

# 暹罗鳄胆汁提取物对人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞的抑制作用

宋 巍<sup>1</sup>, 沈东炎<sup>1</sup>, 康劲翻<sup>1</sup>, 李珊珊<sup>1</sup>, 熊佑熊<sup>2</sup>, 陈清西<sup>1\*</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 泰国是拉差龙虎园有限公司, 泰国 是拉差)

**摘要:** 以暹罗鳄(*Crocodylus siamensis*)胆汁为材料,应用细胞培养、细胞计数、Hoechst33258 染色、流式细胞仪等技术研究暹罗鳄胆汁提取物对人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞凋亡的诱导作用. 实验结果显示,胆汁提取物可明显诱导人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞的凋亡,经 1.75 mg/mL 暹罗鳄胆汁提取物诱导处理 24 h 后,人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞的增殖活动受到显著的抑制,细胞生长抑制率达 86.71%;光镜观察结果显示,暹罗鳄胆汁提取物处理细胞后,细胞体积缩小,细胞核固缩;细胞核经 Hoechst33258 染色出现浓染致密的固缩形态和颗粒状荧光;细胞周期检测出现 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例升高,S 和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例下降. 研究结果表明,暹罗鳄胆汁提取物对人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞凋亡的诱导具有显著作用,从而为进一步研究细胞凋亡机制提供重要基础和研究依据.

**关键词:** 暹罗鳄胆汁;胆管癌;细胞凋亡

中图分类号:Q 247;Q 28

文献标志码:A

文章编号:0438-0479(2011)05-0938-04

胆管癌是消化系统常见的恶性肿瘤,在肝脏原发性肿瘤中,胆管癌的发病率仅次于肝癌<sup>[1]</sup>,在我国的消化道恶性肿瘤中居第 5 位,胆管癌预后很差,在全部癌症死亡中占 2.88%~4.65%<sup>[2]</sup>,每年约有 4 500 人死于胆道恶性肿瘤. 该病起病隐匿,临床症状及体征出现晚,早期诊断困难,已经成为肝内原发肿瘤导致患者死亡的第一位肿瘤<sup>[1]</sup>,因此寻找有效的抑制胆管癌细胞增殖的药物是目前临床上迫切需要解决的问题<sup>[3-4]</sup>. 随着中药研究的迅速发展,对动物胆汁在医药上的应用研究越来越引起重视,近年的研究表明胆汁的药理作用主要有:抗炎、抗菌作用,免疫作用,清热镇痛、抗肿瘤作用等<sup>[5-7]</sup>. 鳄胆汁是由 20 种以上的胆酸、胆醇及中性的甾醇类组成的<sup>[8]</sup>,其中胆汁酸由 12 种 C<sub>27</sub> 胆酸和 8 种 C<sub>24</sub> 胆酸组成<sup>[9]</sup>. 本文采用生化分离技术得到暹罗鳄(*Crocodylus siamensis*)胆汁提取物,运用倒置显微镜观察法、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)法和流式细胞术初步研究了其体外抑制人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞的增殖和诱导凋亡的作用,为进一步研究抗癌机制及相关的细胞信号通路提供了一定的理论依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

暹罗鳄胆由泰国是拉差龙虎园有限公司提供;人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞购自上海细胞所,由本实验室培养传代;RPMI-21640 培养基为 Invitrogen 公司产品;胎牛血清为 Hyclone 公司产品.

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 暹罗鳄胆汁活性物质的提取

取阴干的暹罗鳄胆一只,用 4 倍体积的生理盐水抽提 3 次,12 000 g 离心 20 min,得上清,在 55 °C 下减压旋转蒸发,然后通过冷冻干燥制成干粉,配制为 250 mg/mL 的母液,-20 °C 储存.

#### 1.2.2 细胞培养及诱导处理

人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞培养在内含体积分数为 10% 热灭活胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基(pH 7.2),于 37 °C,体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 培养. 细胞培养 24 h 后进行诱导处理<sup>[10]</sup>.

