

拉曼光谱研究复方鹿仙草颗粒对 SMMC-7721 肝癌细胞的作用

张金彦, 郭建宇, 蔡炜颖, 孙真荣*

精密光谱科学与技术国家重点实验室(华东师范大学), 华东师范大学物理系, 上海 200062

摘要 应用拉曼光谱研究了不同浓度的鹿仙草溶液与肝癌细胞 SMMC-7721 的相互作用, 通过对药物作用前后细胞的光谱变化进行分析, 从而为阐明鹿仙草与肝癌细胞的作用方式提供重要的依据。拉曼光谱显示, 加入鹿仙草后, 细胞的许多峰都发生了变化。归属于磷酸骨架振动的 785 和 1092 cm^{-1} 的两个峰强度下降, 对应碱基 A 和 G 的峰 1312 和 1585 cm^{-1} 等也有不同程度的降低, 表明鹿仙草可能插入 DNA 碱基对之间, 使 DNA 复制受到抑制, 导致细胞 DNA 含量下降, 而且会引起 DNA 单、双链的断裂。同时, 研究还发现属于蛋白质的振动峰(1005 , 1360 , 1656 cm^{-1})强度也有不同程度下降, 说明蛋白质二级结构以及侧链氨基酸的环境均发生了改变。此外, 鹿仙草对细胞的作用效果随浓度增加逐步增强。

关键词 拉曼光谱; 鹿仙草; 肝癌细胞

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2008)11-2574-05

引言

复方鹿仙草颗粒是从古老的“包块方”到黄氏抗癌粉、仙九冲剂、斯库等黄氏系列抗癌药物中筛选出来的配伍最佳、疗效最好的治疗原发性肝癌的新药, 属纯天然植物药。其主要成分是鹿仙草。鹿仙草 (*Balanophora Simoensis* S. Y. Chang et Tam) 系蛇菰科蛇菰属植物。药效研究发现灌服复方鹿仙草颗粒对裸鼠人肝癌 SMMC-7721 的生长有明显抑制作用, 在组织病理形态上, 也可观察到给药组肿瘤细胞的变形、坏死, 细胞内出现空泡样变和巨核细胞、炎细胞浸润。

研究抗癌药物与肿瘤细胞相互作用的方法很多, 如: MTT 法、荧光显微镜、电子显微镜、流式细胞仪等^[1-3]。但这些传统的生物学方法都只能观测到宏观上药物对细胞的作用效果, 如细胞抑制率、形态变化, 并不能从分子学的角度判断出药物与细胞结合方式和位点, 以及作用后对细胞内大分子会产生怎样的影响。拉曼光谱是一种分子振动光谱, 它能够识别和区分不同的物质结构, 当物质的种类、数量、结构、构象及存在状态发生改变的时候, 在拉曼光谱上会显示出相应的光谱强度或频率的变化, 因此成为研究物质分子结构及变化的重要手段。拉曼光谱技术在测量生物分子时, 具有结构信息量大、操作方便等优点, 而且水对拉曼光谱影响

很小。随着光谱学及激光技术的发展, 拉曼越来越广泛地用于蛋白质、核酸等生物大分子的结构研究以及与其它物质的相互作用上, 并且开始深入地研究细胞和组织等更复杂的体系^[4-8]。本文通过对细胞拉曼光谱变化进行分析, 观察鹿仙草溶液和肝癌细胞的相互作用, 从而为阐明中药鹿仙草与肝癌细胞的作用方式提供重要的参考价值。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

SMMC-7721 细胞购于上海午立生物技术有限公司, 复方鹿仙草颗粒系云南黄家医圈制药有限公司产品, 实验所用仪器是法国 Jobin Yvon T 64000 型共焦显微拉曼光谱仪。

1.2 细胞培养及处理

取 5 组处于对数生长期的细胞, 1 组为对照组, 其余 4 组分别加入不同剂量鹿仙草于培养液中, 使培养液中鹿仙草终浓度依次为 0.1 , 0.2 , 0.5 , $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 培养 24 h 后将细胞消化下来, 离心弃上清, 加入 PBS 缓冲液 4 mL 吹散成细胞悬液, 再离心, 重复 2 次, 以消除培养液影响, 将离心后的细胞悬浮在少量缓冲液中, 滴在玻璃盖玻片上进行拉曼光谱测量。

