

。药理实验与临床观察。

海嘧啶对肿瘤细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

季宇彬,高世勇,孔 琪,张秀娟,杨宝峰*

(哈尔滨商业大学 制药工程系,黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 揭示海嘧啶诱导肿瘤细胞凋亡的机制。方法 采用激光扫描共聚焦技术观察海嘧啶对肿瘤细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响及 $[Ca^{2+}]_i$ 变化时 Ca^{2+} 的来源,采用定磷法测定海嘧啶对肿瘤细胞膜钙泵活性的影响。结果 海嘧啶可显著升高肿瘤细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的浓度, $[Ca^{2+}]_i$ 升高时, Ca^{2+} 同时来源于细胞外钙内流和细胞内钙释放。海嘧啶可显著降低肿瘤细胞膜钙泵活性。结论 海嘧啶通过升高肿瘤细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的浓度,从而启动肿瘤细胞凋亡机制,诱导肿瘤细胞凋亡;海嘧啶升高肿瘤细胞内的作用是通过开放肿瘤细胞膜钙通道,引起肿瘤细胞内钙库释放,降低肿瘤细胞钙泵活性 3条途径达到的。

关键词: 海嘧啶;游离 Ca^{2+} ;钙泵;抗肿瘤机制

中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)12-1093-05

Influence of sea pyrimidine on $[Ca^{2+}]_i$ in tumor cells

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

(Department of Pharmaceutical Engineering, Harbin Commercial University, Harbin Heilongjiang 150076, China)

Abstract **Object** Research studies have clearly shown that sea pyrimidine has definite antitumor activities. Its mechanism is related to its inducement of tumor cell apoptosis. This is a further study to uncover the mechanism of its inducement of cell apoptosis. **Methods** The source of Ca^{2+} as $[Ca^{2+}]_i$ was affected and changed by the influence of sea pyrimidine was observed by laser scanning confocal microscopy. Its influence on calcium pump of tumor cell membrane was determined by phosphorus assay. **Results** Sea pyrimidine can significantly increase the concentration of $[Ca^{2+}]_i$ of tumor cells. The source of Ca^{2+} originated both from inward flow of extracellular calcium current and outward flow of intracellular calcium release. Sea pyrimidine can decrease the activity of calcium pump of tumor cells. **Conclusion** Sea pyrimidine can induce tumor cell apoptosis through increasing $[Ca^{2+}]_i$ level of tumor cell as resulted by opening the calcium pathway, releasing calcium and decreasing the activity of calcium pump in tumor cells.

Key words sea pyrimidine; free Ca^{2+} ; calcium pump; antitumor mechanism

海嘧啶是由抗癌药 5-Fu (5-fluorouracil) 和中药海藻、昆布、黄芪、苦参提取的有效成分组方而成的中西药复方抗癌制剂。在国内外首次将中西药复方引入抗癌药领域,在保持 5-Fu 抗癌作用迅速、疗效确切的同时,充分发挥中药扶正、培本、增效、减毒的优势,降低 5-Fu 的毒副作用,增强机体免疫功能,从而提高肿瘤患者的治愈率。

实验研究已证实,海嘧啶抗肿瘤疗效确切,抗肿瘤机制是通过其诱导肿瘤细胞凋亡而实现的^[1~3]。

Ca^{2+} 是细胞信号转导系统的第二信使物质,在细胞信号转导系统中处于枢纽地位,与细胞凋亡密切相

关。为进一步揭示海嘧啶的抗肿瘤作用机制,我们采用激光扫描共聚焦技术观察了肿瘤细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 及钙泵活性的变化,同时对 Ca^{2+} 的来源进行了探讨。

1 材料

1.1 动物:昆明种小鼠:由哈尔滨医科大学实验动物学部提供,雌雄各半,体重(20±2)g。瘤株: S180 及 H₂ 荷瘤小鼠购自哈尔滨市肿瘤医院肿瘤研究所。SGC-7901 人胃癌细胞株:由哈尔滨医科大学公共卫生学院提供。

1.2 药品:海嘧啶:哈尔滨商业大学药物研究所提

* 收稿日期: 2001-03-11

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: D00-18)

