

中药五加皮提取成分抗肿瘤活性作用机理研究

单保恩¹ 付小梅¹ 华正祥² 李巧霞¹ 梁文杰¹ 刘冀琴¹ 张 华³ 刘刚叁³

摘要 目的 研究五加皮提取成分(*Acanthopanax gracilistylus* extract, Age)对肿瘤细胞的作用机理。**方法** 采用 [³H]-TdR 掺入法测定肿瘤细胞增殖反应;用流式细胞技术分析 Age 对肿瘤细胞周期的影响;用蛋白印迹技术检测 Age 对肿瘤细胞 Rb(retinoblastoma)、Cdk(cyclin-dependent kinases)等酶类的影响。**结果** 体外细胞活力试验证明, Age 仅抑制肿瘤细胞增殖,并不导致细胞死亡。在 Age 的作用下,肿瘤细胞增殖停止在细胞周期的 G₀/G₁ 期,而未见直接的细胞毒效应。Age 可诱导 Rb、Cdk₂ 和 Cdk₄ 表达降低,使细胞停止增殖。**结论** Age 对肿瘤细胞的作用机制是通过调节控制细胞周期的酶类而发挥作用的。

关键词 五加皮提取成分;细胞周期;Rb;Cdk;抗肿瘤机制

Study on Mechanism of the Anti-tumor Activity of Acanthopanax Gracilistylus SHAN Bao-en, FU Xiao-mei, HUA Zheng-xiang, et al *Research Center, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang (050011)*

Abstract Objective To study the mechanism of anti-tumor activity of *Acanthopanax gracilistylus* extract (Age). **Methods** The tumor cells proliferation was detected by using [³H]-TdR incorporation method, and the effects of Age on cell cycle of tumor cells, retinoblastoma (Rb) protein and cyclin-dependent kinases (Cdk) were analyzed by flow cytometry and Western blotting assay, respectively. **Results** It was indicated by cytoactivity test *in vitro* that Age only had effect in inhibiting the proliferation of tumor cells, it couldn't lead to death of cells. Under action of Age, the proliferation of tumor cells was halted at G₀/G₁ stage of cell cycle, and showed no direct cytotoxic effect by Age. Age could induce lowering of the expression of Rb, Cdk₂ and Cdk₄, cause halt of tumor cell proliferation. **Conclusion** The tumor inhibitory effect of Age is realized by way of regulating the activity of cell cycle controlling enzymes to suspend the proliferation of tumor cells.

Key words *Acanthopanax gracilistylus* extract; cell cycle; retinoblastoma; cyclin-dependent kinases; anti-tumor mechanism

五加皮 (*Acanthopanax gracilistylus*) 为五加科落叶小灌木细柱五加的根皮,以树皮为药。主要功效为祛风湿、强筋骨、利水消肿^[1]。古医书记载五加皮可用于临床治疗骨蚀(骨瘤、骨癌)、肝积(肝癌)、溺血(肾癌)等肿瘤性疾病。徐建国等体外试验结果显示,五加皮水提液 24 h 内可杀死早幼粒白血病细胞株(HL-60)^[2]。本科研中心也证明了五加皮提取物中一种蛋白质成分有较强的抗肿瘤作用^[3,4],但对于五加皮抗肿瘤作用的机制尚未见报道。本研究探讨了从五加皮中

纯化的抗肿瘤活性成分 Age 蛋白对肿瘤细胞的作用机理。

材料与方法

1 细胞株和主要试剂 五加皮抗肿瘤物质 Age 由河北医科大学第四医院科研中心从中药五加皮中分离纯化的一种分子量为 64 Kda 的蛋白质,纯度达到 99.5% (液相色谱分析)^[5]。该蛋白质对多种肿瘤细胞有较强的抑制作用^[3,4]。本研究中选择了 3 种代表细胞株,MT-2(来自人 T 淋巴细胞性白血病)细胞代表血液病细胞(悬浮细胞)、TMK-1(来自人胃腺癌)代表腺癌细胞和 HSC-2(来自人口腔上皮)代表上皮细胞癌。3 种细胞均由日本产业医科大学山下优毅教授惠赠。RPMI 1640 培养基、LPS(美国 GIBCO 公司产品);胎牛血清为杭州四季青生物材料公司产品。

2 肿瘤细胞增殖实验分析 收集培养中的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30271595)和国家教委、河北省教育厅资助项目(No. 2001245)

