

SCN 的 Periods 钟基因表达变化有关。钟基因 Periods 属于立早基因,在生物体受到刺激后反应迅速,变化较快,容易被检出。

我们发现磁性纳米粒子可影响小鼠中枢日节律,这一发现提供了对磁性纳米粒子生物医学应用的更多思考。首先应考虑到磁性纳米对生物钟的影响。磁性纳米粒子与时间治疗学结合,可能会对肿瘤等疾病的治疗产生更好效果。此外,随着物理学和材料学的不断发展,纳米粒子也许可能成为人造的节律发生器,调节生物体固有节律,在未来的航空航天等诸多领域发挥积极作用。

参考文献

- 1 Silva GA. Nanotechnology approaches to crossing the blood – brain barrier and drug delivery to the CNS. *BMC Neurosci*, 2008, 9 (Suppl 3):S4
- 2 Tysiak E, Asbach P, Aktas O, *et al*. Beyond blood brain barrier breakdown – in vivo detection of occult neuroinflammatory foci by magnetic nanoparticles in high field MRI. *J Neuroinflam*, 2009, 6 (6):20
- 3 Peng XH, Qian X, Mao H, *et al*. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. *Intern J Nanomed*, 2008, 3 (3):311 – 321
- 4 樊祥山,张东生,郑杰,等.具有磁感应定向加热治疗肿瘤作用的锰锌铁氧体纳米粒子的制备及其特性检测. *生物医学工程学杂志*, 2006, 23(4):809 – 813
- 5 王秀利,聂立波. 磁性纳米颗粒在生物医学领域中的应用. *化学*

通报, 2009, 72(6):489 – 494

- 6 Liu CH, Ren JQ, Yang J, *et al*. DNA – Based MRI Probes for Specific Detection of Chronic Exposure to Amphetamine in Living Brains. *J Neurosci*, 2009, 29(34):10663 – 10670
- 7 Pisanic TR, Blackwell JD, Shubayev VI, *et al*. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials*, 2007, 28(16):2572 – 2581
- 8 Gojova A, Guo B, Kota RS, *et al*. Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles; effect of particle composition. *Environ. Health Perspect*, 2007, 115(3):403 – 409
- 9 Suh WH, Suslick KS, Stucky GD, *et al*. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Prog Neurobiol*, 2009, 87(3):133 – 170
- 10 Reddy AB and O’Neill JS. Healthy clocks, healthy body, healthy mind. *Trends Cell Biol*, 2010, 20(1):36 – 44
11. Litinski M, Scheer FAJL, Shea SA. Influence of the Circadian System on Disease Severity. *Sleep Med Clin*, 2009, 4(2):143 – 163
- 12 Vinogradova IA, Anisimov VN, Bukalev AV, *et al*. Circadian disruption induced by light – at – night accelerates aging and promotes tumorigenesis in rats. *Aging (Albany NY)*, 2010, 2(2):82 – 92
- 13 Paxinos G, Franklin KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego:Academic Press, 2nd edition, 2001:20 – 50
- 14 Veisheh O, Sun C, Fang C, *et al*. Specific targeting of brain tumors with an optical/MR imaging nanoprobe across the blood brain barrier. *Cancer Res*, 2009, 69(15):6200 – 6207
- 15 Zhang S, Chen X, Gu C, *et al*. The effect of iron oxide magnetic nanoparticles on smooth muscle cells. *Nanoscale Res Lett*, 2009, 4(1):70 – 77

(收稿:2011 – 01 – 28)

抗肿瘤抗生素云南霉素诱导人肝癌 HepG₂ 细胞凋亡

张方博 刘秀均 陈淑珍 吴淑英 甄永苏

摘要 目的 观察抗肿瘤抗生素云南霉素对人肝癌 HepG₂ 细胞凋亡的影响。**方法** 体外培养人肝癌细胞株 HepG₂, MTT 法检测云南霉素对细胞增殖的影响, Hoechst33342 法检测细胞凋亡的形态变化, Western blotting 法检测凋亡相关蛋白 PARP 的表达, Annexin V – FITC/PI 双染结合流式细胞仪检测细胞的凋亡率。**结果** 云南霉素对 HepG₂ 细胞增殖抑制的 IC₅₀ 值为 24.13 μmol/L; HepG₂ 细胞经云南霉素作用 24h 后, 可诱导胞内凋亡标志蛋白 PARP 的切割, 并随浓度的增高而作用增强; 而 HepG₂ 细胞经云南霉素作用 48h 后, 可出现典型的凋亡形态变化, 呈剂量依赖性引起细胞凋亡。**结论** 云南霉素可抑制人肝癌细胞株 HepG₂ 的增殖, 诱导细胞发生凋亡。

