

表 7 溶血素试验

组别	剂量 (mg/kg·d)	最大稀释度
对照组	—	1: 512
5-Fu	15	1: 32 **
内折香茶菜乙素	12.5	1: 512
	25	1: 256 *

表 8 对 DNCB 诱导的小鼠迟发性超敏反应的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg·d)	动物数	耳肿胀度 (mg)	脾指数 (mg/10g)	胸腺指数 (mg/10g)
对照	—	8	1.53±0.21	84.52±8.24	45.04±4.39
CPA	15	8	2.02±0.33 *	43.82±9.02 *	19.21±3.07 *
内折香茶菜乙素	12.5	8	1.67±2.04 [†]	76.45±9.61 [†]	39.66±5.37
	25	8	1.65±2.87 [‡]	79.65±7.45 [‡]	43.35±2.14 [‡]

较强的抗肿瘤作用,且抗瘤谱较广,能抑制 Lewis 肺癌,肉瘤 S₁₈₀实体型,以及肝癌 HCA 实体型等实体瘤的增长,也能明显延长荷肉瘤 S₁₈₀腹水型和荷肝癌 HCA 腹水型小鼠的生命延长率,其抗肿瘤作用的强弱呈现剂量依赖性

内折香茶菜乙素其抗肿瘤作用稍逊于 5-Fu,对机体免疫机能没有明显影响。内折香茶菜盛产于河南山区,资源丰富,内含的内折香茶菜乙素具有较好

小鼠肝癌 HCA 肉瘤 S₁₈₀, Lewis 肺癌,均为抗肿瘤药物筛选实验中常用的动物移植性肿瘤模型,本文采用这些瘤株进行了内折香茶菜乙素的抗肿瘤作用实验。并通过小鼠溶血素实验和 DNCB 诱导的小鼠迟发性超敏反应实验对小鼠的机体免疫状态影响进行了实验研究。结果表明,内折香茶菜乙素具有

的临床应用价值,可做为一种有前途的抗肿瘤药物,值得进一步深入研究与开发。

参考文献

- 1 李继成,袁宝梅,苏金玲,等. 中草药, 1996, 27(6): 323
- 2 王庆端,王绵英,刘海君,等. 河南医科大学学报, 1987, 22(4): 372
- 3 徐叔云. 药理实验方法学. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 1992 11

(1999-11-02收稿)

鲨鱼软骨制剂诱导人肝癌细胞凋亡及 p21^{WAF1}和 PCNA 表达调控的研究[△]

武警医学院细胞与分子生物学实验室 (300162) 陈莉* 陈小义 徐瑞成

摘要 目的: 探讨鲨鱼软骨制剂 (SCP) 能否诱导 SMM C7721 细胞凋亡及其机制。方法: 以不同浓度 SCP 加入体外培养的 SMM C7721 细胞中,用 MTT 比色法,荧光显微镜,琼脂糖凝胶电泳和免疫细胞化学方法,观察 SMM C7721 细胞形态学,生化和基因表达的变化。结果: SCP 明显抑制 SMM C7721 细胞生长,IC₅₀ 值为 1 mg/mL,荧光显微镜下可见典型的凋亡细胞的形态学改变;琼脂糖凝胶电泳呈现梯状条带 (DNA ladder);免疫细胞化学检测显示 p21^{WAF1} 表达增强,PCNA 表达减弱。结论: SCP 诱导 SMM C7721 细胞凋亡,使 p21^{WAF1} 表达上调,PCNA 表达下降,提示 SCP 是一种有前途的抗肿瘤药物。

关键词 SMM C7721 细胞 鲨鱼软骨 细胞凋亡 p21^{WAF1} PCNA

近年来研究表明,鲨鱼软骨的有效成分具有抗血管生成和抗炎作用^[1],并可通过抑制血管生成而抑制肿瘤细胞的增殖^[2],也有报道,鲨鱼软骨对肺癌、结肠癌和淋巴瘤具有潜在的治疗效果^[3]。沈先荣等人以鲨鱼软骨为原料,经盐酸胍抽提等步骤得到鲨鱼软骨制剂 (Shark Cartilage Preparation, SCP) 能抑制血管生成和 HeLa 细胞的生长,同时提高机

