

重要,缺一不可。成熟 T 细胞可按 CD 抗原分为两个亚群 CD_4^+ 细胞和 CD_8^+ 细胞, CD_4^+ 细胞能协助 B 细胞产生抗体和其他 T 细胞分化成熟, CD_8^+ T 细胞能抑制 B 细胞产生抗体和其他 T 细胞分化成熟。本研究显示, Fr. MuLV 病毒感染小鼠的 CD_4^+ 、 CD_8^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 值均显著下降,而灵芝孢子油各剂量均能够改善胸腺萎缩,升高 CD_4^+ 、 CD_8^+ 细胞比例,升高 CD_4^+/CD_8^+ 值。因此,推测灵芝孢子油可能是通过促进 T 淋巴细胞的成熟分化增殖,提高机体的免疫功能,从而起到抗病毒作用。

参考文献:

- [1] 林志彬. 灵芝的现代研究 [M]. 第 2 版. 北京:北京医科大学出版社, 2001.
- [2] 张守勤, 朱俊洁, 王长征, 等. 灵芝孢子食用方法与破壁技术研究进展 [J]. 农业机械学报, 2004, 35: 160-166.
- [3] 陶佩珍, 蒋景仪, 陈鸿珊, 等. 鼠逆转录病毒小鼠模型的建立 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1995, 9(4): 353-356.
- [4] 姜 晶, 崔晓兰, 时宇静, 等. Fr. MuLV 小鼠红白血病模型的建立及叠氮胸苷抗病毒作用的研究 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(11): 1489-1491.
- [5] Min B S, Nakamura N, Miyashiro H, et al. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease [J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46: 1607-1612.
- [6] Kim Y S, Eo S K, Oh K W, et al. Antiherpetic activities of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* and in combinations with interferons [J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 72(3): 451-458.

川楝素提取物诱导 K562 细胞凋亡的实验研究

刘小玲, 王 进, 张 伶, 易 钢, 何於娟*

(重庆医科大学 医学检验系 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要:目的 探讨川楝素提取物对人白血病 K562 细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用及其机制。方法 采用 MTT 法检测川楝素提取物对 K562 细胞增殖的影响; Wright's 染色观察细胞的形态学改变; 流式细胞技术检测细胞周期与凋亡率的变化; Annexin V/PI 双标记法检测细胞的早期凋亡变化; DNA 琼脂糖凝胶电泳观察 DNA 片段化; 比色法检测 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 相对活性的改变; RT-PCR 检测凋亡相关基因 p21、bcr/abl、H-ras mRNA 表达水平的改变。结果 川楝素提取物显著抑制 K562 细胞的增殖, 并呈剂量-时间依赖性, 作用 72 h 的 IC_{50} 值为 20 nmol/L; 处理组细胞可见典型的凋亡形态学改变; 细胞周期和 Annexin V/PI 双标记检测表明川楝素提取物可诱导 K562 细胞凋亡, 并呈剂量-时间依赖性; 处理组细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳出现明显的 DNA ladder; 处理组细胞 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 的活性均显著增加; p21、H-ras mRNA 表达上调, bcr/abl mRNA 表达下调。结论 川楝素提取物对 K562 细胞具有增殖抑制和诱导凋亡的作用, 其机制与 Caspase 信号途径的活化有关。

关键词: 川楝素提取物; K562 细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5; R329.28; R733.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)03-0426-06

Experimental study on K562 cell apoptosis induced by toosendanin extracts

LIU Xiao-ling, WANG Jin, ZHANG Ling, YI Gang, HE Yur-juan

(Key Laboratory of Clinical Diagnostics, Department of Laboratory Medicine, Chongqing

Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of toosendanin extracts on the apoptosis of human erythroleukemia K562 cells. **Methods** MTT Assay was used to examine the effects of toosendanin extracts on the proliferation of K562 cells. Cell morphological changes were detected by Wright's stain and light microscope. Alteration of cell cycle and apoptosis rate was detected by flow cytometry. DNA Agarose gel electrophoresis was used to observe the cell apoptosis. Chromatometry was used to detect the relative activity of caspases. Expressions of p21, H-ras, and bcr/abl were analyzed by RT-PCR. **Results** Toosendanin extracts significantly inhibited the growth of K562 cells in a dose-time dependent manner, the IC_{50} of 72 h was 20 nmol/L. The K562 cells treated with toosendanin extracts showed morphological characteristics of apoptotic cells. Cell cycle and Annexin V/PI double labeling test indicated that toosendanin extracts induced apoptosis of K562 cells in a concentration- and time-dependent manner. The typical DNA ladder on

收稿日期: 2009-07-21

基金项目: 重庆市科委自然科学基金计划资助项目 (CSTC, 2009BB5258)

作者简介: 刘小玲 (1978—), 女, 重庆人, 硕士, 研究方向为中药抗肿瘤分子机制研究。

Tel: 15086696914 E-mail: lyq253726575@126.com

agarose gel electrophoresis for analysis of cellular apoptosis was significantly appeared in the treated K562 cells. Toosendanin extracts induced K562 cell apoptosis involved in the activation of caspase. The mRNA expressions of p21 and H-ras were up-regulated, while the mRNA expression of bcr/abl was down-regulated. **Conclusion** Toosendanin extracts could inhibit the growth and induce the apoptosis of human leukemia K562 cells via caspase pathway.

Key words: toosendanin extracts; K562 cell line; apoptosis

川楝是具有杀虫、镇痛、消炎作用的传统中药,广泛分布于我国的四川、湖北、湖南、河南、贵州及甘肃南部等地。早在两千年前,我国已有利用楝属植物的根、皮、干、果实、种子和叶治疗消化道寄生虫病和防治农业害虫的记载。川楝素是从楝属植物根皮、树皮中提取、分离的一种三萜类化合物,具有驱虫、神经递质抑制、抗肉毒效应及抗癌等多种生物活性^[1]。川楝素在我国已作为无公害、无残毒的植物杀虫剂用于果蔬生产,但在临床医学上的应用仍在研究阶段。

近年从天然植物中提取有效成分治疗肿瘤的研究甚为活跃,寻求天然抗肿瘤药物已成为治疗肿瘤的新策略之一。目前抗癌药物的筛选的主要指标之一就在于它能抑制肿瘤细胞的无限增殖,继而引发细胞走向凋亡。研究发现从传统中药中提取的川楝素能有效抑制多种肿瘤细胞增殖并引发凋亡^[2],表明川楝素具有作为候选抗癌药物的可能性。但川楝素提取物诱导 K562 细胞凋亡的研究鲜有报道。本实验以川楝树皮为原料,采用超声波乙醇提取-氯仿萃取法制备川楝素提取物^[3],通过观察川楝素提取物对人 K562 细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用,初步探讨川楝素提取物诱导 K562 细胞凋亡的可能机制。

1 材料

1.1 细胞:K562 细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所,常规培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基(含青霉素、链霉素 100 U/mL)中,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的混合气体培养箱中培养,2~3 d 换 1 次液,3~5 d 细胞长至 80% 左右传代培养;正常成人外周血单个核细胞(PBMC)采用 ficol 液提取,按上述条件常规培养可存活 1 周。

1.2 川楝素提取物:以川楝树皮为原料,采用超声波乙醇提取-氯仿萃取法自制(川楝素质量分数为 16%)^[3],以川楝素对照品(质量分数 ≥95%)定标,乙醇溶解,配成 1.198 5 mmol/L 储存液,滤过除菌, -20℃ 冰箱保存,使用时以 RPMI 1640 培养基稀释至所需浓度(培养液中乙醇体积分数)。

1.3 主要试剂:川楝素对照品(上海卓康生物有限公司,质量分数 ≥95%);二甲基亚砜(DMSO, Sigma 公司);噻唑蓝(MTT, Sigma 公司);RPMI 1640 培养基(Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青生物研究所);Annexin V/FITC 试剂盒(Biovision 公司);Caspases 试剂盒(Biovision 公司);DNA ladder 试剂盒(博士德公司);RNA 提取试剂盒(TIANGEN 公司);逆转录试剂盒(TaKaRa 公司);PCR 试剂盒(TaKaRa 公司);ficol 液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司);其余试剂均为国产分析纯。

