2个锌指结构,为结合DNA所必需。Kacena和Muntean等[11,12]研究表明GATA-1主要作用于巨核细胞发育的早中期阶段,在巨核细胞细胞质成熟和产生颗粒方面起着重要的调节作用。在本实验中我们发现,rTMP-GH可以显著上调Dami细胞中GATA-1蛋白水平的表达,而RT-PCR结果则证实rTMP-GH主要是通过促进GATA-1的转录生成来上调其表达。rTMP-GH对GATA-1的显著上调作用进一步表明该重组融合蛋白具有促进巨核细胞分化、成熟和血小板生成的作用。

总之,通过本实验初步证实,我室自行研制的重组融合蛋白rTMP-GH具有显著促进巨核细胞增殖、分化和血小板生成的作用,值得进一步研发和进行体内动物实验研究。

参考文献:

[1] Deutsch V R, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production[J]. Br J Haematol, 2006, 134(5): 453-466.

[2] Nakamura T, Miyakawa Y, Miyamura A, *et al*. A novel nonpeptidyl human c-Mpl activator stimulates human megakaryopoiesis and thrombopoiesis[J]. Blood, 2006, 107(11): 4300-4307.

[3] Cwirla S E, Balasubramanian P, Duffin D J, *et al*. Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine[J]. Science, 1997, 276(5319): 1696-1699.

[4] 邵 波, 艾国平, 王军平, 等. 新型升血小板因子静脉注射在小鼠体内的靶向性实验研究[J]. 重庆医学, 2006, 35(18): 1679-1680.

[5] Li J, Yang C, Xia Y, *et al*. Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin[J]. Blood, 2001, 98(12): 3241-3248.

[6] Bussel J B, Kuter D J, George J N, *et al*. AMG 531, a thrombopoiesis-stimulating protein, for chronic ITP[J]. N Engl J Med, 2006, 335(16): 1672-1681.

[7] Hanley M B, Napolitano L A, Mccune J M. Growth hormone-induced stimulation of multilineage human hematopoiesis[J]. Stem Cells, 2005, 23(8): 1170-1179.

[8] Carlo-Stella C, Di-Nicola M, Milani R, *et al*. Age- and irradiation-associated loss of bone marrow hematopoietic function in mice is reversed by recombinant human growth hormone[J]. Exp Hematol, 2004, 32(2): 171-178.

[9] Briquet-Laugier V, El-Golli N, Nurden P, *et al*. Thrombopoietin-induced Dami cells as a model for alpha-granule biogenesis[J]. Platelets, 2004, 15(6): 341-354.

[10] Balduini C, Pecci A, Loffredo G, *et al*. Effects of the R216Q mutation of GATA-1 on erythropoiesis and megakaryocytopoiesis[J]. Thromb Haemost, 2004, 91(1): 129-140.

[11] Kacena M A, Gundberg C M, Horowitz M C. A reciprocal regulatory interaction between megakaryocytes, bone cells, and hematopoietic stem cells[J]. Bone, 2006, 39(5): 978-984.

[12] Muntean A G, Crispino J D. Differential requirements for the activation domain and FOG-interaction surface of GATA-1 in megakaryocyte gene expression and development[J]. Blood, 2005, 106(4): 1223-1231.

(编辑 邓强庭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)01-0004-01

昆布多糖硫酸酯抑制结肠癌细胞增殖

邓学萍 (重庆市渝北区第二人民医院防疫保健科,重庆 401147)

现行用于治疗结肠癌的化疗药物都存在一定的缺陷,昆布多糖硫酸酯(laminarin sulphate,LAMS)是一具有多种生物功能的多糖酯[1]。现报告LAMS对抑制体外培养人结肠癌细胞株(human colon carcinoma cell line, LOVO)细胞的增殖、诱导凋亡及有关基因表达的影响,为LAMS用于治疗结肠癌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

