

马钱子素^[5]的药动学有差异,至于六味地黄汤的配伍组合对马钱子素的影响,我们正在研究中。

参考文献:

- [1] 马世平,杭秉茜,刘越等.六味地黄汤的免疫药理研究[J].现代应用药学,1990,7(3):14-16.
- [2] 贾泰元.六味地黄丸的免疫调节作用[J].中成药,1994,16(9):34-35.
- [3] 赵武述,张玉琴,李洁等.山茱萸成分的免疫活性研究[J].中草药,1990,21(3):113-116.
- [4] Mathad V T, Raj K, Bhaduri A P, *et al.* Studies on the pro-

file of immunostimulant activities of modified iridoid glycosides [J]. Bioorg Med Chem, 1998, 6(5): 605-611.

- [5] 谢跃生,张振清,阮金秀.小鼠血浆中马钱素的高效液相色谱测定法及药代动力学[J].药学报,2002,37(7):548-550.
- [6] Endreyi L, Fritsch S, Yan W. C_{max}/AUC is A clearer measure that C_{max} for absorption rates in investigations of bioequivalence [J]. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol, 1991, 29: 394.
- [7] 黄熙,陈可冀,任平.“复方效应成分动力学”新假说的科学证据、要素、意义及前景[J].中国中药杂志,1997,22(4):250-252.

青蒿酯钠诱导人肿瘤细胞凋亡及其分子机制的探讨

杨小平,张星*

(中山医科大学肿瘤研究所,广东广州 510016)

摘要:目的 研究青蒿酯钠诱导人肝癌细胞凋亡作用及探讨青蒿酯钠诱导人肝癌细胞凋亡的分子机制。方法 肝癌细胞 (BEL-7402) 经药物处理后,用荧光显微镜、透射电镜和流式细胞仪分析诱导凋亡作用,采用 Western blot 检测 p53、p21 和 bcl-2。结果 与对照组相比,经青蒿酯钠处理后,肝癌细胞中 p53、p21 蛋白表达水平无明显变化,而 bcl-2 蛋白表达水平降低。结论 青蒿酯钠可诱导人肝癌细胞 (BEL-7402) 凋亡,其凋亡的分子机制是 p53 非依赖性的,即与 p53、p21 无关,而与凋亡调节基因 bcl-2 下调有关。

关键词: 青蒿酯钠; 凋亡; 基因

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)09-0819-03

Induction of human tumor cell apoptosis by sodium artesunate and its molecular mechanism

YANG Xiao-ping, ZHANG Xing

(Cancer Institute, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510016, China)

Abstract: **Object** To study the apoptosis induced by sodium artesunate (SA) in human liver cancer cells and its molecular mechanism. **Methods** Induction of the apoptosis was analyzed by fluorescent microscope, transmission electron micrograph and flow cytometry based on drug treated BEL-7402. Expressions of p53, p21 and bcl-2 were determined by Western blot. **Results** The expression level of p53 and p21 had no change remarkably, but the expression level of bcl-2 was reduced compared to that of the control group after the human liver cancer cells were treated by SA. **Conclusion** The apoptosis in human liver cancer cells (BEL-7402) may be induced by SA, the molecular mechanism of apoptosis may be p53-independent, that is no relative to p53 and p21. Otherwise, it is relative to bcl-2 down-regulation.

Key words: sodium artesunate (SA); apoptosis; gene

青蒿酯钠为青蒿素类衍生物,是一种新型的抗癌药物。近年来发现青蒿酯钠有抗肿瘤作用,其对小鼠艾氏腹水癌细胞、人鼻咽癌细胞 (SUNE-1 和 CNE-1)、人宫颈癌细胞 (HeLa) 生长有明显的抑制作用^[1,2],我们已证明青蒿酯钠对人肝癌有体内外抗肿瘤作用^[3]。本实验旨在从诱导肿瘤细胞凋亡的角度来探讨青蒿酯钠抗肿瘤作用机制,并研究青蒿酯

钠对肝癌细胞中凋亡调控基因 p53、p21 和 Bcl-2 的影响,从而探讨青蒿酯钠诱导人肝癌细胞凋亡的分子机制。

1 材料和方法

1.1 药物与细胞系: 青蒿酯钠由广西桂林第二制药厂出品,系白色结晶,用前以 5% NaHCO₃ 助溶,用生理盐水配成相应浓度。肝癌细胞株 (BEL-7402) 由

