

皮鳞癌1号方对人皮肤鳞状癌A431细胞生长的抑制作用[△]

许 俏^{1*}, 罗 俊², 潘年松^{3#}, 刘英波³, 丁 斗³, 张学愈³, 张 珏³(1.上海交通大学医学院附属新华医院崇明分院, 上海 202150; 2.贵阳医学院药理学教研室, 贵阳 550004; 3.遵义医药高等专科学校, 贵州 遵义 563000)

中图分类号 R285;R739.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)07-0904-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.07.12

摘要 目的:研究皮鳞癌1号方对人皮肤鳞状癌A431细胞生长的抑制作用。方法:以0、5、10、20、40、80 μg(生药)/ml皮鳞癌1号方分别作用A431细胞24、48、72 h后,测定光密度并计算细胞增殖抑制率以评价其抑制作用;在显微镜下观察细胞形态学变化;光化学法测定乳酸脱氢酶(LDH)的活性;免疫细胞化学法测定B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)蛋白、Bcl-2相关X蛋白(Bax)的表达。结果:5、10、20、40、80 μg(生药)/ml皮鳞癌1号方对A431细胞均有抑制作用($P < 0.01$);5、40 μg(生药)/ml皮鳞癌1号方可使A431细胞增殖变缓,细胞出现皱缩,与周围细胞黏附力减弱;5、10、20 μg(生药)/ml可明显增强A431细胞LDH活性、Bax表达,减弱Bcl-2表达,降低Bcl-2/Bax的比值($P < 0.01$)。结论:皮鳞癌1号方对A431细胞的增殖具有一定的抑制作用;可能与促进Bax表达、抑制Bcl-2表达、降低Bcl-2/Bax的比值有关。

关键词 皮鳞癌1号方;人皮肤鳞状癌A431细胞;形态学;Bcl-2;Bax

Inhibitory Effects of Skin Scaly Formulation No.1 on the Growth of the Human Skin Squamous Carcinoma A431 Cell

XU Qiao¹, LUO Jun², PAN Nian-song³, LIU Ying-bo³, DING Dou³, ZHANG Xue-yu³, ZHANG Jue³(1.Chongming Branch, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 202150, China; 2.Dept. of Pharmacy Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China; 3.Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Guizhou Zunyi 563000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effects of Skin scaly formulation No.1 on the growth of the human skin squamous carcinoma A431 cell. METHODS: A431 cells were treated with different concentrations of Skin scaly formulation No.1 [0, 5, 10, 20, 40 and 80 μg (medicinal materials)/ml] for 24, 48 and 72 h; the morphological changes of cells were observed under microscope. The activity of lactate dehydrogenase (LDH) was measured by spectroscopy; the expressions of Bcl-2 and Bax were determined by immunohistochemistry assay. RESULTS: Skin scaly formulation No.1 [5, 10, 20, 40 and 80 μg (medicinal materials)/ml] could inhibit A431 cell. Skin scaly formulation No.1 [5 and 40 μg (medicinal materials)/ml] could slow down the proliferation of A431 cell, induced cell shrinkage and weakened cell adhesion. Skin scaly formulation No.1 [5, 10 and 20 μg (medicinal materials)/ml] could increase the activity of LDH and Bax expression, and decreased the expression of Bcl-2 and Bcl-2/Bax ($P < 0.01$). CONCLUSIONS: Skin scaly formulation No.1 can inhibit the proliferation of A431 cells, which may be associated with that it improves Bax expression, inhibits Bcl-2 expression and decreases Bcl-2/Bax.

KEYWORDS Skin scaly formulation No.1; The human skin squamous carcinoma A431 cell; Morphology; Bcl-2; Bax

皮肤鳞状细胞癌系起源于表皮或附属器角质形成的一种恶性肿瘤。其发病率在皮肤非黑色素细胞癌中仅次于基底细胞癌,约占全部非黑色素细胞癌的20%。近年来,皮肤鳞癌发病呈逐年上升的趋势,其病情发展快、破坏性大,早期可发生淋巴结转移,晚期可发生内脏转移。皮肤鳞状细胞癌已成为威胁人类生命的主要皮肤肿瘤。目前皮肤鳞状癌的主要治疗方法包括手术、化学、冷冻治疗等,但各种治疗方法都存在一定的不足;而且,皮肤鳞状癌转移后的治疗仍是尚待解决的难题。因此,寻求新的、有效的解决方法仍是目前临床亟需解决的问题。皮鳞癌1号方由白头翁、莪术等中药组成。研究表