体免疫功能^[4],但关于 SCP 诱导人肝癌细胞凋亡的研究未见报道。本研究以人肝癌细胞 (SMM C7721) 为靶细胞,进一步研究 SCP 抑制肿瘤细胞生长的机制,为 SCP 防治肿瘤的应用提供实验依据。

1 材料

鲨鱼软骨粉由天士力药业公司赠与,人肝癌细胞株 (SMM C7721) 由天津市肿瘤研究所生化室引

* Address: Chen Li, Tianjin Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin

陈莉女,1981年毕业于内蒙古医学院研究生班,现任武警医学院生物教研室副教授。主要从事抗癌药物作用机制的研究,发表科研论文 10 篇,1997 年以第一作者获武警部队科技进步二等奖。

△武警部队资助科研项目,批准号: W K H98027

进; DMEM (Gibco 公司产品); 噻唑蓝 (MTT), 二甲基亚砜 (DMSO), Hoechst33342 和碘化丙啉 (PI) 均为 Sigma 公司产品; 增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 和 p21^{WAF1} McAb 为美国 Santa Cruz 公司产品, SABC-AP 检测试剂盒为武汉博士德生物工程公司产品

2 方法与结果

2.1 SCP 的制备: 按文献^[4]的方法, 取 30 g 鲨鱼软骨粉, 1 mol/L 盐酸胍 200 mL 抽提 48 h, 上清液用 45%~65% 丙酮分级沉淀, 56℃ 温箱烘干后得 SCP, 以 PBS 制成不同浓度水溶液过滤除菌备用。

2.2 细胞培养: SMMC7721 细胞体外培养于 DMEM 培养基中, 内含 10% 胎牛血清, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 青霉素 100 U/mL 和链霉素 100 μg/mL, 置 5% CO₂, 37℃ 孵育箱中培养。取对数生长期的细胞进行实验, 实验数据的统计处理采用 *t* 检验。

2.3 MTT 法检测 SCP 对细胞生长的抑制作用: 将 SMMC7721 细胞浓度调整为 1×10^4 /mL, 接种于 96 孔培养板, 培养 24 h 后, 实验组分别加入 5 种不同浓度 SCP, MTT 还原实验和生长抑制率计算方法按照文献^[5]进行。由表 1 可见, 0.6 mg/mL 的 SCP 作用 48 h 的细胞抑制率为 35%, 随着浓度增加, 抑制作用也显著增强, 5 mg/mL SCP 作用 48 h, 细胞抑制率达 100%, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 约为 1 mg/mL。说明 SCP 对肝癌细胞的生长有显著的抑制作用。

表 1 SCP 对 SMMC7721 细胞的生长抑制作用

组别	药物浓度 (mg/mL)	A _{570 nm}	抑制率 (%)
对照组	—	0.403±0.022	
空白组	—	1.18±0.020	
SCP	10.00	0.390±0.037	100.00
	5.00	0.373±0.058	100.00
	2.50	0.640±0.061	69.54
	1.25	0.778±0.062	51.80
	0.63	0.907±0.030	35.22

与对照组比较: * $P < 0.01$

2.4 细胞形态学观察

2.4.1 倒置光显微镜下观察细胞形态变化: 对照组细胞为多边形, 核大而圆, 多位于细胞中央。而实验组细胞由多边形变为梭型, 细胞体积变小, 颗粒增多, 透明度下降, 药物连续处理 24 h, 0.5 mg/mL 及以上浓度组约有 60% 以上的细胞变圆脱壁, 细胞核偏位, 可见许多的膜包小体形成。

2.4.2 Hoechst 33342/PI 荧光双染法观察细胞形

态学变化: SCP 处理 48 h, 按文献^[6]的方法进行荧光染色, 在荧光显微镜 (日本 Nikon) 下可见对照组细胞核染色质均匀, 被 Hoechst33342 染成蓝色荧光, 经 SCP 处理后, 细胞萎缩, 核染色质凝聚、碎裂, 荧光强度增强的蓝色凋亡细胞明显增多, 约占 35% 以上, 但被染成红色细胞 (坏死细胞) 比例较小。



