

在前期的研究过程中,已制备了3批具有较好纯度HPV16 L2E6E7重组抗原蛋白参考品,该参考品目前已通过了中国食品药品检定研究院的注册检验。以该参考品作为标准物质,建立HPV16 L2E6E7重组抗原的酶联免疫检测方法,可以定量检测发酵菌中重组蛋白表达量。此方法根据抗原抗体特异性结合的原理,具有很好的准确性、特异性和灵敏度,适合于HPV16 L2E6E7重组菌发酵工艺过程中目的蛋白表达量的质量控制。

ELISA方法的灵敏度和特异性取决于所用抗体的亲合力和特异性。所用的包被抗体来源于高纯度的(>95%)HPV16 L2E6E7重组抗原蛋白免疫兔子所得,其所诱导产生的抗体对目标抗原具有更好的捕获能力。本研究所用的检测抗体为特异性的抗HPV16 E7蛋白的小鼠单克隆抗体,该抗体以HPV16 E7蛋白全长98个氨基酸作为免疫源,对HPV16 E7蛋白具有很好的识别能力和特异性^[6],可以最大限度地保证本方法的特异性。

本方法主要用于重组菌发酵工艺过程中目的蛋白HPV16 L2E6E7表达量的质量控制,但是HPV16 L2E6E7重组蛋白在发酵液中主要以不溶的包涵体形式存在,为了使发酵液中的重组包涵体蛋白能完全释放,在对发酵菌液的处理过程中需要用蛋白变性液,最终选择了0.5%的SDS作为变性液,通过煮沸的方式使包涵体蛋白得到最大

程度的释放。然而前期研究表明:高浓度的SDS对于酶联免疫反应中的抗原抗体结合有较大的干扰,而变性后重组包涵体蛋白在缺少SDS变性的条件下又会造成抗原位点暴露不完全。基于这两方面的综合考虑,最终选择了0.002 5%的SDS作为样品的稀释液(具体研究内容有待发表)。在该SDS浓度条件下,既能保证包涵体蛋白的有效变性,又能避免抗原抗体结合受到干扰。

采用本研究建立的ELISA方法对重组菌发酵工艺进行质量中控,将有效提高发酵工艺参数精确度,保证发酵工艺的可控性,从而为HPV16 L2E6E7重组蛋白疫苗的生产奠定坚实的基础。

REFERENCES

- [1] PARKIN D M, BRAY F, FERLAY J, et al. Global cancer statistics 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.
- [2] WALBOOMERS J M, JACOBS M V, MANOS M M, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cancer worldwide [J]. J Pathol, 1999, 189(1): 12-19.
- [3] ZUR HAUSEN H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers [J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1288(2): F55-78.
- [4] 任皎, 姜云水, 高孟, 等. 人乳头瘤病毒16型治疗性疫苗联合免疫效果研究 [J]. 生物技术通讯, 2013, 24(2): 200-204.
- [5] 徐宜. 免疫检测技术 [M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1997: 167-182.
- [6] REICH N C, OREN M, LEVINE A J. Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen p53 [J]. Mol Cell Biol, 1983(3): 2143-2150.

收稿日期: 2014-05-05

杨梅酮对人肺腺癌 A549 细胞凋亡和细胞周期的影响

陈璇, 童晔玲, 任泽明, 杨锋, 戴关海* (浙江省中医药研究院基础实验研究所, 杭州 310007)

摘要: 目的 检测杨梅酮对体外人肺腺癌细胞 A549 细胞凋亡和细胞周期的影响。方法 采用流式细胞仪分别检测各组的细胞早期凋亡率和细胞周期百分率。结果 杨梅酮能显著增加 A549 细胞早期凋亡率和 G₀/G₁ 期的细胞比例, 并且细胞凋亡率与杨梅酮浓度具有较好的量效关系。结论 杨梅酮能显著增加体外人肺腺癌细胞 A549 细胞早期凋亡率, 并可使 A549 细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期。

关键词: 杨梅酮; A549 细胞; 细胞凋亡; 细胞周期

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)01-0014-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.01.004

基金项目: 浙江省科技厅项目(2011F20009、2013F50020、2013F10001)

作者简介: 陈璇, 女, 博士, 助理研究员 Tel: (0571)88849082
研究员 Tel: (0571)88849082 E-mail: 88912292@163.com

