

· 药理实验与临床观察 ·

蜂毒素对小鼠肝癌 H₂细胞增殖的影响

凌昌全,彭永海,张 晨,黄雪强,李 柏*

(第二军医大学长海医院 中医科,上海 200433)

摘要:目的 观察蜂毒素对小鼠肝癌 H₂细胞增殖的影响,探讨其抗肿瘤的可能作用环节。方法 以 MTT 法测定蜂毒素体外对小鼠肝癌 H₂细胞增殖的影响,运用流式细胞术分析增殖细胞核抗原(PCNA)的表达,并观察 iv 蜂毒素对荷瘤小鼠的抑瘤作用。结果 蜂毒素对 H₂细胞的抑制作用随药物浓度增加而增强;蜂毒素作用于 H₂细胞后,细胞 PCNA 平均荧光强度低于对照组;iv 蜂毒素对小鼠皮下 H₂肝癌细胞具有明显的抑制作用,抑瘤作用随浓度增加而增强。结论 蜂毒素在体内外对小鼠肝癌 H₂细胞增殖均有明显的抑制作用,下调细胞 PCNA 表达可能是其作用环节之一。

关键词: 蜂毒素;肝癌;细胞增殖;增殖细胞核抗原

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)10-0921-03

Effect of melittin on growth and proliferation of H₂ hepatocarcinoma cells

LING Chang-quan, PENG Yong-hai, ZHANG Chen, HUANG Xue-qiang, LI Bai

(Department of TCM, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract **Object** To observe the effect of melittin on the growth and proliferation of H₂ hepatocarcinoma cells and study the possible mechanisms. **Methods** The proliferation inhibitory rate of H₂ cells treated with melittin was assayed by MTT. The volume of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression of H₂ cells treated with melittin was analyzed with flow cytometer after being stained with immunocytochemical methods. The antitumor effect of melittin was observed in H₂ tumor-burdened mice.

Results The H₂ cell killing by melittin was dose-dependent. After treatment with melittin, the fluorescence density of PCNA of H₂ cells decreased significantly. Melittin can inhibit the growth of H₂ hepatocarcinoma *in vivo*. **Conclusion** Melittin can inhibit the proliferation of H₂ cells both *in vitro* and *in vivo*. Down-regulating the expression of PCNA of cells may be one of antitumor mechanisms.

Key words melittin; hepatocarcinoma; cells proliferation; proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

蜂毒素是蜜蜂毒的主要成分,对多种肿瘤细胞有杀伤作用。有报道 1 μmol/L 蜂毒素可阻止肿瘤细胞增殖而不抑制正常细胞的生长和克隆率^[1]。以往研究表明,大剂量蜂毒素在体外对多种肿瘤细胞有很强的杀伤作用^[2],小剂量蜂毒素具有诱导细胞凋亡的作用^[3]。本研究在进一步对蜂毒素抗肝癌细胞增殖作用进行观察的同时,初步探讨其抑制肿瘤细胞增殖可能的作用环节。

1 材料

1.1 试剂与药品:蜂毒素为本科实验室采用凝胶色谱法纯化制备(纯度 97%)^[4],环磷酰胺,上海华联制药有限公司,批号 001119;鼠抗小鼠 PCNA 兔抗小鼠 IgG-FITC 为美国 Sigma 公司产品,四甲基偶氮唑蓝(MTT)为 Fluka 公司产品;小牛血清为杭

州四季青公司产品,RPMI-1640 培养基为美国 Gibco 公司产品。

1.2 细胞株:小鼠肝癌 H₂腹水型细胞株为本科实验室保存。

1.3 动物:昆明种雄性小鼠,体重(20±2)g,由第二军医大学动物实验中心提供。

2 方法

2.1 对体外培养 H₂肝癌细胞的杀伤作用:取指数生长期 H₂细胞,以 5×10⁴ 孔细胞接种于 96 孔板中,加入不同剂量的蜂毒素,每孔溶液总体积为 200 μL,共 7 个治疗组,蜂毒素终浓度分别为 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 μg/mL,每组 4 个复孔,另设不加蜂毒素的细胞悬液对照组和空白对照组,每组 8 个复孔,分别在 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 24,

