

# 鲜壁虎提取物抑制 C6 胶质瘤细胞增殖和诱导凋亡的研究

谢爽<sup>1</sup>, 王学美<sup>1</sup>, 谢东泽<sup>2</sup>

## Effectsofnaturalextractionof geckoinducin ga poptosisandan - tiproliferationofC 6 gliomacells

XIEShuan g,WANGXue -mei,XIEDon g-ze

1st hospital of Beijing University, Beijing 100034, China

**Abstract:Objective** Tostudythemodeoftheactionofthenaturalextractionof geckoonC6 gliomacells.

**Methods** C6 gliomacellstreatedbyvariousconcentrationsofnaturalextractionof geckowereassessed.AntiproliferationwasobtainedbyMTT,DNA gelelectrophoresisandcellmorphologystudywereusedtoobserve theevidenceofapoptosis.Quantitativeanalysisofapoptosiswasdonebyflowcytometry. **Results** Thecellstreatedby50mg/Lnaturalextractionof geckoshowedsignificantantiproliferation,5mg/L,30mg/L,50mg/Lnaturalextractionof geckocaninduceC6 gliomacellsapoptosis,DNA gelelectrophoresisshowedDNArupture,impairingC6 gliomacellsapoptoticdeath tobosedependent. **Conclusion** Thenaturalextractionof geckocaninduceC6 gliomacellsapoptosisanddecreasecell proliferation,suggestingthatnaturalextractionof geckomightbeapotent anticancerdrug.

**Keywords:** Naturalextractionof gecko;C6 gliomacells;Antiproliferation;Apoptosis

**摘要:**目的 研究鲜壁虎提取液对 C6 胶质瘤细胞的致凋亡作用及其方式。方法 用不同浓度的鲜壁虎液处理 C6 胶质瘤细胞,用 MTT 法观察增殖抑制,用透射电镜观察用药后细胞形态的变化,用琼脂糖凝胶电泳观察用药后细胞 DNA 断裂情况,用流式细胞术定量观察 C6 细胞凋亡情况。结果 经 50mg/L 鲜壁虎液处理的 C6 胶质瘤细胞,增殖能力降低;5mg/L,30mg/L,50mg/L 鲜壁虎液均可以使 C6 细胞显示明显凋亡征象,有 DNA 断裂现象,并有浓度和时间依赖性。结论 鲜壁虎液在体外能诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡,抑制细胞增殖,是一种具有抗肿瘤作用的天然药物。

**关键词:** 鲜壁虎液;C6 胶质瘤;增殖抑制;凋亡

中图分类号:Q813.5;R285.5;R739.41

文献标识码:A

文章编号:1000-8578(2003)06-0458-04

## 0 引言

壁虎又名守宫,是我国传统的治疗肿瘤的中药材,含与马蜂毒相似的有毒物质和组织胺类<sup>[1]</sup>。但临床中使用的是除去内脏的干燥全体,鲜壁虎极少使用,且目前国内未见鲜壁虎提取物对 C6 胶质瘤细胞作用的报道。本实验首次观察了鲜壁虎提取物对 C6 胶质瘤细胞增殖和凋亡的影响,并探讨其作用机理。

## 1 材料与方法

**1.1 药物** 由北京雅泉中药研究所提供。加工过程:活体无蹼壁虎冷冻处死,清水洗净,粉碎匀浆,冻融 10 次,自然沉淀取上清,低温离心 10000r/min 离心 20min,取上清,0.22 μm 膜过滤除菌,-70℃ 冰箱保存备用。

**1.2 材料与试剂** C6 胶质瘤细胞购自中国医学科学院神经外科研究所;IMDM 培养基:美国 GIBCO BRL 公司;胎牛血清:中国医学科学院血液研究所;二甲亚砜(DMSO)天津市化学试剂二厂;噻唑蓝(MTT):AMRESCO 公司;蛋白酶 K:SIGMA 公司;RNaseA:SIGMA 公司;胰蛋白酶:美国 GIBCO BRL 公司;琼脂糖:基因公司;PI/AnnexinV-FITC 试剂盒:晶美公司;碘化丙啶(PI):SIGMA 公司。

