

响有限。尽管花青素苷中、低剂量与雷公藤多苷都对 ConA 诱导的脾细胞增殖有抑制作用,但是从病理和炎症因子来看,中、低剂量又未能缓解病理改变,这似乎预示雷公藤多苷与櫻桃花青素苷对模型大鼠的免疫影响机制有所不同。櫻桃花青素苷不同剂量对 ConA 诱导的脾细胞增殖的影响以及这种影响对病理改变的意义还需进一步研究。

IL-6 和 PGE₂ 是诱导佐剂性关节炎模型病理改变的主要细胞因子,与模型大鼠的足爪肿胀和病理改变正相关^[9,10]。临床中使用抗 PGE₂ 疗法能够很好地缓解 RA 症状,控制 RA 进展^[11,12]。抗 IL-6 疗法也被作为 RA 的有效治疗方法之一,尤其在 RA 急性期,能降低 C 反应蛋白,缓解病情^[13]。已经证明花青素苷中的 cyanidin 3-O-β-D-glucoside (C3G) 能抑制酵母聚糖诱导的大鼠炎症,降低 IL-6 和足爪中 PGE₂ 水平,櫻桃花青素苷和雷公藤都能降低血清 IL-6 水平,花青素苷高剂量和雷公藤还能降低足爪中 PGE₂ 水平,对这两种炎症因子的抑制作用或许是它们改善模型大鼠炎症反应的途径之一。

本实验结果表明櫻桃花青素苷与雷公藤都能对大鼠的关节炎起到保护作用,这一作用可能是通过调节模型大鼠异常的免疫功能,降低大鼠体内炎症细胞因子水平而产生的,但櫻桃花青素苷对模型大鼠的免疫调节与雷公藤又有所不同,这可能与花青素所具有的多种生理作用如调节毛细血管渗透性、保持细胞完整性,且具有较强的抗氧化等功能有关^[15,16]。因此櫻桃花青素苷对佐剂性关节炎大鼠的作用或许是多途径的,其机制还需进一步研究。

References:

[1] Wang H, Nair M G, Strasburg G M, *et al.* Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon,

- cyanidin, from tart cherries [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62: 80.
- [2] Rossi A, Serraino I, Dugo P, *et al.* Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation [J]. *Free Radic Res*, 2003, 37: 891-900.
- [3] Vrabiescu A, Poli T, Coman G, *et al.* Diethylaminoethanol action in the arthritis with Freund adjuvant in rats [J]. *Rom J Physiol*, 1998, 35: 99-110.
- [4] Haynes D R, Gadd S J, Whitehouse M W, *et al.* Complete prevention of the clinical expression of adjuvant-induced arthritis in rats by cyclosporin-A and lobenzarit; the regulation of lymph node cell populations and cytokine production [J]. *Inflamm Res*, 1996, 45: 159-165.
- [5] Fang J, Zhang Y X, Ru X B, *et al.* A study of the immune function of adjuvant arthritis rats [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 2000, 16(10): 525-528.
- [6] Liu F J. Procyanidins from the bark of *Hamamelis virginiana* exhibit antimutagenic properties against nitroaromatic compounds [J]. *Cell Mol Life Sci*, 1998, 54(10): 1168.
- [7] Cheshier J E. Immunomodulation by pycnogenol in retrovirus-infected or ethanol-fed mice [J]. *Life Sci*, 1996, 58(5): PL87.
- [8] Li H, Jia Y F, Li D. Effects of Polyglycosides of tripterygium wilfordii hookon inflammation and immune suppression [J]. *Acta Acad Med Shanghai* (上海医科大学学报), 2000, 27(6): 502-505.
- [9] Magari K, Miyata S, Nishigaki F, *et al.* Differential effects of FK506 and methotrexate on inflammatory cytokine levels in rat adjuvant-induced arthritis [J]. *J Rheumatol*, 2003, 30: 2193-2200.
- [10] Kumar I V, Paul B N, Asthana R, *et al.* Swertia chirayita mediated modulation of interleukin-1 beta, interleukin-6, interleukin-10, interferon-gamma, and tumor necrosis factor-alpha in arthritic mice [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2003, 25: 573-583.
- [11] Maini R M, Taylor P C. Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis [J]. *Annu Rev Med*, 2000, 51: 207-229.
- [12] Feldmann M, Maini R N. Anti-TNF-alpha therapy of rheumatoid arthritis. What are we learned? [J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 163-196.
- [13] Yoshizaki K, Nishimoto N, Mihara M, *et al.* Therapy of rheumatoid arthritis by blocking IL-6 signal transduction [J]. *Immunopathology*, 1998, 20: 247-259.
- [14] Tsuda T, Horio F, Osawa T. Cyanidin 3-O-beta-D-glucoside suppresses nitric oxide production during a zymosan treatment in rats [J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2002, 48: 305-310.
- [15] Wang H, Cao G, Prior R. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins [J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45: 304-309.
- [16] Saint-Cricq de Gaulejal N, Glories Y. Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines [J]. *Food Res International*, 1999, 32: 327-333.

