

·博士之窗·

豆长明 李继承

摘要 目的 研究栝蒌根提取(简称栝蒌根)物体外对 HeLa 细胞毒作用,探讨其抑癌作用机理。方法 用 MTT 法检测栝蒌根对 HeLa 细胞毒作用,扫描电镜和透射电镜观察细胞超微结构变化,DNA 琼脂糖凝胶电泳法检测其生化特征改变。结果 HeLa 细胞经栝蒌根作用 24~48h 后,细胞体外杀伤作用明显,呈量效、时效关系($r>0.880, P<0.01$) 电镜观察可见 HeLa 细胞表面微绒毛明显减少或消失,胞膜发泡,细胞核固缩,核染色质浓缩边集,并出现凋亡小体 细胞 DNA 经琼脂糖凝胶电泳可见典型的梯形带。结论 栝蒌根提取物对 HeLa 细胞具有良好的抗癌活性,其作用机制与诱导细胞凋亡相关。

关键词 栝蒌根提取物 HeLa 细胞 细胞凋亡

Preliminary Study on Effects of Trichosanthes Kirilowi Root on HeLa Cells DOU Chang-ming, LI Ji-cheng *Institute of Cell Biology, Zhejiang University, Hangzhou (310031)*

Objective : To investigate the cytotoxic effect of extracts of *Trichosanthes kirilowi* (TK) root on HeLa cells in vitro and its probable anti-tumor mechanism. **Methods** : The cytotoxic effect in vitro on the growth of HeLa cells was evaluated by microculture tetrazolium assay (MTT). Cell ultrastructural changes were examined by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM), and DNA agarose electrophoresis was performed to determine apoptosis and biochemical changes of HeLa cells. **Results** : Exposure of HeLa cells to TK extracts for 24 - 48 hrs resulted in a cell growth arrest, which showed in a time- and dose-dependent manner ($r>0.880, P<0.01$). With SEM and TEM, marked changes were observed, including microvilli disappearance or reduction, cell membrane vesiculation, cell shrinkage, condensation of chromosomes and apoptotic bodies with complete membrane. Besides, the apoptosis of HeLa cells was confirmed by typical DNA ladder formation on gel electrophoresis. **Conclusion** : Extracts of TK has a marked anti-tumor activity and could induce apoptosis of HeLa cells.

Key words extracts of *Trichosanthes kirilowi* root, HeLa cell, apoptosis

中药栝蒌(*Trichosanthes kirilowii* Maxim)为葫芦科多年生草质藤本植物,其根块提取分离出的一种高分子植物蛋白,即天花粉蛋白(trichosanthin, TCS),其药理作用已有系统深入的研究,但其对 HeLa 细胞的作用鲜见报道。本研究旨在探讨其根块提取物对 HeLa 细胞生长抑制作用及其可能机制,为药物的进一步开发提供实验依据。

材料与方法

1 药品与仪器 栝蒌根提取物由新鲜栝蒌根(2002 年 8 月采自浙江省杭州余杭区金山吊瓜种植基

地),经提取,冷冻干燥制得^[1](本实验样品所得产率为 0.77%)。使用时用培养液稀释,并过滤除菌。四氮唑蓝(MTT)为 FLUCA 公司产品;二甲基亚砜为无锡鸿声化工厂产品;RPMI 1640 培养基为 GIBCO 公司产品;小牛血清为杭州四季青生物制品产品;动物细胞 DNA 提取试剂盒为北京鼎国生物试剂公司产品;CO₂ 培养箱为 FORMA 公司产品;酶标仪为 Clinibio 公司产品;TECNAI 10 透射电子显微镜为 PHILIP 公司产品;STEREOSCAN 260 扫描电子显微镜为 CAMBRIDGE 公司产品;电泳仪为 E - C Apparatus Corporation 产品;DY-III 电泳槽为北京六一仪器厂产品;凝胶成像系统分析仪为上海天能科技有限公司产品。

