

# 目 录

## 会议通知

中国药理学会第十一次全国学术大会第一轮通知 .....	中国药理学会	(1)
2011 医学科学前沿暨第四届分子靶向药物研究与应用研讨会		
第一轮会议通知 .....	中国工程院医药卫生学部	(4)
第三届定量药理学与新药评价国际会议通知 .....	中国药理学会数学药理专业委员会	(6)
第十三届中国科协年会生物医药博士论坛 .....	中国药理学会	(9)
中国工程科技论坛“实验动物与生命科学研究”第一轮通知 .....	中国工程院	(10)

## 全国第十二届生化与分子药理学学术会议摘要

### 大会报告

Translating Science into More Effective and Safer Therapies .....	Bob Powell	(11)
神经退行性疾病生物标志物研究 .....	王晓良	(12)
抗肿瘤药物研究新进展 .....	陈晓光	(12)
脂肪肉瘤分化与复发的机理及其治疗药的初步研究 .....	徐强 王璐 沈燕	(13)
阻止 PD 病理进程的治疗新策略 .....	胡刚	(14)
碘化 N-正丁基氟哌啶醇抗心肌缺血再灌注损伤的作用及其 分子机制的研究 .....	石刚刚	(15)
从分子到药物—纳米技术的作用 .....	曾文峰 张发云 张春玲等	(16)
EFADchip <sup>®</sup> 系统：简单易用的临床分子药理学研究平台 .....	于常海 汤浩	(17)
The current status of early stage clinical trials: approaches in research sites .....	Pei Hu	(17)
外源物（药物）所致胎儿发育毒性及机制的研究进展 .....	汪晖	(18)
抗菌增敏药物在逆转大肠埃希菌耐药性中的作用及其作用机制 .....	周红	(19)
新疆维吾尔族、哈萨克族正常糖耐量人群和 2 型糖尿病人群 肠道菌群中直肠真杆菌与多形拟杆菌的定量研究 .....	刘晶 王烨 刘金宝等	(19)

## 青年优秀论文

- RNA-interference-mediated downregulation of Pin1 results insuppressed tumorigenicityofmalignantmelanomaA375cells ..... Jing Jin, Xiaoguang Chen (20)
- CYP $\omega$ -羟化酶/20-HETE 通过上调 VEGF 和 MMP-9 表达促进非小细胞肺癌血管生成和转移 ..... 余伟 杨静 (21)
- 胆碱拮抗剂 R2HBJJ 诱导非小细胞肺癌细胞 G0/G1 期阻滞并抑制细胞增殖 ..... 华南 郑建全 (21)
- 12-bp CpG ODN 通过 NO 途径增强人脑胶质瘤细胞 U87 放射增敏作用的研究 ..... 李小丽 周红 (22)
- Pharmacological and toxicological target organelles and safe use of single-walled carbon nanotubes as drug carriers in treating Alzheimer disease ..... Zhong Yang, Yingge Zhang (22)
- 何首乌二苯乙烯苷对神经突触的影响及作用机制研究 ..... 孙芳玲 李林 (23)
- 狂犬病毒糖蛋白衍生肽作为靶脑载体研究 ..... 王逸麟 付爱玲 (24)
- 2-( $\alpha$ -羟基戊基) 苯甲酸钾盐 (dl-PHPB) 抗血小板聚集作用及机制研究 ..... 杨宏艳 王晓良 (24)
- 人类和不同种属血脂紊乱动物模型脂蛋白谱的比较研究 ..... 杨柳 朱海波 (25)
- 碘化 N-正丁基氟哌啶醇对缺氧心肌细胞钙稳态的保护作用 ..... 肖剑锋 石刚刚 (26)
- 姜黄素通过诱导人内皮细胞产生自噬抗氧化应激损伤 ..... 韩婧 李学军 (26)
- 人 Toll 样受体 9 结合 CpG ODN 结构域的研究 ..... 潘夕春 郑江 (27)
- GK 和 PPAR $\gamma$  双靶点激动剂 SHP-14 抗糖尿病作用的研究 ..... 雷蕾 申竹芳 (27)
- 孕期咖啡因暴露所致子代 HPA 轴高应激敏感性增加高脂饮食下胰岛素抵抗发生的风险 ..... 张邴 汪晖 (28)
- 基因芯片结合整合基因网络筛选辐射损伤后恢复相关基因的研究 ..... 张晶 殷明 (29)
- 左氧氟沙星对家兔前交叉韧带细胞的细胞毒性作用 ..... 邓宇 陈廖斌 (30)

