

斑蝥酸钠和肿节风对腹水型肝癌H22 细胞及荷瘤小鼠肝脏能量代谢与 环核苷酸代谢的影响

张英华¹ 陈 兴² 吴国利³ 聂剑初³

内容提要 实验结果表明:斑蝥酸钠和肿节风能改善肿瘤细胞和荷瘤小鼠的能量代谢,提高过氧化氢酶活力,即降低荷瘤小鼠的癌毒激素水平,故改善能量代谢可能是它们控制和缓解癌变的途径之一;H22 癌细胞的 cAMP 与 cGMP 的比值明显低于正常鼠肝,经斑蝥酸钠治疗后的荷瘤小鼠癌细胞的 cAMP 和 cAMP/cGMP 均高于未经治疗的荷瘤小鼠,同时测得癌细胞 cAMP-磷酸二酯酶(低Km)明显下降。因此,斑蝥酸钠的抗癌作用可能与降低 cAMP-磷酸二酯酶活性从而提高癌细胞的 cAMP 有关。

细胞癌变以后其能量代谢发生异常改变。一些化学抗癌药物对肿瘤细胞的能量代谢有不同程度的影响⁽¹⁾。我们探讨了抗癌中药斑蝥酸钠(Disodium carboxide)与肿节风(Injectio herbae sarcandrae)对小鼠腹水型肝癌H22细胞及荷瘤鼠肝的耗氧量、呼吸抑制率(RCR)、氧化磷酸化效率(P/O)及琥珀酸脱氢酶和过氧化氢酶活力的影响。

恶性细胞中的环磷酸腺苷(cAMP)含量往往低于正常细胞⁽²⁾,某些癌细胞内低Km的cAMP磷酸二酯酶(cAPD)活性比正常细胞要高。Weiss提出利用改善环核苷酸代谢的药物来治疗肿瘤是可能的,并对一些抑制cAPD的药物进行了研究^(3,4)。在我们的实验中探讨了斑蝥酸钠对H22癌细胞和荷瘤鼠肝脏的cAMP、环磷酸鸟苷(cGMP)水平、cAMP/cGMP比值及cAPD、cGMP磷酸二酯酶(cGPD)活力的影响。

材料和方法

一、材料:1.动物:雄性上海种小白鼠,体重20±2g。中国军事医学科学院提供。

2.癌株:小鼠腹水型肝癌H22,中国医学科学院基础所提供。

3.药物:斑蝥酸钠注射液(0.25mg/ml)。北京第四制药厂生产。肿节风注射液(相当原生药

500mg/ml)。上海信谊药厂生产。

4.试剂:(1)ADP-Na₂:美Sigma公司产品,纯度70%。(2)高锰酸钾:德E.Merck公司产品。(3)cAMP、cGMP测定箱:中国医学科学院基础医学研究所针麻室提供。(4)³H-cAMP:上海原子能所提供,23ci/mmol。(5)³H-cGMP:北京401所提供,22ci/mmol。(6)眼镜王蛇蛇毒:广西医学院提供。(7)阴离子交换树脂:英Zerolit FF,季胺型,200~400目。(8)其他试剂均为分析纯。

二、方法:1.动物模型及处理:实验小鼠分为三组。(1)正常组小鼠不接种,不注射药物。(2)荷瘤给药组小鼠接种第7天接种鼠的腹水0.2ml(1-10×10⁶癌细胞),接种24小时后腹腔注射药物,每日一次,连续5天,剂量为斑蝥酸钠0.5mg/kg体重或肿节风50mg/kg体重。最后一次给药后24小时将小鼠颈椎脱臼处死。(3)荷瘤对照组小鼠与荷瘤给药组小鼠的处理相同,唯以等量的生理盐水代替药物。

2.蛋白质测定采用Lowry法⁽⁵⁾。

3.耗氧量测定采用Warburg法⁽⁶⁾,反应介质为Krebs-Ringer磷酸盐生理盐水溶液,温度为37°C。

$$\text{呼吸抑制率} = \frac{\text{对照组平均值} - \text{给药组平均值}}{\text{对照组平均值}} \times 100\%$$

体外实验时先加药物于介质中培养60分钟后测定。

4.鼠肝线粒体及癌细胞线粒体的分离参照杨福愉等人的方法⁽⁷⁾。

5.线粒体的呼吸控制和氧化磷酸化效率的测定按Lessler法⁽⁸⁾。反应介质含0.25M蔗糖、50mM Tris-HCl、

1.北京中医研究院中药研究所

2.大连水产学院

3.北京师范大学生物系生物化学教研室

pH7.4, 1mM EDTA-Na, 15mM KH_2PO_4 和 5 mM MgCl_2 , 外电压为 0.7V, 反应温度为 30°C 。反应液总体积为 3 ml, 加药后保温 2 分钟进行测定。

6. 琥珀酸脱氢酶的测定采用汪静英等人方法⁽⁹⁾。规定每毫克蛋白的酶液使正铁氰化钾光密度的减少为 0.1 时琥珀酸脱氢酶的比活力为 1。

7. 过氧化氢酶的测定采用藤井节郎法⁽¹⁰⁾, 反应时间为 30 秒。规定每毫克蛋白酶液分解的 H_2O_2 所用去的 0.01N KMnO_4 为 1 ml 时, 过氧化氢酶的比活力为 1。

8. cAMP、cGMP 含量测定, 参照 Steiner 等人的方法^(11~13), 略有修改。先将在干冰中迅速冷冻的肝组织约 450mg 或 1 ml 腹水制成干渣放冰箱保存, 然后用 50mM, pH 6 的 NaAc 缓冲液稀释后测定。如果样品中环核苷酸浓度低于 1 pmol/50 μl , 可采用 Cx/Co-IgC 坐标系。

9. cAPD、cGPD 活力测定, 参照 Thompson 等人的方法⁽¹⁴⁾。放射性底物计数为 200,000cpm/0.1ml 左右。规定每 mg 蛋白酶液每分钟使 1 pmol 环核苷酸底物分解时磷酸二酯酶的比活力为 1。

