

转铁蛋白对青蒿琥酯体外抗肿瘤活性的增效作用研究

郑青¹, 郭建红¹, 周仲楼², 曾庆平³, 赵文¹

(1. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632; 2. 温州医学院附属眼视光医院, 浙江 温州 315027;

3. 广州中医药大学热带医学研究所, 广东 广州 510405)

摘要:目的 研究转铁蛋白对青蒿琥酯体外抗肿瘤活性的增效作用, 观察药物作用后细胞凋亡情况。方法 采用MTT法检测青蒿琥酯单用或与转铁蛋白合用对鼻咽癌 CNE2 细胞的增殖抑制作用, DAPI 染色观察 CNE2 细胞凋亡, 流式细胞术分析细胞凋亡率变化。结果 青蒿琥酯对 CNE2 细胞的 IC_{50} 值为 $116 \mu\text{g/mL}$, 青蒿琥酯合用转铁蛋白后 IC_{50} 值降为 $17.4 \mu\text{g/mL}$, DAPI 染色显示青蒿琥酯合用转铁蛋白作用 CNE2 细胞 24 h 后, 细胞出现明显凋亡现象, 流式细胞分析结果显示, 与对照组相比, 青蒿琥酯合用转铁蛋白组作用 24 h 后, 细胞出现明显凋亡现象, 而平行进行的青蒿琥酯 $100 \mu\text{g/mL}$ 组相同作用时间没有出现凋亡。结论 转铁蛋白对青蒿琥酯体外抗肿瘤活性有较强增效作用, 转铁蛋白与青蒿琥酯合用加速了青蒿琥酯诱导的细胞凋亡, 是转铁蛋白增强青蒿琥酯作用的重要机制之一。

关键词:转铁蛋白; 青蒿琥酯; 鼻咽癌 CNE2 细胞; 细胞凋亡

中图分类号:R286.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)06-0887-03

青蒿素是我国自主开发研制的抗疟特效药, 青蒿素类衍生物青蒿琥酯作为抗疟药, 不但效价高, 而且长期使用不易产生耐药性。它的代谢产物是二氢青蒿素, 抗疟活性高、毒性小^[1]。研究表明, 青蒿琥酯对白血病、结肠癌、黑色素瘤、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、中枢神经系统肿瘤及肾癌细胞等都具有较强的抑制作用^[2]。鉴于青蒿素及其衍生物的确切抗癌作用, 美国国家癌症研究所 (National Cancer Institute, NCI) 已将其纳入抗癌药物筛选与抗癌活性研究计划^[3]。Singh 等^[4]报道, 转铁蛋白与二氢青蒿素合用, 可显著提高二氢青蒿素作用效果。对于转铁蛋白与青蒿琥酯合用, 对青蒿琥酯增效作用的研究目前国内外尚无报道。本研究将青蒿琥酯与转铁蛋白合用于人鼻咽癌 CNE2 细胞, 观察药物的抑制作用。同时采用不同检测方法, 研究药物作用后细胞凋亡情况, 从而对青蒿琥酯作为抗肿瘤药物的体内研究及临床应用起到指导借鉴作用。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂:注射用青蒿琥酯, 批号 20051022, 桂林南药股份有限公司, 白色粉剂, 用前溶于 5% NaHCO_3 溶液中, 经滤过除菌, 用 DMEM 培养液稀释, 临用前配制。转铁蛋白, Sigma 公司, 溶于无菌双蒸水中, DMEM 培养液稀释, -20°C 冻存, 为防止转铁蛋白效能下降, 不反复冻融。DEME 细胞培养液、胎牛血清、Hanks 缓冲盐溶液为 Gibco

公司产品。

1.2 仪器:高速冷冻离心机, Sigma; 倒置显微镜 CK-40, Olympus; 流式细胞仪, IDA0n_DSf; 液氮灌, Thermo Forma; CO_2 培养箱, Thermo Forma; 酶标仪, SPECTRAMax M5。

1.3 细胞和细胞培养:人鼻咽癌 CNE2 细胞购于中山医科大学药学院实验动物中心, 在含有 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素, 100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养基中贴壁生长, 37°C 、5% CO_2 的湿润培养箱中培养。

