

血两虚心律失常具有保护作用^[10], 深入研究炙甘草汤对血流动力学的影响可进一步解释炙甘草汤诸药合用而使气血充实, 阴阳调和, 则“脉结代、心动悸”皆得其平的作用机制。

参考文献:

- [1] 李绍芝, 谭日强, 颜文明, 等. 心气虚患者左心舒缩功能的初步研究 [J]. 中医杂志, 1998, 13(2): 50-52
- [2] 文旺秀. 心气虚证患者的心功能检查分析 [J]. 实用医学杂志, 1988, 14(1): 29-31.
- [3] 廖家桢, 王硕仁, 吕希滢, 等. 参芪治疗心气虚证临床疗效和作用的原理 [J]. 中医杂志, 1999, 3(2): 51-53
- [4] 徐淑云, 卞如瀛, 陈修, 等. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001.

- [5] 苗明三, 方晓艳, 苗艳艳. 大枣多糖对大鼠气血双虚模型胸腺、脾脏中淋巴细胞超微结构影响的可能途径 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(27): 96-99
- [6] 郭平. 血虚证动物模型研究概况 [J]. 山东中医药大学学报, 2006, 30(1): 83-86
- [7] 杨岚, 祝彼得, 彭成. 血虚证动物模型的标准化研究初探 [J]. 四川动物, 2006, 25(1): 160-164
- [8] 苗明三, 顾丽亚, 方晓艳, 等. 大鼠气血双虚动物模型的复制 [J]. 中药药理与临床, 2005, 21(1): 60-62
- [9] 程志清, 龚文波, 姚立, 等. SD 大鼠心气虚证动物模型的研制 [J]. 中国中医药科技, 2003, 10(6): 361-363
- [10] 陈兰英, 罗雄, 胡瑞刚, 等. 炙甘草汤对大鼠气血两虚型心律失常及免疫系统的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(1): 49-51.

曼宋酮 E 对白血病 K562 细胞增殖和凋亡的影响

王 一¹, 张 玓¹, 连小云¹, 苗玉迪¹, 王 晖¹, 黄世亮^{2*}

(1 陕西省人民医院 血液科, 陕西 西安 710068; 2 中山大学药学院, 广东 广州 510052)

摘要:目的 观察曼宋酮 E 对 K562 细胞增殖的影响, 探讨其诱导凋亡作用及可能机制。方法 台盼蓝拒染实验检测曼宋酮 E 对 K562 细胞的生长抑制作用; 荧光显微镜观察细胞核形态的变化; 流式细胞仪测定细胞凋亡率; 免疫印迹法测定 caspase-3、caspase-8、caspase-9 及 PARP 的活性及 Bcl-2、Bax 和 Bcl-XL 的表达。结果 曼宋酮 E 抑制 K562 细胞增殖呈时间和浓度相关性; 12.5 μg/mL 的曼宋酮 E 处理 K562 细胞 0、12、24、48 h 细胞凋亡率分别为 (2.1±0.8)%、(3.2±1.6)%、(15.3±8.9)%、(25.1±11.4)%; 在曼宋酮 E 诱导 K562 细胞凋亡过程中, caspase-3 和 caspase-8 以及 PARP 出现活化断裂, caspase-9 表达无明显变化; Bcl-2 家族蛋白 Bcl-2、Bax 和 Bcl-XL 表达无显著改变。结论 曼宋酮 E 可抑制诱导 K562 细胞增殖, 并通过 caspase-8 途径介导凋亡。

关键词:曼宋酮; 白血病 K562 细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号: R285.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)09-1440-04