* 收稿日期: 2002-12-15

基金项目:上海市“百人计划”项目(97BR044)

作者简介:凌昌全(1957-),男,教授,博士,博士生导师,主要从事中西医结合防治肝癌研究

E-mail: Lingchangquan@hotmail.com

48 h后,每孔加入 MTT液 (5 mg /mL) 20 μ L,继续避光培养 4 h,离心,弃上清液,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷,振荡 10 min,在酶联免疫检测仪上于 492 nm 波长测定各孔吸光度 (A) 值,按下列公式计算细胞生长抑制率

抑制率 = (1 - $\frac{A_{\text{治疗}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}}$) $\times$ 100%

2.2 对 H₂细胞 PCNA 表达的影响: 取指数生长期 H₂细胞,以 $\times 10^6$ 孔细胞接种于 24 孔板中,加入不同剂量的蜂毒素,每孔总体积 2 mL,共 2 个治疗组,蜂毒素终浓度分别为 2, 6 μ g/mL,另设只加细胞不加药的对照组,于加药后继续培养 24 h 和 48 h,分别收集细胞,1 500 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤 2 次,用终浓度为 0. 002% Triton X-100 预处理 20 min 后,加入 20 μ L (1: 100) 鼠抗小鼠 PCNA 抗体,37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, PBS 洗涤 2 次,加入 20 μ L (1: 50) 兔抗小鼠 IgG-FITC 标记荧光二抗,另设不加 PCNA 抗体 只加 IgG-FITC 标记荧光二抗作为空白对照,37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, PBS 洗涤 2 次,免疫荧光间接法标记 PCNA 采用流式细胞仪进行检测,每个样品收集 10 000 个细胞,以分析软件进行分析。

2.3 对皮下荷 H₂肝癌小鼠的抗肿瘤作用: 昆明种雄性小鼠 120 只,体重 (20 $\pm$ 2) g,分笼饲养,适应

环境 3 d 后开始实验。取指数生长期 H₂细胞,调整细胞浓度为 $\times 10^7$ /mL,每只小鼠右腋皮下接种细胞悬液 0. 2 mL。次日将小鼠随机分为 5 组,每组 24 只,蜂毒素 3 个剂量组分别尾 iv 蜂毒素 4. 5, 3, 1. 5 mg / (kg $\cdot$ d),阳性对照组 iv 环磷酰胺 30 mg / (kg $\cdot$ d),生理盐水组 (空白对照) iv 生理盐水,注射量均为每只 0. 2 mL。连续给药 5 d,休息 2 d,再继续给药 5 d,共给药 10 d。停药后第 2 天各组处死小鼠 12 只,剥取肿瘤称瘤重,其余小鼠观察生存期。抑瘤率按以下公式计算。

抑瘤率 = $\frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{实验组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}}$ $\times$ 100%

2.4 统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间吸光度 A 值及瘤重比较采用秩和检验,率的比较用 χ^2 检验,小鼠生存期比较采用 F 检验,组间比较用 q 检验。

3 结果

3.1 对肝癌 H₂细胞体外生长的抑制作用: 经与蜂毒素共育 24, 48 h, 4 μ g/mL 以下组蜂毒素对 H₂细胞的生长抑制率在 30% 左右,而 8 μ g/mL 以上组对 H₂细胞的抑制作用明显增强,抑制率在 70% 以上,且随药物浓度增高而增强;各剂量组 24, 48 h 两个时间点之间对 H₂细胞的杀伤作用差异无统计学意义,见表 1。

3.2 对肝癌 H₂细胞 PCNA 表达的影响: 蜂毒素

表 1 蜂毒素对肝癌 H₂细胞体外生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Inhibitory effect of melittin on growth of hepatocarcinoma H₂ cells *in vitro* ($\bar{x} \pm s$)