1.4 仪器:CO₂ 恒温培养箱(德国 Heraeus 公司);医用超净工作台(苏净集团安泰公司);普通光学显微镜(Nikon);酶标仪(美国 Awareness 公司);流式细胞仪(美国库尔特公司);PCR 仪(Bio-RAD 公司);电泳槽(北京市六一仪器厂);凝胶成像系统(Bio-RAD 公司)。

2 方法

2.1 MTT 法测定川楝素提取物对 K562 细胞增殖的抑制作用:将对数生长期的 K562 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基换液,常规培养 24 h 后,配成单细胞悬液,按 1×10^4 / mL 细胞浓度接种于 96 孔板中,每孔 200 μL,分别加入不同浓度川楝素提取物,实验分 7 组:溶剂对照组(加入等量含 0.02% 无水乙醇的培养基)、对照组(加入等量培养基)、川楝素提取物组(终浓度分别为 5、10、20、30、40 nmol/L)。同时设立正常成人 PBMC 对照组(加入等量含 0.02% 无水乙醇的培养基)和正常成人 PBMC 药物处理组(加入终浓度为 40 nmol/L 的川楝素提取物)。每组设 5 个平行孔,分别培养 24、48、72、96、120 h 后,每孔加入质量浓度为 5 mg/mL 的 MTT 20 μL,继续培养 4 h,离心,弃上清,加入 DMSO 150 μL,震荡 10 min,在酶标仪上于 492 nm 处检测各孔吸光度(A)值,记录结果,实验重复 3 次,取每次各浓度孔 A 值的均值作为该浓度的最终吸光度值。计算抑制率[抑制率 = $(1 - \frac{\text{实验组吸光度}}{\text{对照组吸光度}}) \times 100\%$]。

2.2 Wright's 染色观察细胞形态变化:将对数生长期细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基配成浓度为 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ 的单细胞悬液,取 6 mL 接种于培养瓶中。实验分为川楝素提取物处理组(终浓度分别为 10、20 nmol/L)和对照组,培养 3、6 d 后,Wright's 染色,光学显微镜下 ($\times 1000$) 观察细胞形态变化。

2.3 流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡率:实验分为 20 nmol/L 川楝素提取物处理组和对照组。收集培养 24、48、72 h 的所有细胞,800 r/min 离心 5 min,弃上清液,PBS 漂洗两次后收集细胞,加入 70% 的冷乙醇固定,4℃ 冰箱过夜,PBS 洗涤去除乙醇,800 r/min 离心 5 min,弃上清液,0.5 mL PBS 重悬细胞,同时加入碘化丙啶 (PI) 染色 30 min,用流式细胞仪测定细胞周期各时相细胞的百分比及细胞凋亡率。

2.4 Annexin V/PI 双标记法检测凋亡效应:实验分为 20 nmol/L 川楝素提取物处理组和对照组。离心收集处理 24、48 h 后的 K562 细胞 $1 \times 10^6/\text{mL}$,PBS 洗 2 次,用 1:4 的结合缓冲液 190 μL 重悬细胞,加入 Annexin V-FITC 5 μL 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI 10 μL ,置冰上作用 10 min,流式细胞仪检测。

2.5 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析:收集 10、20 nmol/L 川楝素提取物作用后的 K562 细胞 2×10^6 个,经 PBS 洗涤,提取 DNA,样品溶于 17 μL TE 中,加入 3 μL DNA loading buffer,上样量为 20 μL ,经 1% 琼脂糖凝胶电泳。

2.6 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 活力检测:实验分为 20 nmol/L 川楝素提取物处理组和对照组。离心收集处理 72 h 后的 K562 细胞,PBS 洗 2 次,加入 50 μL Lysis Buffer 和 0.5 μL DTT,置冰上作用 40 min,离心收集上清液,加入 50 μL 2×Reaction Buffer 和 0.5 μL DTT,再分别加入 5 μL Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 底物,37℃ 避光孵育 4 h,用酶标仪测定 405 nm 处的 A 值,计算相对活性(相对活性 = $A_{\text{处理组}}/A_{\text{对照组}}$)。