## 专题报告

### 一、抗肿瘤药理

GSTM1、GSTM3、GSTT1、GSTP1 基因多态性与蒙古族人群

肺癌易感性关系 .....	白图雅 常福厚 王敏杰等	(30)
CYP4A/20-HETE 在 Lewis 肺癌转移中的作用及其分子机制		
研究 .....	陈丽 赵海霞 余伟等	(31)
缺氧诱导因子-1 抑制剂的发现与抗肿瘤作用机制研究 .....	郎立伟 周晴 李燕等	(32)
注射卡介苗对荷瘤小鼠血清中免疫因子的影响.....	李超 张海婧 陈晓光	(33)
Function of Aurora kinase A in Taxol-resistant breast cancer and		
its correlation with P-gp .....	Yan Li, Ke Tang, Haijing Zhang et al.	(33)
新型 Hsp90 抑制剂 LD053 抗肿瘤作用及初步机制研究 .....	吕春婉 张翼 陈晓光	(34)
慢性髓系白血病对伊马替尼体外耐药的机制研究 .....	丁晓霜 袁霞 陈晓光	(35)
抗癌药物卡波霉素的体外抑瘤作用的初步研究.....	孙岚 张浩 张英鸽	(35)
鼠钙网蛋白单克隆抗体的制 .....	汪龚泽 刘朝奇	(36)
Bcl-2 家族在阿司匹林诱导宫颈癌 Caski 细胞凋亡中的作用.....	杨建林 韩钰 周永芹等	(37)
多胺类似物 BENS 联合阿司匹林有效抑制宫颈癌 Siha 细胞		
增殖 .....	杨建林 韩钰 张伟等	(37)
花生四烯酸代谢酶: 抗肿瘤微环境形成的新靶标 .....	杨静	(38)
骨架蛋白 IQGAP1 促进 Aurora-A 激酶蛋白稳定性.....	尹宁 樊飞跃 詹启敏	(39)
紫杉烷类化合物 Lx2-32c 对乳腺癌耐药细胞生长抑制作用的		
研究 .....	周晴 李燕 陈晓光	(39)
多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶 (PARP-1) 抑制剂筛选方法的		
建立及化合物筛选 .....	朱枝祥 金晶 陈晓光	(40)

## 二、神经药理

FLZ 通过激活 Akt/mTOR 信号通路和提高 RTP801 表达保护		
多巴胺能神经元 .....	鲍秀琦 孙华 张丹	(40)
多肽引导外源性蛋白质入脑转运的研究 .....	付爱玲	(41)
The disturbance of purinergic P2X7-FasL signaling		
participate in brain ischemia-induced neuronal		
death .....	Gengsheng Zhang, Rongrong Tao, Jiyun Huang et al.	(42)
补肾中药治疗阿尔茨海默病的作用机制研究 .....	李林	(43)

二苯乙烯苷对转 $\alpha$ -synuclein 蛋白基因细胞的影响 .....	李雅莉 张兰 李林	(43)
激动剂特异性调控 $\delta$ 阿片受体信号转导的机制 .....	刘景根	(44)
多种哺乳动物血浆中胆碱酯酶活性的比较研究 .....	任汝通 傅风华 李前	(45)
帕罗西汀抗抑郁作用与 BDNF、CRF、NET 和 5-HTT 表达 关系 .....	王涵 李娜 文威等	(45)
瑞波西汀抗抑郁作用与 HPA 轴、BDNF、NET 及 5-HTT 表达的关系 .....	李娜 王涵 文威等	(46)
Protective effect of Rolipram on memory impairments in rats injected with amyloid- (25-35) .....	Jiangping Xu, Chuang Wang, Yufang Cheng	(47)
APP 转基因小鼠脑内突触及相关蛋白的改变以及淫羊藿黄酮的 干预作用 .....	张兰 楚晋 李林	(48)
The role of peripheral anionic sites in the regulation of the spatial structure of acetylcholinesterase tetramer for high efficiency .....	Shuang Jiang, Xiaobo Wang, Ronggang Xi et al.	(49)
线粒体解耦联蛋白 2 介导硫化氢对帕金森病模型鼠的神经 保护作用 .....	鲁明 苏存锦 乔晨等	(50)
DJG108 对小鼠醋酸扭体的影响 .....	徐瑞明	(51)
TREK-1 双孔钾离子通道的门控机制研究 .....	马晓芸 华南 于金梅等	(51)
Kir6.2 构成的 K-ATP 通道在 LPS 诱导的肝胰损伤中的 保护作用 .....	杜仁红 王玲 丁建花等	(52)

### 三、心血管药理

巴戟多糖对分子搭桥中 TRPC6 通道及血管生成基因谱的影响 .....	冯国清 白洁	(52)
巴戟多糖对 ECV304 细胞增殖中细胞周期和 BKCa 通道的影响 ...	冯国清 陈徐旭	(53)
血管紧张素 II 对人脐静脉内皮细胞 RAMP1 表达和分布的 影响 .....	许俊 唐江琼 刘彦梅等	(54)
碘化 N-正丁基氟哌啶醇对缺氧大鼠心肌细胞钠钙交换体电流及 钙电流的影响 .....	黄勇攀 石刚刚	(54)
高糖诱导的血脑屏障损伤的分子基础和机制 .....	刘超	(55)

桑色素单硫酸酯钠盐对血栓形成的影响 .....	刘文 何太平 梁念慈	(56)
碘化 N-正丁基氟哌啶醇对缺血再灌注心肌细胞肌浆网钙泵的保护作用 .....	王春燕 石刚刚	(56)
碘化 N-正丁基氟哌啶醇对培养大鼠心肌细胞缺氧复氧损伤及蛋白激酶 C 活性的影响 .....	王锦芝 石刚刚	(57)
The effect of Resveratrol on Cell Apoptosis via SIRT1 .....	Weirong Wang, Rong Lin, Qinqin Lin et al.	(58)
CGRP 通过抑制 p38 MAPK /Nox4 通路对氧化应激损伤 HUVEC 的保护作用 .....	徐竞鸥 于潇华 刘彦梅等	(59)
全脑缺血再灌注大鼠皮层金属离子含量变化 .....	余丽娟 杨俊卿	(59)
新结构类型化合物调血脂分子药靶探究 .....	朱海波	(60)
新结构类型调血脂化合物与靶蛋白 AMPK 分子间相互作用初步解析 .....	李瑾 朱海波	(61)
探讨化合物 WS070117 调血脂靶点及相互作用机制 .....	连泽勤 朱海波	(62)
人源性细胞膜穿透肽的开发及应用 .....	柳长柏 马杰兰 张洁	(62)
物质粒子尺度与功能间的关系 .....	张英鸽	(63)