关键词 云南霉素 凋亡 HepG₂ 细胞

Yunnanmycin Induces Apoptosis in Human Liver Carcinoma HepG₂ Cells. Zhang Fangbo, Liu Xiujun, Chen Shuzhen, Wu Shuying, Zhen Yongsu. *Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing*

基金项目:国家基础研究计划“973”项目(2004CB518706)。

作者单位:100050 北京,中国医学科学院医药生物技术研究所

通讯作者:甄永苏,中国工程院院士,电子信箱:zhenys@public.bta.net.cn

100050, China

Abstract Objective To observe the apoptosis inducing effect of yunnanmycin in human liver carcinoma HepG₂ cells. **Methods** HepG₂ cells were cultured in DMEM media. After corresponding treatment of yunnanmycin, the cell proliferation was assayed by MTT. The apoptotic rate was measured by flow cytometry analysis. The apoptotic nucleus was evaluated by Hoechst33342 staining, and the expressions of PARP were determined by Western blotting. **Results** The IC₅₀ value for HepG₂ cells was 24.13 μmol/L. With the increasing concentration of yunnanmycin after 24h, the expressions of apoptotic protein PARP cleavage were significantly increased. When cells were treated at different concentrations for 48h, typical morphology of apoptotic nuclei was observed in many cells, and the apoptotic rate was significantly raised. **Conclusion** Yunnanmycin could inhibit the proliferation of HepG₂ cells and induce apoptosis.

Key words Yunnanmycin; Apoptosis; HepG₂

云南霉素 (yunnanmycin) 是从我国云南省关坪自然保护区土壤样品中分离得到的一株链霉菌 *Streptomyces albulus* 2321 产生的新型胞嘧啶核苷二肽类抗肿瘤抗生素^[1,2]。体内外实验显示其对多种肿瘤细胞具有杀伤作用^[3], 此外研究表明云南霉素在体外可诱导人白血病细胞 HL-60、人口腔鳞癌细胞 KB、人肺腺癌细胞 GLC 等细胞产生细胞周期阻滞^[4,5]。本文主要研究云南霉素诱导人肝癌 HepG₂ 细胞凋亡的作用。

材料与方法

1. 材料: 人肝癌 HepG₂ 细胞由中国医学科学院医药生物技术研究所以肿瘤室保存。云南霉素由中国医学科学院医药生物技术研究所以肿瘤室赵春燕老师提供。DMEM 培养基 (美国 Gibco); 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); MTT 和 Hoechst 33342 (美国 Sigma); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (美国 Thermo scientific); 兔源抗 PARP 抗体 (美国 Cell Signaling Technology); 兔源抗 Actin 抗体 (美国 Santa Cruz); 辣根过氧化物酶偶联的抗兔二抗 (北京中杉金桥); ECL 发光试剂盒 (美国 Millipore); Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (北京宝赛生物技术有限公司); 细胞培养箱 (英国 RS Biotech); 倒置显微镜 (日本 Olympus); 荧光倒置显微镜 (日本 Nikon); 酶标仪 Multiskan MK3 (英国 Thermo labsystems); 台式低温超速离心机 (德国 Eppendorf); 蛋白垂直电泳仪 (美国 Pharmacia); 蛋白转膜仪 (美国 Pharmacia); 凝胶成像仪 ChemiImager 5500 (美国 Alpha Innotech); 流式细胞仪 Coulter Epics XL (美国 Beckman Coulter)。