实验结果

一、关于能量代谢

1. 药物对癌细胞和荷瘤鼠肝耗氧量的影响: 体外给药的实验结果表明: 斑蝥酸钠和肿节风对癌细胞的呼吸有明显的抑制作用。斑蝥酸钠浓度为 0.15mg/ml 和 0.20mg/ml 时其对癌细胞耗氧量的抑制率分别为 17% 和 76%。肿节风浓度为 30mg/ml、55mg/ml、110mg/ml 和 140mg/ml 时, 其对癌细胞耗氧量的抑制率分别为 39%、56%、63% 和 66% (图 1-a、1-b)。

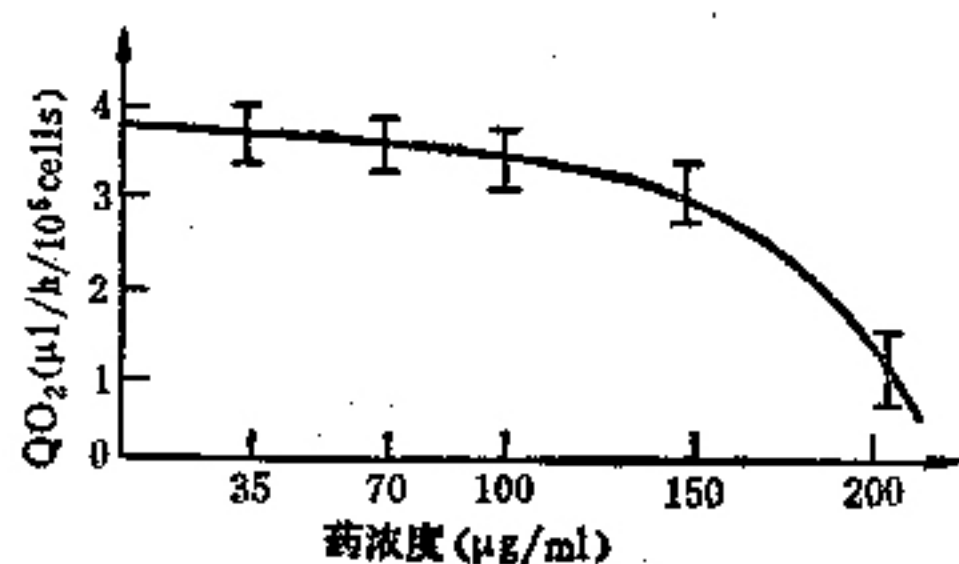


图1-a 斑蝥酸钠对癌细胞耗氧量的影响

活体给药的实验结果表明: (1) 药物对荷瘤鼠肝耗氧量的影响: 荷瘤鼠肝匀浆比正常鼠肝匀浆的耗氧量增高 60%, 注射斑蝥酸钠和肿节风后, 耗氧抑制率分别为 31%、22%。结果见图 2-a。(2) 药物对癌细

