

- [14] 杜伯雨等, 2002, 中国免疫学杂志[J], 2:143-145. (4):2180.
 [15] Cavallotti D., et al., 2000, Neurochem., int. [J], 36 (1):75. [17] Johnson F., et al., 1999, Cell[J], 96:291-298.
 [16] Sempowski G D., et al., 2000, J Immunol [J], 164 66. [18] 陈华等, 2002, 复旦大学(自然科学版)[J], 1:63-66.

CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF PROTHYMOSIN ALPHA

CAO Jun Xia JIN Li Ji LIU Zhe AN Li Jia*

(Bioengineering Department, Dalian University of Technology, Dalian 116012 China)

ABSTRACT The proTa gene was cloned from the adult human peripheral blood and the fetus thymus. Four mutitype sequences are found. By analysing, the results show that thymus remodel age-dependently so the gene type is not only one. Notably, some of them are nearly identical and there is almost same in the characteristic structural region of the proTa and the changeable amino is focus on Asp and Glu.

Key words: Thymus Prothymosin alpha Sequence analysis

* Corresponding author E-mail: Ljan@mail dlptt. ln. cn

独角莲对肝癌细胞 SMMC-7721 细胞增殖抑制作用机理的研究

王顺启 倪虹 王娟 陈力*

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

摘要 临床上独角莲对包括肝癌在内的多种肿瘤有一定的治疗作用。为揭示其抑癌机理, 我们用独角莲根茎水提物(the aqueous extract from dried powdered rhizomes of *Typhonium giganteum Engl.*, AEoTGE)作用肝癌细胞株 SMMC-7721, 研究独角莲对 SMMC-7721 细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡的影响。噻唑氮蓝(MTT)比色实验和流式细胞仪(flow cytometry, FCM)测定表明: AEoTGE 能较强抑制 SMMC-7721 细胞的生长, SMMC-7721 细胞被阻滞在 S 期, 并诱导细胞凋亡。提示独角莲是一种在肝癌治疗上有前景的中草药。

关键词: 独角莲 肝癌 细胞周期

我国是肝癌高发区, 每年有 11 万人死于肝癌, 占全世界肝癌死亡人数的 45%, 对我国人民危害极大^[1]。寻找药效好, 副作用低的治疗药物, 一直是肝癌研究的一个重要方面^[2]。

独角莲在我国传统中医治疗中广泛用于治疗多种恶性肿瘤疾病, 有较好的临床疗效^[3,4], 同时动物模型实验也显示独角莲可明显抑制肿瘤生长^[11,12]。近年来虽然人们对独角莲的抑癌作用研究逐步增

多^[3-10]。但至今未能揭示其药效作用机制。

本实验采用噻唑氮蓝(MTT)比色法检测了独角莲根茎水提物(the aqueous extract from dried powdered rhizomes of *Typhonium giganteum Engl.*, AEoTGE)对肝癌细胞株 SMMC-7721 的增殖抑

本文 2002 年 10 月 30 日收到, 2003 年 3 月 8 日接受。

基金项目: 天津市科委重点基金(编号: 003803411)

* 通讯作者。E-mail: lichen 16@eyou.com

制作用,并借助流式细胞仪(flow cytometry, FCM)测定了 AEO-TGE 对 SMMC-7721 细胞周期及细胞凋亡的影响,对独角莲抑癌作用的细胞学机制作了初步的研究。

材料与方 法

1. 药材及其处理

本实验所用药材为河北迁西人工种植,一年生根茎,经本室陈瑞阳教授鉴定为天南星科犁头尖属植物独角莲(*Typhonium giganteum Engl.*)的根茎。

新鲜独角莲根茎洗净,去皮,切成厚度一毫米左右的薄片,20-30℃阴干,粉碎后用研钵研成粉末。用双蒸水配成 15g/L 的水溶液(独角莲根茎干粉质量/溶液体积),液面上充 N₂,密封,4℃浸泡一个月。0.22μm 微孔滤膜过滤除去不溶物与细菌,4℃保存备用。

2. 主要仪器设备

倒置相差显微镜(XD-101),CO₂ 培养箱(Thermo Forma,CE),酶联免疫反应检测仪(Labsystems, Multiskan Ascent,CE),流式细胞仪(BECTON DICKINSON FACSCalibur),台式离心机(TGL-16C)。