作者单位:1. 河北医科大学第四医院科研中心(石家庄 050011);
2. 承德医学院附属医院;3. 华北制药集团新药研究开发中心

通讯作者:单保恩, Tel: 0311 - 86033941 转 283, Fax: 0311 - 86992004, E-mail: baoenshan@yahoo.com.cn

MT-2、TMK-1、HSC-2 肿瘤细胞, PBS 缓冲液洗涤后, RPMI 1640 培养基重悬细胞, 调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml, 加于 96 孔培养板中 (Falcon, No. 3072, Beckton Dickinson Co., Lincoln Park, NJ), 每孔 $100 \mu\text{l}$ (1×10^4 细胞), 实验孔每孔分别加入 $5 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$ 的 Age $10 \mu\text{l}$, 对照孔加入 PBS $10 \mu\text{l}$, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 条件下培养 48 h, 每孔加入 $10 \mu\text{l}$ [^3H]-TdR (放射特异性活性为 6 Ci/mmol , 中国原子能研究所)。继续培养 24 h, 用细胞收集器 (上海跃进医疗器械厂产品) 将细胞收集到滤纸上, 用液闪仪 (美国贝克曼 LS 6500 型) 测定细胞放射线活性 (摄入细胞内的 [^3H]-TdR 每分钟放射活性, cpm)^[6]。

3 流式细胞分析 肿瘤细胞 (2×10^5) 与不同浓度的 Age 于 37°C 培养 48 h。收集细胞, 用 PBS 洗涤并重悬浮, 99.5% 乙醇于 4°C 固定 2 h, RNA 酶 (Sigma Chemical Co.) 37°C 处理 1 h, 与 PI (propidium iodide, PI, 500 mg/ml , Sigma Chemical Co.) 室温反应 10 min, 用流式细胞仪 (EPICS-XL, Coulter Co., Healeah, FL) 应用 Cellfit 分析软件测定各细胞周期 DNA 变化。

4 蛋白印迹分析 肿瘤细胞 (2×10^5) 与不同浓度的 Age (0 、 0.65 、 2.5 、 $10 \mu\text{g/ml}$) 于 37°C 培养 48 h, 收集细胞提取蛋白质^[7]。将 $20 \mu\text{g}$ 蛋白样品加入 7.5% SDS-PAGE 凝胶, 常规方法电泳并将被分离的蛋白质转移至 PVDF 膜, 分别与抗 Rb 抗体 (IF8)、抗 Cdk₂ 抗体 (M2) 和抗 Cdk₄ 抗体 (C-22) (所有抗体购自 Santa Cruz Bio technology, Inc., Santa Cruz, CA) 室温反应 1 h, 与酶标记羊抗鼠 IgG F(ab)₂ (Amersham Life Science, Tokyo, Japan) 室温反应 1 h。用 chemiluminescence 显色系统 (Amersham Life Science) 显色。

5 统计学处理 所有数据资料用 SPSS 10.0 统

计软件包进行处理, 结果用平均值 \pm 标准差表示, 各个组的组间均数比较用单因素方差分析、实验组与对照组组间均数比较用独立样本 t 检验。所有实验结果均重复 6 次。

结 果

1 Age 对细胞增殖活力的作用 见图 1。未经 Age 处理的 3 种肿瘤细胞随培养天数的增加细胞数目逐渐增多; 而加入 Age 的细胞, 第 2 天稍有增加后, 持续到第 5 天细胞数目没有变化, 但细胞活力与未经处理的细胞相比没有变化, 说明 Age 虽然抑制细胞增殖, 但对细胞没有直接的细胞毒性。

2 Age 对细胞周期的影响 未经处理的 MT-2 细胞经 48 h 培养, G₀/G₁ 期细胞占 56.7% , S 和 G₂ + M 期细胞占 41.5% ; 经 Age 处理的 MT-2 细胞, G₀/G₁ 期细胞增加至 83.1% , 而 S 和 G₂ + M 期细胞则降至 14.2% ; 但坏死和凋亡细胞并未增加。TMK-1 和 HSC-2 细胞与 MT-2 结果相似。该结果提示, Age 将细胞周期的发展抑制在 G₁ 期, 但并不导致细胞死亡 (图略)。

3 Age 对 Rb 和 Cdk 酶的作用 如图 2 所示, 3 种肿瘤细胞 (A: MT-2, B: TMK-1, C: HSC-2) 经 Age 处理, 超磷酸化 Rb (p116) 蛋白随 Age 浓度 (0 : $0 \mu\text{g/ml}$; 1 : $0.65 \mu\text{g/ml}$; 2 : $2.5 \mu\text{g/ml}$; 3 : $10 \mu\text{g/ml}$) 的增加而减少。但亚磷酸化 Rb (p110) 蛋白则变化不大。