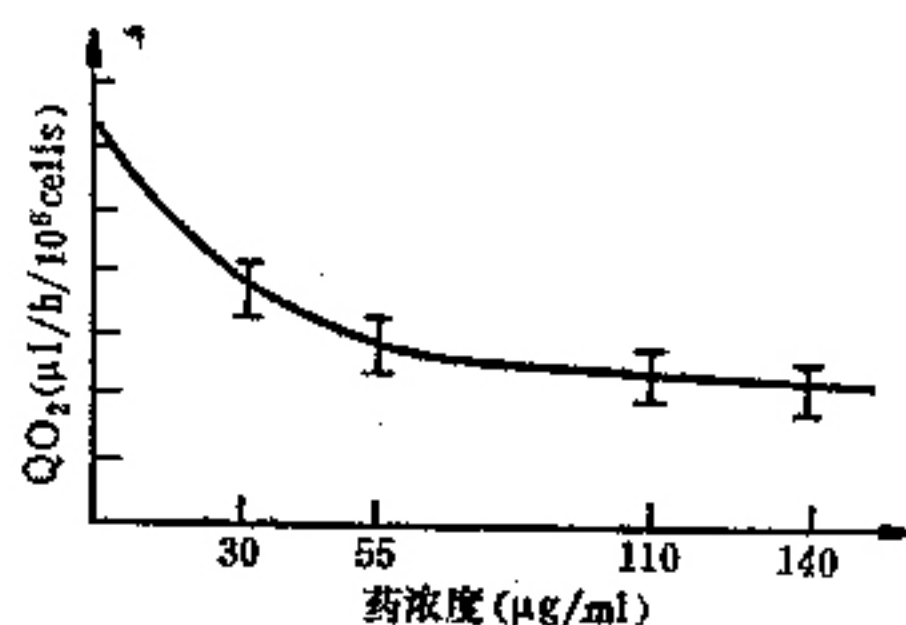


图1-b 肿节风对癌细胞耗氧量的影响

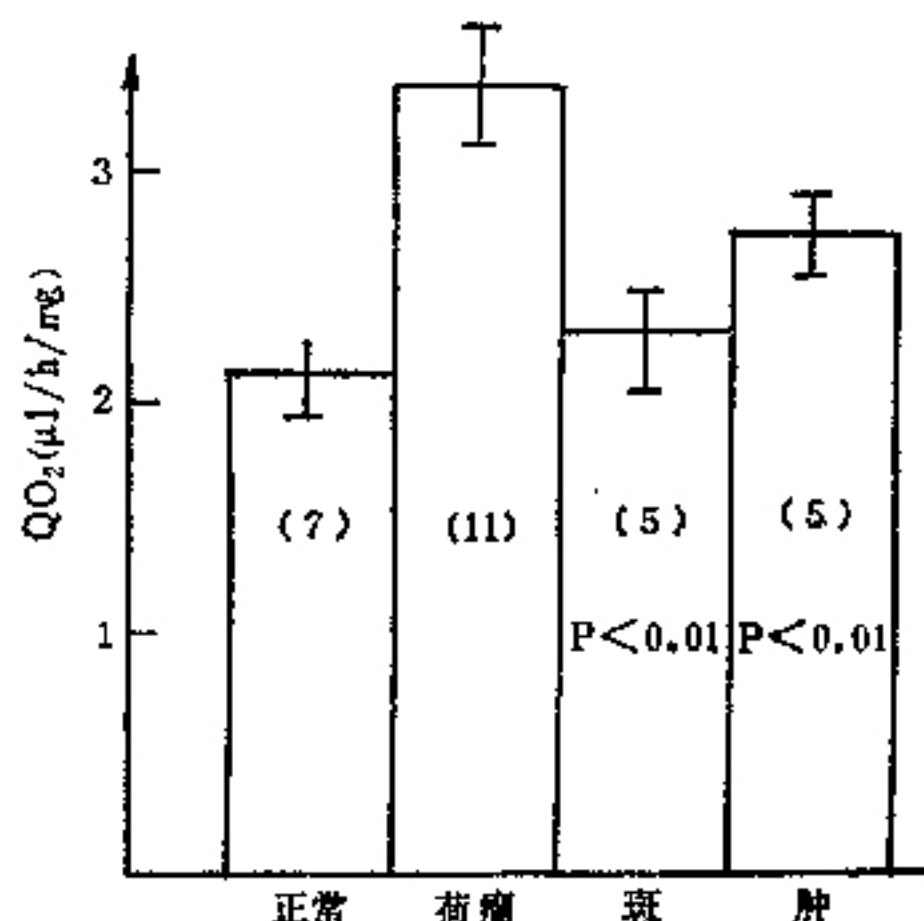


图2-a 药物对肝匀浆耗氧量的影响, () 内为实验动物只数下同, 斑: 斑蝥酸钠, 肿: 肿节风, 下同

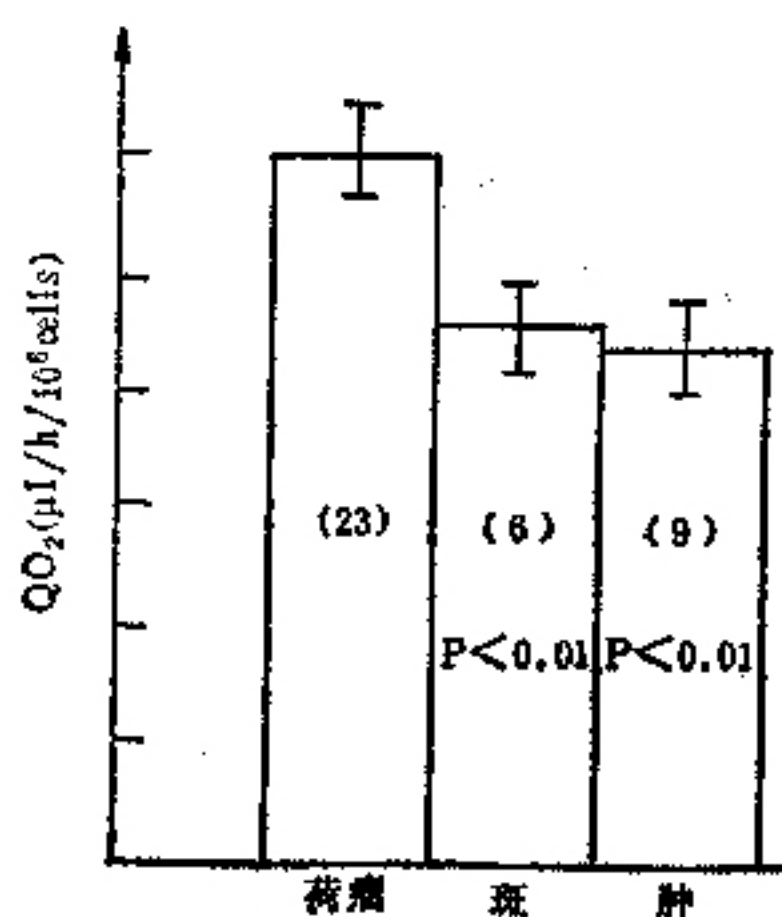


图2-b 药物对癌细胞耗氧量的影响

胞耗氧量的影响: 斑蝥酸钠和肿节风对腹水癌细胞耗氧的抑制率分别为 25%、26%, 结果见图 2-b。

2. 药物对线粒体呼吸控制率(RCR)和氧化磷酸化效率(P/O)的影响(体外实验): 斑蝥酸钠和小剂量的肿节风(5 μl)对正常鼠肝线粒体的 RCR 和 P/O 均

无显著影响,大剂量的肿节风(50 μ l)使两数值明显下降,RCR下降30%,P/O降低17%。斑蝥酸钠和小剂量肿节风对癌细胞的P/O无明显影响,却能明显提高RCR数值,高剂量的肿节风对RCR和P/O均有抑制作用,它使正常线粒体的RCR下降30%,P/O降低17%。见图3-a、3-b、4-a、4-b。RCR是测定氧化磷酸化偶联程度更为灵敏的指标。结果表明斑蝥酸钠和低剂量肿节风能提高癌细胞线粒体氧化磷酸化的偶联程度加强呼吸抑制。

