

中药天花粉蛋白对黑色素瘤细胞 凋亡及细胞周期的影响*

毕黎琦 李洪军 张玉华

内容提要 **目的:**探讨中药天花粉蛋白纯化组分对黑色素瘤细胞增殖的抑制作用。**方法:**用流式细胞仪测定提纯的中药天花粉蛋白有效组分对小鼠黑色素瘤细胞体外培养过程中细胞 DNA 合成、细胞周期及细胞凋亡的影响。**结果:**天花粉蛋白纯化组分可引起小鼠黑色素瘤细胞 G_0/G_1 期细胞增加, S 期细胞减少, 呈现 G_0/G_1 期阻滞现象。并有诱导细胞凋亡作用, 而且 G_0/G_1 期阻滞与细胞凋亡高度相关($r=0.8705$)。**结论:**天花粉蛋白纯化组分可通过抑制黑色素瘤细胞 S 期 DNA 合成、抑制瘤细胞分裂增殖以及诱导瘤细胞凋亡来达到抑瘤作用。

关键词 天花粉蛋白 黑色素瘤 细胞凋亡 细胞周期 流式细胞术

Effect of Trichosanthin of Cell Cycle and Apoptosis of Murine Melanoma Cells Bi Liqi, Li Hongjun, Zhang Yuhua *The Third Teaching Hospital, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun(130031)*

Objective: To study the inhibitory effect of purified trichosanthin component on the proliferation of malignant melanoma. **Methods:** The effect of purified trichosanthin component on the DNA synthesis, cell cycle and cell apoptosis of murine melanoma cells were detected by flowcytometry when cultured in vitro. **Results:** The significant G_0/G_1 phase arrest was revealed by the increase of cells in G_0/G_1 phase and decrease of cells in S phase. The obvious apoptosis of melanoma cells was induced by purified trichosanthin component. G_0/G_1 phase arrest was highly correlated with apoptosis ($r=0.8705$). **Conclusions:** The purified trichosanthin component can markedly inhibit melanoma cells by the suppression of DNA synthesis in S phase and cell mitosis as well as induction of cell apoptosis.

Key words trichosanthin, melanoma, apoptosis, cell cycle, flowcytometry

中药天花粉蛋白(Trichosanthin, TCS)是从枯萎根块中提取的一种高分子植物蛋白。它有抑制艾滋病病毒(HIV)增殖、抑制肿瘤、引产及对人体免疫功能的影响等多方面的作用⁽¹⁻³⁾, 已引起国内外学者的广泛重视。本研究应用天花粉蛋白有效组分首次对小鼠黑色素瘤细胞的作用, 并对不同提取组分进行比较, 以估测其用于肿瘤治疗的前景。

资料和方法

1 材料

1.1 小鼠黑色素瘤细胞株(B16 细胞株)由日本引进, 在 RPMI-1640(含 10% 小牛血清), 5% CO_2 培养箱中培养, 细胞传至第三代, 达指数生长期, 状态最佳时做实验。

1.2 天花粉蛋白有效组分 本院从新鲜枯萎根块中提取, 将提取出的无色透明粗提品(电泳显示 4 条带)及纯化组分(电泳显示 1 条带)分别用于本实验。天花粉蛋白针剂购自上海金山制药厂。RNA 酶: 购自上海生化药厂, 所用浓度为 0.02mg/ml。碘化丙啶(PI): 购自 Sigma 公司, 所用浓度为 50 μ g/ml。

2 方法

2.1 细胞周期测定 取 24 孔培养板, 每孔置入生长良好的小鼠 B16 细胞 1×10^6 个, 将孔分成 5 组, 每组 3 个样本, A 组: 不加天花粉蛋白的空白对照; B 组: 加入天花粉蛋白纯化组分, 50 μ g/孔; C 组: 加入天花粉蛋白纯化组分, 100 μ g/孔; D 组: 加入天花粉蛋白粗提品 50 μ g/孔; E 组: 加入天花粉蛋白针剂 50 μ g/孔。每孔反应总容量 1ml。置 37 $^{\circ}C$, 5% CO_2 孵箱中培养 24h, 结束时, 向各孔加入 RNA 酶 1ml, 再培养 30min, 再加入 PI 1ml, 在室温避光染色 30min, 用流式细胞仪测定细胞 G_0/G_1 期、S 期及 $G_2 + M$ 期细胞百分数的变化, 分析每孔 2×10^5 个细胞。