**1.3 主要仪器** 流式细胞仪(Becton Dickinson FACSCalibur 型):美国;CO<sub>2</sub> 培养箱(Napco):美国;倒置显微镜(OlympusIM 型):日本;全自动酶标检测仪(DYNATECHMR5000 型):美国;透射电镜(JEOLTEM-100CX 型):日本。

## 1.4 方法

**1.4.1 细胞增殖抑制试验** 采用 MTT 法。取对数生长期 C6 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化,吹打,10% 胎牛血清 IMDM 培养基配制成 10<sup>4</sup> 个/ml 单细胞悬液,取 100 μl (含 10<sup>3</sup> 个细胞)加入 96 孔板中。培养 4h,细胞贴壁,分为实验组(加鲜壁虎提取液,

收稿日期:2002-08-19;修回日期:2003-03-26

作者单位:1.100034 北京大学第一医院中西医结合研究室;2.北京市雅泉中药研究所

终浓度分别为 8mg/L,16mg/L,32mg/L,64mg/L,128mg/L,256mg/L)和空白对照组(不加鲜壁虎提取液),培养于 37℃,5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,随时观察细胞生长状况。培养 72h 后,加入 MTT 10μl/孔(5mg/ml),继续培养 4h,吸去培养液,加入 DMSO 100 μl,将培养板振荡 5min,显微镜下着色颗粒消失,20min 以内以 570nm 为测试波长,630nm 为参考波长,在全自动酶标仪上读取各孔吸光度(A 值),每组 8 孔。肿瘤细胞生长抑制率的计算:抑制率(%)=(对照组 A 值-实验组 A 值)/对照组 A 值 ×100%。

1.4.2 细胞凋亡的定量检测 用流式细胞仪测定。取对数生长期 C6 细胞,分别加入不同浓度的药物,终浓度为 5mg/L,30mg/L,50mg/L 于培养 48h、72h、96h 后收集细胞,D-hanks 缓冲液清洗 2 次,用 1 ×Binding Buffer 缓冲液制成 1 ×10<sup>6</sup> 细胞/ml 的悬液。用 PI/Annexin V -FITC 标记 15min,1h 内流式细胞仪检测。数据资料以 CellQuest 软件收集分析。

1.4.3 细胞凋亡的形态学检测 用透射电镜观察。样本处理同上,作用 72h 后收集细胞,D-hanks 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,透射电镜下观察,照相。

1.4.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳法 样本处理同上,分别作用 24、48、72、96h。收集细胞样品,经 D-hanks 缓冲液清洗,在 1 ×10<sup>6</sup> 细胞沉淀中加入细胞裂解液(10mmol/L Tris-HCL pH 8.0,10mmol/L EDTA pH 8.0,75mmol/L NaCl, 0.5% SDS, 0.15mg/ml 蛋白酶 K) 800μl,吹打均匀,37℃ 水浴过夜。加入 5M NaCl 300 μl,振荡,使蛋白质沉淀,10000r/min 离心 10min。取上清,加入等体积异丙醇混匀。10000r/min 离心 10min,弃上清。70% 乙醇清洗,离心去上清,沉淀加适量 TE 缓冲液(10mmol Tris -HCL pH 8.0,1mmol/L EDTA pH 8.0)溶解。加入 200μg/ml RNase A,37℃ 水浴 30min,取 15μl 上样缓冲液,点样,于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,用 Lambda DNA -Hind III markers 作为分子量参照,紫外灯下观察,照相。

1.4.5 统计学处理 本实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,两两比较采用 Student's *t* 检验。

## 2 结果

2.1 鲜壁虎提取液对 C6 胶质瘤细胞增殖的抑制作用 不同浓度的鲜壁虎提取液对 C6 胶质瘤细胞

作用 72 小时后,可见在 64mg/L、128mg/L 和 256mg/L 时,可以显著抑制 C6 胶质瘤细胞的生长,其抑制率分别为 54.81%、69.75%、92.04% 与对照组相比有显著差异( $P < 0.01$ ),且增殖抑制率呈明显的量-效关系。当鲜壁虎提取液浓度在 8mg/L、16mg/L 的 32mg/L 时,其抑制率与对照组相比无明显差异( $P > 0.05$ ),见表 1。