明,白头翁对胃癌BGC823细胞^[1]、肺癌PG细胞^[2]、肝癌HepG2细胞^[3]的增殖有抑制作用;莪术挥发油中抗肿瘤活性成分主要有莪术醇、异莪术醇和莪术酮等^[4],莪术醇对人胃腺癌SGC-7901细胞^[5]、人肺癌A549细胞^[6]、鼻咽癌CNE-2细胞^[7]均有抑制作用。研究表明,皮鳞癌1号方处方中单独成分均有抗肿瘤作用,而关于皮鳞癌1号方用于皮肤鳞状癌的治疗尚未见报道。故本研究通过体外细胞试验,探讨皮鳞癌1号方抑制皮肤鳞状癌A431细胞可能的机制,为临床治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

SW-CJ-1D型超净工作台(苏州净化设备有限公司);CKX31型显微镜(日本Olympus公司);EXL800-UV型酶标仪(美国Bio-Tek公司);CO₂孵箱(美国Thermo公司)。

[△] 基金项目:遵义市科技计划项目(No.遵市科合社字[2013]18)

* 药师,硕士。研究方向:药学。E-mail: xuqiaozjl@163.com

通信作者:教授,博士。研究方向:中药药理学。E-mail: 783044500

@qq.com

1.2 药品与试剂

皮鳞癌1号方(遵义医药高等专科学校中药民族药新药研究实验室,工艺、质量标准见专利申请号:2013104223796.7);5-氟尿嘧啶(5-FU,上海旭东海普药业有限公司,批号:1201081,规格:0.25 g/10 ml);DMEM高糖培养基、胎牛血清(美国Hyclone公司);MTT(美国Amresco公司);B淋巴细胞瘤(Bcl-2)蛋白鼠抗人单克隆抗体、Bcl-2相关X蛋白(Bax)鼠抗人单克隆抗体、ZLI-DAB显色试剂盒、PV-6000检测试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究院);二甲基亚砜(DMSO,北京鼎国生物技术有限责任公司)。

1.3 细胞

人皮肤鳞状癌细胞(A431细胞)购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。

2 方法

2.1 细胞培养

A431细胞培养于含10%胎牛血清、青霉素(100 u/L)和链霉素(100 u/L)的DMEM高糖培养基中,置于5%CO₂、37℃、饱和湿度的培养箱中培养。取对数生长期细胞,调整细胞密度为1.25×10⁵ ml⁻¹,160 μl/孔接种于96孔板。

2.2 细胞增殖抑制率的检测

取培养24 h后的A431细胞随机均分为空白(200 μl无血清培养基)组、阴性对照(常规培养液)组、5-FU(10 μg/ml)组与皮鳞癌1号方①、②、③、④、⑤[5、10、20、40、80 μg(生药)/ml]组。每组设5个复孔,每孔加40 μl培养液。药物的5个梯度质量浓度分别为原药的1/400、1/200、1/100、1/50、1/25,相当于5、10、20、40、80 μg(生药)/ml。各组药物分别培养细胞24、48、72 h后,弃去上清,加200 μl无血清培养基及20 μl MTT(5 mg/ml),置于CO₂培养箱培养4 h后,弃上清,加150 μl DMSO,振荡10 min后,于酶标仪490 nm波长处测定光密度(OD),试验重复3次。细胞增殖抑制率(%)=(用药组OD-空白组OD/阴性对照组OD)×100%。

2.3 细胞形态学的观察

分组与给药同“2.2”项下方法。细胞培养48 h后,在放大倍数为200倍的显微镜下观察各组细胞形态,并拍照。

2.4 LDH活性的检测

取培养24 h后的A431细胞随机均分为阴性对照(常规培养液)组、5-FU(10 μg/ml)组与皮鳞癌1号方高、中、低质量浓度[20、10、5 μg(生药)/ml]组。培养细胞48 h后,收集无血清培养基上清液,按试剂盒说明检测LDH活性,每组5个复孔。

2.5 Bax、Bcl-2蛋白表达的检测

收集处于对数生长期的A431细胞,将细胞接种于用多聚赖氨酸包被的玻片上,培养48 h后,分组与给药同“2.4”项下方法。培养细胞48 h后,取出玻片,自然干燥,然后用丙酮固定5 min,室温下晾干。用枸橼酸缓冲液高压修复3 min,冷却后用3%的过氧化氢去离子水孵育5 min,以阻断内源性过氧化物酶,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次,每次3 min。制备一抗、Bax(1:30, V/V)、Bcl-2(1:50, V/V),滴加30 μl一抗稀释液于载玻片,将玻片(细胞面)盖上,放于湿盒于4℃过夜。取出后, PBS冲洗3次,每次2 min,滴加通用型免疫球蛋白(IgG)抗体-

