

能与其刺激 β -胰岛细胞释放胰岛素有关。

参 考 文 献

- 1 徐叔云,等主编. 药理实验方法学(第2版). 北京:人民卫生出版社,1991. 1121,1272
- 2 Chandler A B. Lab Invest, 1958, 7: 110

- 3 傅方浩,等. 白求恩医科大学学报, 1987, 13(1): 1
- 4 Awoxd A B, 等. Biochem Biophys Res Commun, 1979, 86: 138

(1997-01-02 收稿)

小檗胺及其衍生物对恶性黑色素瘤细胞增殖的影响[△]

南开大学分子生物学研究所(天津 300071)
天津市肿瘤研究所

张金红* 段江燕 耿朝晖 陈家童
黄建英 李 希

摘 要 观察小檗胺及其衍生物(B₂、B₄、BB、EBB)对培养的恶性黑色素瘤细胞(Bowes Cell)增殖都有明显的抑制作用,其抑制增殖的 IC₅₀值分别为小檗胺(Bo)9.5 μ mol、B₂:3.34 μ mol、B₄:3.04 μ mol、BB:4.5 μ mol、EBB:1.5 μ mol。对³H-TdR 掺入和单细胞集落形成(克隆)以及脱氢酶活性同样有明显的抑制作用,其作用特点是经化学修饰后的小檗胺的作用比母体小檗胺强;而4种衍生物中,EBB的抑制效果最强。

关键词 小檗胺 衍生物 Bowes 细胞 增殖

小檗胺是一种具有多种药理作用(如升高白细胞、抗结核、抗矽肺及调节机体免疫功能)的双苄异喹啉类化合物^[1]。过去,我们首先发现小檗胺是一种新型钙调蛋白(CaM)拮抗剂,还发现对它的结构进行化学修饰后,拮抗 CaM 的能力比小檗胺高出几倍至一百多倍,其中 EBB: [O-(4-乙氧基)-丁基]-小檗胺是目前为止国内外发现的最强的 CaM 拮抗剂之一,其拮抗 CaM 的 IC₅₀ 值为 0.35 μ mol^[2];且专一性系数比小檗胺高出 6.5 倍之多,说明 EBB 的特异性(对 CaM)更高。

CaM 作为细胞内多种生理功能的调节剂^[3],在细胞生长增殖过程中起着重要的作用^[4]。研究表明,恶性增殖的细胞中 CaM 的含量和活性往往高出正常细胞。已有许多实验证明^[5],CaM 拮抗剂对肿瘤细胞的增殖有一定的抑制作用。

我们以体外培养的 Bowes 细胞为材料,观察了改性前后,小檗胺及 4 种衍生物对该细胞生长增殖的影响,探讨了这类化合物的结构与抑制增殖能力的关系。

1 材料

DMEM 培养基:购自 GIBCO 公司,³H-TdR:为北京 401 所产品,MTT:Sigma 产品,小檗胺:北京东升制药厂,小檗胺衍生物 B₂ (O-ethylberbamine), B₄ (O-butylberbamine), BB (benzoylberbamine) EBB 均为本室合成。Bowes 细胞:天津市肿瘤研究所提供。

2 方法

2.1 Bowes 细胞培养在含有 10% 新生牛血清(FBS)的 DMEM 细胞培养液中,置 5% CO₂, 37℃ 的培养箱中培养 Bowes 细胞,3~4 d 后传代。

* Address: Zhang Jinhong, Institute of Molecular Biology, Nankai University, Tianjin

张金红 副研究员,1975年毕业于南开大学生物系。主要研究方向,酶学及生物活性物质。主要进行稀土离子对依赖钙调素(细胞内激活因子)的金属酶(Ca²⁺-Mg²⁺ ATPase)和人红细胞膜 Na⁺/K⁺ ATPase 活性影响的研究,此外还系统地进行了钙调素拮抗剂抗肿瘤方面的研究。共发表相关论文近 30 篇。

[△] 天津市自然科学基金资助项目

2.2 小槲胺类化合物对 Bowes 细胞生长增殖曲线的影响^[6]: 将接种量($\times 10^4$ cell/mL)一定的细胞分成实验组和对照组, 培养 24 h 后, 加入不同浓度的小槲胺或衍生物到实验组, 对照组以相应培养液代之。每 24 h 进行活细胞计数, 绘制各种化合物作用后, Bowes 细胞的生长曲线, 计算相对存活率。

2.3 集落形成试验^[6]: 将 2×10^2 cell/mL 对数生长期的个形态细胞接到 6 孔细胞培养板中(培养液含 20% FBS), 待细胞开始分裂时加入不同浓度的待测物。继续培养 1 周后, 更换培养液和相同量化合物一次, 两周后, 用氨基黑染色, 计算集落形成率和存活率。