2. 方法: (1) 细胞培养: 人肝癌 HepG₂ 细胞使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 培养在 37℃、5% CO₂ 培养箱中。取对数生长期的 HepG₂ 细胞按 10⁴ 细胞/平方厘米密度接种于培养瓶中, 24h 细胞贴壁后加药处理不同时间, 收集细胞做各项检测。(2) MTT 测定细胞的增殖抑制: 取对数生长期细胞, 按每孔 (3~5) × 10⁴/孔接种于 96 孔板中, 培养箱中孵育 24h 后加药, 设空白对照组用于调零, 药物浓度组为分别为 5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L、40 μmol/L、60 μmol/L、80 μmol/L, 每组重复 3 孔, 培养箱中孵育 48h。各孔加入 MTT (5mg/ml) 20 μl, 继续孵育 4h, 弃上清, 加入 150 μl DMSO, 震荡 15min

待 Formazan 结晶充分溶解后使用酶标仪在 570nm 处测定吸光值 (A)。每个检测点取 3 个平行孔的平均值, 实验重复 3 次, 计算 IC₅₀ 值。细胞存活率 % = (加药组细胞 A 值 - 本底 A 值) / (对照组细胞 A 值 - 本底 A 值) × 100%。(3) 细胞凋亡形态的变化: 取正常对照组和各药物浓度组的细胞, 吸尽培养液, PBS 洗涤, 加入 4% 多聚甲醛 0.5ml 固定细胞 10min, 去固定液, 用 PBS 洗涤 3 次后加入 DNA 特异性荧光染料 Hoechst 33342 (10 μg/ml) 37℃ 避光染色 15min, 吸去染色液, PBS 洗涤除去过多的染色背景, 荧光显微镜下观察, 激发波长为 350nm, 发射波长为 460nm, 细胞核呈致密浓染或呈碎块状致密浓染, 为凋亡阳性细胞。(4) Western blotting 法检测 PARP 的表达: 收集各组细胞并提取蛋白, 测蛋白浓度并定量, 上样前将蛋白质煮沸 5min, 每孔 30 μg 上样, 进行 SDS-PAGE 电泳, 以半干转法转移至 PVDF 膜上。常规方法孵育一抗和二抗, 以预染分子量标准确定目的蛋白的条带位置, ECL plus 超敏免疫印迹法检测蛋白表达, 化学发光成像系统 ChemiImager 5500 捕获图像, 以 β-actin 为内参。(5) Annexin V-FITC/PI 双染结合流式细胞仪检测细胞的凋亡率: 胰酶消化收集正常对照组和各药物浓度组的细胞, 将待测细胞的浓度调整为 5 × 10⁵ ~ 1 × 10⁶ cells/ml; 取 1ml 细胞悬液, 1000r/min, 4℃ 离心 10min, 弃上清; 加入 1ml 冷 PBS, 轻轻振荡使细胞悬浮; 1000r/min, 4℃ 离心 10min, 弃上清, 重复此步骤两次; 将细胞重悬于 500 μl binding buffer, 加入 10 μl Annexin V-FITC/PI, 轻轻摇匀, 室温反应 1h; 加入 5 μl PI 轻轻摇匀, 室温反应 15min; 细胞经 200 目尼龙网过滤后, 在流式细胞检测仪上进行检测, 采集荧光强度并用自带软件 FACSscan 进行数据处理。

3. 统计学处理: 应用 SPSS13.0 统计软件处理, 所有结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用完全随机设计方差分析 (ANOVA), 两组间比较采用 Student's t 检验, P < 0.05 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 云南霉素抑制 HepG₂ 细胞的增殖: MTT 法测定结果表明云南霉素对 HepG₂ 细胞的增殖有明显的抑制作用, IC₅₀ 值为 24.13 μmol/L, 生长抑制曲线如图 1。

