

富硒绿茶对人肝癌细胞株恶性表型逆转作用的血清药理学研究

张建军, 黄育华, 晏雪生, 张赤志, 盛国光, 王伯祥

(湖北省中医院肝病研究所, 武汉 430061)

摘要: 目的: 研究富硒绿茶对人肝癌细胞株恶性表型的逆转作用, 探索富硒绿茶预防肝癌机制。方法: 对经富硒绿茶药物血清处理后的人肝癌细胞株 Bel-7402 进行生长曲线、克隆形成、甲胎球蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)的合成和分泌、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)活力的测定及细胞形态的电镜观察。结果: 富硒绿茶药物血清对该系细胞能抑制生长, 抑制克隆($P < 0.05$), 减少 AFP 和 γ -GT 的合成和分泌, 促进 ALB 的合成($P < 0.05$), 且呈现一定的浓度、时间依赖关系, 对人肝癌细胞株恶性表型有逆转作用, 可诱导癌细胞向正常方向分化。结论: 富硒绿茶对人肝癌细胞株恶性表型有逆转作用, 能诱导人肝癌细胞株 Bel-7402 向正常方向分化, 具有预防原发性肝癌发生的作用。

关键词: 肝细胞癌; 细胞分化; 富硒绿茶

文献标识码: B 文章编号: 1005-5320(2002)02-0003-03

材料和方法

1 材料

1.1 动物: 健康日本大耳白兔 4 只, 体重 1.5~2.5 kg, 雄性, 湖北省医学科学院实验动物中心提供。

1.2 人肝癌细胞株 Bel-7402: 中国医学科学院药物研究所药理一室提供。

1.3 主要试剂: RPM I1640 培养基, 美国 GBCO 公司产品; 特级小牛血清, 杭州四季生物工程和材料研究所; HEPYS, Hong Kong EMERK 产品; 甲胎蛋白、白蛋白放免试剂盒, 北京北方免疫试剂研究所产品。富硒绿茶提取液由湖北省中医院制剂室提供。富硒绿茶: 购自湖北恩施地区。

2 方法

2.1 含药血清的制备: 纯种雄性日本大耳白兔 4 只, 每 2 只为一组, 自由饮食和进水。一组灌服生理盐水, 一组灌服富硒绿茶液 $9.3 \text{ ml/kg} \cdot \text{d}$ (浓度为 100%)。第 7 d 上午连续两次给药 (中间间隔 1 h, 前晚禁食不禁水), 1 h 后, 颈动脉插管采血, 无菌分离血清, 经 56°C 30 min 灭活, -30°C 冰箱保存备用。

2.2 细胞培养条件: 培养液含 10% 小牛血清, 细胞在 37°C , 含 5% CO_2 的培养箱内培养。

2.3 细胞生长曲线的测定: 取对数生长期细胞, 用胰酶消化传代, 配成浓度为 1×10^5 个/ ml 细胞悬液

接种, 每孔 1 ml, 培养 24 h 后, 同时加入不同浓度的药物血清 (5%、10%、20%) 及同浓度的生理盐水血清, 对照组加等体溶剂, 于药物作用 2、4、6 d 取细胞, 按台盼兰排斥法, 用血细胞计数板在光镜下计数活细胞数, 绘制细胞生长曲线。

2.4 细胞克隆形成实验: 将加入不同浓度的药物血清和空白溶剂的 Bel-7402 细胞培养 4 d, 然后将细胞在 10% 小牛血清的 RPM I 1640 培养液中稀释成 $10^2/\text{ml}$ 细胞, 加入 24 孔培养板中, 置 37°C , 含 5% CO_2 培养箱中培养 7 d, 在低倍镜下计数集落数。

2.5 AFP、ALB 分泌的测定: 接种 $10^5/\text{ml}$ 细胞于培养瓶中, 24 h 后, 分别加入 5%、10% 浓度的药物血清, 对照组加入等体积溶剂, 细胞培养 48 h、72 h 后更换为不含药物血清的培养基继续培养 48 h 收集培养上清, 3000 rpm 离心 5 min, 取上清冷冻干燥, 溶于 PBS 中, 用放免法测定 AFP、ALB 的含量。

2.6 γ -GT 的测定: 接种 $10^5/\text{ml}$ 细胞于培养瓶中, 24 h 后, 分别加入 5%、10% 浓度的药物血清, 对照组加入等体积溶剂, 细胞培养 48 h、72 h 后, 用 PBS 洗二次, 将细胞用 Policeman 橡皮刮刮下, 离心, 将细胞在 0.05 M tris HCl 缓冲液中制备匀浆, 经 3000 rpm 离心 30 min, 取上清用于 γ -GT 和蛋白质的测定。取细胞匀浆 50 μl 加入到 0.25 ml 基质缓冲液