组 别	终浓度 (μ g $\cdot$ mL ⁻¹)	n	A 值		细胞生长抑制率 %	
			24 h	48 h	24 h	48 h
蜂毒素	128	4	0. 038 $\pm$ 0. 004 [*]	0. 035 $\pm$ 0. 001 [*]	100	100
	64	4	0. 042 $\pm$ 0. 004 [*]	0. 039 $\pm$ 0. 003 [*]	99. 3	99. 9
	32	4	0. 112 $\pm$ 0. 005 [*]	0. 114 $\pm$ 0. 004 [*]	85. 8	90. 8
	16	4	0. 123 $\pm$ 0. 024 [*]	0. 121 $\pm$ 0. 004 [*]	84. 0	90. 0
	8	4	0. 193 $\pm$ 0. 013 [*]	0. 284 $\pm$ 0. 029 [*]	71. 9	70. 5
	4	4	0. 398 $\pm$ 0. 012 [*]	0. 603 $\pm$ 0. 059	34. 9	30. 0
	2	4	0. 461 $\pm$ 0. 016	0. 665 $\pm$ 0. 038	23. 5	22. 6
对照	-	8	0. 591 $\pm$ 0. 002	0. 869 $\pm$ 0. 046	0	0

与对照组比较: * $P < 0. 05$ ** $P < 0. 01$

* $P < 0. 05$ ** $P < 0. 01$ vs control group

2, 6 μ g/mL 作用 H₂细胞 24, 48 h 后,流式细胞仪检测各组 PCNA 荧光强度,结果蜂毒素组 24, 48 h PCNA 平均荧光强度均低于对照组;提示蜂毒素对 PCNA 的表达有明显的抑制作用。见表 2。

3.3 对皮下荷 H₂肝癌小鼠的抗肿瘤作用: H₂细胞皮下接种成瘤率 100%。经统计学处理,高、中剂量蜂毒素组、环磷酰胺组平均瘤重明显低于对照组 ($P < 0. 01$),低剂量蜂毒素组与对照组平均瘤重无明显差异;各实验组与对照组相比生存期延长,见

表 2 蜂毒素对肝癌 H₂细胞 PCNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of melittin on PCNA expression of hepatocarcinoma H₂ cells ($\bar{x} \pm s$)

组 别	终浓度 (μ g $\cdot$ mL ⁻¹)	平均荧光强度	
		24 h	48 h
蜂毒素	2	675. 34 $\pm$ 10. 50 [*]	379. 28 $\pm$ 12. 51 [*]
	6	591. 62 $\pm$ 13. 28 [*]	255. 11 $\pm$ 15. 53 [*]
对照	-	1 016. 20 $\pm$ 20. 32	919. 13 $\pm$ 13. 82

与对照组比较: * $P < 0. 05$ ** $P < 0. 01$

* $P < 0. 05$ ** $P < 0. 01$ vs control group

表 3 结果提示:蜂毒素对 H₂皮下移植瘤具有明显的抑制作用,且随浓度增大,抑瘤作用逐渐增强。

表 3 蜂毒素对皮下荷 H₂肝癌小鼠的抑瘤及延长生存期作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 3 Antitumor and prolonging survival time effect of melittin on subcutaneous inoculation mice with H ₂ hepatocarcinoma cells ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)					
组 别	剂 量 /(mg·kg ⁻¹)	平均瘤重 /g	抑瘤率 /%	生存期 /d	生命延 长率 %
蜂毒素	4.5	0.33±0.13	84.3	24.18±1.89*	67.30
	3.0	0.64±0.07	69.5	18.09±1.70*	15.03
	1.5	2.03±0.41	3.3	16.09±1.38	9.04
环磷酰胺	30	0.07±0.02*	96.7	23.6±1.69*	57.06
对照	-	2.10±0.47	0	14.45±1.37	0

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

本实验采用 MTT 法检测了蜂毒素对体外培养的小鼠肝癌 H₂细胞的杀伤作用,结果表明,8μg/mL 以上蜂毒素对 H₂细胞的抑制率均在 70% 以上,作用明显,且随药物浓度增加而增强 本实验还在体外实验的基础上,继续观察了蜂毒素对小鼠皮下 H₂细胞移植瘤的抑瘤效果。结果表明蜂毒素不但在体外可抑制 H₂细胞生长增殖,在体内亦能明显抑制移植瘤的生长,随药物浓度增大,抑瘤作用逐渐增强,同时明显延长了荷瘤小鼠的存活时间。