* 收稿日期: 2001-12-08

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (970087)

作者简介: 杨小平 (1942-), 女, 广东人, 研究员, 1967 年毕业于北京医学院医疗系, 毕业后至 1979 年在北京中国医学科学院抗菌素研究所, 1979 年至今在中山医科大学肿瘤防治中心, 研究方向为肿瘤药理。Tel: (020) 87765368-7340 E-mail: yangxiaoping88@hotmail.com

中国科学院上海细胞生物研究所建株,为肝细胞肝癌,在含有 10% 小牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μ g/mL 的 1640 培养液中培养。Fadu 为 p53 突变型鼻咽癌细胞株。

1.2 DAPI 染色 (4-Diamidino-2-phenylindole): 肝癌细胞经青蒿酯钠处理 48 h, 胰酶消化、离心, 然后加入 DAPI, 终浓度为 2 μ g/mL, 染色后用荧光显微镜观察、拍照。

1.3 细胞超微结构观察: 青蒿酯钠对裸鼠移植人肝癌 (BEL-7402) 的体内抑瘤实验结束时, 取生理盐水对照组和青蒿酯钠高剂量组 (324 mg/kg · d) 裸鼠瘤组织, 按常规固定处理后, 透射电镜下观察超微结构的变化。

1.4 流式细胞仪分析: 参考文献^[4]。肝癌细胞经青蒿酯钠 30, 60, 90 μ g/mL 处理后, 于 12, 24 h 收集细胞, 沉淀加入 PBS 液制成单细胞悬液, 再加 70% 乙醇 3 mL 固定。染色前用 PBS 液离心沉淀, 加 200 μ l RNaseA 37 °C 水浴, 900 μ l 碘化丙啶 (PI) 染色, 在 COULTER ELITE 生产的流式细胞仪上测试记录激发波长 488 nm 处红色荧光。

1.5 Western blot 实验

1.5.1 样本的处理: 肝癌细胞经药物 10, 20, 30, 60, 90 μ g/mL 处理后, 分别于 3, 12, 24 h 收集加入 1 $\times$ SDS 上样缓冲液 (50 mmol/L Tris · Cl pH 6.8, 100 mmol/L DTT, 2% SDS, 0.1% 溴酚蓝, 10% 甘油) 100 μ L 裂解细胞, 100 °C 变性 10 min, 紫外分光光度仪定量。

1.5.2 电泳及转印: 每一标本上样 100 μ g 于 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 3 mA/cm 电泳 4 h, 转印到经甲醇浸泡过的硝酸纤维 (PVDF) 膜, 1 000 mA 转印 1 h, 以氨基黑染膜, 并以铅笔画出分子量标准的位置。

1.5.3 免疫反应及结果显示: 封闭液 (TTBS 配制的 5% 脱脂奶粉) 4 °C 封闭过夜, 分别加入 p53、p21 和 Bcl-2 单抗 (1:200 稀释于 TTBS) 室温反应 2 h, TTBS 洗膜 2 $\times$ 10 min, 兔抗鼠 HRP (1:5 000 稀释于 TTBS) 室温反应 2 h, TTBS 洗膜 2 $\times$ 10 min, 加入等量 ECL 试剂盒中 A 液和 B 液的混合液反应 1~5 min, 去除反应液, 于暗盒中连续压 3 张 X-RAY 片, 显影及定影。TTBS 含 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris · Cl, 0.2% 吐温-20。

2 结果

2.1 荧光显微镜检查: 肝癌细胞经青蒿酯钠处理

48 h, DAPI 染色在荧光显微镜下可观察到细胞出现凋亡, 细胞核和细胞质内可见浓染致密的颗粒块状荧光, 荧光较强, 典型可见新月型改变、固缩或片段化的核。正常细胞核不染色或呈弥漫均匀的弱荧光。

2.2 超微结构观察: 青蒿酯钠用药组的裸鼠瘤组织可观察到细胞凋亡特征性的形态学改变, 凋亡细胞在组织中常呈单个散在分布, 核染色质浓缩、聚集于核膜呈境界分明的颗粒块状或新月形小体, 胞质浓缩, 细胞体积缩小, 内质网扩张, 形成一系列膨胀小泡, 胞质内细胞器及膜性结构保持完整, 见图 1。



