

石形成,同时泽泻水提液组对草酸及钙的代谢没有影响,其抑制结石的形成,可能是通过抑制草酸钙结晶的生长和聚集,减少肾小管内草酸钙晶体的形成和沉积从而抑制实验性大鼠尿草酸钙结石的形成。本实验采用 1% 乙二醇和 2% 氯化铵水溶液 ig 诱导大鼠肾草酸钙结石形成。实验表明 B 组大鼠的血清 BUNM, Cr 含量, 24 h 尿 Ox , Ca^{2+} 分泌量和肾 Ca^{2+} 含量显著高于 A 组,这与肾组织病理切片观察到的结果是一致的。而泽泻的乙酸乙酯浸膏高、低剂量组体内均能明显降低实验性草酸钙结石大鼠 24 h 尿 Ca^{2+} 分泌量和减轻肾小管损伤的程度,而且泽泻的乙酸乙酯浸膏高剂量组也显著降低大鼠肾组织 Ca^{2+} 的含量,因此能抑制体内尿草酸钙结石的形成。但泽泻正丁醇浸膏和水浸膏对体内草酸钙结石的形成影响较小。同时本研究显示,泽泻的各实验组体内均不能降低尿 Ox 的排泄,这与以往的研究结果是一致的,进一步证实泽泻的乙酸乙酯浸膏主要是通过阻止草酸钙结晶生长和聚集作用而抑制结石形成,是泽泻抑制尿草酸钙结石形成的有效活性部位。

川村等^[6]对泽泻具有体外抑制草酸钙结晶生长和聚集的有效成分进行了研究,发现主要是相对分子质量 $> 10^4$ 的物质,并不含葡胺聚糖类物质。

Honda 等^[7]发现,泽泻煮沸提取的成分中相对分子质量小于 10^4 及 $5 \times 10^4 \sim 3 \times 10^5$ 的成分有抑制草酸钙结晶生长的作用,因此,有必要对泽泻抑制草酸钙结晶生长和聚集的有效活性成分作进一步的研究。

References

- [1] China Pharmaceutical University, China Medicinal Science and Technology Publishing House. *Collection Words of Chinese Materia Medica* (中药辞海) [M]. Beijing: China Medicinal Science and Technology Publishing House, 1996.
- [2] Tomoda M, Gonda R, Shimizu N, et al. Characterization of an acidic polysaccharide having immunological activities from the tuber of *Alisma orientalis* [J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17 (5): 572-576.
- [3] Utsunomiya M, Koide T, Yamaguchi S, et al. The effect of kanpou medicine on the growth and aggregation of calcium oxalate crystals *in vitro* [J]. *Hinyokika Kyo*, 1991, 37 (10): 1097-1101.
- [4] Yamaguchi S, Jihong L, Utsunomiya M, et al. The effect of takusha and kagosou on calcium oxalate renal stones in rats [J]. *Hinyokika Kyo*, 1995, 41 (6): 427-431.
- [5] Yin C P, Liu J H, Zhang Y S, et al. Effects of *Alisma orientalis* Juzep. on calcium oxalate crystallization *in vitro* and calcium oxalate renal stone in rat [J]. *Acta Univ Med Tongji* (同济医科大学学报), 1997, 26 (2): 99-101.
- [6] Kawamura K, Moriyama M, Nakajima C, et al. The inhibitory effects of Takusha on the formation, growth and aggregation of calcium oxalate crystals *in vitro* [J]. *Acta Urol Jpn*, 1993, 39: 695-700.
- [7] Honda M, Yoshimura K, Miyake O, et al. Inhibitory of oral administration of Takusha on calcium oxalate crystallization in human whole urine [J]. *Hinyokika Kyo*, 1997, 43 (5): 333-337.

苦参碱诱导 K562 细胞酪氨酸激酶与磷酸酶的活性改变

刘北忠¹, 蒋纪恺¹, 何於娟¹, 张彦¹, 刘小珊^{2*}

(1. 重庆医科大学临床生化教研室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学临床学院血液科, 重庆 400016)

