂盒购自华美生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞生长抑制试验 采用 MTT 比色法,将对数生长的 HepG2、BEL7402 及 L-02 细胞接种于 96 孔板,每孔体积 200 μ l,6000 个细胞。置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 饱和湿度培养 24 小时后,分为实验组与对照组。实验组每孔分别加入终浓度为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 和 1mmol/L 的 UDCA,对照组不加药物。5-FU(10mg/ml)作为阳性对照。实验组每个浓度设 3 个复孔,分别培养 24、48、72 小时后,每孔加入 MTT (5mg/ml)10 μ l,继续培养 4 小时,弃上清,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)100 μ l,作用 30 分钟后,酶标仪上测吸光度 A570nm 值。按公式计算细胞生长抑制

* 北京化工大学生命科学学院
万方数据

率(实验组 A 值/对照组 A 值 $\times 100\%$)。

1.2.2 流式细胞仪(FCM)检测 分别收集经不同浓度药物作用 48 小时后的 HepG2 及 BEL7402 细胞 1×10^6 个, PBS 液仔细清洗 2 次, 70% 乙醇 4℃ 固定, 碘化丙啶染色 30 分钟。用 FACSCalibar 流式细胞仪作凋亡和 DNA 周期分析。

1.2.3 末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导脱氧尿苷三磷酸缺口末端标记(TUNEL 法) 原位检测细胞凋亡, 将 $0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm}$ 的盖玻片置于 24 孔培养板的孔底, 取对数生长的 HepG2 及 BEL7402 细胞接种于培养板, 每孔 2×10^4 个细胞, 分别加入不同浓度的 UDCA 及 5-FU, 培养 48 小时后取捞出玻片, 4% 多聚甲醛固定 30 分钟, 其余步骤按试剂盒说明书进行。光镜下观察, 细胞核染色呈棕褐色者为凋亡细胞。每组观察 5 张玻片, 每张玻片取 5 个高倍视野, 计数 1000 个细胞中凋亡细胞所占的百分比, 即凋亡指数(AI), 取 5 张玻片的平均值代表该组的 AI。

1.2.4 细胞形态学观察 制作不同浓度的 UDCA 处理 48 小时 HepG2 及 BEL7402, 细胞爬片, 倒置显微镜下观察细胞的生长及形态变化。之后以 Wright-Giemsa 染色细胞爬片。以 H-800 透射电镜及 S-570 扫描电镜观察 UDCA 处理前后细胞超微结构变化。

1.2.5 免疫细胞化学(ABC 法) 以不同浓度 UDCA 处理 HepG2、BEL7402、L-02 细胞 48 小时后, 取出细胞爬片, 按试剂盒说明书步骤操作, 正常山羊血清取代第一抗体作为阴性对照, 光镜下观察 bcl-2 和 Bax 阳性性细胞(细胞质内棕黄色细颗粒, 簇状和/或片状分布)。每组观察 4 张玻片, 每张观察 5 个高倍视野, 计算阳性细胞的百分比, 取 4 张玻片的平均值代表该组的阳性细胞百分率。

1.2.6 统计学方法 采用 *t* 检验, 设定 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 UDCA 对肝癌细胞的抑制作用 MTT 检测显示, UDCA 对 HepG2 及 BEL7402 的细胞增殖均有不同的抑制作用, 药物浓度越高, 作用时间越长, 产生的抑制作用越强。UDCA 对 L-02 的生长无明显抑制作用。

2.2 不同浓度 UDCA 作用 48 小时 HepG2、BEL7402 凋亡率比较 见表 1。FCM 分析 UDCA 作用于 HepG2 及 BEL7402 细胞 48 小时后, 在流式细胞 DNA 组方图上可见凋亡细胞呈特征性的凋亡峰(亚二倍峰), 药物浓度越高, 细胞凋亡率亦越高, 与对照组相比, 差异有显著性($P < 0.05$)。UDCA 对 L-

02 细胞作用 48 小时后, 凋亡率较对照组提高, 但差异无显著性($P > 0.05$)。FACS Caliar 流式细胞仪细胞周期分析显示, UDCA 可使 HepG2 和 BEL7402 细胞生长阻滞于 S 期。