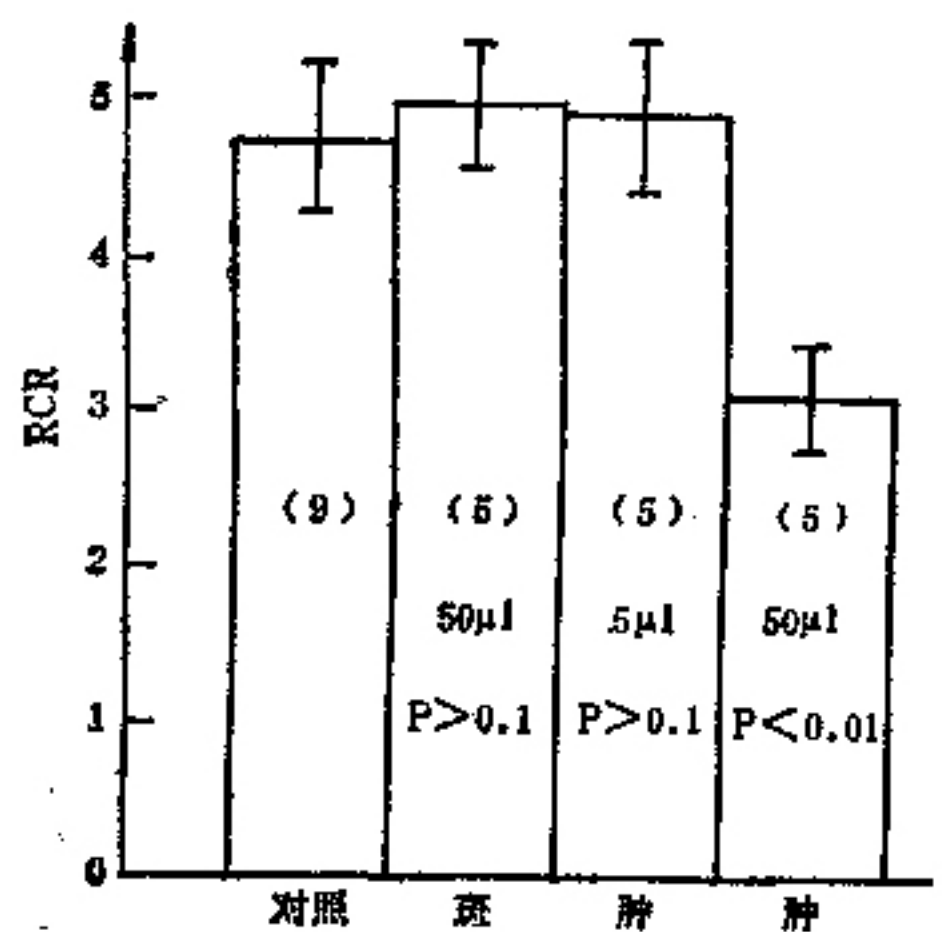


图3-a 药物对正常鼠肝线粒体RCR的影响

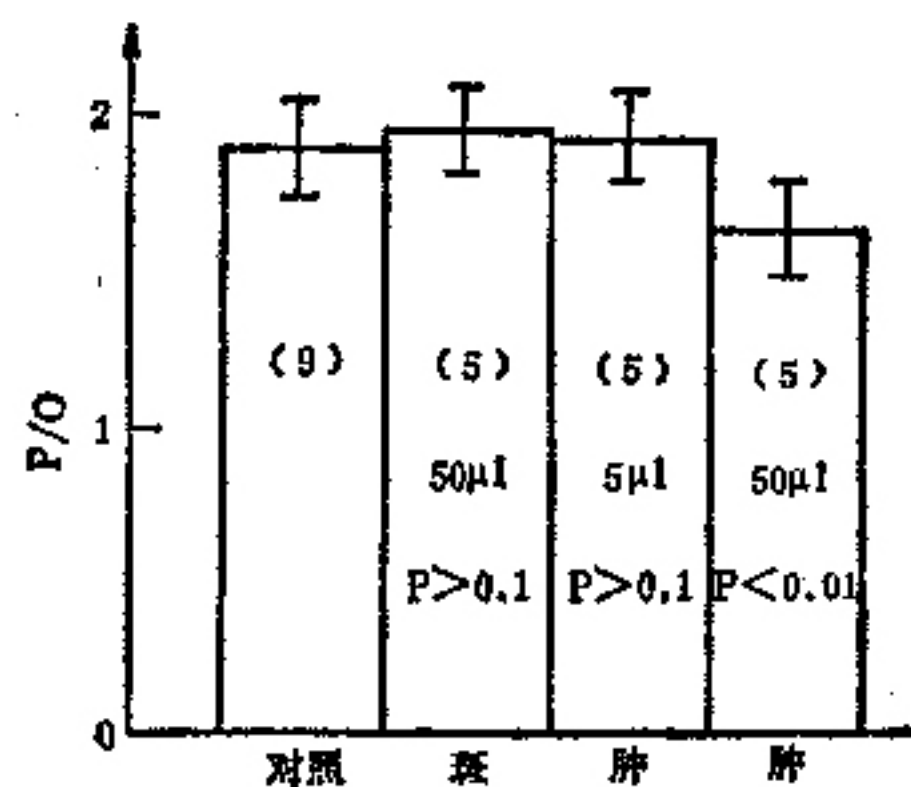


图3-b 药物对正常鼠肝线粒体P/O的影响

3. 药物对荷瘤鼠肝和癌细胞琥珀酸脱氢酶活力的影响:斑蝥酸钠或肿节风体内给药治疗5天后,癌细胞内琥珀酸脱氢酶活力比治疗前分别提高26%、40%。荷瘤鼠肝内此酶活力比治疗前分别提高7%、31%。见图5-a、5-b。

4. 药物对鼠肝过氧化氢酶活力的影响:荷瘤鼠肝比正常鼠肝的过氧化氢酶活力降低了48.5%,斑蝥酸钠或肿节风体内给药5天后,此酶活力分别比治疗前提高30%和39%。见图6。