辣根过氧化物酶(HRP)多聚体,37℃下孵育15 min后, PBS冲洗3次,每次2 min。制备DAB显色试剂工作液,滴加50 μl DAB显色工作液,显色10 min,蒸馏水冲洗,加入100 μl 苏木素复染1 min,蒸馏水冲洗,酒精脱水,自然干燥后,中性树脂封片。在200倍光学显微镜下,通过摄像头将免疫组化标记切片图象采集并输入Biomias 2001图象分析系统进行单位视野内阳性细胞数和细胞总数测量。每例免疫组化标记切片随机选取5个不同视野,每个视野用鼠标点击系统自动计数法计数阳性细胞数和细胞总数。

2.6 统计学方法

采用SPSS 17.0软件处理实验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组细胞增殖抑制率的检测结果

与阴性对照组比较,作用24、48、72 h后皮鳞癌1号方①、②、③、④、⑤组细胞增殖抑制率增强,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果表明,随着药物质量浓度的增加和作用时间的延长,其对细胞的增殖抑制作用愈明显,与时间-质量浓度呈正相关。组间两两比较后发现药物作用细胞72 h时,皮鳞癌1号方②、③组细胞增殖抑制率差异无统计学意义($P > 0.05$),即皮鳞癌1号方在这个质量浓度和时间时其抑制作用达到了平台期。因此笔者选取药物作用48 h作为后面指标检测的时间点。各组细胞增殖抑制率的检测结果见表1。

表1 各组细胞的增殖抑制率($\bar{x} \pm s, n=15$)

Tab 1 Inhibition rate of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	质量浓度, μg/ml	细胞增殖抑制率, %		
		24 h	48 h	72 h
阴性对照组		0	0	0
皮鳞癌1号方①组	5	17.44 ± 6.50*	25.58 ± 3.84*	43.45 ± 8.45*
皮鳞癌1号方②组	10	28.75 ± 5.55*	37.13 ± 3.68*	58.11 ± 0.98*
皮鳞癌1号方③组	20	43.52 ± 5.98*	52.35 ± 9.33*	65.96 ± 6.56*
皮鳞癌1号方④组	40	61.83 ± 7.80*	73.66 ± 3.48*	84.65 ± 3.56*
皮鳞癌1号方⑤组	80	79.94 ± 4.09*	91.54 ± 1.97*	95.59 ± 1.05*
5-FU组	10	7.75 ± 3.03*	25.43 ± 5.44*	49.69 ± 3.37*

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.01$

Note: vs. negative control group, * $P < 0.01$

3.2 各组细胞形态学的观察结果

阴性对照组细胞贴壁生长,生长状态良好,呈多边形或不规则形,折光性强。皮鳞癌1号方各组细胞增殖变缓,细胞出现皱缩,与周围细胞黏附力减弱;且随着质量浓度增加,上述现象更加明显,可见细胞大片脱落,细胞数明显减少,胞质内黑色颗粒增多,可见死亡细胞。各组细胞形态学的观察结果见图1。

3.3 各组细胞LDH活性的检测结果

完整的细胞膜是细胞生长繁殖的必要条件。药物作用于细胞48 h后,与阴性对照组比较,皮鳞癌1号方高、中、低质量浓度组细胞LDH活性增强,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果表明,皮鳞癌1号方能损伤细胞,使细胞膜的通透性发生改变。各组细胞LDH活性的检测结果见表2。

3.4 各组细胞Bax、Bcl-2蛋白表达的检测

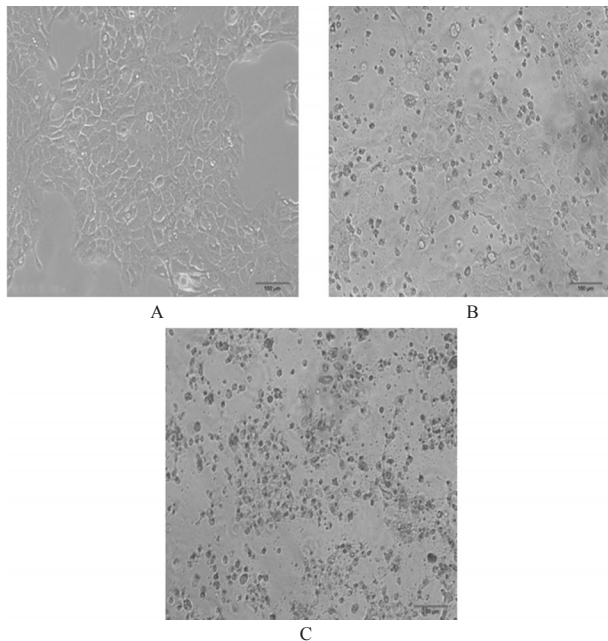


图1 各组细胞形态学的观察结果(×200)