表 1 不同浓度的鲜壁虎提取液对 C6 胶质瘤细胞增殖的抑制作用

组别	A 值	抑制率(%)
对照组	0.1458 ±0.06041	0.00
8mg/L	0.1325 ±0.04053	9.12
16mg/L	0.1375 ±0.04786	5.69
32mg/L	0.1399 ±0.05097	4.04
64mg/L	0.0658 ±0.03893 **	54.81
128mg/L	0.0441 ±0.02177 **	69.75
256mg/L	0.0116 ±0.01554 **	92.04

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ,  $n = 8$

2.2 鲜壁虎提取液对 C6 胶质瘤细胞形态的影响

光镜观察结果显示,实验组出现典型的凋亡细胞的形态学改变,即细胞膜完整,细胞体积变小,突触变短,细胞收缩变圆,轮廓更加清晰,同时可有皱缩变形,细胞出现成泡现象(结果未显示)。透射电镜观察结果显示,对照组(野生型) C6 胶质瘤细胞生长形态多呈长梭形,核较大,呈椭圆形,位于中央,胞体向两级伸长。少部分细胞呈星形,核呈圆形或椭圆形,位于中央,胞浆有很多突起。经鲜壁虎提取液处理的 C6 胶质瘤细胞有部分呈凋亡的形态,细胞体积缩小,染色质浓缩聚集成块,核变小,出现核质沿核膜内侧排列的现象(图 1)。

2.3 DNA 电泳 鲜壁虎提取液处理 C6 胶质瘤细胞 24 小时开始,在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳中均显示“Genomic DNA”,无“DNA ladder”出现。对照组基因组 DNA 条带完整(图 2)。

2.4 鲜壁虎提取液对 C6 细胞凋亡的影响 由表 2 看出在鲜壁虎提取液低剂量(5mg/L)组和中剂量(30mg/L)组,随着作用时间的延长,PI<sup>-</sup>/Annexin V<sup>+</sup> 早期凋亡细胞增多( $P < 0.01$ ),且相同作用时间内,凋亡率随浓度升高而增加( $P < 0.05$ ),体现了很多的剂量和时间依赖性。在高剂量(50mg/L)组,凋亡峰值出现于 48 小时,未见凋亡率对作用时间的依赖性(图 3,表 2)。

## 3 讨论

细胞凋亡(apoptosis)是基因控制的细胞主动参与并遵循一定程序的自我消亡过程。新近研究表明,细胞凋亡过程的异常和紊乱与肿瘤的发生密切

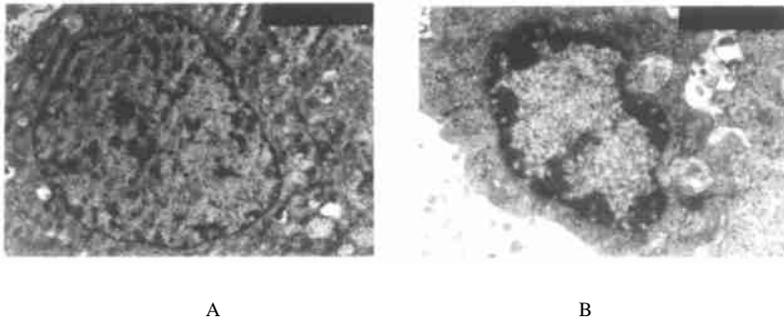


图 1 鲜壁虎提取液处理 C6 胶质瘤细胞前后透射电镜照片

A: 未经鲜壁虎提取液处理的 C6 胶质瘤细胞(放大倍数 ×6700)  
B: 经鲜壁虎提取液处理的 C6 胶质瘤细胞(放大倍数 ×10000)