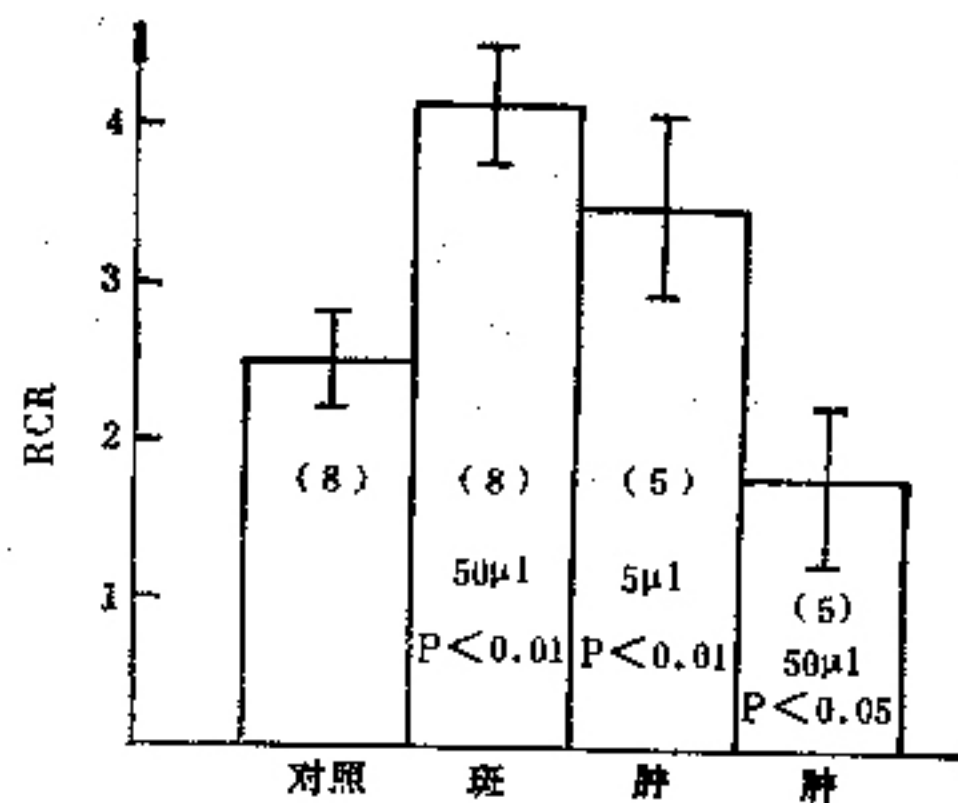


图4-a 药物对癌细胞线粒体RCR的影响

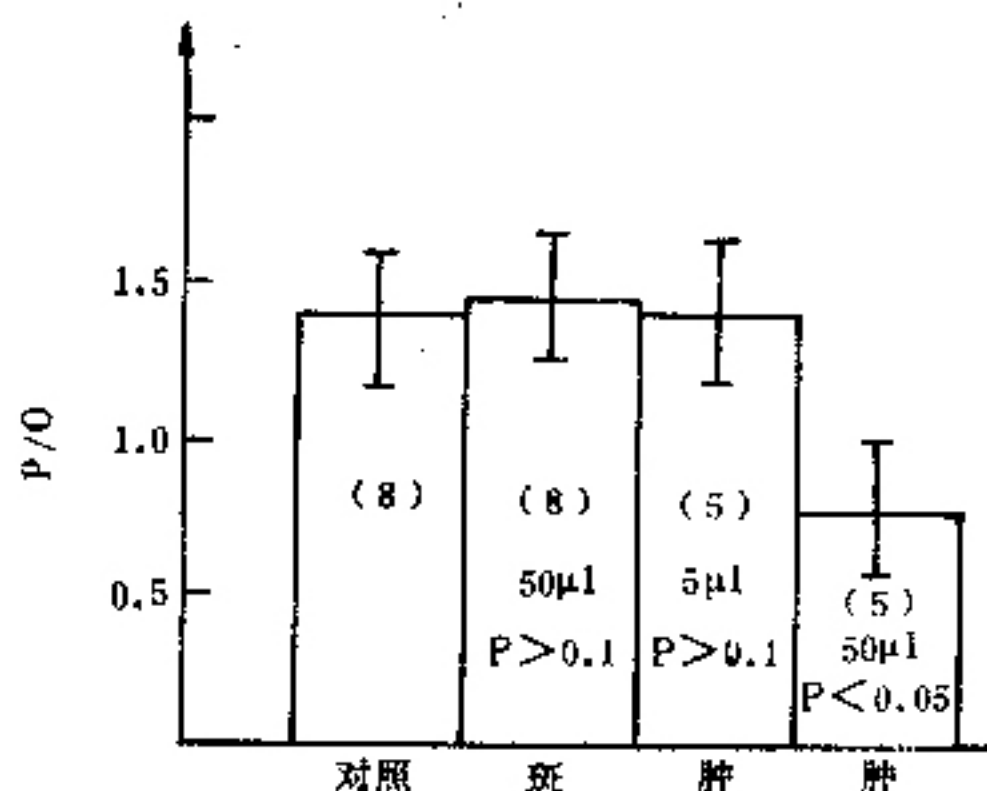


图4-b 药物对癌细胞线粒体P/O的影响

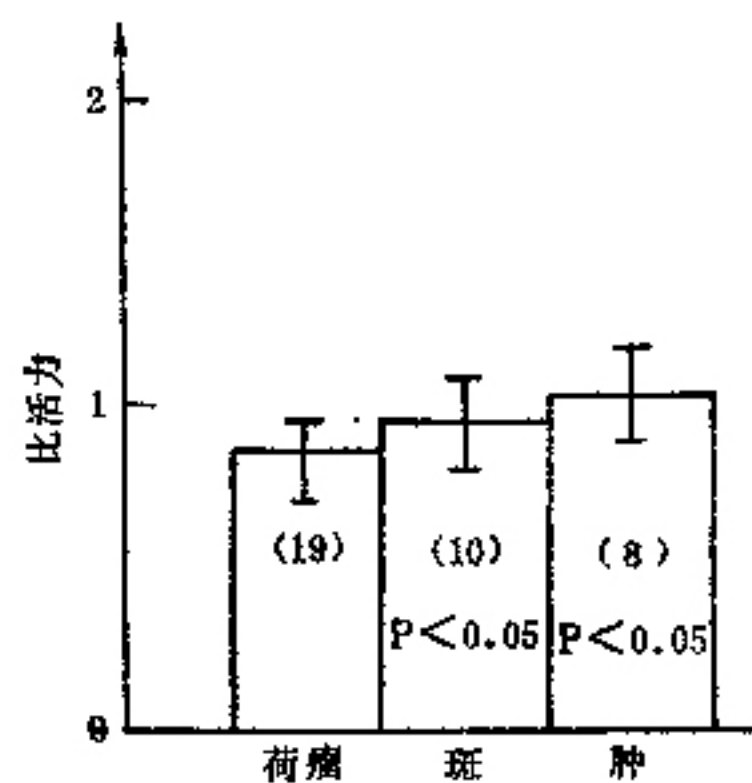


图5-a 药物对癌细胞琥珀酸脱氢酶活力的影响

二、关于环核苷酸代谢

1. 斑蝥酸钠对荷瘤鼠肝的影响:荷瘤鼠肝中cAMP、cGMP水平,cAMP/cGMP比值及cADP、cGDP活力与正常鼠肝相比均无显著差异,荷瘤小鼠注射斑蝥酸钠后,其肝组织中的cAMP含量比治疗前升高56%,cGMP含量下降31%,cAMP/cGMP比值升高83%,见表1。