2 细胞株 HeLa 细胞为本所保存细胞株。

3 HeLa 细胞敏感性检测 采用 MTT 法。取对数生长期细胞,在平底 96 孔细胞培养板上每孔加入

* 教育部博士点基金资助课题(No. J20020576)

浙江大学细胞生物学研究所(杭州 310031)

通讯作者 李继承 Tel 0571 - 87217139 E-mail lijie@mail. hz. zj. cn

1×10^5 细胞/ml $100 \mu\text{l}$, 加入不同浓度的枯萎根提取物 $100 \mu\text{l}$, 使其在细胞培养孔中的终浓度分别为 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$, 每个浓度及对照均设 4 个复孔。以加有细胞而不含药物的培养液孔为对照孔。 37°C 、 5% CO_2 培养箱培养 24h、36h、48h 后分别取出培养板, 弃上清, 每孔加入浓度为 $20 \text{mg}/\text{ml}$ 的 MTT $20 \mu\text{l}$, 继续培养 4h, 快速弃上清, 每孔加细胞溶解液二甲基亚砜 $100 \mu\text{l}$, 震荡 15min, 使 MTT 还原产物甲 (Formazan) 完全从胞内溶解出。最后用酶联免疫测定仪于 492nm 下测定各孔的 OD 值, 计算肿瘤细胞杀伤率。

细胞杀伤率 (%) = $(1 - \text{实验孔 OD 值} / \text{对照孔 OD 值}) \times 100\%$

4 细胞形态学电镜观察 取对数生长期细胞与不同浓度的枯萎根提取物共培养 48h, 按扫描电镜及透射电镜标本制作要求取材, 常规制样, 观察细胞超微结构变化。

5 细胞生化特征检测 不同浓度 ($500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$) 药物作用于细胞 (24~48h) 后, 提取其 DNA, 作琼脂糖凝胶电泳。DNA 提取按动物细胞 DNA 提取试剂盒使用说明书操作。样品 DNA 于 0.8% 琼脂糖凝胶, 75mA 恒流 $1.5 \sim 2 \text{h}$ 。电泳完毕, 在凝胶成像分析仪内观察、拍照。

6 统计学方法 用 SPSS 统计软件, 进行 t 检验。

结 果

1 枯萎根提取物对 HeLa 细胞的细胞毒作用 见图 1。枯萎根提取物对 HeLa 细胞具有较强的细胞毒作用。随着时间的延长、浓度的增加, 细胞毒作用明显加强, 呈良好的时效、量效关系 ($r > 0.880$, $P < 0.01$)。在同一作用时间内, 随枯萎根提取物浓度的增加, 细胞杀伤率随之增加; 而同一药物浓度, 作用时间越长, 细胞杀伤率越高。HeLa 细胞经枯萎根提取物 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 24h, 细胞杀伤率达 57.90% , 而作用 48h, 更可高达 89.41% 。

2 DNA 琼脂糖凝胶电泳 HeLa 细胞经 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 枯萎根提取物作用 24h 后, DNA 电泳可见阶梯形状 (ladder pattern); 48h 后 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 枯萎根提取物作用 DNA 梯形更趋明显, 但高浓度枯萎根提取物 ($500 \mu\text{g}/\text{ml}$) 作用组电泳谱呈涂片状 (smear), 说明凋亡细胞继发性坏死 (见图 2)。