1.4 MTT 法检测药物对 CNE2 细胞的增殖抑制作用:取对数生长期细胞消化, 计数 4 000 个/孔, 铺于 96 孔板, 37°C 、5% CO_2 孵箱中过夜后加入含药物的培养液, 转铁蛋白在加入青蒿琥酯前 1 h 加入。每个药物质量浓度设 5 个复孔, 另设不加药的对照孔, 和不加细胞只加培养基的空白孔, 各设 5 个复孔。继续培养 48 h, 每孔加入 20 μL 以 PBS 溶解的 MTT (5 mg/mL), 温箱孵育 4 h, 弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 室温下摇床摇 10 min 以充分溶解蓝紫色颗粒, 在 SPECTRAMax M5 酶标仪上测定 490 nm 处吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率, 由软件计算 IC_{50} 值。

细胞存活率 = $(A_{\text{加药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$

1.5 DAPI 染色观察药物作用后细胞凋亡:收集药

收稿日期: 2007-09-30

作者简介: 郑青 (1964—), 男, 云南人, 暨南大学药学院生物制药教研室副主任, 副教授, 博士, 硕士生导师, 长期从事生物技术药物研究开发工作, 已发表论文 50 余篇, 获省部级科技进步奖 3 项。Tel/Fax: (020) 85220850 E-mail: tzhenq@jnu.edu.cn

物处理后的细胞,PBS洗1次,加入2 $\mu\text{g/mL}$ DAPI染色液染色,离心去除染液,PBS洗2次,细胞重悬于PBS中,滴片,在荧光显微镜下观察细胞核的变化情况。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡:取对数生长期细胞消化,用新鲜培养液,计数 1.5×10^5 /孔,铺于6孔板。 37°C 、5% CO_2 孵箱中过夜后,加入不同质量浓度的药物。 37°C 、5% CO_2 孵箱中继续培养24 h,收集药物作用后的细胞,PBS洗2次,加入 -20°C 预冷的70%乙醇 4°C 固定过夜,离心弃乙醇,PBS洗1次,碘化吡啶(PI,50 $\mu\text{g/mL}$) 4°C 避光染色30 min,过400目尼龙网,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.7 统计分析:各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单用组与合用组间比较用Wilcoxon配对法检验,组内差异比较用 t 检验。

2 结果

2.1 转铁蛋白对CNE2细胞生长的影响:分别以终质量浓度50、100、250、500、750、1 000、2 000 $\mu\text{g/mL}$ 的转铁蛋白作用于CNE2细胞48 h,结果见图1。表明在本实验质量浓度范围内,转铁蛋白对鼻咽癌CNE2细胞的生长没有影响。

2.2 青蒿琥酯单用或合用转铁蛋白对CNE2细胞的增殖抑制作用:青蒿琥酯+转铁蛋白(200

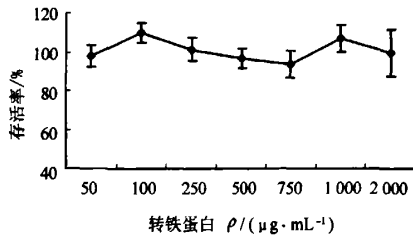


图1 转铁蛋白对CNE2细胞生长的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
Fig. 1 Effect of transferrin on growth of CEN2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

