

香茶菜黄酮诱导人肝癌细胞系 GHC-3 恶性表型的逆转

葛日萍 陈维洁 王晨光 邹东霆 陈尊器
(广州医学院肿瘤研究所 广州 510182)

现代细胞分子生物学研究表明, 肿瘤发生与基因结构和表达异常相关; 癌细胞由正常细胞分化障碍恶变而来, 可能通过适当方法诱导其向正常或降低恶性方向逆转。这种转变若能有效进行, 并维持稳定, 将可作为克制肿瘤的一途径。因此, 深入研究诱导逆转分化具有重要理论意义和实用价值。

曾经报道丁酸钠和维甲酸等对肿瘤细胞具有一定诱导作用^[1], 但效应较短暂, 又不稳定。而天然药对细胞诱导的深入研究不多。本文用香茶菜属提取物对人肝癌细胞系 GHC-3^[2]较长期作用, 获得一系列脱恶性表型转变, 并维持稳定的良好效果。

材 料 和 方 法

一、药物及细胞

从中药香茶菜(*Rabdosia Lephanthoides*, RL)提取黄酮(Flavones, F), 由本室提供。参考 Limbarg 等^[3]计算法和 Mosmann 等^[4]用四甲基偶氮唑(MTT)检测, 选择 0.5 mg/ml 香茶菜黄酮为实验终浓度, 对人肝癌细胞 GHC-3 作用。细胞在含 5% 新生牛血清 RPMI-1640 培养液于 37℃ 和 5% CO₂ 条件下培养。接种 24 小时后加药培养, 以后每次传代重复处理连续 10 周, 停药后换正常培养液继续传代培养 5 周, 另设未加药平行培养细胞对照。

二、观察和检测

1. 生物学特性 一般生物学特性, 包括细胞形态、生长分裂、染色体分布、集落形成、DNA 含量以及 ³H-TdR 掺入等, 方法参照文献^[2,5,6]。

2. ConA 凝集及其受体检测 接种细胞于 96 孔板, 按梯度加 Con A(刀豆凝集素)后观察凝集反应。以细胞化学法测示 ConA 受体, 即于细胞固定后加 ConA, 再与辣根过氧化物酶(HRP)作用, 二氨基

联苯胺(DAB)显色后观察。

3. AFP 及膜抗原 以抗人肝癌甲胎蛋白单克隆抗体(AFP-McAb)^[7]或抗人肝癌细胞膜单克隆抗体(G₃M-McAb, 参照 Zogury 等^[8]制备)与经药物处理的细胞作用, 按常规间接免疫荧光法显示。

4. ras p 21 检测 以抗 ras 癌基因产物 p 21 单克隆抗体(ras p 21-McAb, 军事医学院提供)与经药物处理的细胞作用, 进行间接免疫酶反应显示。

结 果

一、香茶菜黄酮(RLF)作用后细胞形态由多边形上皮样逐渐转变为梭形, 生长减慢, 分裂指数减少, 但仍能繁殖和传代(图 1)。染色体分布较集中(39—65), 出现二倍体细胞。软琼脂细胞集落形成率也明显减少(95:33)。

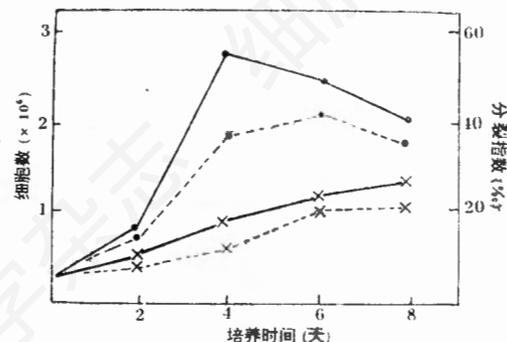


图 1 RLF 处理 GHC-3 细胞生长曲线及分裂指数

实线: 生长曲线; 虚线: 分裂指数; 对照,
× × RLF

二、DNA 总量及 ³H-TdR 掺入结果如表 1 及表 2, 可见 RLF 处理后细胞 DNA 含量及 ³H-TdR 掺入明显减少, 与对照比较差异显著 ($P < 0.01$)。停药后继续培养细胞与停药前

表 1 RLF 对 GHC-3 细胞 DNA 含量的影响

实验	(µg/10 ⁷ 细胞)		P
	对照($\bar{x} \pm s$)	RLF($\bar{x} \pm s$)	
1	224.40 ± 7.24	42.73 ± 4.15	<0.01
2	198.85 ± 1.53	43.95 ± 1.51	<0.01

表 2 RLF 对 GHC-3 细胞 ³H-TdR 掺入的影响

取样 (时)	实验	Cpm		P
		对照($\bar{x} \pm s$)	RLF($\bar{x} \pm s$)	
3	1	1725.0 ± 37.6	1652.5 ± 2.4	<0.01
	2	2190.5 ± 19.0	1727.5 ± 1.0	
6	1	1762.0 ± 3.8	1891.6 ± 31.5	<0.01
	2	2301.0 ± 11.6	1831.5 ± 18.6	
12	2	3115.1 ± 26.6	1970.5 ± 11.3	<0.01
18	1	5840.6 ± 8.6	2190.5 ± 19.0	<0.01
	2	4647.3 ± 15.4	2207.4 ± 10.0	<0.01
24	1	7514.6 ± 14.5	3179.3 ± 37.5	<0.01
	2	5532.2 ± 16.0	3207.7 ± 14.4	<0.01