A-对照组 B-0.2 mg/mL

SCP 处理组 C-1 mg/mL

SCP 处理组 D-DNA marker

图 1 SCP 作用 24 h
SMMC7721 细胞
DNA 凝胶电泳图
谱

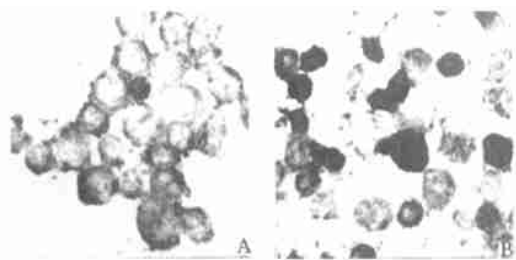
2.5 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测 SCP 诱导细胞 DNA 裂解: 收集细胞 2×10^6 个细胞, PBS 洗涤, 按文献^[5]方法提取 DNA, 样品溶于 30 μL TE 中, 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/mL 溴化乙锭), 50 V 电泳 4 h, 紫外灯下拍照。实验结果可见 0.2 mg/mL SCP 处理 24 h 后, 琼脂糖凝胶电泳呈现凋亡细胞特征性的 DNA 梯形条带 (图 1)。

2.6 免疫细胞化学 (SABC-AP) 检测 SCP 对细胞 p21^{WAF1} 和 PCNA 蛋白表达的影响: 细胞接种后培养 24 h, 加入不同浓度 SCP, 继续培养 24 h,

取出细胞, 丙酮固定, 免疫细胞化学染色步骤按博士德公司试剂盒说明书进行。在镜下可见 p21^{WAF1} 表达阳性产物位于胞核和胞浆, 其中核周区染色较深, 其余区域则较浅; PCNA 定位于细胞核。在放大 200 倍的视野下计数 1 000 个细胞, 计算阳性细胞占总细胞的比例, 每种处理取 4 个标本的均值。由图 2 可见, 1 mg/mL SCP 处理 24 h, 与对照组比较, p21^{WAF1} 表达明显增强, 阳性细胞百分率由 (4.06±1.08)% 升高至 (41.18±4.35)%, 差异具有显著性 ($P < 0.01, n = 4$)。由图 3 可见, PCNA 阳性细胞百分率则由 (61.9±5.46)% 降低至 (5.38±4.98)%, 其表达显著减弱 ($P < 0.01, n = 4$)。

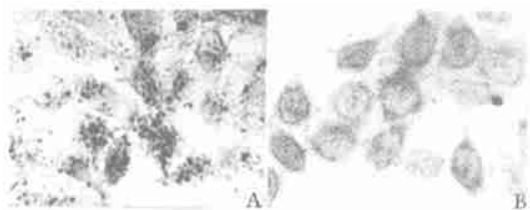
3 讨论

McGuire 曾报道, 鲨鱼软骨对内皮细胞具有特异性的抑制作用, 而对人星形细胞和成纤维细胞却无作用^[7]。Sheu 报道应用鲨鱼软骨纯化的 U-995 研究其对血管内皮细胞迁移和增殖证明 U-995 15~30 mg/mL 明显抑制人血管内皮细胞迁移, 提出 U-



A对照组: p21蛋白表达约有 85% 以上的细胞定位于细胞浆; B-SCP作用 24 h, p21表达增强,约有 40% 以上细胞定位于细胞核

图 2 SMMC7721细胞经消化后制成细胞涂片, p21 SABC-AP免疫细胞化学染色



A对照组: PCNA表达定位于整个细胞,呈大小不等的颗粒状; B-SCP作用 24 h, PCNA在细胞核内表达明显减弱

图 2 SMMC7721细胞爬片 PCNA SABC-AP免疫细胞化学染色

995可通过抑制胶原酶的活性,而抑制血管的生成,因此抑制肿瘤组织生长^[2]。沈先荣等人报道,SCP能使 HeLa 细胞骨架发生凝聚并刺激小鼠脾脏和胸腺淋巴细胞的生长^[4]。在此基础上,我们进一步证实 SCP可有效抑制肝癌细胞的生长,并能诱导其凋亡。在荧光显微镜下可见核碎裂,琼脂糖凝胶电泳得到典型的由 180~ 200 bp 及其倍数的 DNA 片段组