曼宋酮类化合物 (mansonones) 是一类具有醌类结构或其前体的天然产物, 曼宋酮类化合物自 1965 年至今, 已发现近 20 种, 主要是从椴科植物曼宋梧桐及榆科无毛榆的心材中提取分离得到^[1-4]。近期的研究结果提示 8 种从桦树心材中提取的曼宋酮类化合物有明显抗枯草杆菌、抗金黄色葡萄球菌以及抗粪肠球菌功能, 并且对多种肿瘤细胞具有明显抗肿瘤作用^[5]。在 20 多种化合物中曼宋酮 E 具有较明显的抗肿瘤作用^[5-7]。本研究以天然的曼宋酮 E 作为研究对象, 观察其对白血病 K562 细胞增殖及凋亡的影响, 初步研究曼宋酮 E 抗白血病作用及可能机制。

1 材料

1.1 肿瘤细胞株: K562 白血病细胞 (陕西省人民医院血液病研究室保存), 从液氮中复苏后, 培养至

对数生长期后备用。

1.2 药品与试剂: 曼宋酮 E 由中山大学药学院提取纯化, 质量分数 99% 以上。RPMI 1640 培养基和小牛血清购于 Gibco 公司; 台盼蓝购于 Sigma 公司; 碘化丙啶 (PI) 和 RnaseA 购于 Angus 公司; 鼠抗人 caspase-3 抗体、兔抗人 PARP 抗体、caspase-3、鼠抗人 caspase-8 抗体、兔抗人 caspase-9 抗体、鼠抗人 bcl-2 抗体、兔抗人 bcl-XL 抗体、鼠抗人 BAX 抗体、抗鼠-HRP 抗体和抗兔-HRP 抗体均购于美国 Santa cruz 公司; β-actin 抗体为 Sigma 公司产品; 其余均为国产试剂。

2 方法

2.1 细胞增殖抑制实验: 将处于对数生长期的 K562 细胞以 1×10^5 /mL 加入 24 孔板中, 每孔 1 mL, 加入不同质量浓度的曼宋酮 E, 于 12、24、36、

* 收稿日期: 2009-02-25

作者简介: 王 一 (1971—), 女, 博士, 副主任医师, 主要从事血液病及肿瘤的基础和临床研究。

Tel: 13571936193 E-mail: wangyi5182003@yahoo.com.cn

48 h 后记数, 用台盼蓝拒染实验记数活细胞, 实验重复 3 次, 取平均值, 描绘生长曲线。

2.2 Hoechst 33258 染色: 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曼宋酮 E 处理 K562 细胞 12、24 h 后, 收集细胞, 用 PBS 洗涤 1 次, 再加入固定液 (甲醇: 醋酸 3: 1) 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, PBS 洗涤后加入 Hoechst 33258, 避光室温孵育 20 min 后, 荧光显微镜观察照相。

2.3 流式细胞仪分析曼宋酮 E 对人白血病 K562 细胞周期分布和凋亡的影响: 取对数生长期的 K562 细胞, 离心, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基制备成浓度为 $3 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液, 于 6 孔板中每孔接种 1 mL, 将平板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱。加入 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的曼宋酮 E, 分别在给药后 0、12、24、48 h 后, 离心收集细胞, 细胞沉淀用 70% 乙醇悬浮, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱固定 24 h 以上。固定后的细胞用 PBS 洗两遍并悬浮, 加入 PI 染液 (终质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温育 30 min, 300 目尼龙网滤过后, 在流式细胞仪上计数 10 000 个细胞, 测定细胞各期 DNA 量, 办件分析 Sub G₁ 期细胞为凋亡细胞, 测定细胞凋亡率。

2.4 Western blotting 测定蛋白的表达: 取对数生长期的 K562 细胞, 离心, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基制备成浓度为 $3 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液, 于 6 孔板中每孔接种 1 mL, 将平板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱。加入 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曼宋酮 E, 分别在给药后 0、12、24、48 h 后, 离心收集细胞, 用蛋白裂解液裂解细胞后, 离心去细胞碎片, 95 $^{\circ}\text{C}$ 煮 10 min 后, 蛋白定量, 40 $\mu\text{g}/\text{孔}$, 上样于 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。将胶上蛋白转移到 PVDF 膜后, 5% 脱脂奶中封闭过夜, 按抗体稀释比例加入一抗室温孵育 3 h, TBST 洗涤 2 次, 每次 10 min。加入相应二抗, 室温孵育 30 min, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。用 ECL 发光试剂盒发光, 冲片, 照相。

