

钙调蛋白拮抗剂——小檗胺及其 衍生物对正常牛胚肾细胞毒性的影响*

张金红 耿朝晖 段江燕 陈家童 贺 宏 黄建英**
(南开大学分子生物学研究所 天津 300071) (**天津市肿瘤研究所)

随着钙调蛋白(CaM)在细胞内多种生理功能被认识,人们对它在细胞周期和增殖过程中的调控作用也越来越重视。随后进行的CaM拮抗剂对多种瘤株体外增殖的抑制作用更证明了CaM参予细胞增殖过程^[1]。研究中普遍感到棘手的是拮抗剂的专一性不强,加上诸多的拮抗剂同时又具有其他方面的药理活性,所以CaM抗肿瘤的研究不像研究它的生理功能那样迅速而深入。大家努力寻找专一性强的CaM拮抗剂用于抗肿瘤增殖的研究,以揭开拮抗剂抑制肿瘤细胞增殖的本质,同时考察拮抗剂的毒性,进而开发利用这类物质服务于人类。

小檗胺是一种对于放疗和化疗等原因引起的白细胞减少症具有升高白细胞作用的机体免疫调节剂^[2]。在我们过去的研究中,已经证明小檗胺是一种新型的天然钙调蛋白拮抗剂;对其结构进行化学修饰,合成了一系列小檗胺衍生物,酶学(红细胞膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase)实验证明改性后的小檗胺衍生物拮抗CaM的能力超过其母体小檗胺几倍到几十倍之多,且专一性系数增高^[3]。先期的细胞学实验结果表明小檗胺衍生物对脑恶性胶质瘤细胞^[4]、人宫颈癌细胞^[5]、腹水癌细胞以及黑色素瘤细胞^[6]等都有明显的抑制作用;引人注意的是改性后的衍生物抑制肿瘤细胞增殖的作用比小檗胺强。此结果与酶学实验结果基本一致,说明这些化合物抑制细胞增殖与拮抗CaM的活性有关。

为了研究小檗胺类化合物对正常细胞的毒性,深入进行这类化合物对细胞增殖的影响,本文以正常的牛胚肾细胞(MDBK)为材料,观察了四种小檗胺类化合物对正常细胞(即生理

浓度CaM细胞)生长增殖的影响以及CaM含量的变化,探讨了小檗胺及衍生物的结构与它们对正常细胞的生长增殖的毒性关系。

材 料 与 方 法

材料

正常牛胚肾细胞(MDBK)由南开大学生化系分子生物学教研室提供,小檗胺(B_0):北京东升制药厂,小檗胺衍生物(EBB 、 B_2 、 B_4)系本室合成,其他试剂均为国产或进口分析纯。

方法

1. 细胞培养 细胞于10%FBS的DMEM培养液中,5% CO_2 ,36.8℃培养,3~4天后传代。

2. 生长曲线制作^[5] 将密度($\times 10^4/\text{ml}$)一定的细胞悬液分为实验组和对照组。培养24小时后,实验组分别加入不同浓度的小檗胺或衍生物,对照组以相应培养液代之;继续培养,每24小时为一活细胞计数点(计数24、48、72小时),绘制生长曲线,计算出相对存活率。

3. ^3H -TdR 掺入实验^[5] 按密度为 $2 \times 10^4/\text{ml}$ 的细胞于24孔板中,分为对照组和实验组培养。24小时后将不同浓度的小檗胺或衍生物或相应培养液分别加到实验组孔和对照组孔,继续培养24小时后,每孔加0.1ml内含 $0.5 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -TdR培养液。掺入24小时后,吸除孔内培养液,用pH7.38的PBS(磷酸缓冲液)洗3遍,每孔加400 μl 10%TCA,4℃下放置10分钟;每孔再加400 $\mu\text{l}/\text{mol/L}$ NaOH,37℃放置16小时后,取一定量样品到4ml闪烁液中,静置后测样品的CPM值,计算 ^3H -TdR摄取抑制率(相对抑制率(%)) = $\frac{\text{对照组 CPM} - \text{实验组 CPM}}{\text{对照组 CPM}} \times 100\%$

