论著

文章编号:1000-5404(2006)18-1860-04

蝙蝠葛碱对人膀胱癌T-24细胞株生长增殖的抑制作用

李 铭[1],梁文杰[2],曾亚平[3],贾涵真[2] (河北医科大学:[1]第四医院泌尿外科,[2]中西医结合学院内科教研室,石家庄 050011;[3]河北科技出版社,石家庄 050051)

提 要:目的 探讨中药北豆根提取物蝙蝠葛碱(dauricine, Dau)对人膀胱癌T-24细胞株的增殖抑制作用及其作用机制。**方法** 应用MTT法测定了蝙蝠葛碱对泌尿系肿瘤细胞增殖反应的影响;采用流式细胞技术、荧光染色法、琼脂糖凝胶电泳等技术测定和观察了蝙蝠葛碱对诱导肿瘤细胞凋亡的影响。**结果** 蝙蝠葛碱对膀胱癌T-24细胞株的增殖有较强的抑制作用,具有浓度依赖性特点。T-24细胞DNA琼脂糖凝胶电泳呈现凋亡特征性梯形条带。流式细胞分析,浓度为5~30 μg/ml的蝙蝠葛碱具有诱导人膀胱癌细胞凋亡的作用,且随着药物作用时间延长凋亡率逐渐增加,随药物浓度的增高细胞周期被阻滞在G_0/G_1期。T-24细胞的*bcl*-2基因表达受抑,而*bax*基因的表达上调。**结论** 蝙蝠葛碱可有效抑制人膀胱癌T-24细胞株的生长增殖,阻滞细胞周期及诱导细胞凋亡可能起重要作用。

关键词: 蝙蝠葛碱;膀胱癌;细胞凋亡;增殖抑制

中图法分类号: R285.5;R73-351;R737.14 **文献标识码:** A

Inhibitory effect of dauricine on growth of human bladder cancer T-24 cell line

LI Ming[1], LIANG Wen-jie[2], ZENG Ya-ping[3], JIA Han-zhen[2] ([1]Department of Urinary Surgery, The Fourth Hospital, [2]Department of Medicine, Integrated Traditional Chinese and Western Medical College, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011; [3]Hebei Technology Publishing Company, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of dauricine on the growth of human bladder cancer T-24 cell and its mechanism. **Methods** The T-24 cells were treated with dauricine (Dau) at different concentrations. The proliferation of T-24 cells was assayed with MTT colorimetric method. The apoptosis of T-24 cells induced by Dau was studied by fluorescent staining, flow cytometry (FCM) and DNA agarose gel electrophoresis. **Results** Dau effectively inhibited the proliferation of T-24 cells in a concentration dependent manner. A characteristic DNA ladder was observed in Dau treated groups. Dau at the concentration of 5 – 30 μg/ml induced the apoptosis of T-24 cells and the apoptosis rate increased in a time-dependeut manner. Cell cycle was arrested at G_0/G_1 phase. The expression of *bcl*-2 was inhibited and the expression of *bax* was up-regulated. **Conclusion** Dauricine significantly inhibits the growth of bladder cancer cells. Cell cycle arrest and apoptosis might be the functional mechanisms.

Key words: dauricine; bladder cancer; apoptosis; flow cytometry

中药北豆根即蝙蝠葛根,为防己科植物蝙蝠葛(menispermum dauricum)的干燥根茎,其性味苦寒,有清热解毒,祛风止痛之功效,具有抑菌、降压、抗心率失常等作用。近年来发现北豆根提取物也有抗癌作用。单保恩等[1]研究发现,北豆根提取物具有较强的抗肿瘤作用,并提取了北豆根抗肿瘤的有效成分。为此,我们利用北豆根纯化物蝙蝠葛碱(dauricine, Dau)研究其对膀胱癌细胞株的作用,为今后的药物开发和临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验瘤株及培养 人膀胱移行细胞癌T-24细胞株由武汉大学典型培养物保藏中心提供。复苏后培养在RPMI1640培养液(含10%~20%胎牛血清,青霉素和链霉素各100 U/ml及0.03%谷氨酰胺)中,置于37 ℃,饱和湿度,5% CO_2的培养箱中,细胞进入对数生长期后,收集细胞,调节成相