2.7 RT-PCR 检测凋亡相关基因 mRNA 表达的影响:采用总 RNA 抽提试剂盒,提取总 RNA。采用 Prime Script™ 逆转录试剂盒,反应体系为:5×逆转录缓冲液 2 μL 、逆转录酶 0.5 μL 、oligo dT (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.5 μL 、随机引物 (100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.5 μL 、总 RNA 500 ng、RNase Free dH₂O 加至 10 μL ,反应条件为:37℃、15 min,85℃、5 s。20 μL PCR 反应体系 酶 (μ) μ 、 ×

PCR buffer (Mg^{2+} free) 2 μL 、 MgCl_2 (25 mmol/L) 1.2 μL 、dNTP 混合液 1.6 μL 、上下游引物 (10 pmol/L) 各 1 μL 、ddH₂O 12.1 μL 、模板 1 μL 。反应条件:94℃、5 min,94℃、30 s,55℃、30 s,72℃、1 min,30 个循环,72℃、5 min。p21、H-ras、bcr/abl、 β -actin 基因引物序列见表 1。

表 1 凋亡相关基因引物序列及产物长度

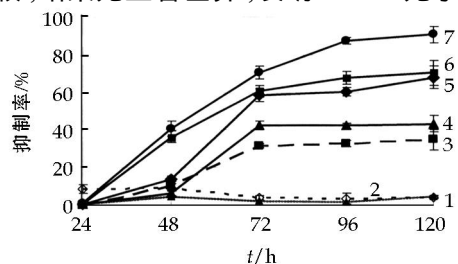
Table 1 Primer sequences of apoptosis related genes and length of products

基因	引物序列	产物长度/bp
p21	正向 5'-TTAGGGCTTCCTCTTGGAAGAAT-3' 反向 5'-ATGTCA GAACCGCTGGGATGTGC-3'	495
H-ras	正向 5'-ACCA TCCAGCTGATCCAGAACCATTTTGTG-3' 反向 5'-CTGTACTGGTGGATGTCTCAAAAGACTTGTG-3'	233
bcr/abl	正向 5'-CTCCA GACTGTCCACA GCATTCGCG-3' 反向 5'-CAGACCTGAGGCTCAAAAGTCA GA-3'	165
β -actin	正向 5'-ACACTGTGCCATCTACGAGG-3' 反向 5'-AGGGGCCGAGTCGTCTACT-3'	621

2.8 统计学分析:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,组间比较进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 川楝素提取物对 K562 细胞的增殖抑制作用:不同浓度的川楝素提取物处理 K562 细胞后,MTT 法测定 A 值,计算抑制率,结果显示川楝素提取物对 K562 细胞生长有明显的抑制作用,具有时间和剂量依赖性,72、96、120 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 22、20、19 nmol/L。40 nmol/L 的川楝素提取物处理正常成人外周血单个核细胞,结果显示川楝素提取物对外周血单个核细胞无明显的抑制作用,表明 40 nmol/L 浓度以下的川楝素提取物对人体正常细胞安全无毒。见图 1。溶剂对照组与对照组比较,结果无显著差异,表明 0.02% 无水乙醇对



1-溶剂对照组 2-PBMC 药物处理组
3~7-5、10、20、30、40 nmol·L⁻¹川楝素提取物组
1-solution control group 2-PBMC treatment group
3-5-7-5, 10, 20, 30, and 40 nmol·L⁻¹ toosendanin extracts

图 1 川楝素提取物对 K562 细胞和 PBMC 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=5)

Fig. 1 Effects of toosendanin extracts on proliferation ($\bar{x} \pm s$, n=5)

