

· 基础研究 ·

中药片仔癀胶囊对骨肉瘤 U-2OS 细胞诱导凋亡的作用

张俐¹, 于波¹, 林建华²

(1.福建中医学院骨伤系, 福建 福州 350108; 2.福建医科大学附属第一医院)

【摘要】 目的: 研究中药片仔癀对骨肉瘤 U-2OS 细胞的诱导凋亡作用。方法: ①采用 1 月龄 SD 大鼠 16 只, 雌雄各半, 体重 120 g 左右, 随机分为 2 组(空白血清组和片仔癀治疗组), 每组 8 只。空白血清组大鼠灌服 PBS, 片仔癀治疗组大鼠灌服中药片仔癀溶液。②人骨肉瘤 U-2OS 细胞培养于含 10% 胎牛血清, 青霉素 100 IU/ml, 链霉素 100 μg/ml 的 RPMI 1640 培养液中, 置于 37 ℃、5%CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养。用 MTT 法检测不同含药血清浓度对骨肉瘤 U-2OS 细胞增殖的影响, 筛选对骨肉瘤 U-2OS 细胞作用最佳的片仔癀含药血清浓度。③在倒置相差显微镜和电镜下观察骨肉瘤 U-2OS 细胞形态。④ TUNEL 原位末端标记法检测细胞的凋亡。⑤提取基因 DNA, 琼脂糖凝胶电泳, 以 DNA 琼脂糖凝胶电泳和透射电镜检测细胞凋亡。结果: ① 20% 片仔癀含药血清对骨肉瘤细胞的增殖抑制作用最佳。②倒置相差显微镜观察可见空白血清组细胞呈梭形贴壁生长, 在 20% 片仔癀胶囊含药血清组, 可见部分细胞体积变小、变圆, 细胞膜完整但出现发泡现象, 折光性增强。随作用时间延长, 变圆细胞逐渐增多, 部分贴壁细胞皱缩、变圆、脱落, 可见坏死细胞及碎片。③ 20% 片仔癀胶囊含药血清组 TUNEL 检测阳性。④ DNA Ladder 电泳结果: 含药血清组细胞基因 DNA 凝胶电泳出现明显的梯状带。⑤透射电镜观察染色质沿皱缩的核膜下凝聚, 细胞表面出现凋亡小体。结论: 中药片仔癀胶囊对骨肉瘤 U-2OS 细胞有抑制增殖和诱导凋亡作用。

【关键词】 细胞凋亡; 中药; 片仔癀; 骨肉瘤 U-2OS 细胞

Apoptosis induction of traditional Chinese herb *Pianzihuang* (片仔癀) in human osteosarcoma U-2OS cells ZHANG Li, YU Bo, LIN Jian-hua*. *The First Affiliated Hospital of Fujian Medical College, Fuzhou 350004, Fujian, China

ABSTRACT Objective: To study the effect of apoptosis induction of *Pianzihuang* in human osteosarcoma U-2OS cells. **Methods:** ①Sixth SD rats were randomly divided into group A (8 rats) and group B (8 rats) in the study. Among them, 8 rats (group A) were treated with PBS and 8 rats (group B) treated with *Pianzihuang*. ②Human osteosarcoma U-2OS cells were cultured in nutrient solution (including fetal calf serum of 10%, penicillin of 100 IU/ml, streptomycin of 100 μg/ml), the environic condition in saturated humidity 5%CO₂, 37 ℃. The osteosarcoma U-2OS cell proliferation effect by different saturation of blood serum was measured by MTT method. And the optimal concentration of the serum (including *Pianzihuang*) could be obtained. ③The morphous of osteosarcoma U-2OS cell were observed by inverted phase contrast microscope and electron microscope. ④Apoptosis cell was detected by TUNEL in situ end labeling. ⑤Extracted DNA, agarose gel electrophoresis (AGE) to detect apoptosis cell by transmission electron microscope (TEM). **Results:** ①It was best that osteosarcoma U-2OS cell proliferation effect by 20% of the concentration of the serum (including *Pianzihuang*). ②On inverted phase contrast microscope showed that the cells of group A were fusiform adherence growth; the cyton transform shrind and circle in 20% of the concentration of the serum (including *Pianzihuang*). Follow lasting time, the cell turning circle gradually increased. Necrosis cell and fragment were found by microscope. ③The detected result of apoptosis cell in 20% of the concentration of the serum (including *Pianzihuang*) was positive by TUNEL assays. ④AGE showed "ladder" strand of DNA, a special phenomenon of cellular apoptosis. ⑤Chromatin aggregated along corrugativus caryotheca and apoptotic body appeared on cell surface by observation of TEM. **Conclusion:** *Pianzihuang* can inhibit proliferation and induce apoptosis for osteosarcoma U-2OS cell

