

的化合物。Bok 等从虫草菌中分离到的麦角甾醇过氧化物可以抑制体外培养的 K562、Jurkat、WM-1341、HL-60 和 RPMI-8226 肿瘤细胞的生长^[12]，Yang 等从天然虫草中分离到的一种甾醇类化合物 H1-A 可以抑制人肾小球系膜细胞的生长，且诱导其凋亡^[13,14]。在本研究中，含麦角甾醇较多的提取物的抗肿瘤活性也较高，麦角甾醇分布与提取物抗肿瘤活性相一致，故推测麦角甾醇最有可能是虫草菌 HK-1 醋酸乙酯提取物中的抗肿瘤活性成分。

本实验通过对虫草菌 HK-1 和天然虫草提取物体外抗肿瘤作用的比较和活性部位体内抗肿瘤作用的研究证明虫草菌 HK-1 醋酸乙酯提取物具有抗肿瘤活性，且比天然虫草活性更强。另外，虫草菌 HK-1 可以进行深层发酵来获得大量菌丝体。因此，不论从药理活性还是从经济成本上看，人工培养的虫草菌都比天然虫草更具有开发利用的价值。

References:

- [1] Zhu J S, Halpern G M, Jones K. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine; *Cordyceps sinensis* (L) [J]. *J Altern Complement Med*, 1998, 4: 289-303.
- [2] Cho M A, Lee D S, Kim M J, et al. Antimutagenicity and cytotoxicity of cordycepin isolated from *Cordyceps militaris* [J]. *Food Sci Biotech*, 2003, 12(5): 472-475.
- [3] Kodama E N, McCaffrey R P, Yusa K, et al. Antileukemic activity and mechanism of action of cordycepin against terminal deoxynucleotidyl transferase-positive (TdT1) leukemic cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59: 273-281.
- [4] Nakamura K, Yamaguchi Y, Kagota S, et al. Inhibitory effect of *Cordyceps sinensis* on spontaneous liver metastasis of

- Lewis lung carcinoma and B16 melanoma cells in syngeneic mice [J]. *JPN Pharmacol*, 1999, 79: 335-341.
- [5] Yoshida J, Takamura S, Yamaguchi N, et al. Antitumor activity of an extract of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. against murine tumor cell lines [J]. *JPN J Exp Med*, 1989, 59(4): 157-161.
- [6] Liu P G, Wang X H, Yu F Q, et al. Key taxa of larger members in higher fungi of biodiversity from China [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2003, 25(3): 285-296.
- [7] Lu L X, Liu S M. Advances in research of *Cordyceps sinensis* [J]. *Bull Biol* (生物学通报), 2002, 37(6): 4-6.
- [8] Fishman P, Bar-Yehuda S, Madi L, et al. A3 adenosine receptor as a target for cancer therapy [J]. *Anti-cancer Drugs*, 2002, 13: 437-443.
- [9] Wen L T, Knowles A F. Extracellular ATP and adenosine induce cell apoptosis of human hepatoma Li-7A cells via the A3 adenosine receptor [J]. *Br J Pharmacol*, 2003, 140: 1009-1018.
- [10] Madi L, Ochaion A, Rath-Wolfson L, et al. The A3 adenosine receptor is highly expressed in tumor versus normal cells; potential target for tumor growth inhibition [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 4472-4479.
- [11] Kuo Y C, Lin C Y, Tsain W J, et al. Growth inhibitors against tumor cells in *Cordyceps sinensis* other than cordycepin and polysaccharides [J]. *Cancer Invest*, 1994, 12: 611-615.
- [12] Bok J W, Lerner L, Chilton J, et al. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 51(7): 891-898.
- [13] Yang L T, Chen A, Kuo Y C, et al. Efficacy of a pure compound H1-A extracted from *Cordyceps sinensis* on autoimmune disease of MRL lpr/lpr mice [J]. *J Lab Clin Med*, 1999, 134: 492-500.
- [14] Yang L Y, Huang W J, Hsieh H G, et al. H1-A extracted from *Cordyceps sinensis* suppresses the proliferation of human mesangial cells and promotes apoptosis, probably by inhibiting the tyrosine phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL [J]. *J Lab Clin Med*, 2002, 141: 74-83.