LOVO细胞购自上海细胞所。

1.2 实验药物

昆布多糖硫酸酯由重庆市普外科重点实验室参照文献[2]从海带提取制备,多糖酯含量30%。使用时用生理盐水稀释成32 μg/ml(使结肠癌细胞IC_{50}的平均浓度),0.22 μl孔径滤器过滤。

1.3 主要试剂

TUNEL(POD)试剂盒产自德国Boehtinger Mannheim公司,Bcl-2抗体、发光试剂盒均产自美国Santa Craze公司。

1.4 主要仪器

垂直电泳仪,CO_2培养箱,电转仪,图像分析系统。

1.5 LAMS对LOVO细胞增殖抑制试验

取对数生长期LOVO细胞(一式三份),以含新生牛血清的1640培养液稀释成1×10^5/ml,置96孔培养板每孔200 μl。37 ℃、5% CO_2培养12 h。实验孔分别加LAMS 5 μl、10 μl、20 μl,一式三份。继续培养12 h,加5 mg/ml MTT液20 μl,继续培养4 h。小心吸弃上清液200 μl,加二甲亚砜200 μl,震荡5 min,600 nm测吸光度值。对照孔不加LAMS,其余同实验孔。

(下转14页)

作者简介 邓学萍,女,重庆市人,主管护师,主要从事医疗卫生防疫管理方面的研究。电话:(023)86889197

收稿日期 2007-05-24 修回日期 2007-08-10

参考文献：

[1] Levashina E A. Immune responses in Anopheles gambiae[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2004, 34(7):673 – 678.

[2] Gorman M J, Paskewitz S M. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2001, 31(3):257 – 262.

[3] Mulinari S, Hacker U, Castillejo-Lopez C. Expression and regulation of Spatzle-processing enzyme in Drosophila[J]. FEBS Lett, 2006, 580(22):5406 – 5410.

[4] Jiang H, Wang Y, Yu X Q, *et al*. Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from Manduca sexta hemolymph: a clip-domain serine proteinase regulated by serpin-1J and serine proteinase homologs[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2003, 33(10):1049 – 1060.

[5] 徐文岳,黄复生,夏莉莎,等. 大劣按蚊丝氨酸蛋白酶 cDNA 克隆和表达[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(2):92 – 95.

[6] Perona J J, Craik C S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases[J]. Protein Sci, 1995, 4(3):337 – 360.

[7] Kosovsky J, Durmanova V, Kudelova M, *et al*. A simple procedure for expression and purification of selected non-structural (alpha and beta) herpes simplex virus 1 (HSV-1) proteins[J]. J Virol Methods, 2001, 92(2):121 – 129.

[8] Cerenius L, Soderhall K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates[J]. Immunol Rev, 2004, 198:116 – 126.

[9] Royet J, Reichhart J M, Hoffmann J A. Sensing and signaling during infection in Drosophila[J]. Curr Opin Immunol, 2005, 17(1):11 – 17.

[10] Kambris Z, Brun S, Jang I H, *et al*. Drosophila immunity: a large-scale in vivo RNAi screen identifies five serine proteases required for Toll activation[J]. Curr Biol, 2006, 16(8):808 – 813.

[11] Jiang H, Wang Y, Korochkina S E, *et al*. Molecular cloning of cDNAs for two pro-phenol oxidase subunits from the malaria vector, Anopheles gambiae[J]. Insect Biochem Mol Biol, 1997, 27(7):693 – 699.

[12] 徐文岳, 黄复生, 况明书, 等. 约氏疟原虫卵囊黑化期间大劣按蚊血淋巴蛋白的分析[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(9):1098 – 1100.