3. 细胞与细胞培养

本实验用肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞由天津市第三中心医院朱争艳医师惠赠。细胞培养用 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)培养液,含 10% 胎牛血清(购于 TBD 公司),100mg/L 链霉素,1.0 × 10⁵ U/L 青霉素。于 37℃、5% CO₂、湿润空气中进行细胞培养。

4. 噻唑氮蓝(MTT)比色法

参考文献^[13]的 MTT 方法略有改动。细胞分四个密度(个/L)梯度:6.0 × 10⁷,1.2 × 10⁸,2.4 × 10⁸,6.0 × 10⁸。96 孔板内设置加药组、正对照组、调零组,每组有三个孔。在实验开始时,加药组与相应正对照组细胞同时加入 96 孔板,调零组无细胞,只加入相应体积的培养液。

加药组:每孔 100μl 细胞悬液,根据药物作用时间长短在不同的时间点加入 11.1μl 15g/L AEO-TGE,独角莲终浓度约为 1.5g/L。正对照组:每孔 100μl 细胞悬液,在每一个加药的时间点加入 11.1μl 灭菌双蒸水。调零组:每孔加入 100μl 营养液,在第一个加药的时间点加入 11.1μl 灭菌双蒸水。

测定 MTT 溶解后的吸光度波长为 492nm。按下述公式计算肝癌细胞存活率(survival rate,SR)和药物抑制率(inhibitory rate,IR)。

$$SR = (\text{加药组 OD 值} - \text{调零组 OD 值}) / (\text{正对照组 OD 值} - \text{调零组 OD 值}) \times 100\%$$

$$IR = (1 - \text{肿瘤细胞存活率}) \times 100\%$$

5. 流式细胞仪(flow cytometry, FCM)测定细胞周期及凋亡诱导率

参考《现代分子生物学实验技术》的 FCM 方法^[14]略有

改动。细胞分两个密度(个/L):7.4 × 10⁷、1.7 × 10⁸,细胞同时加入 35cm² 细胞瓶,每瓶 15ml 细胞悬液,在不同的时间点加 AEO-TGE。加药组:每瓶加入 1.65ml 15g/L AEO-TGE,独角莲终浓度约为 1.5g/L。对照组:每瓶加入 1.65ml 灭菌双蒸水。

在天津协和干细胞基因工程有限公司上机检测;分析软件为:ModFit LT for Mac V2.0。

6. 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示;两组数据间的比较采用 t 检验。

结 果

1. AEO-TGE 对肝癌细胞 SMMC-7721 细胞增殖的影响

在独角莲浓度为 1.5g/L,细胞浓度为 6.0 × 10⁷ 个/L 时,AEO-TGE 对 SMMC-7721 细胞的增殖有较强的抑制作用,随作用时间延长,细胞生长受到抑制逐步加强;12h 药物抑制率为 19.14%,36h 药物抑制率高达 39.57%。在相同药物浓度下(独角莲终浓度 1.5g/L),细胞浓度增加到 1.2 × 10⁸ - 6.0 × 10⁸ 个/L 时,AEO-TGE 抑制 SMMC-7721 细胞增殖的作用减弱,12h、24h、36h 三个时间点的检测表明,药物的最高抑制率不超过 12%,大部分不超过 10% (见表 1)。

表 1 AEO-TGE 对肝癌细胞 SMMC-7721 细胞增殖的影响

细胞密度 (ml)	处理时间 (h)	OD _{492nm} ($\bar{X} \pm SD$)	存活率 (%)	抑制率 (%)
调零组	0	0.061 ± 0.003	—	—
6.0 × 10 ⁷	control group	0.270 ± 0.002	100	—
	12	0.230 ± 0.004	80.86	19.14
	24	0.208 ± 0.010	70.33	29.67
	36	0.187 ± 0.014	60.43	39.57
1.2 × 10 ⁸	control group	0.375 ± 0.013	100	—
	12	0.348 ± 0.038	91.41	8.59
	24	0.380 ± 0.005	101.6	-1.60
	36	0.358 ± 0.019	94.50	5.50
2.4 × 10 ⁸	control group	0.753 ± 0.012	100	—
	12	0.674 ± 0.009	88.67	11.33
	24	0.708 ± 0.007	93.54	6.46
	36	0.689 ± 0.014	90.79	9.21
6.0 × 10 ⁸	control group	0.858 ± 0.009	100	—
	12	0.790 ± 0.003	91.47	8.53
	24	0.805 ± 0.004	93.35	6.65
	36	0.798 ± 0.015	92.47	7.53