#### 四、抗炎免疫药理

Inhibition of acid-sensing ion channels by amiloride protects rat articular chondrocytes from acid-induced apoptosis through mitochondrial-mediated pathway .....	Chao Rong, Feihu Chen, Sheng Jiang et al.	(64)
bFGF 及相关细胞因子转染对人骨关节炎软骨细胞的作用 .....	陈彪 陈廖斌 秦俊等	(65)
糖皮质激素对 IL-13 刺激肺成纤维细胞的影响 .....	陈晓红 李怡然	(65)
脂质体转染 TRPM7 siRNA 对肝星状细胞系 HSC-T6 细胞增殖的影响 .....	贾丽莎 李俊 黄艳等	(66)
ASIC1a 过表达对佐剂性关节炎大鼠关节软骨细胞代谢的影响 .....	江晟 陈飞虎 荣超等	(67)
两种抗补体蛋白对脂多糖致急性肺损伤的保护作用研究 .....	李敏 沈良贤 张湘燕等	(67)
The effect of acute and chronic allergen challenge in a new mouse		

model of allergic asthma .....	Ren ping Liu, Aiming Meng, Qi Hou	(68)
香烟凝集物通过 SIRT1-FOXO3a 途径诱导 Beas-2b 细胞凋亡 .....	史记 孟爱民 侯琦	(69)
眼镜蛇毒 PIII 型金属蛋白酶 Atrase B 结构与功能研究 进展 .....	孙黔云 鲍娟 王彩娥等	(70)
脂多糖激活补体诱导内皮细胞释放粘附分子和凋亡 .....	孙黔云 沈良贤 李敏等	(71)
CYP $\omega$ -羟化酶抑制剂 HET0016 对 Cuprizone 诱导的 小鼠脱髓鞘作用的影响 .....	王慧娜 余伟 陈丽等	(71)
橙皮苷对非酒精性脂肪肝大鼠 COX-2 表达及活性的影响 .....	王雯 李俊 李荣等	(72)
M1 suppresses airway inflammation in a mouse model of asthma .....	Lingling Xuan, Qi Hou	(72)
淫羊藿黄酮对实验性自身免疫性脑脊髓炎大鼠的干预及机制研究 .....	尹琳琳 李林	(73)
内质网应激对博莱霉素诱导的大鼠肺纤维化的影响 .....	王亚丽 李俊 黄艳等	(73)
MeCP2 在大鼠肝纤维化过程中对 RASAL1 表达的调控作用 机制研究 .....	陶辉 李俊 黄成等	(74)
硝克柳胺对 TGF- $\beta$ 受体 II 的抑制作用研究 .....	张海婧 丁晓霜 周琬琪等	(75)
重组人白介素-2 舌下给药对甲苯-2, 4-二异氰酸酯 (TDI) 所致大鼠变应性鼻炎的药效学研究 .....	周琬琪 张海婧 张翼等	(75)
Protective effects of total triterpenoids of <i>Prunella Vulgaris</i> L. (TTP) against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats .....	Shengpeng Zhang, Jun Li, Cheng Hang et al.	(76)
TRPM7 对 TRAIL 诱导的大鼠肝星状细胞凋亡的影响 .....	刘红 李俊 黄成等	(76)
HIV-1 Nef expressed in THP-1 expand Treg cells of PBMC in vitro .....	Xiaolin Qi, Gongze Wang, Jiqin Nie et al.	(77)
白藜芦醇的类似物对流感病毒神经氨酸酶的抑制作用 .....	王琳 刘艾林 朴志松等	(78)
新型甲型 H1N1/季节性流感病毒神经氨酸酶抑制剂评价体系的建立 .....	张超 郭颖	(79)

## 五、抗糖尿病药理

中药复方 FF16 增加小鼠胰岛素敏感性作用的实验研究 .....	陈玲 田金英 张晓琳等	(79)
-----------------------------------	-------------	------

SGLT-2 抑制剂筛选细胞模型的建立及应用 .....	环奕 李林忆 刘景龙等	(80)
Genistein accelerates refractory wound healing by decreasing superoxide and FoxO1/iNOS in type 1 diabetes ...	Lu Tie, Jing Han, Yu An et al.	(80)

## 六、抗辐射损伤

复方丹参和盐酸川芎嗪促进辐射后脐静脉内皮细胞的增殖与 迁移作用机制的研究 .....	李怡然 陈晓红	(81)
造血干细胞辐射损伤机制研究 .....	孟爱民 张恒 李德冠	(82)
白藜芦醇对造血系统辐射损伤的防护作用 .....	张恒 翟志斌 王月英等	(83)
辐射对小鼠免疫系统损伤远期影响研究 .....	李德冠 王月英 路璐等	(84)

## 七、药物代谢

FB2 与大鼠和人肝微粒体 CYP450 同工酶的相互作用 .....	黄凯 扈金萍 盛莉等	(84)
CPRC-130 及其代谢物人血浆浓度与剂量关系研究 .....	刘明 王洪允 江骥等	(85)
抗焦虑药 AF5 在人体内的主要代谢产物 .....	杨芬 王洪允 江骥等	(86)
高效液相色谱法测定大鼠血浆中 5, 7, 3'-三乙酰橙皮素活性 代谢物橙皮素的浓度 .....	秦娣 李俊 李荣等	(86)
地西洋在体鼻腔吸收动力学及薄荷醇的促进作用 .....	张瑞涛	(87)

