

冬凌草甲素对肿瘤细胞钠泵活性的影响

河南医科大学 吴孔明 张章沐 王庆端 华海婴 齐建英 张予

摘要 以 ^{86}Rb 示踪法,观察3种肿瘤细胞的钠泵转运活性及冬凌草甲素(Orid.)对其的影响。结果表明:(Orid.)腹腔注射及体外作用均能显著抑制艾氏腹水瘤细胞的钠泵转运功能;体外作用12小时,半数抑制浓度约为 $5\mu\text{g}/\text{ml}$,在此浓度下,药物作用1小时的抑制率为22%。同时测定人癌细胞系7901, Hep-2的钠泵活性高于人胚肺纤维母细胞系SL,且对Orid.较敏感。本文结果提示Orid.抗癌机理可能与钠泵活性抑制有关,从生物膜转运角度进一步证明Orid.的抗肿瘤作用。

关键词: 冬凌草甲素; 肿瘤细胞; 钠泵

肿瘤细胞的生长、增殖必需从外界环境中摄取大量营养物质,这些营养物的转运靠细胞膜钠泵来维持。近年,钠泵转运活性与癌变及癌细胞增殖的关系引起人们的注意^[1]。某些抗肿瘤药物能选择性抑制癌细胞的钠泵活性,以拮抗肿瘤细胞的快速增殖^[2]。冬凌草甲素是从中药冬凌草中提取的一种抗肿瘤成份,实验及临床证明它可通过多种途径抑制瘤细胞的生长,为进一步探讨其抗癌作用机制,本文以 ^{86}Rb 示踪法观察动物接种的艾氏腹水瘤细胞及体外培养的三种细胞系钠泵转运活性的影响。

材料和方法

药物: 冬凌草甲素针剂,郑州化学制药厂生产,规格25mg/ml。

动物: 昆明种小鼠,体重18—22g。本院动物中心提供。

瘤株: 艾氏腹水瘤细胞,由本室传代。正常人胚肺纤维母细胞系SL和肿瘤细胞系Hep-2, 7901,由本院病室室供给。

同位素: $^{86}\text{RbCl}$ 中国科学院原子能所生产,放射性活度 $2.29 \times 10^8 \text{Bq}/\text{ml}$ 。

试剂: 哇巴因(E. Merk 产品); RPMI-1640粉(日本进口); 胎牛血清(天津血液研究所); 牛血清白蛋白(上海化学试剂采购站); 反应介质含 NaCl 120mM, KCl 4.8mM, KH_2PO_4 1.2mM, NaHCO_3 24mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2mM 和葡萄糖 10mM。pH7.4。各种试剂皆为分析纯,用去离子水配制。

仪器: ^{131}I 放免测定仪

细胞钠泵活性测定: 本实验以 ^{86}Rb 作为示踪物,测定细胞对 K^+ 的摄取活性,把对哇巴因敏感部份作为钠泵转运活性,参照陆世伦方法^[3]。细胞钠泵

活性测定值为对哇巴因敏感的每 10^6 细胞每小时摄取的cpm数。放射性本底为46—91cpm。

统计: 各项实验结果均用 $\bar{x} \pm SD$ 表示,均数差别用t检验,两率差别用u检验。

实验结果

一、血清刺激对瘤细胞钠泵活性的影响

取接种后第7天的艾氏腹水瘤细胞,洗涤后用RPMI-1640制备细胞悬液,细胞数为 $10^6/\text{ml}$,加入血清浓度分别为0%, 1%, 5%, 15%; 在37℃培养2小时后收集细胞,经生理盐水,无K反应介质充分洗涤,将细胞悬浮于含1%牛血清白蛋白的反应介质中,调整细胞浓度并计数活细胞,按前述方法测钠泵转运活性值依次为 1612 ± 122 , 2204 ± 91 , 2508 ± 121 , 2836 ± 118 , 与不含血清组相比, P值均小于0.01。

二、冬凌草甲素ip对小鼠艾氏腹水瘤细胞钠泵转运的影响

取接种后第5天小鼠随机分组,每组8只,对照组ip丙二醇0.2ml/d,治疗组注射不同浓度的Orid. (5, 15, 20mg/kg) 0.2ml; 连用3天,第8天抽腹水制备后测钠泵活性,对照组为 2930 ± 426 ; 治疗组分别为 1520 ± 122 , 818 ± 140 , 582 ± 69 ; 各治疗组与对照组相比,差异有显著性($P < 0.01$)。

三、冬凌草甲素体外对艾氏腹水瘤细胞钠泵转运的抑制作用

1. 量效关系: 接种后第8天的小鼠艾氏腹水瘤细胞,洗涤离心后用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液制备细胞悬液($5 \times 10^5/\text{ml}$),每个培养瓶加入4ml,随机分组,每组6瓶。37℃无菌密闭培养12小时后测钠泵活性,对照组为 3035 ± 382 ,不同浓度的

Orid. (1, 2.5, 5, 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 分别为 2513 ± 224 , 2014 ± 177 , 1638 ± 194 , 925 ± 149 。各组间差异有显著性 ($P < 0.01$)。