1.3 拉曼光谱

收稿日期: 2007-09-22, 修订日期: 2007-12-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(10574046), 国家基础研究重大项目(2006CB806006, 2006CB921105), 教育部新世纪人才计划项目(NCET-04-0420), 高等学校博士点基金项目(20050269011)和上海市科委科技启明星计划项目(06QH14003)资助

作者简介: 张金彦, 女, 1982年生, 华东师范大学物理系硕士研究生 e-mail: ys03122038@student.ecnu.edu.cn

* 通讯联系人 e-mail: zrsun@phy.ecnu.edu.cn

拉曼光谱测量用 T64000 型共焦显微拉曼光谱仪, 使用液氮冷却的 CCD 作为探测器, 氦-氩离子激光器作为光源, 配备一台光学显微镜。实验条件如下: 激发光波长 514.5 nm, 功率 80 mW; 测量时间 100 s, 2 次累加, 扫描范围为 700~1800 cm^{-1} 。所得光谱用五次多项式扣除荧光本底后并光滑, 以位于 1450 cm^{-1} 位置拉曼峰 (C-H 变形振动峰) 强度归一化^[9], 最后把所得光谱统计取平均值以减少实验误差。

2 结果和讨论

图 1 为实验所得的 SMMC 7721 肝癌细胞的拉曼光谱, *a* 为空白组, *b*, *c*, *d*, *e* 为鹿仙草作用 24 h 后细胞的拉曼谱, 药物浓度分别为 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。图 2 为加药组与空白组光谱的差谱。图 3 描绘了细胞主要拉曼峰的强度随药物浓度变化的曲线。拉曼谱主要谱峰的指认如表 1 所示^[10-13]。

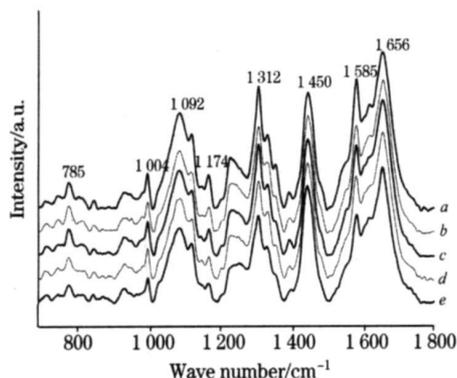


Fig 1 Raman spectra of SMMC 7721 liver cancer cells reacting with luxiancao at the different concentrations

a: 0; *b*: 0.1; *c*: 0.2; *d*: 0.5; *e*: 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

从图中可以明显看出鹿仙草作用后细胞的拉曼谱与空白组相比有了较大的变化, 785, 1092, 1174, 1312, 1585, 1656 cm^{-1} 等峰强度都有不同程度的下降, 且随药物浓度的增大下降趋势更明显。由于拉曼谱线的强度与散射中心的数

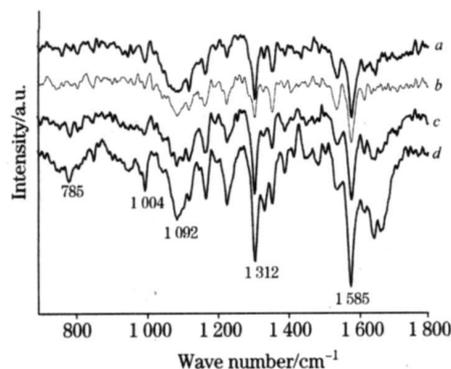


Fig 2 Difference spectra of cells reacting with luxiancao and blank cells

Concentration of luxiancao is *a*: 0.1; *b*: 0.2;

c: 0.5; *d*: 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

目成正比, 谱线强度的变化即意味着散射中心数目的变化, 谱线强度降低说明散射中心的数目减少, 相应谱线所属的基团和化学键受到了损伤^[14, 15]。

Table 1 Peak assignments for the SMMC 7721 Raman spectrum

峰位 / cm^{-1}	指认	
	DNA	蛋白质
785	O—P—O str; U, C, T ring br	
1004		Sym ring br Phe
1092	PO_2^- str	
1126		C—N str
1174		C—H in-plane bend Tyr
1312	A	CH def
1339	A, G	CH def
1360		Trp
1450		CH def
1585	G, A	
1619		C=C Tyr, Trp
1656		Amide I helix

