

鲜壁虎冻干粉诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡的血清药理学研究

宋 萍 王学美 谢 爽 卜定方 富 宏 刘庚信

摘要 目的 探讨鲜壁虎冻干粉对 C6 胶质瘤细胞凋亡的影响。方法 将 30 只小鼠随机分为 3 组,分别给予顺铂腹腔注射,口服鲜壁虎冻干粉及口服等量蒸馏水。20 天后,取小鼠血清体外处理 C6 胶质瘤细胞。通过形态学分析、流式细胞仪及 TUNEL 法,观察细胞凋亡情况;S-P 免疫组化法检测细胞凋亡相关基因 bcl-2、bax 的表达水平。结果 形态学变化、流式细胞仪分析和 TUNEL 法结果均证实含鲜壁虎血清在体外可诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡;鲜壁虎组与空白对照组比较,细胞内的 bcl-2 基因表达无明显变化,bax 基因表达升高。结论 含鲜壁虎血清能够诱导细胞凋亡,其机制可能与上调 bax 基因有关。

关键词 壁虎;C6 胶质瘤细胞;细胞凋亡;bcl-2;bax

Study on Sero-pharmacology of Fresh Gecko Swinhonis Gunther Freeze-dried Powder in Inducing Cell Apoptosis of C6 Glioma Cells in Mice SONG Ping, WANG Xue-mei, Xie Shuang, et al *The First Hospital of Peking University, Beijing (100034)*

Objective To explore the effect of Gecko Swinhonis Gunther freeze-dried powder (GFP) in inducing apoptosis of C6 glioma cells. **Methods** Thirty mice were randomly divided into three groups and treated with intraperitoneally injection of cisplatin, orally taken GFP or distilled water respectively. After treatment for 20 days, the serum of mice was collected for treating the C6 glioma cells. The apoptosis state of cells was observed by morphological examination, flow cytometry and TUNEL method, and the cell apoptosis related gene expression of bcl-2 and bax were determined by S-P immunocytochemical assay. **Results** The C6 glioma cell apoptosis induction of GFP contained serum in vitro could be confirmed by morphological examination, flow cytometry analysis and TUNEL method. Comparison between the GFP treated group and the blank control group on intracellular bcl-2 gene expression showed no difference, but bax gene expression was higher in the GFP treated group. **Conclusion** GFP contained serum could induce C6 glioma cell apoptosis, its mechanism might be related with the up-regulation of bax gene.

Key words gecko Swinhonis Gunther, C6 glioma cell; cell apoptosis; bcl-2; bax

动物药,作为一种天然药物,已经逐渐成为近年来抗肿瘤研究的热点。美国学者已从鲨鱼软骨中分离出血管生成抑制因子,并已经进入临床研究阶段^[1]。同时,我国学者研究发现,蛇毒具有抑制肿瘤细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用^[2]。

壁虎在临床中主要用于治疗恶性肿瘤、淋巴结核、慢性痿管、骨髓炎、血栓性脉管炎,对肝癌、白血病、癌性疼痛等方面效果尤为突出。但是,壁虎抑制肿瘤细胞的机制尚不清楚。我们采用血清药理学方法,在体外用含鲜壁虎冻干粉的血清,作用于 C6 胶质瘤细胞,

观察了其对肿瘤细胞凋亡的影响。

材料与方法

1 主要药品与试剂 鲜壁虎(Gecko Swinhonis Gunther)冻干粉由北京雅泉中药研究所提供。C6 胶质瘤细胞株由中国医学科学院神经外科研究所提供;顺铂购自齐鲁制药厂;IMDM 培养基,胰蛋白酶购自美国 GIBCO 公司;胎牛血清购自中国医学科学院血液研究所;碘化丙啶(PI)为美国 SIGMA 公司产品;TUNEL 试剂盒购自宝灵曼公司;兔抗小鼠 bcl-2, bax 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

2 鼠血清制备 30 只雄性昆明小鼠(由北京大学实验动物中心提供),体重(30±2)g,随机分成 3 组。顺铂组,腹腔注射顺铂 1mg/kg,每 4 天 1 次;壁虎组,

基金项目:国家中医药管理局基金(No. 04-05ZT04)

作者单位:北京大学第一医院(北京 100034)

通讯作者:王学美, Tel: 010-66551122 转 3053, E-mail: wangxue-meif64@sohu.com

将鲜壁虎冻干粉 36mg 溶于 0.5ml 蒸馏水中,每日灌胃;空白对照组,每日灌胃 0.5ml 蒸馏水。连续给药 20 天。在末次给药后 3h,下腔静脉采血,4℃ 下静置 2h,3 000r/min,离心 10min,取上清,0.22μm 膜过滤除菌,-20℃ 冰箱保存备用。

