

解毒消癥饮对肝癌干细胞标记分子 CD90 和 CD133 表达的影响*

胡海霞 陈旭征 曹治云 廖联明 杜建[#]

(福建中医药大学中西医结合研究院 福州 350122)

摘要:目的:探讨解毒消癥饮对人肝癌细胞株 HepG2 的增殖及肝癌干细胞标记分子表达的影响。方法:用解毒消癥饮乙酸乙酯提取物(EE-JXY)体外干预人 HepG2 细胞,采用 MTT 检测细胞存活率,荧光定量 PCR 实验和 Western-blotting 实验分别检测肝癌细胞中干细胞标记分子 CD90 和 CD133 的基因和蛋白表达水平。结果:与对照组相比,EE-JXY 组体外可抑制 HepG2 细胞的生长,且具有显著的剂量依赖性;同时,EE-JXY 组可显著抑制 HepG2 细胞中 CD90 和 CD133 的基因和蛋白的表达。结论:EE-JXY 体外可显著抑制肝癌细胞的增殖及肝癌干细胞标记分子的表达,这可能是解毒消癥饮治疗肿瘤的机制之一。

关键词:肝癌干细胞;解毒消癥饮;HepG2;CD90;CD133

中图分类号:R735.7

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2015.05.049

肿瘤可能是一种干细胞疾病,其中肝癌干性细胞^[1]可能在肝癌的发生发展、转移转归中起到了主要的驱动作用,其在临床肝癌术后对放化疗不敏感且转移复发率较高,远期疗效差。研究者分别通过侧群细胞技术及 CD133、CD90 等标志分离和鉴定得到一小群肝癌细胞,它们具有很强的体外克隆形成及体内成瘤能力,这为肝癌干细胞的存在提供了有力证据。现代医学已经不断证实,中医药在肿瘤治疗方面有着不可替代的优势。本研究选取的中药复方解毒消癥饮是用于治疗消化道肿瘤的临床验方,它能提高肿瘤患者的治疗有效率及改善肿瘤病人的生活质量,延长患者生存率。在本课题组前期研究中发现,解毒消癥饮能显著抑制肝癌移植瘤小鼠干细胞表面标志物 CD133 的表达^[2]。本研究通过观察解毒消癥饮对体外培养的肝癌细胞株 HepG2 的细胞增殖能力及干细胞特异标志分子基因和蛋白表达的影响,从而探讨解毒消癥饮抗肿瘤的分子机制,为解毒消癥饮临床防治肝癌提供可靠的实验依据。

1 材料与仪器

1.1 试剂 本研究中使用的试剂包括:RPIM 1640 培养基(Hyclone 公司),胰蛋白酶(Hyclone 公司),胎牛血清(GIBCO 公司),MTT(sigma 公司),Trizol(Invitrogen 公司),反转录试剂盒(Promega 公司),SYBR-Green I 定量 PCR 试剂盒(Takara 公司),RAPI 细胞裂解液(碧云天公司),CD133、CD90 单克隆抗体(Santa Cruz 公司),ECL 显色试剂盒(碧云天公司)。

1.2 仪器 SW-CJ-1FD 超净工作台(苏州安泰仪器设备有限公司);ELX 808 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);HF 212 UV CO₂ 培养箱(香港力康仪器设备有限公司);

荧光实时定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);凝胶成像分析系统(美国 Bio-Red 公司)。

2 方法

2.1 药物制备 药材:白花蛇舌草 150 g、夏枯草 75 g、山慈菇 75 g、苦参 75 g。药物制备具体方法依据课题组前期文献记载^[3],主要步骤为:将药物按比例混匀,粉碎后用乙醇(75%)回流提取 1 h/次,共 2 次,合并提取液进行抽滤并减压浓缩。浓缩液分别用石油醚和乙酸乙酯萃取 3 次,合并萃取液后减压浓缩、真空干燥后即得解毒消癥饮乙酸乙酯提取物(EE-JXY)。

2.2 细胞培养 人肝癌细胞株 HepG2 购自中国科学院上海生命科学研究院,采用含 10%胎牛血清、100 U/L 的青链霉素的 RPMI 1640 培养基培养,置于饱和湿度、37℃、5%CO₂ 培养箱中培养至对数生长期,用于后续实验。