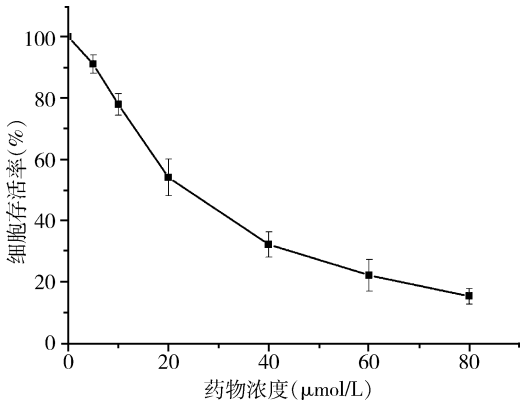


图 1 云南霉素对 HepG₂ 细胞的生长抑制曲线

2. 云南霉素使 HepG₂ 细胞核形态发生改变:经不同浓度的云南霉素 20μmol/L、40μmol/L、80μmol/L 处理 48h 后,用 Hoechst 33342 染色后在荧光显微镜下观察,可见正常对照组细胞核均匀着色,而药物处理组细胞产生典型的凋亡形态改变,细胞核致密浓染,染色质高度凝集产生凋亡小体,或者细胞核裂解为碎块,呈碎片状等多种形态学的变化,并且凋亡细胞的数目随着药物浓度的增加而增多(图 2)。

3. 云南霉素影响 HepG₂ 细胞凋亡蛋白 PARP 表达: HepG₂ 细胞经不同浓度的云南霉素 20μmol/L、40μmol/L、80μmol/L 处理 24h 后,使用 Western blotting

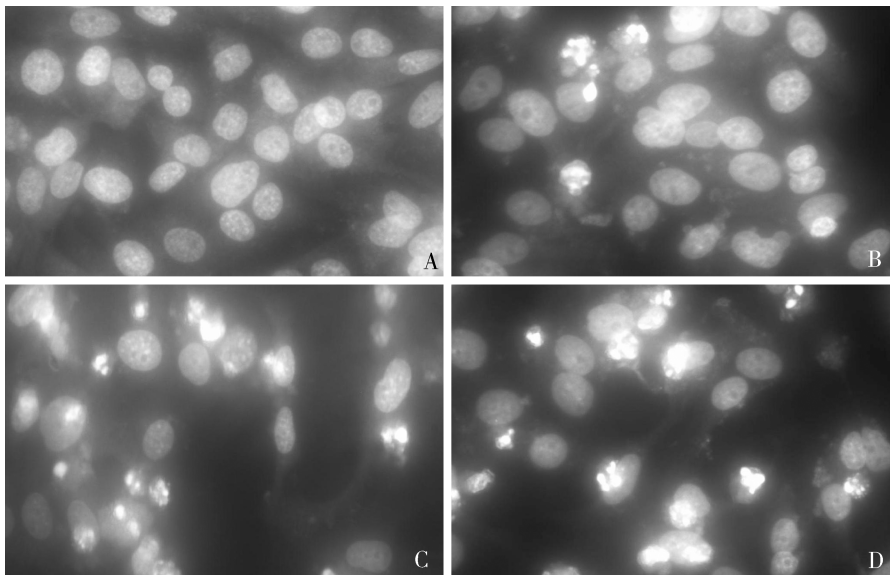


图 2 对照组和不同药物浓度组的 Hoechst 33342 染色结果 (×400)
A. 对照组; B. 20μmol/L; C. 40μmol/L; D. 80μmol/L

法测定了对于凋亡标志蛋白 PARP 表达的影响。结果从图 3 中可以看出云南霉素可浓度依赖性诱导 PARP 的切割,启动凋亡通路,导致细胞凋亡。

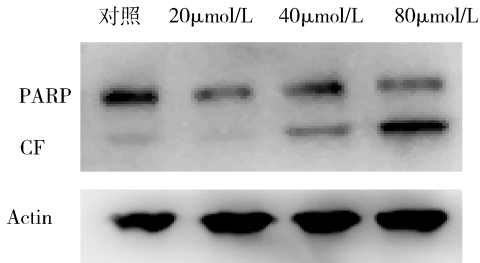


图 3 Western blotting 法检测对照组和不同药物浓度组 PARP 的表达

4. 云南霉素可诱导 HepG₂ 细胞凋亡:活细胞经过 Annexin V - FITC /PI 染色后,利用流式细胞仪可

得到早期凋亡、中晚期凋亡、坏死和活细胞百分率。不同浓度云南霉素作用 HepG₂ 细胞 48h 后,细胞凋亡率随浓度增加而升高。20μmol/L、40μmol/L、80μmol/L 云南霉素作用于 HepG₂ 细胞凋亡率分别为 12.52% ± 0.69%、17.05% ± 1.05%、34.14% ± 2.01%,显著高于对照组的 6.50% ± 0.40% (图 4、图 5)。