#### 1.2.3 MTT 法测定暹罗鳄胆汁提取物对人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞生长的影响

将培养好的人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞接种于 96 孔平底细胞培养板,平均每孔 5 000 个细胞,置 CO<sub>2</sub> 培

收稿日期:2010-11-16

基金项目:国家基础科学人才培养基金项目(J1030626);厦门市科技计划项目(3502Z20103008)

\* 通信作者:chenqx@xmu.edu.cn

养箱中,37 °C 培养 1 d 后分别加入暹罗鳄胆汁提取物,空白对照为相同体积 RPMI-1640 培养液,继续培养 24,48,72 h 后加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液(5 mg/mL),继续培养 4 h,弃上清液,每孔加入 200  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜(DMSO),37 °C 充分溶解后,用酶标仪测量吸光度,测量波长为 490 nm. 按下式计算抑制率:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$$

#### 1.2.4 Hoechst33258 荧光染色检测

取分别长有对照组细胞和处理组细胞的盖玻片,预热的磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,然后用固定液(V(甲醇):V(乙酸)=3:1)固定 10 min,PBS 洗 3 次,每次 10 min,加入 Hoechst33258 室温避光温育 10 min,染料终浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,PBS 洗 3 次,稍微晾干后,用含有抗淬灭剂的封片液封片,用荧光显微镜进行检测.

#### 1.2.5 细胞周期的测定

将培养 2 d 的人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞按约  $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  接种于一批 60 mm 培养皿中,培养 24 h 后,实验组分别用 1.5,1.75,2 mg/mL 的暹罗鳄胆汁提取物处理,对照组以相应体积的 PBS 处理. 诱导培养 24 h 后收集细胞,4 °C 1 000 r/min 离心 5 min,PBS 洗 2 次后加入 -20 °C 预冷的体积分数为 70% 乙醇固定,4 °C 过夜,次日再以 PBS 洗涤 2~3 次,加入 1 mL 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNaseA 重悬细胞,37 °C 温育 20 min,之后加入碘化丙啶(PI)染液(10 mg/mL) 4 °C 染色 30 min,300 目绢筛过滤除去成团细胞,在 Coulter EPICS XL 流式细胞仪上测定细胞周期,根据所测得的 DNA 分布直方图用 Cell FIT 软件进行细胞周期统计分析.

## 2 实验结果

### 2.1 MTT 法测定暹罗鳄胆汁提取物对人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞的作用

结果如图 1 所示,表明暹罗鳄胆汁提取物对人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞有明显的抑制作用,并显示出对剂量和时间的依赖效应,其抑制率随浓度的升高而升高,抑制作用随时间的延长而增强. 不同浓度的暹罗鳄胆汁提取物(1.25,1.50 和 1.75 mg/mL)作用于人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞 12,24 和 36 h 后,处理组的细胞生长抑制率分别为 47.62%~88.41%,60.14%~90.27% 和 75.71%~95.63%.

#### 2.2 细胞在光学显微镜下的变化

倒置光学显微镜下观察到对照组细胞轮廓清晰,

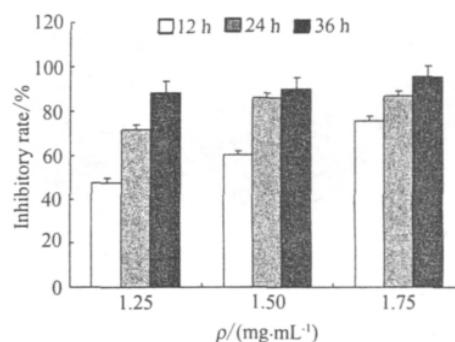
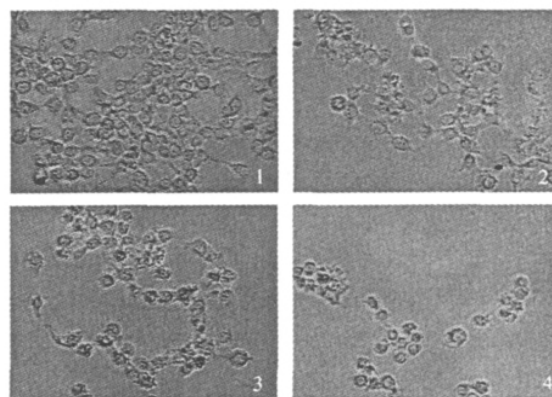