3 细胞的形态学检测 C6 胶质瘤细胞培养 48h,用各组血清处理 72h,取 50μl 离心至载玻片,采用 Giemsa 染色,在光学显微镜下观察细胞形态的变化。余细胞收集后,D-Hank's 缓冲液清洗 2 次,以 2.5% 戊二醛,1% 锇酸双固定,用 Epon812 常规方法包埋,制成半薄切片,甲苯胺蓝染色,光镜下定位。LKB-5 型超薄切片机切片,铀-铅双染色,透射镜下观察。

4 流式细胞仪检测凋亡率 细胞处理如上。将细胞收集后,D-Hank's 缓冲液清洗 2 次,用 70% 冷乙醇固定 24h。细胞再次清洗后,加入 Rnase A (10mg/ml)和 PI(2 mg/ml),37℃ 避光反应 30min,用流式细胞仪检测凋亡率,数据资料以 Cell Quest 软件分析。

5 TUNEL 检测细胞凋亡率 按照试剂盒说明步骤操作。随机选取 5 个高倍镜视野(>1 000 个细胞),在光镜下分别计数凋亡细胞数和总细胞数,计算凋亡率。凋亡率=(凋亡细胞数÷总细胞数)×100%。

6 对 bcl-2,bax 基因蛋白表达的影响 采用 S-P 免疫组化法。分别用 3 组 10% 的血清处理细胞 72h 后,将细胞收集,PBS 洗 2 次,离心至载玻片。用预冷的丙酮固定细胞 15min,PBS 洗片后,与 0.3% H₂O₂ 甲醇溶液于室温下孵育 30min,阻断内源性过氧化物酶,然后用 0.1% TritonX-100 作用 20min 通透细胞。PBS 冲洗 2 次,样品加入封闭血清放置 1h,甩去血清,加一抗(稀释浓度均为 1:100),4℃ 过夜。次日 PBS 洗片后,滴加有生物素标记的二抗(1:100),30min 后加入辣根过氧化物酶标记的链霉素亲和素,作用 30min,DAB 显色,苏木素复染,封片。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

7 统计学方法 采用 SAS 6.0 软件进行分析。多组间数据比较,采用方差分析。两两比较采用 *t* 检验。

结 果

1 形态学观察 壁虎组和顺铂组含药血清处理 72h,细胞开始收缩变小,逐渐由长梭形变短梭形,以至圆形,细胞间连接中断,胞浆内空泡增多,最后部分细胞漂浮。光镜下,观察到细胞皱缩,细胞膜无明显异常,胞浆出现大量空泡变性,核固缩浓染及凋亡小体形成。电镜下,核的变化突出,而细胞器未见明显损伤。

细胞核表现为染色质边集、核固缩、核碎裂,可见胞膜包绕核碎片形成的凋亡小体。空白对照组血清处理后,在形态学上没有明显变化。

2 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率比较 血清浓度均为 10% 的情况下,72h 后顺铂组的细胞凋亡率最高,为(47.37±4.97)%,其次壁虎组,为(36.86±3.19)%,与胎牛血清组比较,差异有显著性(*P*<0.01)。空白对照组细胞凋亡率与胎牛血清组比较,差异无显著性(*P*>0.05)。见表 1。

3 TUNEL 检测细胞凋亡率比较 10% 壁虎血清作用 72h 的细胞凋亡率为 50.73% (*P*<0.01),顺铂组为 59.03% (*P*<0.01),空白对照组为 2.13%。空白对照组与胎牛血清组比较,细胞凋亡率无显著变化。见表 1。

表 1 各组细胞凋亡率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	细胞凋亡率	
		流式细胞仪	TUNEL
10% 胎牛血清	10	1.79±0.12	1.86±0.09
空白对照	10	2.12±0.07	2.13±0.08
10% 含壁虎血清	10	36.86±3.19*	50.73±4.79*
10% 顺铂	10	47.37±4.97*	59.03±5.30*

注:与 10% 胎牛血清组比较,**P*<0.01

4 对 bcl-2,bax 基因蛋白表达的影响 见表 2。10% 壁虎血清处理细胞 72h 后,bax 蛋白表达有显著升高(*P*<0.01),而 bcl-2 的表达与空白对照组比较差异无显著性(*P*>0.05)。

表 2 10% 含壁虎血清对 bcl-2,bax 蛋白表达的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	bcl-2	bax
空白对照	10	58.45±3.52	55.37±5.49
顺铂	10	60.32±4.98	88.72±3.85*
壁虎	10	56.63±4.71	81.68±3.92*