## 八、新技术方法

纳米活性炭对多烯紫杉醇的吸附与缓释功能的实验研究 .....	蔡要欣 张英鸽	(87)
CdSe 量子点在不同生理条件下中的分散分布 .....	鄂晓 张英鸽	(88)
纳米活性炭粒子跨膜转运方式及引起的生物学效应研究 .....	彭飞 张英鸽	(88)
APJ 受体的生物信息学分析 .....	黄浩 陆启轩 陈临溪等	(89)
激光光纤荧光光谱法对光敏剂福大赛因注射后不同时间在裸鼠 肿瘤及周围组织内含量分布的研究 .....	付招娣 刘红岩 程桂芳等	(90)
吡啶-2, 3-二酮的电化学方法测定 .....	倪倍倍 董希英 刘宝玫等	(90)
HPCE 测定野菊花中 9 种黄酮类化合物的含量 .....	吴婷妮 余长柱 李俊	(91)
应用定量 PCR 技术检测 HIV-1 逆转录环节的方法的建立 .....	杨颖 陈勅 郭颖	(91)

## 九、生殖毒理

- 吡咯西啶双烷生物碱所致的胎儿发育毒性研究 ..... 寇皓 郭喻 熊婕等 (92)
- 孕期咖啡因摄入所致 IUGR 胎鼠肝脏 IGF-1 基因的表达抑制及  
表观遗传修饰改变 ..... 刘瑾 徐丹 刘莲等 (93)
- 孕期尼古丁暴露所致成年雌性大鼠脂肪肝易感的宫内代谢编程  
机制 ..... 沈朗 平洁 吴勇等 (94)
- 海带多糖对铅中毒雄性小鼠生殖的影响 ..... 石振艳 毛小红 倪倍倍等 (95)

### 《中国药理通讯》编委会

**主 编：**李学军

**副主编：**李长龄 李卫东 薛 明

**顾 问：**张均田 林志彬 包定元 曾繁典 王永铭 库宝善 蔡志基 楼雅卿

**编 委：**(以下按姓氏笔划为序)

丁 健 王广基 王庆端 王昌恩 王晓良 王怀良 李卫东 李元建 李长龄  
李 林 李学军 李晓玉 李晓辉 李 锦 邓文龙 任雷鸣 刘克辛 刘昌孝  
刘俊田 杜冠华 陈乃宏 陈汝筑 陈 奇 陈建国 苏定冯 吴春福 吴曙光  
吴 镭 岳 旺 周文霞 周宏灏 金满文 杨宝峰 杨世杰 张永祥 张述禹  
张岫美 张永鹤 胡 刚 姚明辉 卿 晨 娄建石 耿美玉 莫 宁 梁建辉  
梅其柄 斯拉甫 谭焕然 缪朝玉 廖明阳 薛 明 魏尔清 魏 伟

**本期责任编辑：**程桂芳 潘 燕 李学军





## 中国药理学学会第十一次全国学术大会第一轮通知

中国药理学学会

为积极配合我国“重大新药创制”科技重大专项的实施，不断提高创新药物研发和临床合理用药的水平，及时交流我国药理学研究所取得的新成果和新经验、增进会员之间的交流与合作，经中国药理学学会第九届常务理事会讨论决定，于 2011 年 9 月 22—25 日在山东省济南市召开“中国药理学学会第十一次全国学术大会”。本次大会将为广大药理学工作者提供形式多样的学术交流平台，主要内容包括大会特邀报告、专题报告、青年英文学术报告、壁报展示、Workshop 及学术研讨等。会议将邀请国内外从事实验药理学和临床医学研究的专家以及国家卫生部、药品审评中心的领导和专家到会做学术报告。会议期间还将进行药理学研究相关仪器设备、药品试剂、图书杂志展销，为全国药理学工作者提供药理学信息服务。本次大会授予国家级医学继续教育学分 6 分。

欢迎中国药理学学会会员以及从事药理学科科研、教学、新药研发等工作的各界人员积极参会！

### 一、大会组织机构

主办机构：中国药理学学会

承办单位：山东大学药学院

协办单位：北京全路客专信息技术中心

大会主席：杜冠华 娄红祥

大会副主席：张永祥 李学军 刘昌孝 周宏灏 杨宝峰 苏定冯 张岫美 刘俊田

王 凤

大会秘书长：张永祥 王凤山

### 学术委员会

主 任：张永祥 李学军

委 员：(按拼音排序)

陈建国 陈乃宏 陈汝筑 邓文龙 丁 健 李 锦 李 林 廖明阳 梅其炳 缪朝玉

卿 晨 任雷鸣 吴春福 吴曙光 魏尔清 王广基 魏 伟 王庆端 王晓良 杨世杰

张永鹤 曾繁典 周文霞

### 组织委员会

主 任：张永祥 王凤山

委 员：(按拼音排序)

陈乃宏 暴洪军 刘新泳 刘燕平 穆 鑫 帅 翔 王 昕 徐 东 杨 亮 张永鹤

周文霞 赵小丹

二、会议时间：2011 年 9 月 23 日—9 月 25 日（9 月 22 日报到）

三、会议地点：山东省济南市南郊宾馆

四、大会主要内容

（一）特邀报告

大会将邀请国内外知名药理学家及卫生部、国家药品审评中心等机构有关专家做大会特邀报告。

（二）专题报告

大会将根据交流内容设置专题分会场，部分分会场将由专业委员会承办。专题报告人将采取大会邀请和从提交的论文摘要中遴选两种方式产生。请申请做专题报告的人员，在提交论文摘要时注明，大会学术委员会将根据提交会议论文的内容和先进性等情况遴选专题报告人。每个专题报告的报告时间暂定为 20 分钟。会议开展的专题报告拟分为：