E-mail: chenxuan001564@163.com *通信作者: 戴关海, 男, 硕士,

Effect of Myricanone on Cell Apoptosis and Cell Cycle in Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells

CHEN Xuan, TONG Yeling, REN Zeming, YANG Feng, DAI Guanhai* (Institute of Basic Medicine, Zhejiang Academy of TCM, Hangzhou 310007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To detect the effect of myricanone on cell apoptosis and cell cycle in human lung adenocarcinoma A549 cells. **METHODS** The early cell apoptosis rate and cell cycle percentage of each group were detected by flow cytometry. **RESULTS** Myricanone induced early cell apoptosis of A549 cells in a dose-dependent manner, as well as increased the percentage of A549 cells blocked in G₀/G₁ stage. **CONCLUSION** Myricanone could significantly increase the cell apoptosis rate of A549 cells and could block cell cycle of A549 cells in G₀/G₁ stage. **KEY WORDS:** myricanone; A549 cell; cell apoptosis; cell cycle

杨梅(*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.)是指杨梅科杨梅属植物, 杨梅树皮提取物具有抗病毒、抗菌、抗氧化、抗炎、防肠虫和抗肿瘤活性^[1-3]。杨梅树皮中含有黄酮类、环状二芳基庚烷类、单宁类、三萜类等多种具有药理活性的化合物^[3]。杨梅酮属于环状二芳基庚烷类化合物, 是杨梅树皮中主要活性物质之一, Paul 等^[4-5]研究发现杨梅酮能引起Hela细胞和PC3细胞凋亡。笔者前期研究发现杨梅树皮提取物能显著抑制A549细胞生长^[2], 进一步利用制备液相法分离提取获得的杨梅酮能抑制人肺腺癌细胞A549的细胞增殖^[6], 本研究将检测杨梅酮对A549细胞的凋亡诱导作用及其对细胞周期的影响。

1 仪器与试剂

3111型CO₂培养箱(美国Forma); GS-6R型离心机(美国Beckman公司); HR40-II-A2型医用净化工作台(青岛海尔特种电器有限公司); CK40-F200型倒置显微镜(日本OLYMPUS公司); XL-4型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司)。

杨梅酮(浙江省中医药研究院中药研究中心制备液相制得, 批号: 20130823, 纯度: 95.4%); RPMI-1640培养液(批号: 12091204)、PBS缓冲液(批号: 13022001)、0.25%胰蛋白酶(批号: 11090901)均购于吉诺生物医药技术有限公司; 新生牛血清(批号: 110304, 杭州四季青生物工程材料研究所); 氟尿嘧啶[5-Fu, 天津金耀氨基酸有限公司, 批号: 1105131, 规格: 0.25 g/(10 mL)⁻¹]; Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司, 批号: 20110608); 细胞周期检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司, 批号: 111228)。

人肺腺癌A549细胞购自中国科学院上海细胞库, 本实验室液氮保存。

2 方法

2.1 杨梅酮对细胞凋亡的影响

将A549细胞以10⁵·mL⁻¹浓度接种于6孔板中, 每孔4 mL, 24 h后分别加入杨梅酮溶液4 mL(终浓度分别为2.5, 5.0, 10.0 μg·mL⁻¹), 实验同时设阴性对照组(0.1% DMSO)和阳性对照组(5 μg·mL⁻¹ 5-FU)。用药48 h后, 弃上清, PBS清洗1次, 用0.25%胰蛋白酶消化, 收集1~5×10⁵个细胞, 加入500 μL的1×Binding Buffer, 加入5 μL Annexin V-FITC, 10 μL PI, 混匀, 室温下避光反应15 min, 1 h内进行流式细胞仪检测。

2.2 杨梅酮对细胞周期的影响

将A549细胞以5×10⁴·mL⁻¹接种于6孔板中, 每孔3 mL, 按“2.1”项下方法操作, 用0.25%胰蛋白酶消化, 调整细胞浓度为1×10⁶·mL⁻¹, 用1 mL单细胞悬液离心去上清, 加入体积分数为70%的冷乙醇500 μL固定过夜, 4℃保存。第2天用PBS洗去固定液, 加100 μL RnaseA 37℃水浴30 min, 再加入400 μL PI染色混匀, 4℃避光30 min, 上机检测。

