

[文章编号] 1000- 4718(2005)05- 0980- 05

天花粉蛋白对 HepA- H 细胞和 HeLa 细胞抑癌活性研究*

豆长明, 李继承[△]

(浙江大学细胞生物学研究所, 浙江 杭州 310031)

[摘要] 目的: 比较分析商品天花粉蛋白(TCS1) 和从鲜药材中提取分离出的天花粉蛋白粗品(TCS2), 对 HepA- H 细胞(腹水型肝癌高转移株细胞) 和 HeLa 细胞(人宫颈癌肿瘤细胞) 的杀伤作用, 并进一步探讨其抑癌作用机理。方法: MTT 法检测药物的细胞毒作用, 电镜观察细胞超微结构改变, 电泳检测细胞 DNA 生物化学特征改变。结果: TCS1 和 TCS2 对 HepA- H 细胞作用不明显($P > 0.05$), 而对 HeLa 细胞具有显著性作用, 呈明显时效、量效关系($r > 0.864$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在相同作用时间内, TCS2 作用组对细胞生长抑制率均高于 TCS1 组($P < 0.01$)。进一步研究发现, HeLa 细胞经 TCS2 作用后, 细胞表面微绒毛消失, 胞膜发泡, 核染色质浓缩边集, 并出现凋亡小体, 细胞 DNA 经琼脂糖凝胶电泳呈典型的梯形带。结论: HepA- H 细胞对天花粉蛋白不敏感, 而 HeLa 细胞对 TCS1 和 TCS2 敏感, 其中 TCS2 抑癌活性明显强于 TCS1, 细胞生长受抑制作用显著, 作用机制与诱导细胞凋亡相关。

[关键词] 天花粉素; Hep A- H 细胞; HeLa 细胞; 细胞凋亡

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The anti- tumor effect of trichosanthin on HepA- H cells and HeLa cells

DOU Chang- ming, LI Ji- cheng

(Institute of Cell Biology, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To analyze and compare the cytotoxic activity of commercial TCS (TCS1) on HepA- H cells and HeLa cells with coarse product of TCS (TCS2) extracted from fresh root tubers of *Trichosanthes kirilowii Maxim.*, and further explore its possible mechanism of anti- tumor activity. **METHODS:** Microculture tetrazolium assay (MTT) was applied to investigate cytotoxicity of the drug, and electron microscopy was used to observe ultrastructural changes of cells. The techniques of electrophoresis were performed to detect biochemical changes of intercellular DNA. **RESULTS:** TCS1 and TCS2 had no obvious effects on HepA- H cells ($P > 0.05$), but marked effects on HeLa cells were observed in a time- and dose- dependent manner ($r > 0.864$, $P < 0.05$ or $P < 0.01$) and the inhibitory rate of TCS2 was higher than that of TCS1 in the same time point ($P < 0.01$). Furthermore, marked morphologic changes were observed including microvilli disappearance, cell membrane blebbing, condensation of chromosomes and apoptotic bodies. Meanwhile, the apoptosis of HeLa cells was confirmed by DNA ladder formation on gel electrophoresis. **CONCLUSIONS:** TCS1 and TCS2 have no obvious effect on HepA- H cells, but have a significant inhibitory effect on HeLa cells, indicating that TCS2 is superior to TCS1 in anti- tumor activity by the way of inducing apoptosis.

[KEY WORDS] Trichosanthin; HepA- H cells; HeLa cells; Apoptosis

近年来, 从天然药物中筛选抗癌药已成为研究热点。中药天花粉中分离出的天花粉蛋白(trichosanthin, TCS), 作为一类核糖体失活蛋白, 其药物价值受到广泛关注, 已在妇产科和抗人类免疫缺陷病毒中得到临床应用^[1- 3], 在抗癌方面也有一定的研究, 主

要集中在消化道肿瘤或癌症上^[4, 5], 而对某些癌细胞作用尚无定论。另外, 用从新鲜栝蒌根得到的提取物对肿瘤细胞作用, 鲜见报道。为此, 本实验选用肿瘤细胞 HepA- H(腹水型肝癌高转移株细胞) 和 HeLa(人宫颈癌肿瘤细胞), 比较分析商品天花粉蛋白