Key words Apoptosis; Chinese herbal drugs; *Pianzihuang* (片仔癀); Osteosarcoma U-2OS cells

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(4): 265-268 www.zggszz.com

目前,医学上对骨肉瘤治疗缺少有效的方法,寻求一种以激素不敏感细胞为靶目标、不良反应小的治疗手段,一直是人们努力的方向,而最有可能取得突破的是肿瘤的基因治疗和中药的辅助治疗。随着现代分子生物学技术的发展,人们从更深层次揭示细胞增殖、凋亡与肿瘤发生、发展和治疗的有机联系,为中医药抗肿瘤机制的研究提供科学、客观、现代化的手段和方法,也提供了新的思路^[1]。中药片仔癀有祛邪扶正,增强免疫力之功效,可改善癌症的症状,减轻化疗毒副作用,减轻疼痛^[2]。本研究通过观察片仔癀胶囊对骨肉瘤 U-2OS 细胞增殖和凋亡的影响,探讨其抗肿瘤作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器 片仔癀胶囊剂(国药准字 Z35020242,生产厂家:漳州片仔癀药业股份有限公司,生产批号:0711012);1 月龄 SD 大鼠,雌雄各半,体重 120 g 左右,共 16 只,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供 [许可证号:SCXK(沪)2003-0003、SCXK(沪)2003-0008];RPMI-1640、胎牛血清(海克隆);四甲基偶氮唑蓝 (Amresco);二甲亚砜(Sigma);TUNEL 试剂盒 (Promega);DNA 提取试剂盒(MOBIO);1%琼脂糖凝胶(Biovision);全自动酶标仪(Biotek);飞利浦 EM 208 型透射电镜。

1.2 溶液配制

1.2.1 MTT 溶液 称取 250 mg MTT,放入小烧杯中,加入 50 ml PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)在磁力加热搅拌器上搅拌 30 min,用 0.22 μm 微空滤器过滤除菌,4 ℃避光保存。

1.2.2 PBS (灭菌) 在 800 ml 蒸馏水溶解 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄ 和 0.24 g KH₂PO₄,用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4,加水定容至 1 L。在 15 lbf/in²(1.034×10⁵ Pa)高压下蒸气灭菌 20 min。保存于室温。

1.2.3 氨苄青霉素(Ampicillin, 100 mg/ml) 1 g Ampicillin 溶于 10 ml ddH₂O,分装成 500 μl 每小份。贮存于-20 ℃。使用时 1:1 000 加于培养基中,即 1 ml LB 加 1 μl 的氨苄青霉素。

1.3 检测指标

1.3.1 MTT 法检测不同片仔癀含药血清浓度对骨肉瘤细胞增殖的影响,确定最佳含药血清浓度 含药血清组以 10 倍临床使用量(按体重比折算)给予大鼠灌胃,连续给药 3 d,第 4 天 1 次服用全天剂量,动物给药前禁食 12 h,不禁水。保持动物于空腹状态,使其较快较好地吸收药物^[3],末次给药 1 h 后麻醉处死提取血清^[4];空白对照组以同样的生理盐水灌胃以获得空白对照血清。

取生长良好的第 3 代细胞以 2×10³ 个/孔接种于 96 孔板中,含 15% FBS 的 DMEM 培养液培养贴壁 24 h。弃去培养液,分别加入含 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%片仔癀含

药血清或空白血清的 DMEM 培养基,每个浓度设 6 孔,并设 15% FBS 正常细胞为对照组。培养 72 h,弃培养基,每孔加入 90 μl PBS 溶液和 10 μl 0.5% MTT 溶液,37 ℃温育 4 h,弃除 MTT,加入 100 μl DMSO,充分震荡 10 min。用酶标仪 570 nm 检测每孔光吸收值(OD 值),记录结果并计算肿瘤细胞抑制率=[(对照组 OD-实验组 OD)/对照组 OD]×100%。比较片仔癀含药血清组(B 组)及空白血清组(A 组)在不同浓度对细胞增殖抑制的影响,并得出最佳含药血清浓度。