在 G₁ 后期, Cdk₂ 和 Cdk₄ 可促进 Rb 的磷酸化。如图 3 显示, 3 种肿瘤细胞 (A: MT-2, B: TMK-1, C: HSC-2) 经 Age (0 : $0 \mu\text{g/ml}$; 1 : $0.65 \mu\text{g/ml}$; 2 : $2.5 \mu\text{g/ml}$; 3 : $10 \mu\text{g/ml}$) 处理, Cdk 蛋白的表达明显降低。这些结果提示, Age 是通过影响 Rb 和 Cdk 蛋白的表达来阻止细胞周期发展的。

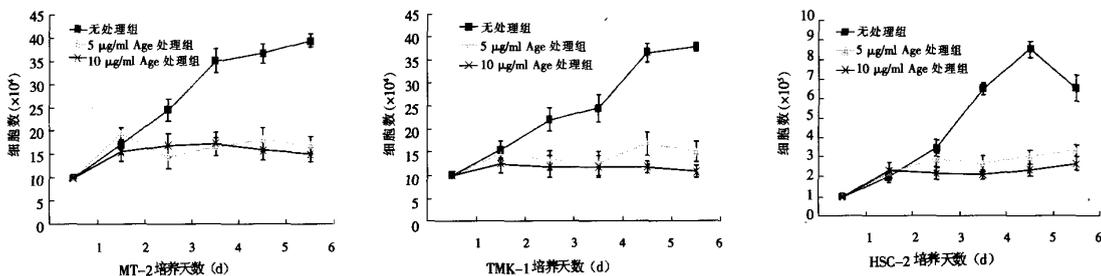


图 1 Age 对细胞增殖活力的作用



注:A,B,C 分别为 MT-2、TMK-1、HSC-2 细胞经 Age 处理后;0:0 µg/ml,1:0.65 µg/ml,2:2.5 µg/ml,3:10 µg/ml;下图同

图 2 Rb 蛋白表达的免疫印迹测定结果

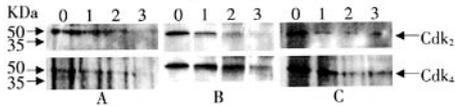


图 3 Cdk₂ 和 Cdk₄ 蛋白表达的免疫印迹结果

讨 论

许多学者报道,中药可抑制荷瘤小鼠的肿瘤生长^[8,9],有些中药已经作为临床治疗肿瘤有效的常用药物。中药五加皮有许多种生物化学作用,如 Tang X 研究结果显示,五加皮有抗炎作用^[10]。但有关五加皮抗肿瘤作用的实验研究,特别是抗肿瘤机制尚未见报道。

Age 对肿瘤细胞的抑制作用有较好的量效关系^[5]。不仅对血液病细胞株如 MT-2、Raji、HL-60 等有作用,对上皮细胞癌株如 HSC-2,腺癌细胞株如 TMK-1 也有较强的抑制作用。为了研究其对肿瘤细胞的作用机制,我们首先检测了 Age 对细胞活力和细胞周期的作用。经 Age 处理,MT-2、TMK-1、HSC-2 细胞的增殖反应受到了严重抑制,但对细胞的活力却未见明显影响(图 1 结果)。用流式细胞技术对细胞 DNA 含量测定结果显示,肿瘤细胞经 Age 48 h 处理后,将肿瘤细胞(MT-2、TMK-1、HSC-2)周期阻止在 G₀/G₁ 期,不能向 S 期进展,而细胞周期的凋亡峰和坏死峰未见明显变化,提示 Age 仅抑制肿瘤细胞周期发展,并不诱导细胞凋亡和坏死。

细胞周期的发展受几种周期素依赖性蛋白激酶(cyclin dependent kinases, Cdk)的控制,而 Cdk 的这种作用是通过调节视网膜母细胞瘤基因(retinoblastoma, Rb)家族成员(如 p110 和 p116 蛋白)的活性来完成的^[11,12]。Rb 在控制细胞周期 G₁ 期的发展中起关键作用。在 G₁ 早期,磷酸化 Rb 与转录因子 E₂F 以复合体形式存在,所以 E₂F 呈无活性状态。在 G₁ 的中后期,随着 Rb 的磷酸化,Cdk 周期素复合体诱导 Rb-E₂F 复合体的分离,随后, E₂F 活化几种基因的转录,如在细胞周期中从 G₁ 期向 S 期发展所必需的周期素 A、胸腺嘧啶激酶和 c-myc 等^[11,12]。细胞周期的停滞,往往与磷酸化 Rb 蛋白表达减少有关。本研究结果显

