

低温联合紫外照射增强苦参碱诱导 Colo320 细胞凋亡作用的研究[※]

● 王 勇 章 敏*

关键词 低温联合紫外照射 Colo320 细胞 苦参碱 细胞凋亡

低温作为一种环境因素,能直接或间接地对细胞的生命活动造成影响。冷冻医疗对于某些良性和恶性肿瘤的治疗,无疑是一种新技术,在一定情况下可取代传统的外科手术、放疗以及其他物理疗法。但由于超低温冷冻损伤肿瘤组织及细胞过程中温度变化范围甚宽,仍会有少数肿瘤细胞存活,引起肿瘤残留和再生,降低了冷冻肿瘤治愈率。近年发现这种现象可通过冷冻手术后行辐射治疗加以补救,且冷冻使辐射治疗肿瘤的照射时间缩短,使用剂量显著降低^[1]。中医学认为苦参有清热燥湿功效,现代医学也认为苦参含有多种生物碱,除抗炎,抗过敏,升高白细胞等作用外,具有明显的抑制肿瘤,调节肿瘤细胞周期及诱导肿瘤细胞凋亡等作用^[2]。为从细胞学角度探讨低温、辐射、中药共同治疗肿瘤的可能机制,临床运用冷冻联合辐射疗法,配合中药苦参碱灌肠治疗大肠癌的机理提供实验依据,我们进行了低温及紫外照射联合苦参碱诱导人大肠癌细胞凋亡作用的初步研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

细胞系:人大肠癌细胞(Colo320)由中国典型培育物保藏中心提供。

1.2 主要试剂

RPMI-1640 购自美国 Gibco 公司;小牛血清购自杭州四季青公司;胰蛋白酶及 Hoechst33258 荧光染

※基金项目 湖北省卫生厅中西医结合项目(编号:鄂卫发[2005]455号-3)

*作者简介 章 敏,女,医学博士,研究方向为中医基础理论及实验研究。

●作者单位 湖北省中医学院(430065)

料购自美国 SIGMA 公司;苦参碱由北京双鹭药业股份有限公司提供(批号:20051201)。

1.3 主要仪器

二氧化碳培养箱:美国 LRBM ODEL 2300 型;超净工作台:苏州净化设备厂 CJ-1680 型;倒置显微镜;日本 OLYMPUS 公司,CK2-TRC-3 型;荧光电子显微镜:日本 OLYMPUS 公司,U-ND25 型。

1.4 方 法

细胞培养:将 Colo320 细胞接种至含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基中,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中常规培养。

低温处理:取对数期细胞 0.8×10^5 个/ml 接入 T-25 培养瓶中,7ml/瓶,37℃ 环境培养 36h 后吸去培养液,补加 8ml 新鲜的预冷培养液,并置于 -4℃,0℃,4℃ 处理 24h,将处理后的细胞恢复于 37℃ 培养 12h 后取样分析。

紫外照射:取对数期的细胞 2×10^5 个/ml 接入培养皿中,5ml/皿,37℃,5% CO₂ 培养 24h 后吸去培养液,用 PBS(PH7.2)洗两次,加入 3ml PBS 液,于 15W 紫外灯下 50,100,150cm 处照射 10min,弃 PBS 液,加培养液,置 37℃,5% CO₂ 培养箱培养并取样分析。

低温处理与紫外照射:取对数期的细胞 2×10^5 个/ml 接入培养皿中,5ml/皿,37℃,5% CO₂ 培养 24h 后吸出培养液,补加 5ml 预冷培养液,置 4℃ 处理 24h,吸出培养液,用 PBS(PH7.2)洗两次,加 3ml PBS 液,去培养皿盖,于 15W 紫外灯下 50cm 处照射 10min,继续培养后取样分析。

苦参碱诱导细胞凋亡:将处于对数生长期的细胞吹打成单细胞悬液,台盼蓝染色,显示细胞活力 > 95%,调整细胞密度为 1×10^5 个/ml,接种于 96 孔培

养板,每孔 100 μ l。实验组加入 100 μ l 不同浓度的苦参碱液,其浓度分别为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8mg/ml;对照组加入单纯 100 μ l RPMI-1640 培养基;空白组为无细胞的 200 μ l 1640 培养基。每组作 10 个复孔,以上各孔体积均为 200 μ l。将培养板移入 CO₂ 培养箱中,孵育 48 小时并取样分析。