讨 论

当前临床上常规使用的多数抗肿瘤药物都可以通过诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡来抑制肿瘤生长。前期研究证明云南霉素可诱导多种肿瘤细胞发生细胞周期阻滞,还可抑制 KB 细胞 DNA 和蛋白质的合成,但是对 RNA 合成无影响^[6]。将云南霉素与抗黏附肽 RGD 相偶联,可增强 RGD 肽的细胞毒作用,而本实验主要研究云南霉素诱导癌细胞凋亡的作用^[7]。

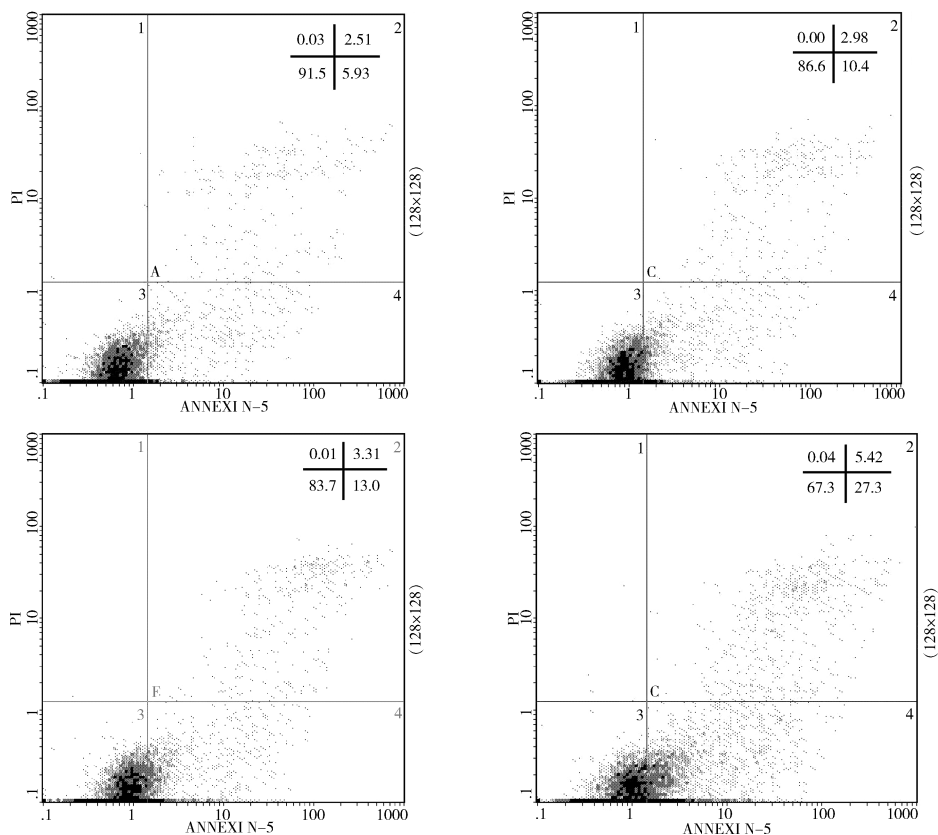


图 4 经 Annexin V - FITC/PI 双染结合流式细胞仪检测对照组和不同药物浓度组的细胞凋亡率

A. 对照组; B. 20 $\mu\text{mol/L}$; C. 40 $\mu\text{mol/L}$; D. 80 $\mu\text{mol/L}$

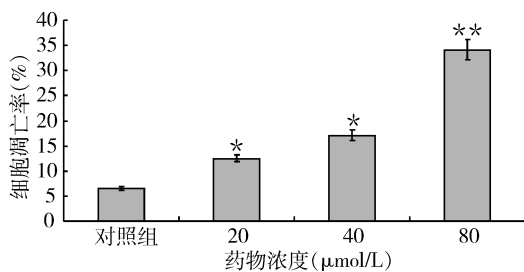


图 5 将 Annexin V - FITC/PI 双染结合流式细胞仪检测凋亡结果

实验结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, * $P < 0.05$ 与对照组比较, ** $P < 0.01$ 与对照组比较

