

维药异常黑胆质成熟剂的抗肿瘤作用及其对细胞迁移的影响

胡汉华¹, 盛磊¹, 哈木拉提·吾甫尔², 刘翠³, 熊文娟³, 吴彩云³, 姑丽尼格尔·库来西³

1. 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011
2. 新疆医科大学维吾尔医学系, 乌鲁木齐 830011
3. 新疆医科大学医学工程技术学院, 乌鲁木齐 830011

摘要 探讨维药异常黑胆质成熟剂(ASM)抗肿瘤作用及其对肿瘤细胞迁移的影响。体外培养人肝癌 Bel-7402 细胞株、人乳腺癌 BCAP 细胞株、人宫颈癌 Hela 细胞株、人胃癌 BGC-823 细胞株, 采用四甲基偶氮唑蓝 (tetrazolium-based colorimetric assay, MTT) 法检测不同浓度 ASM (1、2.5、5、10、15、20、50mg/mL) 对人肝癌 Bel-7402 细胞株、人乳腺癌 BCAP 细胞株、人宫颈癌 Hela 细胞株、人胃癌 BGC-823 细胞株 4 种肿瘤细胞增殖的影响; 选择人肝癌 Bel-7402 细胞株为研究对象, 采用细胞划痕运动实验和扫描电镜技术, 观察不同浓度 ASM 对肝癌细胞迁移的影响。MTT 检测结果显示, ASM 对人肝癌 Bel-7402 细胞株、人乳腺癌 BCAP 细胞株、人宫颈癌 Hela 细胞株、人胃癌 BGC-823 细胞株生长均有一定抑制作用, 且在 15~20mg/mL 作用下最为明显, 对不同肿瘤细胞株抑制作用不一; 体外细胞划痕运动实验和扫描电镜结果显示, ASM 对人肝癌 Bel-7402 细胞运动有一定抑制作用。由此推论, ASM 对肿瘤细胞增殖和肿瘤细胞迁移有一定抑制作用。

关键词 异常黑胆质成熟剂, 增殖, 细胞迁移, 肿瘤细胞

中图分类号 R2-031

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2011.03.10

Anti-cancer Effects of Uighur Medicine Abnormal Savda Munzip and Its Influence on Cell Migration

HU Hanhua¹, SHENG Lei¹, UPUR Halmurat², LIU Cui³, XIONG Wenjuan³, WU Caiyun³, KULAIXI Guliniger³

1. College of Pre-clinic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumuqi 830011, China
2. Faculty of Traditional Uighur Medicine, Xinjiang Medical University, Urumuqi 830011, China
3. College of Medical Engineer and Technique, Xinjiang Medical University, Urumuqi 830011, China

Abstract The possible mechanism of Uighur medicine Abnormal Savda Munzip (ASM) on the anti-tumor effects and its influence on tumor cell migration are explored. MTT was applied to determine the cell proliferation of human hepatoma (Bel-7402), human breast carcinoma (BCAP), human cervical cancer (Hela), and human gastric cancer proliferation (BGC-823) after treated with different concentration of ASM (1, 2.5, 5, 10, 20, 50mg/mL) for 48h; Human hepatoma cell line (Bel-7402) was selected for the cell motility study, the cell migration influence on human hepatoma (Bel-7402) were assessed by the wound-healing assay and the Scanning Electron Microscopy (SEM) technique after treated with ASM (5, 10, 20, 50mg/mL) for 48h. ASM produced the cytotoxic effect on these four type of tumor cells in vitro and all type cells showed the obviously vitro inhibition after treated with ASM (15, 20mg/mL), there were difference inhibited effect among the four type of tumor cells, the results of wound-healing assay with SEM show that the moving ability of Bel-7402 treated with ASM has decreased. It is deduced that ASM might inhibit the ability of proliferation and moving of tumor cell.