1. 新药研发专题

主要内容包括新药研发的新理论、新技术及新方法，新药注册法规及技术审评等。

2. 精神神经药理专题

主要内容包括精神、神经药理学基础和临床研究的新成果，以及神经内科、神经外科、精神科、麻醉科等相关内容。本专题由中国药理学会神经药理专业委员会承办。

3. 心脑血管药理专题

主要内容包括心脑血管药理学研究的新理论和新成果，以及心脑血管系统药物研发和应用等有关药理学问题。

4. 抗肿瘤及免疫药理专题

主要内容包括抗肿瘤及免疫药物药理学研究的新理论和新成果，以及抗肿瘤、自身免疫病治疗等药理学问题。

5. 中药药理专题

主要内容包括中药复方、单味中药以及中药有效组分和成分研究的新成果，以及中药药理学研究的新思路、新技术和新方法等。

6. 临床治疗药物监测（TDM）专题

主要内容包括 TDM 的新思路、新技术和新方法，TDM 实验室标准化建设及工作规范研究，以及 TDM 工作开展与现行卫生政策的融合等。本专题由中国药理学会治疗药物监测研究专业委员会承办。

7. 临床药理专题

主要内容包括临床药动学、临床疗效评价、疾病药物治疗学和合理用药，以及基于临床药理学原理的新药发现与开发、新药临床研究等。本专题由中国药理学会临床药理专业委员会承办。

8. 中国药理学会——香港药理学会双边学术交流专题

本专题由中国药理学会——香港药理学会联合举办，会议语言为英语。本专题报告人将分别由中、港药理学会分别推荐 1—3 位专家，其他报告人均为来自大陆和香港的优秀青年药理学者。报告人选将从中国大陆和香港青年药理学者提交的论文摘要中遴选，会议期间将进行“优秀青年英文报告奖”评选，并在大会闭幕会上对获奖者予以表彰奖励。拟参加本专题报告的青年药理学者应符合以下条件：是中国药理学会或香港药理学会会员，年龄 35 岁以下（1976 年 7 月 1 日以后出生）。注意论文摘要须用英文撰写，格式同中文摘要（见实例），并在摘要左上角注明“参加中港专题及优秀论文评选”字样。欢迎广大青年药理学者积极参与。

## 9. 其它专题

大会将根据收到的论文摘要情况设置。

### （三）壁报交流

其它参会人员将参加壁报交流，壁报规格为 1.2m 长×0.9m 宽。大会将设置“优秀壁报奖”，设立评奖委员会，从参加交流的壁报中评选获奖壁报，并在大会闭幕会上对获奖者予以表彰奖励。请参会代表认真准备壁报，并在壁报交流时间到壁报展示处进行讲解，并回答评奖委员会专家和其他参观人员的提问。

### （四）Workshop

本次大会拟设立以下三个 Workshop：

1. 药理学研究新技术新方法：内容主要包括基因组、蛋白质组、代谢组等各种“组学”技术、网络药理学、分子药理学、计算生物学、生物医学影像学等新技术和新方法。
2. 新药研发：内容主要包括靶标发现和确认、筛选模型建立、活性筛选，如高通量及高内涵筛选、早期安全性评价、早期药代动力学研究（ADME/T）及其它成药性研究的新策略、新思路、新技术和新方法等，以及新药临床前药效学研究的新思路、新模型、新技术和新方法等。
3. 新药注册：内容主要包括新药研究规范与技术、药品注册以及新药注册法规及技术评审等。

大会将邀请有关专家在相应 Workshop 做中心发言，然后进行研讨。此外从提交的论文摘要中遴选部分发言人。希望在 Workshop 发言者须提交论文摘要，并在摘要的左上角注明“参加×××Workshop 发言”字样，大会学术委员会将根据摘要内容遴选部分发言人，每位发言人的时间暂定为 10 分钟，使用 ppt。

### （五）大会奖项

大会评选和表彰奖项：大会期间将进行以下两个奖项的评选，并在大会闭幕式对获奖者进行表彰奖励：

1. “优秀青年英文报告奖”：由中国药理学会—香港药理学会双边学术交流专题开展，由评审委员会从参加报告的青年学者中，根据论文研究水平、英文表达及幻灯制作规范等方面进行综合评选产生。
2. “优秀壁报奖”：由评奖委员会从参加交流的壁报中，根据论文研究水平、制作规范、以及展示讲解和回答问题等情况评选产生。

大会期间表彰奖项：大会期间将举行以下两个奖项的颁奖仪式：

1. “第十五届中国药理学会—Servier 优秀青年药理工作者奖”和“2011 年度中国药理学会优秀青年药理学工作者奖”。

2. “中国药理学发展突出贡献奖”。将对年龄在 75 岁以上、为我国药理学事业和学会发展做出突出贡献的老一辈药理学专家进行表彰。

(六) 中国药理学会第九届理事会第四次全体会议

会议期间将召开中国药理学会第九届理事会第四次全体会议，重点讨论学会下一步的工作及学会换届有关事宜，请各位理事务必准时参加，不能参会的理事请提前通知大会秘书处。

(七) 大会展览

大会期间将举行药理学研究相关仪器设备、药品试剂、图书杂志展销，为全国药理学工作者提供学术交流平台 and 药理学信息服务。

(八) 会议征稿及论文摘要要求

会议征稿范围：本次会议为中国药理学会的学术年会，接受药理学以及相关学科的研究论文和综述性文章摘要。

参会论文摘要投稿截止日期：2011 年 8 月 31 日。参会论文通过中国药理学会网站 ([www.cnphars.org](http://www.cnphars.org)) 提交并注册，每人限投一篇。摘要格式请见网站信息。

(九) 注册方式

采用网上注册，请登陆中国药理学会网站 (<http://www.cnphars.org>) (点击《中国药理学会第十一次全国学术会议》注册。

中国药理学会办公室联系方式：

联系人：赵小丹 穆鑫 王昕

地 址：北京市宣武区先农坛街 1 号 中国药理学会办公室 邮 编：100050

电 话：010-63165211 电子信箱：[zhxd@imm.ac.cn](mailto:zhxd@imm.ac.cn)；[muxin@imm.ac.cn](mailto:muxin@imm.ac.cn)