K562 细胞的生长无明显抑制作用,可以作为溶剂溶解川楝素提取物。

3.2 川楝素提取物诱导 K562 细胞凋亡的形态学改变:瑞氏染色可见对照组 K562 细胞体积较大,核大而明显,核仁清晰,核浆比大,胞浆有瘤状突起;用药组细胞出现典型的凋亡形态变化:细胞体积明显缩小、胞核变小,核仁减少或消失,核浆比降低,染色质聚集、核固缩、核碎裂、凋亡小体逐渐增多,形态变化呈剂量-时间依赖性。见图 2。

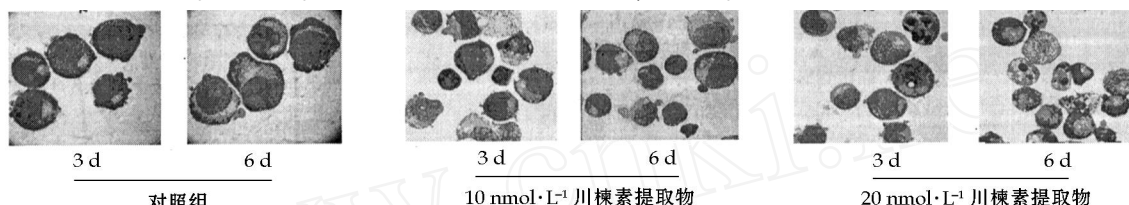


图 2 川楝素提取物处理后 K562 细胞形态改变

Fig. 2 Morphological changes of K562 cells treated by toosendanin extracts

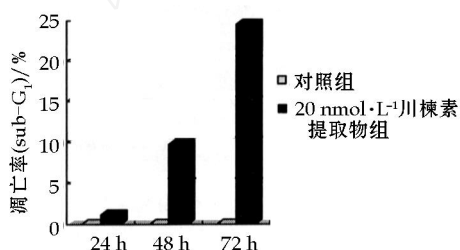


图 3 川楝素提取物对 K562 细胞凋亡率的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Effects of toosendanin extracts on apoptosis rate of K562 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.4 Annexin V/PI 双标记法检测细胞凋亡: Annexin V/PI 双标记法检测细胞凋亡效应时, Annexin V (+)/PI (-) 代表早期凋亡细胞, Annexin V (+)/PI (+) 代表晚期凋亡细胞。20 nmol/L 川楝素提取物处理 K562 细胞 24、48 h 后,细胞凋亡率分别为 5.95%、7.88%,与对照组相比有统计学意义 ($P<0.01$),并呈时间依赖性。见表 2。

3.5 凋亡细胞的 DNA 片段琼脂糖凝胶电泳:由图 4 可见,10、20 nmol/L 川楝素提取物处理 K562 细胞 72 h 后, DNA 裂解为片段,琼脂糖凝胶电泳获得清晰的凋亡特征性梯形条带 (DNA ladder);对照组细胞 DNA 完整,无 DNA 梯形条带。

Table 2 Effects of toosendanin extracts on apoptosis of K562 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组 别	凋亡率/ %	
	24 h	48 h
对照	2.93 $\pm$ 0.96	2.09 $\pm$ 0.87
川楝素提取物	5.95 $\pm$ 1.01 **	7.88 $\pm$ 2.13 **

与对照组比较: ** $P<0.01$

3.3 川楝素提取物对细胞周期和细胞凋亡率的影响:20 nmol/L 川楝素提取物处理 K562 细胞 24、48、72 h 后,FCM 检测细胞周期及细胞凋亡率。结果表明川楝素提取物处理后, K562 细胞周期无显著变化,不影响细胞周期。而川楝素提取物处理后 K562 细胞凋亡率分别为 1.16%、9.74%、24.55%,与对照组相比有统计学意义 ($P<0.05$),表明川楝素提取物能够诱导 K562 细胞凋亡,并呈时间依赖性,见图 3。