Keywords abnormal savda munzip; proliferation; cell migration; tumor cell

收稿日期: 2010-09-10; 修回日期: 2010-12-29

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(30525023)

作者简介: 胡汉华, 副教授, 研究方向为中医医药药理机制, 电子信箱: huanhuaster@gmail.com; 哈木拉提·吾甫尔(通信作者), 教授, 研究方向为新疆重大疾病中医西药; 电子信箱: halmurat@263.com

0 引言

维吾尔医药是中华民族传统医学重要组成部分,是维吾尔族人民与疾病不断做斗争而建立的医学体系,具有丰富的临床实践和独特的理论内涵,尤其是对肿瘤等难治性疾病具有独特的认识和有效的疗法,其中不乏治疗癌症的有效处方和用药,异常黑胆质成熟剂(Abnormal Savda Munziq, ASM)就是其典型的代表。异常黑胆质成熟剂是由十几种草药组成的复方药,既往的研究^[1-4]表明,ASM对肝癌、淋巴瘤、乳腺癌等肿瘤细胞有明显的抑制作用;可以逆转肝癌耐药细胞株 Bel/Fu 多药耐药性;ASM具有很强的清除羟自由基、保护 DNA 氧化损伤、诱导淋巴瘤细胞凋亡的作用;此外还具有增强小鼠对辐射的防护能力^[5],提示异常黑胆质抗肿瘤作用机制涉及一个多成分、多靶点、多途径的复杂过程。肿瘤的转移是决定癌症的预后,肿瘤细胞运动能力的强弱决定于细胞的迁移能力,为探讨维吾尔药 ASM 抗肿瘤作用及其机制,本文利用体外细胞培养技术和扫描电镜方法研究 ASM 的抗肿瘤作用和对肿瘤细胞迁移的影响,以期揭示其作用机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 异常黑胆质成熟剂

新疆维吾尔自治区维吾尔医医院提供。根据国家发明专利《能够使异常黑胆质型体液成熟和清除的药物及其制备方法(专利号:C082130082.8)》制备,用旋转蒸发器浓缩至膏稠状,然后在 60℃真空干燥,备用,每 1g 药粉含 3.4g 生药。

1.1.2 仪器

超净工作台(江苏苏净集团)、二氧化碳培养箱(Thermo Scientific Forma 公司)、倒置显微镜(Leica 公司)、酶标仪(Beckman Coulter 公司)。

1.1.3 药品与试剂

四甲基偶氮唑蓝(tetrazolium-based colorimetric assay, MTT)为 Sigma 公司产品;二甲基亚砜(DMSO),为中国医药集团上海试剂公司产品。

1.1.4 肿瘤细胞株

人肝癌 Bel-7402 细胞株、人乳腺癌 BCAP 细胞株、人宫颈癌 Hela 细胞株、人胃癌 BGC-823 细胞株均由新疆医科大学特高发疾病分子生物学重点实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 药物溶液的配制

异常黑胆质成熟剂用双蒸水配制 250mg/mL 浓缩液。使用时根据需要稀释,用于体外细胞培养实验。

1.2.2 对 Bel-7402、BCAP、Hela 和 BGC-823 细胞体外增殖的抑制作用

取对数生长期细胞用 0.25%胰蛋白酶和 0.02% EDTA 消化后,毫升培养液稀释成含有 5000 个肿瘤细胞,接种于 96 孔培养板中,每孔加入 200 μ L 含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液,细胞置于 37℃,10% CO₂ 培养 24h 后,实验组分别加入最

终浓度为 1、2.5、5、10、15、20、50mg/mL 异常黑胆质成熟剂的培养液,对照组则加入等体积溶剂的培养液,每组 6 孔,重复 4 次。置 37℃,10% CO₂ 培养 48h 后,弃去上清液,每孔加入 200 μ L 新鲜配置的含 0.2mg/mL MTT 的无血清培养液,37℃继续培养 4h,弃上清液,加入 200 μ L DMSO,振荡混匀后,在酶标仪上以波长 520nm,测定 OD 值。

