

# 中药制剂艾迪联合顺铂诱导骨肉瘤细胞凋亡

黄涛, 吕刚, 高大新, 王岩峰

(中国医科大学附属第一医院骨科, 辽宁 沈阳 110001)

**摘要** 目的: 研究中药制剂艾迪注射液对骨肉瘤细胞的诱导凋亡作用及相关机制, 探寻骨肉瘤的中西医结合化疗方案。方法: 免疫组化及 RT-PCR 方法检测不同浓度艾迪作用下骨肉瘤细胞的 Fas 表达, 并将艾迪与顺铂单独及联合应用于骨肉瘤细胞, 采用 MTT 法检测细胞毒性作用, 流式细胞仪定量分析凋亡细胞所占比例, 倒置相差显微镜、荧光显微镜及电镜下观察凋亡细胞超微结构改变。结果: 艾迪可上调骨肉瘤细胞 Fas 表达并诱导凋亡, 艾迪浓度达 25  $\mu\text{l/ml}$  时, 细胞抑制率不再明显改变, 但如与 1  $\mu\text{g/ml}$  顺铂合用将使细胞抑制率进一步提升 ( $P < 0.01$ )。细胞超微结构观察及凋亡率测定也显示, 艾迪与顺铂联用可诱导更多骨肉瘤凋亡。结论: 艾迪可通过上调 Fas 表达诱导骨肉瘤细胞凋亡, 艾迪与亚毒性剂量顺铂合用可高效杀伤骨肉瘤细胞。

**关键词** 骨肉瘤; 细胞凋亡; 中药疗法

## Apoptosis of osteosarcomal cells induced by combination of Aidi injection (艾迪注射液) with cisplatin

HUANG Tao, LV Gang, GAO Da-xin, WANG Yairfeng. Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Liaoning Shenyang, 110001, China

**Abstract Objective:** To study the apoptosis of osteosarcomal cells induced by Aidi injection (艾迪注射液) and related mechanism so as to explore the new method of clinical chemotherapy. **Methods:** Immunohistochemical and RT-PCR methods were used to examine the expression of Fas on osteosarcomal cells, Aidi injection (艾迪注射液) and cisplatin were applied on the osteosarcomal cells respectively or jointly and the inhibition rate was measured by MTT assay. The cellular ultrastructure was observed with inverted phase contrast microscope, fluorescence microscope and electron microscope. The apoptotic rates were analyzed with flow cytometry (FCM). **Results:** Aidi injection (艾迪注射液) had the effect of up regulating expression of Fas and inducing apoptosis. The inhibition rate was stagnated with Aidi injection (艾迪注射液) of 25  $\mu\text{l/ml}$ . If Aidi injection (艾迪注射液) was combined with cisplatin of 1  $\mu\text{g/ml}$ , the rate became significantly higher ( $P < 0.01$ ). Changes of cellular ultrastructure and apoptotic rate also indicated apoptosis inducing effect of joint application, which was much stronger than those of respective application. **Conclusion:** Aidi injection (艾迪注射液) is conductive to the Fas expression and effective to induce apoptosis. Combination of Aidi injection (艾迪注射液) and subtoxic cisplatin has strong killing effect on osteosarcomal cells.

**Key words** Osteosarcoma; Apoptosis; Treatment with Chinese herbs

顺铂等化疗药对骨肉瘤细胞有显著杀伤作用, 但长期应用后的耐受性及毒副作用也已成为化疗时难以克服的问题。中药制剂艾迪是由人参、黄芪、刺五加和斑蝥组成的抗癌中药, 因其对化疗药有协同作用而被广泛应用于呼吸、消化系统肿瘤的治疗。本研究将艾迪应用于体外培养的骨肉瘤 OS-732 细胞, 探讨其能否诱导细胞凋亡及程度如何, 同时观测此效应是否与上调肿瘤细胞的 Fas 表达有关, 以分析其抗肿瘤的相关机制, 并将艾迪与亚毒性剂量顺铂

联合应用于骨肉瘤细胞, 探讨二者联用能否增强对骨肉瘤细胞的杀伤作用, 为骨肉瘤的中西医联合治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 骨肉瘤 OS-732 细胞株购自北京积水潭医院; RPMI 1640 干粉及 TRIzol 购自美国 Gibco 公司; 胰蛋白酶、MTT 及 Rnase A 均购自华美生物工程有限公司; 艾迪注射液由贵州益佰制药股份有限公司提供, 主要成分为人参、黄芪、刺五加和斑蝥; 顺铂由齐鲁制药厂提供; Fas 多克隆抗体购自福州迈新生物有