3 细胞形态学观察 扫描电镜下可见, 药物作用 24~36h 后的细胞膜表面可见典型的细胞凋亡特

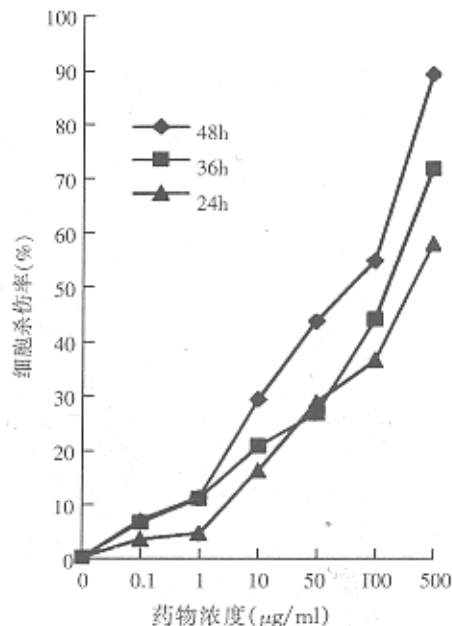


图 1 不同浓度的枯萎根提取物对 HeLa 细胞的杀伤作用

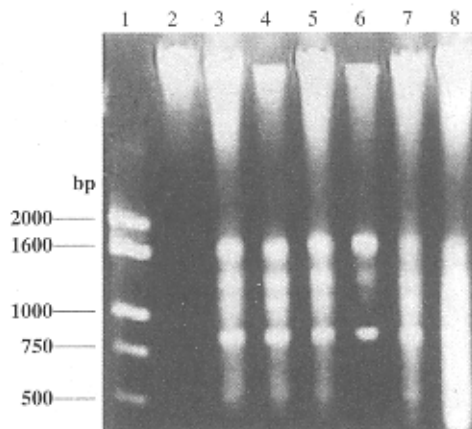


图 2 HeLa 细胞经枯萎根提取物作用后 DNA 片段分析

注: 1. Marker; 2. 正常对照; 3. $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 24h; 4. $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 24h; 5. $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 48h; 6. $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 24h; 7. $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 48h; 8. $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 48h

征, 即泡状突起, 微绒毛消失或基本消失, 并可见分离出的凋亡小体 (见图 3)。透射电镜下可见细胞体积缩小, 微绒毛消失, 核固缩, 染色质浓集靠近于核膜, 形成沿核膜收缩的新月状体, 可见具有完整膜性结构的凋亡小体的分离 (见图 4)。

讨 论

近年来, 从细胞凋亡角度探讨中药抗肿瘤机制及从天然药物中筛选抗癌药已成为研究热点。大量证据表明, 来源于传统抗癌中药的喜树碱、紫杉醇等抗癌机理均与诱导肿瘤细胞凋亡有关。目前, 新的抗癌中药陆续发现, 如蟾蜍灵、甘草提取物、小柴胡汤提取物、灵芝复方等都具有诱导细胞凋亡活性。已有研究表