槲皮素-7,4'-二硫酸酯二钠对重组人肌醇磷脂 3-激酶 p110β 催化亚基活性的影响

刘 文,梁念慈

(广东医学院生物化学与分子生物学研究所,广东 湛江 524023)

摘要:目的 观察槲皮素-7,4'-二硫酸酯二钠 (SQDS) 对重组人肌醇磷脂 3-激酶 (PI3-K) p110β 催化亚基的直接作用。方法 通过基因工程技术的方法获得 PI3-K p110β 催化亚基,用 PtdIns (4,5) P₂ 和 [γ-³²P] ATP 与重组

收稿日期:2004-09-19

基金项目:广东省重点学科基金资助项目 (9306); 广东医学院青年基金资助项目 (XQ9901)

作者简介:刘文 (1970—),男,广东翁源人,生物化学副教授,医学硕士,研究方向为生化药理学。

Tel: (0759) 2388582-4 Fax: (0759) 2284104 E-mail: liuw422@yahoo.com.cn

PI3-K p110 β 催化亚基一起保温的方法测定 PI3-K 的活性;³²P 标记的磷脂用氯仿和甲醇抽提,加闪烁液于液闪计数器计数。结果 SQDS 对重组人 PI3-K p110 β 催化亚基有抑制作用,IC₅₀为 14.88 μ mol/L。结论 SQDS 是 PI3-K 的抑制剂。重组人 PI3-K p110 β 催化亚基可作为一种较为简便地筛选和开发有效的 PI3-K 抑制剂的分子靶点。

关键词:肌醇磷脂 3-激酶 (PI3-K); 重组蛋白; 槲皮素-7,4'-二硫酸酯二钠 (SQDS)

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)06-0878-04

Effect of disodium quercetin-7,4'-disulfate on enzyme activity of recombinant human phosphoinositide 3-kinase p110 β catalytic subunit

LIU Wen, LIANG Nian-ci

(Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Objective To study the effect of disodium quercetin-7,4'-disulfate (SQDS) on activity of recombinant human phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) p110 β catalytic subunit. **Methods** Recombinant human PI3-K p110 β catalytic subunit was expressed by gene engineering. PI3-K activity was assayed by incubating recombinant PI3-K p110 β with phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and [γ -³²P] ATP; the ³²P-radiolabeled lipids were extracted with chloroform and methanol, then assessed by scintillation counter. **Results** SQDS showed inhibition on the recombinant p110 β catalytic subunit with IC₅₀ 14.88 μ mol/L. **Conclusion** SQDS is an inhibitor of PI3-K. The recombinant PI3-K p110 β catalytic subunit might be used as a molecular target for simpler screening and development of more effective inhibitors of PI3-K.

Key words: phosphoinositide 3-kinase (PI3-K); recombinant protein; disodium quercetin-7,4'-disulfate (SQDS)

肌醇磷脂 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3-K) 是多磷脂酰肌醇通路中的一个重要的效应器和涉及信号转导与细胞转化的关键酶。最近的研究表明,PI3-K 是一个重要的药物靶点,PI3-K 特异的抑制剂可望开发成为一种新的抗肿瘤药物^[1~3]。黄酮类化合物是广泛存在于植物界的多酚类化合物,但多数黄酮类化合物不溶于水,极大地限制了其生物利用度和体内给药途径。本所用槲皮素作为母体分子,采用化学方法合成出槲皮素水溶性衍生物,并用胶束纸色谱来分离和鉴定,其结构经 FAB-MS、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 确定为槲皮素-7,4'-二硫酸酯二钠 (disodium quercetin-7,4'-disulfate, SQDS)^[4,5]。研究表明 SQDS 对 HL-60 细胞生长、重组人蛋白激酶 CK2 全酶及血小板聚集、胞外钙内流、胞内钙动员、胞浆蛋白激酶 C (PKC) 的活性和肌动蛋白的聚合有抑制作用^[6~8],但其药理作用的分子机制仍未清楚。为了探讨 SQDS 对 PI3-K 的作用机制,本实验研究了 SQDS 对重组人 PI3-K p110 β 催化亚基的直接作用。

