

。药理实验与临床观察。

海嘧啶对 H₂₂小鼠完整细胞膜脂流动性及人胃腺癌 细胞内 DNA含量影响的研究

季宇彬,张秀娟,孔 琪,高世勇,杨宝峰

(哈尔滨商业大学药物研究所,黑龙江 哈尔滨 150076)

摘 要:目的 研究海嘧啶对 H₂₂荷瘤小鼠红细胞膜的影响以及对人胃腺癌细胞 DNA合成的影响。方法 采用荧光分光光度法及激光扫描共聚焦显微镜进行研究。结果 海嘧啶可使荷瘤小鼠红细胞微粘度下降,膜脂流动性升高,体外实验对胃腺癌细胞内 DNA荧光强度降低,DNA合成减少。结论 海嘧啶可改善荷瘤机体的血液循环,提高红细胞免疫粘附肿瘤细胞的能力,同时通过影响肿瘤细胞内 DNA的合成发挥抗肿瘤作用。

关键词: 海嘧啶;抗肿瘤作用机制;膜脂流动性;肿瘤细胞 DNA

中图分类号: R979. 1; R286. 91 文献标识码: A 文章编号: 0253- 2670(2001)08- 0713- 03

Effect of Haimidin on lipid fluidity in erythrocyte membrane and DNA content in normal and H₂₂ tumor bearing mice

Ji Yu-bin, ZHANG Xiu-juan, KONG Qi, GAO Shi-yong, YANG Bao-feng

(Institute of Materia Medica, Harbin Comercial University, Harbin Heilongjiang 150076, China)

Abstract **Object** To study the effect of Haimidin (HMD) on erythrocyte membrane of H₂₂ ascites tumor bearing mice and DNA synthesis in human gastric tumor cell. **Methods** By fluorescence spectrophotometry and laser scanning confocal microscopy. **Results** HMD can lower erythrocyte microviscosity and elevate membrane lipid fluidity of H₂₂ ascite tumor bearing mice. It also reduced DNA fluorescent intensity and DNA content of gastric tumor cells *in vitro*. **Conclusion** HMD can improve blood circulation of tumor bearing mice, enhance immune adherence of erythrocyte on tumor cells and displays its antitumor activity by interfering DNA synthesis of tumor cells.

Key words Haimidin (HMD); antitumor mechanism; membrane lipid fluidity; DNA of tumor cell

5-Fu (Fluorouracil)抗肿瘤疗效及作用机制已经证实,但作为常规化疗药物存在着诸多副作用,尤其是长期用药引起的骨髓抑制使患者难以长期使用^[1]。而某些中药既具有抗肿瘤作用又能提高机体的耐受性,达到事半功倍的效果。海嘧啶就是基于这样的指导思想,由 5-Fu 与海洋中的药用植物海藻、昆布及植物药黄芪、苦参等组成的新型复方抗癌药物,其抗肿瘤作用已得到肯定^[2]。本研究通过海嘧啶对机体免疫细胞——红细胞的影响及对肿瘤细胞内 DNA的影响,进一步揭示其抗肿瘤的作用机制。

1 实验材料

1.1 动物:昆明种小鼠,体重(20±2)g,雌雄兼用,购自哈尔滨医科大学实验动物中心。H₂₂荷瘤小鼠:

购自哈尔滨医科大学附属第三医院动物研究所。

1.2 药品:海嘧啶:由哈尔滨商业大学药物研究所研制,批号 960517; 5-Fu 上海制药十二厂,批号 961207; DPH Sigma 产品,溶解在四氢呋喃中配成 2×10^{-3} mol/L,保存在棕色瓶中,实验前用等渗 PBS 缓冲液稀释成 2×10^{-6} mol/L; 肝素钠:上海化学试剂公司,批号 F990320; 胎牛血清: Hyclone 产品; PI Sigma 产品,以生理盐水配成 100 μg/mL,避光放置; RNase A: Sigma 产品,用 PBS 配成 2.5 mg/mL,80℃~100℃加热 15 min,冷至室温后分装,-20℃保存。人胃腺癌细胞:购自哈尔滨医科大学公共卫生学院; RPMI1640 培养液: Gibco 产品。