MTT 结果表明, 云南霉素能抑制人肝癌 HepG₂ 细胞的增殖, 呈剂量依赖性; Hoechst 33342 染色观察结果显示, 经云南霉素作用的 HepG₂ 细胞核致密浓染, 或者细胞核裂解为碎块, 呈碎片状等多种形态的变化, 且随药物浓度增加, 发生细胞核形态改变的细胞明显增多, 表明云南霉素具有诱导 HepG₂ 细胞凋亡的作用。

多聚 ADP 核糖聚合酶 (PARP) 是细胞凋亡中由 caspase - 3 降解的 DNA 修复酶。在细胞凋亡早期

PARP 被切割降解而丧失其 DNA 修复功能, 促进细胞凋亡的发生, PARP 剪切通常被认为是细胞凋亡的一个重要指标。Western blotting 结果表明云南霉素可浓度依赖性诱导 PARP 的切割, 从而诱导 HepG₂ 细胞凋亡, 而 Annexin V - FITC/PI 双染结合流式细胞仪检测结果更进一步证明云南霉素可诱导 HepG₂ 细胞发生凋亡。

目前临床上使用的核苷类抗肿瘤药物较多如阿糖胞苷、卡培拉滨、吉西他滨等等, 这些药物均具有核苷和糖环结构。吉西他滨通过线粒体途径释放细胞色素 C, 后者与凋亡酶激活因子 - 1 (apoptotic protease activating factor 1, APAF1) 结合活化 caspase 介导肿瘤细胞凋亡^[8], 吉西他滨与酪氨酸激酶抑制剂厄洛替尼 (erlotinib) 联用通过抑制 Akt 和 NF - κ B 对肿瘤细胞的凋亡有促进作用^[9]。卡培他滨可通过 Fas/FasL 通路启动 caspase 的级联反应来诱导肿瘤细胞凋亡, 卡培他滨与组蛋白去乙酰化酶抑制剂 vorinostat 联用还可以上调胸苷磷酸化酶的表达, 此酶是将卡培他滨转化为氟尿嘧啶的关键酶, 从而导致肿瘤细胞凋亡^[10,11]。本文中的云南霉素也可以通过参与细胞凋

亡而发挥抗肿瘤作用,这些结构类似的抗癌药物可以用诱导凋亡来评价其抗肿瘤作用。

现有的实验研究表明云南霉素可通过引起细胞周期阻滞和诱导细胞凋亡来完成在体内外杀伤肿瘤细胞的作用,而其诱导肿瘤细胞凋亡的具体机制还需要做进一步研究,从而为云南霉素能应用于肿瘤治疗提供理论基础。

参考文献

- 1 胡继兰,李月英,张春颖,等. 新的抗肿瘤抗生素云南霉素 I 抗菌生物活性及产生菌的生物学[J]. 中国抗生素杂志,1998, 23(1): 100-103
- 2 陈文君,戚长菁,潘俊. 新的抗肿瘤抗生素云南霉素 II 提纯、理化性质与鉴别[J]. 中国抗生素杂志,1998,23(1):170-174
- 3 甄永苏,薛玉川,吴淑英,等. 新抗肿瘤抗生素云南霉素 III 抗肿瘤作用[J]. 中国抗生素杂志,1998,23(4):274-277
- 4 童彤,郭素萍,白瑾峰,等. 抗肿瘤抗生素云南霉素对细胞周期的作用及分子机理[J]. 癌症,2000,19(4):289-292
- 5 童彤,郭素平,韩迺珺. 阿糖胞苷及云南霉素的细胞周期阻滞作用

