

某些药物对正常细胞和肿瘤细胞纤维蛋白溶酶原激活酶活性的影响

中国科学院生物物理研究所 刘朵花 张贺志

血液的凝固系统和纤溶系统是一个整体中不可分的两个部分,若失去平衡,就可能使机体出现异常。纤溶系统不仅有维持血液流体状态和保持腺体导管畅通等重要的生理功能,而且是许多疾病发生发展的重要因素。近来对纤维蛋白溶酶原的激活酶(PA)研究较多。它不仅是维持正常生理功能所必要的,而且与许多疾病密切相关,如心血管病、糖尿病等,尤其与肿瘤细胞的增殖、浸润、转移等关系密切。PA使纤维蛋白溶酶原(PGN)转变成为纤维蛋白溶酶(PN)。PN专一分解由赖氨酸或精氨酸的羧基所形成的肽键。癌细胞的PA活性比相应的正常组织高许多倍⁽¹⁻⁵⁾。近来发现有些药物对正常组织和肿瘤组织PA活性呈现不同的调节作用⁽²⁾。我们在测定了一些癌细胞和正常细胞PA活性水平的基础上,测定了氟美松、放线菌素D、雌激素、雌二醇、半胱氨酸等对这两类细胞PA活性的影响,并对其在抗癌方面的意义进行了讨论。

材 料 和 方 法

1. 动物和细胞:实验使用昆明种小白鼠和小鼠腹水肝癌(H₂₂)细胞。将正常小鼠断头处死,立刻取出肾,用制胶液(见后)洗去血污,按组织重量(克):制胶液体积(毫升)=1:1匀浆,留作点样用。把接种H₂₂细胞一周的小鼠拉颈处死,取出腹水,离心(2500转/分,5分钟),弃去上清液,细胞留作点样用。点样量为50微升。

2. 化学试剂和药品:人纤维蛋白原为Sigma产品,其中杂有PGN。凝血酶和纤维蛋白溶酶原为上海生物制品研究所的产品。尿激酶(UK)为卫生部药品生物制品检定所的产品。“772”培养基为上海东风试剂厂的产品。氟美松为市场上出售的口服药。雌二醇为Calbiochem进口产品。放线

菌素D为Sigma产品。半胱氨酸为中国科学院生物化学所东风厂产品。雌激素为法国uclaf出品。制胶液为“772”培养液:磷酸盐缓冲液(0.1M, PH7.4)=17:1”

3. 用平板法测定PA活性:该法既简便又直观,也比较灵敏。其原理是纤维蛋白原在凝血酶的作用下,形成不透明的纤维蛋白凝块,而在纤维蛋白原中杂有的PGN被PA激活成PN后,PN是活性很强的蛋白水解酶,可把纤维蛋白切成小肽,使凝块溶解成透明状态。溶圈的大小代表溶解活性的强弱。溶圈的最大直径(D₁)和最小直径(D₂)的乘积(D₁×D₂)与PA浓度在双对数坐标纸上呈直线关系。根据Willia S Tucker⁽⁶⁾和徐康森等^(7,8)的方法制胶(稍加修改)。0.5g琼脂糖放入25毫升制胶液中,加热熔化后,冷却至60℃左右,与25毫升0.4%的人纤维蛋白原(用制胶液溶解)混合,再加入50单位凝血酶,倒入灭菌培养皿中,置于室温形成5毫米厚的凝胶,即为“标准平板”。在测定某种药物的作用时,则另加入该种药物。在制好的平板上打5至6排直径为3毫米、间隔为20毫米的小孔,其中一排(5—6个孔)点尿激酶标准品(2.5—30微升,50单位/毫升),以便作标准曲线。其余各排孔点欲测定的样品。将平板置于37℃温箱中保温24小时左右,待溶圈明显后照相,并用卡尺量出溶圈的D₁和D₂。以尿激酶各点的浓度(单位)为横坐标,以尿激酶各点的D₁×D₂为纵坐标,在双对数坐标纸上做出尿激酶的标准曲线,然后根据所测样品溶圈的D₁×D₂数值,从标准曲线上找出相应的横坐标(尿激酶的浓度),从而得知各样品的PA相对水平。

结 果 和 讨 论

肿瘤(H₂₂)细胞的PA活性不受糖皮质激素(氟美松)的影响或影响很小,而正

常组织肾中的PA活性显著地受氟美松的抑制(如附图所示), P值小于0.01。

附图, 氟美松(4微克/毫升)对肿瘤(H_{22})细胞和正常组织(肾)PA活性的影响。 x_1 、 y_1 分别代表肿瘤(H_{22})细胞和肾组织点在标准板上时所表现的PA相对浓度在标准曲线上的位置。 x_2 、 y_2 为点在含氟美松板上时所表现的PA相对活性在标准曲线上的位置。