原花青素对肿瘤坏死因子- α 诱导 HeLa 细胞凋亡和 caspase-8 活化的影响

侯 敢, 黄迪南

(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 研究原花青素对肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导 HeLa 细胞凋亡和 caspase-8 活化的影响。方法 采用流式细胞术检测细胞凋亡, 荧光检测试剂盒测定 caspase-8 活性, Western blot 检测 caspase-8 酶原表达水平。结果 原花青素 (5、10、20 mg/L) 对重组人肿瘤坏死因子- α (rhTNF- α , 100 μ g/L) 诱导的 HeLa 细胞凋亡均有显著的抑制作用 ($P < 0.01$), 呈剂量依赖关系; 原花青素 (5、10、20 mg/L) 对 rhTNF- α (100 μ g/L) 诱导的 HeLa 细胞 caspase-8 活化均有显著抑制作用 ($P < 0.01$), 呈剂量依赖关系; 原花青素 (5、10、20 mg/L) 对 HeLa 细胞 caspase-8 酶原表达无明显影响。结论 原花青素抑制 TNF- α 诱导 HeLa 细胞凋亡可能与其抑制 caspase-8 活化有关。

关键词:原花青素; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α); HeLa 细胞; 细胞凋亡; caspase-8

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)09-1349-04

收稿日期: 2005-01-15

基金项目: 广东省教育厅、广东省重点学科经费资助项目 (200308)

作者简介: 侯 敢 (1963-), 女, 湖南泸溪人, 副教授, 硕士, 从事抗肿瘤药物的分子生物学研究。

Tel: (0759) 2388581 E-mail: dinanh@gdmc.edu.cn

Effects of procyanidin on apoptosis and caspase-8 activation in HeLa cell induced by TNF- α

HOU Gan, HUANG Di-nan

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

Abstract: Objective To investigate the effects of procyanidin on apoptosis and caspase-8 activation in HeLa cell induced by TNF- α . **Methods** Flow cytometry was used to analyze the apoptosis. The caspase-8 fluorescent kits were used to detect the activity of caspase-8. And the expression of caspase-8 enzymogen was examined by Western blot. **Results** Procyanidin (5, 10, and 20 mg/L) significantly inhibited the apoptosis of HeLa cells induced by rhTNF- α (100 μ g/L) ($P < 0.01$) in a dose-dependent manner; procyanidin (5, 10, and 20 mg/L) had significantly inhibition on the caspase-8 activation of HeLa cells induced by rhTNF- α (100 μ g/L) ($P < 0.01$) in a dose-dependent manner. Procyanidin (5, 10, and 20 mg/L) had no effect on the expression of caspase-8 enzymogen of HeLa cells. **Conclusion** The inhibition of procyanidin on apoptosis of HeLa cells induced by rhTNF- α may have relation to the inhibition of caspase-8 activation.

Key words: procyanidin; tumor necrosis factor- α (TNF- α); HeLa cell; apoptosis; caspase-8

肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 在体外能诱导某些正常细胞和包括 HeLa 细胞株在内的大多数肿瘤细胞株凋亡^[1,2]。TNF- α 诱导敏感细胞凋亡的机制,被认为是通过与靶细胞膜上的特异性受体 (TNF-Rs) 结合后,触发细胞内信号转导而启动凋亡机制^[3]。现在普遍认为细胞凋亡是一系列高度调控的半胱氨酸蛋白酶 (caspase) 级联反应 (cascade) 事件的结果。本实验观察原花青素 (procyanidin, PC) 对 TNF- α 诱导 HeLa 细胞凋亡和 caspase-8 活化的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂: RPMI-1640 培养基 (Gibco 公司), 小牛血清 (超级, 杭州四季青生物工程公司), 重组人肿瘤坏死因子- α (rhTNF- α)、碘化丙啶 (PI) (美国 Sigma 公司), 原花青素 (质量分数 $\geq 95\%$, 南京学子医化研发中心), caspase-8 兔抗人多克隆抗体和 β -actin 兔抗人抗体 (Santa Cruz 公司), HRP-山羊抗兔 IgG (北京中山生物工程公司), Caspase-8 荧光检测试剂盒 (Clontech 公司), 其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 细胞培养与药物处理: HeLa 细胞株引自中国科学院上海细胞生物研究所。培养基为含 10% 小牛血清及青霉素 (10 U/mL)、链霉素 (50 μ g/mL) 的 RPMI-1640 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养。取对数生长的 HeLa 细胞, 实验分为 5 个组: 空白对照组、rhTNF- α (100 μ g/L) 组、rhTNF- α (100 μ g/L)+PC (5 mg/L) 组、rhTNF- α (100 μ g/L)+PC (10 mg/L) 组和 rhTNF- α (100 μ g/L)+PC (20 mg/L) 组, 培养 48 h 后进行各种检测。均进行 3 次重复实验。