低温联合紫外照射及苦参碱共同作用:根据预实验各项结果,确定将 0.2mg/ml(半数抑制浓度)苦参碱,在 4 $^{\circ}$ C 及 15W 紫外灯下 50cm 处照射 10min 环境下共同作用,观察凋亡情况。取对数期的细胞 2×10^5 个/ml 接入培养皿中,5ml/皿,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养 24h 后吸出培养液,补加 5ml 预冷培养液(含有 0.2mg/ml 浓度苦参碱),置 4 $^{\circ}$ C 处理 24h,吸出培养液,用 PBS (PH7.2)洗两次,加 3ml PBS 液,去培养皿盖,于 15W 紫外灯下 50cm 处照射 10min,继续培养后取样分析。

Hoechst 33258 荧光染色检测:收集以上各项实验中待测细胞,1000rpm 离心 5min,去上清,剩 100 μ l 重悬细胞,加固定液 1ml/管,固定 5min,离心,弃上清,悬浮细胞,重复离心,弃上清,悬浮细胞,取细胞悬液约 0.1ml 滴于洁净的盖玻片上,空气干燥,染色,封片,镜检。每样品随机计数 5 个视野,计算细胞凋亡百分率 AP = 凋亡细胞数/总细胞数 \times 100%,取其平均值。

2 结果

低温处理:Colo320 细胞经 -4 $^{\circ}$ C,0 $^{\circ}$ C,4 $^{\circ}$ C 处理 24h,并恢复于 37 $^{\circ}$ C 培养 12h 后,倒置显微镜下观察发现,细胞生长明显受到抑制,增殖速度减慢,细胞间隙变大,相互间呈疏松依附,并逐渐出现细胞离壁上浮情况。荧光显微镜下,相对于胞核完整,核质均匀弥散的正常细胞,凋亡细胞经荧光染色后表现为细胞核固缩、碎裂等。经 -4 $^{\circ}$ C,0 $^{\circ}$ C,4 $^{\circ}$ C 不同温度处理后,其凋亡率分别为 30.98%,31.72%,33.06%。实验中由于 -4 $^{\circ}$ C,0 $^{\circ}$ C 处理导致细胞发生的坏死性死亡较高,所以相对于 4 $^{\circ}$ C 环境起凋亡率反而有所降低。

紫外照射:经紫外线照射并培养后,倒置显微镜下观察,发现细胞生长明显受到抑制,细胞间隙变大,相互间的依附变得疏松,细胞形态开始改变,由正常扁平上皮状逐渐呈圆形,并开始脱壁上浮。经荧光染色可见典型的凋亡细胞。经紫外灯下 50,100,150cm 处照射并培育后,其凋亡率分别为 35.56%,22.69%,15.08%。说明细胞凋亡与紫外照射强度呈剂量依赖性,在一定距离内,照射距离越近,凋亡指数越高。提

示 Colo320 细胞凋亡反应受紫外照射的影响。

低温处理与紫外照射:呈典型的凋亡细胞状态,其凋亡率为 42.31%。提示 Colo320 细胞凋亡反应在受到低温处理与紫外照射影响下,其凋亡情况有所增加。

低温联合紫外照射及苦参碱共同作用:呈典型的凋亡细胞状态,其凋亡率达 48.17%。说明 Colo320 细胞凋亡反应在低温、紫外照射及苦参碱的共同影响下,其诱导凋亡作用明显提高。