限公司;  $\beta$ -actin 及 Fas 引物由上海生工生物有限公司合成; PCR 试剂购自 TAKARA 公司。

1.2 仪器 IT-61 型二氧化碳培养箱(日本 YAMA-TO 公司); LH50A 型倒置相差显微镜(OLYMPUS); MK ASENT 酶标分析仪(LABSYSTEMS 生产); H-600 型透射电子显微镜(日立公司); JSM-7300 型扫描电子显微镜(日立公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及给药方法 OS-732 细胞株按常规细胞培养方法进行培养。待细胞贴壁后给药, 具体分组方法见表 1。

1.3.2 免疫组化方法检测 Fas 表达 调节细胞浓度至  $2 \times 10^5$ /ml 后, 分别加入不同浓度的艾迪注射液继续培养 24 h, 对照组则只加入培养液。取出盖玻片, 以 4 °C 丙酮固定 10 min。使用 SP 法进行免疫组化染色, 染色过程按说明书进行。以胞浆呈棕黄色为阳性, 利用显微图像分析系统得出平均灰度值, 来反映 Fas 表达强度。

1.3.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测 Fas 表达 收集肿瘤细胞, 按试剂盒说明书提取总 RNA 后, 逆转录合成 cDNA, 再行 Fas 的 PCR 扩增, 扩增产物为 513 bp。取 10  $\mu$ l 扩增产物电泳后,  $\beta$ -actin 基因表达为参照, 用凝胶分析仪比较 Fas 在不同组间表达水平的差异。

1.3.4 MTT 法检测肿瘤细胞抑制率  $5 \times 10^5$ /ml 细胞接种于 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ l, 贴壁后加入不同浓度药物或对照 PBS 的细胞培养基, 每孔 100  $\mu$ l, 每种浓度平行 4 孔, 培养 24 h 后, 加入 5 mg/ml 的 MTT 20  $\mu$ l, 37 °C 孵育 4 h, 弃上清加 150  $\mu$ l DMSO 溶解, 540 nm 测定吸光度。细胞抑制率(%) = (1 - 实验组吸光度值 / 对照组吸光度值)  $\times$  100%。

1.3.5 肿瘤细胞凋亡形态学观察 于倒置相差显微镜下直接观察肿瘤细胞形态及贴壁情况。另取盖玻片置入 6 孔板内, 待细胞凋亡后, 固定 10 min, 加入 0.5 ml Hoechst 33258 染色液, 染 5 min 后, 将盖玻片盖在滴有抗荧光淬灭封片液的载玻片上, 荧光显微镜下照片。

1.3.6 扫描电镜及透射电镜下肿瘤细胞的超微结

构观察 OS-732 细胞经 2.5% 戊二醛固定后, 按常规扫描电镜及透射电镜的操作程序制备电镜标本, 并分别拍摄下电镜照片。

1.3.7 流式细胞仪测定凋亡细胞所占比例 将细胞加入 70% 冷乙醇固定 48 h。离心弃上清后, 加入 10 g/L RNase 200  $\mu$ l, 37 °C 水浴 30 min 后, 洗去 RNase, 100  $\mu$ l PI 染液 4 °C 避光染色 1 h。FAG-SCAN 流式细胞仪测定荧光强度, 激发光波长 488 nm, Cell Quest 分析软件测定细胞凋亡率。

1.3.8 统计学处理 应用 SPSS 10.0 软件分析数据, 采用方差分析进行统计学处理。

2 结果

2.1 艾迪与顺铂对骨肉瘤 OS-732 细胞的抑制作用

艾迪可抑制 OS-732 细胞增殖, 并呈浓度依赖性。除 25  $\mu$ l/ml 组与 125  $\mu$ l/ml 组比较抑制率无明显改变外, 其余各组比较均有统计学差异( $P < 0.01$ ), 可见艾迪浓度增加到 25  $\mu$ l/ml 以上, 对肿瘤细胞的抑制作用已不再明显提升。并且此时的促凋亡作用也未见明显增加。顺铂对 OS-732 细胞的抑制率及诱导凋亡率的影响, 均具有浓度依赖性, 不同浓度组间比较差异有显著性意义( $P < 0.01$ ), 见表 1。