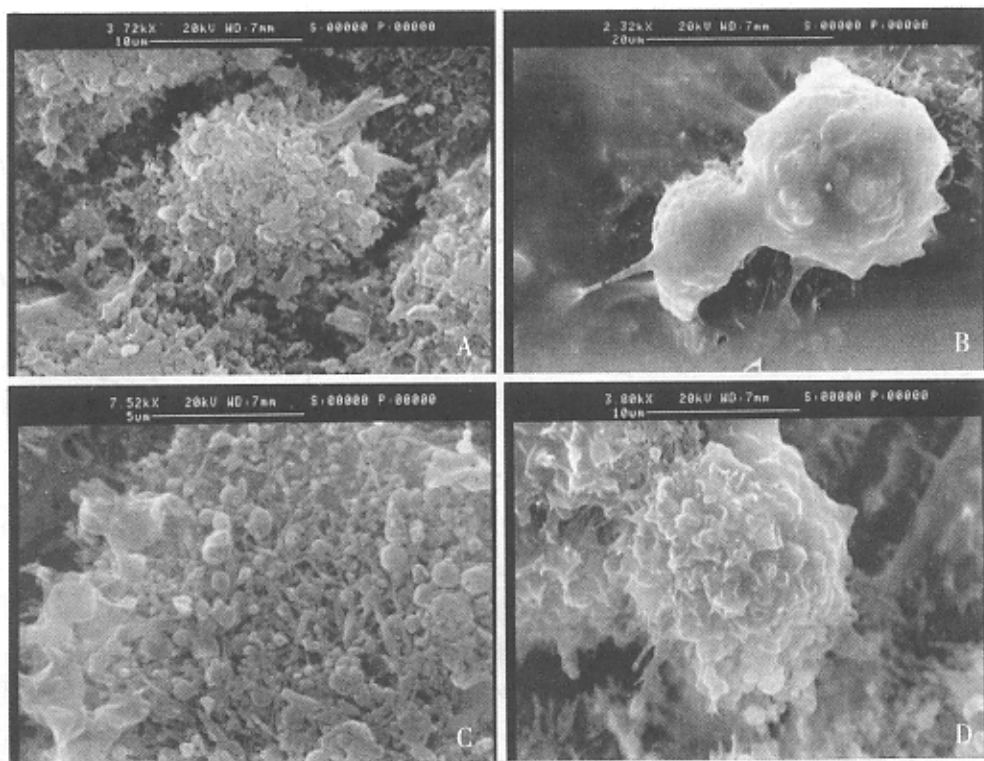


图 3 HeLa 细胞扫描电镜观察

注:A. 正常对照组 HeLa 细胞;B. 药物 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 36h 后 HeLa 细胞,微绒毛消失,膜发泡,并有凋亡小体分离;C. 正常 HeLa 细胞表面;D. 药物 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 24h 后 HeLa 细胞,膜表面微绒毛基本消失,并可见泡状突起

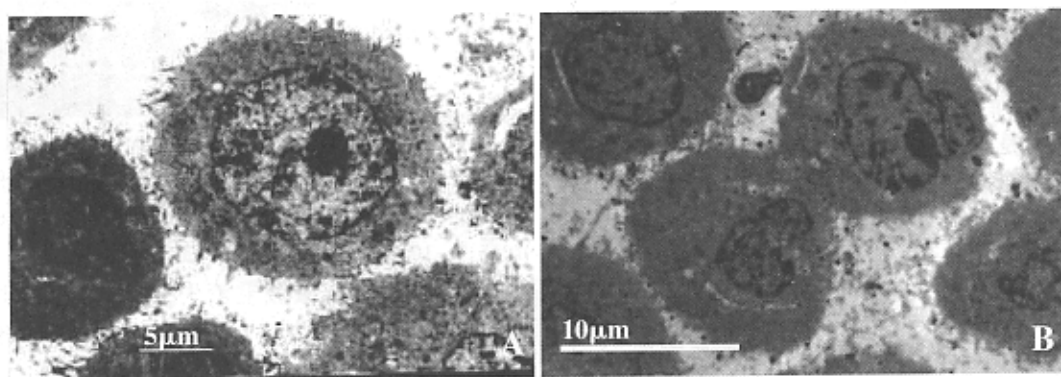


图 4 HeLa 细胞透射电镜观察

注:A. 正常对照组 HeLa 细胞;B. 药物 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 24h 后 HeLa 细胞,核固缩,染色质边集,并可见凋亡小体(↓)

明^[2],应用双光子及共聚焦激光扫描显微术结合特异性荧光探针 Hoechst 33342、2',7'-二氯荧光黄双乙酸酯(DCFH-DA)、Indo-1 和 Fluo3-AM,天花粉蛋白(trichosanthin, TCS)引起人绒毛癌细胞(JAR 细胞) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高和 ROS 形成,诱导 JAR 细胞凋亡。张曙等研究发现,天花粉蛋白在体外能诱导人胃癌细胞发生凋亡,下调 bcl-2 基因的表达^[3],上调野生型 p53 基因的表达^[4],同时,万寿菊对胃癌多药耐药细胞也有较强的细胞

毒和诱导凋亡作用^[5]。另外,天花粉蛋白对白血病细胞、黑色素瘤细胞凋亡均有诱导作用^[6,7]。

本实验探讨了枯萎根提取物对 HeLa 细胞生长抑制作用,并从凋亡角度定性检测其可能的作用机制。本研究证实,枯萎根提取物对 HeLa 细胞生长具有明显的抑制作用,并呈量效、时效关系。电镜下可观察到细胞凋亡典型形态学变化,细胞膜表面泡状突起,微绒毛明显减少或消失,细胞固缩,染色质浓集靠近于核膜,

