

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

*通讯作者 袁仕善 Tel: (0731) 88912458 E-mail: yuanshishan@yahoo.com.cn

4, protein similar to hepatitis A virus cellular receptor 1 short form, mitochondrial isocitrate dehydrogenase 2-like, protein similar to keratin, keratin-10, and keratin-1, respectively. **Conclusion** Expression of liver proteins from *O. hupensis* could be changed when immerse in ECA.

Key words: *Eomecon chionanthe* Hance; alkaloids; *Oncomelania hupensis*; liver; proteomics

血水草 *Eomecon chionanthe* Hance, 别名水黄连, 系罂粟科血水草属多年生草本植物。其植物资源丰富, 分布在我国长江流域、华东、华南、西南大部分省区, 西北秦岭也有分布, 是我国独属独种的植物。《中药志》记载其味苦, 性寒, 有小毒, 具有清热解毒之功效。民间用于治疗急性结肠炎、眼结膜炎、疮痛疔毒以及毒蛇咬伤等症^[1]。生物碱类化合物是血水草的主要有效成分。研究表明, 从血水草中提取的生物碱 (*Eomecon chionanthe* alkaloid, ECA) 具有杀灭钉螺及螺卵、抑制钉螺上爬的作用, 能杀灭日本血吸虫尾蚴、防护小鼠感染^[2,3]。研究发现 ECA 浸泡钉螺导致钉螺肝细胞严重损伤^[4]。另有研究表明 ECA 对钉螺肝脏丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活性的影响明显, 对 ALT 尤其显著^[5]。为深入探讨 ECA 对钉螺肝脏的损伤机制, 本实验用 ECA 浸泡钉螺后, 收集活体螺肝脏, 进行双向电泳和质谱鉴定, 分析 ECA 处理后钉螺肝脏蛋白质表达的变化, 为 ECA 的临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂: IPGphor 等电聚焦仪、SE600 垂直电泳仪、高精度扫描仪、ImageMaster 2D 5.0 凝胶分析软件系美国 Amersham 公司产品; VCX400 型细胞破碎机为美国 SONICS 公司产品; Powerwavex 型酶标仪为美国 BIO-TEK 公司产品; GS-15R 型台式冷冻离心机为美国 Beckman 公司产品; 4700 型串联飞行时间质谱仪系美国 Applied Biosystems 产品。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、SDS、TEMED、尿素、硫脲、CHAPS、Tris、二硫苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺 (IAA), 87% 甘油、Agrose、甘氨酸、IPG buffer (pH 4~7)、IPG 干胶条 (pH 4~7, 13 cm)、覆盖油、混合型蛋白酶抑制剂、核酸酶、样品研磨试剂盒 (Grinding Sample kit)、2-D 定量试剂盒 (2-D Quant kit) 购自美国 Amersham 公司。丙酮购自美国 Sigma 公司。其他试剂系国产分析纯。

1.2 血水草生物碱 (ECA) 的提取: 血水草采自湖南省桃江县人形山, 由湖南中医学院周天达教授鉴定为 *Eomecon chionantha* Hance。取完全干燥的血

水草根茎粉末, 按照杨华中等^[6]的方法, 提取 ECA。

1.3 钉螺肝脏蛋白质的制备: 湖北钉螺 *Oncomelania hupensis* Gredler 采自湖南省洞庭湖君山区水域, 由湖南省血吸虫病防治研究所提供, 置实验室饲养 1~2 d。选取活成螺, 配制 10 mg/L ECA 药液^[3], 25 浸泡钉螺 36 h, 以清水浸泡钉螺为对照组, 水养法检测钉螺存活情况。解剖活钉螺, 分离肝脏, -80 冻存。准确称取 80 mg 肝脏置于样本研磨试剂盒提供的 EP 管内, 加入 200 μ L 裂解液 (7 mol/L Urea, 2 mol/L Thiourea, 4% CHAPS, 65 mmol/L DTT, 40 mmol/L tris)、10 μ L 蛋白酶抑制剂、5 μ L 核酸酶, 用一次性研磨杵, 冰浴匀浆 15 min, 再加入 300 μ L 裂解液, 冰上自由裂解 5 min。冰浴超声 15 次, 超声 5 s, 间隔 5 s, 功率 40 W。4、20 000 $\times g$ 离心 1 h, 收集上清液; 重复离心两次, 小心避开上层脂肪, 取上清液, 加入 3 倍体积预冷丙酮, -20 沉淀 8 h。离心, 弃上清, 裂解液重悬沉淀。分装后 -80 保存备用。