1 材料

1.1 菌株与质粒载体:大肠杆菌 BL21 (DE3) 由卫生部武汉生物制品研究所引进,重组人 PI3-K p110 β -pBuescript II (PBS) 由英国 Ludwig 肿瘤研究所 Waterfield MD 教授惠赠。

1.2 试剂:异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 为美国

Calbiochem 公司产品;槲皮素,渥曼青霉素,LY294002,EGTA,Hepes 和磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (PIP₂) 为 Sigma 公司产品;[γ -³²P] ATP (比活度:185 TBq/mmol) 为北京福瑞生物工程公司产品;SQDS 由本院化学教研室莫丽儿教授用化学的方法,将槲皮素和硫酸起反应而合成,其质量分数为 98%^[4,5];其余为国产分析纯产品。

2 方法

2.1 PI3-K p110 β 催化亚基的原核表达^[9]:将 p110 β 重组质粒转化感受态表达菌 BL21 (DE3),挑取单菌落加入 10 mL 含 Amp 的 LB 培养基过夜振荡培养,次日按 250 mL 培养基 (10 g/L 胰蛋白胨,5 g/L 酵母提取物,5 g/L NaCl,75 mg/L Amp) 加 2.5 mL 过夜培养菌,于 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养,当 A₅₉₅到达 0.5 时,加 IPTG (终浓度为 1 mmol/L) 诱导表达。继续培养 4 h 后收获细菌,称湿质量。然后将 250 mL 培养菌 (约 0.5 g) 加 5 mL 缓冲液 (10 mmol/L Hepes, pH 7.4, 1 mmol/L EGTA, 0.2 mmol/L EDTA, 3 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L PMSF) 于冰浴超声破碎,加 DNase I 于 4 $^{\circ}$ C 水解 DNA 60 min,以 30 000 $\times g$ 超速离心 1 h,获得上清液用于 PI3-K 的活性测定。

2.2 PI3-K 的活性测定:反应缓冲液 100 μ L,含 40 mmol/L Hepes, pH 7.4, 50 mmol/L NaCl, 4 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, 50 μ mol/L

ATP (含 1.85×10^4 Bq [γ - 32 P] ATP), $250 \mu\text{mol/L}$ PIP_2 , 其中, PIP_2 预先超声助溶 3 min。另按实验设计要求加入 $10 \mu\text{L}$ 药物, 加入酶液 $20 \mu\text{L}$ 起始反应。反应温度 30°C , 反应时间 10 min, 加入 $200 \mu\text{L}$ 氯仿-甲醇 (2:1) 终止反应。先后加入 1 mL HCl (3.1 mol/L) 和 1 mL 氯仿, 充分振荡以抽提磷脂。 $3\,000 \times g$ 离心 10 min, 小心吸取下层有机相转移到 5 mL 离心管中, 洗涤 1 次, 加 10 mL 闪烁液于液闪计数仪计数。

2.3 统计学处理: 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 渥曼青霉素和 LY294002 对重组人 PI3-K p110 β 亚基活性的影响: 渥曼青霉素和 LY294002 是 PI3-K 特异的抑制剂, 渥曼青霉素和 LY294002 对重组 PI3-K p110 β 亚基有抑制作用, IC_{50} 分别为 2.15 nmol/L 和 $1.49 \mu\text{mol/L}$ 。结果见表 1 和 2。

3.2 SQDS 对重组人 PI3-K p110 β 亚基活性的影响: SQDS 对重组人 PI3-K p110 β 催化亚基有抑制作用, IC_{50} 为 $14.88 \mu\text{mol/L}$, 见表 3。

表 1 渥曼青霉素对重组人 PI3-K p110 β 亚基活性的影响 ($n=3$)

Table 1 Effect of wortmannin on recombinant human PI3-K p110 β activity ($n=3$)

渥曼青霉素		PI3-K 活性/Bq	抑制率/%
/($\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	lg 值		
0	—	323 $\pm$ 6	—
500	2.699	254 $\pm$ 20	21**
1 000	3.000	214 $\pm$ 17	34**
2 000	3.301	174 $\pm$ 7	46**
4 000	3.602	115 $\pm$ 7	64**
8 000	3.903	81 $\pm$ 7	75**