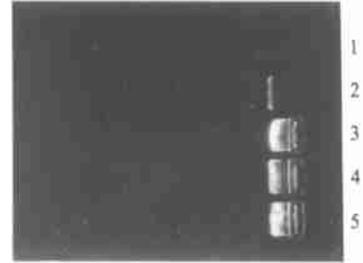


图 2 鲜壁虎提取液处理 C6 胶质瘤细胞前后的 DNA 断裂分析

1:Hind 分子量 markers;2: 未经鲜壁虎提取液处理的 C6 胶质瘤细胞;3~5: 分别经 5mg/L,30mg/L,50mg/L 鲜壁虎提取液处理的 C6 胶质瘤细胞。

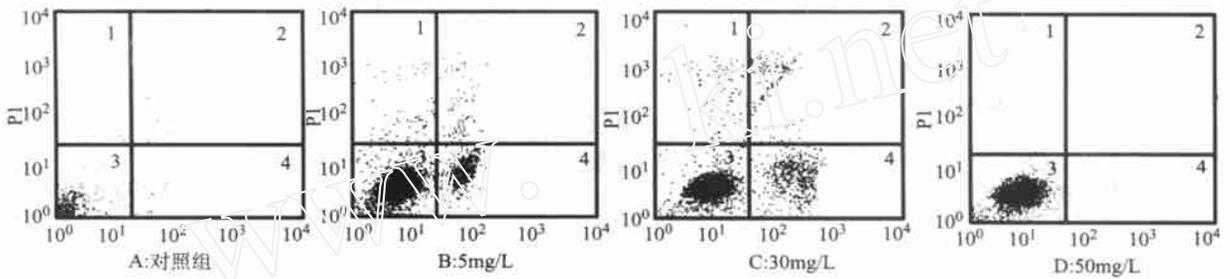


图 3 鲜壁虎提取液处理 C6 胶质瘤细胞 72 小时后的流式细胞仪分析  
1: 机械损伤细胞;2: 坏死细胞;3: 活细胞;4: 凋亡细胞

表 2 鲜壁虎提取液对 C6 细胞凋亡率的影响

浓度 (mg/L)	48h	72h	96h
0	0.1860 ±0.05030	0.6500 ±0.30083	0.6000 ±0.27973
5	0.4900 ±0.17607	0.7240 ±0.58252	2.3060 ±1.67342 *
30	0.7220 ±0.20681 *	2.2420 ±0.38389 **	6.3667 ±1.99212 **
50	1.8040 ±0.69529 **	0.4120 ±0.36806	0.6450 ±0.27958

\* P<0.05, \*\* P<0.01, n=5

相关。神经系统肿瘤有不同程度的细胞凋亡的减少<sup>[2]</sup>。因此,诱导肿瘤细胞凋亡已成为当今肿瘤治疗的热点之一。近年来发现一些中药成分(一榄香烯吗素,人参皂甙 Rh<sub>2</sub>,灵芝菌丝体多糖等)均有诱导肿瘤细胞凋亡的作用<sup>[3-5]</sup>。

经鲜壁虎提取液处理的 C6 细胞,光镜下出现细胞间失去彼此连结,收缩变圆,轮廓更加清楚;电镜下出现染色质浓缩聚集,核变小,核质延核膜内侧排列现象,与 Kerr 提出的凋亡的形态学变化一致。特异 DNA 梯状排列(DNA ladder)是细胞凋亡的典型生化改变。继 Cohen 第一次观察到凋亡胸腺细胞出现典型形态学改变和生化改变分离<sup>[6]</sup>后,相继有类似的报道<sup>[7,8]</sup>。本实验未出现 DNA ladder,这与 Ornerod<sup>[9]</sup>和 Catchpole<sup>[10]</sup>诱导细胞凋亡相似,即凋亡形态学特征明显而无 DNA ladder 出现。Cohen 及其他实验表明,凋亡细胞的形态学变