基金项目:河北省科技厅攻关计划项目(052761853)
Supported by the Research Project of Sci & Tech Department of Hebei Province (052761853)

作者简介:李 铭(1967-),男,山东省莱州市人,博士,副主任医师,主要从事泌尿外科肿瘤的临床研究,发表论文21篇。电话:(0311)86033941-364

收稿日期:2005-03-01;修回日期:2006-06-14

应浓度备用。

1.1.2　受试物　　Dau 由华北制药集团新药研究开发中心提纯，经河北医科大学药学院鉴定。该药为淡黄色粉末，熔点 98～100 ℃（氯仿-环己烷），相对分子质量 624.7，纯度 99.8%。用前以 1 mol/L 盐酸溶液溶解，氢氧化钠溶液调节为 pH 6.0，以生理盐水补充至所需体积。一次性滤器过滤，调节浓度为 0.6 mg/ml，4 ℃保存备用。

1.1.3　主要试剂　　胎牛血清，杭州四季青生物工程材料公司；RPMI1640 和胰蛋白酶，美国 Gibco 公司；四氮唑蓝（MTT），美国 Sigma 公司；琼脂糖，美国 Promega 公司；SDS，美国 Biotec 公司；Trisbase，北京化工厂；蛋白酶 K 及溴化乙锭，华美公司产品。

1.1.4　主要仪器　　CO_2 培养箱 TC2323 型，美国 SHELDON 公司；倒置相差显微镜 IMT-2 型，日本 OLYMPUS；荧光显微镜 UFX-Ⅱ型，日本尼康；酶标仪 HT2 型，奥地利 Anthos 公司；薄层层析板 Silica gel 60 F254 型，美国 Merk 公司产；EPICS-XL 型流式细胞仪为 Coulter Co. Healeah，FL 产品；FoToDYNE 凝胶成像系统，美国 Image 公司；SCR20B 低温高速离心机，日本 HITACHI 公司；DF-Cu 电泳仪，北京六一仪器厂产品。

1.2　方法

1.2.1　体外抑瘤实验　　将肿瘤细胞株悬液接种于 96 孔培养板，每孔 100 μl（含 1 ×10^4 个细胞），分别加入阴性对照磷酸盐缓冲液（PBS）、阳性对照顺铂（DDP）126 μg/ml 和羟基喜树碱（HCPT）4.2 μg/ml 以及不同浓度 Dau 各 10 μl，4 复孔。置于饱和湿度、37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 72 h。结束前 4 h，各培养孔加入 5 mg/ml MTT 10 μl。培养结束后，离心，弃去上清，每孔加入 15% SDS 100 μl，过夜。次日用酶联免疫检测仪检测各孔吸光度 A 值，测定波长 λ = 570 nm，重复 3 次并计算抑制率。抑制率（CI）=（对照组 A 值-实验组 A 值）/对照组 A 值 ×100%。药物敏感实验判断标准：CI ≥50% 为敏感，30 % ≤CI <50% 为中度敏感，CI <30% 为不敏感。

1.2.2　荧光染色实验　　调节对数生长期的 T-24 细胞浓度为 1 ×10^5 个/ml，与 30 μg/ml 和 0 μg/ml 的 Dau 于 37 ℃培养 48 h，收集细胞，用磷酸盐缓冲液洗涤并重新悬浮，取 100 μl 受检细胞悬液，加 4 μl 吖锭橙（acridine orange，AO）/ EB（浓度各为 100 μg/ml）双荧光染色液，用滴管轻请吹打，在 37 ℃孵育 15 min，取悬液 1 滴滴于洁净玻片，加盖玻片，立即在 300～500 nm 波长下，用 ×400 荧光显微镜进行凋亡形态学观察。

1.2.3　DNA 提取及琼脂糖凝胶电泳　　同上收集细胞，按文献[2]的方法提取 DNA，溶于 20 μl TE 缓冲液中（10 mol/L Tris-HCl，0.1 mol/L $EDTANa_2$，pH 8.0），将提取的基因组 DNA，在1.8% 琼脂糖凝胶中电泳（电压 80 V，电泳缓冲液 1 ×TBE），30 min 后移凝胶至凝胶成像系统进行观察。