DNA 是很多抗癌药物作用的重要靶点, 它的拉曼峰主要来自磷酸骨架基团和 DNA 各种碱基的振动。1092 cm^{-1} 处的峰归属于 DNA 骨架中磷酸离子 PO_2^- 的对称伸缩振动峰, 它对构象变化不灵敏^[13]。实验结果显示, 加入药物后 1092 cm^{-1} 峰强度明显降低, 下降幅度保持在 12%~20% 之间, 随浓度增加降幅变化不大。这个峰的强度已经可以作为一种判断 DNA 含量的标准^[9]。在癌变过程中, 细胞无限增殖, DNA 大量复制, 导致细胞中的 DNA 含量增加, 而该峰强度减小表明加入药物后 DNA 含量减小, DNA 复制被抑制。785 cm^{-1} 对应 DNA 磷酸二酯 (O—P—O) 对称伸缩振动, 它对构象变化灵敏, 当 DNA 呈无序状态时它会位移到 790 cm^{-1} 附近^[13], 而磷酸二酯的损伤则会引起 DNA 单、双链的断裂^[14-17]。从图 2 和图 3 可以看出, 加入药物后 785 cm^{-1} 的峰位并未发生位移, 但强度有所下降, 药物浓度为 0.1 和 0.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时强度变化不大, 浓度进一步增大时强度下降 20%, 浓度为 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 降幅增大到 30%。这说明低浓度药物对磷酸二酯影响不大, 当药物浓度高于 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时会影响磷酸二酯振动, 进而可能造成 DNA 单、双链的断裂。此外, DNA 碱基的谱线在加入药物后发生了很大的变化, 加入药物后归属于鸟嘌呤 G、腺嘌呤 A 振动的谱线 1312, 1339, 1585 cm^{-1} 有明显下降, 且随药物浓度增加降幅逐步增加。对于 1312 cm^{-1} , 当药物浓度为 0.1 和 0.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时强度下降 10% 左右, 浓度增至 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时强度下降将近 20%, 浓度为 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 降幅达 30%。而 1339 和 1585 cm^{-1} , 在药物浓度低于 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 降幅分别为 4%~6% 和 16%~19%; 当浓度增大到 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时降幅增大, 分别为 26% 和 32%。过去研究已经证实药物分子是通过插入、沟槽键联、共价键联三种基本方式与 DNA 相互作用, 药物与 DNA 的插入作用会引起拉曼光谱的减色性, 即谱峰强度的下降^[18]。实验结果所示的碱基拉曼峰的