[收稿日期] 2003- 10- 14 [修回日期] 2003- 12- 16

* [基金项目] 浙江省科技计划项目(No. 2003c30057)

△ 通讯作者 Tel: 0571- 87217451; E- mail: Lijc@mail. hz. zj. cn

(TCS1) 和从鲜药材中分离出的天花粉蛋白粗品 (TCS2)^[6] 对两者的杀伤作用, 并从细胞凋亡的角度进一步探讨其抑癌机理, 为药物的进一步研究开发提供实验依据。

材 料 和 方 法

1 实验药品

TCS1 (1.2 g/L, 上海金山制药有限公司), TCS2, 按《天花粉蛋白》书中提取工艺^[6], 由新鲜栝楼根 (2002年11月采自浙江杭州余杭区) 经提取, 冷冻干燥制得 (本实验样品所得产率为 0.83%)。运用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 以 TCS1 和蛋白 marker 为对照, 初步定性检测样品成分。电泳胶浓度为 10%, 考马斯亮蓝染色, 充分脱色, 在凝胶成像分析仪内观察拍照, 并对电泳条带扫描, 计算蛋白相对含量。两药品使用时用培养液稀释, 并过滤 (0.22 μm) 除菌。

2 主要试剂和仪器

RPMI-1640 培养基 (Gibco 公司产品), 小牛血清 (杭州四季青生物制品), 四氮唑蓝 (MTT, FLUCA 公司产品), 二甲亚砜 (DMSO, 无锡鸿声化工厂产品), 酶标仪 (Clinibio 产品), 动物细胞 DNA 提取试剂盒 (北京鼎国生物试剂公司产品), CO₂ 培养箱 (FORMA 公司产品), TECNAI 10 透射电子显微镜 (PHILIP 公司产品), STEREOSCAN 260 扫描电子显微镜 (CAMBRIDGE 公司产品), 电泳仪 (E-C Apparatus Corporation 产品), 微型凝胶电泳系统 (Bio-Rad 产品), DY-III 电泳槽 (北京六一仪器厂产品), 凝胶成像系统分析仪 (上海天能科技有限公司产品)。

3 细胞培养

HepA-H 细胞和 HeLa 细胞, 为本所保存细胞株, 前者由本所杨泽然和李继承等新建细胞系^[7]。两种细胞常规培养于 RPMI-1640 完全培养液内 (含 10% 小牛血清, 1 × 10⁵ U/L 青霉素和 1 × 10⁵ U/L 链霉素, pH 7.2), 37 °C 5% CO₂、饱和湿度。

4 细胞毒性作用

采用 MTT 法。取对数生长期细胞, 在平底 96 孔细胞培养板每孔加入 1 × 10⁸ cells/L 100 μL, 分别加入 TCS1 和 TCS2 溶液 100 μL, 使其在细胞培养孔中的终浓度分别为 0.1 mg/L、1 mg/L、10 mg/L、100 mg/L、500 mg/L。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%

CO₂、饱和湿度, 培养 24 h、36 h、48 h 后, 分别取出培养板, 弃上清, 每孔加入浓度为 20 g/L 的 MTT 20 μL, 继续培养 4 h, 快速弃上清, 每孔加细胞溶解液二甲亚砜 100 μL, 震荡 15 min, 使 MTT 还原产物甲臜 (formazan) 完全从胞内溶解出。最后用酶联免疫测定仪测定各孔于 492 nm 下的 A 值, 计算肿瘤细胞杀伤率。细胞杀伤率以如下公式计算:

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

根据各组药物对 HeLa 细胞的细胞杀伤率, 运用 SPSS 软件中 Probit 求出药物半数抑制浓度 (IC₅₀)。

5 细胞形态学观察

取对数生长期细胞 HeLa 细胞与不同浓度的 TCS2 共培养 24 h, 收集细胞, 2.5% 戊二醛前固定, 锇酸后固定, 逐级脱水, EPON 812 包埋, 超薄切片, 枸橼酸铅和醋酸双氧铀染色, PHILIPS TECNI10 透射电镜观察。另将 6 孔培养板中放入灭菌的盖玻片, 培养 24 h, 取出盖玻片, 常规制样, 扫描电镜观察。