1.3.2 倒置相差显微镜观察细胞形态 将细胞的浓度为 5×10⁴/ml 的骨肉瘤细胞 0.25%胰酶消化后,接种于培养皿,常规培养 24 h 后使其同步化 24 h,倒置相差显微镜下观察干预后 48、72、96 h 细胞形态的变化。

1.3.3 TUNEL 原位末端标记法检测细胞凋亡 骨肉瘤细胞胰酶消化置于左旋多聚赖氨酸铺片上至细胞贴壁;4%多聚甲醛溶液室温固定 25 min。固定前细胞在超净台内风干约 15 min。0.2% Triton(r)X-100 solution 的 PBS 通透液促渗 5 min,滴加 Equilibration Buffer 100 μl 覆盖细胞。含 rTdT 酶的 TUNEL 反应液 37 ℃,(湿室内)湿润避光反应 60 min。新鲜配制 DAB 工作液显色反应,光镜观察^[5]。

1.3.4 DNA Ladder 电泳分析骨肉瘤细胞凋亡 样品电泳参照文献^[6-7]进行。将细胞沉淀悬浮于 400 μl 细胞裂解液(10 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100)中,37 ℃ 1 h, 12 000 r/min 离心 20 min,吸取上清液并加入 RNaseA,使终浓度为 0.5 mg/ml,50 ℃ 1 h。然后用酚/氯仿按常规方法抽提 DNA 并用 2 倍体积的无水乙醇沉淀,4 ℃过夜,14 000 r/min 离心 20 min,取沉淀。沉淀干燥后用 20 μl TE 溶解,即为待测样品。取待测样品 20 μl 用 1%的琼脂糖凝胶电泳,4 V/cm 电压,电泳 90 min,紫外检测仪下观察,照相。

1.3.5 透射电镜观察细胞形态 倒置相差显微镜观察细胞形态后收集细胞,离心(1 500 转/min, 5 min),取材后 4 ℃下,经 3%戊二醛-1.5%多聚甲醛前固定数天,1%锇酸-1.5%亚铁氰化钾后固定 1.5 h,PBS 漂洗;70%乙醇饱和醋酸铀染液块染,乙醇-丙酮梯度脱水,环氧树脂 618 包埋剂包埋。超薄切片 80 nm,醋酸铀、柠檬酸铅各染色 5 min;在飞利浦 EM 208 型透射电镜下观察、摄影。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件处理,实验数据为计量资料,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验或 *q* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 检测不同浓度片仔癀含药血清对骨肉瘤细胞增殖的影响 见表 1。空白血清组细胞随血清浓度增加增殖速度改变不明显;片仔癀含药血清组细胞随血清浓度增加而抑制

表 1 不同浓度片仔癀含药血清对骨肉瘤细胞增殖的影响 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Cell proliferation of human osteosarcoma U-2OS cells cultured in different concentration of Pianzihuang (n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	1%	5%	10%	15%	20%	25%	30%
空白血清组(A)	0.140±0.032	0.140±0.030	0.173±0.035	0.173±0.013	0.252±0.056	0.173±0.042	0.196±0.013
含药血清组(B)	0.140±0.036	0.196±0.032	0.196±0.065	0.210±0.013	0.364±0.023*	0.210±0.010	0.198±0.042

注:与 A 组比,**P*<0.05

Note: Compared with group A,**P*<0.05

加快,并在含药血清浓度为 20%时增殖抑制速度最快,且与同浓度空白血清组比较差异有统计学意义($P<0.05$),随着血清浓度继续增加,其增殖抑制速度下降(见表 1)。说明 20%等剂量灌胃血清组对骨肉瘤细胞的增殖抑制作用最优。

2.2 倒置相差显微镜细胞形态观察 片仔癯胶囊含药血清处理后,骨肉瘤 U-2OS 细胞体积变小、变圆,细胞膜完整但出现发泡现象,折光性增强。随作用时间延长,变圆细胞逐渐增多,部分贴壁细胞皱缩、变圆、脱落,可见坏死细胞及碎片。空白血清组骨肉瘤 U-2OS 细胞呈梭形贴壁正常生长(图 1-2)。