肿瘤细胞生长的抑制率计算方法为

$$\text{肿瘤细胞生长抑制率(\%)} = (1 - \frac{\text{实验组平均 OD 值}}{\text{对照组平均 OD 值}}) \times 100\%$$

1.2.3 细胞划痕运动实验

细胞运动实验根据 Birch 等^[6]方法改进,Bel-7402 细胞接种于 6 孔板,每孔加 2mL 含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液,培养 24h 细胞基本长满后划痕,3 复孔,用无血清 RPMI1640 洗细胞两遍,实验组分别加入最终浓度 5、10、15、20、50mg/mL 异常黑胆质成熟剂的培养液,对照组则加入等体积溶剂的培养液,培养 48h 后观察细胞的迁徙能力,并且在倒置显微镜观察照相,重复 3 次。

1.2.4 扫描电镜观察

Bel-7402 细胞接种于 6 孔培养板,每孔加 2mL 10% FBS 的 RPMI1640 培养液,细胞置于 37℃,10% CO₂ 培养 24h 后,实验组分别加入最终浓度为 5、10、15、20、50mg/mL 异常黑胆质成熟剂的培养液,对照组则加入等体积溶剂的培养液,培养 48h 后,磷酸缓冲液清洗 3 次,用 2.5%戊二醛和 1%锇酸固定,叔丁醇梯度脱水,冷冻干燥,离子溅射镀铂金膜,JSM6380 扫描电镜观察。

2 结果与分析

2.1 对 Bel-7402、BCAP、Hela 和 BGC-823 肿瘤细胞体外增殖的抑制作用

由图 1 可以看出,异常黑胆质成熟剂对肝癌 Bel-7402、乳腺癌 BCAP、宫颈癌 Hela、胃癌 BGC-823 肿瘤细胞生长有不同的抑制作用,浓度 5mg/mL 即对肿瘤细胞生长产生抑制,15~20mg/mL 时抑制率出现高峰,其中对胃癌 BGC-823 的抑制作用最明显,20mg/mL 时抑制率可达 56.7%。超过 20mg/mL

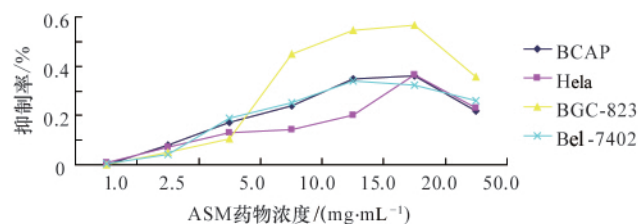


图 1 不同浓度异常黑胆质成熟剂与肝癌、乳腺癌、宫颈癌、胃癌肿瘤细胞生长抑制之间的关系

Fig. 1 Relationship between different concentration of ASM and cell proliferation inhibition rate of hepatoma (Bel-7402), breast cancer (BCAP), cervical cancer (Hela) and gastric cancer (BGC-823)

浓度后,肿瘤细胞增殖抑制率缓慢下降。

2.2 细胞划痕运动实验

图 2 显示,不同浓度的异常黑胆质成熟剂(5、10、15、20、50mg/mL)与人肝癌 Bel-7402 细胞共同培养 48h,结果可见对

照组人肝癌细胞运动生长活跃,铺展较好;而经不同浓度异常黑胆质成熟剂作用后,Bel-7402 细胞运动能力明显下降,细胞向划痕处爬行的速度明显慢于对照组,10、20、50mg/mL 给药组划痕处基本没有细胞铺展。