2.3 不同浓度 UDCA 作用 48 小时 HepG2、BEL7402 的 AI 比较 见表 2。经 UDCA 处理 48 小时后, UDCA 检测 HepG2 及 BEL7402 的 AI 比对照组明显升高($P < 0.05$), 并且药物浓度越高, AI 越高。

表 1 不同浓度 UDCA 作用 48 小时 HepG2、BEL7402 细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)

UDCA (mmol/L)	凋亡率(%)	
	HepG2	BEL7402
0(对照组)	2.58 \pm 0.26	2.02 \pm 0.13
0.1	8.36 \pm 1.55*	9.26 \pm 2.01*
0.4	19.45 \pm 3.22*	17.24 \pm 1.68*
0.8	36.25 \pm 6.36*	37.36 \pm 5.25*
1.0	42.36 \pm 5.65*	44.27 \pm 4.39*

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

表 2 不同浓度 UDCA 作用 48 小时 HepG2、BEL7402 细胞 AI 比较($\bar{x} \pm s$)

UDCA (mmol/L)	AI(%)	
	HepG2	BEL7402
0(对照组)	3.26 \pm 1.1	4.15 \pm 1.6
0.2	12.5 \pm 1.8*	14.6 \pm 1.4*
0.4	18.8 \pm 2.4*	12.5 \pm 2.6*
0.8	28.6 \pm 5.4*	30.1 \pm 6.2*
5-FU(10mg/ml)	23.5 \pm 3.2*	26.4 \pm 2.2*

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

2.4 细胞形态改变 倒置显微镜下观察, 经浓度为 0.05 及 0.1mmol/L UDCA 处理的 HepG2 及 BEL7402 细胞形态变化不大。当 UDCA ≥ 0.4 mmol/L 时, 上述两种细胞形态变化明显, 瑞氏染色可见 HepG2 及 BEL7402 细胞有较为典型的凋亡形态学变化(细胞浆有较多空泡形成, 染色质凝集、核固缩、核碎裂等)。扫描电镜显示, 经 UDCA 处理的 HepG2 及 BEL7402 细胞体积皱缩, 外观不规则, 微绒毛减少甚至消失; 透射电镜显示胞浆浓缩, 染色质聚集, 可见凋亡小体形成。

2.5 不同浓度 UDCA 作用 48 小时 HepG2、BEL7402、Bax 与 bcl-2 基因的表达比较 见表 3。浓度为 0.4 或 0.8mmol/L 的 UDCA 处理 HepG2 及 BEL7402 细胞 48 小时后, bcl-2 表达明显下降($P < 0.05$), Bax 基因表达显著增强($P < 0.05$)。UDCA 浓度越高, Bax/bcl-2 比值越大。UDCA 处理 L-02 细胞后, Bax 及 bcl-2 表达无明显改变。

表3 不同浓度UDCA作用48小时HepG2、BEL7402、Bax与bcl-2基因的表达比较($\bar{x} \pm s$)

UDCA (mmol/L)	HepG2(%)		BEL7402(%)	
	bcl-2	Bax	bcl-2	Bax
0(对照组)	24.3±2.4	42.6±5.4	21.6±1.8	44.5±3.8
0.2	19.4±1.5	42.5±3.6	20.1±1.9	48.4±2.5
0.4	14.2±2.1*	53.6±2.5*	13.5±1.8*	56.3±3.8*
0.8	10.1±1.6*	9.4±3.2*	11.6±2.1*	58.9±3.2*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