* 国家中医药管理局及吉林省科委基金资助课题(No. 93Y123 及 943548-3)

白求恩医科大学第三临床学院(长春 130031)

2.2 细胞凋亡测定 将生长良好的小鼠 B16 细胞置入 24 孔板,每孔 1×10^5 个细胞,将孔分成 3 组,分组及实验方法与 2.1 中的 A、B、C 组相同,每组 3 个样本。由于细胞凋亡过程中,细胞核 DNA 降解成寡聚核小体,因此凋亡细胞在 G_0/G_1 峰前形成一个峰,该峰可用于细胞凋亡的定量分析。采用 Cellfit 软件可一次性测量细胞凋亡和细胞周期⁽⁴⁾。分析每孔 2×10^5 个细胞。统计分析采用 t 检验。

结 果

1 天花粉蛋白各组分对小鼠黑色素瘤细胞周期的影响 见表 1。

表 1 天花粉蛋白各组分对小鼠 B16 细胞周期影响的比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	G_0/G_1 期	S 期	$G_2 + M$ 期
A	73.90 ± 1.85	26.23 ± 1.87	1.46 ± 0.21
B	$81.46 \pm 2.56^*$	$18.53 \pm 2.56^*$	1.60 ± 0.32
C	$86.20 \pm 1.67^{**}$	$13.50 \pm 1.82^{**}$	1.70 ± 0.17
D	79.96 ± 7.91	20.33 ± 6.77	1.59 ± 0.44
E	76.00 ± 2.52	23.96 ± 2.57	1.52 ± 0.24

注:与 A 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 每组 3 个样本

各组加入不同组分天花粉蛋白后,与 A 组比较,S 期 B16 细胞百分数均有所减少, G_0/G_1 期细胞百分数均有所增加,其中以 C 组变化最明显,其次为 B 组及 D 组,E 组无明显变化。表明只有天花粉蛋白纯化组分具有抑制 B16 细胞增殖作用,而大剂量($100\mu\text{g}$)比小剂量($50\mu\text{g}$)作用更为明显。

2 不同剂量天花粉蛋白纯化组分在不同时间点对小鼠黑色素瘤细胞凋亡的影响 见表 2。

表 2 天花粉蛋白纯化组分对 B16 细胞凋亡的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	细胞凋亡	
		24h	48h
A	3	27.35 ± 2.78	10.08 ± 3.15
B	3	28.20 ± 5.93	$16.37 \pm 3.54^*$
C	3	$54.17 \pm 0.97^{***}$	$21.94 \pm 3.52^{**}$

注:与 A 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

天花粉蛋白纯化组分 B 组($50\mu\text{g}$)及 C 组($100\mu\text{g}$)均有诱导 B16 细胞凋亡的作用,C 组($100\mu\text{g}$)在 24h 作用最强。48h 时,两组均出现 B16 细胞凋亡,而以剂量较大的 C 组为明显。

统计分析表明,小鼠黑色素瘤细胞在天花粉蛋白作用下, G_0/G_1 期阻滞与细胞凋亡高度相关, ($r = 0.8705$)。

讨 论

黑色素瘤是一种恶性度很高的肿瘤,由于其增长速度快、转移早,对放疗抵抗,对化疗不敏感,故 5 年生存率仍很低。因此寻找有效的治疗药物是目前急需研究的课题。本研究显示,天花粉蛋白对小鼠黑色素瘤细胞有明显抑制作用,可使 G_0/G_1 期细胞增加,而 S 期细胞减少,呈现明显的 G_0/G_1 期阻滞现象,表明天花粉蛋白可明显抑制小鼠黑色素瘤细胞 S 期 DNA 合成,干扰蛋白质代谢,从而抑制瘤细胞的分裂增殖。用天花粉蛋白纯化组分进行细胞凋亡研究显示,作用 24h 和 48h 均出现明显细胞凋亡现象,以较大剂量作用 24h 诱发凋亡最为明显。以上研究证明,天花粉蛋白纯化组分对小鼠黑色素瘤细胞的抑制作用是通过干扰瘤细胞增殖及诱发瘤细胞凋亡来实现的。