2.5 统计学处理: 采用 SPSS 软件进行统计学处理。

3 结果

3.1 曼宋酮 E 对 K562 细胞增殖活性的影响: 微克级质量浓度的曼宋酮 E 对 K562 细胞的增殖起明显抑制作用, 其对 K562 细胞的增殖抑制作用呈时间与剂量依赖性, 结果见图 1。

3.2 荧光显微镜下观察曼宋酮 E 对 K562 细胞形态的影响: 用 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曼宋酮 E 处理 K562 细胞 24 h, Hoechst 33258 染色后, 在荧光显微镜下观察到 K562 细胞出现细胞核的浓集, 核固缩和出现核小体, 结果见图 2。

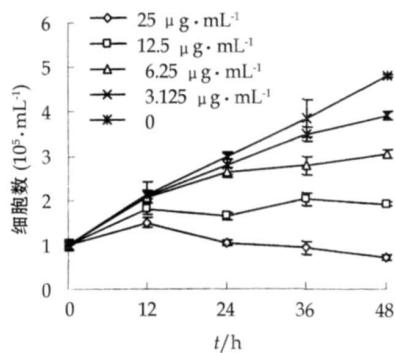


图 1 曼宋酮 E 对 K562 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Inhibition of mansonone E on proliferation of K562 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

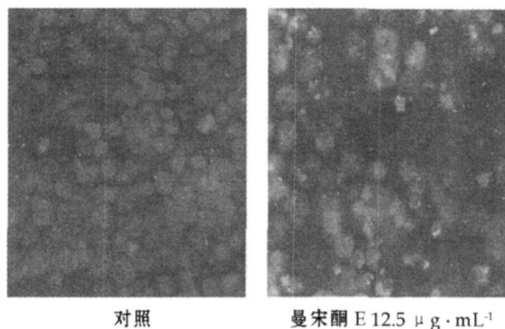


图 2 曼宋酮 E 对 K562 细胞形态的影响

Fig. 2 Effect of mansonone E on morphology of K562 cells

3.3 流式细胞仪测定曼宋酮 E 诱导 K562 细胞凋亡: 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曼宋酮 E 处理 K562 细胞 0、12、24、48 h 后, 用流式细胞仪测定 Sub G₁ 期细胞的比例, 即凋亡细胞, 可见处理 12 h 仅有少量 Sub G₁ 期细胞, 24、48 h 可见到 Sub G₁ 期细胞明显增多, 实验重复 3 次。12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曼宋酮 E 处理 K562 细胞 0、12、24、48 h 细胞凋亡率分别为 (2.1 $\pm$ 0.8) %、(3.2 $\pm$ 1.6) %、(15.3 $\pm$ 8.9) %、(25.1 $\pm$ 11.4) %。

3.4 曼宋酮 E 诱导 K562 细胞凋亡过程中 caspase-3、caspase-8、caspase-9 和 PARP 蛋白表达的变化: 用 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曼宋酮 E 处理 K562 细胞, 可见从处理 12 h 开始长为 35 kb 的 caspase-3 逐渐断裂为 17 kb 长的 caspase-3 活性片段; 原长度为 118 kb 的 PARP 分子, 也逐渐形成断裂为有活性的 85 kb 的断裂带, 且随着时间的延长, 断裂越明显; 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曼宋酮 E 处理 K562 细胞 12 h 起可见原长为 57 kb 的 caspase-8 断裂为 43 kb 和 41 kb 的活化片段, 时间越长, 断裂带含量越多; 而 K562 细胞中 caspase 家族分子中的 caspase-9 在曼宋酮 E 处理的整个过程中无活性断裂带出现, 结果见图 3。