图 1 暹罗鳄胆汁提取物对人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞增殖的抑制效应

Fig. 1 Inhibitory effects of the extraction of *Crocodylus siamensis* bile on the proliferation of MZ-ChA-1 cells

细胞平铺贴壁生长,细胞之间排列密集,呈不规则多角形,细胞间无接触抑制;而经处理 48 h 后的细胞数量明显减少,细胞明显变圆,形态轮廓变得不清晰,且皱缩变形,细胞间连接减少. 光学显微镜的结果说明,暹罗鳄胆汁提取物能改变人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞的形态学特征,并有效抑制细胞的生长(图 2).



1. 对照组;2~4. 处理组(1.25,1.50,1.75 mg/mL,48 h).

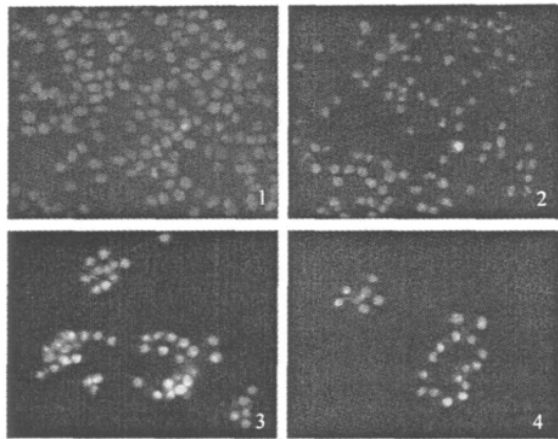
图 2 暹罗鳄胆汁提取物对人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞形态的影响(400 $\times$ )

Fig. 2 The influence of the extraction of *Crocodylus siamensis* bile on the morphology of MZ-ChA-1 cells(400 $\times$ )

#### 2.3 荧光显微镜观察

荧光显微镜下对照组人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞核完整,着色均匀,荧光成弥散状,比较黯淡. 暹罗鳄胆汁提取物处理组细胞,染色质凝聚,细胞核裂解,着色不规则,呈现出细胞凋亡的典型变化即核碎裂(图 3).

### 2.4 暹罗鳄胆汁提取物对人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞周期分布的影响



1. 对照组; 2~4. 处理组(1.25, 1.50, 1.75 mg/mL, 48 h).

图 3 不同浓度暹罗鳄胆汁提取物对人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞核的影响(400×)

Fig. 3 The influence of extraction of *Crocodylus siamensis* bile on the nucleus of MZ-ChA-1 cells(400×)

应用流式细胞仪检测暹罗鳄胆汁提取物对人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞周期分布的影响. 检测结果显示, 经暹罗鳄胆汁提取物处理后, 人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞在细胞周期各个阶段的分布发生了明显变化, 其中, 暹罗鳄胆汁提取物诱导人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞产生凋亡, 处于 G0/G1 期的细胞比例增加, 由 47.01% 增加为 79.35%; S 期细胞比例减少, 由 34.14% 下降为 14.87%, 降低幅度为 56.45%; 而 G2/M 期细胞比例下降, 由 18.85% 下降为 5.78%, 降低幅度为 69.34% (表 1). 细胞周期柱形图可见, 与对照组相比, 暹罗鳄胆汁提取物处理组细胞 S 期和 G2/M 期细胞比例明显下降, 其中 S 期细胞比例减少尤为明显; G0/G1 期细胞增多, 出现 G0/G1 期细胞堆积的现象(图 4).