成的梯形条带,这是细胞凋亡的重要指标

细胞凋亡是细胞死亡的一种生理途径,人类肿瘤的凋亡受 3 个主基因 (master genes) 的调控: p53 bcl-2 和 c-myc,这 3 个肿瘤凋亡主基因的平衡支配着人类肿瘤的预后^[8]。p21^{WAF1} 是 1993 年发现的一种新基因位于 p53 的下游,可通过抑制细胞周期蛋白 (Cyclin) 和 PCNA 的活性,阻止细胞进入 S 期,从而抑制细胞增殖^[9]。PCNA 是一种分子量 36 000 的细胞核多肽,是 DNA 多聚酶 δ 的辅助蛋白,是 DNA 复制所必需的物质,在 DNA 合成及细胞增生中起着重要的调节作用^[10]。本研究通过用 SABC 方法检测细胞内 p21^{WAF1} 和 PCNA 的表达证明 SMMC7721 细胞经 SCP 处理后,在诱导其凋亡同时上调 p21^{WAF1} 基因表达,而抑制了 PCNA 的表达,这一结果进一步阐明了 SCP 抑制肿瘤细胞生长的作用机制

参考文献

- 1 Dupont E, Savant P E, Jourdain C, *et al.* Cutant Med Surg, 1998, 2(3): 146
- 2 Sheu J R, Fu C C, Tsai M L, *et al.* Anticancer Res, 1998, 18(6): 4435
- 3 Miller D R, Anderson G T, Stark J J, *et al.* J Clin Oncol, 1998, 16(11): 3649
- 4 沈先荣,贾福星,于志洁,等. 中国生化药物杂志, 1997, 18(3): 123
- 5 徐瑞成,陈小义,陈莉,等. 中华血液学杂志, 2000, 21(7): 359
- 6 元放,张宝泉,徐炎,等. 中华医学杂志, 1999, 79(4): 298
- 7 McGire T R, Kazakoff P W, Hoie E B, *et al.* Pharmacotherapy, 1996, 16(2): 237
- 8 王申五,武沙沙. 中华肿瘤杂志, 1999, 21(4): 308
- 9 周辉,代建新. 国外医学-遗传学分册, 1995, (4): 194
- 10 Jaskulski D, Deriel J K, Mercer M E, *et al.* Science, 1988, 240(4858): 1544.

(2000-04-04收稿)

桑叶延年益寿的药理学研究[△]

浙江大学医学院国家医药管理局新药 (杭州 310006) 唐法娣* 王砚 卞如濂
研究管理中心浙江呼吸药物实验室

摘要 观察桑叶延年益寿的新功效。采用抗应激、抗疲劳试验、老年大鼠 SOD 和脂褐质测定,以及果蝇寿命试验。研究表明桑叶能提高小鼠的耐高温能力和防止由于应激刺激引起的大鼠肾上腺 Vit C 含量降低;能延长小鼠游泳及转棒时间,增强机体耐力作用;能延长果蝇的寿命,提高老年大鼠红细胞内 SOD 和降低大脑、脊髓组织脂褐质含量。提示桑叶能调节机体对应激刺激的反应能力,增强机体耐受能力和延缓衰老作用。

关键词 桑叶 抗应激 抗疲劳 延缓衰老 脂褐质 果蝇寿命试验 超氧化物歧化酶

桑叶为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的叶,桑叶的功用有祛风清热、凉血明目,主治风温发热、头痛、

* Address: Tang Fadi, Medical College of Zhejiang University, Hangzhou
[△]该研究获浙江省科学技术进步三等奖