2. AEO-TGE 对肝癌细胞 SMMC-7721 细胞周期及细胞凋亡的影响

细胞浓度为 7.4 × 10⁷ - 1.7 × 10⁸ 个/L,AE-

oTGE 未作用时 S 期细胞所占比例为 32.19% - 36.23%, AEoTGE 作用 36h 时上升到 44.44% - 52.80% (变化极显著)。在细胞密度为 7.4×10^7 个/L 时, AEoTGE 作用 36h, 细胞凋亡率达 11.77% (极显著, 见表 2)。

表 2 AEoTGE 对肝癌细胞 SMMC-7721 细胞周期及细胞凋亡的影响

细胞密度 (ml)	处理时间 (h)	细胞周期中各期细胞比率 (%)			凋亡率 (%)
		G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M	
7.4×10^7	对照组	59.13	32.19	8.86	2.32
	12	54.98	32.30 [△]	12.72	1.58
	24	46.19	37.16 ^{**}	16.65	5.05 ^{**}
	36	50.16	44.44 ^{**}	4.95	11.77 ^{**}
1.4×10^8	对照组	53.83	36.23	9.94	1.01
	12	54.84	35.23 [△]	9.93	0.39
	24	50.87	41.59 ^{**}	7.54	0.69
	36	44.13	52.80 ^{**}	3.08	0.00

与对照组比较 [△] P>0.05; ^{**} P<0.01。

讨 论

本研究显示在细胞密度为 6×10^7 个/L 时, AEoTGE 对 SMMC-7721 细胞的增殖抑制率 24h 为 29.17%, 36h 达 39.47%; 达到了全国抗癌会议上抗肿瘤药物疗效通用指标规定, 即有效化疗药物抑制率应达到 30%^[15]。说明 AEoTGE 对 SMMC-7721 细胞增殖具有明确的抑制作用, 是一种有研究价值的抗癌中草药。

MTT 实验显示, AEoTGE 对 SMMC-7721 细胞的作用和单个细胞的平均药物浓度有关。在相同药物浓度下 (独角莲终浓度 1.5g/L), 细胞浓度为 6.0×10^7 个/ml 时, 随作用时间延长, 细胞生长受到的抑制逐步加强。但当细胞浓度增加到 1.2×10^8 - 6.0×10^8 个/ml 时, 单个细胞的平均药物浓度下降, AEoTGE 对 SMMC-7721 细胞增殖抑制作用减弱。

本实验流式细胞检测结果显示, AEoTGE 对 SMMC-7721 细胞的细胞周期有阻滞作用, 主要表现为阻滞细胞于 S 期, S 期细胞比例增高。在固定药物浓度下 (独角莲终浓度 1.5g/L), 作用时间越长, 阻滞作用越明显。

流式细胞检测结果还表明, 独角莲对诱导 SMMC-7721 细胞发生细胞凋亡的作用和细胞培养液中单个细胞的平均药物浓度有关。在单个细胞平均药物浓度较高时 (细胞密度 7.4×10^7 个/L), 诱导细胞凋亡作用强; 在单个细胞平均药物浓度较低时

(细胞密度 $\geq 1.7 \times 10^8$ 个/L), 诱导凋亡的作用明显减弱。

独角莲对 SMMC-7721 细胞的凋亡诱导和细胞周期阻滞间的关系有待进一步的研究。推测有两种不同的机制: 第一种为 AEoTGE 影响 SMMC-7721 细胞周期, 阻滞细胞生长于 S, 由于细胞周期抑制而引起细胞凋亡, 也就是说凋亡细胞是从阻滞的 S 期细胞而来。据报道细胞凋亡存在着细胞周期特异性, 表现为细胞被某种因素阻滞在细胞周期的某一时相时, 往往诱导细胞凋亡^[16]。另外一种可能就是细胞周期阻滞同细胞凋亡发生没有因果关系, 细胞凋亡不是由细胞周期阻滞引起, 而是单个细胞的平均药物浓度达到一定水平后, 直接诱导细胞进入凋亡。