2.3 MTT 法观察 EE-JXY 对 HepG2 肝癌细胞生长的影响 将 HepG2 细胞按 3×10^4 个/ml 的浓度接种至 96 孔板,过夜培养。待细胞汇合至 80%后,分别用 0.125 mg/ml、0.25 mg/ml、0.5 mg/ml 的 EE-JXY 的 RPMI 1640 培养基干预细胞 24 h,吸弃上清,每孔加入 0.5 mg/ml 的 MTT 100 μ l,继续培养 4 h,弃上清,加入 100 μ l DMSO 溶解细胞蓝紫色结晶。用酶标仪检测吸光度值(OD_{570nm}),通过以下公式计算细胞生长存活率。计算公式为:肿瘤细胞生长存活率(%)=给药组 OD_{570nm}/对照组 OD_{570nm} × 100%。

2.4 荧光定量 PCR 法检测 CD90、CD133 的基因表达 将 HepG2 细胞按 5×10^5 个/ml 的浓度接种至 6 孔板,过夜培养后,弃细胞上清,将细胞分为两组,分别为对照组(细胞常规培养)和 EE-JXY(0.25

* 基金项目:福建省自然科学基金(编号:2013J01335)

[#] 通讯作者:杜建, E-mail: dujian@fjtcu.edu.cn

mg/ml) 干预组, 每组设 3 个复孔, 置于 CO₂ 培养箱培养 10 h 后, 弃去培养上清。采用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 将总 RNA 溶解于 20 μl DEPC 处理水中, 检测总 RNA 浓度。应用逆转录试剂盒 (Takara) 合成 cDNA 后, 再进行荧光定量 PCR 反应。β-actin 作为内参照。引物序列如下: CD90 正义链: 5'-GACCCGTGAGACAAAGAAGC-3', 反义链: 5'-GCCCTCACACTTGACCAGTT-3'; CD133 正义链: 5'-TTACGGCACTCTTCACCT-3', 反义链: 5'-TATTCCACAAGCAGCAAA-3'; β-actin 正义链: 5'-TGGCACCCAGCACTAGTGCGGA-3', 反义链: 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'。根据实验所得 Ct 值用 2^{-ΔΔCt} 计算目的基因的相对表达量。

2.5 Western-blotting 法检测 CD90、CD133 蛋白表达 将 HepG2 细胞按 8×10⁵ 个/ml 的浓度接种至细胞培养瓶, 过夜培养后进行药物干预, 分组同 3.2。干预结束后收集细胞, 加入细胞裂解液冰上裂解细胞后离心 (12 000×g, 10 min), 收集离心上清进行蛋白浓度检测。取 50 μg 总蛋白变性后用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转膜 (PVDF 膜), 加入 CD90、CD133、β-actin 一抗孵育过夜, 将 PVDF 膜清洗 3 遍, 再加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温静置 1 h, 再次清洗后进行 ECL 化学发光显色反应, 拍照并进行数据分析 (β-actin 为内参)。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 15.0 软件进行统计分析, 数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示。P<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 EE-JXY 抑制肝癌细胞株 HepG2 的增殖 不同剂量的 EE-JXY 干预 HepG2 细胞 24 h 后, 随着药物剂量的增加, 细胞的增殖抑制越明显, 且具有显著的剂量依赖性, P<0.05。实验结果显示, EE-JXY 在体外能明显抑制肝癌细胞株 HepG2 的增殖。后续实验将选择对细胞抑制率为 52.36% 的 EE-JXY 剂量 (0.25 mg/ml) 作用干预浓度。见图 1。

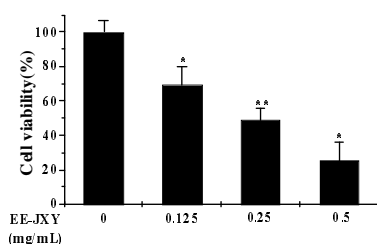


图 1 EE-JXY 对 HepG2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$, 与对照组相比, *P<0.05, **P<0.01)