3 讨论

大肠癌是一种常见消化道肿瘤,近年来发病率有明显的上升趋势。在手术根治前后,寻找有效的大肠癌配合治疗方法是当前急需解决的问题。采用抗肿瘤中药治疗恶性肿瘤是具有中医特色的肿瘤治疗方式。传统中药苦参是豆科植物苦参的干燥根,味苦性寒,入心、肝、胃、大肠、膀胱经,具有清热燥湿,杀虫,利尿的功能。其制剂苦参碱具有抗心率失常,抗炎,抗过敏,升高白细胞等作用,尤其是体内外研究发现,具有明显的抑制肿瘤,调节肿瘤细胞周期及诱导肿瘤细胞凋亡等作用。苦参碱的抗肿瘤活性研究,在近期主要针对肝癌和白血病细胞进行的较为广泛而深入,而对于大肠癌是否具有同样的疗效研究还有待探讨。另一方面,冷冻医疗对于若干良性和恶性肿瘤的治疗,也无疑是一种治疗新技术,在某种情况下可以取代传统的外科手术,放疗以及其它物理疗法^[3]。通常冷冻医疗采用液氮超低温直接接触肿瘤,使之冻后迅速死亡而达到治疗目的。但由于超低温冷冻损伤肿瘤组织及细胞温度变化范围较宽,故有少数肿瘤细胞存活而导致肿瘤残留和再生,降低治愈率。紫外线是一种非离子射线,具有多种生物学效应,如致癌、杀菌、致炎等作用。目前发现紫外线可诱导多种细胞发生凋亡,其诱导细胞凋亡的机制较复杂,尚有争议。有学者认为紫外线诱导细胞凋亡可能是在基因水平上诱导一些与细胞凋亡的相关基因发生改变有关。此外,还有证据表明,不同种类的细胞对紫外线诱导细胞凋亡的反应也存在着差别^[4]。

近年发现冷冻清除肿瘤残余细胞可通过冷冻术后行辐射治疗加以补救,且缩短肿瘤的照射时间,可使剂量显著降低^[5]。这为冷冻协同放疗治疗肿瘤奠定了基础。目前研究低温增强肿瘤细胞辐射敏感性的文献有所报道,但大多是通过检测低温处理及辐射前后细胞存活分数的变化来探讨细胞辐射敏感性

(下转第 66 页)

- [7] 樊毫军等. 慢性阻塞性肺疾病痰中性粒细胞表面 CD11b 表达及意义[J]. 湖北医科大学学报, 2000, 21(1): 33-36.
- [8] 张宏华, 张国陪, 杜娟. 慢性阻塞性肺病的发病机制[J]. 郴州医学高等专科学校学报 2003, 5(1): 50-53.
- [9] 吴兴萍, 徐丽华. 慢性阻塞性肺疾病中西医结合发病机制的研究进展[J]. 中华实用中西医杂志 2006, 19(6): 667-668.
- [10] Chung A, Zay K, Shay S, et al. Acute cigarette smoke - induced connective tissue breakdown requires both neutrophils and macrophage metalloelastase in mice[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002, 27: 368-374.
- [11] Chung A, Wang RD, Tai H, et al. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke - induced inflammation via tumor necrosis factor - a release[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003; 167: 1083-1089.
- [12] Chapman HA Jr, Shi GP. Protease injury in the development of COPD [J]. Thomas A. Neff Lecture. Chest, 2000, 117: 295-299.
- [13] 洪广祥. 论呼吸肌疲劳、营养障碍与慢性阻塞性肺疾病[J]. 中医药通报, 2006, 5(2): 4-6.
- [14] 李光, 陈德磊. 化痰益肺汤治疗肺气肿 37 例[J]. 河南中医, 2003, 23(7): 31-32.
- [15] 司东波. 调理脾胃法对慢性阻塞性肺疾病预后的影响[J]. 中国中医急症, 2006, 15(8): 838-839.
- [16] 刘洪, 陈云凤, 李群英, 等. 温补纳气、健脾利水法对慢性阻塞性肺疾病缓解期肺功能的影响[J]. 中国中医急症, 2006, 15(2): 116.
- [17] 黄晓军, 蔡智刚. 益气温阳与活血化痰法治疗慢阻肺的临床疗效观察[J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(7): 820-821.
- [18] 张铭熙. 健脾益肺补肾法治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期临床研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(7): 64-65.
- [19] 张玲. 益气扶正汤加针刺治疗慢性阻塞性肺病 288 例[J]. 陕西中医, 2003, 24(10): 882-883.
- [20] 汤翠英, 林琳, 许银姬. 培土生金法综合治疗对 COPD 稳定期患者营养状况及肺功能的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21(1): 16-19.
- [21] 孙志佳. 温补肺肾法治疗慢性阻塞性肺疾病的理论与临床探讨[J]. 中药药管理杂志, 2006, 14(5): 56-58.
- [22] 王鸿程, 卢文赛, 湛晓勤. 扶正中药对 COPD 患者细胞免疫功能调节作用的研究[J]. 泸州医学院学报, 1997, 20(1): 40.
- [23] 要全保, 王冬青. 益气温肾法防治慢阻肺低氧血症和右心肥厚实验研究[J]. 陕西中医, 2000, 21(2): 91-92.
- [24] 张腊林. 加减阳和汤治疗慢性阻塞性肺部疾病 44 例[J]. 湖北中医杂志, 1997, 19(5): 18.
- [25] 范钦平. 温补脾胃法治疗慢性支气管炎疗效观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10 卷(9): 52.
- [26] 刘明. 温补脾胃汤治疗慢性支气管炎 117 例[J]. 河南中医, 1997, 17(4): 222.
- [27] 王真, 张泓, 宓雅琳. 温补脾胃方治疗慢性阻塞性肺病稳定期 23 例[J]. 浙江中医杂志, 1999: 234-235.
- [28] 杨秀兰, 李瑞霞. 温补脾胃益肺化痰法治疗慢性支气管炎 66 例[J]. 四川中医, 2000, 28(5): 28.
- [29] 卢云, 张晓云, 黄宁, 等. 宣肺平喘、温阳利水法对肺心病急性加重期合并周围性水肿患者抗利尿激素的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(12): 9-11.
- [30] 万文蓉. 针灸治疗慢性阻塞性肺疾病 36 例[J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2006, 26(9): 672.
- [31] 庞巧玲, 鲍正宏. 穴位注射和中药贴敷防治慢性阻塞性肺疾病 180 例[J]. 中国民间疗法, 2005, 13(2): 31-32.
- [32] 彭明松, 龚新全, 谢六安. 中药穴位贴敷治疗慢性阻塞性肺疾病的临床观察[J]. 湖北中医杂志, 2006, 28(7): 44-45.