网 址：<http://www.cnphars.org>

会议招商联系人：暴洪军 电 话：18610294517

## 2011 医学科学前沿暨第四届分子靶向药物研究与 应用研讨会第一轮会议通知

中国工程院医药卫生学部

中国医药生物技术协会单克隆抗体专业委员会

近年来，在转化医学框架下的分子靶向药物的研究研发与治疗应用研究已成为主流热点领域。随着功能基因组学与蛋白质组学的研究进展，将发现与确定越来越多新的与疾病相关的分子靶点，分子靶向药物正是与这一发展相适应的、具有高度特异性。为充分把握国际前沿进展动态，促进我国分子靶向新药研发、肿瘤分子标志物的发现以及肿瘤个体化治疗，加强基础与

临床的紧密结合。中国工程院医药卫生学部和医药生物技术协会单克隆抗体专业委员会决定于 2011 年 10 月 14~17 日在福州市举办“2011 医学科学前沿暨第四届分子靶向药物研究与应用研讨会”。

举办以“分子靶向药物研究与应用”为主题的医学科学前沿研讨会，在内容上将充分反映这一前沿领域的进展，有助于推动我国分子靶向药物研究与应用的发展。诚挚欢迎全国药学和临床药物治疗学界同仁踊跃投稿、积极报名。

### (一) 会议组织机构

#### 1. 大会主席团

主 席：甄永苏院士 陈元仲教授

主席团成员：(以拼音为序)

陈志南院士 陈元仲教授 陈晓春教授 丁 健院士 罗永章教授 詹启敏教授 沈倍奋院士  
王红阳院士 甄永苏院士 许建华教授

#### 2. 学术委员会：

主任委员：甄永苏院士 沈倍奋院士

委 员：(以拼音为序)

陈志南院士 陈元仲教授 陈 强教授 丁 健院士 冯奉仪教授 郭亚军教授  
黄华樑教授 蒋华良教授 梁米芳教授 罗永章教授 林 旭教授 马胜林教授  
邵荣光教授 沈倍奋院士 王军志教授 向军俭教授 谢良志教授 许建华教授  
甄永苏院士 杨治华教授

#### 3. 组织委员会

主 任：许建华

副主任：陈 强 林 频 何颖义

委 员：(以拼音为序)

陈 强 陈建济 陈燕凌 池 畔 何颖义 黄昌明 李冬梅 林 频 林小燕 吴丽贤  
许建华 徐本华 张胜华

### (二) 会议时间与地点

1. 会议时间：2011 年 10 月 14 日——17 日

2. 会议地点：福建省福州市西湖宾馆

#### 3. 报名方式

(1) 信函报名：请于 2011 年 9 月 20 日前将报名表寄至福建省福州市交通路 88 号，福建医科大学药学院吴丽贤收，邮编：350004。报名时间以寄出邮戳日期为准。

(2) 网上报名：请将报名表发送 E-mail 至 imb9@yahoo.cn。报名时间以电子邮件日期为准。

(3) 电话或传真报名：电话：0591-83830081 18259000966 传真：0591-83830081 联系人：吴丽贤

4. 网址: www.fjmu.edu.cn

### (三) 会议征文内容

针对会议 8 个专题提交论文摘要

1. 癌症与其他疾病相关分子靶点研究; 2. 抗体靶向药物; 3. 小分子靶向药物; 4. RNA 靶向药物; 5. 抗病毒分子靶向药物; 6. 治疗心脑血管疾病的靶向药物; 7. 治疗类风湿性关节炎的靶向药物; 8. 分子靶向药物的临床应用。

### (四) 征文方式

摘要要求: 提交 1000 字以内的摘要(含题目、作者单位、省市; 内容包括目的、方法、结果、结论)。请将摘要以电子邮件(E-mail)附件形式发至 imb9@yahoo.cn; 稿件截止日期: 2011 年 9 月 20 日前。

## 第三届定量药理学与新药评价国际会议通知

中国药理学会数学药理专业委员会

自从美国 FDA (2004 年) 提出了“基于模型的药物研发 (Model based drug development, MB-DD)”模式, 定量药理学在全球范围内成为一个热门学科, 新型定量药理学方法不断涌现, 学科广泛交叉。中国药理学会数学药理专业委员会分别于 2007 年和 2010 年在南京和厦门成功举办了两届“定量药理学与新药评价国际学术会议”(International Symposium of Quantitative Pharmacology in Drug Development and Regulation, ISQP), 吸引了国内外众多学者参加。为促进我国定量药理学的发展, 增进国内外交流, 第三届“定量药理学与新药评价”国际学术会议将于 2011 年 10 月底在上海举办。会议将邀请来自美国、欧洲、中国的药政当局、学术界和企业界等诸多知名专家学者参加, 本次会议将为国内外从事定量药理学与新药研究人员提供一个交流平台。

### 会议概况

参会人员: 从事药物研发和管理的行政部门、科研院所、制药企业、药物临床研究机构、CRO 等相关人员; 新药研发、临床药理学、临床药学、生物统计、数据管理、临床医学等研究人员; 大专院校研究生。欢迎各厂商在会议期间进行医药分析软件、药物检测仪器、配件、实验材料展示, 也欢迎进行会议冠名等宣传活动。

会议形式: 会议届时将邀请国内外一流定量药理学专家、美国 FDA、中国 SFDA 和国内外同行知名专家作学术专题报告, 各专题由专家报告、实例介绍、问题研讨和软件演示组成, 内容强调实用性。会议还将结合专家报告内容进行专题培训(workshop)。