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

供,批号: 960517 5-Fu 上海制药十二厂,批号: 960517 Fluo-3/AM 荧光探针: 美国 Molecular Probe 公司。RPMI1640培养基: Gibco 产品。胎牛血清: Hyclone 产品。维拉帕米: 江苏恒瑞制药厂,批号: 990402

1.3 仪器: 721 型分光光度计: 山东高密分析仪器厂; RF-540 荧光分光光度计: 日本岛津; 恒温水浴箱: 厦门医疗电子仪器厂; 超净工作台: 苏州净化设备厂; 水平高速离心机: 北京医用离心机厂; CO₂ 恒温培养箱: 日本三洋公司; 激光扫描共聚焦显微镜: Insight Plus-IQ 型, 美国 Meridian 公司。

2 实验方法

2.1 肿瘤细胞内 [Ca²⁺] 测定

2.1.1 细胞培养: 人胃癌细胞系 SGC-7901 常规细胞复苏后, 培养于质量分数为 0.1 的小牛血清 RPMI 1640 培养液中, 置于 CO₂ 培养箱 (37℃, 体积分数为 0.05 的 CO₂, 相对湿度 95%) 培养 2~3 d 传代 1 次。

2.1.2 分组与给药: 用台盼蓝染色记录细胞数量, 用培养液将其调整为 2×10^5 个/毫升, 分装于各培养瓶中。实验共分为 6 组, 4 个时间段 6 组分别为 A, B, C₁, C₂, C₃, D 组, 其中 A, B 分别为阴性对照组和阳性对照组, C₁, C₂, C₃ 分别为海嘧啉高、中、低 3 个剂量组, D 为海嘧啉中剂量加维拉帕米组 4 个时间段分别为 12, 24, 36 和 48 h

细胞培养贴壁后, 分别换上含各药品的不同浓度的培养液, 使各药品终浓度分别为: B 组 50 μg/mL, C₁ 组 200 μg/mL, C₂ 组 100 μg/mL, C₃ 组 50 μg/mL, D 组 100 μg/mL 海嘧啉 + 20 μg/mL 维拉帕米, A 组则用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 完全培养液 给药分别培养 12, 24, 36, 48 h 后收集细胞

2.1.3 细胞内游离 Ca²⁺ 浓度的测定: 胃癌细胞系 SGC-7901 加药后分别于不同时间收集细胞, 消化后, 用质量分数为 0.1 的 RPMI 1640 洗两次, 用质量分数为 0.25 的台盼蓝染色, 计数活细胞为 95% 以上, 细胞悬液 37℃ 预温 5 min 后, 用 PBS 及无钙台氏液清洗 2~3 次 加入 100 μL Fluo-3/AM 染液, 37℃ 放置 45 min 用适量无钙台氏液制成细胞悬液, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察细胞内 Ca²⁺ 的变化, 并记录细胞的荧光强度, 以细胞的荧光强度反映 Ca²⁺ 的浓度。测定条件: 激发波长 488 nm, 40 倍物镜下观察。

2.2 肿瘤细胞钙泵的测定

2.2.1 小鼠肿瘤模型的建立: ① 抽取腹水: 将接种后 7 d 的小鼠颈椎脱臼处死, 固定于蜡板上, 腹部皮肤消毒后, 剪开并剥去腹部皮肤, 用高温消毒过的注射器抽取腹水, 放入无菌容器内, 置冰块中保存。另取小量腹水, 置于加有肝素的试管中, 作为观察细胞形态及细胞记数用。将注射器中剩余的腹水, 滴一滴于载玻片上, 推片, 瑞氏染色, 并进行细胞分类记数, 其中癌细胞数为 97% 以上方可使用 ② 接种: 腹水用无菌生理盐水按 1:4 稀释, 对于 S₈₀ 作腋下部位注射接种, 每鼠注射接种 0.2 mL 对于 H₂ 作腹腔注射接种, 每鼠注射 0.2 mL

2.2.2 实验分组与给药: 将小鼠随机分为 5 组: 阴性对照组, 阳性对照组, 海嘧啉高、中、低剂量组, 每组 10 只。小鼠接瘤 24 h 后 ip 药物, 每天 1 次, 连续给药 7 d 阴性对照组给生理盐水, 阳性对照组给 5-Fu, 治疗组给海嘧啉。