2.4 ^3H -TdR 掺入试验^[7]: 接对数生物期的细胞($\times 10^4$ /mL)到 24 孔板中, 培养 24h 后加药, 继续培养 24h 后, 吸除并用磷酸缓冲液洗去未掺入的 ^3H -TdR, 处理后记数 cpm, 以对照组 cpm 数为 100%, 计算药物对 ^3H -TdR 掺入的抑制率。

2.5 MTT 法测活细胞存活率: 采用 Mosmann 法^[8]。以未加药组 570 nmOD 值为 100%, 计算药物对细胞降解 MTT 的相对抑制率。

3 结果与讨论

3.1 小槲胺及衍生物对 Bowes 细胞生长曲线的影响: 如图 1 所示, 对照组细胞增殖旺盛, 一直处于对数生长期; 实验组伴随化合物种类和浓度的不同, 细胞增殖受到抑制的程度也不同。0.25 $\mu\text{mol/L}$ 各种化合物作用细胞 48 h 后, 细胞增殖的抑制率分别是: EBB 85.8%、BB68.7%、 B_4 32.7%、 B_2 24.5%、Bo7.4%; 化合物作用 72 h 后, 对 Bowes 细胞增殖抑制的 IC_{50} 值见表 1。这些结果说明化学修饰后的小槲胺衍生物抑制 Bowes 细胞增殖的能力比小槲胺明显增强。而衍生物的取代基不同 (B_2 - C_2H_5 、 B_4 - C_4H_9 、EBB- $(\text{CH}_2)_4$ -O- C_2H_5 、BB-OCC $_6\text{H}_5$), 分子的疏水性和空间结构也略有不同, 所表现出的抑制效果也不同, 4 种衍生物中 EBB 的效果最显著, 与酶学实验的结果相符^[2]。

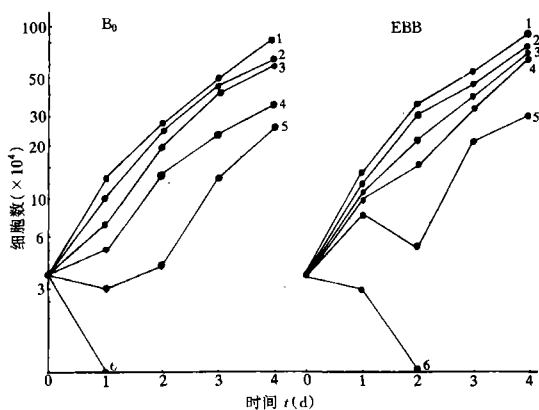


图 1 Bo 和 EBB 的浓度对 Bowes 细胞生长的影响

	Bo	EBB
1-	对照	对照
2-	2.5 $\mu\text{mol/L}$	0.2 $\mu\text{mol/L}$
3-	5.0 $\mu\text{mol/L}$	0.5 $\mu\text{mol/L}$
4-	10.0 $\mu\text{mol/L}$	1.0 $\mu\text{mol/L}$
5-	15.0 $\mu\text{mol/L}$	2.5 $\mu\text{mol/L}$
6-	20.0 $\mu\text{mol/L}$	5.0 $\mu\text{mol/L}$

表 1 5 种小槲胺类化合物作用 72 h 后, 对 Bowes 细胞增殖的影响

化合物	Bo	B_2	B_4	BB	EBB
$\text{IC}_{50}(\mu\text{mol/L})$	9.5	3.34	3.04	4.5	1.5

3.2 Bo 和衍生物(BB、EBB)对 Bowes 细胞集落形成的影响: 3 种小槲胺类化合物对 Bowes 细胞的集落形成都有明显的抑制作用。0.25 $\mu\text{mol/L}$ 的 EBB 对 Bowes 细胞集落形成的抑制率达 43.7, 而 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 的小槲胺的抑制率也只有 45.2%, 作用效果相差近 10 倍。而取代基碳原子数比 EBB 还多一个的 BB 效果与小槲胺近似, 为 48.2%, 说明化合物的空间构象不同, 其生物效应也不尽相同。

3.3 小槲胺类化合物对 Bowes 细胞 ^3H -TdR 掺入的影响: 表 2 所示, 几种化合物对 Bowes 细胞 ^3H -TdR 掺入都有明显的抑制作用, 与抑制增殖相似, 小槲胺的作用不及它的衍生物。