增殖细胞核抗原 (PCNA) 是真核细胞合成 DNA 所必需的一种酸性核蛋白,近年研究表明其

是 DNA 聚合酶的辅助蛋白之一,调控 DNA 的合成,并在细胞周期中起重要的调控作用^[5]。PCNA 在 G₁后期开始表达,并逐渐升高, G₁/S 期交界处达到高峰, S 期持续高水平表达,到 G₂期明显下降。现已证明 PCNA 的合成与表达与细胞的增殖状态相关,其量的变化与 DNA 的合成一致。本研究结果发现,蜂毒素作用于 H₂细胞 24, 48 h 后,细胞平均荧光强度低于对照组,提示 H₂细胞经蜂毒素作用后,参与 DNA 合成的 PCNA 的表达明显下降,故推测影响 PCNA 的表达可能是蜂毒素抑制小鼠肝癌 H₂细胞生长和增殖的作用环节之一,确切的作用机制值得进一步探讨。

References

[1] Zhu H G, Tayeh I, Israel L, et al. Castagna M different susceptibility of lung cell to inhibitors of tumor promotion and inducers of differentiation [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 1991, 5(2): 52-58.
[2] Ling C Q, Huang X Q, Liu L. The antitumor effect of melittin in vitro [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2001, 22(7): 612-614.
[3] Huang X Q, Ling C Q, Chen Z, et al. Apoptosis of human acute T lymphocyte leukemia cell line 6T-CEM induced by melittin [J]. *J Anhui Coll Tradit Chin Med* (安徽中医学院学报), 2001, 20(5): 39-41.
[4] Liu L, Ling C Q, Hu J H, et al. Isolation, purification and content determination of melittin from bee venom [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2001, 22(7): 609-611.
[5] Waga S, Hannon G J, Beach D, et al. The p^{ri}-inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA [J]. *Nature*, 1994, 369(6481): 574-578.

泽兰有效部分对血小板聚集和血栓形成的影响

石宏志¹,高南南²,李勇枝¹,余竞光²,范全春¹,白桂娥^{1*}

(1. 航天医学工程研究所,北京 100094; 2. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所,北京 100094)

摘要: 目的 研究泽兰有效部分 L-F04对血小板聚集和血栓形成的影响,探讨其活血化瘀作用机制。方法 用高分子右旋糖酐静脉推注造成大鼠血瘀证模型,观察泽兰 L-F04对二磷酸腺苷 (ADP) 诱导的大鼠体内血小板聚集以及体内动静脉旁路血栓、体外旋转环内血栓形成的影响。结果 L-F04 0.408, 0.204 g/kg 对模型组大鼠 ADP 诱导的体内血小板最大聚集率明显增加皆有显著的抑制,且呈剂量依赖关系;与对照组相比,血瘀模型大鼠体外血栓质量明显增加,长度仅有增加趋势, L-F04高、低剂量 (0.408, 0.204 g/kg) 皆有抗血栓形成作用, L-F04高剂量对血栓干质量、湿质量的减轻尤为明显; L-F04高、低剂量对实验性动静脉旁路血栓形成均有明显的抑制作用,抑制率分别为 27.41%, 27.14%。结论 泽兰 L-F04可显著抑制血小板聚集及体内、外血栓形成。

关键词: 泽兰; 血小板聚集; 血栓

中图分类号: R852.22; R286.32 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)10-0923-04

* 收稿日期: 2002-12-18
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770899)
作者简介: 石宏志 (1970-),女,河北永清人,航天医学工程研究所助理研究员,硕士,毕业于中国医学科学院、中国协和医科大学药用植物研究所,研究方向为生药学、航天医学。Tel (010) 66362387 E-mail shihongz2002@yahoo.com.cn