2.2.3 肿瘤细胞处理: 停药次日, 处死动物, 迅速剥离出肿瘤组织, 放入冰冷的 0.9% NaCl 中洗去血液, 滤纸吸干, 称重后按 25:1 加入匀浆液中, 在冰浴中用玻璃匀浆器制成组织匀浆, 经 3 层纱布过滤, 滤液于 0℃~4℃ 保存, 当天用于 ATP 酶活力测定或迅速置于 -20℃ 保存, 24 h 内进行酶活性测定。对于腹水型肿瘤, 则在抽取腹水后进行细胞记数, 根据记数结果调整腹水浓度。

2.2.4 肿瘤细胞钙泵活性的测定: 钙泵活性测定参照杨兴易等^[4]的方法进行。取试管 3 只, 做好标记, 在 I、II 试管内加入癌细胞液 0.1 mL, 第 III 管为空白对照, 加入蒸馏水 0.1 mL, 3 只试管内加入底物反应介质 0.7 mL, 终浓度为 30 mmol/L 咪唑, 100 mmol/L KCl, 15 mmol/L NaCl, 4.5 mmol/L MgCl₂, 1.25 mmol/L CaCl₂ 和 5 mmol/L ATP 第 I、II 管内各加入 300 mmol/L 哇巴因 20 μL 以抑制钠-钾泵活性。于第 II 管内加入 EGTA 20 μL 以抑制钙泵活性。将 3 只试管置于 30℃ 水浴恒温振荡器中振荡反应 1 h, 迅速用 306 μmol/L (50%) 三氯醋酸中止反应。以 3 000 r/min 离心 10 min 取上清液 0.5 mL, 加等量定磷试剂, 充分混匀后入 45℃ 水浴锅中 10 min, 721 分光光度计测无机磷含量。波长 650 nm 从第 I 管减去 II、III 所测结果即为钙泵活性。

2.3 数据处理: 结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据采用 *t* 检验进行分析。

3 实验结果

3.1 海嘧啉对肿瘤细胞内 [Ca²⁺] 的影响

3. 1. 1 人胃癌细胞给海嘧啉后细胞内 $[Ca^{2+}]$ 的变化: 见表 1

表 1 人胃癌细胞给海嘧啉后细胞内 $[Ca^{2+}]$ 的变化

组别	给药浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	细胞数 (n)	$[Ca^{2+}]$			
			12 h	24 h	36 h	48 h
A	-	22	320. 26 $\pm$ 147. 99	323. 50 $\pm$ 141. 35	339. 97 $\pm$ 150. 19	328. 45 $\pm$ 135. 15
B	50	25	386. 00 $\pm$ 163. 85 [*]	382. 67 $\pm$ 135. 02 [*]	399. 83 $\pm$ 159. 52 [*]	380. 42 $\pm$ 151. 46 [*]
C ₁	200	23	1 367. 56 $\pm$ 133. 98 ^{**}	824. 63 $\pm$ 155. 65 ^{**}	833. 84 $\pm$ 133. 10 ^{**}	1 119. 55 $\pm$ 193. 94 ^{**}
C ₂	100	23	916. 78 $\pm$ 151. 46 ^{**}	672. 65 $\pm$ 165. 16 ^{**}	684. 3 $\pm$ 148. 45 ^{**}	787. 00 $\pm$ 178. 19 ^{**}
C ₃	50	27	724. 26 $\pm$ 151. 33 ^{**}	532. 46 $\pm$ 146. 76 ^{**}	519. 00 $\pm$ 170. 92 ^{**}	547. 29 $\pm$ 142. 25 ^{**}
D	100+ 20	26	776. 36 $\pm$ 144. 10 ^{Δ}	579. 16 $\pm$ 147. 20 ^{Δ}	583. 67 $\pm$ 144. 80 ^{Δ}	693. 38 $\pm$ 168. 15 ^{Δ}