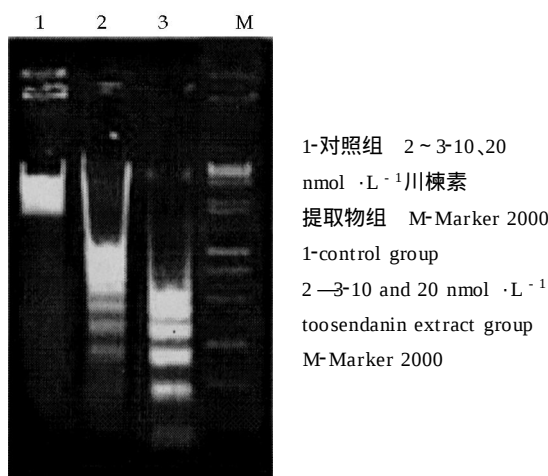


图 4 川楝素提取物处理后 K562 细胞 DNA 梯形条带

Fig. 4 DNA Ladder of K562 cells treated by toosendanin extracts

胞 72 h 后, DNA 裂解为片段,琼脂糖凝胶电泳获得清晰的凋亡特征性梯形条带 (DNA ladder);对照组细胞 DNA 完整,无 DNA 梯形条带。

3.6 川楝素提取物对 K562 细胞 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 活力检测:经 20 nmol/L 川楝素提取物作用 K562 细胞 72 h 后, Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 相对活性明显升高,与对照组相比有统计学意义 ($P<0.01$)。见图 5。

3.7 RT-PCR 检测凋亡相关基因的改变:20 nmol/L 川楝素提取物处理 K562 细胞 72 h 后, p21、H-ras 的 mRNA 表达上调, bcr/abl 的 mRNA 表达下调。见图 和表。

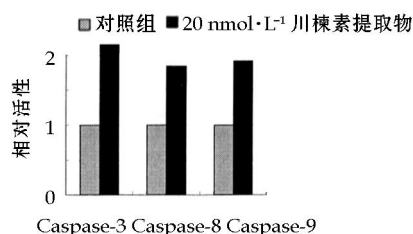
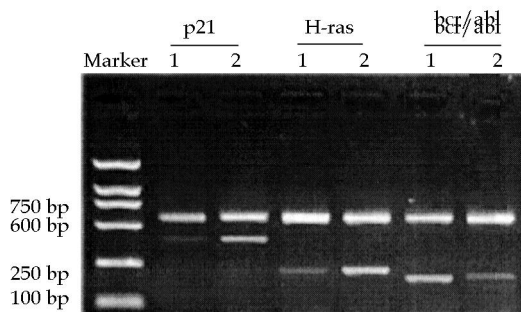


图 5 川楝素提取物处理 K562 细胞 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 活性改变 (n=5)

Fig. 5 Caspases 3, Caspase-8, and Caspase-9 activities of K562 cells treated by toosendanin extracts (n=5)



1-对照组 2-川楝素提取物组
1-control group 2-toosendanin extract group

图 6 川楝素提取物处理后 K562 细胞凋亡相关基因 mRNA 表达水平的改变

Fig. 6 Effects of toosendanin extracts on mRNA expression of apoptosis related gene of K562 cells

表 3 川楝素提取物对 K562 细胞凋亡相关基因 mRNA 表达的影响

Table 3 Effects of toosendanin extracts on mRNA expression of K562 apoptosis related genes

组别	p21/ β -actin	H-ras/ β -actin	(bcr/abl)/ β -actin
对照	0.06	0.14	0.58
处理	0.47	0.61	0.19

4 讨论

K562 细胞株最初是由 Lozzio 等从一位慢性粒细胞白血病伴晚期幼稚细胞危象患者的胸腔积液中分离建立的、能连续传代的细胞系,是分化极差的白血病细胞系,常作为增殖抑制与诱导凋亡研究的细胞模型。本实验以 K562 细胞为研究对象,通过 MTT 法证实了川楝素提取物对 K562 细胞有明显的增殖抑制作用,并呈时间和剂量依赖性,作用 72 h 的 IC_{50} 约为 20 nmol/L。在 IC_{50} 浓度下作用细胞,通过瑞氏染色观察到典型的细胞凋亡形态学变化,流式细胞周期分析、Annexin V/PI 染色和 DNA 梯形条带结果显示川楝素提取物能够显著诱导细胞凋亡并呈时间依赖性。