3.5 曼宋酮诱导 K562 细胞凋亡过程中 Bcl-2、Bcl-

XL 和 BAX 的变化: 用 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曼宋酮 E 处理 K562 细胞后观察不同时间发现, Bcl-2、Bcl-XL 和 Bax 的表达无变化, 结果见图 4。

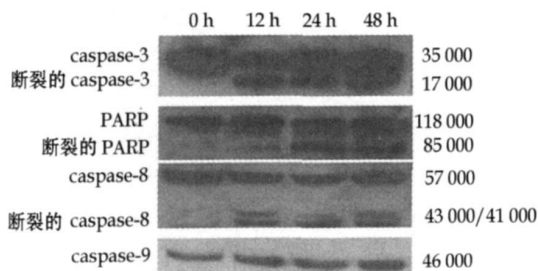


图 3 曼宋酮 E (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对 K562 细胞中 caspase-3、caspase-8、caspase-9 和 PARP 活性的影响

Fig. 3 Effect of mansonone E (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on activities of caspase-3, caspase-8, caspase-9, and PARP in K562 cells

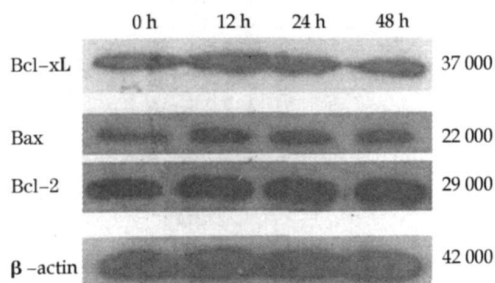


图 4 曼宋酮 E (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对 K562 细胞中 Bcl-2、Bcl-XL 和 Bax 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of mansonone E (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax protein in K562 cells

4 讨论

急性白血病主要的治疗方式为联合化疗, 而白血病化疗失败的重要原因为白血病细胞产生原发或继发耐药, 导致本病的复发, 要克服白血病治疗中的耐药问题, 主要通过化疗过程中使用不同作用机制的化疗药物来克服^[8]。而要使白血病化疗中不断换用不同作用机制的抗白血病药物, 需要不断寻找新的有效的抗白血病药物。凋亡是许多体细胞的正常归宿, 尤其在造血系统, 它是造血细胞终末分化的一个组成部分, 细胞凋亡明显受抑是造成白血病细胞大量积聚的主要原因, 研究表明凋亡的明显减弱与白血病的发生, 治疗耐药、预后等密切相关^[9]。而抗白血病药物治疗白血病的机制与诱导凋亡有关。