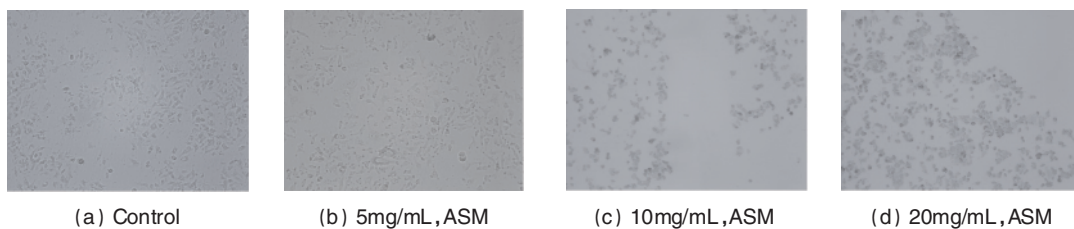


图 2 ASM 在体外对肝癌细胞 (Bel-7402) 运动的影响

Fig. 2 Effect of ASM on the motility of hepatoma (Bel-7402) *in vitro*

2.3 体外干预肝癌细胞扫描电镜观察

扫描电镜观察结果表明,对照组的肝癌细胞基底面有较多的片层突起交织成片、细胞表面有许多较长的细丝状绒毛,如图 3(a)所示;5mg/mL 异常黑胆质成熟剂作用肿瘤细胞基底片层伪足减少,部分肿瘤细胞呈圆形,脱离基底细胞层,细胞有小泡突出,小泡与细胞突起部分彼此相嵌呈菜花状,有少量的细长绒毛,如图 3(b)所示;10mg/mL 和 20mg/mL 异

常黑胆质成熟剂作用的肿瘤细胞表面突起明显减少,细胞膜皱缩形成较大凹陷,其表面光滑,偶见细小突起伸出,胞浆明显减少,细胞周围出现许多大小不等的质膜泡,质膜泡彼此重叠,如图 3(c)和(d)所示;此外,20mg/mL 细胞顶部中央明显凹陷,深入细胞实质,呈“火山口”状,甚至凹陷贯穿细胞达底部,细胞形态改变明显,失去原有结构。50mg/mL 基本同 20mg/mL 组。

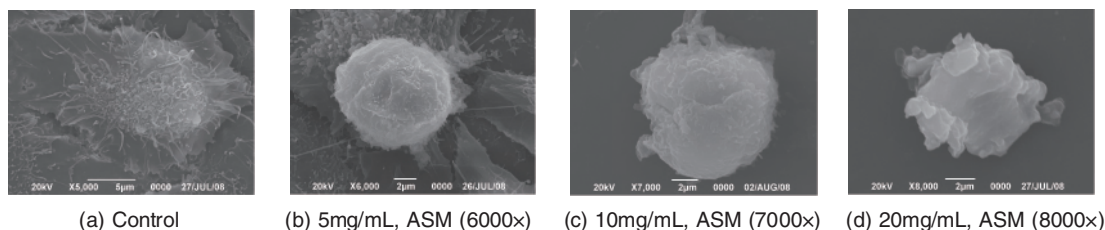


图 3 异常黑胆质成熟剂对肝癌细胞影响的扫描电镜观察

Fig. 3 Effect of ASM on hepatoma cell (Bel-7420) using SEM

3 讨论

维吾尔医学认为异常黑胆质是在各种内外因素的作用下,体液质平衡紊乱、体液质被燃烧,继而沉淀的最终病理性产物是肿瘤、高血压、糖尿病、哮喘等复杂性疾病发病的病因^[1]。针对异常体液的治疗,维吾尔医学采取成熟/清除疗法,即首先给予该体液的成熟剂,待物质成熟的体液出现后,再予以清除异常体液的该类体液的清除剂,待全身被清理之后,再根据失调气质引起疾病症状给予专门的治疗药或补益药,以达到纠正气质和体液失调。异常黑胆质成熟剂是由琉璃菊、神香草、熏衣草、铁线蕨、欧烟堇、红枣、破布木实、刺糖等组成的复方药,是新疆著名维吾尔医学专家巴黑·玉素甫根据多年维吾尔医学理论和治疗原则,将维药异常黑胆质成熟剂应用于各种癌症治疗,取得满意的效果^[1]。近年研究结果表明,它对肝癌、淋巴瘤、乳腺癌等肿瘤有抗癌作用,该处方具有抑制肿瘤细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡^[2-5];异常黑胆质成熟剂提取物可增强小鼠对辐射的防护作用^[6]。本研究结果表