2.3 TUNEL 原位末端标记法观察凋亡细胞 TUNEL 原位末端标记法,DAB 工作液显色反应,片仔癯含药血清组可见骨肉瘤细胞成簇阳性染色的凋亡细胞,体积变小、核固缩、碎裂;空白血清对照组未见骨肉瘤细胞阳性染色的凋亡细胞,见图 3-4。

2.4 DNA Ladder 电泳结果 含药血清组细胞基因 DNA 凝胶电泳出现明显的梯状带,空白血清组无梯状条带出现。

2.5 透射电镜观察结果 见图 5-6。片仔癯含药血清组凋亡细胞胞核固缩,染色质浓缩聚集。可见凋亡小体,密度较深;空白血清对照组细胞有正常突起,胞核胞浆相对着色,细胞核清晰完整,有丰富正常的线粒体及内质网。

3 讨论

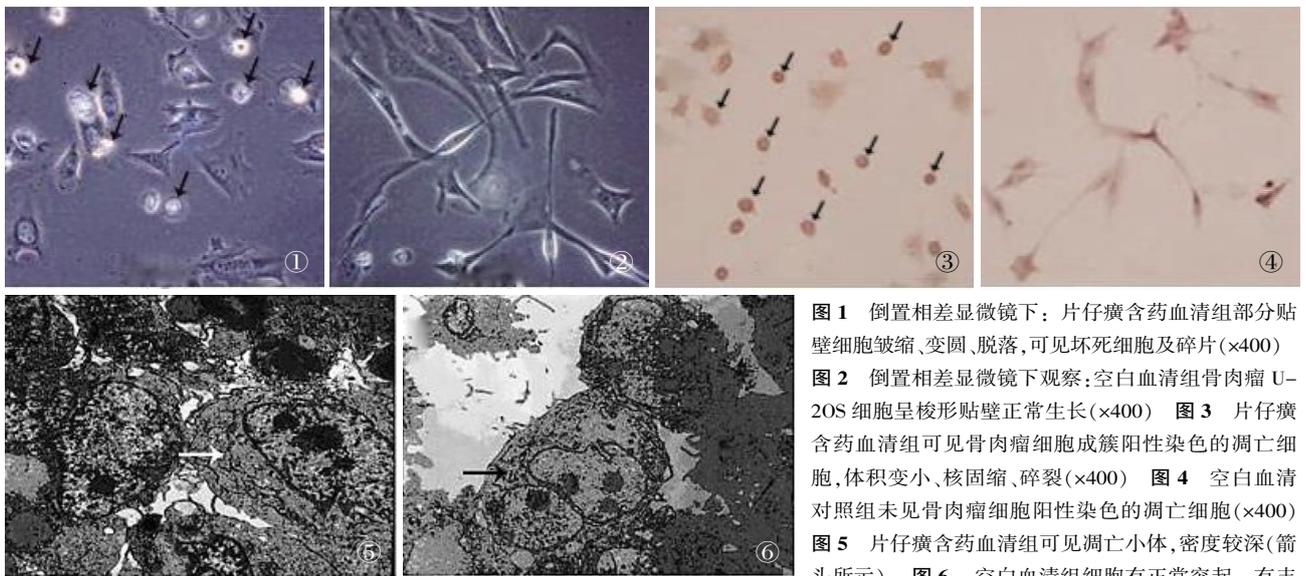
中医学认为,邪毒凝聚是肿瘤形成过程的共同病理变化。清热解毒是治疗肿瘤的重要治则^[7]。清热解毒药具有较广的抗菌谱,能抑制病毒、提高机体的非特异性免疫功能^[8]。活血化瘀药物能直接作用于肿瘤细胞,部分药物可以增强癌细胞的抗原性,从而增强机体对肿瘤的免疫反应^[9]。因此,以“清热解毒、消肿散结、活血化瘀”见长的福建名药片仔癯的主要成