3 结果

3.1 杨梅酮对A549细胞凋亡的影响

实验结果表明, 杨梅酮能诱导A549细胞凋亡, 不同浓度杨梅酮(2.5~10.0 μg·mL⁻¹)引起的A549细胞的早期凋亡率为23.9%~34.9%, 高于阳性对照组, 并且随着杨梅酮浓度的增加, 早期凋亡率增加, 与阴性对照组比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。结果见表1和图1。

3.2 杨梅酮对A549细胞周期的影响

实验结果表明, 杨梅酮通过使A549细胞阻滞在G₀/G₁期而影响其细胞周期的调控, 不同浓度杨梅酮(2.5~10.0 μg·mL⁻¹)均引起A549细胞周期阻滞, 表现在G₀/G₁期细胞比例增加, 与阴性对照组比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。结果见表2和图2。

表 1 杨梅酮对 A549 细胞凋亡的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of myricanone on cell apoptosis in A549($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	细胞凋亡率/%
阴性对照组	—	4.13 $\pm$ 0.56
阳性对照组	5.0	10.1 $\pm$ 0.92 ¹⁾
杨梅酮低剂量组	2.5	23.9 $\pm$ 2.56 ¹⁾
杨梅酮中剂量组	5.0	26.9 $\pm$ 2.89 ¹⁾
杨梅酮高剂量组	10.0	34.9 $\pm$ 3.57 ¹⁾

注：与阴性对照组比较，¹⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with negative control group, ¹⁾ $P<0.01$.

表 2 杨梅酮对 A549 细胞周期的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effect of myricanone on cell cycles in A549($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
阴性对照组	—	49.8 $\pm$ 3.25	21.0 $\pm$ 1.88	29.2 $\pm$ 2.76
阳性对照组	5	89.7 $\pm$ 4.25 ¹⁾	2.23 $\pm$ 0.86 ¹⁾	6.7 $\pm$ 1.58 ¹⁾
杨梅酮低剂量组	2.5	69.9 $\pm$ 5.01 ¹⁾	11.7 $\pm$ 0.89 ¹⁾	17.6 $\pm$ 1.87 ¹⁾
杨梅酮中剂量组	5.0	72.3 $\pm$ 4.38 ¹⁾	12.9 $\pm$ 1.08 ¹⁾	14.0 $\pm$ 0.96 ¹⁾
杨梅酮高剂量组	10.0	65.9 $\pm$ 3.58 ¹⁾	13.7 $\pm$ 0.79 ¹⁾	17.1 $\pm$ 1.27 ¹⁾

注：与阴性对照组比较，¹⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with negative control group, ¹⁾ $P<0.01$.

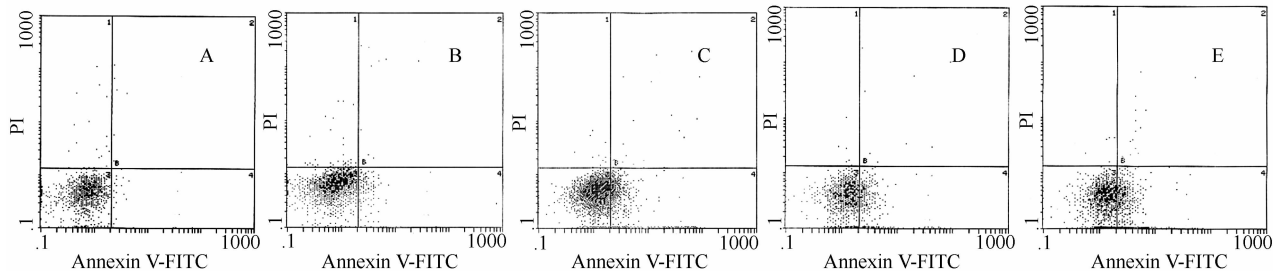


图 1 杨梅酮对 A549 细胞凋亡的影响

A-阴性对照组；B-阳性对照组；C-杨梅酮低剂量组；D-杨梅酮中剂量组；E-杨梅酮高剂量组。

Fig. 1 Effect of myricanone on cell apoptosis in A549

A-negative control group; B-positive control group; C-2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ myricanone; D-5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ myricanone; E-10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ myricanone.