收稿日期: 2001-12-27

基金项目: 湖北省教育厅资助项目

(10 μmol/ml γ-谷氨酰-α-萘胺 酸缓冲液, pH9.0) 中, 37℃ 恒温 1 h 加入 5 ml 重氮试剂(0.2% 对氨基苯磺酸钠: 0.1% 亚硝酸钠 24 1) 混匀。对照管加 50 μl 匀浆, 重氮试剂 5 ml, 基质缓冲液 0.25 ml 混匀, 室温放置 20 min 后, 520 nm 波长下测定光密度值, 以对照管调零, 根据 α-萘胺标准曲线测定 α-萘胺释放量, 结果换算为每小时每 mg 蛋白释放 α-萘胺的 μmol 数。

2.7 蛋白质测定为酚试剂法。

2.8 细胞形态学观察(电镜): 取经 5%、10% 药物血清处理后(培养 48、72 h) 的一部分沉淀细胞团, 用 3.8% 戊二醛固定 1 h, 经 0.1 M PBS 冲洗后, 用环氧化锇及 15% 亚铁氢化钾的混合液固定 2 h 后, 用环氧树脂 618 浸泡, 包埋, 聚合后, 超薄切片, 在 HITACHI 800 型透射电镜下观察。

结 果

1 不同浓度药物血清对 Bel-7402 细胞生长的抑制作用

各种浓度药物血清均能抑制细胞的生长, 随着作用时间的延长, 抑制作用有加强的趋势, 且呈浓度依赖关系, 5%、10% 的药物血清处理后的活细胞计

数始终在 95% 以上, 提示其抑制作用而非杀癌细胞作用, 因此选用 5%、10% 两个浓度进行实验。生理盐水血清对细胞生长影响不明显。

2 对 Bel-7402 细胞克隆形成的影响

5%、10% 的药物血清可抑制 Bel-7402 细胞克隆的形成, 呈浓度依赖关系, 克隆抑率达 60% 以上, 见表 1。

表 1 富硒绿茶血清对 Bel-7402 细胞克隆形成率

	浓度	生理盐水血清组	富硒绿茶血清组
抑制率	5%	98%	37% *
	10%	95%	18%

对照组细胞克隆形成率为 100%, 与对照组比较, * P < 0.05。

3 对 Bel-7402 细胞 AFP、ALB 分泌的影响

Bel-7402 细胞体外培养, 可合成和分泌 AFP, 与正常肝细胞相比 ALB 合成和分泌能力降低。5%、10% 富硒绿茶血清均能抑制 AFP 的合成和分泌, 促进 ALB 的合成和分泌, 且与浓度增大、时间延长而作用增强有一定的相关性, 见表 2。

4 对 Bel-7402 细胞中 γ-GT 活性的影响

表 2 富硒绿茶血清对 Bel-7402 细胞 AFP、ALB 分泌的影响(x ± s)

浓度	AFP (ng/ml)		ALB (μg/ml)	
	48 h	72 h	48 h	72 h
对照组	223 ± 3	266 ± 2	2.98 ± 0.13	2.24 ± 0.04
生理盐水	220 ± 7	267 ± 10	2.18 ± 0.15	2.26 ± 0.09
血清组	218 ± 12	258 ± 9	2.20 ± 0.11	2.25 ± 0.21
富硒绿茶	177 ± 20	165 ± 37	2.54 ± 0.27	3.24 ± 0.01 *
药物血清组	148 ± 13 *	128 ± 22	3.31 ± 0.40	4.20 ± 1.58

注: 与对照组比较 * P < 0.05 n = 2

表 3 富硒绿茶血清对 Bel-7402 细胞 γ-GT 活性的影响 (x ± s)

浓度	γ-GT (U/mg 蛋白)	
	48h	72h
对照组	184.5 ± 4.3	211.9 ± 5.2
生理盐水	186.3 ± 7.8	208.4 ± 9.3
血清组	180.7 ± 10.2	196.8 ± 11.5
富硒绿茶	150.6 ± 24.2	138.8 ± 32.1
药物血清组	135.5 ± 43.1	116.3 ± 15.0 *

注: 与对照组比较 * P < 0.05 n = 2

肝细胞癌变时, 细胞 γ-GT 活性明显增高。结果表明 5%、10% 的富硒绿茶血清处理后细胞的 γ-GT 活性明显低于对照组, P < 0.05, 且呈一定的浓度、时间依赖关系, 见表 3。

5 对 Bel-7402 细胞形态影响的观察

电镜观察表明, 在对照组细胞中, 细胞核大, 不规则, 数目可见 2 核、3 核或 4 核, 染色深, 细胞浆相对较小, 核浆比例大; 而经富硒绿茶血清处理后的细胞, 其核变小, 常无核仁, 染色淡, 位于边缘, 可见核碎裂现象, 胞浆相对增多, 核浆比例小, 分泌空泡增加。