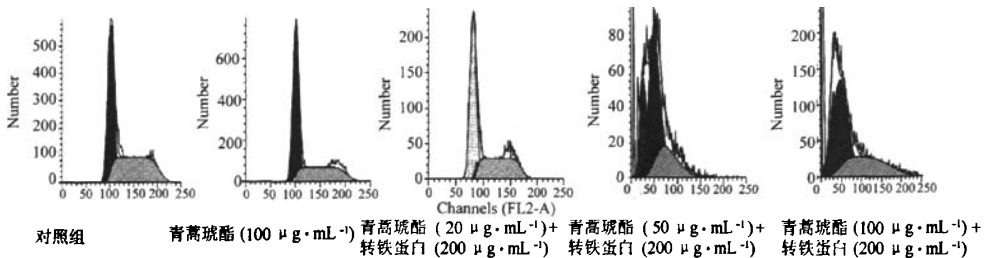


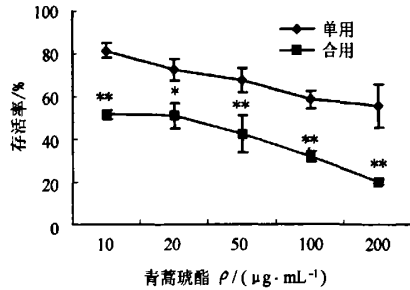
图3 青蒿琥酯合用转铁蛋白诱导CNE2细胞凋亡

Fig. 3 Induction of apoptosis of CNE2 cells by artesunate plus transferrin

3 讨论

Berger 等^[5]2005年首次报道了两例应用标准

$\mu\text{g/mL}$)作用48 h,对CNE2细胞的抑制作用与单用组相比较,结果见图2。合用组与单用组作用48 h后,细胞存活率有显著差异($P<0.05, 0.01$)。合用组青蒿琥酯 IC_{50} 值为17.4 $\mu\text{g/mL}$,单用组青蒿琥酯 IC_{50} 值为116 $\mu\text{g/mL}$ 。



与青蒿琥酯单用组比较,* $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs artesunate group

图2 青蒿琥酯单用与青蒿琥酯及转铁蛋白合用对CNE2细胞生长的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 2 Effect of artesunate and artesunate plus transferrin on growth of CNE2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

2.3 DAPI染色结果:细胞DAPI染色后,对照组细胞固定染色后显微镜下观察细胞核形态完好,染色均一;青蒿琥酯(20 $\mu\text{g/mL}$)+转铁蛋白(200 $\mu\text{g/mL}$)组可观察到部分细胞细胞核形态呈不规则状况,且染色不均一,为凋亡细胞。

2.4 流式细胞仪分析结果:青蒿琥酯+转铁蛋白(200 $\mu\text{g/mL}$)作用CNE2细胞24 h后,与对照组相比 G_1 期荧光强度明显前移,出现凋亡峰,细胞发生明显凋亡,随剂量增加,凋亡细胞减少,死亡细胞增加。单用组在作用细胞24 h后与对照组相比 G_1 期荧光强度无前移现象发生,也无凋亡峰出现,单用青蒿琥酯100 $\mu\text{g/mL}$ 作用24 h后细胞没有凋亡和死亡现象发生,结果见图3。

化疗无效,加用青蒿琥酯的葡萄膜黑色素瘤转移病人。病人耐受性很好,没有其也副反应的发生。一例

病人在诊断为Ⅳ期黑色素瘤后生存了47个月,而生存中值只有2~5个月。青蒿琥酯没有严重的副作用,良好的耐受性,将推动其成为不久的将来临床试验的主要药品。关于青蒿素类药物的抗癌效应的始发机制,有些研究者认为与青蒿素类药物的抗癌机制以及肿瘤细胞代谢的特点有关^[6]。Singh等^[7]提出癌细胞的核酸代谢旺盛,需要大量铁质,大多数肿瘤细胞表面有高密度的转铁蛋白受体,正常细胞转铁蛋白受体较少。含有内过氧桥的青蒿素类药物则通过二价铁离子,促进过氧基团分解产生自由基,发挥破坏作用,从而使肿瘤细胞较正常细胞形成更多的自由基,起到选择性杀伤作用^[7]。青蒿素及其衍生物对正常细胞毒性较低,且其来源广泛,在抗癌药物的开发方面有很大前景。但是青蒿素及其衍生物作为抗肿瘤药应用还需要解决很多方面的问题,如在青蒿素诸多衍生物中选择抗癌作用强、抗癌谱广的化合物,或者通过合用增强其作用效果;深入研究青蒿素及其衍生物抗肿瘤作用机制等。转铁蛋白是单一肽链的蛋白质,是人体内一种重要的铁元素载体,可特异性与转铁蛋白受体结合,将铁离子运送入细胞内。本研究将转铁蛋白与青蒿琥酯合用,研究转铁蛋

白对青蒿琥酯在体外的抗癌增效作用。结果表明转铁蛋白可显著提高青蒿琥酯对CNE2细胞的增殖抑制作用。这对于临床青蒿琥酯作为抗肿瘤药的应用将起到推动作用。另外可以考虑将转铁蛋白开发为一种新的药物剂型,通过使用转铁蛋白调节体内铁离子的摄入,从而对青蒿琥酯产生增效作用。

参考文献:

- [1] 徐亦益,陈绍芳,刘祥麟. 青蒿琥酯的抗肿瘤作用[J]. 中国肿瘤, 2004, 13(10): 641-644.
- [2] Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, et al. The antimalarial artesunate is also active against cancer [J]. *Int J Oncol*, 2001, 18(4): 767-773.
- [3] 叶启翔,陆 凌. 青蒿素类药物抗肿瘤作用研究进展[J]. 实用医学杂志, 2006, 22(5): 600-601.
- [4] Singh N P, Lai H. Dihydroartemisinin and holotransferrin [J]. *Life Sci*, 2001, 70: 49-56.
- [5] Berger T G, Dieckmann D, Efferth T. Artesunate in the treatment of metastatic uveal melanoma—first experiences [J]. *Oncol Rep*, 2005, 14(6): 1599-1603.
- [6] 肖凤春,林 隆,沈培强,等. 青蒿素及其衍生物抗肿瘤研究进展[J]. 国外医学中医中药分册, 2005, 27(3): 149-151, 161.
- [7] Henry Lai, Narendra P, Singh N P. Selective cancer cell cytotoxicity from exposure to dihydroartemisinin and holotransferrin [J]. *Cancer Lett*, 1995, 91: 41-46.

蒺藜皂苷对缺血心肌细胞内核转录因子- κ B的作用

孙 巍,李晶莹,李 红,杨世杰*

(吉林大学白求恩医学院 药理教研室,吉林 长春 130021)

摘 要:目的 研究蒺藜皂苷对培养大鼠乳鼠心肌细胞 H_2O_2 损伤时心肌细胞内蛋白激酶 C (PKC ϵ)、细胞外信号调节激酶 (ERK1/2) 及核转录因子- κ B (NF- κ B) 水平的影响。方法 利用培养的 Wistar 大鼠乳鼠心肌细胞,采用 H_2O_2 建立心肌细胞损伤模型,应用 PKC ϵ 抑制剂 Chelerythrine 干预后,观察细胞形态学改变,应用流式细胞仪定性检测细胞凋亡率,Western blotting 定量检测各组 PKC ϵ 、ERK1/2 及 NF- κ B 水平。结果 蒺藜皂苷明显保护受损心肌细胞,降低细胞凋亡率,并且能够升高 PKC ϵ 、ERK1/2 及 NF- κ B 水平;应用 Chelerythrine 可部分阻断蒺藜皂苷的上述作用。结论 蒺藜皂苷对 H_2O_2 损伤大鼠心肌细胞具有保护作用,其保护作用机制与 PKC ϵ 、ERK1/2 及 NF- κ B 激活有关。

关键词:蒺藜皂苷; PKC ϵ ; ERK1/2; 核转录因子- κ B (NF- κ B); Chelerythrine

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)06-0889-04

蒺藜又称白蒺藜、刺蒺藜,系蒺藜科植物蒺藜 *Tribulus terrestris* L. 的果实,主要含有皂苷类、黄酮类、生物碱类、甾醇类等化合物。蒺藜皂苷 (gross saponin of *T. terrestris*, GSTT) 是从蒺藜地上全

草中提取的有效组分之一,是以甾体皂苷为主的10余种皂苷的混合物,主要包括呋甾醇和螺甾醇两类皂苷。研究资料^[1~4]表明蒺藜皂苷具有降血压、舒张血管、降低胆固醇和抗动脉粥样硬化作用;对离体大

收稿日期:2007-12-24

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30472020)

作者简介:孙 巍(1978—),男,吉林省长春市人,博士,讲师,主要从事药物对心血管疾病作用及药物对心肌细胞信号转导通路的研究。

* 通讯作者 杨世杰 Tel: (0431) 5619483 E-mail: jcyao@sina.com

转铁蛋白对青蒿琥酯体外抗肿瘤活性的增效作用研究

作者：郑青, 郭建红, 周仲楼, 曾庆平, 赵文
作者单位：郑青, 郭建红, 赵文(暨南大学药学院, 广东, 广州, 510632), 周仲楼(温州医学院附属眼视光医院, 浙江, 温州, 315027), 曾庆平(广州中医药大学热带医学研究所, 广东, 广州, 510405)
刊名：中草药 ISTIC PKU
英文刊名：CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS
年, 卷(期)：2008, 39(6)
被引用次数：4次

参考文献(7条)