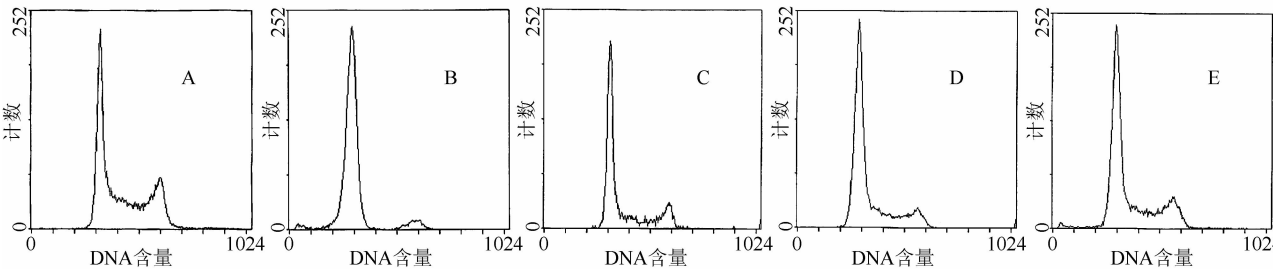


图 2 杨梅酮对 A549 细胞周期的影响

A-阴性对照组；B-阳性对照组；C-杨梅酮低剂量组；D-杨梅酮中剂量组；E-杨梅酮高剂量组。

Fig. 2 Effect of myricanone on cell cycle in A549

A-negative control group; B-positive control group; C-2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ myricanone; D-5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ myricanone; E-10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ myricanone.

4 讨论

中国是世界上杨梅树种植面积最大的国家，每年定期修剪的树枝成为杨梅树皮丰富而稳定的来源。杨梅树皮提取物具有抗肿瘤活性，笔者前期的研究结果也发现杨梅树皮提取物对 A549 细胞有很好的抑制作用，并且杨梅树皮醇提取物和氯仿萃取层部位对 A549 细胞的抑制作用最明显，并具有较好的量效关系^[2]。对相关活性物质的鉴定有利于阐明杨梅树皮提取物抗肿瘤活性的机制，更重要的是为抗肿瘤药物的开发提供基础。

环状二芳基庚烷类化合物具有显著的抗肿瘤活性^[7]，杨梅酮作为环状二芳基庚烷类化合物是杨

梅树皮中主要的活性物质之一^[5]。笔者前期研究结果表明，杨梅酮能抑制 A549 细胞的增殖，本研究从诱导凋亡角度发现杨梅酮通过使 A549 细胞阻滞在 G₀/G₁ 期而影响其细胞周期的调控，并诱导 A549 细胞凋亡。

本研究结果表明杨梅酮能显著增加体外人肺腺癌细胞 A549 细胞早期凋亡率，促凋亡效率甚至高于阳性对照 5-Fu 的作用，并且杨梅酮可使 A549 细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期。该研究结果表明杨梅树皮具有治疗肺腺癌的应用潜力，其中杨梅酮可能是关键有效物质之一。此外，本研究结果提示杨梅酮具有开发成为治疗肺癌的有效药物的潜力，

同时可以为其他肺癌治疗药物的研发提供参考。

REFERENCES

- [1] JAIN V K, JAIN B. Anthelmintic activity of ethanolic extract of bark of *Myrica esculenta* [J]. Int J Pharm Sci Res, 2010, 1(11): 129-131.
- [2] DAI G H, TONG Y L, REN Z M, et al. Effect of extract from bark of *Myrica rubra* on resisting human lung adenocarcinoma A549 cells *in vitro* [J]. Chin Arch Trad Chin Med(中华中医药学刊), 2013, 31(1): 81-82.
- [3] YANG L, CHANG C, CHEN L, et al. Antitumor principle constituents of *Myrica rubra* var. *acuminata* [J]. J Arg Food Chem, 2003, 51(10): 2974-2979.
- [4] PAUL A, DAS S, DAS J, et al. Diarylheptanoid-myricanone isolated from ethanolic extract of *Myrica cerifera* shows anticancer effects on HeLa and PC3 cell lines: signalling pathway and drug-DNA interaction [J]. J Integr Med, 2013, 11(6): 405-415.
- [5] PAUL A, DAS J, DAS S, et al. Anticancer potential of myricanone, a major bioactive component of *Myrica cerifera*: novel signaling cascade for accomplishing apoptosis [J]. J Acupunct Meridian Stud, 2013, 6(4): 188-198.
- [6] REN Z M, TONG Y L, DAI G H, et al. Effect of myricanone on tumor *in vitro* [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医院学刊), 2014, 32(10): 2423-2425.
- [7] ZHANG J B, LIU J X, DI D L, et al. Advances in studies on macrocyclic diarylheptanoids from natural products [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2009, 39(8): 1263-1268.