A-对照 B-青蒿酯钠 324 mg/(kg · d)

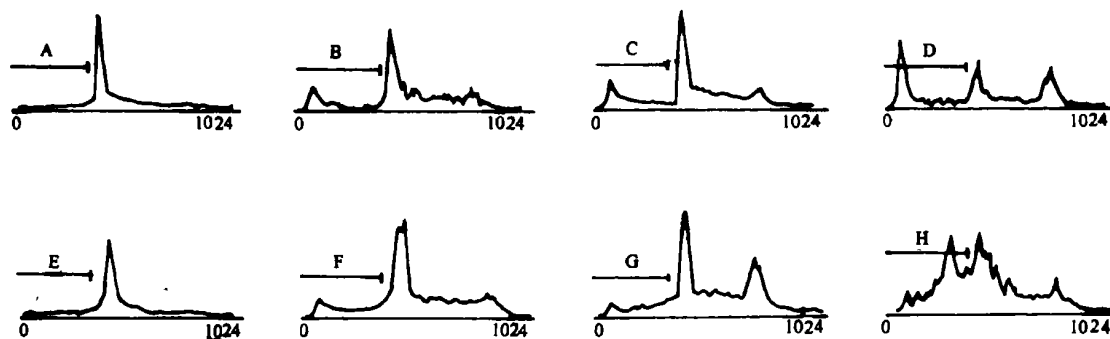
图 1 裸鼠 BEL-7402 移植瘤凋亡细胞超微结构

2.3 流式细胞仪: 在 DNA 直方图, 青蒿酯钠加药组肝癌细胞出现二倍体峰 (G1 细胞峰) 的减少, G1 峰左侧出现亚二倍体细胞群的峰型即凋亡峰 (亚 G1 峰), 表明青蒿酯钠能诱导人肝癌 BEL-7402 细胞发生凋亡, 见图 2。青蒿酯钠浓度为 0, 30, 60 和 90 μ g/mL 时, 12 h 凋亡率分别为 3.7%、14.8%、16.8% 和 37.0%, 24 h 凋亡率分别为 8.2%、16.0%、15.4% 和 44.1%。

2.4 Western blot 分析: 对照组 Fadu 细胞在阿霉素刺激前后 Western blot 结果均显示 p53 蛋白高度表达, 无明显差异, 表明 Fadu 细胞中 p53 基因为突变型; 肝癌 BEL-7402 细胞未经阿霉素刺激时 p53 蛋白表达量很低, 而刺激后表达大量增加, 表明肝癌细胞中 p53 基因为野生型; 与未经青蒿酯钠处理的肝癌细胞中 p53 蛋白表达无明显差异, 表明青蒿酯钠对肝癌细胞中 p53 表达水平无明显影响。p21 蛋白表达水平在青蒿酯钠作用前后也无明显变化。而 bcl-2 蛋白表达水平随药物作用时间的延长呈降低的趋势。

3 讨论

经光镜、电镜和流式细胞仪实验表明青蒿酯钠能诱导人肝癌细胞凋亡是在基因调控下的细胞的主死亡过程, 目前研究较多的有以下几类: 促进细胞凋亡发生: 野生型 p53、Fas 分子和 Fas 分子配体 (Fas/fasL)、白细胞介素 1B 转换酶 (ICE)、Ged-9



A-对照 (12 h) B~D-青蒿酯钠 30, 60, 90 $\mu\text{g/mL}$ (12 h) E-对照 (24 h) F~H-青蒿酯钠 30, 60, 90 $\mu\text{g/mL}$ (24 h)