注:与空白对照组比较,**P*<0.01

讨 论

壁虎在临床应用时,通常取其干燥全体入药。曾有报道,壁虎含有多重蛋白质、肽类、18 种微量元素^[3]、17 种氨基酸^[4]。本实验结合“鲜者尤良”的理论,采用了鲜壁虎的冻干粉,减少了干燥过程中有效成分的丢失,使其药效能够得到充分地发挥。以鲜壁虎为主要成分的金龙胶囊突出的抗肿瘤效果,也验证了鲜动物药在临床上具有的显著疗效。我们曾经采用鲜壁虎的提取物直接作用于 C6 胶质瘤细胞,发现可以抑制肿瘤细胞的增殖,并可引起肿瘤细胞凋亡^[5]。但日本学者研究发现,有些中药粗制剂在体外有效,其含药血清却无效,可能是有效成分未被吸收或在代谢过程

中失活^[6]。而另一些中药,则是含药血清有效,但中药粗制剂却无效,考虑可能是药物经过消化后有效部位充分暴露或药物刺激机体产生的细胞因子变化所起的作用^[7]。因此,对中药这种多系统、多途径、多环节的药理作用的研究,采用血清药理学方法更具可靠性。

血清药理学方法,是 1988 年由日本学者首先提出的采用动物的含药血清进行体外实验的一种药理学实验方法^[8]。这种研究方法避免了中药粗制剂直接加入体外实验系统造成的干扰,又因含药血清能反映药物刺激后,体内各种细胞因子的变化,从而通过血清药理学研究的结果更加接近于体内的药理作用。此次我们采用含鲜壁虎冻干粉的小鼠血清处理 C6 胶质瘤细胞后,从形态学、流式细胞仪检查和 TUNEL 检测,均说明含壁虎冻干粉的小鼠血清能够诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡,与以往我们的研究结果一致。二者相结合,更加有力地证实了壁虎具有抑制 C6 胶质瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡的作用。

bcl-2 是一种胞内膜蛋白,主要在线粒体、光面内质网及核膜表达。在细胞凋亡的调控中,起抑制细胞凋亡的作用^[9]。bax 基因是 bcl-2 同源基因,其过表达可拮抗 bcl-2 的保护效应而使细胞走向凋亡^[10]。bcl-2 蛋白与 bax 蛋白的比值影响着细胞受到刺激后发生凋亡的比率。我们的实验结果表明,bax 基因蛋白的高表达可能是鲜壁虎诱导 C6 胶质瘤凋亡的重要分子机制。

尽管临床上疗效显著,但近 10 年来,关于其化学成分,研究较少。究竟哪种是发挥抗肿瘤作用的成分,需要进行药物化学方面的研究,此外是否是药物单独起作用,还是结合其他细胞因子的调节作用,有待于进一步论证。

参 考 文 献

- 1 Cho J, Kim Y. Sharks: a potential source of antiangiogenic factors and tumor treatments. *Mar Biotechnol* (NY) 2002;4(6):521—525.
- 2 叶春玲,张海伟,罗英儒,等. 中华眼镜蛇诱导 HL-60 细胞凋亡及其机制探讨. *中国药理学通报* 2003;19(2):177—180.
- 3 黄筱美. 蛤蚧与壁虎化学成分比较. *中成药研究* 1987;(2):29—30.
- 4 陈 明. 无蹠壁虎的薄层色谱与氨基酸分析. *中药材* 1994;17(5):21—22.
- 5 谢 爽,王学美,谢东泽. 鲜壁虎提取液抑制 C6 胶质瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡的研究. *肿瘤防治研究* 2003;30(60):458—461.
- 6 Xie S, Wang XM, Xie DZ. Effects of natural extraction of gecko in inducing apoptosis and antiproliferation of C6 glioma cells. *Cancer Res Prev Treat* 2003;30(60):458—461.
- 7 Lwama H, et al. Effect of shoshaikoto, a Japanese and Chinese traditional herbal medical mixture, on the mitogenic activity of lipopolysaccharide: a new pharmacological testing method. *J Ethnopharmacol* 1987;21(1):45.
- 8 Umeda M. Effect of certain herbal medicines on the biotransformation of arachidonic acid: anew pharmacological testing method using serum. *J Ethnopharmacol* 1988;23(1):91.
- 9 田代真一. “血清药理学”と“血清药化学”——汉方の药理学がはきつ药物血中浓度测定の新しい世界. *TDM 研究* 1988;54(5):11.
- 10 Tashiro S. “Serum Pharmacology” and “Serum Pharmacology-chemistry”——New methods of determining serum drug concentration in TCM pharmacology. *TDM Res* 1988;54(5):11.
- 9 Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Sci* 1997;275:1129—1132.
- 10 Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, et al. Conversion of bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Sci* 1997; 278: 1966—1968.

(收稿:2004-02-25 修回:2004-07-09)