1.3 流式细胞仪分析: 参照 Nicoletti 等^[4]的方法进行流式细胞术分析, RNA 酶处理后进行 PI 染色, 采用 EPICSXL 型流式细胞仪检测亚倍体峰。

1.4 检测 caspase-8 的活性: 按 Clontech 公司的 caspase-8 荧光检测试剂盒操作说明检测 caspase-8 活性。用荧光分光光度计检测 IETD-AFC 中游离的 AFC (7-amino-4-trifluoromethyl coumarin) 的强度, 以此来确定 caspase-8 的活性。绘制标准曲线, 计算出 caspase-8 酶活性 (用游离 AFC 强度表示)。

1.5 Western blot 检测 caspase-8 酶原表达水平: 细胞中总蛋白的提取采用超声波法, 蛋白的检测采用 Lowry 方法。将蛋白样品于 100 $^{\circ}$ C 加热 3 min 变性。经 SDS-PAGE (8%) 电泳分离后, 用湿式转移法转移至 NC 膜上, 用丽春红 S 染色, 确定蛋白已转移成功。5% 脱脂奶粉-PBS-聚山梨酯溶液封闭 1 h, PBS-聚山梨酯溶液洗涤 15 min, 共洗 3 次, 分别加入一抗 (1:1 000) 溶液共同孵育 1 h, PBS-聚山梨酯溶液洗涤 15 min, 共洗 3 次, 然后再与 HRP-山羊抗兔 IgG (1:1 000) 溶液共同孵育 1 h, 洗膜 3 次, 将膜与化学发光试剂孵育 5 min, 直至蛋白条带处形成紫色沉淀, 终止反应。以 β -肌动蛋白 (β -actin) 等量蛋白质上样为内参照。

1.6 统计学分析: 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 软件处理, 进行方差分析及 Tukey's HSD 检验。

2 结果

2.1 流式细胞术分析细胞凋亡: rhTNF- α 处理的各组, DNA 直方图均可见到明显的亚二倍体峰 (sub-G1 峰), 以亚倍体细胞峰代表凋亡率。结果显示, 与空白对照组比较, rhTNF- α (100 μ g/L) 处理组细胞凋亡率显著增高 ($P < 0.01$); 不同质量浓度

PC 对 rhTNF- α 诱导的 HeLa 细胞凋亡均有显著的抑制作用 ($P < 0.01$), 且呈剂量依赖关系 (表 1)。

表 1 PC 对 rhTNF- α 诱导的 HeLa 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effects of PC on apoptosis of HeLa cells induced by rhTNF- α ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	凋亡率/%
对照	5.05 \pm 2.1
rhTNF- α (100 μ g/L)	36.10 \pm 6.8**
rhTNF- α +PC (5 mg/L)	26.70 \pm 4.5** $\Delta\Delta$
rhTNF- α +PC (10 mg/L)	18.30 \pm 4.8** $\Delta\Delta$
rhTNF- α +PC (20 mg/L)	13.90 \pm 3.4** $\Delta\Delta$

与对照组比较: ** $P < 0.01$

与 rhTNF- α (100 μ g/L) 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs rhTNF- α (100 μ g/L) group

2.2 检测 caspase-8 活性结果: caspase-8 活性测定结果显示, rhTNF- α (100 μ g/L) 处理组 caspase-8 活性较空白对照组显著增高 ($P < 0.01$); 不同质量浓度 PC 对 rhTNF- α (100 μ g/L) 诱导的 HeLa 细胞 caspase-8 活性升高均有显著的抑制作用 ($P < 0.01$), 且呈剂量依赖关系 (表 2)。

表 2 PC 对 HeLa 细胞 caspase-8 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effects of PC on caspase-8 activity of HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	游离 AFC 强度
对照	61.24 \pm 10.2
rhTNF- α (100 μ g/L)	308.10 \pm 18.3**
rhTNF- α +PC (5 mg/L)	224.90 \pm 12.4** $\Delta\Delta$
rhTNF- α +PC (10 mg/L)	162.30 \pm 15.7** $\Delta\Delta$
rhTNF- α +PC (20 mg/L)	116.10 \pm 13.0** $\Delta\Delta$