摘要: 目的 研究苦参碱诱导 K562 细胞分化的信号转导机制。方法 运用链亲和素-生物素放大系统结合的酶联免疫法, 动态检测苦参碱作用于 K562 细胞后, K562 细胞膜相与胞浆内的酪氨酸激酶与磷酸酶的变化。结果 结合特异性激酶抑制剂的使用, 首次证实了在苦参碱对 K562 细胞的诱导分化过程中, 有广泛性的蛋白酪氨酸激酶活性的短暂下降, 同时伴有蛋白酪氨酸磷酸酶的活性变化。结论 在苦参碱诱导 K562 细胞分化的信号转导过程中, 涉及到蛋白酪氨酸激酶的活性改变, 膜相中蛋白酪氨酸激酶的活性改变先于胞浆内的改变, 提示有一个信号的跨膜转运过程。同时伴有蛋白酪氨酸磷酸酶的活性变化, 反映了胞内的蛋白酪氨酸残基磷酸化与去磷酸化的即时调节机制。

关键词: 苦参碱; K562 细胞; 细胞分化; 信号转导; 酪氨酸激酶; 酪氨酸磷酸酶

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)01-0048-04

Change of tyrosine kinase and phosphatase activity in K562 cells induced by matrine

LIU Bei-zhong¹, JIANG Ji-kai¹, HE Yu-juan¹, ZHANG Yan¹, LIU Xiao-shan²

* 收稿日期: 2002-06-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39670881, 30171150)

作者简介: 刘北忠 (1970-), 男, 重庆人, 博士, 重庆医科大学临床生化教研室副主任, 主要从事中药抗肿瘤的分子机制研究。

Tel (023) 68894666 E-mail lbz2753@hotmail.com

(1. Department of Clinical Biochemistry, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China; 2. Department of Hematology, College of Clinical Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract Object To study the mechanism of signal transduction in K562 cell differentiation induced by matrine. **Methods** The method of ELISA coupled with streptavidin-biotin system was used to detect the activity of protein tyrosine kinase and phosphatase respectively in cytoplasm and membrane of K562 cells treated by matrine at different time. **Results** Using specific kinase inhibitor, it was demonstrated in the first time that the activity of protein tyrosine kinase decreased transiently accompanying the change of protein tyrosine phosphatase activity. **Conclusion** The change of protein tyrosine kinase activity was involved in the course of K562 cell differentiation induced by matrine. The tyrosine kinase activity in cell membrane decreases more rapidly than that in cell cytoplasm, suggesting that there be a signal transmembrane transport process. The change of tyrosine phosphatase activity following the kinase reflects the real time regulation of phosphorylation and dephosphorylation.

Key words matrine; K562 cell; cell differentiation; signal transduction; tyrosine kinase; tyrosine phosphatase

传统的肿瘤疗法对人体细胞进行非选择性杀伤, 有较大的毒副作用。无创伤性的生物学疗法具有广阔的应用前景。苦参碱是苦参的主要生物碱, 一定浓度的苦参碱能诱导红白血病细胞株 K562 细胞向红细胞系分化^[1]。为探讨其诱导分化的机制, 本研究从蛋白的磷酸化与去磷酸化的调节入手, 动态检测了与细胞的增殖和分化密切相关的膜相与胞浆内的蛋白酪氨酸激酶活性, 同时检测了相应的蛋白酪氨酸磷酸酶的活性变化。

1 材料与方法

1.1 主要仪器: CO₂培养箱 (Sheldon Manufacturing, Inc., USA), 低温高速离心机 (Hitachi Himac CF15, Japan), 酶标仪 (BIO-RAD Model 3550-UV MICRO PLATE READER, USA)

1.2 主要试剂: 苦参碱标准品 (纯度 > 99.9%, 日本大正制药惠赠), 细胞培养基 RPMI 1640 (GIBCO, USA), 蛋白酶抑制剂 PMSF, aprotinin, leupeptin (均购自 Sigma Inc., USA), Tyrosine Kinase Assay Kit (BOEHRINGER MANNHEIM, Germany), Tyrosine Phosphatase Assay Kit (BOEHRINGER MANNHEIM, Germany)

1.3 样品准备^[1-3]

1.3.1 细胞培养: 取对数生长期的 K562 细胞, 用 RPMI 1640 细胞培养液 (含 10% 新生小牛血清) 调整细胞浓度为 1×10^7 /mL, 加入苦参碱标准储备液, 使终浓度为 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。然后置 CO₂ 培养箱 37℃, 5% CO₂ 培养, 在不同时间准确收集细胞

1.3.2 总蛋白提取: 细胞经 PBS 洗涤后, 用冰预冷的含 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ PMSF, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ Aprotinin 和 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ Leupeptin 的 RIPA 三去污剂裂解缓冲液裂