表 1 艾迪、顺铂作用下的骨肉瘤 OS 732 细胞的增殖抑制率及诱导凋亡率

Tab.1 Inhibitive and apoptotic rate of osteosarcoma OS 732 induced by Aidi injection(艾迪注射液)and cisplatin

groups	Aidi ( $\mu$ l/ml)	cisplatin ( $\mu$ g/ml)	inhibitive rate ( $\bar{x} \pm s, \%$ )	apoptotic rate ( $\bar{x} \pm s, \%$ )
PBS control group	0	0	1.21 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.02
Aidi 1	1	0	5.37 $\pm$ 0.52	3.73 $\pm$ 0.29
Aidi 2	5	0	12.46 $\pm$ 0.85	7.65 $\pm$ 0.58
Aidi 3	25	0	38.24 $\pm$ 3.09	25.48 $\pm$ 2.67
Aidi 4	125	0	41.25 $\pm$ 3.57	27.36 $\pm$ 3.42
cisplatin 1	0	1	19.84 $\pm$ 1.26	11.75 $\pm$ 0.91
cisplatin 2	0	10	30.47 $\pm$ 3.57	22.37 $\pm$ 2.49
cisplatin 3	0	20	56.83 $\pm$ 6.75	49.26 $\pm$ 5.63
Aidi 1+ cisplatin 1	1	1	13.59 $\pm$ 1.37	7.76 $\pm$ 0.43
Aidi 2+ cisplatin 1	5	1	31.97 $\pm$ 2.48	19.02 $\pm$ 4.51
Aidi 3+ cisplatin 1	25	1	64.47 $\pm$ 7.12	52.37 $\pm$ 6.44
Aidi 4+ cisplatin 1	125	1	67.76 $\pm$ 7.05	51.39 $\pm$ 5.49

2.2 艾迪对骨肉瘤细胞表面 Fas 受体表达的影响

见表 2。

表 2 不同浓度艾迪作用下的骨肉瘤 OS 732 细胞的 Fas 表达

Tab.2 Fas expression of osteosarcoma OS 732 with different dose of Aidi

examination items	0 $\mu$ l/ml	1 $\mu$ l/ml	5 $\mu$ l/ml	25 $\mu$ l/ml	125 $\mu$ l/ml
Fas protein	143.47 $\pm$ 5.76	128.81 $\pm$ 5.79	109.76 $\pm$ 5.25	91.07 $\pm$ 5.12	86.47 $\pm$ 4.83
Fas mRNA	0.15 $\pm$ 0.03	0.29 $\pm$ 0.05	0.38 $\pm$ 0.07	0.49 $\pm$ 0.13	0.52 $\pm$ 0.11

### 2.3 低浓度艾迪与低浓度顺铂联用对 OS-732 细胞的抑制作用

①OS-732 细胞凋亡的形态改变: 相差显微镜下见单用顺铂(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 时仅部分细胞变小, 变圆; 与 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  艾迪合用时可见染色质及细胞质浓缩, 大量细胞脱落而悬浮于培养液中。荧光显微镜下见单用顺铂(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 时, 细胞内荧光呈均匀分布, 以淡染的正常细胞为主; 合用时可见细胞内浓集、发亮的荧光显色, 表明有大量凋亡细胞存在。②OS-732 细胞的超微结构改变: 单用顺铂(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 时, 于扫描电镜下见细胞表面微绒毛比较丰富且向周围扩展; 透射电镜下仅见细胞核畸形。顺铂(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 与 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  艾迪合用时, 于扫描电镜下见凋亡细胞表面微绒毛减少且扩展程度缩小, 细胞轮廓变模糊; 透射电镜下见核固缩, 染色质浓缩于核膜, 细胞皱缩, 胞浆空泡化明显, 可见凋亡小体。③25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的艾迪与 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  顺铂合用于 OS-732 细胞 24 h, 细胞抑制率及诱导凋亡率与单用相比, 差异有显著性意义( $P < 0.01$ ), 见表 1。