1.2.4　流式细胞仪分析　　调节肿瘤细胞浓度为 1 ×10^5 个/ml，与 30、5、1 μg/ml 和 0 μg/ml 的 Dau 于 37 ℃培养 24、48、72 h，收集细胞，用磷酸盐缓冲液洗涤并重新悬浮，70% 乙醇于 4 ℃固定 2 h，RNA 酶 37 ℃处理 1 h，与 PI（propidium iodide）室温反应 10 min，用流式细胞仪每个样品检测 10 000 细胞事件，重复 3 次。Cellfit 分析软件测定细胞周期 DNA 变化，计算出细胞凋亡率。

1.2.5　*bcl*-2 和 *bax* 基因表达的检测　　50 ml 培养瓶接种 1 ×10^6 细胞，37 ℃培养 24 h 后，加入和不加（对照组）30 μg/ml Dau，作用 24 h 胰酶消化收获细胞，PBS 洗 2 次，PBS 稀释细胞浓度（2～5）×10^4/200 μl。1∶50 稀释 *bcl*-2 和 *bax* 一抗，去 20 μl二抗加入 200 μl 细胞温浴 30 min，上流式细胞仪检测。

1.3　统计学处理

两组间数据用 *t* 检验，多组间数据用单因素方差分析。应用 SPSS 11.5 统计软件计算。采用改良 Karber 公式计算 IC_{50}[3]。

2　结果

2.1　Dau 对 T-24 细胞株增殖作用的影响

表 1 结果显示，与阴性对照比较，浓度为 3.75 μg/ml 以上的 Dau 对 T-24 肿瘤细胞有较强的抑制作用，敏感的最低药物浓度为：1.88 μg/ml。并有良好的量效关系，随着药物浓度的升高抑制率逐渐升高。但其作用无明显的时间依赖性，随着时间延长抑制率总体逐渐升高，在低浓度时随着时间延长抑制率反有降低。24、48、72 h 时 IC_{50} 分别为 6.9、7.7、5.1 μg/ml。

表 1　Dau 对 T-24 肿瘤细胞增殖作用的影响（$\bar{x} \pm s$，%）

药物组别	吸光度值		
	24 h	48 h	72 h
阴性对照组	0.43 ±0.02	0.92 ±0.06	1.11 ±0.02
顺铂	0.26 ±0.01[a]	0.31 ±0.03[a]	0.26 ±0.04[a]
羟基喜树碱	0.30 ±0.02[a]	0.41 ±0.02[a]	0.27 ±0.01[a]
蝙蝠葛碱（μg/ml）			
60	0.07 ±0.01[a]	0.07 ±0.01[a]	0.09 ±0.01[a]
30	0.12 ±0.01[a]	0.12 ±0.01[a]	0.11 ±0.01[a]
15	0.16 ±0.01[a]	0.22 ±0.03[a]	0.19 ±0.01[a]
7.5	0.18 ±0.01[a]	0.40 ±0.03[a]	0.47 ±0.01[a]
3.75	0.24 ±0.02[a]	0.72 ±0.02[b]	0.70 ±0.02[a]
1.88	0.33 ±0.02[b]	0.80 ±0.01	0.84 ±0.02[b]
0.94	0.36 ±0.02	0.90 ±0.02	0.95 ±0.02
0.47	0.42 ±0.02	0.90 ±0.03	1.04 ±0.06

a：$P<0.01$，与阴性对照组比较；b：$P<0.05$，与阴性对照组比较

2.2　荧光显微镜细胞形态观察

AO/ EB 染色后，30 μg/ml Dau 处理 48 h 的人膀胱移行细胞癌细胞株 T-24 呈现出凋亡细胞形态：体积缩小，细胞质浓缩，细胞核 DNA 发出橙色荧光，细胞核边缘不规则，出现核固缩、核碎裂等，呈大小不等、形态不规则的碎片状；而对照组细胞核近圆形，边缘清晰，染色均匀，未见有明显凋亡细胞形态特征。见图 1。