示,经 Age 处理,几种肿瘤细胞的 Rb 蛋白超磷酸化作用明显降低,但亚磷酸化 Rb 未发生变化。另外, Age 还可使 Cdk₂ 和 Cdk₄ 蛋白表达降低,故 Age 诱导的细胞周期停止是作用于 Rb 和 Cdk 蛋白的结果。

本研究结果显示, Age 不但对血液病细胞株有抑制作用,对来自腺体和上皮组织的肿瘤细胞也有同样的作用,这意味着 Age 能应用于临床口服投入,治疗能直接接触到的肿瘤组织。许多文献报道,一些从中药中提取的蛋白和多糖成分作为生物效应调节物有抗肿瘤作用^[9,13]。有报道指出,红毛五加(与五加皮有部分相同生物学活性的不同亚种)多糖成分可以增强小鼠单核巨噬细胞的活性,抑制种植瘤在小鼠体内的生长。我们通过研究发现, Age 对小鼠和人的单核细胞有较强的刺激作用。通过增强单核巨噬细胞的吞噬作用和细胞因子的分泌,抑制肿瘤细胞的增殖^[4]。虽然有关 Age 的一些问题还有待于解决如 Age 与肿瘤细胞的结合位点、信号传递机制等,但是其抗肿瘤活性和对单核细胞的刺激活性可为临床对五加皮的开发利用提供了有价值的基础数据,我们还将进一步研究其体内作用机制、胃肠道吸收机制、信号传导机制等。

参 考 文 献

- 贺兴东,钟赣生主编. 临床中药手册. 北京:人民卫生出版社,1998:109.
He XD, Zhong GS, editors. Clinical handbook of traditional Chinese drugs. Beijing: People's Medical Publishing House, 1998:109.
- 徐建国. 302 种传统治癌中草药水提液对 HL-60 细胞的诱导分化及细胞毒作用. 山西医药杂志 1991;20(2):82-83.
Xu JG. The induced differentiation and cytotoxicity of water extracts from 302 anti-tumor traditional Chinese herbal drugs on HL-60 cell line. Shanxi Med J 1991;20(2):82-83.
- 单保恩,李巧霞,梁文杰,等. 中药五加皮的抗肿瘤作用体内外实验研究. 中国中西医结合杂志 2004;24(1):55-58.
Shan BE, Li QX, Liang WJ, et al. Experimental study on anti-tumor effects of cortex Acanthopanax Senticosus in vivo and in vitro. Chin J Integr Tradit Chin West Med 2004;24(1):55-58.
- 单保恩,段建萍,张丽华,等. 五加皮抗肿瘤活性物质 Age 对单核细胞产生 TNF-α 和 IL-12 的影响. 中国免疫学杂志 2003;19(7):490-493.
Shan BE, Duan JP, Zhang LH, et al. Stimulating activity of Acanthopanax gracilistylus anti-tumor component on monocytes. Chin J Immunol 2003;19(7):490-493.
- 单保恩,斯重阳,张金忠,等. 中药五加皮抗肿瘤活性成分的分离. 癌变·畸变·突变 2004;16(4):203-207.

- Shan BE, Si CY, Zhang JZ, et al. Isolation and purification of antitumor components of *Acanthopanax gracilistylus*. *Carcinog, Teratogenesis Mutagen* 2004; 16(4):203—207.
- 6 Harrison MR, Thurman GB, Thomas GM, et al. A simple and versatile harvesting device for processing radioactive label incorporated into and/or released from cells in microculture. *J Immunol Methods* 1974; 3(1):11—16.
- 7 Wang JZ, Tsumura H, Shimura K. Antitumor activity of polysaccharide from a Chinese medicinal herb, *Acanthopanax giralidii* Hams. *Cancer Lett* 1992; 65(1):79—84.
- 8 Shen ML, Zhai SK, Chen HL, et al. Immunopharmacological effects of polysaccharides from *Acanthopanax senticosus* on experimental animals. *Int J Immunopharmacol* 1991; 13(5):549—554.
- 9 Yoshida Y, Wang MQ, Liu JN, et al. Immunomodulating activity of Chinese medicinal herbs and *Oldenlandia diffusa* in particular. *Int J Immunopharmacol* 1997; 19(7):359—370.
- 10 Tang X, Ma Y, Li P. Separation and identification of the anti-inflammatory diterpene from the root cortices of *Acanthopanax gracilistylus* W. W. Smith. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 1995; 20(4):231—253.
- 11 Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G_1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995; 9(10):1149—1163.
- 12 Dyson N. pRB, p107 and the regulation of the E_2F transcription factor. *J Cell Sci* 1994; 18 (Suppl):81—87.
- 13 Lan ZF, Zhang ZL, Cheng GQ, et al. Effects of *rdix hadysari* polysaccharide on immunological function and transplanted tumors in mice. *Chin Pharmacol Acta* 1987; 8(3):275—277.