表 1 暹罗鳄胆汁提取物对人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞周期的影响

Tab. 1 The effect of extraction of *Crocodylus siamensis* bile on the cell cycle of MZ-ChA-1 cells (%)

类型	G0/G1	S	G2/M
对照组	47.01	34.14	18.85
处理组	79.35	14.87	5.78

### 3 讨论

肿瘤细胞区别于正常细胞的重要生物学特征之一是细胞持续分裂和不断增殖, 因此考察对肿瘤细胞的

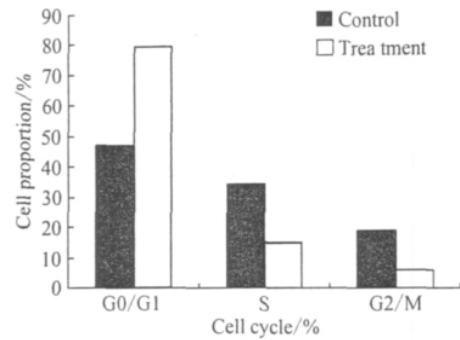


图 4 暹罗鳄胆汁提取物对 MZ-ChA-1 细胞周期的影响

Fig. 4 The effect of extraction of *Crocodylus siamensis* bile on the cell cycle of MZ-ChA-1 cells

增殖抑制作用是筛选抗肿瘤药物的一个基本指标<sup>[11]</sup>, 细胞凋亡是一个主动的由基因决定的自动结束生命的过程, 受到严格的程序性调控<sup>[12]</sup>, 其中涉及细胞增殖抑制和细胞周期阻滞以及细胞皱缩、染色质凝集、边缘化、DNA 断裂等一系列变化特征. 因此考察这一系列特征的变化是鉴定细胞凋亡的重要指标.

Hoechst 33258 染色结果显示, 对照组细胞在荧光显微镜下观察细胞核完整, 荧光成弥散状, 染色均匀, 经鳄鱼胆汁提取物处理的人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞则染色质凝聚, 细胞核裂解, 荧光比较明亮, 这与已报道的用华蟾素诱导 U937 细胞凋亡时观测到的 Hoechst33258 染色后, 细胞核出现的染色质凝聚及边缘化, 蓝色荧光加深等实验结果<sup>[13]</sup>相符合.

本文结果显示, 经 1.75 mg/mL 暹罗鳄胆汁提取物诱导人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞处理 24 h 后, 细胞生长抑制率达到 86.71%. 细胞周期各时期的细胞比例发生了显著变化, 对照组人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞 G0/G1 期细胞比例为 47.01%, S 期细胞占 34.14%, G2/M 期细胞占 18.85%, 处理组 G0/G1 期细胞增加为 79.35%, S 期细胞下降为 14.87%, G2/M 期细胞比例则减少为 5.78%. 本文实验结果表明, 暹罗鳄胆汁提取物诱导处理的人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞的增殖受到了显著抑制, 细胞周期在 S 期受到阻滞. 这一结果与本实验室研究人胆管癌 QBC939 细胞凋亡时观察到的细胞增殖及周期变化相吻合<sup>[10]</sup>. 由于暹罗鳄胆汁生理盐水提取物显示出很明显的抑制细胞生长的作用, 这可能和其中所含的成分有关, 暹罗鳄胆汁中含有大量的疏水和亲水性胆汁酸, 据报道, 疏水性胆汁酸在抗肿瘤的过程中发挥关键的作用<sup>[14]</sup>, 而亲水性胆汁酸对癌细胞的作用还鲜有报道, 我们的结果证实了暹罗鳄胆汁中的亲水性胆汁酸对人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞的抑制作用, 并诱导细胞发生凋亡.

本文研究工作充分证实了暹罗鳄胆汁能有效诱导人胆管癌 MZ-ChA-1 细胞凋亡,从而为胆管癌细胞凋亡机制的进一步研究和相关肿瘤疾病防治研究工作提供了重要基础和实验研究依据。