实验 1. RLF 处理, 实验 2. 停药后正常培养, P. RLF 与对照比

表 3 RLF 对 GHC-3 细胞 ConA 凝集反应的影响

组别	ConA 浓度(µg/ml)				
	100	50	25	12.5	0
对照	++	++	++	+	-
RLF	±	-	-	-	-

比较无明显差异($P > 0.05$), 提示诱导的变化维持稳定。

三、ConA 凝集试验结果如表 3, 可见 RLF 作用后细胞 ConA 凝集反应显著减弱或消失。ConA 受体检测显示对照细胞膜上显深棕色反应物, 经药物处理的细胞显色反应甚弱, 提示细胞表面膜 ConA 受体减少。

四、对照细胞与 AFP-McAb 作用呈黄绿色荧光反应; 与 G₃M-McAb 作用后在胞膜上显明亮点状荧光。RLF 处理的细胞随着作用时间和传代次数的增加, 免疫荧光反应也逐渐减弱, 提示药物作用后癌细胞 AFP 合成下降, 表面膜抗原与 G₃M-McAb 反应减弱。

五、对照细胞与 ras p 21-McAb 反应在多数细胞显示棕色颗粒, RLF 处理后的细胞随着作用时间的延长而反应逐渐减弱, 提示药物作用后的细胞的癌基因产物 ras p 21 表达减少。

以上各项对停药后继续培养细胞重复检测结果基本一致。

讨 论

肿瘤细胞分化异常可出现种种表型变化, 某些肿瘤的自然消退现象和一些化合物的诱导作用的实验提示, 通过适当方法可能改变肿瘤细胞的恶性状态。但报道的药物作用周期较短, 诱导的变化不稳定, 一旦脱离诱导物则细胞迅速回复原状。用中药诱导肿瘤细胞逆转分化的较深入研究尚未见有报道, 本文对此作一探索。

香茶菜属中药具清热利湿和凉血散瘀的功能, 用于治疗肝胆疾病和消炎。曾报道黄酮类化合物为一种自由基捕捉剂和淬灭剂, 能抑制类脂过氧化和抗突变等作用^[9]。我们用从香茶菜提取黄酮, 对人肝癌细胞较长期持续处理和停药后继续培养, 经多层次指标观察到癌细胞形态发生变化和生长速度减慢, 分裂指数、集落形成以及 DNA 合成和 ³H-TdR 掺入率明显减少, 表明经过诱导获得减低恶性行为的基本改变。为了探索逆转变化的特征, 又对细胞基因表达相关的肿瘤标志物、膜受体、抗原和癌基因产物等进一步实验观察。

AFP 是肝癌的一个标志物, 肝细胞癌变时 AFP 量可增高。小分子 RNA 可在转录水平上调控 AFP 基因的表达^[10]; 正常肝细胞在烷化剂作用后去甲基化, AFP 基因又可恢复表达^[11]。本实验用 RLF 持续处理有 AFP 表达功能的人肝癌细胞系 GHC-3, 从 AFP-McAb 检测所见, AFP 表达已逐步转向减弱或消失, 这是肝癌细胞发生逆转变化的—具特异性指征。同时, 从 G₃M-McAb 的作用可见, 标志

细胞恶变的膜抗原也逐渐消失。

ConA 受体与配体结合可起传递信号的作用。本实验以凝集素分子作探针,检测与之匹配的 ConA 受体,结果经药物处理的细胞表面受体明显减少。另一方面,癌基因产物 ras p21 对肝细胞分化和肝癌细胞的作用曾有报道^[12],本实验显示经 RLF 作用的细胞 ras P21 表达减弱。同时,尚观察到染色体分布转向较集中,出现二倍体细胞。这些变化在细胞脱离药物后一个月以上仍维持稳定。

细胞的受体和基因表达的脱恶性表型改变是细胞由恶性向正常方向逆转分化的重要表现。这些变化或许不仅是基因产物的活性受抑制,可能在调节细胞表面功能上也起着一定的作用。从本实验结果提示,RLF 对人肝癌细胞的作用不是直接杀伤,而可能通过调节细胞内部机制,诱导癌细胞改变其遗传本质或表型性状,向正常或降低恶性方向逆转分化。

摘 要

香茶菜提取物黄酮体外对人肝癌细胞系 GHC-3 的诱导,从细胞生长特性、膜受体、肿瘤标志物、癌基因产物和遗传性状等方面观察到细胞恶性表型的逆转。经过药物作用 10 周后发现细胞形态由多边形上皮样逐渐转变为梭形,生长速度减慢,分裂指数、集落形成、ConA 凝集和 ConA 受体、DNA 含量及 ³H-TdR 掺入均明显减少,染色体分布较集中,出现二倍体细胞等变化。进一步以三种单克隆抗