收稿日期: 2014-04-22

二甲双胍对舒必利、利培酮所致大鼠糖脂代谢紊乱的影响

董介正¹, 马婉¹, 刘野², 盘圣明¹, 徐莲莲¹, 刘义¹(1.杭州市第七人民医院, 杭州 310013; 2.甘肃省中医院, 兰州 730000)

摘要: 目的 探讨二甲双胍防治抗精神病药舒必利、利培酮所致的大鼠体重增加、糖脂代谢紊乱及肝脏脂质沉着的效果。方法 大鼠第 1~4 天予舒必利 25 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 或利培酮 0.05 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃, 从第 5 日起舒必利加至 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 或利培酮加至 0.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 2 周后加用二甲双胍 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 总共给药周期为 8 周; 取基线, 3 d, 1 周, 2 周, 4 周, 6 周, 8 周 7 个时间点, 称取大鼠体重, 测空腹血糖(fasting blood-glucose, FBS)及餐后 2 h 血糖(2-hour post-meal blood glucose, 2hPBG); 于实验第 8 周末检测血清果糖胺(fructosamine, FA)、胰岛素(insulin, IRS)水平血清胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)及高密度脂蛋白(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C), 并取大鼠肝脏进行常规 HE 染色。结果 各时间点二甲双胍组与正常对照组各相关指标差异无统计学意义; 与正常对照组比较, 服用舒必利组、利培酮组大鼠在第 6 周、8 周末体重、2hPBG、INS、FA 升高($P<0.05$), 8 周末 TC、TG、HDL-C 升高($P<0.05$), LDL-C 降低($P<0.05$), 而舒必利与利培酮组比较, 上述指标差异无统计学意义; 舒必利或利培酮合用二甲双胍的大鼠 6 周及 8 周末体重、2hPBG、INS、FA 较单独使用舒必利或利培酮的大鼠更低($P<0.05$), 8 周末 TC、TG、HDL-C 更低($P<0.05$), LDL-C 较高($P<0.05$)。肝脏病理示舒必利及利培酮组大鼠肝细胞形态紊乱, 血管周围见多量白色脂肪浸润细胞, 且在距离血管较远的肝细胞也可见到脂质沉着; 舒必利或利培酮合用二甲双胍的大鼠肝细胞形态整齐, 血管周围及血管较远白色脂肪浸润细胞明显少于舒必利及利培酮组。结论 抗精神病药舒必利、利培酮可引起大鼠体重增加、血糖升高、糖耐量异常、脂代谢紊乱及肝脏脂质沉着, 二甲双胍能有效地防治舒必利、利培酮所致的大鼠体重增加及糖脂代谢紊乱, 并能减轻肝脏脂质沉着。

关键词: 二甲双胍; 舒必利; 利培酮; 糖脂代谢紊乱; 脂质沉着

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)01-0017-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.01.005

Effects of Metformin on Sugar Lipid Metabolic Disorder Caused by Sulpiride or Risperidone in Rats

DONG Jiezheng¹, MA Wan¹, LIU Ye², PAN Shengming¹, XU Lianlian¹, LIU Yi¹(1.The Seventh People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310013, China; 2.Traditional Chinese Medicine Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study using metformin to prevent and treat body weight increasing, sugar lipid metabolic disorder and liver lipid deposition which are caused by sulpiride or risperidone in rats. **METHODS** From 1 d to 4 d, sulpiride

基金项目: 杭州市科技发展计划项目(20110833B21); 浙江省中医药科学研究基金项目(2011ZB112); 杭州市卫生科技计划(一般)项目(2012A039); 浙江省中医药科技计划项目(20122B134)

作者简介: 董介正, 男, 硕士, 主治医师

Tel: (0571)85126583

E-mail: djzh105@126.com