4. MTT法测定活细胞存活率^[5] 按100 μl

* 天津市自然科学基金资助项目

($2.4 \times 10^4/\text{ml}$)细胞悬液于96孔培养板中,分为对照组和实验组,培养24小时后,对照组和实验组分别加入相应培养液和小檗胺类化合物100 μl ,继续培养68小时后,加入20 μl 4 mg/ml的MTT,同样条件下继续培养4小时,吸出100 μl 培养液,加入等体积DMSO,振荡使蓝紫色颗粒溶解均匀,于570 nm波长下测OD值,计算MTT相对抑制率(相对抑制率(%)) = $\frac{(\text{对照组} - \text{实验组}) \text{OD}_{570 \text{ nm}}}{\text{对照组} \text{OD}_{570 \text{ nm}}} \times 100\%$

5. CaM含量测定 (1) 细胞样品处理^[5]。(2) PDE法测CaM含量^[5]。

结果与讨论

小檗胺(B_0)和它的衍生物(B_2 、 B_4 、EBB)对正常的牛胚肾细胞生长曲线的影响。图1(A)(B)分别所示 B_0 、EBB对MDBK细胞生长曲线的影响及四种化合物作用MDBK细胞72小时后,相对存活率。从图1可以看到几种化合物对培养中的MDBK细胞的生长均有抑制作用。当培养液中小檗胺的浓度为2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率为12.1%,小檗胺的浓度增加到5.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率降到1.1%;而此浓度下的小檗胺对培养中的HeLa细胞和

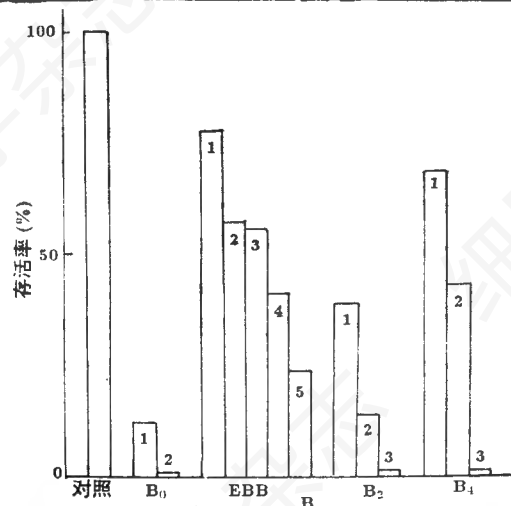


图1(B) 小檗胺及其衍生物作用MDBK细胞72小时后对存活率影响的比较

	B ₀	EBB
1.	2.5 $\mu\text{mol/L}$	0.5 $\mu\text{mol/L}$
2.	5.0 $\mu\text{mol/L}$	1.0 $\mu\text{mol/L}$
3.	—	2.5 $\mu\text{mol/L}$
4.	—	5.0 $\mu\text{mol/L}$
5.	—	7.5 $\mu\text{mol/L}$
	B ₂	B ₄
1.	1.0 $\mu\text{mol/L}$	0.5 $\mu\text{mol/L}$
2.	2.5 $\mu\text{mol/L}$	1.0 $\mu\text{mol/L}$
3.	5.0 $\mu\text{mol/L}$	5.0 $\mu\text{mol/L}$
4.	—	—
5.	—	—

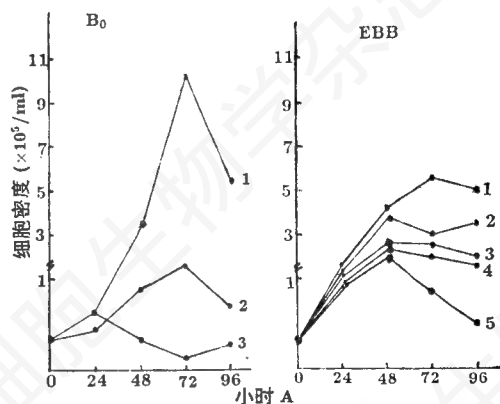


图1(A) B_0 、EBB对MDBK细胞增殖的影响

	B ₀	EBB
1.	对照	对照
2.	2.5 $\mu\text{mol/L}$	1.0 $\mu\text{mol/L}$
3.	5.0 $\mu\text{mol/L}$	2.5 $\mu\text{mol/L}$
4.		5.0 $\mu\text{mol/L}$
5.		7.5 $\mu\text{mol/L}$