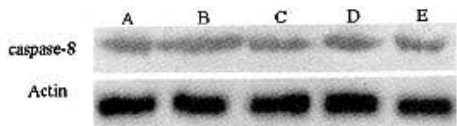
与对照组比较: ** $P < 0.01$

与 rhTNF- α (100 μ g/L) 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs rhTNF- α (100 μ g/L) group

2.3 Western blot 分析 caspase-8 酶原表达水平: 检测结果显示, 各组细胞 caspase-8 酶原表达水平均无明显差异 (图 1)。



A-对照 B-rhTNF- α (100 μ g/L)

C~E-rhTNF- α (100 μ g/L)+PC (5, 10, 20 mg/L)

A-control B-rhTNF- α (100 μ g/L)

C-E-rhTNF- α (100 μ g/L)+PC (5, 10, and 20 mg/L)

图 1 Western blot 分析 caspase-8 酶原表达水平

Fig. 1 Expression of caspase-8 enzymogen analysed by Western blot

3 讨论

目前普遍认为细胞凋亡是一系列高度调控的半胱氨酸蛋白酶 (caspase) 在凋亡不同阶段发挥作用, 分为调控性 caspase 和效应性 caspase, 形成凋亡信号传导的酶级联反应^[5]。TNF- α 以活性三聚体与细胞表面的 TNF-R1 结合, 引起 TNF-R1 形成三聚体, 三聚体的 TNF-R1 通过其凝集的胞内死亡结构域招募下游的信号传递蛋白, 如 FADD (Fas receptor-associated death domain) 等组装成庞大的信号传导复合体, 进而激活下游的多条信号传递通路。其中 FADD 通过活化 caspase-8 引发细胞凋亡^[6]。本实验应用 caspase-8 荧光检测试剂盒检测调控性 caspase-8 的活性变化, 结果表明原花青素对 rhTNF- α 诱导的 caspase-8 活性升高具有明显的抑制作用, 并呈剂量依赖关系。但 Western blot 法未检测到各组细胞 caspase-8 酶原表达水平的明显变化。表明 rhTNF- α 诱导的 HeLa 细胞凋亡过程中, 在不改变 caspase-8 酶原表达水平的基础上, 能有效地引起 caspase-8 酶原的活化, 而原花青素能明显抑制这一活化过程。

TNF- α 在体外能诱导某些正常细胞和大多数肿瘤细胞株凋亡, 并且不同肿瘤细胞株对 TNF- α 诱导的细胞凋亡显示出不同的敏感性, 约 40% 的肿瘤细胞株表现出生长抑制或细胞溶解^[1], 似乎具有一定程度肿瘤特异性。关于 TNF- α 诱导细胞凋亡有肿瘤特异性学说有了新的发展。氧自由基是细胞生长代谢中产生的代谢物质, 其过量产生能引发细胞凋亡。有学者认为 TNF- α 能诱导细胞内产生氧自由基来调节细胞中存活因子^[7]。细胞中存活因子与凋亡因子是一对平衡, 而肿瘤细胞快速生长和缺乏 G₁期使细胞中的存活因子相对处于弱势, 因此肿瘤细胞比正常细胞更敏感于 TNF- α 所诱导产生的自由基, 更易引发细胞凋亡。进而提出, TNF- α 活化氧自由基的作用在临床上的意义超过其受体诱导的细胞毒作用。

原花青素是植物中广泛存在的一类多酚类化合物, 由不同数量的儿茶素和表儿茶素结合组成, 具有多种生物活性和药理作用。原花青素是一种很好的氧自由基清除剂和脂质过氧化抑制剂^[8]。本实验研究结果显示, 原花青素在 5~20 mg/L 对 rhTNF- α 诱导的 HeLa 细胞凋亡有显著的抑制作用 ($P < 0.01$), 且呈剂量依赖关系。结果提示, 原花青素能有效地抑制 rhTNF- α 诱导的 HeLa 细胞凋亡。其作用机制可能与原花青素的抗氧化活性有关。

本实验结果还显示,原花青素对 rhTNF- α 诱导的 HeLa 细胞凋亡的抑制作用与 caspase-8 活性变化相一致。推测原花青素对 rhTNF- α 诱导的 HeLa 细胞凋亡的抑制作用,可能由于其抗氧化活性,能清除 TNF- α 诱导细胞产生的氧自由基,改变细胞中存活因子与凋亡因子的平衡,具体表现为抑制 caspase-8 活化,阻止凋亡信号传导的酶级联反应的形成,从而抑制细胞凋亡,但其确切机制尚待探明。

References:

[1] Old L J. Tumor necrosis factor (TNF) [J]. *Science*, 1985, 230 (4726): 630-632.
 [2] Hou G, Huang D N, Zhu Q F. Effect of cell cycle phase in HeLa cells on apoptosis induced by tumor necrosis factor [J]. *Pract J Cancer* (实用癌症杂志), 2001, 16(5): 459-461.