与 A 组比较: ^{*} $P < 0. 01$ ^{**} $P < 0. 001$; 与 C₂ 及 A 组比较: ^{Δ} $P < 0. 01$

实验结果表明: 海嘧啉可显著升高肿瘤细胞内游离钙离子的浓度 ($P < 0. 001$), 且具有剂量依赖性。维拉帕米组 (D 组) 钙离子浓度处于阴性对照组和海嘧啉中剂量组之间, 且与二者相比均具有统计学差异 ($P < 0. 01$)。5-Fu 也可升高肿瘤细胞内钙离子浓度, 但其强度不及海嘧啉。

3. 1. 2 人胃癌细胞给海嘧啉不同时间后 $[Ca^{2+}]$ 的变化: 见表 2

表 2 给药不同时间后 $[Ca^{2+}]$ 的变化

给药时间 (h)	细胞数 (n)	$[Ca^{2+}]$
12	28	916. 78 $\pm$ 151. 46
24	23	672. 65 $\pm$ 165. 16
36	26	684. 3 $\pm$ 148. 41
48	28	787. 00 $\pm$ 178. 19

实验结果表明: 海嘧啉作用于肿瘤细胞不同时间后, 均可使肿瘤细胞内游离钙离子浓度升高, 但相比较而言, 海嘧啉作用初期 (12 h) 肿瘤细胞内游离钙离子浓度升高的幅度最大。

3. 2 海嘧啉对荷瘤小鼠肿瘤细胞膜 Ca 泵活性的影响: 见表 3

表 3 海嘧啉对荷瘤小鼠瘤细胞膜 Ca 泵活性的影响

组别	剂量 (mg/kg)	给药 途径	动物数 (n)	钙泵活性 ($\mu\text{mol}^{\circ}\text{Pi}/\text{mg}^{\circ}\text{Pr}^{\circ}\text{h}$)	
				S ₁₈₀	H ₂
生理盐水	-	ip	10	10. 85 $\pm$ 0. 86	8. 55 $\pm$ 0. 56
5-Fu	25	ip	10	10. 99 $\pm$ 1. 04	8. 26 $\pm$ 0. 77
海嘧啉	100	ip	10	7. 20 $\pm$ 0. 63 [*]	5. 38 $\pm$ 0. 45 [*]
	50	ip	10	8. 62 $\pm$ 0. 63 [*]	6. 52 $\pm$ 0. 68 [*]
	25	ip	10	9. 97 $\pm$ 0. 71 [*]	7. 98 $\pm$ 0. 47

与生理盐水组比较: ^{*} $P < 0. 05$ ^{**} $P < 0. 01$

3. 2. 1 海嘧啉对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜 Ca 泵活性的影响: 实验结果表明海嘧啉可显著降低 S₁₈₀ 小鼠肿瘤细胞膜钙泵活性, 其中高、中剂量组经统计学处理差异非常显著 ($P < 0. 01$), 低剂量组经统计学处理差异比较显著 ($P < 0. 05$), 即海嘧啉降低 S₁₈₀ 小鼠膜流动性作用强度具有剂量依赖性。而 5-Fu 则无此作用。

3. 2. 2 海嘧啉对 H₂ 荷瘤小鼠瘤细胞膜 Ca 泵活性

的影响: 实验结果表明海嘧啉可显著降低 H₂ 小鼠肿瘤细胞膜钙泵活性, 其中高、中剂量组经统计学处理差异非常显著 ($P < 0. 01$), 低剂量组经统计学处理差异比较显著 ($P < 0. 05$), 即海嘧啉降低 H₂ 小鼠膜流动性作用强度具有剂量依赖性。而 5-Fu 则无此作用。

4 讨论

近年来随着分子生物学技术的发展, 其重要意义受到广泛重视, 特别是与肿瘤的关系已成为当前研究的热点。新观点认为肿瘤的发生不仅是细胞分裂失控导致的细胞过度增生所致, 同时也可能是细胞凋亡通路受阻, 使本该死亡的细胞继续存在而产生肿瘤。海嘧啉能通过诱导肿瘤细胞凋亡而达到抗肿瘤的作用。Ca²⁺ 是细胞凋亡传导系统中的一个重要组成部分, 为了进一步确定海嘧啉诱导细胞凋亡而抗肿瘤的作用机制与肿瘤细胞内 Ca²⁺ 浓度的关系, 我们采用激光扫描共聚焦技术观察了海嘧啉对肿瘤细胞内 Ca²⁺ 浓度的影响, 从而进一步阐明海嘧啉的抗肿瘤作用机制。