Bowes细胞的存活率分别为95%和90%^[5,6],浓度达5.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,HeLa细胞和Bowes细胞的存活率仍保持在90%和81%。小檗胺衍生物——EBB,对MDBK细胞、HeLa细胞和Bowes细胞增殖抑制的 IC_{50} 值分别为3.0 μmol 、1.6 μmol 和1.5 μmol 。从结果还可以看到,当EBB的浓度达5 $\mu\text{mol/L}$ 时,MDBK细胞的存活率仍维持在38%,而此浓度的EBB已使HeLa细胞和Bowes细胞全部死亡。

四种化合物作用同一数量级的MDBK细胞24小时后,对MDBK细胞DNA合成前体 ^3H -TdR掺入的影响如表1所示。从表1可以看到四种化合物都不同程度地影响MDBK细胞的 ^3H -TdR摄取,在2.5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的作用下, B_0 的抑制作用比衍生物强;三种衍生物之间差别不明显。

表 1 小檗胺类化合物对 MDBK 细胞 ^3H -TdR 掺入的影响

2.5 $\mu\text{mol/L}$ 化合物	B ₀	B ₂	B ₄	EBB
^3H -TdR 掺入抑制率(%)	48.1	26.8	20.3	28.1

小檗胺类化合物对 MDBK 细胞代谢 MTT 的影响如表 2。从表 2 不难发现, 当 MDBK 细胞培养液中小檗胺或它的衍生物的浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 MTT 代谢的抑制强弱均为 $\text{B}_0 > \text{B}_4 > \text{B}_2 > \text{EBB}$, 说明 EBB 对 MDBK 细胞代谢 MTT 的功能影响最小, 此结果与活细胞计数、 ^3H -TdR 掺入 B_0 抑制强度大于衍生物趋势一致。

表 2 小檗胺类化合物作用 68 小时对 MDBK 细胞降解 MTT 的影响

化合物 浓度 抑制率(%)	B ₀	B ₂	B ₄	EBB
1.0 $\mu\text{mol/L}$	—	—	—	2.0
2.5 $\mu\text{mol/L}$	45	18	24	4.0
5.0 $\mu\text{mol/L}$	93	54	58	25.6

表 3 小檗胺类化合物对 MDBK 细胞(72 小时)CaM 含量的影响

化合物 浓度	对照	B ₀	B ₄	B ₂	EBB
浓度 $\mu\text{mol/L}$	0	1.5	1.5	1.5	1.0
CaM 浓度 ng/mg 蛋白	442	57	383	251	147

几种化合物作用 MDBK 细胞后, 在本测定条件下, CaM 的含量都有不同程度的降低。表 3 的结果可以看出 CaM 含量的降低与抑制细胞增殖的规律不尽相同。此结果说明小檗胺类化合物对 MDBK 细胞增殖的影响不仅与降低细胞内 CaM 浓度有关, 而且也通过阻断 CaM 对细胞内酶系统的激活途径达到抑制

细胞增殖目的^[7]。

表 4 为 B_0 和 EBB 对三种体外培养细胞生长增殖相对抑制率的比较。两种化合物分别作用三种细胞 72 小时后, 对细胞增殖的抑制程度明显不同。主要表现为 B_0 对正常细胞的抑制大于肿瘤细胞; 而 EBB 则为同浓度下, 对肿瘤细胞的抑制率大于对正常细胞的抑制。