A. 阴性对照组; B. 皮鳞癌1号方①组; C. 皮鳞癌1号方④组

Fig 1 The morphological observation of cells in each group (×200)

A. negative control group; B. Skin scaly formulation No.1 ① group; C. Skin scaly formulation No.1 ④ group

表2 各组细胞的LDH活性($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 LDH activity of cells each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	LDH, U/L
阴性对照组		43.44 ± 13.82
皮鳞癌1号方低质量浓度组	5	97.43 ± 13.58*
皮鳞癌1号方中质量浓度组	10	140.35 ± 31.72**
皮鳞癌1号方高质量浓度组	20	162.61 ± 39.51**
5-FU组	10	111.30 ± 28.93**

注: 与阴性对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. negative control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

与阴性对照组比较, 皮鳞癌1号方高、中、低质量浓度组Bax阳性细胞表达率增加, Bcl-2阳性蛋白表达率减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。免疫细胞化学染色法, 以背景清晰、细胞膜和细胞质呈棕黄色为阳性表达。Bax蛋白检测中阴性对照组细胞胞体饱满, 胞膜完整, 细胞大多为蓝染, 胞膜内可见少许棕黄色染色; 皮鳞癌1号方高质量浓度组细胞胞浆内呈弥漫性棕黄色染色, 可见大量棕黄色染色, 中、低质量浓度组细胞胞浆内也可见较多棕黄色染色, 提示Bax阳性细胞表达率增强。Bcl-2蛋白检测中阴性对照组细胞胞体饱满, 胞膜完整, 胞膜内可见大量棕黄色染色; 而皮鳞癌1号方高质量浓度组细胞胞浆内可见少许棕黄色染色, 中、低质量浓度组细胞胞浆内可见棕黄色染色, 提示Bcl-2阳性细胞表达率减弱。各组细胞Bax、Bcl-2蛋白表达的检测结果见表3; 各组细胞Bax、Bcl-2蛋白表达结果见图2、图3。

4 讨论

细胞膜是维持细胞内环境稳定的必要条件, 细胞膜破损, 细胞就会死亡。LDH存在于细胞的胞质中, 正常细胞很少有

表3 各组细胞Bax、Bcl-2蛋白表达的检测结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 3 Expression of bax and bcl-2 protein of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	Bax 阳性细胞表达率, %	Bcl-2 阳性细胞表达率, %
阴性对照组		20.85 ± 1.75	46.39 ± 1.66
皮鳞癌1号方低质量浓度组	5	26.60 ± 2.42*	20.19 ± 1.36*
皮鳞癌1号方中质量浓度组	10	54.17 ± 0.82*	12.13 ± 1.05*
皮鳞癌1号方高质量浓度组	20	95.27 ± 1.03*	3.91 ± 1.58*
5-FU组	10	71.12 ± 5.92*	11.89 ± 1.48*

注: 与阴性对照组比较, * $P < 0.01$

Note: vs. negative control group, * $P < 0.01$

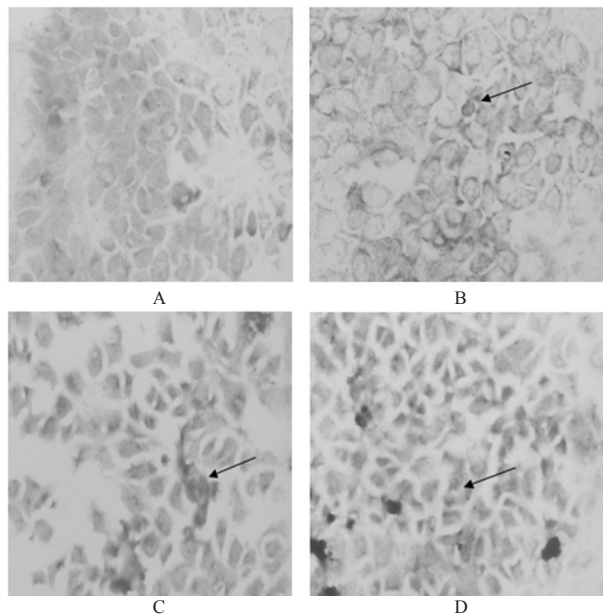


图2 各组细胞Bax蛋白表达结果(×200)