我们研究发现,枯萎中可提取出分子量不同的几种蛋白组分,各组分的作用不尽相同(具体作用另文报道),本结果显示具有明显抑制小鼠黑色素瘤细胞生长作用的是其中的纯化组分,在剂量为 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 时诱导细胞凋亡及抑制细胞 S 期 DNA 合成作用最强,粗提品(含纯化组分)作用稍差,临床用于引产的针剂无明显抑瘤作用。

有报告肿瘤的发生与细胞凋亡的调节紊乱有密切关系⁽⁵⁾。Song 等发现肿瘤促进剂明显地抑制细胞凋亡,进一步证实凋亡与肿瘤发生的关系⁽⁶⁾,并认为调节细胞凋亡的基因是癌基因。因此,提出肿瘤化疗的新目标是诱导细胞凋亡。天花粉蛋白纯化组分不仅可抑制黑色素瘤细胞分裂增殖,而且可明显诱导瘤细胞凋亡。另一方面,天花粉蛋白还可通过改变不同功能的免疫调节 T 细胞的比例(增加辅助诱导 T 细胞数),而增进机体免疫功能⁽⁷⁾,这也是其抗肿瘤作用的一个方面。从中医角度讲,天花粉蛋白具有扶正、祛邪双重功效。提示天花粉蛋白可能成为一种很有前途的抗肿瘤新药。

参 考 文 献

1. Mayer RA, Sergios PA, Coonan K, et al. Trichosanthin treatment of HIV-induced immune dysregulation. Eur J Clin Invest 1992;22(2):113—122.
2. Wang QC, Ying WB, Xie H, et al. Trichosanthin-mono-clonal antibody conjugate specifically cytotoxic to human hepatoma cells in vitro. Cancer Res 1991;51(13):3353—3355.
3. 郭 峰,刘小平,徐 瑛. 天花粉对小鼠艾氏腹水癌的疗效和对红细胞免疫功能的影响. 中西医结合杂志 1989;9(7):418—420.

4. 苏旭, 张迎春, 刘树铮. 胸腺细胞体外培养对细胞凋亡和细胞周期进程的影响. 白求恩医科大学学报 1995; 21(5): 447—448.
5. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. Lancet 1993; 341(15): 1251—1254.
6. Song Q, Baxter GD, Kovacs EM, et al. Inhibition of apoptosis

in human tumor cells by okadaic acid. J cell Physiol 1992; 153(3): 550—556.

7. 毕黎琦, 刘继文, 宋怡. 中药天花粉对免疫调节 T 细胞作用的研究. 中国中西医结合杂志 1994; 14(1): 18—20.

(收稿: 1997-01-12 修回: 1997-08-18)