讨 论

Bel-7402 细胞在富硒绿茶药物血清作用后增长速度明显下降, 抑制程度随培养时间延长及浓度的增大而呈抑制增强趋势, 细胞成活率在 95% 以上, 少见死亡细胞, 形态观察没有看到急剧的形态破坏和明显的细胞死亡, 提示富硒绿茶对 Bel-7402 细胞生长抑制是通过诱导分化作用而非细胞毒性作用引起的。

经富硒绿茶血清处理的细胞, 其集落形成率明显下降, 提示其生长能力、增殖速度、集落形成率明显减弱, 接触抑制部分恢复。细胞间的接触抑制恢复可能与诱导纤维连接蛋白(FN)的合成和分泌至细胞膜有关^[1]。FN 可使细胞形态向正常方向分化, 且它是一种细胞骨架蛋白, 缺乏时将影响细胞形态, 使细胞间的接触抑制现象消失^[2]。

AFP 是公认的诊断肝癌的肿瘤去分化的指标, 其分泌量的多少反映肝细胞恶变程度的高低^[1]。正常肝细胞具有分泌和合成白蛋白的功能, 是肝细胞分化成熟的指标, 肝癌细胞分泌和合成白蛋白的能力大为下降。经富硒珍珠茶药物血清处理后的 Bel-7402 细胞的 AFP 分泌量较相同培养天数的对照组细胞明显减少, 而白蛋白的分泌量则明显增多, 反映富硒绿茶能诱导恶性细胞重新分化, 使基因表达的表型向正常方向逆转。这与秦锁富^[1]于树玉^[3]报道亚硒酸钠能使人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞的 AFP 分泌量减少结论一致, 诱导细胞向正常方向分化。

γ -GT 是肝癌的标志。肝癌时癌细胞的逆分化, 类似胚胎期, 酶的合成增多, 使 γ -GT 的合成增多, 使 γ -GT 的合成亢进^[4]。经富硒绿茶血清处理的 Bel-7402 细胞的 γ -GT 活力较相同培养天数的对照组细胞明显下降, 反映富硒绿茶能够使恶性细胞重新分化, 而 γ -GT 主要在于细胞膜处, 推断细胞膜可能是富硒珍珠茶作用的一个位点。

经富硒绿茶处理的 Bel-7402 细胞, 电镜观察发现, 细胞形态较对照组比较有较大变化。处理后的细胞, 细胞核变小, 核仁减少或者消失, 胞质增多, 核浆比例减少, 细胞分泌的空泡增加。这与艾兆伟^[5]报道的 RA 处理的结果一致。说明富硒绿茶具有诱导癌细胞向正常方向分化的特点。

人肝癌细胞株 Bel-7402 细胞由上海细胞生物所陈瑞铭^[6]等于 1978 年建立, 该系细胞具有曲型肝癌细胞的一系列恶性特征, 是研究和评价防癌抗癌药物的理想细胞模型。我们运用中药血清药理学的方法克服了中药粗制剂在细胞药理实验上的缺点, 提高了实验结果的科学性。

富硒绿茶原产于湖北省富硒地区恩施自治州, 其硒含量为 2.0~4.1 $\mu\text{g/g}$, 绿茶和微量元素硒具有抑制肝癌发生的作用^[7,3]。硒具有防止肿瘤发生, 抑制肿瘤生长, 促进肿瘤细胞分化, 抑制分裂, 使恶性表型逆转^[8]。于树玉研究证实补硒可使肝癌发生率下降 35%, 使有肝癌家族史发病率下降 50%, 并可阻断乙肝病毒携带者发生肝癌^[3]。本实验表明其使肝癌细胞恶性表型逆转, 诱导肝癌细胞株 Bel-7402 向正常方向分化的作用, 具有预防原发性肝癌发生的功能。

参考文献

- [1] 秦锁富 亚硒酸钠对人肝癌细胞株甲胎蛋白纤维连接蛋白及细胞膜糖链的影响 肿瘤, 1991, 11(3): 133
- [2] Ali lu Restoratin of momal morphology adhesion and cytoskeleton in tranaformed cell by addition of a transformation Seniditive Surface Protein Cell, 1977, 11: 115
- [3] 于树玉 硒预防肝癌研究获奖 中国肿瘤, 1997, 6(2): 29
- [4] 江绍基 临床肝胆系病学 上海: 上海科技出版社, 1992 105
- [5] 艾兆伟 维甲酸对人肝癌细胞株一些表现的逆转作用 中华肿瘤杂志, 1991, 13(1): 9
- [6] 陈瑞铭 人肝癌体外细胞系 Bel-7402 的建立及其特征 实验生物学报, 1978, 11(1): 37
- [7] 于新蕊 茶叶的化学成分及药理作用研究进展 中草药, 1995, 26(2): 219
- [8] Pung A. Some differentiation effect of selenium on the celtured human hepatoma cells and human pulmoncy adenocarcinoma cells in vitro. Bilogical Trace Element Research, 1987, 14: 19