工作语言: 中文、英文。

会议规模: 500 人。

会议时间地点

报到地点: 上海(具体地址待定)

会议时间: 2011 年 10 月 27—30 日(27 日报到)

## 联系方式

电 话：021-51323006 021-51322556 传 真：021-51322750

联系人：李禄金（13816202716） 许羚（13764999215） 刘红霞（15921008232）

E-mail: drugChina@21cn.com

网 址：http://www.drugChina.net

地 址：201203 上海浦东区蔡伦路 1200 号 上海中医药大学 51 信箱

## 会议内容

### 一、定量药理学在新药研发中的应用

1. 基于模型的药物研发模式（概念、实施、范例）
2. 模型化与仿真技术在新药研发中的应用
3. 药动-药效结合分析在新药研发中的应用
4. 模型化与仿真技术在不同种族间桥接试验中的应用
5. 基于模型的 Meta-Analyses 在药物研发及审批中价值

### 二、药代动力学

1. 计算软件演示与介绍
2. 疑难数据计算与实例讨论
3. 比较药动力学的设计与分析方法
4. 内源物的药动力学计算
5. 多组分参数与合理用药指导
6. 缓控释制剂药动力学计算
7. 线性分析与非线性药动力学计算
8. 中药药动力学研究的若干问题
9. 群体药动力学与群体药效学设计、计算、实例、软件演示
10. 药动-药效结合模型分析与范例

### 三、生物等效性与耐受性分析

1. 高变异生物等效性试验与计算
2. 平均、个体、群体生物等效性计算
3. 生物等效性实例计算和软件演示
4. 耐受性试验设计、数据分析
5. 耐受性试验起始剂量与最大剂量计算
6. 静脉用药耐受性试验的多因素考察与设计（速度、浓度、剂量、用药时间合理选择）
7. 早期临床试验中药物对 QT 间期影响的定量评估

### 四、量效关系与时效关系

1. 量效关系试验设计
2. 临床试验剂量确定（dose-finding）的设计、计算、演示

3. 药物临床试验的安全性定量评价与后续试验的剂量选择

4. 时辰药理学数据计算

5. 时反应量效关系分析

五、临床试验设计与定量评价

1. 适应性设计在临床研究中的应用

2. 富集设计在临床研究中的应用

3. 常见药物相互作用分析方法与实验设计

4. 复方药物组方设计要点与难点讨论

5. 中药新型临床试验的设计、分析与探索

6. 高风险药物临床试验设计与风险最小化措施

六、药物临床评价的热点及难点讨论

1. 中国 I 临床试验现状与发展趋势

2. II—III 期新药临床统计分析定量评价中争议问题和国际对策

3. IV 期临床试验的设计与定量评价的关键问题

4. 临床试验期中分析方法、后续结果的模拟预测

5. 临床试验优劣效界值确定的一般考虑

6. 药物不良反应的监测及定量分析

七、临床试验数据管理

1. 计算机系统在药物临床试验中应用的国际指南介绍

2. 高级电子临床数据管理 (ECDM) 技术在临床药理学研究中的应用

3. 药物研发中研究数据的质量定量评价及其稽查

注册缴费

请直接在线注册 (<http://www.drugChina.net>), 也可下载报名表填写后以邮寄、传真或电子邮件发回。会议注册费标准: 国内普通代表 ¥1500 元/每人, 2011-9-30 前交纳可优惠 ¥200 元/每人, 学生代表减半。国外普通代表 \$450 元/每人, 学生代表 \$350 元/每人, 2011-9-30 前交纳可优惠 \$50 元/每人。学生代表报到时需提供有效学生证件。会议统一安排食宿, 费用自理 (食宿费现场支付)。注册费可通过邮局汇款和银行转账方式支付, 缴费时请务必注明“ISQP 会议”。

邮局汇款: 201203 上海浦东新区蔡伦路 1200 号 51 号信箱, 上海中医药大学药物临床研究中心

银行转账: 户名: 上海中医药大学

开户行: 工行东安路支行

账号: 1001 2391 0900 4636 961



## 第十三届中国科协年会生物医药博士论坛

中国药理学会

根据中国药理学会、天津药理学会和天津药学会近几年开办的多次博士论坛的经历和效果，根据中国工程院医药卫生学部刘昌孝院士和中国药理学会理事长杜冠华教授建议，在本届科协年会上开办生物医药博士论坛，突出青年科技工作者思想活跃特点，鼓励其创新热情，给予展示创新才能的机会，促进创新人才脱颖而出。论坛围绕生物医药发展中的重大问题和前沿问题、热点问题，用他们的研究成果、研究发现、产业化和国际化的事实，开展自由的学术讨论，推动我国生物医药的创新发展。该论坛对推动天津未来生物医药创新建设、产业战略和结构调整、产业链延伸、高端人才发展战略、科教兴市战略的决策具有重要意义。

主办方：中国药理学会 天津市药学会 天津市药理学会

协办方：天津医科大学 天津大学 南开大学 天津中医药大学 天津药物研究院

论坛组织

会议主席：刘昌孝（天津药物研究院，天津药学会和药理学会理事长）

杜冠华（中国医学科学院药物研究所，中国药理学会理事长）

会议副主席：王平保（天津药物研究院） 姜建石（天津医科大学） 高文远（天津大学）

白钢（南开大学） 何新（天津中医药大学）

会议时间地点和规模：2011 年 9 月 22 日在天津召开，会期一天，参会预计规模为 150 人。

会议形式：以博士研究报告为主，博士导师的前沿报告为辅，结合专家点评，会场互动。保证论坛质量，让与会报告者有收获，听会者能受益。

报告论文征集：报告题目由中国药理学会、天津市药学会天津市药理学会以网上征集、学会通知征集和特约推荐征集等方式，在全国范围内征集，征文终止时间为 7 月 20 日。（征文要求见下附件）