解细胞, 然后经冰预冷的微型匀浆器匀浆后, 4℃, 1000g 离心 10 min, 收集上清液作为总蛋白提取物。用于蛋白酪氨酸激酶的活性测定时, 尚须加入 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 钒酸钠, 以抑制蛋白酪氨酸磷酸酶的活性 (以下同)。

1.3.3 胞浆蛋白提取: 细胞经 PBS 洗涤后, 用冰预冷的低渗裂解液 (见试剂盒说明书) 裂解细胞, 后同总蛋白的提取, 收集上清液作为胞浆蛋白提取物。

1.3.4 膜相蛋白提取: 收集低渗裂解液裂解细胞后, 经离心得到的沉淀, 再以 RIPA 三去污剂裂解缓冲液作用 30 min, 经匀浆离心后, 收集上清液作为膜相蛋白提取物

1.4 活性测定^[2,4]

1.4.1 蛋白酪氨酸激酶的活性测定: 经样品处理过程提取的各种蛋白质提取物 (含蛋白酪氨酸激酶), 分别与生物素标记的含酪氨酸残基的激酶底物 (Biotin-EGPW LEEEEAYGWMDF-NH₂) 作用后, 使部分底物的酪氨酸残基磷酸化; 借助于标记的生物素, 底物与链亲和素包被的酶标板微孔结合; 洗去未结合的底物后, 加入过氧化物酶标记的高度特异性的抗磷酸化酪氨酸残基的抗体, 与磷酸化的酪氨酸残基结合; 洗去未结合的抗体, 最后加入过氧化物酶的催化底物 ABTS 进行比色。测定波长 405 nm, 参考波长 490 nm 通过蛋白酪氨酸激酶活性—吸光度 ($A_{405} - A_{490}$) 的标准曲线进行定量。其中, 蛋白酪氨酸激酶活性以酪氨酸磷酸化肽的生成量表示。

1.4.2 蛋白酪氨酸磷酸酶的活性测定: 测定原理与蛋白酪氨酸激酶的活性测定相似, 只是改用相应的酪氨酸残基已磷酸化的底物 (Biotin-EGP-

WLEEEEEAY~ PO₄ GWMDF-NH) 蛋白酪氨酸磷酸酶的活性的定量则是以阴性对照的吸光度 ($A_{405} - A_{490}$) 为 100%, 通过公式: $(A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$ 来计算其相对活性 PTPase (%)。

2 结果

2.1 不同浓度的苦参碱作用 K562细胞 5 min后, 总的蛋白酪氨酸激酶活性(以磷酸化肽的生成量 PP 表示)变化, 见图 1

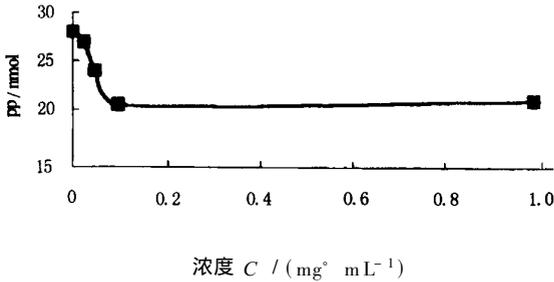
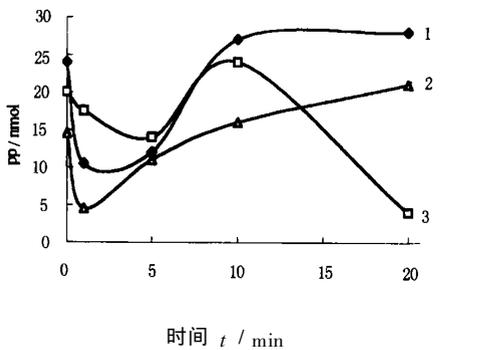


图 1 苦参碱浓度-磷酸化肽曲线

Fig. 1 Curve of matrine concentration-phosphopeptide

2.2 苦参碱 (0.1 mg/mL) 作用于 K562细胞后的蛋白酪氨酸激酶活性变化: 见图 2



1-总蛋白提取物 2-膜相蛋白提取物 3-胞浆蛋白提取物
1-total protein extract 2-cell membrane protein extract
3-cell cytoplasm protein extract