深入研究独角莲的细胞周期 S 期阻滞和细胞凋亡诱导的机制能够使我们进一步了解该药物抑制细胞生长的生物学特征, 为药物开发提供合适的靶位点, 对于癌症的治疗具有重大意义。本室已开始对独角莲的有效成分进行组分分离, 并结合细胞学技术和基因芯片技术对各有效成分进行筛选和鉴定。

参 考 文 献

- [1] 陈建国、沈卓才等, 1998, 中华肿瘤杂志, 20(3): 166 - 168.
- [2] 朱建平、蔡国友等, 2001, 中华普通外科杂志, 16(1): 28 - 30.
- [3] 李清华、贾宗才, 1962, 药学报, 9(11): 643 - 648.
- [4] 刘珂、杨松松等, 1985, 中草药, 16(3): 42.
- [5] 孙启良、卫永第等, 1995, 白求恩医科大学学报, 21(4): 364 - 365.
- [6] 孙启良、卫永第等, 1995, 吉林中医药, 4: 40.
- [7] 孙启良、卫永第等, 1995, 中国药理学杂志, 30(9): 572.
- [8] 李静、卫永第等, 1996, 吉林农业大学学报, 18(2): 29 - 31.
- [9] 孙淑芬、曾艳等, 1998, 微量元素与健康研究, 15(2): 78.
- [10] 陈雪松、陈迪华等 2000, 中草药, 31(7): 495 - 496.
- [11] 孙淑芬、曾艳等, 1998, 中医研究, 11(6): 8 - 10.
- [12] 尹建元、朴春姬等, 2000, 长春中医学院学报, 16(2): 52 - 53.
- [13] 张锦泉、李军等, 2000, 锦州医学院学报, 21(6): 23 - 26.
- [14] 卢圣栋, 1999, 现代分子生物学实验技术 (第二版), 中国协和医科大学出版社, 北京, pp. 656 - 676.
- [15] 姜圣亮、朱上林等, 2001, 肿瘤, 21(1): 23 - 25.
- [16] Gong J, Li X et al., 1993, J Cell Physiol, 157: 263.

THE INHIBITION EFFECTS OF *TYPHONIUM GIGANTEUM ENGL.* ON HEPATOCARCINOMA CELL

WANG Shun Qi NI Hong WANG Juan CHEN Li*

(Institute of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071 P. R. China)

ABSTRACT *Typhonium giganteum Engl.* has been used to treat many cancers for many years in China. This research was designed to study the inhibition of the aqueous extract from dried powdered rhizomes of *Typhonium giganteum Engl.* (AEoTGE) on the proliferation, cell cycle and apoptosis of hepatocarcinoma cell SMMC-7721. MTT colorimetric assay and flow cytometry results showed: AEoTGE can decrease the proliferation rate of SMMC-7721 cells; the significant S phase arrest was revealed by the increase of cells in S phase and the obvious apoptosis of SMMC-7721 cells was induced by AEoTGE. Taken together, these results suggest that *Typhonium giganteum Engl.* is a promising herbal drug in the therapy of hepatocellular carcinoma.

Key words: AEoTGE (the aqueous extract from dried rhizomes of *Typhonium giganteum Engl.*)
Cancer Cell cycle

Supported by Natural Sciences Foundation of Tianjin

* Corresponding author E-mail: lichen 16@eyou.com

《细胞生物学杂志》编辑委员会

主 编: 郭礼和

副主编: 白永延 朱学良 施渭康

编 委: 丁明孝 丁小燕 马奎蒙 许政暄

孙 兵 朱德煦 李逸平 严缘昌

陆长德 杨弘远 陈受宜 陈瑞阳

陈尊器 周光炎 赵寿元 郑仲承

费 俭 章静波 黄百渠

秘 书: 卢建平(责任编辑)