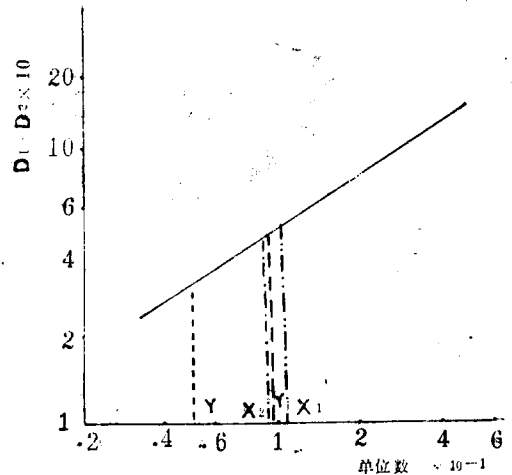
放线菌素D对肿瘤(H_{22})细胞的PA活性有显著的提高作用, 对正常组织肾此种作用不明显, 有时还有抑制作用。

雌二醇对肿瘤(H_{11})细胞和正常组织肾的PA活性都有明显的抑制作用($P < 0.01$)。

测雌二醇的标准平板, 上排点 UK 25ul, 20ul, 15ul, 10ul, 5ul(浓度为50单位/ml), 下排点肿瘤(H_{22})细胞, 每孔点50ul腹水(没经处理)。关于雌二醇平板(在制胶液中含有1微克/毫升的雌二醇), 点样完全与标准平板相同。

雌激素、半胱氨酸对正常组织肾和肿瘤细胞(H_{22})的PA活性都有明显的抑制作用。二者受抑制的程度类似。随着保温时间的延长, 抑制率逐渐下降。

以上五种药物: 有的只对肿瘤细胞的PA活性有明显的促进作用(如放线菌素D); 有的则对肿瘤细胞的PA活性影响不大, 而对正常组织的PA活性有显著的抑制作用(如氟美松); 有的则对二类细胞的PA活性均有抑制作用(如雌激素、雌二醇和半胱氨酸)。在长期应用上述药品治疗疾病时, 有必要考虑其对机体纤溶系统功能的不同影响所带来的问题。而从治疗癌症的角度考虑, 上述几种药物有的可能具有抗癌应用的良好前景。很多研究者⁽¹⁻⁵⁾证明, 肿瘤细胞的PA活性比相应的正常组织高许多倍。针对这一特点, 在一般不具选择性的抗癌药(结构上需带有 $-NH_2$)上连一个小肽(其羧基末端为赖氨酸或精氨酸)。经试验, 抗癌药连上小肽后, 对正常细胞和肿瘤细胞的杀伤力都大大下降。但当该种药物运行到肿瘤组织时, 由于肿瘤组织中具有高水平的PA活性, 可导致该组织内具有较高的PN水平, 进而使在肿瘤组织中较多地将该种药还原成原形抗癌药, 发挥强大的杀伤作用。而正常组织因PA活性较低, 故最后形成的原形抗癌药



附图. 氟美松对正常细胞和肿瘤细胞纤维旦白溶酶原激活酶活性的影响。

浓度也就很低, 从而可免受其害。在应用这种抗癌药时, 若同时给予氟美松、放线菌素D之类的药物, 进一步降低正常组织内的PA水平或提高肿瘤组织内的PA水平, 则更会提高这种抗癌药杀伤作用的选择性。今后经过进一步研究, 还可能找到既能降低正常组织PA活性、又能升高肿瘤组织PA活性的药物, 更大地拉开这两类组织的PA水平的差距, 从而获得更好的选择性。

参 考 文 献

1. Reich E: In Biological Markers of Neoplasia: Basic and Applied Aspects, ed. Rudden R W (Elsevier, New York), PP. 491-498, 1978
2. Philip L Carl, et al: Proc Nat Acad Sci USA 77: 2224, 1980
3. 周爱如: 细胞增殖调节因子与肿瘤, 生理科学进展 11: 41, 1980
4. A AHakim: Cancer Biochem Biophys 5: 63, 1980
5. Margaret Bruetsch: Int J Cances: 32, 121-126 (1983)
6. Tucker W S, et al: In vitro Cancer Research 38: 297, 1978
7. 叶智彰等: 浙江产蝮蛇毒纤溶组份对凝血系统的作用, 动物学研究 2: 33, 1980
8. 徐康森等: 尿激酶质量标准的研究, (一) 尿激酶效价测定法的比较, 药检工作通讯 9: 241, 1979