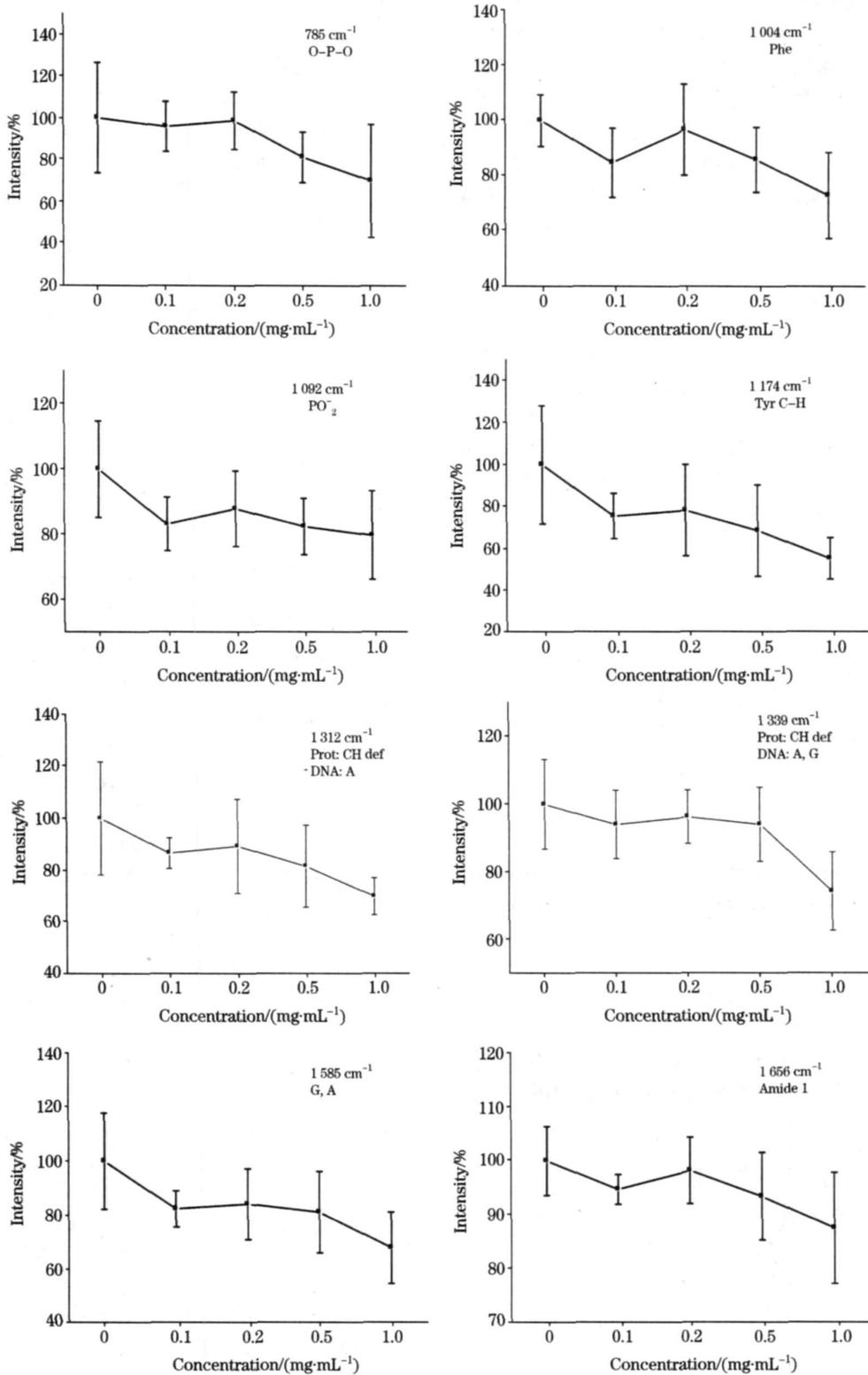


Fig 3 Raman bands of cells varied with the increase in luxiancao concentration

大幅度下降, 说明药物可能插入到 DNA 碱基对之间, 从而
影响 DNA 复制。

蛋白质的拉曼谱峰可以得到关于其主链构象、二级结构
和侧链氨基酸构象变化的信息。酰胺 I 带拉曼峰位于 1 656

cm⁻¹, 归属为 α 螺旋结构, 表明细胞蛋白质以 α 螺旋结构为
主。 α 螺旋结构的另一个判据是 900~ 945 cm⁻¹ 附近的骨架
C—C 伸缩振动的谱线, 它是构象灵敏的, β 折叠在此区域无
谱线^[13]。从图 1 可以看到在 938 cm⁻¹ 处有谱峰, 与上述判断