明,异常黑胆质成熟剂对 Bel-7402、BCAP、Hela、BGC-823 肿瘤细胞体外生长均有一定抑制作用,而且均在 15~20mg/mL 抑制率最高,4 种瘤细胞中对胃癌 BGC-823 抑制最为明显。

异常黑胆质成熟剂为复方制剂,其中药物成分复杂,其抗癌作用机制必然涉及一个多成分、多靶点、多途径的复杂过程。肿瘤细胞转移是恶性肿瘤的重要生物学行为,也是其预后不良的主要原因。对于肿瘤细胞,其迁移特性已经成为评价抗肿瘤药物的重要特征^[7]。能够减缓肿瘤细胞迁移的药物有可能对遏制肿瘤转移起到重要的作用。在恶性肿瘤的生物学行为中,侵袭性与转移性是恶性肿瘤最重要的习性,也是肿瘤病人致死的主要原因。癌细胞运动能力是癌细胞转移的基础,细胞表面结构的改变、细胞膜的凸起和伪足形成与细胞黏附、渗透压的变化以及细胞固有的骨架结构等有关,在细胞靶向性移动中具有重要作用,是癌细胞侵袭转移的形态学基础^[8-9]。肿瘤细胞扫描电镜观察可以为肿瘤细胞运动研究提供依据^[10]。细胞划痕运动实验结果显示,异常黑胆质成熟剂对肝癌 Bel-7402 细胞体外培养细胞爬行有一定影响,扫描

电镜观察结果也显示片层细胞突起和细胞表面绒毛减少,提示异常黑胆质成熟剂可以抑制肝癌细胞伪足的形成进而影响肝癌细胞运动,这表明异常黑胆质成熟剂可能遏制肝癌转移,减缓肿瘤的进程。

4 结论

(1) 维药异常黑胆质成熟剂对肝癌 Bel-7402、乳腺癌 BCAP、宫颈癌 Hela、胃癌 BGC-823 肿瘤细胞体外生长均有一定抑制作用,且对不同肿瘤细胞的生长抑制率不完全相同。

(2) 维药异常黑胆质成熟剂对肝癌细胞迁移有一定影响,遏止肝癌转移可能是其抗肿瘤作用机制之一。

参考文献 (References)

- [1] 哈木拉提·吾甫尔. 维吾尔医气质、体液论及其现代研究 [M]. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社, 2003.
Halmurat Upur. On temperament, body fluids and its modern study of uigher medicine [M]. Urumqi: Xinjiang Science and Technology Publishing House, 2003.
- [2] 阿不都热依木·玉苏甫, 哈木拉提·吾甫尔, 吐尔洪·卡迪尔, 等. 异常黑胆质成熟剂乙酸乙酯萃取物对 HepG2 细胞生长和凋亡及相关基因调控的研究[J]. 中国药科大学学报, 2006, 37(2): 161-165.
Abdiryim Yusup, Halmurat Upur, Turghun Kadir, et al. Journal of China Pharmaceutical University, 2006, 37(2): 161-165.
- [3] 玛依努尔·艾力, 哈木拉提·吾甫尔. 维吾尔药异常黑胆质成熟剂总黄酮逆转肝癌耐药性的作用[J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(9): 31-33.
Mayimur Ali, Halmurat Upur. Chinese Journal of Information on TCM, 2007, 14(9): 31-33.