2. 时效关系: 细胞悬液制备同上, 实验组加入 Orid. 终浓度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。然后分别在 37°C 恒温培养箱中药物作用 1, 3, 6, 9 小时之后, 取细胞悬液, 每组 6 瓶, 制备后测钠泵活性。为排除培养时间、血清刺激及其它因素对钠泵活性的影响, 每个时期均设丙二醇对照组。实验组钠泵活性分别为同期对照组的 78%, 61%, 50%, 37%, 同期实验组和对照组之比差异有显著性 ($P < 0.001$)。

四、正常人胚肺纤维母细胞系 SL 及人癌细胞系 Hep-2, 7901 的钠泵活性测定及 Orid. 抑制作用比较

上述三种细胞均用含 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养液 37°C 密闭培养, 治疗组第 3 天加入 Orid., 终浓度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$, 对照组加入等体积的丙二醇。第 4 天细胞贴壁生长为茂密的单层细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 吹打成单个细胞, 收集制备悬液, 计数活细胞后测钠泵活性值, SL: 2632 ± 156 ; 7901: 4255 ± 412 ; Hep-2: 4681 ± 126 。Orid. 组依次为 2139 ± 157 , 2489 ± 91 , 2272 ± 228 ; 分别为对照组的 80%, 58%, 49%。后两种细胞系钠泵活性显著高于前者, 且对 Orid. 的抑制作用较敏感。

讨 论

细胞钠泵转运活性与增殖状态有关, 并受多种因素的影响。血清刺激静止期的小鼠成纤维细胞, 可使 ^{86}Rb 主动转运增加 4 倍; 但对于增殖中的细胞。血清刺激只能使 ^{86}Rb 主动转运增加 20~50%, 也有报告达 1.8 倍, 且当血清浓度在 5~20% 时, 刺激作用最强。本文结果 5% 血清刺激可增加 ^{86}Rb 转运 56%, 15% 血清刺激可增加 75%, 与文献报告基本

一致^[3]。说明实验方法可靠。

很多研究报告肿瘤细胞钠泵活性高于正常细胞并与生长速度有关。章雄文等发现具有钠泵转运抑制作用的黄花夹竹桃甙体外实验时, 对多种人癌细胞株有生长抑制效应。作者还认为选用适当的膜转运抑制剂, 可能为肿瘤防治提供新的途径^[4]。本文结果表明冬凌草甲素 5~20 $\text{mg}/\text{kg}/\text{d}$, 连用 3 天, 能显著抑制艾氏腹水瘤细胞的钠泵转运, 同时, 实验中发现小鼠腹水减少或基本消失, 也支持钠泵活性与肿瘤生长速度有关; 体外实验 Orid. 对艾氏腹水瘤细胞钠泵活性的抑制具有明显的量一效和时一效关系; 且对钠泵活性高的人癌细胞系的抑制作用较强。Orid. 是通过受体接合直接抑制钠泵转运或者是通过其它生化环节, 阻止细胞增殖, 从而间接表现在钠泵转运的降低^[5]? 需要进一步分离纯化细胞膜 Na^+ , K^+ -ATP 酶来验证。总之, 钠泵活性下降说明肿瘤细胞增殖缓慢, 这就从生物膜转运角度证实 Orid. 的抗肿瘤作用。

参 考 文 献

- 1 陆世伦, 朱世能. 肿瘤与钠泵. 肿瘤, 1983, 3 (4): 175
- 2 Johnson MA. Serum stimulation of Potassium influxes. Ouabain binding and sodium influx in quiescent chicken embryo fibroblasts. J cell physiol, 1980, 103: 363
- 3 Asger Zaheer, et al. Na^+ , K^+ -Stimulated ATPase of human kidney, normal and adenocarcinoma, phosphorylation and inhibition by antitumor proteins. Biochem Biophys Res Commu, 1981, 102 (1): 86
- 4 章雄文, 等. 肿瘤细胞 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性与黄夹甙体外抗肿瘤活性的实验研究. 第四届全国肿瘤药理及化疗学术会议论文集. 郑州. 1992. 80
- 5 李英, 张覃沐. 冬凌草甲素对小鼠肿瘤核苷酸代谢的影响. 中国药理学报, 1987, 8 (3): 271

Effect of Oridonin on the activity of tumor cell sodium pump

Wu kongming, et al

Henan Medical University, 450052

The sodium pump activity of tumor cells and effect of Oridonin (Orid.) were measured by using ^{86}Rb tracing method. The results showed that serum stimulus increased pump activity of EAC cell in vitro; while Orid inhibited the ^{86}Rb infuix of EAC cell in vitro (1-7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and in vivo (5--20 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d}) \times 3$). preincubating cell with Orid (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 1, 3, 6, 9h, the inhibitory rates were 22%, 39%, 50%, 63%, respectively. The pump activity of tumor cell lines 7901, Hep-2 and normal cell line SL were 4255, 4681 and 2632; the inhibitory rates of Orid. (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were 42%, 51% and 20% separately. These data suggested that Orid. can restrain tumor cell growth by means of inhibiting sodium pump activity.

Key words: Oridonin; tumor; ^{86}Rb influx; Cell membrane