2. 斑蝥酸钠对H22肝癌细胞的影响:小鼠肝癌

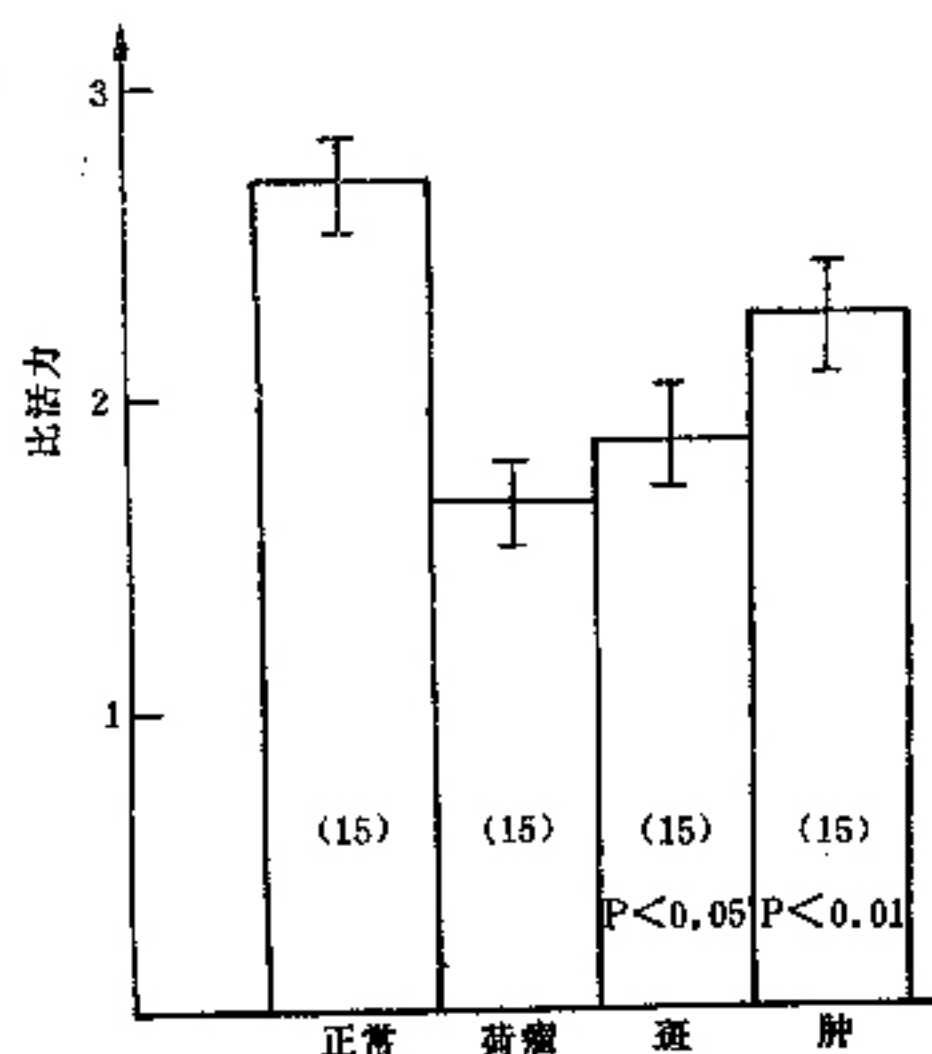


图5—b 药物对荷瘤鼠肝琥珀酸脱氢酶活力的影响

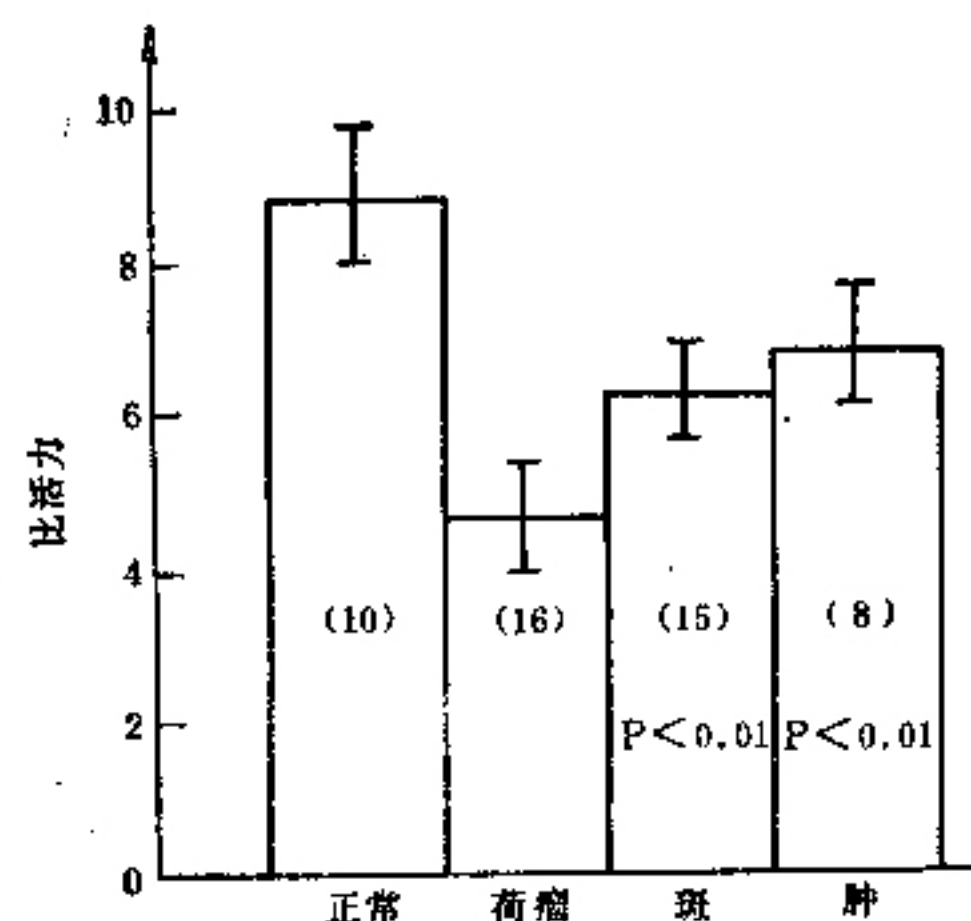


图6 药物对荷瘤鼠肝过氧化氢酶活力的影响

表1 斑螋酸钠对荷瘤鼠肝的影响(M±SD)

	pmol/g鲜肝				cAMP/cGMP		pmol/min/mg蛋白质			
		cAMP		cGMP			cAPD (低Km)		cGPD	
正常组鼠肝	(17)	962±191	(16)	41±19	(14)	23±9	(8)	290±180	(8)	1430±830
荷瘤组鼠肝	(20)	1088±428	(21)	49±16	(21)	30±11	(6)	200±90	(8)	1280±390
荷瘤给药组鼠肝	(17)	1703±955*	(7)	34±9**	(6)	55±17***	(6)	230±50	(6)	1390±320

注: (1)△表示荷瘤组与正常组比较之P值<0.001。(2)*表示荷瘤给药组与荷瘤组比较之P值<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。(3)无标记者表示无显著差异(P>0.05)。(4)()为鼠数。(5)下同

表2 斑螋酸钠对H22癌细胞的影响(M±SD)

	pmol/g鲜肝				cAMP/cGMP		pmol/min/mg蛋白质			
		cAMP		cGMP			cAPD (低Km)		cGPD	
正常组鼠肝					(14)	23±9	(8)	290±180	(8)	1430±830
荷瘤组癌细胞	(16)	420±230	(15)	31±9	(15)	13±8△	(9)	170±90	(8)	1040±590
荷瘤给药组癌细胞	(12)	760±310**	(17)	13±5***	(12)	38±29**	(8)	12±8***	(6)	620±220

细胞的cAMP/cGMP比值为正常肝细胞的43.5%。斑螋酸钠明显抑制癌细胞的cAPD活性,使其活力比药物治疗前下降92.9%,药物治疗还使cAMP含量提高81%,cAMP/cGMP比值上升192.3%(见表2)。

讨 论

斑螋酸钠和肿节风对癌细胞和荷瘤肝的耗氧能力