钙在体内以两种形式存在: 结合状态和离子状态 (Ca²⁺), 而只有 Ca²⁺ 才具有生理活性, 所谓钙离子又分为细胞外 Ca²⁺ 和细胞内 Ca²⁺ 两种。研究表明细胞内 Ca²⁺ 仅为细胞外的 1/1 000。但正是在这种细胞内 Ca²⁺ 变化的参与下, 调节众多的生理和代谢过程, 特别是在细胞信号传递过程中的作用, 日趋受到重视。Ca²⁺ 目前被认为是一种比较重要的第二信使, 同时也参与或协调其他第二信使的代谢和对细胞功能的调节。

在细胞信号转导系统中, 内源或外源信号经过细胞膜、胞浆传入细胞核, 引起基因表达的变化。信号跨越细胞膜传入胞浆常经过 3 条途径: 酪氨酸蛋白激酶介导, G 蛋白介导和离子通道介导^[5]。而胞浆内信号传导过程中主要包括 3 个信使系统^[6]: 腺苷酸环化酶系统, 肌醇脂质系统和钙调蛋白系统。而由这 3 个信使系统衍化出 5 个相应的传导途径均

可诱导细胞凋亡,这 5 个途径是 (1) 胞内 Ca^{2+} 信号系统; (2) cAMP/PKA 信号系统; (3) DG/PKC 信号系统; (4) 酪氨酸蛋白系统; (5) 神经酰胺途径。在这些信使系统中主要的信号分子包括 cAMP、 IP_3 、PKC、 Ca^{2+} 等,而 Ca^{2+} 在信号传导中起重要作用,是各条信号传导通路的枢纽^[2]。细胞内含量甚微的 Ca^{2+} 对细胞凋亡起着重要作用。因此我们选择 Ca^{2+} 作为研究肿瘤细胞凋亡信号传导机制的突破点。

本研究应用 Fluo-3/AM 为 Ca^{2+} 的荧光指示剂,采用激光扫描共聚焦技术测定 SGC-7901 人胃癌细胞给药不同时间长度细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的动态变化,因此分为 12, 24, 36, 48 h 四个时间段,同时各时间段又分为对照组及不同剂量给药组,以观察海嘧啶影响细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的剂量依赖性。实验结果表明:各时间段给药组 Ca^{2+} 浓度均显著高于阴性对照组 ($P < 0.001$),且海嘧啶高、中、低 3 个剂量组升高 Ca^{2+} 浓度的强度具有剂量依赖性。而从不同给药时间长度 Ca^{2+} 浓度变化来看,给药组 Ca^{2+} 浓度 12 h 最高,其他时间段则较 12 h 有所降低,但均显著高于阴性对照组。这与文献报道 Ca^{2+} 升高对细胞凋亡早期细胞凋亡的启动有关相一致。阳性对照组 5-Fu 也具有升高胃癌细胞内 Ca^{2+} 浓度的作用,与文献报道一致^[7],但其强度不及海嘧啶。

Cohen 等用糖皮质激素诱导胸腺细胞凋亡,发现 $[\text{Ca}^{2+}]$ 持续升高。进一步研究发现引起 DNA 片段化的内源性核酸内切酶是 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 依赖性的,且胞浆浓度升高时,此酶活性明显增强。同样用 Vp16 诱导乳腺癌细胞凋亡以及用肿瘤坏死因子诱导乳腺癌细胞凋亡时,也发现 $[\text{Ca}^{2+}]$ 升高,激活 Ca^{2+} 依赖性的核酸内切酶引起 DNA 片段化和细胞凋亡^[8,9]。海嘧啶可诱导肿瘤细胞凋亡,同时本研究表明海嘧啶可以引起胃癌细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的升高,与其他肿瘤细胞凋亡 $[\text{Ca}^{2+}]$ 变化一致,说明 Ca^{2+} 在胃癌细胞凋亡过程中激活了 Ca^{2+} 依赖性的核酸内切酶,使细胞凋亡。