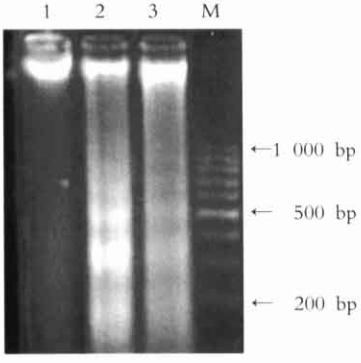


A：0 μg /ml 组 正常细胞；B：30 μg /ml 组 核固缩；C：30 μg /ml 组 核裂解

图 1　Dau 处理前后的 T-24 细胞核形态变化　（荧光显微镜 ×400）

2.3 凋亡细胞的 DNA 凝胶电泳

对照组细胞 DNA 凝胶电泳后，在加样孔附近有一条清晰的条带，而 30 μg/ml Dau 处理 72 h 的细胞 DNA 凝胶电泳后，则出现较典型的梯状电泳模式。如图 2。



1：未处理的 T-24 细胞；2：30 μg/ml Dau 处理 72 h 后的 T-24 细胞；3：5 μg/ml Dau 处理 72 h 后的 T-24 细胞；M：标准

图 2 T-24 细胞 DNA 凝胶电泳

2.4 Dau 对 T-24 细胞凋亡率的影响

经流式细胞仪分析，随 Dau 剂量的增加，凋亡细胞数明显增加，呈剂量依赖关系。低浓度 Dau(1 μg/ml)作用于 T-24 细胞 24、48、72 h 的细胞凋亡率与空白对照无显著差异($P>0.05$)。中浓度 Dau(5 μg/ml)作用于细胞 72 h，细胞凋亡率显著增加($P<0.01$)。高浓度 Dau(30 μg/ml)作用于细胞 24 h 即可使细胞凋亡率增加，随时间的延长，凋亡率进一步增加，可达 34.66%，但高浓度组 72 h 比 48 h 略有下降，但无显著差异($P>0.05$)。见表 2。

表 2 不同浓度 Dau 处理后的 T-24 细胞凋亡率($\bar{x}\pm s$，%)

组别	Dau 浓度(μg/ml)			
	0	1	5	30
24 h	2.52±1.05	2.94±0.12	5.04±1.25[a]	11.07±1.53[a]
48 h	2.66±0.96	2.53±0.64	4.72±1.68[a]	34.66±0.35[a]
72 h	1.81±0.06	2.58±0.58	16.63±1.04[a]	32.72±1.83[a]

a：$P<0.01$，与 0 μg/ml 组比较

2.5 Dau 对 T-24 细胞周期的作用

Dau 作用 72 h 后，经流式细胞仪分析，未经药物作用的对照组 G_0/G_1 期、S 期和 G_2/M 期细胞分别为 46.9%、40.2%、12.9%；30 μg/ml Dau 处理 72 h 的人膀胱移行细胞癌细胞，在 G_0/G_1 期、S 期和 G_2/M 期的细胞分别为 60.9%、29.2%、9.9%。与对照组比较，差异显著($P<0.01$)。可见在高浓度 Dau 作用下，G_0/G_1 期细胞明显增多，S 期细胞比率下降，多数细胞阻滞在 G_0/G_1 期。

2.6 Dau 对 T-24 细胞 *bcl-2* 和 *bax* 基因的表达的影响

用流式细胞仪测定了 Dau 处理 T-24 细胞 72 h 后的 *bcl-2* 和 *bax* 基因的表达量。未经药物作用的细胞 *bcl-2* 基因表达量为 20.8±0.23，而 5 μg/ml 以及 30 μg/ml Dau 处理的细胞 *bcl-2* 基因表达量分别 7.7±0.25 和 6.8±0.17，表达量下降，与未处理组比较，两浓度组均有非常显著性差异($P<0.01$)；未经药物作用的细胞 *bax* 基因表达量为 1.0±0.32，而 5 μg/ml 以及 30 μg/ml Dau 处理 72 h 的 T-24 细胞 *bax* 基因表达量分别为 5.1±0.29 和 6.6±0.31，表达量明显增加，与未处理组比较，两浓度组均有非常显著性差异($P<0.01$)。