分中,田七擅于散瘀止血,消肿定痛,行滞通脉;蛇胆擅清热解暑、清肝利胆;牛黄泻火清热、熄风开窍止痛、清肝、豁痰解毒;国家限量特批供应的天然麝香善于开窍醒神、活血通经、消肿止痛。诸药配伍,散积消瘀,解毒祛邪之效臻于上乘,可以使肿瘤患者的预后得到好转,症状有所减轻,生存时间延长,在综合治疗的作用下,部分患者甚至可望获得治愈^[10]。

在实验中,含药血清加入体外反应系统后,浓度将被稀释,达不到在体条件下的药物浓度,在这种情况下,如果反应系统出现阴性反应,并不能排除由于药物浓度过低而出现的假阴性结果。针对此种情况,有学者提出增大给药剂量,即给药剂量=在体实验的给药剂量×反应体系中被稀释的倍数^[3],然而其不足之处是给药剂量与血药浓度并不是呈等比增加,况且受到灌胃药物浓度和体积的限制;给药剂量应以整体模型动物的有效剂量(即为临床成人剂量的 8~18 倍量)为宜^[11]。本实验的等效剂量设定为临床成人剂量×反应体系中被稀释的倍数(10 倍,按体重比折算)。采用 MTT 法检测不同片仔癯含药血清浓度对骨肉瘤细胞增殖的影响,确定最佳含药血清浓度是一个有效的实验方法。

形态学检测是鉴定细胞凋亡最可靠的方法,而检测凋亡的原位末端标记法具有很高的特异性和敏感性^[10],二者结合为凋亡的研究提供了强有力的工具和手段。实验结果看到经片仔癯胶囊含药血清处理后,可见部分细胞体积变小、变圆,细胞膜完整但出现发泡现象,折光性增强。随作用时间延长,变圆细胞逐渐增多,部分贴壁细胞皱缩、变圆、脱落,可见坏死细胞及碎片,并见成簇阳性染色的凋亡细胞,表明片仔癯胶囊对抑制骨肉瘤细胞凋亡有一定的作用。

由于肿瘤治疗的关键是如何调控凋亡相关基因或是其相



丰富正常的线粒体及内质网(箭头所示)

Fig.1 Inverted phase contrast microscope showed that the cells transformed circle, abscission and necrosis fragment in cell of including *Pianzihuang* serum($\times 400$) **Fig.2** Inverted phase contrast microscope showed that the cells were fusiform shape grew normally in the group A($\times 400$) **Fig.3** Human osteosarcoma U-2OS cells of including *Pianzihuang* serum showed clustering positive staining apoptosis by TUNEL assay($\times 400$) **Fig.4** The positive staining apoptosis was not found in the group A($\times 400$) **Fig.5** TEM showed apoptotic body with deep (arrow point) density in human osteosarcoma U-2OS cells of including *Pianzihuang* serum **Fig.6** TEM showed that cell had normal enation with affluent, normal mitochondrion and endoplasmic reticulum(arrow point)

· 经验交流 ·

非选择性末节断指再植的临床体会

夏增兵, 王丹, 袁永健, 闵继康, 杨文龙, 徐旭纯, 李战春
(湖州市第一人民医院骨科, 浙江 湖州 313000)

关键词 断指再植; 显微外科手术

Clinical experience of nonselective replantation with severed distal finger segment XIA Zeng-bing, WANG Dan, YUAN Yong-jian, MIN Ji-kang, YANG Wen-long, XU Xu-chun, LI Zhan-chun. Department of Orthopaedics, the First People's Hospital of Huzhou, Huzhou 313000, Zhejiang, China

Key words Replantation of amputated finger; Microsurgery

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(4): 268-269 www.zggszz.com

自 2001 年 6 月至 2008 年 6 月对 44 例(52 指)多种原因所致的末节断指,采用非选择性进行多种方式再植,取得了满意的临床疗效,现报告如下。

1 临床资料

本组 44 例(52 指),男 31 例,女 13 例;年龄 17~60 岁,平均 31 岁。损伤原因:电锯锯伤或切割机伤 24 例,机器撕脱伤或冲压伤 15 例,钢丝绞伤 4 例,刀砍伤 1 例。其中拇指 18 指,食指 15 指,中指 8 指,环指 7 指,小指 4 指。按 Yamano 末节断指分区及分型: I 型 5 指, II 型 32 指, III 型 15 指,其中有皮肤指腹瘀斑 14 指。受伤至入院时间 30 min~3 h,断指最短缺血时间 2.5 h,最长 9 h。