1.4 双向电泳: 2-D Quant kit 定量钉螺肝脏总蛋白。取 90 μ g 样品, 加样本水化液 (7 mol/L Urea, 2 mol/L thiourea, 2% CHAPS) 至终体积 250 μ L, 转入 13 cm 持胶槽中, 覆以 pH 4~7 13 cm IPG 干胶条后加 400 μ L 覆盖油, 进行等电聚焦 (IEF)。时间程序: 30 V、12 h, 500 V、1 h, 1 000 V、1 h, 8 000 V、0.5 h, 8 000 V、6 h。等电聚焦后取下胶条, 去离子水冲洗, 依次在 1% DTT 平衡液和 2.5% IAA 平衡液中平衡 (6 mol/L urea, 75 mmol/L Tris-HCl, 29.3% Glycerol, 2% SDS, 0.002% 溴酚蓝), SDS 电泳缓冲液润洗, 吸去多余液体。配制 12.5% 第二向聚丙烯酰胺凝胶, 将平衡后的胶条放置于已聚合的凝胶胶面上, 0.5% 的琼脂糖封闭, 进行第二向凝胶电泳。电泳至溴酚蓝离胶底约 0.5 cm 时停止电泳。剥下凝胶, EMBL 银染。

1.5 双向电泳的图像采集与分析: 用高精度扫描仪采集图像, 以 ImageMaster 2D 5.0 软件对数字化图像进行分析, 对蛋白质点进行检测 (包括量化、背景扣除、量的归一化及点的匹配), Ratio 值大于 2.0 认为存在差异。

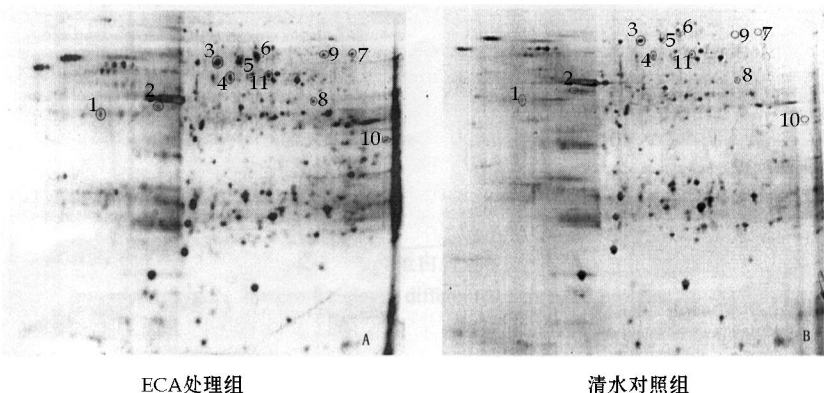
1.6 MALDI-TOF-TOF 质谱分析及数据库检索:

切取差异蛋白点,去离子水清洗,50 mmol 碳酸氢铵 + 50 % 乙腈脱色,纯乙腈干胶,加测序级胰酶于 4 °C 冰箱中约 30 min 后 37 °C 酶解过夜,0.1 % 三氟乙酸 + 50 % 乙腈提取肽段, N_2 吹干,点样,取 5 g/L 基质溶液 0.8 μ L (溶于 0.1 % 三氟乙酸 + 50 % 乙腈) 覆盖样品,空气中自然干燥后分别进行肽指纹图谱 MALDI-TOF-TOF 分析,激光源为 355 nm 波长的 Nd:YAG 激光器,加速电压为 20 kV,采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据。PMF 质量扫描范围为 700 ~ 3 500,且强度最大的 5 个峰进行串联质谱分析;谱图用 myoglobin 酶解肽段进行外标校正。所得结果用 GPS (Applied Biosystems, 美国)-MASCOT (Matrix Science, 英国) 进行数据库检索。搜索参数设置:数据库为 NCBI nr;数据检索的方式为 combined (MS + MS/

SM);最大允许漏切位点为 1;酶为胰蛋白酶。质量误差范围设置:PMF 1.0×10^{-4} ,MS-MS 0.6;在数据库检索时胰酶自降解峰和污染物质的峰均手工剔除。

2 结果

2.1 ECA 组与对照组 2-DE 凝胶图谱的差异分析:在相同条件下对 ECA 组与清水对照组的肝脏总蛋白进行双向电泳,得到了一致性较好的电泳图谱 (图 1)。图谱通过 ImageMaster 5.0 软件分析,结果显示:ECA 处理组和清水对照组分别平均检测到 (354 ± 10) 个和 (311 ± 12) 个蛋白质点 ($n=3$),以 ECA 组的一个 2D 图谱为参考胶,其余 ECA 组 2D 图谱和清水对照组 2D 图谱匹配点数为 (262 ± 3) 个 ($n=3$) 和 (234 ± 5) 个 ($n=3$),平均匹配率分别为 73.89 %、75.36 %。