体测试,AFP 和 ras P 21 合成以及荧光标志抗体显示的膜抗原都明显减弱。这些改变在脱离药物后一个月以上仍维持稳定。以上结果表明,香茶菜黄酮可诱导人肝癌细胞改变恶性表型特征,促使向正常或降低恶性方向逆转。

关键词: 香茶菜黄酮 诱导逆转 人肝癌细胞

参 考 文 献

- [1] Kruh, J., 1982, *Molecular and Cellular Biochem.*, 42: 65—82.
- [2] 葛曰萍等, 1991, 肿瘤, 11(3): 136—138.
- [3] Dendy, P.P., 1976, *Human tumour in short term culture techniques and clinical application*, pp. 111, London, New York, San Francisco. Acad Press.
- [4] Mosmann, T., 1983, *J. Immunol. Methods*, 65(1—2): 55—63.
- [5] Bellard, M. G et al., 1973, *Europ. J. Biochem.*, 36: 32—38.
- [6] Leffert H. L., 1982, in «The Live» pp. 601—611, ed. by I. Arias, et al., Raven Press, New York.
- [7] 葛曰萍等, 1993, 细胞生物学杂志, 15(3): 136—137.
- [8] Zogury, D. et al., 1979, *Europ. J. Immunol.*, 9(1): 1—6.
- [9] Torel, J.J., 1986, *Phytochemistry*, 25(2) 383—385.
- [10] 叶秀珍等, 1984, 实验生物学报, 17(4): 447—457.
- [11] 葛曰萍等, 1986, 实验生物学报, 19(2): 193—201.
- [12] Barbacid, M., 1987, *Ann. Rev. Biochem.*, 56: 779—827.

简讯 西安申立超声粉碎器可变电能为高频振动,使物质粉碎,适用于生物学、医药学等部门作生物材料、细菌、药物颗粒等少量材料的粉碎和多种液体的乳化。特别适合实验室使用。

该机器经过西安唐都医院传染病实验室和西北大学化学系等单位两年多的使用,效果一直稳定,细菌破壁率可达 80%。蛋白体活性可达 1 千多万个/ml。

需要者可与西安申立超声服务部联系(提供免费试用服务)。地址:西安市陕西师范大学招待所东北 24 楼 210 号,邮编:710062。联系人:丁四年。电话:(029)5243043。

INDUCTION ON THE MALIGNANT PHENOTYPICAL RE- VERSION OF HUMAN HEPATOCELLULAR CAN- CER CELL LINE (GHC-3) BY RLF IN VITRO

Ge Yue-ping Chen Wei-jie et al

(Cancer Research Institute, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182)

ABSTRACT

The changes of human hepatocellular cancer cell line (GHC-3) induced by Chinese herbal medicine Flavones from *Rabdosia* (RLF) was studied in vitro. The malignant phenotypical reversion of GHC-3 cells was observed such as the properties of cell growth, cancer cell membrane receptor, tumor marker, oncogene products and inheritable character and so on. It was found that the treated cell with RLF for 10 weeks not only gradually changed morphogenesis from the polygonal epithelial-like cells into the spindle cells, but also remarkably decreased in so far as their growth speed rate, mitotic index, colong formation, Con A agglutination and Con A receptor, DNA amount as well as total incorporation of ^3H -TdR into cells and the treated cells which have the chromosomes seemed to be collectively and some diploid cells were counted.

Furthermore, the treated cells were assayed with G_3M -McAb, AFP-McAb and ras p21-McAb. The results show that AFP or ras p21 synthesis decreased gradually and the antigen of GHC-3 on the cell membrane by the fluorescence label of antibody became weaker.

After transferred to standerd medium more than one month, the induced biological properties of the treated cells were continued. These results mentional above suggest that RLF was able to change GHC-3 cell's malignant phenotypic characteristics and produce a reversed alteration.

Key words: RLF Induced reversion Human hepatocellular cancer cell

创伤后巨噬细胞对 T 细胞白介素 2 及白介素 2 受体 α 基因表达的直接接触抑制作用*

梁华平 王正国 耿波 田丰群

(第三军医大学野战外科研究所 重庆 630042)

创伤后巨噬细胞的抑制作用是导致伤后免疫功能低下的重要原因。已有证据表明^[1], 创伤后巨噬细胞抑制作用的发挥有赖于其分泌一系列免疫抑制成份如前列腺素 E_2 (PGE_2) 等。我们以往研究证实, 创伤后巨噬细胞在其分泌细胞因子的能力被阻断后, 仍可通过直接的细胞-细胞接触方式抑制 T 淋巴细胞的功能^[2]。但其作用环节尚不清楚。本研究对此进行了探

讨。

材 料 和 方 法

一、动物模型及分组

Balb/c 小鼠, 雌雄各半, 6—8 周龄, 体重 18—22 g。随机分为正常对照、伤后 1、2、4、7、10 天共 6 组, 每组 10 只。小鼠致伤参照文献^[2]进行。即利

* 国家自然科学基金资助项目。