化先于 DNA 断裂出现。不同诱导物对不同细胞系的致凋亡机理可能不同,判定凋亡出现与否必须综合形态学、DNA 断裂研究及凋亡的一些定量指标综合进行判定。流式细胞分析是定量研究凋亡的方法之一,本实验表明,在 5mg/L 到 30mg/L 剂量范围内,C6 细胞的凋亡率呈现明显的时间和剂量依赖性,说明小剂量的鲜壁虎提取液长时间作用于 C6 胶质瘤细胞可以诱导其凋亡。而大剂量组的作用并不稳定。

凋亡是一种程序性的细胞死亡,在此过程中细胞膜完整,无细胞质溢出,无炎症和疤痕形成,不会出现因其导致的神经系统损害和癫痫发作。这对神经系统肿瘤的病人有特殊意义。

传统的炮制壁虎的方法是去除内脏后烘干,目前临床有鲜用并不去内脏的报道,对于鲜用效优还是炮制用效优还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 陈明,等.中药壁虎现代研究进展[J].世界科学技术—中药现代化,2001,3(4):53-56.  
[2] Schiffer D, Cavalla P, Migheli A, et al. Apoptosis and cell proliferation in human neuroepithelial tumors[J]. Neuroscience Lett, 1995, 195(1):81-84.  
[3] 卢步峰,等.一榄香烯吗素抗肿瘤作用的实验研究[J].中国组织化学和细胞化学杂志,2000,9(1):78-82.

- [4] 李殿友,等.人参皂甙 Rb<sub>2</sub> 对 C6 胶质瘤细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用[J].白求恩医科大学学报,2000,26 (4):342-344.
- [5] 胡映辉,等.灵芝菌丝体多糖通过增强小鼠巨噬细胞功能诱导 HL-60 细胞凋亡[J].中国药理学通报,1999,15 (1):27-30.
- [6] Cohen,G.M.,Sun,X -M.,etal.Keyumor phologicalfeaturesof apoptosisintheabsenceofinternucleosomalDNAfragmentation[J].Biochem.J.,1992,286 (2):331-334.
- [7] Ucker,D.S.,etal.Genomeeditingisadispensableconsequenceofphysiologicalcelldeathmediatedby cytotoxicT lymphocytes[J].Mol.CellBiol.1992,12 (7):3060-3069.
- [8] Barbieri,D.etal.Inhibitionofapoptosisbyzinc:apraisal.Biochem.Biophys[J].Res.Comm.,1992,187 (3):1256-1261.
- [9] OrmerodMG,O 'NeilCFO,RobertsonD,etal.Cis platininduceapoptosisinhuman pvariancarcinomacellinewithoutacommitantinternucleosomalde gradation[J].Exp CellRes,1994,211 (2):231-237.
- [10] Catch poleD,BernardWS.Etoposide-inducedcytotoxicityinhumanT -cellline:delayedmembrane permeabilityratherthanDNA fragmentationasanindicatorof programmedcelldeath[J].Cancer Res,1993,53 (18):4287-4296.

(贺文校对)

## 技术交流

# 小儿枕骨大孔区肿瘤的诊断与显微手术治疗

罗智刚,黄书岚,晏炳元,陈谦学,史强,蔡强

关键词:小儿;枕骨大孔区;肿瘤;MRI;显微手术  
 中图分类号:R730.4;R651.1 +1 文献标识码:B  
 文章编号:1000-8578(2003)06-0461-01

### 0 引言

枕骨大孔区肿瘤的发生率较低<sup>[1]</sup>,小儿枕骨大孔区肿瘤临床上更是少见。我院神经外科 1995~2002 年共收治 5 例。回顾性分析报道如下。

### 1 资料和方法

#### 1.1 一般资料

本组 5 例,男 3 例,女 2 例;年龄 6~13.5 岁,平均年龄 10.2 岁;病程 2 个月~2.2 年,平均 1.3 年。均为髓外肿瘤,其中脑(脊)膜瘤 3 例,神经鞘膜瘤与脂肪瘤各 1 例。

#### 1.2 临床表现

本组 5 例,首先症状均为不同程度的枕部及颈后部疼痛,麻木及颈部活动受限。其中伴有单侧肢体麻木,乏力者 3 例;胸闷呼吸困难者 1 例;副神经功能障碍 2 例;小脑症状 1 例;无 1 例出现颅高压症状。