ECA处理组

清水对照组

图 1 钉螺肝脏蛋白质 2-DE 图谱

Fig. 1 2-DE Image of liver proteins from *O. hupensis*

2.2 差异蛋白质的质谱分析和数据库搜索:通过 ImageMaster 5.0 软件分析,筛选差异蛋白,选取蛋白表达丰度相差 2 倍的差异蛋白质点 19 个,进行串联质谱鉴定,鉴定了其中 11 个蛋白点 (图 2),其余 8 个蛋白由于无法得到好的肽指纹图谱或搜索数据库时无法得到可信度较高的结果而未能成功鉴定。鉴定蛋白点的信息见表 1。可知,鉴定成功的 11 个蛋白质点在 ECA 组均表达上调。此 11 个差异蛋白分别是假定蛋白、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。

3 讨论

植物杀螺剂是世界卫生组织推荐开发的杀螺

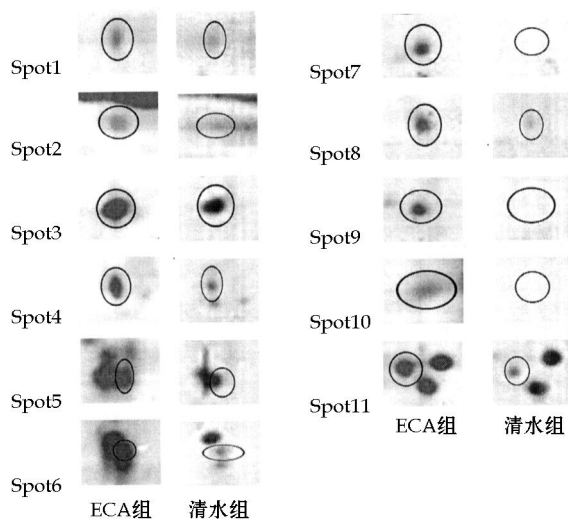


图 2 差异蛋白质点各图

Fig. 2 Images for differential expressed proteins

表 1 差异蛋白点信息

Table 1 Information for differential expressed proteins

蛋白质名称	蛋白 质点	登记号	蛋白质 得分	序列覆盖率/ %	PI	蛋白质相对 分子质量	种属来源
假定蛋白	1	6807998	70	23	5.84	69 251.3	人
ENSANGP00000022175	2	58395660	94	26	5.36	41 522.7	冈比亚疟蚊 PEST 株
醛脱氢酶	3	3818533	70	22	7.49	55 170	
未知蛋白	4	30172720	68	48	6.14	13 515.6	非洲爪蛙人
ENSANGP00000027067	5	57971066	72	39	9.74	34 796.8	冈比亚疟蚊 PEST 株
类似锚蛋白 3 的 1 亚型 4 亚型蛋白	6	73952642	73	11	6.05	490 398.2	狗
相似 A 型肝炎病毒短型细胞受体 1 的蛋白	7	50759667	73	15	8.2	47 226.7	原鸡
线粒体异柠檬酸脱氢酶 2 样蛋白	8	93115142	70	13	7.55	50 374.5	莫桑比克口孵非鲫
类似角蛋白的蛋白	9	76617955	84	27	5.43	53 954.5	牛
角蛋白 10	10	307086	102	27	5.11	46 358.6	人
角蛋白 1	11	17318569	104	34	8.16	66 027	人

剂,因其具有来源广泛、取材方便、易生物降解、对环境污染小等优点^[7],是目前国内外研究的热点之一。我国通过对 500 余种植物资源的研究,已发现有数十种植物对钉螺有较强的毒杀作用^[8],不过到目前为止尚未研究出一种较好的能推广的植物性灭螺药物^[9]。从我国独有的中药——血水草根茎中提取的生物碱(ECA)主要是一类苯并菲啶型生物碱,具有较好杀灭钉螺效果,对鱼毒性较低^[10],并且 ECA 提取方法简便、费用低廉^[5],是具有开发前景的植物杀螺剂。为揭示 ECA 灭螺的作用机制,本课题组进行了一系列研究,发现 ECA 引起钉螺肝脏细胞变性,并导致钉螺肝脏超微结构和酶发生改变^[3,4]。