3.2 EE-JXY 抑制肝癌细胞 HepG2 干细胞标志分子 CD90、CD133 的基因表达水平 与对照组 (EE-JXY 为 0 mg/ml) 相比较, EE-JXY 组 CD90、CD133 的 mRNA 表达水平显著降低, 即 EE-JXY 在基因水平能显著抑制干细胞标记分子的表达, P<0.05。见图 2。

图 2 EE-JXY 对 CD90、CD133 基因表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$, 与对照组相比, *P<0.05)

3.3 EE-JXY 抑制肝癌细胞 HepG2 干细胞标记分子 CD90、CD133 的蛋白表达水平 与对照组 (EE-JXY 为 0 mg/ml) 相比, EE-JXY (0.25 mg/ml) 组 CD90、CD133 的蛋白表达水平均有下降, 说明 EE-JXY 能够抑制 CD90、CD133 蛋白的表达, P<0.05, 逆转肝癌干细胞的自我更新。见图 3。

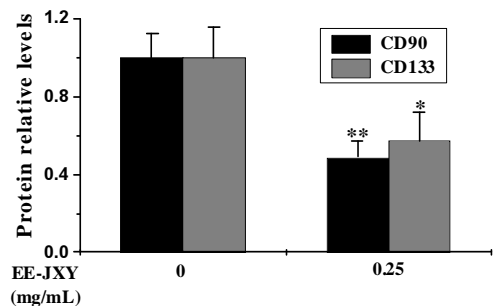
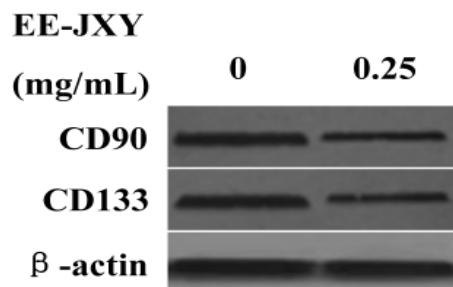


图 3 EE-JXY 对 CD90、CD133 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$, 与对照组相比, *P<0.05, **P<0.01)

4 讨论

肝细胞癌为全世界病死率最高的癌症之一^[4], 临床治疗肝细胞癌的效果不理想, 现研究证实其主要原因是由于肿瘤细胞对放化疗的抵抗^[5]。近年来研究者认为可能是肿瘤组织中少量具有无限增殖潜

能的肿瘤干细胞的恶性增殖导致肿瘤的生长^[6],肿瘤干细胞具有自我更新、多向分化潜能、高致瘤性和高耐药性^[7],本身兼有肿瘤细胞和干细胞的特性,这可能是肿瘤复发和转移的根本原因。也就是说,肿瘤组织中一般肿瘤细胞虽然在数量上占多数,却只具有相对的增殖能力,而肿瘤干细胞的数量虽然只占一小部分,却可能在肿瘤的发生进展、转移复发中起着关键性的作用。肿瘤干细胞学说的提出,为肿瘤发生发展的机制及肿瘤治疗的研究开拓了新的思路。

在肝癌干细胞的研究中,CD133、CD90 等是体外鉴定和分离肝癌干细胞的主要标志分子。CD133^[8]是一种跨膜蛋白(分子量为 120 kD),多个研究小组从肝癌细胞系中分离和鉴定了 CD133⁺表型的肝癌干细胞。Ma 等^[9]研究发现,CD133⁺较 CD133⁻具有更强的克隆形成和增殖能力。Song 等^[10]发现肝癌患者肝癌组织中 CD133⁺细胞的比例与肝癌病理分级和预后则成反比,与患者血清中的甲胎蛋白升高则成正比。而 CD90 则是一种葡萄糖 6 磷酸异构酶锚定的糖蛋白,主要表达在肝癌干细胞上。在裸鼠成瘤实验和肝癌细胞系中,Yang 等^[11]均验证了该干细胞标识物的表达与细胞致癌性以及肝癌转移性有很大的关联。中医药在临床治疗肿瘤的过程中以多靶点调控、整体调节、毒副作用少为主要特点和优势。本研究使用的中药复解毒消癥饮临床主要用于消化道肿瘤围手术期的辅助治疗,具有清热解毒、活血散结等功效,是由白花蛇舌草、夏枯草、山慈姑、苦参等配伍组成。通过体外实验研究发现,解毒消癥饮有抑制肿瘤生长、诱导癌细胞凋亡、增强免疫功能等作用^[12-13]。