1.3 仪器:激光扫描共聚焦显微镜 (Insight Plus-

收稿日期: 2001-01-11

基金项目: 国家科委生命中心博士基金资助(项目号: 96-901-06-10); 中国优秀博士后基金资助(中博基[1999]17号); 黑龙江省杰出青年基金资助(19906); 黑龙江省自然科学基金项目资助(项目号: D9801)

作者简介: 季宇彬,男,44岁,博士,教授,硕士、博士研究生导师。多年来一直致力于中药药理、肿瘤药理、分子药理学研究,1999年进入哈尔滨医科大学博士后工作流动站工作。

* 哈尔滨医科大学博士后导师

IQ美国 Meridian公司), RF-540荧光分光光度计(日本岛津), Sep85A低温高速离心机(日本日立), 超净工作台(苏州净化设备厂), 二氧化碳培养箱(日本三洋)。

2 方法

2.1 H₂小鼠完整红细胞膜脂流动性的测定: 无菌条件下取 H₂腹水癌细胞 3 mL, 以 0.9%生理盐水作 1:3稀释。取已随机分组的小鼠, 每只腹腔接种 0.2 mL。于停药次日处死, 取全血, 0.1%肝素抗凝, 荧光偏振度的测定见文献^[3], $\eta = 2p / (0.46 - p)$ ^[4], $LFU = 0.5 - p / p^2$ ^[5]。

2.2 人胃腺癌细胞 DNA的测定: 细胞常规复苏传代, 用台盼蓝染色记细胞数量, 用培养液将其调整为 2×10^5 cfu/mL, 分装于各培养瓶中, 细胞贴壁后, 分别换上含各样品浓度的培养液(阴性对照组用 10% 1640培养液, 阳性对照组 5-Fu, 浓度为 50 μ g/mL)。分别于给药后 12, 24, 36, 48 h收集细胞。将不同浓度的样品和生理盐水(空白对照) 40 μ L加至 40 mL细胞悬液中, 5% CO₂ 37℃培养箱中温育 48 h

后, 用 0.125%胰蛋白酶消化, 清洗 70%冷乙醇固定 1.5 h, 加入 200 μ L PBS和 250 μ L RNaseA, 37℃共同保温 10 min。加荧光染料 PI 750 μ L, 室温, 避光染色 30 min, 用 PBS制成细胞悬液, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察细胞形态, 并记录细胞荧光强度, 以细胞的荧光强度反映 DNA的含量。激发波长 488 nm, 40倍物镜下观察^[6]。

2.3 数据处理: 数据经统计分析后, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间用 *t* 检验。

3 实验结果

3.1 海嘧啉对 H₂小鼠完整红细胞膜脂流动性的影响: 见表 1

由实验结果看出: 与正常组相比, H₂小鼠完整红细胞的荧光偏振度增加, 微粘度加大, 膜脂流动性下降, 经过药物治疗后, 荧光偏振度普遍下降, 微粘度也有不同程度的降低, 说明膜脂流动性提高, 其中海嘧啉中剂量作用效果最好, 与生理盐水组比较差异极显著 ($P < 0.001$)

3.2 海嘧啉对人胃腺癌细胞 DNA的影响: 见表 2

表 1 海嘧啉对 H₂小鼠完整红细胞膜脂流动性的影响

组别	剂量 (mg/kg)	荧光强度	微粘度 (η)	膜脂流动性
正常对照	-	0.200 6 $\pm$ 0.072 8	1.755 7 $\pm$ 0.961 6	7.447 8 $\pm$ 2.327 3
生理盐水	-	0.243 0 $\pm$ 0.030 1	2.137 8 $\pm$ 0.618 6	4.355 9 $\pm$ 1.405 1
5-Fu	25	0.227 5 $\pm$ 0.018 2	1.976 0 $\pm$ 0.673 8	5.260 6 $\pm$ 1.547 2
海嘧啉	100	0.233 1 $\pm$ 0.021 1	2.081 9 $\pm$ 0.177 2	4.915 3 $\pm$ 1.536 0
	50	0.172 2 $\pm$ 0.056 7*	1.277 5 $\pm$ 0.416 4	11.037 0 $\pm$ 3.448 9**
	25	0.211 1 $\pm$ 0.022 3*	1.817 6 $\pm$ 0.210 6	6.477 6 $\pm$ 2.089 5*