6 细胞生物化学特征改变研究

不同浓度 TCS2 作用 HeLa 细胞后, 提取其 DNA, 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操作。样品 DNA 于 0.8% 琼脂糖凝胶, 75 mA 恒流 1.5-2 h。电泳完毕, 在凝胶成像分析仪内观察拍照。

7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用 SPSS 统计软件和 Microsoft Excel 进行数据处理, 包括进行配对 *t* 检验或方差分析。

结 果

1 TCS1 和 TCS2 蛋白质电泳

SDS-PAGE 结果显示, TCS1 电泳图谱除主带外, 仅有 1 条杂带, TCS 纯度较高, 含量达 99.81%; 样品 TCS2 主带明显, 但杂带较多, 条带扫描数据表明其主带 TCS 含量为 70.93%, 杂蛋白含量较高 (图 1)。

2 TCS1 和 TCS2 对 HepA-H 细胞和 HeLa 细胞的细胞毒作用

TCS1 和 TCS2 对 HepA-H 细胞作用 24 h 后, 实验数据表明药物对细胞生长具有促进作用, 无量效关系; 36 h 后, 细胞生长均受抑制, 但无量效关系; 48 h 后部分细胞生长被抑制, 部分细胞生长被促进, 无量效关系, 3 组数据差异不显著 ($P > 0.05$, 表 1)。

TCS1 和 TCS2 对 HeLa 细胞作用效果明显 ($Q <$

0.05或 $P < 0.01$), 具有很好的时效、量效关系($r > 0.864$, 表2)。其中药物作用36 h, TCS2对HeLa细胞的 IC_{50} 是115.6 mg/L, TCS1为610.9 mg/L; 作用48 h, 两者的 IC_{50} 分别是33.4 mg/L和130.7 mg/L。

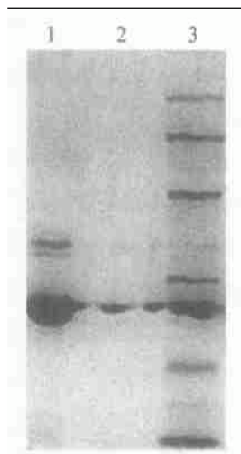


Fig 1 Analysis of coarse TCS product and TCS by SDS-PAGE.

Lane 1: TCS2; Lane 2: TCS1; Lane 3: protein marker.

图1 TCS1和TCS2 SDS-PAGE比较分析

表1 TCS1和TCS2对HepA-H细胞的细胞毒作用

Tab 1 Cytotoxic activity of TCS1 and TCS2 on HepA-H cells (% . $\bar{x} \pm s$. $n = 4$)

Drug	Concentration (mg/L)	Killing rate ($\bar{x} \pm s$. %)		
		24 h	36 h	48 h
Control	0.0	0.0 ± 1.1	0.0 ± 0.7	0.0 ± 1.5
TCS2	0.1	- 3.1 ± 2.9	19.1 ± 2.6**	15.7 ± 0.8**
TCS2	1.0	- 3.6 ± 8.1	7.9 ± 11.5	5.1 ± 2.6*
TCS2	10	- 25.0 ± 1.7**	6.8 ± 0.1*	3.8 ± 3.6
TCS2	100	9.6 ± 3.3**	21.0 ± 2.2**	16.2 ± 6.3**
TCS2	500	7.6 ± 7.6	17.0 ± 3.0**	13.4 ± 0.7**
TCS1	0.1	- 19.9 ± 6.7	6.9 ± 5.2	- 3.7 ± 4.9
TCS1	1.0	- 6.1 ± 6.4	4.7 ± 0.6**	7.4 ± 2.7*
TCS1	10	- 16.1 ± 19.1	0.7 ± 2.4	- 11.4 ± 4.7*
TCS1	100	- 6.8 ± 1.0*	11.9 ± 4.1**	2.6 ± 2.3
TCS1	500	- 3.4 ± 3.3	10.8 ± 5.2*	5.9 ± 3.8*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

3 细胞形态学观察

扫描电镜下, TCS2对HeLa细胞作用24h后, 细胞膜表面可见典型的细胞凋亡特征: 泡状突起, 微绒毛消失或基本消失(图2A、2B)。透射电镜下, 细胞体积缩小, 微绒毛消失, 核固缩, 染色质浓集靠近于核膜, 并沿核膜收缩, 可见具有完整膜性结构的凋亡小体的分离(图3A、3B)。