本研究中的 MTT 实验结果显示,EE-JXY(解毒消癥饮乙酸乙酯提取物)可梯度抑制 HepG2 肝癌细胞的生长,EE-JXY 在 0.125 mg/ml、0.25 mg/ml、0.5 mg/ml 的浓度上,其抑制率分别达到 30.86%、52.36%、74.63%,说明解毒消癥饮在体外可以显著抑制肝癌细胞的增殖能力。荧光实时定量 PCR 实验

和 Western-blotting 实验结果显示,EE-JXY 可显著抑制主要的肝癌干细胞标记分子 CD90、CD133 的基因及蛋白水平的表达,提示 EE-JXY 可能通过减少肝癌干细胞的比例从而达到抑制肝癌干细胞自我更新和多向分化的潜能。该研究从干细胞角度探讨了解毒消癥饮抗肿瘤的分子机制,从而为解毒消癥饮临床防治肝癌提供了可靠的基础实验依据。

参考文献

[1] Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research [J]. Blood, 2008, 112 (13): 4793-4807

[2] 曹治云, 陈旭征, 林瀛, 等. 中药复方对肝癌移植瘤小鼠肿瘤干细胞表面标志 c-kit 和 CD₁₃₃ 表达的影响 [J]. 福建中医药学报, 2010, 20 (3): 18-20

[3] 陈旭征, 黎金浓, 胡丹, 等. 解毒消癥饮逆转氟尿嘧啶诱导的肝癌干细胞耐药的机制研究 [J]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2013, 3 (4): 191-196

[4] Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening [J]. Semin Liver Dis, 2005, 25(2): 143-154

[5] Rich JN. Cancer stem cells in radiation resistance [J]. Cancer Res, 2007, 67(19): 8980-8984

[6] Wang JC, Dick JE. Cancer stem cells: lessons from leukemia [J]. Trends Cell Biol, 2005, 15(9): 494-501

[7] Chiba T, Kita K, Zheng YW, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties [J]. Hepatology, 2006, 44(1): 240-251

[8] Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, et al. Characterization of CD133⁺ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 351(4): 820-824

[9] Ma S, Chan KW, Hu L, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells [J]. Gastroenterology, 2007, 132(7): 2542-2556

[10] Song W, Li H, Tao K, et al. Expression and clinical significance of the stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma [J]. Int J Clin Pract, 2008, 62(8): 1212-1218

[11] Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90⁺ Cancer stem cells in human liver cancer [J]. Cancer cell, 2008, 13(2): 153-166

[12] 陈立武, 林晶, 陈文, 等. 中药治疗原发性肝癌 III 期围手术期患者 42 例 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(9): 832-834

[13] 曹治云, 杜建, 陈立武, 等. 中药复方对肝癌小鼠移植瘤体液免疫的影响 [J]. 福建中医学院学报, 2007, 17(2): 33-34

(收稿日期: 2015-02-26)

(上接第 61 页) 穿刺活检等检查手段, 进行综合判断, 以最大限度减少乳腺癌的误诊, 提高其确诊率。

综上所述, 被误诊患者的平均年龄在 30 岁以下, 其 X 线征象特征与典型的乳腺癌 X 线征象易混淆, 应加强看片医师对非典型性乳腺癌的 X 射线片征象的认识, 并考虑家族史因素的影响, 必要时采取其他

辅助检查手段, 以减少年轻乳腺癌患者的误诊率。

参考文献

[1] 骆倩, 李文武. 年轻乳腺癌的全数字乳腺 X 射线摄影误诊原因初探 [J]. 中国辐射卫生, 2013, 22(2): 222-224

[2] 殷宗香, 赵新建, 郭春芝. 乳腺钼靶 X 射线检查漏诊、误诊原因分析 [J]. 医学信息, 2014, 27(4 中): 180-181

[3] 孙铁军, 施淑萍, 袁清民. 年轻妇女乳腺癌 3 例钼靶误诊分析 [J]. 中国社区医师(医学专业), 2011, 13(36): 149

(收稿日期: 2014-11-14)