图2 青蒿酯钠处理后 BEL-7402 细胞的流式细胞仪分析

相关调节基因中 Bax、Bak、Bal、Bal-Xs 基因等; 抑制凋亡发生的有: 突变型 p53、Ced-9 相关调节基因中 Bcl-2、Bcl-x1、Mcl-1 和 pRB 等。目前认为细胞凋亡可以不通过 p53 依赖性途径, 而通过 p53 非依赖性途径^[5~8]。分化诱导细胞因子如白细胞介素-6 (IL-6)、白血病抑制因子 (LIF), 生长抑制细胞因子如转化生长因子 (TGF- β), DNA 损伤剂 MMS (Methylmethane Sulfate) 诱导 p53-非依赖性途径的凋亡, 并且研究发现 MyD116 (myeloid differentiation primary response gene)、MyD118 家族的 MyD118、Gadd45、CR6 以及 p21、Bax 和 bcl-2 等基因参与调控此种类型的凋亡途径^[9]。本实验 Western blot 结果显示青蒿酯钠诱导的凋亡细胞中 p53、p21 表达与对照组相比无明显变化, 而 Bcl-2 蛋白表达水平随药物作用时间的延长呈降低的趋势, 表明青蒿酯钠诱导肝癌细胞凋亡的分子机制是 p53 非依赖性的, 即与 p53、p21 无关, 而与凋亡调节基因 bcl-2 下调有关。

参考文献:

- [1] 杨小平, 潘启超, 梁永钜. 青蒿酯钠抗肿瘤作用[J]. 癌症, 1997, 16(3): 186-188.
- [2] 张星, 杨小平, 潘启超, 等. 青蒿酯钠抗人肝癌 (Bel-7402) 与诱导凋亡[J]. 中草药, 1998, 29(7): 467-469.
- [3] Woerdenbag H J, Moskal T A, Pras N, *et al.* Cytotoxicity of artemisinin related endoperoxides to ehrlich ascitestumor cells [J]. J Nat Prod, 1993, 56(6): 849-856.
- [4] Shimura M, Ishizaka Shimura M, Ishizaka You, *et al.* Characterization of room temperature induced apoptosis in HL-60 [J]. J FEBS Lett, 1997, 417: 379-384.
- [5] 秧茂盛, 肖建初. 青蒿琥酯对腺苷酸环化酶的影响[J]. 中国药理学通讯, 1997, 14(1): 17.
- [6] Macfarlane M, Jones N A, Dive C, *et al.* DNA damaging agents induce both p53-dependent and p53-independent apoptosis in immature thymocytes [J]. Mol Pharmacol, 1996, 50(4): 900-911.
- [7] Tomihiko Tamura, Masahiko Ishinara, Marcos Lamphier, *et al.* An IRF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes [J]. Nature, 1995, 376(17): 596-599.
- [8] Gartenhaus R B, Wang P, Hoffmann P. Induction of the WAF1/CIP1 protein and apoptosis on human T-cell leukemia virus type I-transformed lymphocytes after treatment with Adramycin by using a p53-independent pathway [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 265-268.
- [9] Liebermann D A, Hoffmann B, Steinman R A. Molecular controls of growth orrease and apoptosis I p53-dependent and independent pathways [J]. Oncogene, 1995, 11(1): 199-210.

神农 33 注射液减轻环孢素 A 肾毒性的实验研究

崔 桅, 张雅敏, 潘 霖, 何振梅, 高仲阳*

(天津市第一中心医院, 天津 300192)

摘要: 目的 观察神农 33 注射液减轻环孢素 A (CsA) 肾毒性的作用效果。方法 建立大鼠急性 CsA 肾毒性模型, 观察神农 33 注射液治疗前后病理学改变和体重、血清尿素氮 (BUN) 及肌酐 (Cr) 的动态变化; 用硫代巴比妥法、放免法及 Western Blot 法检测组织内丙二醛 (MDA)、前列腺素 I₂/血管紧张素 A₂ (PGI₂/TXA₂) 及热休克蛋白 70 (HSP70) 的含量。结果 神农 33 注射液治疗后的组织病理改变较轻, 未见明显的体重减轻及血清 BUN、Cr 的进行性增高, 局部组织 MDA、PGI₂/TXA₂ 及 HSP70 的含量明显低于 CsA 肾中毒组。结论 神农 33 注射液能有

* 收稿日期: 2001-12-31

基金项目: 天津市卫生局基金 (局 996KYZ-17-2)

作者简介: 崔桅, 女, 1988 年毕业于天津市第二医学院药系, 主管药师, 学士学位, 从事中药注射液的研制、生产及开发等工作, 发表论文 13 篇, 现承担天津市卫生局科研基金项目两项。Tel: (022) 23366917 转 20108 E-mail: shanjiazhizi@yahoo.com.cn