与渥曼青霉素 0 pmol/L 组比较: ** $P<0.01$
** $P<0.01$ vs wortmannin 0 pmol/L group

表 2 LY294002 对重组人 PI3-K p110 β 亚基活性的影响 ($n=3$)

Table 2 Effect of LY294002 on recombinant human PI3-K p110 β activity ($n=3$)

LY294002		PI3-K 活性/Bq	抑制率/%
/($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	lg 值		
0	—	241 $\pm$ 13	—
500	2.699	142 $\pm$ 48	41*
1 000	3.000	144 $\pm$ 24	40*
2 000	3.301	88 $\pm$ 31	63**
4 000	3.602	78 $\pm$ 1	68**
8 000	3.903	56 $\pm$ 7	77**

与 LY294002 0 nmol/L 组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs LY294002 0 nmol/L group

表 3 SQDS 对重组人 PI3-K p110 β 亚基活性的影响 ($n=3$)

Table 3 Effect of SQDS on recombinant human PI3-K p110 β activity ($n=3$)

SQDS		PI3-K 活性/Bq	抑制率/%
/($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	lg 值		
0	—	633 $\pm$ 156	—
2 500	3.398	575 $\pm$ 126	9
5 000	3.699	520 $\pm$ 29	18
10 000	4.000	381 $\pm$ 100	40*
20 000	4.301	288 $\pm$ 70	54**
40 000	4.602	156 $\pm$ 8	75**

与 SQDS 0 nmol/L 组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs SQDS 0 nmol/L group

4 讨论

PI3-K 是多磷脂酰肌醇通路中一个重要的效应器和涉及信号转导和细胞转化的关键酶。PtdIns (3) P、PtdIns (3,4) P_2 和 PtdIns (3,4,5) P_3 是 PI3-K 的酶促反应产物, 它们在细胞内起到第二信使的作用, 调节一些蛋白激酶活性如蛋白激酶 A (PKA)、蛋白激酶 B (PKB) 和某些 PKC 同工酶等, PI3-K 通过这些信号传导途径参与多种生物学事件, 如囊泡运输、细胞骨架重组、肿瘤发生、细胞存活等^[1,2]。研究表明某些疾病, 如肿瘤、II 型糖尿病等与 PI3-K 有密切关系, 因此, 有学者提出, PI3-K 是一个药理靶点, 其特异的抑制剂具有临床治疗价值^[3]。

在本实验中, 重组人 PI3-K p110 β 亚基有无活性, 是进行其生物学性质与生化药理学研究的前提。本实验用 PtdIns (4,5) P_2 、 $[\gamma$ - 32 P] ATP 与重组 PI3-K p110 β 催化亚基一起保温的反应, 发现有 PtdIns (3,4,5) P_3 产生, 说明重组 PI3-K p110 β 亚基有生物学活性。渥曼青霉素和 LY294002 是 PI3-K 特异的抑制剂, 对重组人 PI3-K p110 β 亚基均有抑制作用, IC_{50} 分别为 2.15 nmol/L 和 $1.49 \mu\text{mol/L}$, 与文献报道的结果基本一致^[3]。因此, 重组人 PI3-K p110 β 催化亚基可作为一个药理靶点。

槲皮素是一种广泛存在于植物中的黄酮类化合物, 是 PKC 和酪氨酸蛋白激酶的抑制剂。由于槲皮素不溶于水, 难于吸收, 生物利用度低, 因此国内外学者在槲皮素分子中导入亲水性基团, 增加溶解度, 从而增强其药理作用。目前已合成了一些水溶性槲皮素衍生物, 如槲皮素乙酸赖氨酸盐、烟酸槲皮素酯、槲皮素磷酸酯钾等^[10]。本课题组合成了 SQDS, 并进行了一些抗肿瘤作用的研究。由于 PI3-K 与细胞增殖密切相关, PI3-K 是抗肿瘤的靶点之一, 为进一步研究 SQDS 的作用机制, 进行了本实验。结果

发现 SQDS 是 PI3-K 的抑制剂。这和其他证据^[6~8]均表明, SQDS 具有生物学活性。SQDS 抑制 PI3-K 的活性, 因此抑制了 PI3-K 介导的信号转导通路而发挥作用。SQDS 既具有槲皮素的作用, 又增加其水溶性, 达到结构改造的目的。

本实验进一步阐明了 SQDS 的作用机制, 这为今后将 SQDS 应用于临床提供了一定的实验依据。本实验结果还提示重组人 PI3-K p110 β 催化亚基可作为一种较为简便地筛选和开发有效的 PI3-K 抑制剂的分子靶点。