4 细胞生物化学特征改变研究

HeLa细胞经TCS2 50 mg/L、100 mg/L、500 mg/L

分别作用24 h后, DNA电泳可见细胞凋亡特征性的梯形条带(ladder pattern); 随着时间延长, 50 mg/L和100 mg/L作用组, 48 h后, DNA ladder更趋明显, 但高浓度药物(500 mg/L)作用组, 电泳谱呈涂片状(smear), 表明凋亡细胞继发性坏死(图4)。

表2 TCS1和TCS2对HeLa细胞的细胞毒作用

Tab 2 Cytotoxic activity of TCS1 and TCS2 on HeLa cells (% . $\bar{x} \pm s$. $n = 4$)

Drug	Concentration (mg/L)	Killing rate ($\bar{x} \pm s$. %)		
		24 h	36 h	48 h
Control	0.0	0.0 ± 0.8	0.0 ± 1.2	0.0 ± 0.2
TCS2	0.1	3.4 ± 4.1* #	9.7 ± 7.0** # #	9.9 ± 3.1** # #
TCS2	1.0	4.5 ± 3.7** #	11.1 ± 2.0** #	11.3 ± 1.9** # #
TCS2	10	16.3 ± 3.2**	20.9 ± 6.8** # #	29.4 ± 4.1** # #
TCS2	100	36.7 ± 4.0** #	44.2 ± 1.7** # #	54.6 ± 3.0** #
TCS2	500	57.9 ± 3.4** # #	71.8 ± 3.9** # #	89.4 ± 1.9** # #
TCS1	0.1	2.2 ± 1.7*	2.9 ± 2.7*	4.4 ± 3.1*
TCS1	1.0	2.9 ± 2.0*	5.5 ± 1.2**	6.0 ± 2.7*
TCS1	10	16.4 ± 4.1**	6.7 ± 2.4**	13.0 ± 3.3**
TCS1	100	26.3 ± 2.5**	29.3 ± 3.9**	47.9 ± 5.2**
TCS1	500	39.6 ± 4.8**	53.8 ± 4.0**	70.2 ± 2.9**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$, # # $P < 0.01$ vs TCS1 in the same time.

讨 论

随着天花粉蛋白的深入研究和应用范围的拓展, 其药物开发价值日益引起广泛关注。科研人员对鲜药材植物栝楼的种植, 药物的采集、提取、分离纯化以及进一步加工和分子克隆等, 都进行了相关研究。当前, 作为商品化的天花粉蛋白已在临床使用。商品天花粉蛋白主要从鲜植物体中提取^[8], 部分利用分子克隆技术体外表达^[9], 但在这些过程中蛋白活力会受到不同程度的影响, 其药物效力也将随之改变。

为此, 本实验研究了从鲜药材中提取制得的天花粉蛋白粗品和商品天花粉蛋白对HepA-H细胞和HeLa细胞的杀伤作用, 比较分析两者的抑癌活力, 并进一步探讨其作用机理。天花粉蛋白对于肝癌细胞的作用, 研究结果不一; 对宫颈癌肿瘤细胞作用, 少见报道。本研究证实, 天花粉蛋白粗品和商品天花粉蛋白对HepA-H细胞作用不明显, 而对HeLa细胞具有显著作用, 呈明显时效、量效关系。实验数据表明, 对于HeLa细胞, 天花粉蛋白粗品抑癌活性明