(收稿:2004-09-15 修回:2005-06-20)

低能量氩氦激光穴位照射结合川芎嗪治疗突发性耳聋 53 例

周 昆

2000—2004 年我科采用低能量氩氦激光穴位照射结合川芎嗪治疗取得较好疗效,现报告如下。

资料和方法 104 例患者来我科就诊,均经电测听检查后确诊,诊断标准按中华医学会耳鼻喉科学会突发性耳聋诊断依据,明确诊断后治疗分两组。观察组 53 例(62 耳),男 31 例,女 22 例,年龄 10~54 岁,平均 37 岁,病程 1~30 天,平均 18 天,伴耳鸣 48 例,眩晕恶心呕吐 11 例。近期呼吸道感染 9 例,高血压 11 例,颈椎病 10 例,糖尿病 3 例。对照组 51 例(58 耳),男 28 例,女 23 例,年龄 13~61 岁,平均 39 岁,病程 1~35 天,平均 20 天,伴耳鸣 42 例,眩晕恶心呕吐 10 例。近期上呼吸道感染 6 例,高血压 10 例,颈椎病 7 例,糖尿病 2 例。两组患者症状、体征及各项检查经检验均差异无显著性。

观察组患者入院后给予盐酸川芎嗪葡萄糖注射液(安徽双鹤药业有限责任公司生产,0.1 g/100 ml)100 ml,静脉滴注,每日 1 次。同时采用氩氦激光光纤治疗仪(上海医用激光仪器厂生产),频率:50 Hz,功率:16 mW,波长 0.6328 μm 。直接照射双侧耳门、听宫、听会穴,每穴 5~8 min,每日 1 次,15~20 次为 1 个疗程。对照组只采用川芎嗪注射液治疗,方法同观察组。两组伴耳鸣、恶心、眩晕、呕吐者同时给予镇静、止吐及谷维素、维生素治疗,40 天后观察两组疗效。

结 果

1 疗效标准 根据临床耳聋症状改善情况和纯音测听结果作为疗效评定依据。痊愈:自觉症状消失,0.25~4.00 kHz 各频率听阈恢复至正常或达健耳水平,或达此次患者病前水平;显效:自觉症状明显改善,上述各频率平均听力提高 30 dB

以上;有效:自觉症状好转,上述各频率平均听力提高 15~30 dB;无效:自觉症状无明显改善,上述各频率平均听力改善不足 15 dB。

2 两组疗效比较 观察组 53 例,痊愈 15 例(28.3%),显效 16 例(30.2%),有效 15 例(28.3%),无效 7 例(13.2%);对照组 51 例,痊愈 6 例(11.8%),显效 18 例(35.3%),有效 14 例(27.5%),无效 13 例(25.5%)。观察组总有效率为 87.8%,对照组总有效率为 74.5%。经校正 χ^2 处理,差异无显著性($\chi^2 = 2.52, P > 0.05$)。两组痊愈率比较,差异有显著性($\chi^2 = 4.41, P < 0.05$)。

讨 论 突发性耳聋的机理尚无定论,推论主要源于病毒感染和供血障碍。该病自觉症状听力下降,多伴耳鸣,电测听检查多为高频率聋曲线,伴语言识别力降低,表明可能有耳蜗病变存在。发病时由于血管痉挛累及迷路动脉或分支,致局部缺血缺氧而出现耳聋。低能量氩氦激光特殊的生物学效应,具有生物刺激作用,可扩张血管,改善局部微循环,影响生物膜通透性,刺激各种酶系统的活化,增强局部营养代谢,调节免疫功能。激光刺激耳部穴位可提高大脑皮层听觉中枢的兴奋性,增强皮层对声音信息的感受和分析能力,通过耳部穴位和刺激改善内耳微循环的功能,有利于一些可逆性病理过程的好转。中药川芎嗪具有活血化瘀,改善微循环的药理效应,能增加耳蜗血流,增强血氧供应,减轻因缺氧导致的神经上皮功能受损。低能量氩氦激光穴位照射结合药物治疗是安全有效的方法之一,值得重视。

(收稿:2005-01-04 修回:2005-05-10)