与生理盐水组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

表 2 海嘧啉作用 12, 24, 36, 48 h后对人胃癌细胞 DNA含量的影响

组别	细胞数 (<i>n</i>)	剂量 (mg/kg)	作用不同时间(h)荧光强度			
			12	24	36	48
生理盐水	30	-	978.6 $\pm$ 143.82	892.69 $\pm$ 138.63	672.69 $\pm$ 98.82	301.65 $\pm$ 85.23
5-Fu	30	50	881.95 $\pm$ 264.84	678.43 $\pm$ 112.15*	457.85 $\pm$ 83.64*	286.60 $\pm$ 112.11
海嘧啉	30	200	897.70 $\pm$ 172.54	613.80 $\pm$ 107.58*	431.19 $\pm$ 194.05*	320.69 $\pm$ 73.29
	30	100	882.05 $\pm$ 242.18	641.33 $\pm$ 139.43*	396.20 $\pm$ 189.81*	248.38 $\pm$ 88.27
	30	50	939.42 $\pm$ 165.89	847.64 $\pm$ 150.69	659.75 $\pm$ 89.82	315.99 $\pm$ 81.11

与生理盐水组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

用激光扫描共聚焦显微镜可见: 12 h时生理盐水组细胞为较完整的圆形, 细胞核形状规则、完整, DNA荧光较强。同一时间段内不同给药组细胞与生理盐水组相比差异不显著, 无统计学意义。24, 36 h后, 生理盐水组细胞虽然是圆形, 但荧光强度略有下降, 给药组细胞变化较大, 细胞核形状不规则, DNA分布不均匀, 荧光强度明显降低, 与生理盐水组相比差异显著 ($P < 0.01$)。而同一时间段内, 又以高剂量、中剂量作用效果最好。给药 48 h后, 生理盐水组细

胞形态及荧光强度都有明显变化, 推测与细胞本身的生理特性有关, 给药组与生理盐水组相比, 只有中剂量组有差异 ($P < 0.05$), 提示海嘧啉对肿瘤细胞的作用并不是随着给药时间的延长而增加的。

4 讨论

膜的流动性是细胞膜的重要力学特性, 红细胞的所有正常生理功能都与细胞膜结构的完整性及脂质双层的流动性有关。红细胞膜的流动性对通透性、变形性、脆性、物质运输、酶的活性都有影响, 与血清

特别是血清脂蛋白成分直接相关^[4]。因此,研究海嘧啶对红细胞膜流动性的影响可以从细胞水平和分子水平探讨其作用机制。众所周知,细胞恶性增殖的分子基础之一即跨膜信号传递链索的异常,肿瘤细胞的恶性转化与再分化可能分别与跨膜信号传递链索的损伤和修复有关,改变或扩增其中的某些分子,就可能引起信号传递链索的失常和分子程序的紊乱,造成细胞的转化和生长失控,引起恶性肿瘤。修复和改变其中的某些分子就可能使损伤了的跨膜信号传递链索得到修复,使恶性肿瘤细胞再分化而促使癌细胞逆转,以上程序涉及到多种蛋白质,特别是膜蛋白和膜脂类。细胞癌变与癌变逆转都与膜流动有关^[7]。本研究证明海嘧啶能降低荷瘤小鼠红细胞膜的微粘度,使膜流动性升高,有助于集体红细胞免疫功能的调整,有助于使损伤的跨膜信号传递链索恢复正常,提高对肿瘤细胞的杀伤能力。