为进一步探讨川楝素提取物诱导 K562 细胞凋亡的作用机制,本研究应用比色法和 RT-PCR 技术,分别从酶活性和 RNA 水平确定 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 和凋亡相关基因 p21、H-ras、bcr/abl 的变化。细胞凋亡主要通过 3 条途径:线粒体途径、死亡受体途径和内质网途径。Caspase 的本质是一些半胱氨酸蛋白酶,其剪切位点是在特异的的天冬氨酸 (Asp) 残基。据其功能可将参与凋亡的 Caspase 分为触发 Caspase (initiator),如 Caspase-2、Caspase-8、Caspase-9 和 Caspase-10,以及执行 Caspase (executor),如 Caspase-3、Caspase-6 和 Caspase-7 两类。在启动细胞凋亡 Caspase 激酶通路时,凋亡刺激首先激活触发 Caspase,然后由它剪切执行 Caspase,所产生的活性片段再剪切下游底物,而导致凋亡^[4]。其中线粒体途径中涉及到细胞色素 C 与 Apaf-1 及 ATP 形成多聚体 apoptosome 后,结合并激活 Caspase-9,再激活 Caspase-3;而死亡受体途径中位于胞膜的 Fas/ TNF 受体被凋亡刺激激活后,激活 Caspase-8,再由其激活 Caspase-3,引发凋亡。执行 Caspase 被激活后剪切一系列胞内底物,其中有 DNA 结合修复蛋白 PARP、核纤层蛋白、细胞骨架蛋白、核蛋白等,使这些蛋白丧失维持细胞正常形态和修复细胞功能的能力,从而产生细胞形态改变, DNA 双链断裂,呈现凋亡细胞特征^[5]。在本实验中,发现 20 nmol/L 川楝素提取物处理 K562 细胞 72 h 后,可以明显促进 K562 细胞中 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 的激活,表明川楝素提取物诱导 K562 细胞凋亡的机制可能是通过线粒体和死亡受体双重途径。

Bcr/abl 是慢性粒细胞白血病 (CML) 的标记基因,具有明显的抗凋亡作用,川楝素提取物处理 K562 细胞 72 h, bcr/abl 的 mRNA 水平表达明显下调。p21 是细胞周期蛋白依赖性抑制剂,能够作用于细胞周期素 cyclin Es 和 cyclin Ds 而改变细胞周期进程,影响细胞增殖的生物学活性^[6]。在本实验中,观察到 p21 mRNA 在川楝素提取物处理 72 h 后出现明显上调,这与流式凋亡率明显增加的结果一致,但细胞周期却没有明显的改变,需要进一步研究证实。ras 基因是最常被激活的人类原癌基因之一, ras 基因家族有 3 种基因,即 H-ras、N-ras 和 K-ras。研究证明, CML 病情的发生、发展确与 ras 信号传导通路及 ras 基因活性失调有关,野生型及突变型 H-ras、N-ras 和 K-ras 基因的高表达都可抑制细胞增殖^[7]。本研究观察到川楝素提取物处

理后 K562 细胞中 H-ras 的表达增加。

目前许多应用于临床的抗癌药物,如 VP16、顺铂、阿霉素及紫杉醇等都是通过抑制肿瘤细胞的增殖,引发细胞凋亡的作用来实现抗癌功效的。与之相比,川楝素提取物不仅具有抑制肿瘤细胞增殖,引发凋亡的作用,而且其 IC_{50} 更低,表明川楝素提取物具有更强的抑制肿瘤细胞增殖及促进细胞凋亡的能力。研究还发现,高浓度川楝素提取物对外周血单个核细胞的生长无抑制作用,表明川楝素提取物对人体正常细胞安全无毒。因此川楝素提取物可能是一种潜在的、具有应用前景的、安全无毒的抗癌药物。

参考文献:

- [1] 施玉梁,王文萍. 驱蛔中药的活性成分川楝素的生物效应[J]. 生理学报, 2006, 58(5): 397-406.
- [2] Zhang B, Wang Z F, Tang M Z, et al. Growth inhibition and apoptosis-induced effect on human cancer cells of toosendanin, a triterpenoid derivative from Chinese traditional medicine [J]. *Invest New Drugs*, 2005, 23: 547-553.
- [3] 刘小玲. 超声波萃取-HPLC 法分离、检测川楝树皮提取物中川楝素[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(2): 203-205.
- [4] Cohen G M. Caspase: the executioners of apoptosis [J]. *Biochem J*, 1997, 326: 1-16.
- [5] Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis [J]. *Genes Dev*, 2001, 15: 2922-2937.
- [6] Park Y, Kuroda M I. Epigenetic aspects of X-chromosome dosage compensation [J]. *Science*, 2001, 293(5532): 1083.
- [7] Delgado M D, Vaque J P, Aruzarenal I, et al. H-, K- and N-Ras inhibit myeloid leukemia cell proliferation by a p21 WAF1-dependent mechanism [J]. *Oncogene*, 2000, 19(6): 783-790.

血水草生物碱致钉螺肝脏蛋白质差异表达分析

彭 玲¹, 黄琼瑶¹, 刘建军², 彭 飞¹, 孙 慧¹, 袁仕善^{1*}

(1. 湖南师范大学医学院, 湖南 长沙 410006; 2. 深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518020)

摘要:目的 分析血水草生物碱(ECA)致钉螺肝脏蛋白质表达的变化。方法 10 mg/L ECA 浸泡钉螺 36 h 后,解剖活钉螺并收集肝脏,双向电泳分离 ECA 组和清水对照组钉螺肝脏蛋白质,ImageMaster 2D 5.0 软件分析图谱,筛选差异蛋白质,并用 MALDI-TOF-TOF 质谱进行鉴定。结果 ECA 组和清水对照组分别检出 (354 ± 110) 、 (311 ± 12) 个蛋白点;质谱鉴定获得假定蛋白、ENSANGP00000022175 蛋白、醛脱氢酶、未知蛋白、ENSANGP00000027067 蛋白、类似锚蛋白 3 的 1 亚型 4 亚型蛋白、相似 A 型肝炎病毒短型细胞受体 1 的蛋白、线粒体异柠檬酸脱氢酶 2 样蛋白、类似角蛋白的蛋白、角蛋白 10、角蛋白 1 共 11 个蛋白质,这些蛋白质均为 ECA 处理后表达上调的蛋白质。结论 ECA 可引起钉螺肝脏蛋白质表达发生改变。

关键词:血水草;生物碱;钉螺;肝脏;蛋白质组学

中图分类号:R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2010)03-0431-05

Proteome analysis on differential expression of liver proteins from *Oncomelania hupensis* induced by *Eomecon chionanthe* alkaloids

PENG Ling¹, HUANG Qiong-yao¹, LIU Jian-jun², PENG Fei¹, SUN Hui¹, YUAN Shi-shan¹

(1. Medical College of Hunan Normal University, Changsha 410006, China; 2. Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China)

Abstract: **Objective** To analyze the influence of *Eomecon chionanthe* alkaloids (ECA) on differential expression of liver proteins from *Oncomelania hupensis*. **Methods** *O. hupensis* was immersed in 10 mg/L ECA or clean water for 36 h and livers were isolated from live snails. Total liver proteins were extracted and separated by two-dimensional gel electrophoresis, differentially expressed proteins between ECA group and clean water group were selected and analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and tandem mass spectrometry sequencing of tryptic peptides. **Results** There were (354 ± 110) and (311 ± 12) spots observed in ECA group and in water group, respectively. Eleven differential expressed proteins were identified and all were up-regulated in ECA group. The eleven identified proteins were hypothetical protein, ENSANGP00000022175, class I aldehyde dehydrogenase, unknown protein, ENSANGP00000027067, protein similar to ankyrin 3 isoform 1 isoform

收稿日期:2009-07-04

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30771872);湖南省科技厅项目(2006SK1001)

作者简介:彭 玲(1983—),女,湖南岳阳人,病原生物学专业硕士生,研究方向为血吸虫病防治。Tel: (0731) 88912429

E-mail: Pengling39@163.com