A. 阴性对照组; B. 皮鳞癌1号方低质量浓度组; C. 皮鳞癌1号方中质量浓度组; D. 皮鳞癌1号方高质量浓度组

Fig 2 Expression of bax protein of cells in each group (×200)

A. negative control group; B. Skin scaly formulation No.1 low-concentration group; C. Skin scaly formulation No.1 medium-concentration group; D. Skin scaly formulation No.1 high-concentration group

LDH渗出, 一旦细胞受损、细胞膜的通透性发生改变, LDH就会大量释放到细胞外。LDH活性反映了细胞膜损伤的程度, 其活性增强是细胞不可逆损伤或坏死的标志^[8]。本研究结果中, 皮鳞癌1号方高、中、低质量浓度组细胞的LDH活性与阴性对照组比较, 差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。说明皮鳞癌1号方作用于A431细胞48 h后, 使细胞膜受损, 细胞膜通透性发生变化, 细胞内的LDH大量溢出。

凋亡又名细胞程序性死亡, 是机体细胞在正常生理或病理状态下发生的一种自发的程序化死亡过程。它的发生受到机体的严密调控, 许多抗肿瘤药物就是通过激发细胞凋亡通路达到抑制肿瘤生长的目的。细胞凋亡在机体生长发育和生殖衰老等生理过程中起着重要的作用。随着对细胞凋亡研究的不断深入, 发现Bcl-2家族是在细胞凋亡中有重要作用的一类蛋白质^[9]。Bcl-2家族的表达和调控是影响细胞凋亡的关键因素之一。Bax和Bcl-2分别是Bcl-2家族中最有代表性的促

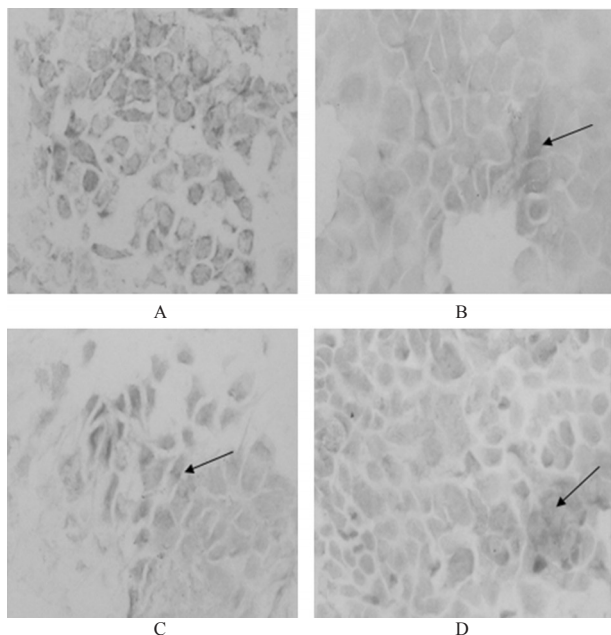


图3 各组细胞 Bcl-2 蛋白表达结果(×200)

A. 阴性对照组; B. 皮鳞癌 1 号方低质量浓度组; C. 皮鳞癌 1 号方中质量浓度组; D. 皮鳞癌 1 号方高质量浓度组

Fig 3 Expression of bcl-2 protein of cells in each group(×200)

A. negative control group; B. Skin scaly formulation No.1 low-concentration group; C. Skin scaly formulation No.1 medium concentration group; D. Skin scaly formulation No.1 high concentration group