形成沿核膜收缩的新月状体,并出现凋亡小体。细胞 DNA 经琼脂糖凝胶电泳呈典型的梯形带。本结果从细胞形态学和生物化学特征提示枯萎根提取物可诱导 Hela 细胞凋亡。

本研究所用枯萎为浙江省杭州余杭区金山吊瓜种植基地多年培育出的一新品种,其根所含多糖、蛋白等成分及其含量均高于普通枯萎。实验所得根提取物为天花粉蛋白粗品,其具体成分不详^[1]。但实验结果表明,该提取物具有良好的抗癌活性,诱导 Hela 细胞发生凋亡。至于枯萎根提取物中引起抗癌活性作用的具体成分及其抗癌活性与诱导细胞凋亡详细内在机制,还有待进一步研究。当前,国内枯萎资源丰富,但其多运用于计划生育,其药物的潜在价值未得到充分研究与开展,这一点远远落后于发达国家。因此,对其深入研究,对于枯萎的潜在药物价值的研究开发具有深远意义。

参 考 文 献

1 汪 猷.天花粉蛋白.第 2 版.北京:科学出版社,2000:21—

23.

2 Zhang C, Gong YX, Ma H, et al. Reactive oxygen species involved in trichosanthin-induced apoptosis of human choriocarcinoma cells. Biochem J 2001 ;355(Pt 3):653—661.

3 张 曙,胡梅洁,吴裕忻,等.天花粉蛋白诱导的胃癌细胞凋亡与 bcl-2 表达下降有关.中华消化杂志 2000 ;20(6):380—382.

4 孙 ,涂水平,吴裕忻,等.天花粉蛋白诱导胃癌细胞 MKN-45 凋亡中 p53、bcl-2、c-myc 蛋白表达变化.上海医学 2001 ;24(5):292—294.

5 涂水平,江石湖,乔敏敏,等.天花粉蛋白对胃癌多药耐药细胞的细胞毒和诱导凋亡作用.世界华人消化杂志 2000 ;8(2):150—152.

6 Zheng YT, Zhang WF, Ben KL, et al. In vitro immunotoxicity and cytotoxicity of trichosanthin against human normal immunocytes and leukemia-lymphoma cells. Immunopharmacol Immunotoxicol 1995 ;17(1):69—79.

7 毕黎琦,李洪军,张玉华.中药天花粉蛋白对黑色素瘤细胞凋亡及细胞周期的影响.中国中西医结合杂志 1998 ;18(1):35—37.

(收稿 2003-02-30 修回 2003-07-06)

《中国中西医结合杂志》第六届编委会名单

名誉总编 季钟朴

总 编 辑 陈可冀

副总编辑 沈自尹 肖培根 陈维养(常务)

顾 问 吴咸中 辛育龄 关幼波 邓铁涛 尚天裕 王永炎 侯 灿

编辑委员	马必生	王一涛	王书臣	王今达	王宁生	王 阶	王学美	王 佩	王宝恩
	王硕仁	王雪苔	尹光耀	史大卓	史载祥	刘干中	刘建勋	刘耕陶	刘猷枋
	危北海	匡调元	朱 兵	吕爱平	吕维柏	齐清会	孙 燕	李 恩	李乃卿
	李大金	李玉光	李连达	李廷谦	李国贤	李国栋	李鸣真	李顺成	李恩宽
	杨任民	杨秀伟	时毓民	陈士奎	陈小野	陈冬燕	陈香美	吴伟康	陆付耳
	张大钊	张之南	张永祥	张伯礼	张国玺	张亭栋	张荣华	张家庆	张梓荆
	林求诚	林志彬	林瑞超	郁仁存	周文泉	周 俊	周霭祥	金益强	赵伟康
	唐由之	顾振纶	郭赛珊	徐治鸿	梁晓春	黄晓愚	曹小定	葛秦生	谢宗万
	谢竹藩	董福慧	曾晓春	雷 燕	蔡定芳	裴正学	黎磊石	廖家桢	廖福龙
	戴瑞鸿								