射频消融术后综合征 1 例

张孟雄

病例简介 患者女性, 28 岁。阵发性心慌胸闷 11 年, 发作时无明确诱因, 自觉心慌、胸闷、气短、乏力等不适, 心率 140~220 次/min, 心脏未发现其他异常, 肝肾功能正常, 心电图示预激综合征 A 型。食道调搏示显性预激综合征 A 型; 房室折返性心动过速。电生理检查示显性预激综合征(左侧旁路); 房室折返性心动过速(左旁路前传 AVN 逆传)。经多种药物治疗无效, 于 1994 年 11 月 1 日在某医院于局麻下行射频消融术, 术中发现两条旁路, 射频打断两旁路, 诱发刺激未再出现预激波型。心电监护及心电图未见室上性心动过速(简称室上速)发作, Δ 波消失, P-R 间期 0.14s, 为正常心电图, 射频消融术成功。但患者术后心慌、胸闷、气短、乏力等症状仍未减轻并反复出现, 发作时心电图为窦性心动过速(简称窦速), 心率 110 次/min 左右, 多次复查心电图及 Holter 再未发现预激征的心电表现, 经安定类、 β -受体阻滞剂等多种药物及中医、针灸治疗效果欠佳。于 1995 年 1 月 5 日来诊。查体: T 36.5℃, P 116 次/min, R 20 次/min, BP 14/9kPa, 神志清楚, 颈软, 甲状腺不大, 心率 116 次/min, 律齐, 各瓣膜区未闻及病理性杂音, 肺部正常, 肝脾未触及, 肾区无叩击痛, 双下肢无浮肿。查胸片、肝功能, 血清钾、钠、氯、钙均正常, 心脏及腹部超声未见异常, T_3 、 T_4 及心肌酶谱检查均正常。心电图示窦速。诊断为射频消融术后综合征。中医属胸痹范畴。

治疗经过 1995 年 1 月 9 日开始用普萘洛尔每次 20mg, 每天 3 次口服; 地西洋片 5mg 每晚 1 次口服, 能量合剂、门冬氨酸钾镁、维生素 C 加入 10% 葡萄糖中静脉滴注, 治疗 2 周无好转。1 月 23 日, 改服美托洛尔每次 25mg, 每天 3 次。2 天后加至 50mg, 每天 3 次口服。同时服用自拟中药胸痹汤: 陈皮 10g 茯苓

10g 栝蒌 15g 丹参 20g 桂枝 10g 枳壳 10g 桔梗 10g 枣仁 15g 远志 10g 苏梗 15g 炙甘草 6g, 服此方 7 剂后, 症状消失, 即停中西药观察, 但间隔 3 周时复发。2 月 22 日再次服用上方中药和美托洛尔治疗, 7 剂为 1 个疗程, 服完第 2 疗程后症状消失, 为巩固疗效, 又服 7 剂, 中药每疗程间隔 3 天。美托洛尔仍按每次 50mg, 每天 3 次, 连续服用, 仅在服中药的最后 1 周, 每两天递减至 50mg 时, 按每天 25mg 维持 3 天, 并与中药同时停用, 治愈。随访 2 年无复发。

讨论 射频消融术是治疗房室旁路折返性心动过速的有效方法之一。本例术后心律由预激征并室上速转为窦速, 心室率亦由 140~220 次/min 减慢为 110 次/min 左右, 经诱发刺激也无多旁道径路存在, 证实预激征消失, 但患者又出现窦速, 且心慌、胸闷、气短等临床症状未减轻, 这种情况, 是否可诊断为射频消融术后综合征, 有待同行专家进一步商榷。笔者认为, 术后心率变异性的降低是由于射频电流损伤心脏迷走神经活性所致, 心脏迷走神经活性损伤时, 因抑制心脏活动的紧张性消失, 心率就加快。这可能是术后形成窦速的主要原因, 也是自觉症状不减轻的重要因素之一。中医学认为, 患者久病, 素有痰湿, 且胸阳不振, 痰湿难以运化, 停于胸中, 气机痹阻形成胸痹。采用中西医结合的方法治疗, 中医用祛湿化痰的胸痹汤, 方中苏梗、枳壳、栝蒌、陈皮、桔梗理气宽中, 通阳宣痹, 以化痰气郁结; 丹参、桂枝通心脉, 以振胸阳, 使气机通畅, 血脉调和, 茯苓健脾渗利水湿, 炙甘草补益心气调和诸药; 枣仁、远志宁心安神, 以助心慌、胸闷、气短诸证消失。美托洛尔选择性阻滞 β_1 受体, 减慢心率, 减慢房室传导, 临床用于窦房结折返、房室结折返或房室折返性心动过速时减慢心室率, 与中药胸痹汤合用, 可能会使损伤了的迷走神经功能得以恢复。