进凋亡蛋白和抑制凋亡蛋白,在肿瘤细胞凋亡中具有重要的调控作用^[10]。Bax 促进肿瘤细胞凋亡,而 Bcl-2 可阻断多种原因导致的细胞凋亡过程并促进肿瘤细胞增殖^[11]。细胞凋亡的发生,最终取决于促凋亡蛋白和抑凋亡蛋白的相对浓度,因而, Bcl-2 家族成员的构成比例形成了细胞凋亡的“分子开关”^[12]。Bax 和 Bcl-2 通过形成同源或异源二聚体来调节细胞凋亡^[13]: 当 Bax 形成同源二聚体时诱导细胞凋亡; Bax 与 Bcl-2 形成异源二聚体时则实现了 Bcl-2 抑制细胞凋亡的功能。Bcl-2 和 Bax 互相拮抗,当两者表达量平衡时,则细胞生存期正常;当 Bcl-2 表达量较高时,则形成异源二聚体 Bcl-2/Bax,抑制细胞凋亡;当 Bax 表达量较高时,则形成同源二聚体 Bax/Bax,通过抑制 Bcl-2 的抗凋亡作用而促进细胞凋亡的发生^[14-15]。因此, Bcl-2/Bax 比值被认为是调节细胞凋亡的杠杆^[16],该比值降低则凋亡增加,该比值升高则凋亡减少^[17]。本研究免疫细胞化学法结果提示,皮鳞癌 1 号方高、中、低质量浓度组 Bcl-2 阳性细胞表达率明显低于阴性对照组; Bax 阳性细胞表达率明显高于阴性对照组。

综上所述,皮鳞癌 1 号方能抑制 A431 细胞的增殖,且随着时间和质量浓度的增加,增殖抑制率也逐渐增大。皮鳞癌 1 号方可以破坏 A431 细胞膜,通过上调促凋亡因子 Bax 表达、降低抗凋亡因子 Bcl-2 表达、促进 A431 细胞的凋亡而发挥作用。

参考文献

[1] 冯秀芝,刘伟,刘建平,等.白头翁诱导胃癌细胞凋亡的研究[J].中国现代医生,2011,49(9):1.
[2] 张岱州,李洁,佟全胜.MTT 法检测白头翁对人肺巨细胞

癌细胞株 PG 细胞增殖的抑制作用[J].生物医学工程研究,2010,29(1):71.
[3] 王海侠,郑新勇,郜尽,等.白头翁皂苷 B4 体外抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖并诱导其凋亡[J].上海交通大学学报:医学版,2011,31(10):1481.
[4] 曾建红,陈旭,潘艳薇,等.莪术醇的研究进展[J].中药材,2008,31(1):168.
[5] 徐立春,陈海燕,文洁,等.莪术醇对人胃癌细胞凋亡、MMP2、NO 影响的初步探讨[J].中国医药导报,2012,34(9):19.
[6] 陈旭,王娟,蒋晓山,等.莪术醇对肺癌 A549 细胞凋亡诱导因子、聚 ADP 核糖聚合酶及 Caspase-3 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,19(17):157.
[7] 何金年,姚东方,李杰恩.莪术醇对人鼻咽癌细胞 CNE-2 增殖、凋亡及周期的影响[J].中国耳鼻喉咽喉底外科杂志,2011,17(3):171.
[8] 赵松,解丽君,张建新,等.异丙酚对小鼠心肌细胞氧化损伤时线粒体功能的影响[J].中华麻醉杂志,2009,29(4):364.
[9] 史婷婷,白建平,梁月琴.芹菜素对大鼠缺血/再灌注心肌细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 表达的影响[J].中国药理学通报,2011,27(5):666.
[10] Tichy A. Apoptotic machinery: the Bcl-2 family protein in the role of inspectors and superintendents[J]. Acta Medica: Hradec Kralove, 2006, 49(1):13.
[11] 蔡江霞,陈思颖,张蔚鹏.中药单体逆转肿瘤多药耐药研究进展[J].中国药房,2013,24(35):3342.
[12] 王卫东,陈正堂. Bcl-2/Bax 比率与细胞“命运”[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2007,14(4):393.
[13] 刘凤仙,宋扬.刺参酸性黏多糖对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及 Bax、Bcl-2 基因表达的影响[J].实用医学杂志,2010,26(12):2089.
[14] Burguillos MA, Hajji N, Englund E, et al. Apoptosis-inducing factor mediates dopaminergic cell death in response to LPS-induced inflammatory stimulus evidence in Parkinson's disease patients[J]. Neurobiol Dis, 2010, 9(17):1.
[15] Tomasin R, Cintra Comes-Marcondes MC. Oral administration of Aloe vera and honey reduces walker tumour growth by decreasing cell proliferation and increasing apoptosis in tumour tissue[J]. Phytother Res, 2010, 9(14):25.
[16] Oberst A, Bender C, Green DR. Living with death: the evolution of the mitochondrial pathway of apoptosis in animals[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(7):1139.
[17] 任美萍,李万平,刘明华,等.维拉帕米对肝星状细胞凋亡和 Bcl-2/Bax 表达的影响[J].重庆医科大学学报,2011,36(9):1037.

(收稿日期:2014-06-11 修回日期:2014-07-25)

(编辑:张静)