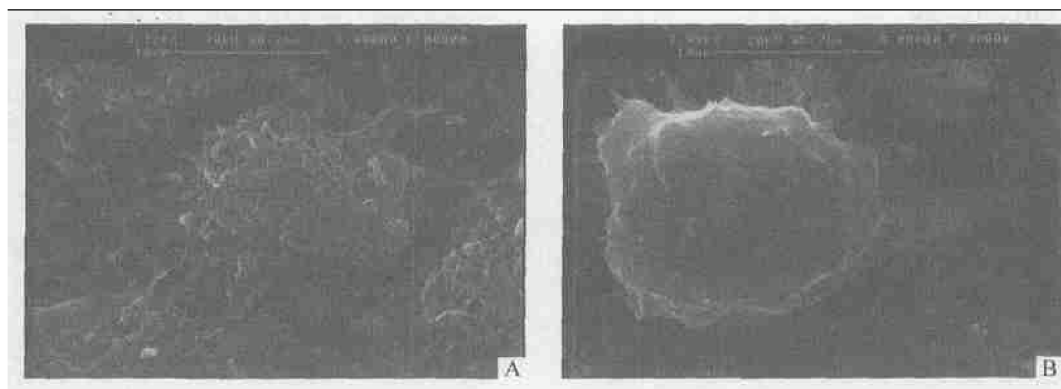


Fig 2 Observation of a HeLa cell by SEM. A: normal HeLa cells; B: HeLa cells treated with TCS2 100 mg/L for 24 h.

图 2 HeLa 细胞扫描电镜观察

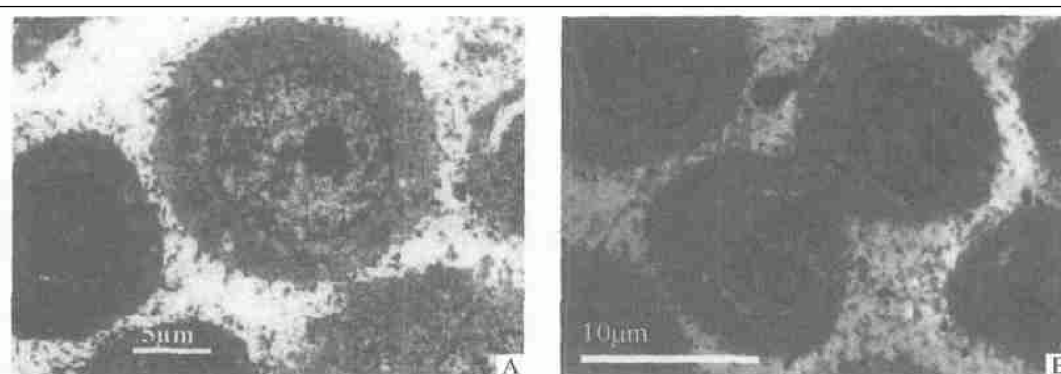


Fig 3 Observation of HeLa cells by TEM. A: normal HeLa cells; B: HeLa cells treated with TCS2 100 mg/L for 24 h.

图 3 HeLa 细胞透射电镜观察

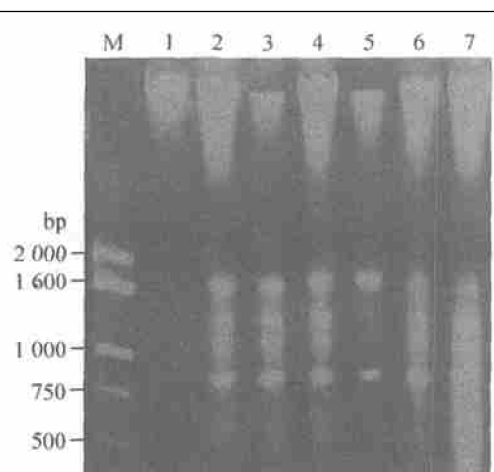


Fig 4 Analysis of DNA fragments of HeLa cells treated with TCS2.

Lane 1: DNA marker; Lane 2: control; Lane 3: 500 mg/L for 24 h; Lane 4: 100 mg/L for 24 h; Lane 5: 50 mg/L for 48 h; Lane 6: 50 mg/L for 24 h; Lane 7: 100 mg/L for 48 h; Lane 8: 500 mg/L for 48 h.

图 4 HeLa 细胞经 TCS2 作用后 DNA 片段分析

显优于商品天花粉蛋白。进一步研究表明,天花粉蛋白粗品对 HeLa 细胞抗癌活性与诱导细胞凋亡有关。实验从细胞形态学和生物化学特征方面证实,

HeLa 细胞经天花粉蛋白粗品作用后发生凋亡。这一点与其他相关研究抗癌作用机制一致,但本研究所用鲜药材中直接提取制得的天花粉蛋白粗品,成分较复杂,其抑癌活性却强于商品天花粉蛋白。这一点是否因为天花粉蛋白粗品中天花粉蛋白与其它杂蛋白的协同作用有关,还是与其它成分或因素的相互作用有关,仍需进一步验证。