### 参考文献:

- [1] Khan S A, Taylor Robinson S D, Toledano M B, et al. Changing international trends in mortality rates for liver, biliary and pancreatic tumours[J]. J Hepatol, 2002, 37(6):806-813.
- [2] 郭仁宣. 胆道肿瘤外科学[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社, 2002.
- [3] Jabara B, Fargen K M, Beech S, et al. Diagnosis of cholangiocarcinoma: a case series and literature review[J]. J La State Med Soc, 2009, 161(2):89-94.
- [4] 杜冠华. 药物筛选新技术与中药现代化研究[J]. 世界科学技术, 2000, 2(4):6.
- [5] Marchetti C, Migliorati G, Moraca R, et al. Deoxycholic acid and SCFA-induced apoptosis in the human tumor cell-line HT-29 and possible mechanisms [J]. Cancer Lett, 1997, 114(1/2):97-99.
- [6] Danchenko E, Petermann H, Chirkin A, et al. Effect of bile acids on the proliferative activity and apoptosis of rat hepatocytes[J]. Exp Toxicol Pathol, 2001, 53(2/3):227-233.
- [7] Lamireau T, Zoltowska M, Levy E, et al. Effects of bile acids on biliary epithelial cells: proliferation, cytotoxicity, and cytokine secretion[J]. Life Sci, 2003, 72(12):1401-1411.
- [8] Tint G S, Dayal B, Batta A K, et al. Biliary bile acids, bile alcohols, and sterols of *Alligator mississippiensis* [J]. J Lipid Res, 1980, 21(1):110-117.
- [9] Kihira K, Okamoto A, Hoshita T. Identification of new C27 and C24 bile acids in the bile of *Alligator mississippiensis* [J]. J Biochem, 1987, 101(6):1377-1384.
- [10] Han P, Kang J H, Li H L, et al. Antiproliferation and apoptosis induced by tamoxifen in human bile duct carcinoma QBC939 cells via upregulated p53 expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 385(2):251-256.
- [11] Li Q F, Wang D Y. The differentiation of human gastric adenocarcinoma cell line MGc80-3 induced by dibutyl cAMP in vitro[J]. Shi Yan Sheng Wu Xue Bao, 1990, 23(2):167-175.
- [12] 欧阳高亮, 李祺福, 洪水根. 细胞凋亡与肿瘤的发生发展和治疗[J]. 国外医学肿瘤学分册, 2000, 27(5):266-269.
- [13] 张莉, 李军民, 钱樱. 华蟾素诱导 U937 细胞凋亡及其作用机制[J]. 肿瘤, 2007, 27(5):4.
- [14] LaRue J M, Stratagoules E D, Martinez J D. Deoxycholic acid-induced apoptosis is switched to necrosis by bcl-2 and calphostin C[J]. Cancer Lett, 2000, 152:107-113.

## Effect of the Extraction from *Crocodylus siamensis* Bile on Proliferation of Human Bile Duct Carcinoma MZ-ChA-1 Cells

SONG Wei<sup>1</sup>, SHEN Dong-yan<sup>1</sup>, KANG Jin-he<sup>1</sup>, LI Shan-shan<sup>1</sup>,  
XIONG You-xiong<sup>2</sup>, CHEN Qing-xi<sup>1\*</sup>

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Tailand ShiLaCha Tiger Zoo Limited Company, ShiLaCha, Tailand)

**Abstract:** The apoptosis effects of extraction from *Crocodylus siamensis* bile (ECB) on Human bile duct carcinoma MZ-ChA-1 cells have been studied using the methods of cell culture, cell count, Hoechst33258 staining, flow cytometry analysis. The results showed that proliferation of MZ-ChA-1 cells could be inhibited by 1.75 mg/mL ECB after 24 h, and the inhibitory rate is 86.71%. Light microscope showed that the morphology of the cells treated with bile extracts appeared shranked, cell nucleus concentrated. Cell nucleus concentrated and appeared granular fluorescence by Hoechst33258 staining. The results of flow cytometry analysis showed that the phase of G0/G1 is increased and the phase of G2/M is decreased. This study suggested that ECB had induced apoptosis of MZ-ChA-1 cells effectively, and provides important foundation and research proofs to study more about the apoptosis mechanisms of MZ-ChA-1 cells.

**Key words:** *Crocodylus siamensis* bile; bile duct carcinoma; apoptosis