2 手术方法

逆行法再植 28 指(Yamano I 型 5 指, II 型 18 指, III 型 5 指),操作顺序为:清创→缝合掌侧皮肤→吻合掌侧静脉→吻合指动脉或其终末支→吻合指神经→指骨或关节融合固定→指背侧静脉→闭合全部伤口,指骨远端先用钻头适当髓腔扩大,骨折远端用细克氏针髓内贯穿,待血管神经吻合后再固定于近端。顺行法再植 24 指(Yamano II 型 14 指, III 型 10 指),即常规先固定指骨,最后吻合指神经与动静脉。血管修复:根据伤情及缺血时间决定吻合动静脉顺序。其中吻合动

脉:静脉比例 2:3 有 3 指, 2:2 有 9 指, 2:1 有 2 指, 1:2 有 7 指, 1:1 有 9 指(其中 3 指的静脉为动脉静脉化),仅吻合 1 根动脉有 15 指, 2 根动脉有 7 指。其中有 8 指动脉缺损均取腕掌侧浅静脉移植桥接。术后常规保暖及抗感染、抗凝药及解痉药应用。对离断指体有皮肤挫伤瘀斑、血管移植或血管危象探查病例,采用小剂量肝素钠疗法 5~7 d(即肝素钠 12 500 U 加生理盐水 10 ml 稀释后,每 4 h 静注 2 ml)^[1]。仅吻合指动脉的断指术后均常规甲床或非吻合侧指端放血 5~10 d。

3 结果

术后再植成活 48 指,成活率 92.3%(48/52)。5 指术后出现静脉危象,经放血处理 4 指坏死,1 指成活;2 指术后发生动脉危象,经探查、腕掌侧浅静脉移植后成活。应用小剂量肝素钠疗法的 14 例中 11 指成活,术后监测凝血全套检验均在安全范围。本组伤指成活病例中有 34 例(41 指)获得随访,时间 1 个月~2 年,按中华医学会手外科学会断指再植术后功能评定试用标准评定(运动 ATM、日常生活活动 ADL、感觉恢复与外观各 20 分,血液循环状态与恢复工作各 10 分,等级分值为:优 100~80 分,良 79~60 分,差 59~40 分,劣<40 分)^[2]:优 24 例,良 8 例,差 2 例,优良率为 94.1%(32/34)。无伤口感染及骨折不愈合病例发生(典型病例见图 1-2)。

关产物,提高肿瘤细胞对药物的敏感性,并诱导细胞进入凋亡,因此今后需进一步研究片仔癀胶囊作用后相关凋亡因子的变化,为探讨其抗肿瘤作用提供更充分的理论依据。

参考文献

[1] 杨勤建. 中药诱导肿瘤细胞凋亡的研究进展. 湖北中医杂志, 1998, 20(1):53-55.

[2] 刘从盛. 浅谈片仔癀的祛邪安正作用. 医药世界, 2005, 12: 52.

[3] 赵万红. 中药血清药理学的方法探讨. 中药新药与临床药理, 2002, 13(2):122-124.

[4] 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题. 中药新药与临床药理, 1999, 10(2):95-98.

[5] 刘成海, 刘平, 刘成, 等. 抗肝纤维化有效中药复方血清药理学

方法探讨. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(2):16-19.

[6] 刘术娟, 赵天如, 张乃鑫. TUNEL 法检测体外培养细胞凋亡的体会. 临床与实验病理学杂志, 2001, 17(2):169-170.

[7] 裘沛然. 疑难病中医治法研究. 中国医药学报, 1987, 3(1):9.

[8] 元·朱震亨. 丹溪心法. 上海:科学技术出版社, 1959. 214.

[9] 陈翠花, 刘爱学. 中药在肿瘤治疗中的应用. 河南中医, 2004, 24(3):75-76.

[10] 谭晓华, 姜泊, 张亚历, 等. 凋亡细胞核 DNA 片段检测方法进展. 第一军医大学学报, 1999, 19(4):371.

[11] 刘平, 王宁生, 雷燕, 等. 关于血清药理学的若干思考. 中国中西医结合杂志, 1999, 10(5):263.

(收稿日期:2008-12-09 本文编辑:李为农)