诱导细胞凋亡是目前公认的治疗肿瘤的理想途径^[10]。通过诱导细胞凋亡,去寻找和研发有效抗肿瘤药物,已是当前热点。本实验所用天花粉蛋白粗品对 HeLa 细胞具有良好的抑制作用和诱导凋亡作用,初步显示了药物开发前景。提示天花粉蛋白粗品在抗肿瘤方面很有前途,对其深入研究,以开发相关药品,有望应用于宫颈癌等肿瘤的临床治疗。

[参 考 文 献]

[1] Wang JH, Nie HL, Tam SC, et al. Anti- HIV- 1 property of trichosanthin correlates with its ribosome- inactivating activity[J]. FEBS Lett, 2002, 531(2): 295- 298.
 [2] 汪 猷 主编. 天花粉蛋白[M]. 第 2 版. 北京: 科学出

- 出版社, 2000. 242- 261.
- [3] Palca J. Trials and tribulations of AIDS drug testing[J]. Science, 1990, 247(4949 Pt1): 1406.
- [4] 涂水平, 江石湖, 乔敏敏, 等. 天花粉蛋白诱导胃癌 MKN-45 凋亡的研究[J]. 癌症, 2000, 19(12): 1105- 1108.
- [5] Zhang C, Gong YX, Ma H, et al. Reactive oxygen species involved in trichosanthin- induced apoptosis of human chorionic carcinoma cells[J]. Biochem J, 2001, 355(Pt 3): 653- 661.
- [6] 汪猷主编. 天花粉蛋白[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 2000. 21- 32.
- [7] 杨泽然, 李继承. 两种不同淋巴转移能力小鼠肝癌细胞亚系的建立和生物学特征[J]. 实验生物学报, 2003, 36(2): 99- 104.
- [8] 袁惠东, 夏其昌, 张祖传. 用 Blue Sepharose CL- 6B 快速纯化天花粉蛋白[J]. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24(4): 369- 373.
- [9] 胡苹, 安成才, 李毅, 等. 原核表达的天花粉蛋白和另外两种蛋白具有体外抗真菌活性[J]. 微生物学报, 1999, 39(3): 234- 239.
- [10] Kerr JF, Winterford CM, Hamon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy[J]. Cancer, 1994, 73(8): 2013- 2026.

优秀论文征稿评选活动

《中华现代外科学杂志》编辑部将于 2005 年 2 月 1 日至 2005 年 6 月 30 日举行优秀论文征稿评选活动!

在此活动期间, 本刊将为获得国家自然科学基金、国家级、省部级基金项目资助的论文以及取得前沿课题突破性进展的论文颁发优秀论文证书, 并对相应文章的第一作者给予每千字符 50 元的优秀论文奖励; 同时本刊专家编辑委员会和中华首席医学网联合推出优秀论文专栏, 凡在此次评选活动中获得优秀论文奖的文章将有机会被中华首席医学网优秀论文专栏收录。希望广大专家、作者、读者能不吝赐教, 踊跃来稿!

《中华现代外科学杂志》是由中华临床医药学会主办的专业医学学术期刊。本刊为半月刊, 具有 ISSN/CN 标准刊号, 现已被中华首席医学网和中文生物医学期刊文献数据库(cmcc) 等收录, 您可以在中华首席医学网(www. chouxin. net) 免费查看本刊各期的全部内容。

本刊近期投稿栏目的主题是:

1. 有实际指导意义的述评、临床研究、经验介绍、临床病理(例)讨论和病例报告, 以及反映国内外外科重要进展的文献综述等。
2. 探讨大外科领域(普通外科、骨外科、神经外科、泌尿外科等)某一方面的理论研究、临床基础研究和实验研究工作成果的论文。
3. 中医药、中西医结合防治常见耳鼻咽喉-头颈外科疾病的经验和科研进展。
4. 新技术、新疗法、新器械的创制, 书评, 学术讨论, 学术动态等。

投稿信箱: 北京 100035- 55 信箱

邮编: 100035

咨询电话: 010- 62242528

E- mail: waikexue@sohu.com

《中华现代外科学杂志》编辑部

2005 年 1 月 25 日