3 讨论

北豆根始载于《中国药植志》，主要作用是抑菌消炎、镇咳祛痰、肌松和抗心率失常等。可用于治疗气管炎等，现已有成药北豆根片问世。各书籍杂志多述及北豆根的抑菌作用、降压作用及抗心率失常作用等。近年有北豆根抗肿瘤作用报道[4]，以及北豆根的有效成分之一 Dau 的逆转肿瘤多药耐药的[2,5]相关报道，但数量较少。本研究首先使用膀胱移行细胞癌 T-24 细胞株对 Dau 进行体外抑瘤实验，结果表明 Dau 有明显的抑制细胞株增殖反应的作用，具有明显的量效关系，24、48、72 h 时 IC_{50} 分别为 6.9、7.7、5.1 μg/ml，说明 Dau 对 T-24 细胞具有较强的体外增殖抑制作用。

细胞凋亡对于肿瘤的发生和生长有负调控作用，对肿瘤细胞凋亡的诱导率已成为评价抗肿瘤药物疗效的指标[6]。我们利用不同方法对 Dau 作用后细胞的形态学改变进行了观察，荧光显微镜可见到明显的细胞凋亡形态变化：胞体缩小，细胞质浓缩，核固缩，核碎裂以及荧光亢进等。细胞凋亡是从细胞核开始的，当细胞凋亡时，细胞核内限制性内切酶活化，活化了的内切核酸酶将 DNA 链在核小体之间切口，使核内 DNA 断裂，形成 180～200 bp 整倍数的核酸片段，从而使琼脂糖凝胶电泳呈现的凋亡梯形图。提示 Dau 的抗肿瘤作用可能与细胞凋亡有关。

我们用流式细胞仪测定了 Dau 对细胞凋亡率及对细胞周期的影响，DNA 直方图上可见 G_1 期峰前显现明显的细胞凋亡峰亚 G_1 期峰。流式细胞仪计数显示 30 μg/ml Dau 处理 72 h 诱导膀胱癌细胞凋亡率可达 32.72%。G_1 期又称 DNA 复制前期，可产生 rRNA、mRNA 及 tRNA 核蛋白体[7]，同时为细胞进入 S 期做各种准备，如合成 DNA 合成诱导物以及 DNA 复制所需的各种前体和酶等，本实验表明 Dau 能明显抑制 T-24 细胞的周期转换，高浓度 Dau 使细胞大量堆积在 G_0/G_1 期，抑制 DNA 合成，进而抑制癌细胞的增殖，这是其抗肿瘤的又一机制。

bcl-2 基因家族是细胞凋亡的关键性调节者，作为抑制凋亡基因的 *bcl-2* 高表达，可提高细胞凋亡阈值，抑制细胞凋亡，延长细胞存活；而 bax 具有相反的作用。本研究结果显示，Dau 作用于 T-24 细胞，使 *bcl-2* 表达受抑，而上调 *bax* 基因的表达，提示 Dau 影响了细

胞相关基因的表达。

本实验虽然证实诱导凋亡是Dau抗肿瘤作用的机制之一。但体外实验30 μg/ml Dau作用72 h抑制率可达95%，而凋亡率仅为32.72%，表明Dau存在对药物的直接的细胞毒作用及其他机制。细胞死亡有两种形式：坏死和凋亡。坏死多由强烈的外来刺激引起，坏死机制多种多样，如胞体内外离子失衡、细胞器中毒等。同其他生物碱相似，Dau对肿瘤具有较强的细胞毒作用[8]，其作用机制有待进一步探讨。

在我国，膀胱癌是泌尿系统中发病率最高的恶性肿瘤，且极易复发，并对大多数的一线化疗药物不敏感。作为术后化疗膀胱灌注的有5-氟尿嘧啶，表阿霉素，丝裂霉素，喜树碱类等，也有卡介苗等生物免疫制剂。但不同生物特性的膀胱肿瘤对这些药物有着天然的及获得的抗药性，单一的治疗常不能控制其复发。因此需要更多的可选择药物，尤其是低毒高效的中药提取物，是目前世界上肿瘤治疗的发展趋势，也是我国制药领域的优先发展项目。北豆根作为抗肿瘤药物有待进一步开发，其作用机制有待进一步研究。