- [4] 哈木拉提·吾甫尔, 艾斯卡尔·依米提, 伊力哈木江·沙比提. 异常黑胆质成熟剂与清除剂对人 Hela 细胞凋亡基因表达的研究 [J]. 细胞与分子免疫杂志, 2001, 17(2): 109-111.
Halmurat Upur, Ascar Yimiti, Ilihamjiang Sabit. Journal of Cell Molecular Immunology, 2001, 17(2): 109-111.
- [5] 阿不都热依木·玉苏甫, Isabelle Baudrimont, 吐尔洪·卡迪尔, 等. 异常黑胆质成熟剂水提物和醇提物对 HepG2 细胞 m-5dC 及 8-OH-dG 形成的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(10): 728-730.
Abdiryim Yusup, Isabelle Baudrimont, Turghun Kadir, et al. Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine, 2006, 12(10): 728-730.
- [6] 张莉, 哈木拉提·吾甫尔, 张仑. 异常黑胆质成熟剂提取物对小鼠辐射的防护作用[J]. 中南大学学报: 医学版, 2007, 32(1): 69-73.
Zhang Li, Halmurat Upur, Zhang Lun. Journal of Central South University: Medical Sciences, 2007, 32(1): 69-73.
- [7] Birch M, Mitchell S, Hurt I R. Isolation and characterization of human melanoma cell variants expressing high and low levels of CD44 [J]. Cancer Research, 1991, 51(24): 6660-6667.
- [8] 曹琦珍, 林树钱, 王赛珍, 等. 灵芝多糖肽对人肺癌细胞侵袭的影响[J]. 北京大学学报: 医学版, 2007, 39(6): 656-660.
Cao Qizhen, Lin Shuqian, Wang Saizhen, et al. Journal of Peking University: Health Sciences Edition, 2007, 39(6): 656-660.
- [9] 沈键, 陈铭华, 郑瑞明, 等. 肿瘤细胞侵袭性体外检测的扫描电镜观察 [J]. 电子显微学报, 2000, 19(3): 313-314.
Shen Jian, Chen Minghua, Zheng Ruiming, et al. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2000, 19(3): 313-314.
- [10] 余力, 刘莉, 张艳非, 等. 转移特性不同的大肠食管癌细胞形貌结构差异分析[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(11): 1097-1102.
Yu Li, Liu Li, Zhang Yanfei, et al. World Chinese of Journal of Digestology, 2006, 14(11): 1097-1102.

(责任编辑 吴晓丽)

·学术动态·



“2011 年国际电气电子工程师学会 汽车电子与安全国际会议(ICVES'11)”征文

由国际电气电子工程师学会智能交通系统委员会(IEEE-ITSS)主办,中国科学院自动化研究所承办的“2011 年国际电气电子工程师学会汽车电子与安全国际会议 (ICVES'11)”将于 2011 年 7 月 10—12 日在北京市召开。同时召开的还有“2011 年国际电气电子工程师学会情报与安全信息学国际会议 (ISI'11)”及“2011 年国际电气电子工程师学会服务运筹、物流与信息化国际会议 (SOLI'11)”。

会议征文范围: 主动与被动安全系统, 信息通信, 车辆电源网络, X-By 线控技术, 单芯片系统, 车用传感器, 车辆总线, 传感网络, 嵌入式操作系统, 电磁兼容性, 车辆间通讯网络, 车辆测试, 车辆硬件/软件系统, 导航与定位系统, 车辆检测技术, 车辆信号处理, 微机系统, 图像传感器, 汽车/发动机控制, 驾驶员辅助驾驶系统, 自适应巡航控制系统, 车辆模式识别, 人机交互, 在线诊断, 虚拟/数字系统。

大会收录的论文将全部收录 IEEE 数据库, 并被 Ei, ISTP 检索, 提交的论文文字必须是英文。征文截止时间: 2011 年 3 月 13 日。

联系方式: 北京市海淀区中关村东路 95 号自动化大厦 912 室 (100190) 赵学亮; 电话: 010-82614437, 传真: 010-82615087, 电子信箱: xueliang.zhao@ia.ac.cn; 会议网址: www.ieeeves.org。