表 4 5.0 $\mu\text{mol/L}$ B_0 和 EBB 作用 72 小时后, 对细胞增殖的影响

细胞 抑制率(%) 化合物	MDBK	Bowes ^[1]	HeLa ^[1]
B_0	99	14	18
EBB	48	100	95

注 1. Bowes 细胞和 HeLa 细胞资料分别来源于参考文献[5, 6]。

2. 所测条件相同, 皆设三个平行。

综上所述, 小檗胺类化合物由于结构上的一些不同, 带来对 MDBK 细胞增殖影响也不同。本实验中, 小檗胺的毒性(对 MDBK 增殖)大于三种衍生物, 说明了疏水性基团(C_2H_5 、 C_4H_9 、 $(\text{CH}_2)_4$ 、 $-\text{OC}_2\text{H}_5$)的导入降低了小檗胺结构的部分毒性有利于正常细胞的生长。在三种衍生物中, EBB 由于取代基 $-(\text{CH}_2)_4$ 、 $-\text{OC}_2\text{H}_5$ 比 B_2 和 B_4 更复杂, 所以对 MDBK 细胞的毒性表现出相对小; 但对恶性肿瘤细胞(Bowes、HeLa)的杀伤又最强。另外恶性肿瘤细胞中 CaM 水平往往比正常细胞高^[7], 而 CaM 拮抗剂又常常是通过拮抗 CaM 的活性而达到抑制细胞增殖, 因此从理论上讲对 CaM 拮抗专一性系数越高的拮抗剂, 抑制肿瘤细胞增殖能力应越强。EBB 作为目前国内外最强的 CaM 拮抗剂之一, 其专一性系数为 85, 比小檗胺高 6.5 倍之多。本实验结果证明上述推测是有道理的。当然伴随化合物对正常细胞影响所出现的 CaM 水平降低是因为 CaM 基因表达系统受到一定的影响, 还是其它原因有待进一步的探

讨。

总之,经化学修饰后的小檗胺衍生物-EBB是一种低毒的、具有很大潜力的肿瘤化学治疗剂。

摘 要

本文研究了4种小檗胺类化合物对正常牛胚肾细胞(MDBK)生长增殖和细胞内钙调蛋白(CaM)水平的影响。结果发现,小檗胺及其衍生物对MDBK细胞的增殖都有抑制作用,但小檗胺的影响大于衍生物,而衍生物中,结构略复杂的EBB对MDBK细胞影响最小。实验结果还发现四种化合物均能不同程度地降低

MDBK细胞内CaM的水平。

关键词: 小檗胺 小檗胺衍生物 抑制作用
MDBK细胞 细胞毒性

参 考 文 献

- [1] William N Hait et al., 1986, *J Clin. Onco.*, 4(6): 994—1012.
- [2] 刘昌孝等, 1979, 中草药通讯, 9: 420.
- [3] 张遂坡等, 1988, 生物化学与生物物理学报, 20(1): 13.
- [4] 徐小华等, 1994, 中国肿瘤临床, 21: 9—12.
- [5] 张金红等, 1996, 南开大学学报, 29(2): 89.
- [6] 张金红等, 1997, 中草药杂志(待发表).
- [7] 文允镒等, 1989, 钙与钙调素, 化学工业出版社, P. 279.

CALMODULIN ANTAGONIST-EFFECTS OF BERBAMINE AND ITS DERIVATIVES ON THE CYTOTOXICITY OF NORMAL CELLS (MDBK)

ZHANG Jin Hong GENG Zhao Hui DUAN Jiang Yan CHEN Jia Tong HE Hong
HUANG Jian Ying*

(Institute for Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071

* Institute for Cancer of Tianjin)

ABSTRACT

We have observed the activation of the structure of four berbamine compounds on the growth and proliferation of MDBK cells in vitro and the change of CaM content before and after the treatment with berbamine compounds.

The results suggested that berbamine and its derivatives all have inhibitory activated on the proliferation of MDBK cells. But the cytotoxicity of berbamine on the growth of MDBK cells is more greatly than its derivatives. The study demonstrated that modified berbamine-derivative-EBB is a potent drug of anticancer for future investigation and developed.

The results also appeared that CaM content of the cells has decrease during the activation of these compounds on the MDBK cells.

Key words: Berbamine Derivatives of berbamine Inhibitory MDBK cell Cytotoxicity

欢迎来稿和订阅《Cell Research》

《Cell Research》创刊于1990年5月。是一本用英语刊登国内、外细胞生物学各领域学术专著、简报和评述性文章的学报级期刊,暂为半年刊,拟于1998年改为季刊。

该刊由中国科学院上海细胞所主办,科学出版社出版,并由该刊及其纽约分社向世界各地发行。现有国内外编委30多人,遍布德、英、美、日等国,姚鑫教授(学部委员)任主编。

该刊开本:16开,110±10页,每期定价35元。

来稿请寄:中科院上海细胞所《Cell Research》编辑部 上海市岳阳路320号,邮编:200031。

订阅请与科学出版社上海办事处连秉亮联系(上海市枫林路270号,邮编:200032),也可直接与编辑部联系。