3 讨论

肿瘤发生与细胞凋亡及增殖异常有密切关系。细胞凋亡是区别于细胞坏死的另一种细胞死亡方式,其形态及生物化学改变具有自身特点。本研究MTT试验结果显示,UDCA对HepG2及BEL7402细胞增殖有明显的抑制作用,且UDCA浓度越高、作用时间越长、对细胞增殖的抑制作用越强。FCM及TUNEL检测结果表明,UDCA可诱导HepG2及BEL7402细胞凋亡,药物浓度越高,凋亡越明显。光镜及电镜观察发现,UDCA可诱导HepG2及BEL7402细胞出现典型的凋亡形态学改变。MTT及FCM检测未发现UDCA有抑制正常肝细胞株L-02增殖及诱导其凋亡的作用,并对L-02细胞bax/bcl-2表达无影响,说明UDCA抑制细胞增殖及诱导凋亡的作用具有选择性。细胞分裂增殖的实质就是不断通过细胞周期来实现DNA的复制,而细胞周期由严格的4个时期组成,即 $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$ 。本研究中FCM检测结果显示,HepG2及BEL7402细胞株经UDCA处理后,细胞周期发生了变化,使细胞增殖阻滞于S期,这可能是UDCA抑制HepG2及BEL7402细胞株增殖诱导凋亡的一个重要机制。bcl-2家族是目前公认的一类与细胞凋亡相关的基因,包括作用相反的2个亚类:①促进细胞凋亡的

Bax、bcl-x、bak和bad等;②抑制细胞凋亡的bcl-2、bcl-xl等,其中对bcl-2和Bax的研究最为广泛。当Bax/bcl-2比例较高时,细胞趋向凋亡,反之则细胞凋亡程度降低。许多研究表明,bcl-2过度表达能抑制多种因素诱导的多种细胞凋亡;Bax过度表达不仅可使多种细胞发生自发凋亡,而且也可促进许多因素诱导的多种细胞凋亡^[2~4]。本研究显示,UDCA处理HepG2及BEL7402后,Bax表达增强,bcl-2表达减少,Bax/bcl-2升高,且UDCA浓度越高,Bax/bcl-2升高越明显。这与本研究中UDCA可诱导HepG2及BEL7402细胞凋亡,并且随UDCA浓度升高,凋亡率越高的结果相一致。提示Bax/bcl-2升高可能是UDCA诱导HepG2及BEL7402细胞凋亡的机制之一。上述研究表明,UDCA可能通过影响HepG2及BEL7402细胞的增殖周期和调节Bax/bcl-2的表达等机制,抑制癌细胞增殖,诱导癌细胞凋亡。而对L-02细胞的增殖及凋亡则无明显影响。本研究结果为临床使用该药防治肝癌提供了理论及实验依据。

4 参考文献

1. Im EO, Lee S, Suh H, et al. A novel ursodeoxycholic acid derivative induces apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Pharm Pharmacol Commun*, 1999, 5: 293~298.
2. Tsujimoto Y, Shimizu S, Eguchi Y, et al. Bcl-2 and Bcl-XL block apoptosis as well as necrosis: possible involvement of common mediators in apoptotic necrotic signal transduction pathways. *Leukemia*, 1997, 11: 380~382.
3. Arafat W, Gomez-Navarro J, Xiang J, et al. An adenovirus encoding proapoptotic bax induces apoptosis and enhances the radiation effect in human ovarian cancer. *Mol Ther*, 2000, 1(6): 545~554.
4. Hotchkiss R, Swanson P, Knudson C, et al. Overexpression of bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol*, 1999, 162(7): 4148~4156.

(2004-08-31 收稿)

• 短篇与个案 •

B超诊断睾丸微石症2例报告

张祖峰
张勇 (胜利石油管理局胜利医院 257055)

睾丸微石症临床少见,其与精液异常不育有密切关系。近年来,在男性不育精液异常患者中,我们应用高灵敏度实时超声显像仪、探头频率10MHz,直接探查阴囊、精索静脉,发现2

例睾丸微石症患者。现报告如下。

例1:年龄30岁,婚后5年未育,平时身体健康。精液检查量稀少,未见存活精子,动度0级。B超检查见双侧睾丸大小形态正常,两侧睾丸内均见弥散钙化点;精索静脉曲张。彩色多普勒检查见反流信号。诊断为睾丸微石症。

例2:年龄28岁。结婚3年未育,平时身体健康。精液检查数量正常,精子成活率低15%,动度2级,畸形率大于50%。B超检查见双侧睾丸大小、形态正常,右侧睾丸内见密集的点状强回声,左侧睾丸内见散在稀疏强回声;精索静脉曲张。彩色多普勒检查见反流信号。诊断为睾丸微石症。