近年来研究表明,很多信号传导系统调节细胞凋亡过程,它们包括: (1) 胞内钙离子信号系统; (2) cAMP/PKA 信号系统; (3) 二酰甘油/蛋白激酶 C 信号系统; (4) 酪氨酸蛋白激酶活化系统。而 Ca^{2+} 作为多个信号传导系统的枢纽,存在着多条诱导细胞凋亡的途径:① 激活 Ca^{2+} 依赖性的核酸内切酶引起细胞凋亡;② Ca^{2+} 升高后可直接活化 PKC,同时也可辅助 DG 活化 PKC,PKC 是一个具有双功

能的激酶,不仅可调节细胞分化,同时可诱导细胞凋亡;③ Ca^{2+} 升高后, Ca^{2+} 与 CaM 结合成 Ca-CaM 的复合物, Ca-CaM 复合物可激活 AC,从而使 cAMP 升高启动 cAMP/PKA 信号系统,通过活化 PKA 而诱导肿瘤细胞凋亡;④ Ca^{2+} 可调节谷氨酰胺转移酶的活性,引起细胞凋亡,但其具体的凋亡机制尚不清楚。总之, Ca^{2+} 在细胞信息传递中的特殊地位决定了它从多条途径诱导细胞凋亡。而海嘧啶可通过升高肿瘤细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 而达到诱导肿瘤细胞凋亡的目的。

细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 升高时, Ca^{2+} 有两方面的来源:一是细胞外 Ca^{2+} 内流,主要是通过钙通道开放引起 Ca^{2+} 内流;二是细胞内钙库 Ca^{2+} 的释放,细胞内 Ca^{2+} 主要贮存于内质网/肌浆网中,主要受 IP_3 调节。为了观察海嘧啶引起胃癌细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 升高时 Ca^{2+} 的来源,我们设计了维拉帕米组:在给药时,加入中剂量的海嘧啶和维拉帕米的混合物,维拉帕米是细胞膜钙通道阻滞剂。由此本组将可能产生 3 种可能的实验结果: (1) 如果 Ca^{2+} 只来源于细胞外钙内流,则此时维拉帕米组 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的值应与阴性对照组相当; (2) Ca^{2+} 只来源于内钙释放,则维拉帕米组 $[\text{Ca}^{2+}]$ 值应与海嘧啶中剂量组值相当; (3) Ca^{2+} 既来源于外钙内流又来源于内钙释放,则维拉帕米组 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的值应处于阴性对照组与中剂量组之间且与二者均具有显著性差异。本实验结果表明维拉帕米组 $[\text{Ca}^{2+}]$ 高于阴性对照组而低于中剂量组且统计学差异显著 ($P < 0.001$),由此提示:海嘧啶升高细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 诱导细胞凋亡过程中, $[\text{Ca}^{2+}]$ 升高源于细胞外 Ca^{2+} 的进入和细胞内钙库 Ca^{2+} 的释放,即海嘧啶通过引起细胞膜钙通道开放和结合膜表面受体从而引起 IP_3 产生进而引起细胞内钙库 Ca^{2+} 释放两条途径达到升高胞浆 Ca^{2+} 浓度的作用。

我们观察海嘧啶对肿瘤细胞膜钙泵活性发现:接种 S₁₈₀ 和 H₂₂ 的小鼠,未经治疗组 (阴性对照组) 钙泵活性分别为 (10.85 ± 0.86) 和 $(8.55 \pm 0.56) \mu\text{mol} \cdot \text{P}_i / \text{mg} \cdot \text{Pr} \cdot \text{h}$,而经海嘧啶治疗 7 d 后,高、中、低 3 个剂量组钙泵活性较阴性对照组均有下降,经统计学处理差异非常显著 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),且钙泵活性下降程度具有剂量依赖性。因此海嘧啶同时还通过降低钙泵活性来间接达到升高细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的目的。

通过本研究我们得出这样的结论: (1) 海嘧啶通过升高肿瘤细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 而启动肿瘤细胞凋亡机制,达到诱导肿瘤细胞凋亡的目的; (2) 海嘧啶通

过降低肿瘤细胞膜钙泵活性, 开放肿瘤细胞膜钙通道及引起肿瘤细胞内钙库释放 3条途径升高细胞内 $[Ca^{2+}]_i$

参考文献:

- [1] 季宇彬, 高世勇, 孔琪, 等. 海噻啉抗肿瘤作用的实验研究 [J]. 中草药, 2001, 32(6): 524-527.
- [2] 季宇彬, 张秀娟, 孔琪, 等. 海噻啉对 H_{22} 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 [J]. 中草药, 2001, 32(8): 713-715.
- [3] 季宇彬, 高世勇, 孔琪, 等. 海噻啉对 SGC-7901人胃癌细胞凋亡的影响 [J]. 中草药, 2001, 32(10): 901-904.
- [4] 杨易兴. 心力衰竭患者心肌细胞的钙泵活性 [J]. 中国危重病

急救医学, 1996, 8(1): 44.

- [5] Cole K A, Kohn E C. Calcium-mediated signal transduction biology, biochemistry and therapy [J]. Cancer Metastasis Rev, 1994, 13: 33-34.
- [6] 曹泽毅. 激素受体及临床应用 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993.
- [7] 陈戴, 李旭. 5-氟脲嘧啶诱导人卵巢癌细胞凋亡的实验研究 [J]. 肿瘤防治研究, 1988, 25(2): 100.
- [8] Tauber R. Membranes in Tumor Growth [M]. Elsevier Biomedical Press, 1982.
- [9] Robinson J M, Smith D F, Davis E M, *et al.* Partial characterization of rat hepatoma cell surface glycoproteins possession concanavalin A receptor activity [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1976, 72: 81-88.

Stellera chamaejasme induced apoptosis of HL-60 cells and regulated expression of *bcl-2* protein in SGC-7901 cells

JIA Zheng-ping¹, WANG Yan-guang¹, FAN Jun-jie², XIE Jing-wen²,
XU Li-ting², LIU Sheng^{2*}

(1. Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou Zhejiang 310027, China; 2. Department of Pharmacy, General Hospital of Lanzhou Command PLA, Lanzhou Gansu 730050, China)

Abstract Object To explore the antitumor mechanism of *Stellera chamaejasme* Linn. (SC). **Methods** SC containing-serum (SCCS) was derived from mice pretreated with different doses of SC. Cultured human leukemia HL-60 and human gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells were used. Inhibition of proliferation was measured using MTT assay. Morphological assessment of apoptosis was performed with fluorescence microscope. DNA fragmentation was assessed by agarose gel electrophoresis and flow cytometry. Expression of *bcl-2* protein was measured with immunohistochemistry. **Results** Exposure of exponentially growing HL-60 cells to mice serum containing 10% SC (pretreated with SC 3, 6, and 12 g/kg) for 48 h resulted in growth inhibition in a dose-dependent manner. Typical morphological changes of apoptosis and DNA fragmentation in HL-60 cells were induced. "Apobodies" in the apoptotic cells were observed, "ladder" pattern of agarose gel electrophoresis of DNA from these cells was revealed, and the percentage of apoptotic cells with fractional DNA content increased from 11.7% to 57.4%. Treatment with SC containing serum decreased the percentage of SGC-7901 cells of *bcl-2* protein positive expression from 78.3% to 32%. **Conclusion** SC could induce apoptosis of HL-60 cells and decrease the expression of *bcl-2* protein of gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells.

Key words *Stellera chamaejasme* Linn.; apoptosis; *bcl-2* protein; cultured tumor cells; flow cytometry; agarose gel electrophoresis

瑞香狼毒诱导 HL-60 细胞凋亡和 调节 SGC-7901 细胞 *bcl-2* 蛋白表达

贾正平¹, 王彦广¹, 樊俊杰², 谢景文², 徐丽婷², 刘盛²

(1. 浙江大学 化学系, 浙江 杭州 310027; 2. 兰州军区兰州总医院 药剂科, 甘肃 兰州 730050)

* 收稿日期: 2000-10-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 No29972054

作者简介: 贾正平, 男, 40岁, 理学博士, 兰州军区兰州总医院主任药师, 解放军第四军医大学硕士生导师, 教授。现在浙江大学化学系做博士后研究。主要研究方向: 中药及肿瘤药理学。完成的鬼臼毒素衍生物抗肿瘤药理学研究获军队科技进步二等奖。Tel (0931) 8975478