- 研究[J]. 中华肿瘤防治杂志,2006,13(20):1525-1529
- 6 ZhenYS, Qi CQ, Hu JL, *et al.* Antitumor activity of yunnanmycin, A novel pyrimidine nucleoside antibiotic[J]. Adv Exp Med Biol,1998, 431:575-579
- 7 郑艳波,许先栋,黄云虹,等. 云南霉素-RGD 二甲酯偶联物的合成及其抗肿瘤细胞侵袭活性[J]. 中国抗生素杂志,2009,34(2): 83-86
- 8 Christgen M, Schniewind B, Jueschke A, *et al.* Gemcitabine-mediated apoptosis is associated with increased CD95 surface expression but is not inhibited by DN-FADD in Colo357 pancreatic cancer cells[J]. Cancer Lett, 2005, 227(2):193-200
- 9 Arlt A, Muerkoster SS, Schäfer H. Targeting apoptosis pathways in pancreatic cancer[J]. Cancer Lett, 2010, 11:13
- 10 Ciccolini J, Fina F, Bezulier K, *et al.* Transmission of apoptosis in human colorectal tumor cells exposed to capecitabine, Xeloda, is mediated via Fas[J]. Mol Cancer Ther, 2002, 1(11):923-927
- 11 Di Gennaro E, Piro G, Chianese MI, *et al.* Vorinostat synergises with capecitabine through upregulation of thymidine phosphorylase[J]. Br J Cancer, 2010, 103(11):1680-1691

(收稿:2010-12-23)

中国汉族人群 CYP2C9 常见多态性位点的检测及其与国外其他人群的比较研究

徐仁爱 戴大鹏 胡利明 杨莉萍 胡国新 蔡剑平

摘要 **目的** 检测中国汉族人群细胞色素 P450 2C9 (CYP2C9) 常见多态性位点的等位基因,为药物基因组学研究提供理论依据。**方法** 用聚合酶链反应产物直接测序和基因克隆测序法对 2127 例中国汉族人群 CYP2C9 基因常见多态性位点 CYP2C9 * 1、CYP2C9 * 2 和 CYP2C9 * 3 等位基因进行检测,明确其在中国汉族人群中的等位基因及基因型频率分布,并与国外不同人群基因多态性进行比较研究。**结果** 中国汉族人群 CYP2C9 基因常见等位基因 CYP2C9 * 1、CYP2C9 * 2 和 CYP2C9 * 3 的等位基因频率分别为 96.94%、0.14%、2.92%,常见基因型 CYP2C9 * 1/* 1、CYP2C9 * 1/* 2、CYP2C9 * 1/* 3、CYP2C9 * 3/* 3 的基因型频率分别为 94.12%、0.28%、5.36%、0.24%。**结论** 中国汉族人群 CYP2C9 基因中以 CYP2C9 * 1 等位基因为最常见,CYP2C9 * 2 和 CYP2C9 * 3 是中国汉族人群罕见等位基因;中国人群 CYP2C9 基因的等位基因频率与日本人群相近,与法国、西班牙和意大利等欧洲人群差异有统计学意义,该研究结果将为我国的临床药物基因组学研究提供有价值的理论依据。

关键词 CYP2C9 基因多态性 基因分型

Polymorphism Analysis of CYP2C9 Common Alleles in Han Chinese. Xu Renai, Dai Dapeng, Hu Limin, Yang Liping, Cai Jianping. Department of Pharmacology, Wenzhou Medical College, Zhejiang 325035 China

Abstract Objective To investigate the genetic polymorphism of CYP2C9 in Han Chinese population and compare the distribution profile of CYP2C9 polymorphism with that of other races. **Methods** PCR combined with DNA sequencing method was used to analyze the sequences of CYP2C9 in 2127 healthy people from Han population in China. **Results** The allele frequencies of CYP2C9 * 1, CYP2C9 * 2

基金项目:科技部重大新药创制心脑血管疾病新药临床评价技术平台研究(2008ZX09312-005)

作者单位:325035 温州医学院药学院药理教研室(徐仁爱、胡利明、胡国新);100730 卫生部北京医院/卫生部北京老年医学研究所/卫生部老年医学重点实验室(戴大鹏、蔡剑平);100730 卫生部北京医院药学部(杨莉萍)

通讯作者:蔡剑平,电子信箱:caijp61@vip.sina.com