#### 1.3 影像学检查

5 例颈椎 X 线摄片检查未发现异常;CT 扫描 4 例,2 例未发现异常;全部病例行 MRI 检查均确诊。

#### 1.4 治疗情况

全部病例均在手术显微镜下行肿瘤全切术。位于延髓偏背侧者(2 例)采用后颅窝正中切口,位于延髓腹外侧

者(3 例),采用远外侧入路。

### 2 结果

- 2.1 本组 5 例,肿瘤均获全切,无 1 例死亡。术后随访均已恢复正常的学习、生活。
- 2.2 术后并发症:发生脑脊液漏 1 例,行硬膜修补术后治愈;消化道出血 2 例,对症处理后治愈;无颅内感染。

### 3 讨论

#### 3.1 诊断特点

枕骨大孔区肿瘤症状不典型,缺乏阳性体征,早期常常被误诊<sup>[2]</sup>。MRI 是诊断枕骨大孔区肿瘤的最佳手段,如同时进行增强扫描,几乎全部枕骨大孔区肿瘤均可确诊<sup>[3]</sup>。小儿患者由于以下原因往往更易发生误诊:小儿脑肿瘤颅高压症状发生较晚;语言表达能力较差,反映症状不确切;常常首诊于儿科、神经内科,专科医师缺乏对此类肿瘤的认识;发病率较低,临床医师往往忽略发病的可能性。本组 5 例,4 例首诊于儿科,1 例首诊于神经内科。3 例曾被误诊(占 60%),其中误诊为脊髓空洞症 2 例,误诊为脱髓鞘病 1 例。故小儿发生上述相关症状时,切不可忽略枕骨大孔区肿瘤的可能性,必要时宜在神经系统检查的基础上及时行 MRI 检查。

#### 3.2 治疗

小儿枕骨大孔区肿瘤一经确诊应尽早手术治疗<sup>[2]</sup>。由于该区为延髓呼吸中枢及高位颈髓所在,且椎动脉穿过两旁的横突孔而进入颅内,故手术需十分谨慎。术前要多方位成像,详细了解肿瘤与上述各结构的关系。麻醉插管时应注意避免颈部过度后伸或屈曲压迫脑干而致呼吸心跳停止。术中要加强脑干功能检测。手术要在显微镜下进行,手术入路根据文献记载<sup>[4]</sup>有前入路和后人路两类,而后者更常用,它包括远侧面入路、枕后正中入路。本组 5 例,2 例肿瘤位于延髓偏背侧,采用后正中入路,3 例肿瘤位于延髓腹外侧,采用远侧面入路。肿瘤均获全切。手术应注意的问题:小儿血容量较成人少,对失血的耐受力差,术前应做好充分输血、输液的准备;术中要保护好椎动脉、小脑后下动脉、延髓及后组颅神经;小儿头皮薄,皮下组织和肌肉不如成人发达,故发生脑脊液漏和皮下积液的可能性高<sup>[5]</sup>,故术毕要严密缝合硬膜及皮下各层;术后颅颈稳定性常受破坏,小儿由于颈部肌肉不如成人发达,表现更为突出。故术后应绝对卧床休息 1 月,并予颈托固定 2~3 月。

### 参考文献:

- [1] 浦佩玉,薛庆澄.枕大孔区肿瘤[J].中华神经外科杂志,1987,3 (1):3.
- [2] 刘道坤,蔡用武,陈长.枕骨大孔区肿瘤[J].中华神经外科杂志,1995,11 (3):129.
- [3] 王忠诚,张俊廷,刘阿力.延颈部胶质瘤及其显微外科治疗[J].中华神经外科杂志,1998,14 (5):261.
- [4] 王忠诚.神经外科手术学[M].北京:科学出版社,2000.278-283.
- [5] 项全申.实用小儿神经病学[M].北京:人民卫生出版社,1988.369-375.

(刘红武校对)

收稿日期:2003-04-10;修回日期:2003-07-18  
 作者单位:430060 武汉大学人民医院神经外科