(上接第 62 页)

变化的^[6], 而从细胞凋亡角度进行的研究, 尤其是配合中药制剂共同诱导肿瘤细胞凋亡的研究几乎没有。目前, 在细胞凋亡研究领域判定凋亡的主要技术标准有: 采用显微镜观察细胞的形态学变化; 流式细胞仪检测出现凋亡特征的亚二倍体峰; 琼脂糖凝胶电泳出现梯状条带; 应用原位末端标记技术检测单个凋亡细胞。本实验仅仅是通过形态学对以上联合疗法作一个初步的可行性分析, 为后续实验打下基础。我们观察到低温、紫外照射及苦参碱在联合应用种情况下对于人大肠癌细胞 (Colo320) 确能提高凋亡率, 从细胞学的角度探索低温、辐射、中药治疗肿瘤的可能机制, 为临床运用冷冻联合辐射疗法, 配合中药苦参碱灌肠治疗大肠癌的机理提供了实验依据。

参考文献

[1] Steven A B, William R P, Shalom K, et al. Hypothermia - enhanced

Human Tumor Cell Radio sensitivity. *Crobiology*, 1997, 35: 70-78.

[2] 张鸣杰, 黄建. 苦参碱类抗肿瘤作用机制研究的新进展[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(2): 115-118.

[3] QIQJ, LUYX, ZHANG Y H. New A dvance of Freezing Treatment on Cancer Research. *Cancer in Foreign Medical Sciences*, 1985, 4: 227-230 (Ch).

[4] 胡庆柳, 丁振华, 谭小华, 等. 紫外辐射诱发 NIH3T3 细胞凋亡时 DNA 断裂的特性[J]. 生化与生物物理进展, 1998, 25(1): 53-56.

[5] Steven A B, William R P, Shalom K, et al. Hypothermia - enhanced Human Tumor Cell Radio sensitivity. *Crobiology*, 1997, 35: 70-78.

[6] Van R J, Van Den B J, Kipp J BA, et al. Effect of Hypothermia on Cell Kinetics and Response to Hypothermia and Xray. *Radiat Res*, 1985, 101: 292-305.