有直接的抑制作用,可以认为它们是有有效的呼吸抑制剂,细胞呼吸被抑制,在降低细胞产能、阻止细胞的分裂方面起重要作用。

琥珀酸脱氢酶是三羧酸循环的关键酶,癌细胞及荷瘤鼠肝此酶活力的降低反映了癌组织有氧氧化能力的下降。两药能促使此酶活力趋向正常化,表明它们有使癌组织恢复巴斯德效应的趋势。

过氧化氢对大多数组织是一种毒物,它能氧化磷脂分子中不饱和脂肪酸生成过氧化物,使磷脂功能障碍,对生物膜造成损伤,使线粒体氧化磷酸化的偶联受到影响。过氧化氢酶活力的变化已被作为测定癌毒激素含量的指标⁽¹⁵⁾。两药能提高荷瘤鼠肝过氧化氢酶活力,表明它们能降低机体内癌毒激素的含量,有利于对癌变产生 H_2O_2 的解毒作用。这对缓解和控制肿瘤是很重要的。

线粒体的呼吸控制率就是指磷酸化对氧化的反馈控制,从检验线粒体结构和功能的完整性来考虑,RCR比P/O更为灵敏。两药能明显增加癌细胞线粒体的RCR,所以它们对能量代谢的恢复是有调理作用的,对能量代谢的调理作用是控制和缓解癌变的重要途径之一,这一调理作用可能是因为药物影响了线粒体膜的通透性,有利于质子电化学梯度的形成。其作用机制有待进一步探讨。

高浓度的肿节风使线粒体的呼吸控制大大下降,这可能因为肿节风成分包括有机酸、挥发油、总黄酮三种,大剂量时有活血、生热等人参样作用,而表现呼吸控制减少。有些中药含多种成分,尤其是复方,各成分间的相互影响很复杂,不同剂量时对代谢的影响也不相同,这些问题尚待进一步探讨。

许多类型的癌细胞内cAMP水平低于正常细胞,cAMP和cGMP常表现出相反的生理作用,这些生理过程的抑制或加强与细胞中cAMP与cGMP含量的比值有关,已证明细胞中环核苷酸水平的异常往往是由于与其代谢有关的酶活性发生变化所致。某些学者认为一些药物就是通过调节细胞内的环核苷酸代谢,提高癌细胞中cAMP水平而发挥抗癌作用的^(2,4)。

水解环核苷酸的磷酸二酯酶具有不同的同功酶形式。有实验证明几种肿瘤中低 K_m 的cAPD活性都有升高,因此Weiss等认为cAPD的低 K_m 形式负责细胞内cAMP的基础水平⁽⁴⁾。

我们的实验结果表明小鼠癌细胞的cAMP/cGMP比值只为正常肝细胞的一半。斑蝥酸钠可以明显提高小鼠H22肝癌细胞内的cAMP含量,使cAMP/cGMP比值相应提高,同时明显抑制cADP(低 K_m)的活力,说明cAMP的提高很可能由于cAPD受抑制的结果。还需要考虑药物对环化酶和蛋白激酶的可能作用,对膜通透性的影响等各方面可能影响cAMP水平的因素。