从植物的有效抗肿瘤成分中开发新的抗白血病药物是药理学家和临床研究者的研究方向之一。天然曼宋酮有 20 多种, 研究发现其中不少化合物具有明显抗肿瘤作用。

Wang 等^[4]研究表明曼宋酮 E 和 F 在体外可诱导多种肿瘤细胞凋亡, Liu 等^[10]近期的研究结果显示, 曼宋酮 F 可以通过抑制 HeLa 细胞内硫氧蛋白还原酶的活性来诱导细胞凋亡。本实验研究显示曼宋酮 E 对 K562 细胞具有明显抗增殖作用, 进一步的研究显示, 一定质量浓度的曼宋酮 E 作用于人 K562 细胞后, 可以逐渐出现细胞核的聚集、浓缩, 甚至形成凋亡小体; 利用流式细胞仪测定可见到 G₁ 期细胞的亚二倍体, 这些结果提示, 曼宋酮 E 可诱导 K562 细胞凋亡。在药物作用下通过 caspases 信号途径诱导细胞凋亡是凋亡途径之一, 本研究发现曼宋酮 E 作用于 K562 细胞后, 出现 caspase-3 和 caspase-8 的活化断裂, 无 caspase-9 活性的变化^[11,12]。通常凋亡信号先活化 caspase-8 或/和 caspase-9, 通过信号级联反应再活化凋亡的执行人 caspase-3 和 PARP 分子, 使细胞中 DNA 分子出现不可逆的损伤, 细胞核出现浓集, 出现细胞凋亡^[12]。本研究发现曼宋酮 E 作用 K562 细胞 12 h 后可使 caspase-8 分子逐渐断裂, 活化, 同时可以观察到有 caspase-3 和 PARP 的断裂和活化, 表明曼宋酮 E 可以通过活化 caspase-8 信号途径诱导 K562 细胞凋亡^[13]。细胞凋亡过程中 Bcl-2 家族蛋白在凋亡的调节过程中起非常重要的作用, caspase-9 活化状态可影响包括 Bax, Bcl-XL 等 Bcl-2 家族蛋白的表达发生变化, 调节细胞浆内细胞色素 C 内流到线粒体中^[14-16]。本研究结果显示, 曼宋酮 E 可通过活化 caspase-8、caspase-3 途径诱导 K562 细胞凋亡; Bcl-2 家族蛋白不参与凋亡的调节。

参考文献:

- [1] Kraus G A, Jeon I. Anti-estrogenic activity of mansorins and mansonones from the heartwood of *Mansonia gagei* Drumm [J]. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55(9): 1332-1337.
- [2] Puckhaber L S, Stipanovic R D. Thespesinone and dehydrooxoperezinone-6-methyl ether, new sesquiterpene quinones from *Thespesia populnea* [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(9): 1571-1573.
- [3] Nambiar M P, Murugesan R, Wu H C. Inhibition of the cytotoxicity of protein toxins by a novel plant metabolite, mansonone-D [J]. *J Cell Physiol*, 1998, 176(1): 40-49.
- [4] Wang D, Xia M, Cui Z, et al. Cytotoxic effects of mansonone E and F isolated from *Ulmus pumila* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(7): 1025-1030.
- [5] Boonsri S, Karalai C, Ponglimanont C, et al. Cytotoxic and antibacterial sesquiterpenes from *Thespesia populnea* [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71(7): 1173-1177.
- [6] Tiew P, Ioset J R, Kokpol U, et al. Antifungal, antioxidant and larvicidal activities of compounds isolated from the heartwood of *Mansonia gagei* [J]. *Phytother Res*, 2003, 17(2): 190-193.
- [7] Villamil S F, Dubin M, Galeffi C, et al. Effects of mansonones on lipid peroxidation, P450 monooxygenase activity, and superoxide anion generation by rat liver microsomes [J].

- Biochem Pharmacol*, 1990, 40(10): 2343-2351
- [8] Ikeda A, Shankar D B, Watanabe M, *et al*. Molecular targets and the treatment of myeloid leukemia [J]. *Mol Genet Metab*, 2006, 88(3): 216-224
- [9] Hess C J, Berkhof J, Denkers F, *et al*. Activated intrinsic apoptosis pathway is a key related prognostic parameter parameter in acute myeloid leukemia [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(10): 1209-1215
- [10] Liu Z, Huang S L, Li M M, *et al*. Inhibition of thioredoxin reductase by mansonone F analogues: Implications for anti-cancer activity [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 177(1): 48-57
- [11] Sarkar F H, Li Y. Markers of apoptosis [J]. *Methods Mol Med*, 2006, 120: 147-160
- [12] Boatright K M, Salvesen G S. Mechanisms of caspase activation [J]. *Curr Opin Cell Bio*, 2003, 15(6): 725-731
- [13] Zhuang S, Lynch M C, Kochevar I E. Caspase-8 mediates caspase-3 activation and cytochrome c release during singlet oxygen-induced apoptosis of HL-60 cells [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 250: 203-212
- [14] Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins [J]. *J Cell Mol Med*, 2003, 7: 249-257
- [15] Tsujimoto Y. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins [J]. *J Cell Mol Med*, 2003, 7: 249-257
- [16] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival [J]. *Science*, 1998, 281: 1322-1326