相符。从图 2 和图 3 可以看出, 加入药物后 $1\ 656\ \text{cm}^{-1}$ 峰强度下降, 浓度低时降幅不大, 仅有 2% ~ 6%, 浓度增大到 $1.0\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时下降 13%。 $1\ 656\ \text{cm}^{-1}$ 拉曼峰的强度与细胞 α 螺旋结构的含量相关, 峰强度下降说明药物作用使得蛋白质二级结构中 α 螺旋结构比例有所下降, 但是药物浓度低时影响不大, 浓度达到 $1.0\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时药物作用显著。 $1\ 004\ \text{cm}^{-1}$ 归属于苯丙氨酸 Phe 单基取代苯环的振动, $1\ 174\ \text{cm}^{-1}$ 归属于酪氨酸 Tyr C-H 平面内弯曲振动模式, 这两个峰在药物作用后都有明显下降。 $1\ 004\ \text{cm}^{-1}$ 强度在药物浓度为 $0.1\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时降幅达 15%, $0.2\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时强度又有所回升, $0.5\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时下降了 15% 左右, $1.0\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时降幅达 27%; $1\ 174\ \text{cm}^{-1}$ 加入药物后变化很大, 随浓度增大降幅依次增大, 从 25% 到 30%, 最大达 45%。这表明药物作用使得苯丙氨酸及酪氨酸的环境乃至含量都发生了变化。 $1\ 360\ \text{cm}^{-1}$ 属于色氨酸吡啉环的振动, 该谱线对于环境和聚集状态的改变是敏感的, 它的存在表明色氨酸残基的吡啉环处于“埋藏式”^[13]。图 1 显示, 肝癌细胞拉曼谱 $1\ 360\ \text{cm}^{-1}$ 处有一肩峰, 而药物作用后, 该峰逐渐减弱最后消失, 说明药物作用使细胞色氨酸残基逐步“暴露”出来。此外, 归属于色氨酸的 C=C 振动的 $1\ 619\ \text{cm}^{-1}$ 也略有下降。

由此可见, $1\ 312$, $1\ 585$, $1\ 174$, $1\ 004\ \text{cm}^{-1}$ 即碱基和蛋白质侧链氨基酸的拉曼峰对药物很敏感, 药物浓度很低时拉曼谱就有变化, 而归属于磷酸骨架和蛋白质二级结构的 785 ,

$1\ 656\ \text{cm}^{-1}$ 在药物浓度低时变化不大, 浓度高时才有明显变化, $1\ 656\ \text{cm}^{-1}$ 最大降幅也只有 13%, 而蛋白质中氨基酸以及 DNA 对应的各峰下降幅度很大。这些结果表明药物作用对细胞内 DNA 及氨基酸影响较大, 而对蛋白质二级结构变化影响不大, 药物对细胞的作用效果随药物浓度增加逐步增强, 只有在浓度高时 DNA 链可能断裂, 使蛋白质二级结构变化明显。

3 结 论

用拉曼光谱研究了中成药复方鹿仙草颗粒与肝癌细胞的相互作用。根据光谱分析推断得知: (1) 药物作用使得 DNA 链发生断裂, DNA 含量下降, 但 DNA 构象并未发生反应, 药物可能插入到碱基对之间, 使 DNA 复制受到抑制, 从而可能诱导细胞的凋亡。(2) 药物作用使得细胞内蛋白质侧链的氨基酸环境改变很大, 而蛋白质二级结构变化不大, α 螺旋结构比例略有下降。(3) 药物作用效果随药物浓度的增大而增加。综上所述, 鹿仙草可以与肝癌细胞内的 DNA、蛋白质相作用, 从而诱导肝癌细胞凋亡, 但是药物与细胞具体结合位点及方式还有待进一步研究。拉曼谱作为一种分子振动光谱, 可以成为药理研究的工具, 具有方便、快捷的优点, 结合其他的研究方法可以在药物筛选和药理研究中发挥重要的作用。