本实验利用双向电泳和质谱技术,分析了 ECA 处理后钉螺肝脏蛋白质表达的变化。ImageMaster 5.0 软件分析结果表明,钉螺肝脏蛋白质 2D 图谱上 19 个蛋白点显现出稳定的变化(上调或下调大于 2 倍)。选取这些差异蛋白质点进行质谱鉴定,成功获得 11 个蛋白质,这些蛋白质均在 ECA 处理组表达上调。在鉴定成功的蛋白质中,醛脱氢酶是催化合成维甲酸的酶,Ang^[11]发现维甲酸在哺乳动物中通过配体控制的核受体信号通路调节其生长和发育;张延平^[12]报道醛脱氢酶在催化过程中将还原型辅酶 NADH 氧化为 NAD⁺,而 NADH 是糖酵解关键酶,也是最重要的还原酶之一。锚蛋白^[13]是一种细胞内连接蛋白,连接整合膜蛋白到细胞骨架蛋白网络,参与机体生长、发育、细胞内蛋白转运、细胞信号转导及 mRNA 转录等,近来有研究发现锚蛋白可能参与细胞凋亡^[14]。线粒体异柠檬酸脱氢酶 2 是细胞抗氧化应激损伤防御系统的关键酶,通过提供 NADPH 控制线粒体氧化还原平衡和抵抗细胞的氧化应激损伤^[15,16]。角蛋白是一类具有结缔和保护功能的纤维状蛋白质,对正常生理防护功能方

面有重要意义。推测相似 A 型肝炎病毒短型细胞受体 1 的蛋白在钉螺肝脏的信号转导中起作用。而其他几种蛋白功能未知,可能是钉螺肝脏特有的蛋白质或者是低等生物的蛋白质,目前尚未进行过研究。此外,在质谱鉴定过程发现,由于钉螺蛋白质库/基因库尚未建立,有些蛋白质虽然获得很好的肽指纹图谱,搜库却找不到匹配的蛋白质,Mónica^[17]在进行海螺(*Littorina saxatilis*)蛋白质组学研究时也曾提到这个问题。

从上述分析可知,经 ECA 浸泡后的钉螺肝脏差异表达的蛋白质主要涉及细胞通讯、细胞凋亡、信号转导及抗氧化应激损伤和防御等作用。推测 ECA 浸泡钉螺时,钉螺为抵抗氧化损伤,上调线粒体异柠檬酸脱氢酶的表达,增强机体清除活性氧簇的能力;上调角蛋白,改变细胞的通透性;并通过上调锚蛋白和一些受体蛋白,改变细胞信号转导,诱导细胞凋亡,发挥联合防御 ECA 作用。钉螺在抵抗 ECA 毒性作用时耗能增加,因此糖酵解增强,醛脱氢酶表达上调可能是为糖酵解提供更多的 NAD⁺。

目前,国内外对螺的蛋白质组学报道较少,Bouchut^[18]于 2008 年对光滑扁卷螺(*Biomphalaria glabrata*)的血细胞进行蛋白质组学分析,同年 Liana^[19]对喜浅水双脐螺(*Biomphalaria tenagophila*)心包组织和心肌组织蛋白质组进行研究等,而钉螺蛋白组学研究目前国内外未见相关的文献报道。本研究首次对钉螺肝脏蛋白组进行探讨,通过对 ECA 处理后钉螺肝脏差异蛋白质组学分析,结果表明 ECA 通过对细胞造成氧化损伤、导致肝细胞糖酵解紊乱、改变细胞信号转导并可能诱导肝细胞凋亡,对钉螺肝脏造成毒害。成功鉴定 ECA 浸泡钉螺后差异表达的蛋白质,在揭示钉螺对杀螺剂起作用的基因是必须的,本实验为揭示 ECA 对

钉螺肝脏的作用机制提供了重要线索,也为来源于血水草的生物碱作为植物杀螺剂提供科学依据。

参考文献:

- [1] 周天达,周雪仙. 血水草中一个抗菌成分的化学结构研究[J]. 中草药, 1981, 12(1): 1-3.
- [2] 黄琼瑶,彭飞,刘年猛,等. 血水草生物碱杀灭钉螺及日本血吸虫尾蚴的实验研究[J]. 实用预防医学, 2003, 10(3): 289-291.
- [3] 黄琼瑶,彭飞,刘年猛,等. 血水草生物碱杀灭钉螺的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2004, 16(1): 55-57.
- [4] 彭飞,黄琼瑶,刘年猛,等. 血水草生物碱对钉螺肝脏超微结构的影响[J]. 实用预防医学, 2007, 14(6): 1675-1677.
- [5] 刘年猛,黄琼瑶,彭飞,等. 血水草生物碱对钉螺肝脏酶活性的影响[J]. 中药材, 2005, 28(1): 42-44.
- [6] 杨华中,黄琼瑶,刘年猛,等. 血水草杀螺成分——生物碱的提取[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2003, 15(6): 450-451.
- [7] Singh K, Singh A, Singh D K. Molluscicidal activity of *Neem* (*Azadirachta indica* A. Juss) [J]. *J Ethnopharmacol*, 1996, 52(1): 35-40.
- [8] 罗钊,李桂玲. 不同产地黄果茄灭螺效果及增效研究[J]. 中草药, 2004, 35(增刊): 155-157.
- [9] 吴向阳,仰榴青,张联恒,等. 灭螺药物的研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2006, 18(6): 474-476.
- [10] 杨华中,黄琼瑶,彭飞,等. 血水草生物碱对鱼类毒性实验的观察[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2003, 15(4): 276-278.
- [11] Ang H L, Duester G. Stimulation of premature retinoic acid synthesis in *Xenopus* embryos following premature expression of aldehyde dehydrogenase ALDH1 [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 260(1): 227-234.
- [12] 张延平,杜晨宇,黄志华,等. 醛脱氢酶基因敲除对克氏肺炎杆菌合成 1,3 丙二醇的影响[J]. 化工学报, 2006, 57(11): 2686-2692.
- [13] 熊安秀,金润铭. 锚蛋白的研究进展[J]. 国外医学:儿科学分册, 2003, 30(3): 159-161.
- [14] Tschopp J, Martinon F, Hofmann K. Apoptosis: Silencing the death receptors [J]. *Curr Biol*, 1999, 9(10): R381-R384.
- [15] Yang E S, Lee J H, Park J W. Ethanol induces peroxynitrite-mediated toxicity through inactivation of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase and superoxide dismutase [J]. *Biochimie*, 2008, 90: 1316-1324.
- [16] Yang E S, Park J W. Antioxidant enzyme inhibitors enhance nitric oxide-induced cell death in U937 cells [J]. *Biochimie*, 2006, 88(7): 869-878.
- [17] Mónica Martínez-Fernández M, Rodríguez-Piñero A M, Oliveira E, et al. Proteomic comparison between two marine snail ecotypes reveals details about the biochemistry of adaptation [J]. *Proteome Res*, 2008, 7(11): 4926-4934.
- [18] Bouchut A, Sautiere P E, Coustau C, et al. Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: Potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach [J]. *Acta Trop*, 2006, 98(3): 234-246.
- [19] Jannotti-Passos L K, Andrade H M, Caldeira R L, et al. Proteome analysis of the cardiac and pericardial tissue of *Biomphalaria tenagophila* populations susceptible and resistant to *Schistosoma mansoni* infection [J]. *Acta Trop*, 2008, 105(3): 229-234.

半边旗活性物质 5F 对非小细胞肺癌 NCF H460 细胞 IK K β 、IK B、p65 及 p50 mRNA 表达的影响

刘义¹, CHEN George G², 吕应年¹, HSIN Michael K Y², UNDERWOOD Malcolm J², 梁念慈^{1,3}

(1. 广东医学院 广东天然药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524023; 2. 韦尔斯亲王医院 香港中文大学外科系, 香港 新界 沙田; 3. 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 从 NF- κ B 信号通路着手探讨半边旗活性物质 5F 诱导非小细胞肺癌 NCF H460 细胞凋亡发生的机制。方法 MTT 法检测 5F 对 NCF H460 细胞的生长抑制作用; 用半定量 RT-PCR 方法检测 NCF H460 细胞 IK K β 、IK B、p65 及 p50 mRNA 表达水平的变化。结果 5F 抑制 NCF H460 细胞的生长, 其效果与 5F 的质量浓度和作用时间相关, 24、48、72 h 的 IC₅₀ 分别为: 21.40、4.52、1.02 μ g/mL; 100 μ g/mL 5F 作用 NCF H460 细胞 6 h 后能引起 IK K β 和 IK B mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); p65 和 p50 mRNA 水平在作用 3 h 就发生明显减少 ($P < 0.05$)。结论 5F 诱导 NCF H460 细胞凋亡的机制可能是通过抑制核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路来实现的。

关键词:半边旗; 5F; NCF H460 细胞; 核因子- κ B (NF- κ B)

中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)03-0435-05

收稿日期: 2009-06-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870900); 粤港合作课题 (GHP/022/06); 湛江市科技计划项目资助 (2008C01006)

作者简介: 刘义 (1978—), 男, 贵州人, 硕士, 助理研究员, 主要从事抗肿瘤及抗骨质疏松药物的研究。

Tel: (0759) 2388405 E-mail: plliu78@sina.com