在正常鼠肝与荷瘤鼠肝内所测定的有关环核苷酸代谢的各项指标均无明显差异,这可能与小鼠虽携有癌腹水,但肝脏本身并未发生癌变有关。

我们的实验结果也反映了斑蝥酸钠对荷瘤鼠肝中

环核苷酸水平及磷酸二酯酶活力的不同影响。肝脏是具有整体调节功能的器官,斑蝥酸钠对肝组织有影响,说明它可能对整体代谢起着某种调节作用,这种作用很可能也构成了抗肿瘤机制的一部分。

参 考 文 献

1. Gosalvez N, et al. Effect and specificity of anticancer agents on the respiration and energymetabolism of tumor cells. *Cancer Treatment Report* 1976; 60:1.
2. 王振纲. 环核苷酸的研究近况. *国外医学·中医中药分册* 1981; (2): 1.
3. Hickie AR, et al. Increased activity of low- K_m cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase in plasma membrane of Morris Hepatoma 5123tc(h). *Cancer Res* 1975; 35(3):601.
4. Weiss B, et al. Selective cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors as potential therapeutic agents. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1977; 17:441.
5. Lowry OH, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265.
6. WW恩布赖特,等(姚侃等译). 检压技术. 北京: 科学出版社, 1961:10—16.
7. 中国科学院生物物理研究所线粒体研究小组编. 线粒体的分离与活性测定. 北京: 生物物理所, 1980: 1—16.
8. Lessler MA. Oxygen electrode measurements in biochemical analysis, in: Glick D, ed. *Methods of Biochemical Analysis*. New York: John Wiley and sons 1969; 17: 1.
9. 汪静英,等. 琥珀酸脱氢酶的研究. *生理学报* 1966; 20(2):81.
10. 藤井节郎. 癌毒素—トキソホルモン—に関する研究法. 见: 山村雄一監修, *医化学实验法讲座*. 东京: 中山书店, 1973:370—372.
11. Steiner LA. Assay of cyclic nucleotide by RIA, in: *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press. 1974; 38(c):96.
12. Brooker G, et al. Radioimmunoassay of cAMP and cGMP. *Adv in cyclic nucleotide Res* 1979; 10: 1.
13. 刘景生,等. 环鸟苷酸(cGMP)放射免疫测定法. *中国药理学报* 1981; 2(1):67.
14. Thompson WJ. Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterase with radioactive substrates. in: *Methods in Enzymology* 1974; 38(c):205.
15. 松尾雄志. トキソホルモンとして肝臓の酵素の变动. 见: 堀尾武一編, *癌と宿主*. 东京: 南江堂, 1973:219—222.

The Effect of Sodium Ferulate on Complement-Activated Hemolysis

Feng Liming (冯立明), Li Caihua (李彩华), Pan Huazhen (潘华珍), *Zhang Zhinan (张之南)

*Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences; *Beijing Union Hospital, Beijing*

Sodium Ferulate (SF) is one of the ingredients derived from *Radix Angelicae Sinensis* and *Rhizoma Ligustici* Chuanxing. Red blood cells from normal persons or paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients were incubated with SF and the effect of SF on Cobra Venom Factor (CoF) hemolysis test, activation of complement (C_3), the binding of C_{3b} with red blood cell membrane and red cell deformability was observed. The result revealed that SF could definitely reduce the hemolysis induced by CoF and the binding of C_{3b} to red cell membrane was decreased, but no influence on the activation of complement through alternate pathway or effect on red cell deformability was observed. The mechanism of action was briefly discussed. (Original article on page 681)

Observation on Inhibitory Actions of Tanshinone on Leukocyte Chemotaxis

Gao Jiyan (高骥媛), et al

Department of pathophysiology, China Medical University, Shenyang

As has been demonstrated by a series of clinical practices and experimental researches, Tanshinone (ether extract from the root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge) possesses antibiotic and antiinflammatory actions. However it has not been reported whether Tanshinone has inhibitory action on leukocyte chemotaxis in vitro. This paper reports the observation of actions of Tanshinone on leukocyte random locomotion and chemotaxis in vitro by agarose plate assay for elucidation of Tanshinone's action. The results shows though human leukocytes chemotaxis was inhibited when Tanshinone (50 ng/ml) and leukocytes suspensions (10^7 /ml) preincubated for 1 hour at 37°C, random locomotion showed no changes. When action of Tanshinone on leukocytes lasted 19 hours, both chemotaxis and random locomotion were inhibited by Tanshinone with the same concentration. The results demonstrate and confirm the antiinflammatory action and mechanism of Tanshinone. (Original article on page 684)

Effect of Disodium Cantharidate and Injectio Herbae Sar Candrae on Energy and Cyclic Nucleotide Metabolism in Hepatoma 22 Cells and Liver Tissues of Tumor-Bearing Mice

Zhang Yinghua (张英华), *Chen Xing (陈兴), et al

Institute of Chinese Materia Medica, Academy of TCM;

**Department of Biology, Beijing Normal University, Beijing*

Effect of Disodium Cantharidate (DSC) and injectio herbae Sarcandrae on oxygen consumption, respiratory control ratio, oxidative phosphorylation efficiency, succinate dehydrogenase activity, catalase activity, cAMP and cGMP levels and phosphodiesterase activities in Hepatoma 22 cells and liver tissues of tumor-bearing mice were studied in vivo and in vitro.

The present data suggest that these two drugs are respiration inhibitors and can improve the energy metabolism of tumor cells and tumor-bearing mice. They also increase the catalase activity, showing a decrease in toxohormone level of these mice. The improvement of energy metabolism may be one of their ways to control or moderate carcinogenesis.

The cAMP/cGMP ratio was found much lower in Hepatoma cells than in livers of normal mice. It was also found that DSC not only elevated the intracellular cAMP level and cAMP/cGMP ratio, but also inhibited cAMP phosphodiesterase activity (low K_m) in Hepatoma cells. These results suggest that the antitumor mechanism of DSC may be partly due to modulating cAMP level by inhibiting the activity of cAMP phosphodiesterase.

(Original article on page 686)