图 2 磷酸化肽-时间曲线

Fig. 2 Curve of phosphopeptide-time

2.3 不同浓度的苦参碱作用于 K562细胞后, 总的蛋白酪氨酸磷酸酶的活性变化: 见图 3

2.4 苦参碱作用于 K562细胞后蛋白酪氨酸磷酸酶活性的变化: 见图 4

3 讨论

K562细胞的诱导增殖与分化, 涉及到多条信号转导途径。其中, 蛋白酪氨酸激酶受体途径与蛋白酪氨酸激酶偶联受体途径是重要的信号转导通路^[5]。由于信号的传递是一个多分子参与的、迅速的、级联放大的过程, 并且具有非线性的特点。而一般的研究是以 RT-PCR技术扩增信号分子的 mRNA, 通过定性或定量分析来反映信号分子的表达情

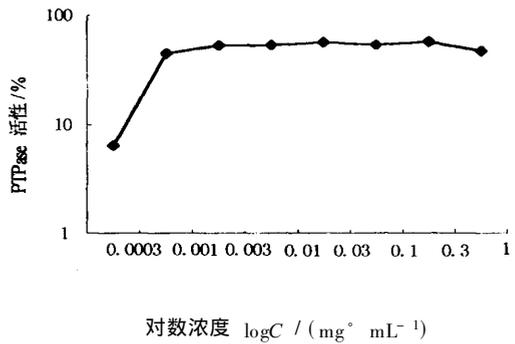


图 3 苦参碱浓度的自然对数值-蛋白酪氨酸磷酸酶活性曲线

Fig. 3 Curve of log (matrine concentration)-activity of PTPase (%)

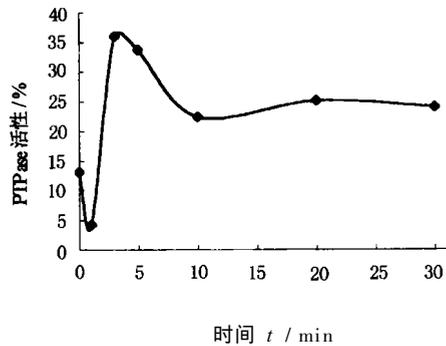


图 4 蛋白酪氨酸磷酸酶活性-时间曲线

Fig. 4 Curve of activity of PTPase (%) -time

况。但 mRNA 的量并不能完全代表信号蛋白的表达量, 更不能反映其活性的大小, 很难满足信号转导研究的需要。因此为深入研究苦参碱对 K562细胞的诱导分化机制, 本实验选择蛋白酪氨酸激酶的活性作为研究对象, 通过多时间点检测, 反映其动态变化; 同时检测蛋白酪氨酸磷酸酶的活性变化, 反映其体内的调节。实验结果 (图 1) 表明, 不同浓度的苦参碱对蛋白酪氨酸激酶的活性均有抑制作用, 而且在 0.1 mg/mL 的浓度范围内, 抑制作用具有浓度依赖性, 0.1 mg/mL 苦参碱的抑制率最大, 达 26.8%。如图 2 所示, K562细胞经 0.1 mg/mL 苦参碱处理后, 总蛋白提取物中的蛋白酪氨酸激酶活性有一个短暂的下降, 在 1~5 min 时的下降幅度最大, 达 56% 以上。随后激酶活性反弹, 恢复正常。胞浆蛋白提取物中的蛋白酪氨酸激酶活性则同样有一个短暂的下降, 在 5 min 时的下降幅度达 30%。膜相蛋白提取物中的蛋白酪氨酸激酶活性亦有短暂的下降, 并于 1 min 时降至正常时的 31%。从激酶活性下降的时相看, 膜相蛋白提取物中的蛋白酪氨酸激酶活性变化先于胞浆蛋白提取物中的蛋白酪氨酸激酶活性的变化。提示有一个信号从外入内的跨膜

传递过程

为探讨蛋白酪氨酸激酶活性的胞内调节,我们检测了不同浓度的苦参碱作用于 K562 细胞后,总的蛋白酪氨酸磷酸酶的活性变化。实验结果(图 3)表明,在 0.001~ 1.0 mg/mL 浓度内,苦参碱对蛋白酪氨酸磷酸酶活性的影响没有显著性差异。同时,蛋白酪氨酸磷酸酶的活性有一个显著的先降后升,然后逐渐恢复的过程,正好紧随蛋白酪氨酸激酶活性的变化时相,提示为一个反应性的调节性增高。进一步用蛋白酪氨酸激酶活性抑制剂预处理 K562 细胞后,蛋白酪氨酸磷酸酶的活性不受苦参碱的影响;而经蛋白酪氨酸磷酸酶活性的抑制剂预处理后,蛋白酪氨酸激酶的活性仍受到苦参碱的抑制。表明苦参碱作用 K562 细胞后,可引起广泛性的蛋白酪氨酸激酶的活性变化,同时伴随有蛋白酪氨酸磷酸酶活性的相应改变。