参考文献：

[1] 单保恩，梁文杰，任凤芝，等. 中药北豆根抗肿瘤活性的体外实验[J]. 癌变·畸变·突变，2004，16(5)：293-295.
[2] 李建华，秦凤绮，杨佩满. 蝙蝠葛碱逆转K562/ADM细胞多耐药性的研究[J]. 大连医科大学学报，2002，24(2)：94-96.
[3] 鄂 征. 组织培养技术(修订本)[M]. 北京：人民卫生出版社，1988：292-293
[4] 梁文杰，刘东青，单保恩，等. 北豆根提取物对小鼠和人淋巴细胞及巨噬细胞作用的体外实验研究[J]. 中国免疫学杂志，2005，21(1)：56-59.
[5] 崔 燎，潘毅生. 粉防己碱和蝙蝠葛碱对人白血病细胞株HL-60和K562的生长抑制作用[J]. 中国药理学通报，1995，11(6)：478-480.
[6] DONNELL T J, MEYN R E, ROBERTSON L E. Implication of apoptotic cell death regulation in cancer therapy[J]. Semin Cancer Biol, 1995, 6: 53.
[7] ORMENOD M C, PEACOCK J H. The role of apoptosis in cell killing by cisplatin: a flow cylometric study[J]. Br J Cancer, 1994, 69: 93-100.
[8] 丁 航，唐旭东，周克元. 蝙蝠葛碱和胡椒碱对两株鼻咽癌细胞增殖的影响[J]. 广东医学院学报，2003，21(1)：1，16-17.

(编辑 栾 嘉)

文章编号：1000-5404(2006)18-1863-01

个案与短篇

AO微型钢板螺钉与克氏针治疗掌指骨骨折的比较研究

史宗新，孟祥才，丛云海，晋合成，林 飞，綦子顺 (北京市房山区良乡医院骨科，北京 102401)

掌、指骨骨折是手部常见损伤，收集本科2003年2月至2005年7月患者56例，采用了AO微型钢板螺钉内固定治疗，疗效满意，现将本组病例与以往克氏针固定的1组病例进行比较。

1 资料与方法

1.1 一般资料

AO钢板螺钉固定组：56例78处骨折，男性42例，女性14例，年龄16-54岁，平均33.6岁。闭合性骨折55处，开放性骨折23处。克氏针固定组：64例87处；男性45例，女性19例，年龄16-71岁，平均36.5岁。闭合性骨折33处，开放性骨折54处。

1.2 研究方法

术后随访时，记录关节功能、骨折愈合时间及感染3项指标。关节功能按TAFS标准评定[1]。

作者简介：史宗新(1966-)，男，北京市房山区人，副主任医师，主要从事骨科创伤方面的研究，发表论文5篇。电话：(010)69351080-8108

收稿日期：2005-12-06；修回日期：2006-07-17

2 结果

AO微型钢板螺钉固定组平均随访5.5个月。根据TAFS评分，优良率88.5%。骨折愈合时间平均5.2周。闭合性骨折无感染，开放性骨折3处感染。

克氏针固定组随访时间4-15个月。按TAFS评分，优良率为71.3%，平均骨折愈合时间为8.1周。闭合性骨折2例针道感染，开放性骨折中9处发生感染。

3 讨论

AO微型钢板螺钉内固定治疗掌、指骨骨折，提供了骨折端的直接接触，牢固固定，可缩短骨折愈合时间，有利于手部功能的恢复。生物力学的研究结果表明[2,3]：AO微型钢板固定手部骨折在表面刚度、稳定性和压力方面优于其他固定方法。万杰等[4]报道AO微型钢板内固定治疗手部骨折，使骨折愈合时间比传统的内固定提早2-4周。

1枚克氏针固定骨折防旋作用不够，两枚交叉克氏针却倾向于使骨折断端分离，不利于骨折的愈合。克氏针常常于临近关节两侧穿出，阻挡伸指装置的滑动，影响关节的活动。

(下转1866页)