参 考 文 献

- [1] WANG Shi hong, WEI Wei, XU Du Juan, et al(王世宏, 魏伟, 许杜娟, 等). Anhui Medical and Pharmaceutical Journal(安徽医药), 2006, 10(1): 8.
- [2] SONG Wei guang, WANG Yi feng, ZHANG Zhi, et al(宋文广, 王毅峰, 张志, 等). Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine(陕西中医), 2006, 27(5): 629.
- [3] CHEN Long fei, CHEN Tao(陈龙飞, 陈涛). Chinese Journal of the Practical Chinese and Modern Medicine(中华实用中西医杂志), 2003, 6(14): 2123.
- [4] GUO Jian yu, SUN Zhen rong, WU Liang ping, et al(郭建宇, 孙真荣, 吴良平, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(3): 460.
- [5] TANG Yu long, GUO Zhou yi(唐玉龙, 郭周义). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(4): 653.
- [6] YU Ge, ZHANG Pan, TAN En zhong, et al(于舸, 张攀, 谭恩忠, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(2): 295.
- [7] Hanlon E B, Manoharan R, Koo T W, et al. Phys. Med. Biol., 2000, 45: R1.
- [8] Ramasamy M, Yang W, Feld M S. Spectrochimica Acta Part A, 1996, 52: 215.
- [9] Sharon R H, William B C, Andre K B, et al. Cancer Lett., 1996, 110: 35.
- [10] Notingher I, Verrier S, Romanskab H, et al. Spectroscopy-An Interational Journal, 2002, 16(2): 43.
- [11] Verrier S, Notingher I, Polak J M, et al. Biopolymers, 2004, 74(1-2): 157.
- [12] Notingher I, Verrier S, Haque S, et al. Biopolymers, 2003, 72(4): 230.
- [13] XU Yi ming(许以明). Raman Spectroscopy in Application of Structure Biology(拉曼光谱及其在结构生物学中的应用). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2005.
- [14] KE Wei zhong, ZHOU Dian feng(柯惟中, 周殿凤). Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory(光谱实验室), 2004, 21(3): 432.
- [15] LIU Song hao, MENG Yaoyong(刘颂豪, 孟耀勇). Acta Optica Sinica(光学学报), 2000, 20(4): 529.
- [16] XU Yi ming, ZHANG Zhi yi, XU Guo rui(许以明, 张志义, 徐国瑞). Chinese Science Bulletin(科学通报), 1989, 34(19): 1500.
- [17] ZHAO Hong xia, XU Yi ming, ZHANG Zhi yi(赵红霞, 许以明, 张志义). Chinese Science Bulletin(科学通报), 1998, 43: 957.
- [18] LI Wei, CHEN Wu gao, LIANG Yong mao(李蔚, 陈五高, 梁永茂). Chinese Journal of Laser Medicine & Surgery(中国激光医学杂志), 1998, 7(2): 102.

Raman Spectroscopic Investigation on the Interactions between Liver Cancer Cells (SMMC 7721) and Fufang Luxiancao Particles

ZHANG Jir yan, GUO Jiar yu, CAI Wei ying, SUN Zheir rong*

State Key Laboratory of Precision Spectroscopy and Department of Physics, East China Normal University, Shanghai 200062, China

Abstract Luxiancao is a new medicine for liver cancer, and is purely natural botanical. It has good curative effects and few side effects. The curative mechanism of Luxiancao is unknown. In the present paper, the authors used a 514.5 nm laser to measure the changes in the Raman spectrum of liver cancer cells (SMMC 7721) treated by Luxiancao at different concentrations. The study can help us know more about the mechanism, efficiency and side effects of Luxiancao. The results show that significant changes were observed in the cells' Raman spectra after reacting with Luxiancao. The intensities at 785 and 1092 cm^{-1} , corresponding to DNA phosphate backbone vibration, were reduced; and the Raman bands for the bases A and G at 1312 and 1585 cm^{-1} also decreased, indicating that Luxiancao may be inserted in DNA bases and influence the DNA replications, resulting in the reduction in DNA content and breaking of the DNA strands. Besides, the intensity of 1360 cm^{-1} , belonging to Trp, decreased gradually and disappeared in the end, indicating the Trp of cancer cells began to be exposed when adding in Luxiancao. The bands at 1004 cm^{-1} for Phe and 1656 cm^{-1} for proteins α helix also decreased, suggesting that there were changes in the structure of protein and circumstance of amino acid. Moreover, the effects on cancer cells were enhanced gradually with the HCPT concentration increasing. Since a Raman spectrum is a chemical fingerprint of a sample, the different concentration dependent changes in the Raman spectra of individual cells due to reacting with Luxiancao can overcome the limitations of other detection systems used for quantitative and qualitative analysis of the drug.

Keywords Raman spectroscopy; Luxiancao; Liver cancer cells

(Received Sep. 22, 2007; accepted Dec. 28, 2007)

* Corresponding author