### 3 讨论

艾迪具有诱导机体产生白介素、干扰素、肿瘤坏死因子及增强 LAK 细胞、NK 细胞活性等免疫调节作用<sup>[1]</sup>, 更重要的是由于艾迪所含 4 种成分都具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用<sup>[2,5]</sup>, 因此, 艾迪的抗肿瘤作用, 也与诱导肿瘤细胞凋亡有关。本研究不仅从细胞超微结构方面证实了上述推论, 还同时发现这种诱导作用与 Fas 系统的调节密切相关。由 Fas 与 Fas 配体(FasL)组成的 Fas 系统, 在将凋亡信号传入细胞内发挥着重要作用。当 FasL 与肿瘤细胞表面的 Fas 结合后, 可将凋亡信号传至细胞内, 并诱发肿瘤细胞凋亡。由于许多肿瘤细胞的 Fas 表达减低, 使 Fas 系统的诱导凋亡作用减弱。因此, 许多学者提出可通过化疗药来恢复肿瘤细胞的 Fas 表达, 从而诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[6,7]</sup>。Song 等<sup>[8]</sup>发现, IL-2 可通过上调 Fas 表达来促进结肠癌细胞的凋亡, 表明 Fas 高表达可提升化疗敏感性。本研究发现艾迪与顺铂合

用, 极大地提升了骨肉瘤细胞对顺铂的敏感性, 表明艾迪是一种很理想的化疗增敏剂。

本研究的不尽完善之处在于未同时检测 FasL 的表达, 因为这将有助于全面了解艾迪对肿瘤免疫特赦的调节作用。但毕竟细胞凋亡是一个极其复杂的病理过程, 艾迪诱导骨肉瘤细胞凋亡的确切机制值得进一步研究。仅从本研究中我们发现, 艾迪对骨肉瘤细胞也有一定程度的杀伤作用, 虽然在化疗期单独使用对骨肉瘤尚有一定局限性, 但作为一种化疗增敏剂与顺铂联用治疗骨肉瘤时, 既能通过提升顺铂的抗肿瘤效果来克服肿瘤对化疗药的耐受性, 又可通过减低顺铂的使用剂量而克服化疗药的毒副作用, 是一种非常值得推广的化疗方案。此外, 艾迪也可在手术前后, 或非正规化疗期单独使用, 以增强患者免疫力, 起到辅助治疗的作用。将艾迪应用于临床骨肉瘤的治疗是我们下一步的研究方向, 此领域的研究必将为骨肉瘤的中西医结合治疗提供崭新的视角。

#### 参考文献

- 1 严英, 钟秀驰, 周伟生, 等. 中药制剂介入治疗恶性肿瘤的药理与临床研究概述. 中药新药与临床药理, 2000, 11(3): 185-188.
- 2 郑春燕, 肖伟. 肺癌患者外周血单个核细胞反应状态及黄芪的调节作用. 中国免疫学杂志, 2002, 18(7): 502-504.
- 3 牛洪平, 高瑞兰, Helen T, 等. 人参皂甙诱导 HL60 细胞凋亡的研究. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(6): 450-452.
- 4 孙震晓, 魏育林, 赵天德, 等. 斑蝥素及去甲斑蝥素诱导人红白血病 K562 细胞凋亡的细胞学研究. 解剖学报, 2000, 31(1): 56-60.
- 5 叶红军, 邹兵, 杜意平. 刺五加叶皂甙诱发肝癌细胞凋亡的研究. 临床肝胆病杂志, 2002, 18(3): 162-163.
- 6 Matsuzaki I, Suzuki H, Kitamura M, et al. Cisplatin induces fas expression in esophageal cancer cell lines and enhanced cytotoxicity in combination with LAK cells. Oncology, 2000, 59(4): 336-343.
- 7 Iwase M, Watanabe H, Kondo G, et al. Enhanced susceptibility of oral squamous cell carcinoma cell lines to FAS-mediated apoptosis by cisplatin and 5-fluorouracil. Int J Cancer, 2003, 106(4): 619-625.
- 8 Song E, Chen J, Autus B, et al. Interleukin 2 enhances susceptibility of colon cancer cells to FasR mediated apoptosis by up-regulating Fas receptor level and down-regulating FAP-1 expression. Int J Immunopathol Pharmacol, 2000, 13(3): 113-122.

(收稿日期: 2004-11-30 本文编辑: 李为农)