(编辑 薛国文)

(上接4页)

1.6 LAMS 对 LOVO 细胞 Bcl-2 基因蛋白影响

分别取增殖抑制试验实验组与对照组细胞,按常规提取全细胞蛋白,将蛋白浓度均调整为 3 mg/ml,经变性电泳、免疫印迹、化学发光法显示 Bcl-2 基因蛋白表达程度、经图像分析系统测采集、分析结果。

1.7 凋亡细胞测定

将 1×10^5/ml 浓度的 LOVO 细胞(一式三份),接种于内置盖玻片的六孔培养板,分别按细胞增殖抑制试验处理后,37 ℃、5% CO_2 条件下培养 12 h,取出盖玻片按 TUNEL(POD)试剂盒说明书进行细胞固定、显色、封片。光镜 400 倍放大下计数细胞核呈棕黄色的细胞比例。

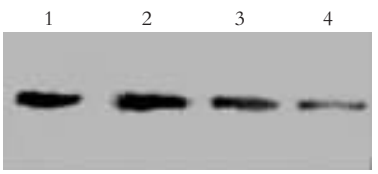
2 结果

2.1 LAMS 对 LOVO 细胞增殖的抑制程度

对照孔 D(600)值为(0.81 ± 0.12),加 3 μl LAMS 孔为(0.63 ± 0.08)低于对照孔($P<0.05$);加6、9 μl LAMS 孔的分别为(0.41 ± 0.09)、(0.18 ± 0.08),低于对照孔($P<0.01$)。

2.2 LAMS 对 LOVO 细胞 Bcl-2 基因蛋白的影响

加3、6、9 μl 的孔的积分光密度分别为 2 919、2 261、1 384,显著低于对照孔的 5 978($P<0.01$),见图 1。



1:对照孔;2:3 μl LAMS;3:6 μl LAMS;4:9 μl LAMS

图1 蛋白印记观察 LAMS 对 LOVO 细胞增殖的抑制程度

2.3 LAMS 促使 LOVO 细胞凋亡的效果

对照孔中棕黄色细胞比例为 5%,加入 LAMS 3 μl 后为 20%,高于对照组($P<0.05$)。加入 LAMS 6、9 μl 后,分别为 31%、59%,皆高于对照孔($P<0.01$)。

3 讨论

LAMS 是一具有多种生物功能的多糖酯。文献[3]报道体内、外实验证实 LAMS 具有抑制肿瘤细胞增殖的作用,但其分子机制少见报道。作者在不同剂量 LAMS 造成的 LOVO 细胞增殖抑制状态下,检测凋亡细胞数量变化,Bcl-2 基因蛋白含量变化。Bcl-2 是抗凋亡基因,且与肿瘤的发展密切相关[4]。它通过其转录翻译产物 Bcl-2 蛋白,参与细胞内抗氧化作用和抑制钙离子跨膜运动而调控细胞凋亡。它的表达增强或减少是影响肿瘤细胞凋亡和增殖状态的重要因素之一。本实验显示 LAMS 可导致 LOVO 细胞 Bcl-2 基因蛋白表达减少,减少程度随 LAMS 剂量的增加而加大,与此同时 LOVO 细胞株增殖受抑制的程度加大,凋亡细胞数量增加。说明 LAMS 抑制该 LOVO 细胞增殖、促进凋亡与降低 Bcl-2 基因蛋白有关。

关键词:昆布多糖硫酸酯 结肠癌细胞 增殖
中图法分类号:R73-361 文献标识码:B

参考文献：

[1] 邱莲女, 周永列. Bcl-2 与肿瘤关系的研究进展[J] 国外医学:临床生物化学与检验学分册, 2000, 21(4):196 – 199.

[2] 范曼芳,陈琼华. 褐藻淀粉和褐藻淀粉硫酸酯的制取、分析及生物活性比较[J]. 中国药科大学学报, 1988, 19(1):30 – 34.

[3] Hoffman R, Paper D H, Donaldson J, *et al*. Inhibition of angiogenesis and murine tumour growth by laminarin sulphate[J]. Br J Cancer, 1996, 73(10):1183 – 1186.

[4] Baretton G B, Diebold J, Christoforis G, *et al*. Apoptosis and immunohistochemical Bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance[J]. Cancer, 1996, 77(2):255 – 264.

(编辑 邓强庭)