表 2 5 种小檗胺类化合物对 Bowes 细胞³H-TdR 掺入的影响

化合物	Bo	B ₂	B ₄	BB	EBB
IC ₅₀ (μmol/L)	15	12.5	3.5	5.0	3.5

3.4 小檗胺类化合物对 Bowes 细胞能量代谢的影响:采用 Mosmann 根据活细胞和生长旺盛细胞能代谢 MTT 产生甲臢原理的 MTT 比色分析法,测定了 5 种化合物对 Bowes 细胞能量代谢的影响,结果如表 3。几种化合物对 Bowes 细胞降解 MTT 都有抑制作用,且与浓度呈正相关。结果还显示出衍生物的作用强于小檗胺,而 EBB 对 Bowes 细胞代谢 MTT 影响最大;EBB 在 1 μmol/L 时对 Bowes 细胞降解 MTT 的抑制率达 72% (EBB 对 Bowes 细胞增殖抑制的 IC₅₀ 值为 1.5 μmol),说明 EBB 不仅能抑制 Bowes 细胞的增殖,也对活细胞内代谢水平有一定的抑制作用。

表 3 小檗胺类化合物对 Bowes 细胞降解 MTT 的影响

浓度	抑制率(%)				
	Bo	B ₂	B ₄	BB	EBB
1.0 μmol/L	14	32.5	66	17	72
5.0 μmol/L	22.5	47.5	81.6	29	83.5

CaM 是一种酸性小分子钙结合蛋白,含有苯丙和甲硫氨酸等疏水性氨基酸。而 CaM 拮抗剂又多具有疏水结构和带正电荷的特点^[9]。CaM 与 Ca²⁺ 结合后暴露出的疏水结构与细胞内靶酶结合,进而调控细胞的生理功能和细胞的生长和增殖。CaM 拮抗剂靠其疏水结构和带正电荷与 Ca²⁺-CaM 复合体结合,达到拮抗 CaM 活性的目的,这一观点已被许多实验所证实。小檗胺具有拮抗 CaM 的作用,而经化学修饰后的衍生物,无论是烷基化的(B₂、B₄、EBB),还是酰基化的(AB、BB)其疏水性均大于小檗胺,所表现出的拮抗 CaM 活性的能力也强于小檗胺^[2]。从本实验结果看,小檗胺衍生物抑制细胞增殖的能力均强于小檗胺,说明 CaM 参与细胞增殖;而 CaM 拮抗剂能抑制细胞内 CaM 对酶系统的调控,使细胞的增殖受到抑制。在本实验条件

下,小檗胺及衍生物对 Bowes 细胞增殖抑制程度为 Bo<BB<B₂<B₄<EBB;烷基化的小檗胺衍生物的疏水性 EBB>B₄>B₂,说明拮抗剂的疏水结构对拮抗 CaM 活性的能力影响很大。CaM 的这种特性在类似物 W-5(IC₅₀ 6.4 μmol 和 W-7(IC₅₀ 18 μmol)对人卵巢癌细胞的影响中亦得到证明^[10]。化合物的空间结构对细胞增殖的抑制能力也有一定的影响,BB 的疏水性不比 EBB 差,但对 Bowes 细胞增殖的抑制能力低于 EBB 3 倍之多。

从四方面实验得到相同的结果,小檗胺衍生物对 Bowes 细胞的增殖抑制程度比小檗胺高;几种衍生物中,EBB 的效果最强。EBB 对 Bowes 细胞代谢 MTT 能力影响比细胞增殖的抑制能力强的特点,进一步说明 EBB 对 Bowes 细胞增殖影响的实质是能量代谢减慢、细胞老化、最终使细胞死亡。其原因可能是 EBB 通过阻断 CaM 调控,使细胞的酶系统处于低活状态所致。在研究中还发现(另文发表),培养中的正常细胞(牛胚肾细胞)的增殖,EBB 影响不及小檗胺强,即小檗胺对正常细胞的毒性大于 EBB。

总之,作为专一性较强的 CaM 拮抗剂——EBB 是一种有前途的抗肿瘤化合物,小檗胺结构的修饰所带来药效的提高又为中草药有效成分的研究提出了新的内容。而研究 CaM 拮抗剂与抗肿瘤细胞增殖的关系,必将为抗肿瘤药物的开发和筛选开辟新的途径。

参考文献

- 1 刘昌孝,等.中草药,1983,14(1):45
- 2 张遂坡,等.生物化学与生物物理学报,1988,20(1):13
- 3 Cheung W Y, Science, 1980, 207(1):19
- 4 James G, et al. Involment in Regulation of Cell-Cycle Progression, 1982, 28:41
- 5 William N Hait, et al. J Clin Onco, 1986, 4(6):994
- 6 章静波,等.细胞生物学实用方法和技术.北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1995:52
- 7 Neil S M, et al. J Invest Dermatol, 1984, 83:15
- 8 Mosmann T. J Immunol Methods, 1983, 65:55
- 9 徐友涵.国外医学—分子生物学分册,1985,7(3):116
- 10 Yoshihiro Kikuchi. Biochem Biophys Res Commun, 1984, 123(1):385

(1996-03-06 收稿)