References:

- [1] Wymann M P, Zvebil M, Laffargue M. Phosphoinositide 3-kinase signalling—which way to target? [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 24: 366-376.
- [2] Ward S G, Finan P. Isoform-specific phosphoinositide 3-kinase inhibitors as therapeutic agents [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2003, 3: 426-434.
- [3] Stein R C. Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment [J]. *Endocr-Related Cancer*, 2001, 8: 237-248.
- [4] She J, Mo L E, Kang T B, *et al.* Preparation of water-soluble quercetin derivatives and their biological activities [J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 1998, 8(4): 287-289.
- [5] She J, Mo L E, Liang N C. Effects of temperature on preparation of quercetin sulphates [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学杂志), 1998, 15(2): 22-23.
- [6] Weng Y, She J, Cai K R, *et al.* Comparison of effects of quercetin and its derivatives on the growth of HL-60 cells [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2000, 16(2): 154-157.
- [7] Liu W, Liang N C. Inhibitory effect of disodium quercetin-7, 4'-disulfate on aggregation of pig platelets induced by thrombin and its mechanism [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2000, 21(8): 737-741.
- [8] Liu X G, Liang N C, Liu W, *et al.* Inhibitory effect and kinetic analysis of disodium quercetin-7, 4'-disulfate on recombinant human protein kinase CK2 holoenzyme [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 2002, 37(3): 165-168.
- [9] Liu W, Liang N C. Prokaryotic expression of recombinant human PI3-K p110 β catalytic subunit [J]. *J Guangdong Med Coll* (广东医学院学报), 2003, 21(1): 18-20.
- [10] Bao T Z, Wang Q L, Liao Z H. Research advances of quercetin [J]. *J Jiangxi Coll Tradit Chin Med* (江西中医学院学报), 1998, 10(2): 90-91.

塞隆骨提取物对体外大鼠成骨样细胞 ROS17/2.8 的影响

潘明^{1,2}, 谭言飞³, 杨志荣^{1*}

(1. 四川大学生命科学学院, 四川 成都 610064; 2. 四川理工学院 生物工程系, 四川 自贡 643000;

3. 四川大学生物材料工程研究中心, 四川 成都 610064)

摘要:目的 研究塞隆骨提取物对体外培养大鼠成骨样细胞 ROS17/2.8 代谢功能的调节作用, 从而在细胞水平上阐述塞隆骨防治骨质疏松的作用机制及药效成分的筛选。方法 采用超临界萃取法制备塞隆骨的脂、醇、水提液及水煎提取液, 用 MTT 法测定塞隆骨脂、醇、水提液及水煎液对成骨样细胞的增殖作用; 测定碱性磷酸酶 (ALP) 活性, 观察上述提取液对细胞分化的影响。结果 10 mg/mL 塞隆骨脂提液和水提液对大鼠成骨样细胞 ROS17/2.8 有显著的增殖作用 ($P < 0.01$); ALP 检测结果显示, 10 mg/mL 脂提液能极显著增强成骨样细胞内 ALP 活性 ($P < 0.01$), 1.0、0.1 mg/mL 能提高 ALP 活性 ($P < 0.05$); 10 mg/mL 水提液能使 ALP 活性升高 ($P < 0.05$)。结论 塞隆骨脂和水提取液中分别存在有较高活性的促成骨样细胞增殖、分化的物质, 可作为虎骨的替代中药。

关键词: 塞隆骨; 成骨样细胞; 增殖; 分化

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)06-0881-04

Effect of Sailong bone extracts on rat osteoblastoid cells ROS17/2.8 *in vitro*

PAN Ming^{1,2}, TAN Yan-fei³, YANG Zhi-rong¹

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. Department of Bioengineering, Sichuan Institute of Technology, Zigong 643000, China; 3. Engineering Research Center in Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Objective To investigate the modulation of Sailong bone extracts on rat osteoblastoid cells ROS17/2.8 *in vitro* so as to clarify the mechanism of osteoporosis prevention and active component screening of Sailong bone. **Methods** Sailong bone fat-soluble extract, Sailong bone ethanol extract and Sailong

收稿日期: 2004-12-24

基金项目: 四川省科技厅科技攻关项目 (01SG003-14)

作者简介: 潘明 (1966—), 女, 副教授, 在读博士, 硕士生导师, 研究方向为天然产物开发及药理药效的分子机制研究。

Tel: (028) 85410362 E-mail: panming106@163.com

* 通讯作者 杨志荣