金振口服液抗甲型 H1N1 流感病毒作用实验研究

萧伟¹, 郑丽舒², 尚强¹, 刘涛¹, 孙兰¹, 王振中^{1*}

(1 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001; 2 中国疾病预防控制中心病毒病研究所, 北京 100052)

摘要:目的 观察金振口服液对甲型 H1N1 流感病毒抑制作用。方法 采用体外抗病毒实验, 观察金振口服液对流感病毒的抑制作用; 采用体内实验, 以流感病毒感染小鼠, 观察小鼠生存时间、死亡率及肺组织病变程度。结果 金振口服液体外对甲型 H1N1 流感病毒有一定抑制作用, 体内则能明显延长感染小鼠的生存时间, 显著降低肺湿质量 ($P < 0.05, 0.01$), 减轻肺组织病变程度。结论 金振口服液体内外均有一定的抗甲型 H1N1 流感病毒作用。

关键词:金振口服液; 甲型 H1N1 流感病毒; MDCK 细胞

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)09-1443-04

流感是一种传染性强、传播速度快的疾病。流感所引起的并发症和死亡非常严重。据世界卫生组织 (WHO) 发布的公告, 全球每年流感病例为 6~12 亿例, 死亡 50~100 万人^[1]。目前市场上的抗流感药物主要以化学药为主, 但化学药通常有不同程度的不良反应, 在临床应用上受到一定限制。而中医药临床防治流感具有独特效果, 不良反应少, 药源丰富, 价格低廉, 通过调节整体免疫功能抑制病毒复制, 阻止病毒致细胞病变, 改善临床症状快等, 在治疗流感方面显示了独特的优势^[2]。本实验观察金振口服液对流感病毒 A/PR/8/34 (甲型 H1N1 流感病毒) 抑制作用, 为临床应用提供理论依据。

1 实验材料

1.1 细胞与病毒: MDCK 细胞 (犬肾细胞), 流感病毒 A/PR/8/34 (甲型 H1N1 流感病毒), 均由病毒生物技术国家工程研究中心北京金迪克生物技术研究所提供。

1.2 药物与试剂: 金振口服液, 江苏康缘药业股份有限公司, 规格: 生药 1.84 g/10 mL (用蒸馏水稀

释 50 倍用于体外试验, 生药 3.68 mg/mL), 批号: 080115; 病毒唑注射液, 天津药业集团新郑股份有限公司, 规格: 10 mg/mL, 批号: 080219; 达菲, 上海罗氏制药有限公司, 规格: 75 mg, 批号: 080121; DMEM 培养基, 北京清大天一生物技术有限公司; 小牛血清, 杭州四季青药物试剂有限公司; 胰酶、MTT 均购自 Amresco 公司; DMSO 购自 Sigma 公司。

1.3 受试动物: BALB/c 小鼠, 清洁级, 体质量: 14~16 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 质量合格证: SCXK (京) 2007-0001。

1.4 仪器: 96 孔细胞培养板, Corning 公司; 超净工作台, 北京瑞泽康生物科技有限公司; CO₂ 恒温培养箱, 日本 Sanyo 公司; 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; 酶标仪, 美国伯乐公司。

2 方法

2.1 药物对 MDCK 细胞毒性实验: 96 孔细胞板中每孔接种约 5×10^4 个 MDCK 细胞, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜, 弃去细胞培养液, 加入金振口服液 20 μ L (生药 3.68 mg/mL) 于 37 °C、5%

* 收稿日期: 2009-05-14

作者简介: 萧伟 (1959—), 男, 山东昌乐人, 高级工程师, 博士, 研究方向为中药新型制剂的研究与开发。

* 通讯作者 王振中 Tel: (0518) 85521956 E-mail: wzhlz-nj@tom.com