在苦参碱诱导 K562 细胞的增殖抑制与红系分化过程中,除上述改变外,尚有 G 蛋白偶联受体信号通路、磷脂酶 A₂及钙信号等的变化(有关内容将另文发表);许相儒等的研究还发现 K562 细胞膜上

有与苦参碱特异性结合的蛋白^[6];与诱导分化有关的立早基因也正在积极研究之中。随着对苦参碱等诱导分化剂抗肿瘤机制的研究深入,无创伤性的生物学疗法将逐渐走入临床,造福人类。

References

[1] Zhang Y, Jiang J K, Liu X S, et al. Differentiation and apoptosis in K562 erythroleukemia cells induced by matrine [J]. *Nat Med*, 1998, 52(4): 295-299.

[2] Rivero J A, Adunyah S H. Sodium butyrate induces tyrosine phosphorylation and activation of MAP Kinase (ERK-1) in human K562 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 224: 796-801.

[3] Kang C D, Lee B K, Kim K M, et al. Signaling mechanism of PMA-induced differentiation of K562 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 221: 95-100.

[4] Gordon J A. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor [J]. *Methods Enzymol*, 1991, 201: 477-482.

[5] Liu B Z, Jiang J K. Signal transduction mechanism of induced proliferation and differentiation of K562 cells [J]. *Chin J Hematol* (中华血液学杂志), 1999, 20(5): 278-280.

[6] Xu X R, Jiang J K, Zhang Y, et al. Study on the characteristic of matrine binding to human erythroleukemia K562 cell line [A]. *The Symposia of the 5th Southwest Three Provinces and One City Biochemistry Science Conference* (第五届西南三省一市生化学术会议论文集) [C], 1997.

聪圣胶囊对小鼠脑缺血再灌注损伤后自由基变化的影响

赵玲¹, 徐秋萍², 李林^{1*}

(1. 首都医科大学宣武医院 药理研究室, 北京脑老化重点实验室, 北京 100053; 2. 北京中医药大学 药理教研室, 北京 100029)

摘要:目的 研究聪圣胶囊对小鼠脑缺血再灌后脑组织自由基变化的影响, 分析聪圣胶囊抗脑缺血损伤的作用机制。方法 采用早老龄小鼠双侧颈总动脉反复缺血再灌合并尾部放血降压模型, 应用分光光度法观察小鼠脑组织自由基的变化及聪圣胶囊对其影响。结果 聪圣胶囊可拮抗脑缺血再灌注引起的 SOD活力的下降及 MDA含量的升高, 明显降低脑缺血再灌注引起的 NO水平及 NOS活性的升高。结论 聪圣胶囊可通过减轻脑缺血损伤后自由基产生, 降低升高的 NOS活性来发挥抗脑缺血作用。

关键词: 聪圣胶囊; 脑缺血; 自由基; 一氧化氮

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)01-0051-04

Effect of Congsheng Capsule on free radical change after cerebral ischemia-reperfusion in mice

ZHAO Ling¹, XU Qiu-ping², LI Lin¹

(1. Department of Pharmacology, Beijing Key Laboratory for Brain Aging, Xuanwu Hospital of Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China; 2. Department of Pharmacology, Beijing University of TCM, Beijing 100029, China)

Abstract Object To investigate the effects of Congsheng Capsule (CSC) on free radical change after cerebral ischemia-reperfusion, and analyze the mechanisms of CSC anti cerebral ischemia action.

* 收稿日期: 2002-04-27

基金项目: “九五”国家攻关课题 (96-906-09-03)

作者简介: 赵玲 (1972-) 女, 辽宁沈阳人, 助理研究员, 博士。1996年毕业于辽宁中医学院中医系, 获医学学士学位; 同年考入北京中医药大学, 攻读硕士学位, 导师为徐秋萍教授。在读期间获准硕博连读, 2001年获医学博士学位。研究方向为脑缺血的发病机制和脑缺血与 AD 的相关因素分析及中药的影响。