[3] Biasch H. Relationship between cell kinetics and apoptotic effects in TNF-alpha and IFN-gamma-treated human tumor cell lines [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2001, 12(4): 604-613.
 [4] Nicoletti I, Miglioti G, Paglicci M C, et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry [J]. *J Immunol Methods*, 1991, 139(2): 271-279.
 [5] Villa P, Kaufmann S H, Earnshaw W C. Caspase and caspase inhibitors [J]. *Trends Biochem Sci*, 1997, 22(20): 388-393.
 [6] Chen C, Coeddel D F. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway [J]. *Science*, 2002, 296(5573): 1634-1635.
 [7] Schulg A, Bauer C. Selective effect of tumor necrosis factor on transformed versus nontransformed cell: Nonselective signal recognition but differential target cell response [J]. *Anti-cancer Res*, 2000, 20(5B): 3435-3439.
 [8] Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol [J]. *Fre Rad Biol Med*, 1999, 27(5 P6): 704-724.

重组水蛭素在大鼠体内的药动学研究

黄玉荣,李全胜,刘昌孝

(天津药物研究院 天津药代动力学省部共建重点实验室,天津 300193)

摘要:目的 研究重组水蛭素 iv 给药在大鼠体内的药动学。方法 采用¹²⁵I-标记的放射性同位素法(RA法)、三氯醋酸沉淀结合放射性检测法(TCA-RA法)研究重组水蛭素 iv 给药在大鼠体内的药动学。结果 大鼠 iv 0.5、1.0 和 2.0 mg/kg 重组水蛭素,以 RA 法检测,该药的消除半衰期($t_{1/2ke}$)分别为 162.8、147.5 和 172.8 min, AUC 分别为 264.9、429.9 和 1 112.9 ($\mu\text{g} \cdot \text{min}$)/mL;以 TCA-RA 法检测,该药的 $t_{1/2ke}$ 分别为 100、101 和 107 min, AUC 分别为 160.7、327.7 和 551.3 ($\mu\text{g} \cdot \text{min}$)/mL。两种方法所得结果均证明 AUC 与剂量呈正相关,相关系数均大于 0.99。大鼠 iv 重组水蛭素 1.0 mg/kg 后用 RA 法和 TCA-RA 法测定不同组织的药物质量浓度,在各时间点以肾脏含药量显著高于其他组织,肺、胃、脾、心、肝、性腺等组织次之,脑、脂肪最少。大鼠 iv 重组水蛭素 1.0 mg/kg 后,用 RA 法测定不同时间段内尿、粪的放射性总量,在 96 h 内 70.16% 放射性从尿中回收,1.35% 从粪中回收,24 h 内胆汁排泄量为 3.46%。结论 RA 法和 TCA-RA 法测得重组水蛭素在大鼠体内的药动学结果不同,但整体趋势一致;重组水蛭素主要由尿排泄。

关键词:重组水蛭素;放射性;药动学

中图分类号:R285.61

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)09-1352-05

Pharmacokinetics of recombinant hirudin in rats *in vivo*

HUANG Yu-rong, LI Quan-sheng, LIU Chang-xiao

(Tianjin Key Laboratories of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract: Objective To investigate the pharmacokinetics of recombinant hirudin (r-hirudin) after iv administration in rats. **Methods** Two methods, total radioisotope assay with ¹²⁵I-labeled (RA), the radioactivity assay after sample deposited with trichloroacetic acid (TCA-RA), were used to detect r-hirudin after iv administration in rats. **Results** Rats were given 0.5, 1.0, and 2.0 mg/kg r-hirudin by iv. The pharmacokinetic parameters determined by RA method were as follows: the elimination half-life $t_{1/2ke}$ were 162.8, 147.5, and 172.8 min, AUC were 264.9, 429.9, and 1 112.9 ($\mu\text{g} \cdot \text{min}$)/mL. The pharmacokinetic parameters determined by TCA-RA method were as follow: $t_{1/2ke}$ were 100, 101, and 107 min, AUC were 160.7, 327.7, and 551.3 ($\mu\text{g} \cdot \text{min}$)/mL. AUC were correlated with doses positively for the