DNA分子位于细胞中的染色体、线粒体中,是一种由简单重复单位构成的线形序列所决定的高分子聚合物,几乎存在于所有细胞遗传,信息储存在DNA分子中,然后以DNA为模板合成RNA,继而以RNA为模板完成蛋白质多肽链的合成。在细胞增殖过程中可将其周期划分为G₁、S、G₂和M期,肿瘤细胞周期与正常细胞周期的速率和时间都是相似的,即周期的长短主要由G₁期的长短来决定。因此,理想的药物应该是杀死癌细胞而正常细胞免受其

害。如绝大多数抗肿瘤药物可以通过直接损伤DNA抑制DNA聚合酶、抑制有丝分裂器,抑制拓扑酶等方式作用于肿瘤细胞^[8]。本研究结果表明:海嘧啶降低肿瘤细胞内DNA含量从而发挥其抗肿瘤作用。随着给药时间的变化,海嘧啶以高、中剂量作用24、36h效果较好。随着给药时间的延长,其作用并不显著,由此可以说明,海嘧啶对肿瘤细胞的影响与其生长周期有关,而肿瘤细胞的周期动力学特点是细胞群主体分布于DNA合成活跃的S期,我们的研究结果又发现肿瘤细胞内DNA含量明显降低,因此,可以推测海嘧啶为一周期特异性药,其主要特点是通过影响肿瘤细胞内DNA的合成而发挥作用,但是海嘧啶是通过何种途径影响到DNA的生物合成还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 张翥林. 抗肿瘤药物的药理与临床应用[M]. 郑州: 河南医科大学出版社, 1999.
- [2] 季宇彬, 高世勇, 孔琪, 等. 海嘧啶抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中草药, 2001, 32(6): 524-527.
- [3] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993.
- [4] 聂松青, 薄惠卿, 林克椿. 蜂花精对大鼠红细胞膜脂流动性的影响[J]. 生物物理学报, 1997, 13(4): 584.
- [5] 唐孝礼, 许实波, 周永红, 等. 鱼精巢DNA对细胞膜和细胞体的保护作用[J]. 中国药理学报, 2000, 16(6): 657-660.
- [6] 司徒镇强. 细胞培养[M]. 北京: 世界图书出版公司, 1996.
- [7] 徐立生, 曲长芝. 抗癌药物巴豆碱、顺铂对红细胞膜的作用[J]. 中华肿瘤杂志, 1995, 17(2): 115.
- [8] 欧阳高亮, 李祺福. 细胞凋亡与肿瘤的发生发展和治疗[J]. 国外医学-肿瘤学分册, 2000, 27(5): 266-268.

1-甲基-4-苯基吡啶离子诱发大鼠小脑颗粒细胞凋亡

蒲小平, 李晓蓉, 李慧农, 李长龄

(北京医科大学药学院 药理室, 北京 100083)

摘要: 目的 建立 1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenyl pyridinium ion, MPP⁺)诱导的大鼠小脑颗粒细胞凋亡模型。方法 MPP⁺处理大鼠小脑颗粒细胞, 分别用甲基绿-派诺宁染色, DNA凝胶电泳, 流式细胞术进行检测。结果 浓度为 50 μmol/L MPP⁺使小脑颗粒细胞发生凋亡。结论 以 MPP⁺为诱导剂建立的大鼠小脑颗粒细胞凋亡模型, 可用于研究和帕金森病(PD)有关的细胞凋亡的调控机制和筛选抗PD药物。

关键词: 1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP⁺); 小脑颗粒细胞; 凋亡

中图分类号: R285.51 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)08-0715-04

Induction of rat cerebellar granular neuron apoptosis by 1-methyl-4-phenyl pyridinium cation

PU Xiao-ping, LI Xiao-rong, LI Hui-nong, LI Chang-ling

收稿日期: 2000-02-12

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目课题, No. G1998051124

作者简介: 蒲小平(1956-), 女, 甘肃人, 副研究员, 博士, 1995年获日本北海道大学药理学博士学位, 现在北京大学药学院分子与细胞药理学系工作。研究方向: 神经细胞凋亡蛋白酶 Caspase-3为靶的药物研究。