1. 徐亦益;陈绍芳;刘祥麟 青蒿琥酯的抗肿瘤作用[期刊论文]-中国肿瘤 2004(10)
2. Efferth T;Dunstan H;Sauerbrey A Theantimalarial artesunate is also active against cancer[外文期刊] 2001(04)
3. 叶启翔;陆羨 青蒿素类药物抗肿瘤作用研究进展[期刊论文]-实用医学杂志 2006(05)
4. Singh N P;Lai H Dihydroartemisinin and holotransferrin[外文期刊] 2001
5. Berger T G;Dieckmann D;Efferth T Artesunate in the treatment of metastatic uveal melanoma-first experiences 2005(06)
6. 肖凤春;林隆;沈培强 青蒿素及其衍生物抗肿瘤研究进展[期刊论文]-国外医学(中医中药分册) 2005(03)
7. Henry Lai;Narendra P;Singh N P Selective cancer cell cytotoxicity from exposure to dihydroartemisinin and holotransferrin[外文期刊] 1995

本文读者也读过(10条)

1. 蔡怀鸿. 杨培慧. 蔡继业. CAI Huai-hong. YANG Pei-hui. CAI Ji-ye 青蒿素与转铁蛋白相互作用的光谱分析[期刊论文]-化学研究与应用2006, 18(6)
2. 郭建红. 郑青. Guo Jian-hong. ZHENG Qing 转铁蛋白增强青蒿琥酯对A549细胞增殖抑制活性[期刊论文]-安徽医药2009, 13(2)
3. 林溪. 黄秀旺 人转铁蛋白-阿霉素结合物的制备及其体外细胞毒作用[期刊论文]-肿瘤2000, 20 (4)
4. 张豪. 沈明山. 方宏清. 王明刚. 陈惠鹏 转铁蛋白/转铁蛋白受体介导的药物运输[期刊论文]-中国生物工程杂志 2004, 24(6)
5. 朱晓静. 刘永明. ZHU Xiao-jing. LIU Yong-ming 盐酸拓扑替康及10-羟基喜树碱和转铁蛋白的相互作用[期刊论文]-化学研究与应用2008, 20(8)
6. 林溪. 黄秀旺. 柯丹如. 温彩霞 人转铁蛋白-甲氨喋呤结合物对人肝细胞、人肝癌细胞体外细胞毒的作用特点[期刊论文]-福建医科大学学报2001, 35(1)
7. 吕冬颖 二醇桥联青蒿素二聚体衍生物的裂解研究[学位论文]2008
8. 马振秋 第一部分 半胱氨酰白三烯受体1拮抗剂筛选方法的建立;第二部分 二氢青蒿素抑制大鼠胶质瘤C6细胞增殖和诱导凋亡[学位论文]2007
9. 余和平 青蒿素联合全转铁蛋白对小鼠肝癌H-22细胞作用的研究[学位论文]2007
10. 姚鹏. 姚爱杰. 康春生. Yuan Xu-bo. CHANG Jin. PU Pei-yu. YAO PENG. ZHAO Ai-jie. KANG Chun-sheng. Yuan Xu-bo. CHANG Jin. PU Pei-yu 复合功能传递系统的结构、铁传递蛋白的传递联系和药物载体的磁性颗粒[期刊论文]-中国医学工程2005, 13(2)

引证文献(4条)

1. 苗立云. 张祖贻 铁离子增强青蒿琥酯抗癌作用及改变癌细胞死亡方式研究[期刊论文]-中草药 2008(10)

2. [黄玲](#), [张平祖](#), [曾庆平](#) [青蒿素增敏复方抑制肿瘤细胞增殖及延缓荷瘤裸鼠移植肿瘤生长的研究](#)[期刊论文]-[广州中医药大学学报](#) 2010(3)
3. [张莉](#), [徐维平](#), [苏育德](#), [陆杨](#), [王艳萍](#), [汪菲](#), [杨金敏](#) [转铁蛋白-转铁蛋白受体在肿瘤主动靶向治疗中的应用](#)[期刊论文]-[中国药业](#) 2012(5)
4. [陈蕾](#), [孙晓然](#), [杨光](#), [张秀凤](#) [蛋白质载药体系的研究进展及其应用](#)[期刊论文]-[现代化工](#) 2013(7)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200806030.aspx