论文评选：2011 年 8 月 10 前由中国药理学会、天津市药学会天津市药理学会组织专家评选，选出大会报告人和题目，其中博士报告 9—12 人。并确定博士导师前沿报告 2—3 人。

论文出版：所有征集的入选论文出版在大会指定的论文集中。

会议报告：每人报告 25 分钟，点评讨论 5 分钟，博士导师前沿报告 3—4 人，每人报告 30 分钟。讨论互动 10 分钟。经过专家点评，选出优胜者 3—5 人，颁发“创新人才奖”证书和奖金，以资鼓励青年学者。

论坛工作组

会议联系人：杨燕 13920388579yaoxuehui1@163.com

胡仁杰 13299918138renjiehu@163.com

征文范围：选用博士在研相关课题或已经完成的相关课题为来源，证明是有送稿人完成的研究工作。

本次会议采用网上注册，请登录中国药理学会网站（<http://www.cnphars.org>）（点击《第十三届中国科协年会生物医药博士论坛》板块注册并提交论文。

## 中国工程科技论坛“实验动物与生命科学研究”第一轮通知

中国工程院

实验动物是生命科学研究的重要工具和支撑条件之一，在生命科学研究中起着非常重要的作用。由于我国实验动物科学起步较晚，总体滞后，适应不了生命科学迅猛发展的需要，亟需政府各相关部门领导，各领域的专家一起进行交流与探讨，齐心协力，共同将我国实验动物科学提高到一个新的水平。

由中国工程院夏咸柱院士发起，中国工程院主办的“中国工程科技论坛——实验动物与生命科学研究”将于 2011 年 10 月 18—19 日在北京举办，会期 2 天。论坛首次将国家科技部、卫生部 and 农业部等有关部门领导的专家、领导组织到一起，就实验动物与生命科学研究的主题进行交流和研讨。通过交流，促进各部门之间的相互了解，提高人们对实验动物科学重要性的认识。听取专家对发展我国实验动物科学提出的建议，形成我国今后 5—15 年发展的基本框架。论坛现在开始征文，具体事宜如下：

一、论坛主题：1. 实验动物与生命科学研究；2. 学科交叉、科学合作，学科发展，安全与健康

二、主办单位：中国工程院

三、承办单位：中国工程院农业学部

中国农村技术开发中心

军事医学科学院军事兽医研究所

中国医学科学院医学实验动物研究所

四、支持单位：科技部科研条件与财务司

卫生部科教司

中国实验动物学会

中国药理学会

中国毒理学会

五、时 间：2011 年 10 月 18—19 日

六、地 点：北京国谊宾馆（北京市西城区文兴东街 1 号）

七、征文要求：

1. 凡围绕论坛主题内容的文章均可投交。论文以我国实验动物宏观管理、科学管理为主要内容，包括如何提高我国实验动物科学的发展，发挥实验动物在生命科学研究领域以及保障人口健康、保障生物安全及社会安全的重要作用，如何促进实验动物与相关学科的交叉应用，相互促进，共同提高等与实验动物科学相关的科研论文。

2. 论坛召开时以《中国比较医学杂志》(专刊)形式出版论坛论文集。同时进行优秀论文评选,对获奖论文颁发中国工程院优秀论文证书。

3. 论文投交截止时间:2011年8月30日,具体格式参照《中国比较医学杂志》投稿格式,并注明是否同意在本刊公开发表,对所投论文《中国比较医学杂志》享有版权,特殊情况请事先说明。欢迎踊跃投稿。

#### 八、论坛费用:

参加本次论坛免收会议注册费,统一安排食宿,交通费、住宿费自理。

#### 九、联系方式:

1. 赵宏旭 中国实验动物学会(会务 参会)

北京市朝阳区潘家园南里5号(100021)

电 话:010-67781534 手 机:13611237432

传 真:010-67776816 电子信箱:zhaohongxu@sohu.com

2. 李继平 中国比较医学杂志(论文 征集)

北京市朝阳区潘家园南里5号(100021)

电 话:010-67779337 手 机:13641101685

传 真:010-67770690 电子信箱:a67761337@126.com

3. 杨松涛 军事医学科学院军事兽医研究所(会议 组织)

吉林省长春市净月经济开放区柳影西路666号(130122)

电话:13578759448 电子信箱:yst610223@yahoo.com.cn

注:会员名单按会员所在单位列出,并以单位所在省份邮政编码排序。会员的邮寄地址仍以注册登记时提供的邮寄地址为准。如有任何问题,请及时与学会办公室(010-63165211)或《中国药理通讯》编辑部(010-82801890)联系。

## 全国第十二届生化与分子药理学学术会议摘要

### 大会报告

Translating Science into More Effective and Safer Therapies  
Bob Powell, Senior Clinical Pharmacologist, Roche China

Even though the US, Europe and Japan have been the leaders in translating science into better drugs, productivity has decreased over the past 10-15 years. China has an interest in placing locally discovered drugs onto the global market so it is worthwhile to develop a Chinese perspective on how to create a productive academic-industrial-government axis. In this talk we will

discuss the relationship of government policy to stimulating research productivity from research bench to patient bedside. We will then discuss some contemporary examples of amazing research impacting patient health. In addition to scientific advances in genetics and disease biology, emerging technologies such as systems biology, modeling and simulation and bioinformatics hold promise to enable us to learn more from old and new knowledge. Finally, we will discuss a new academic—industrial relationship at PUMC to help develop physicians and biomedical scientists to bridge the academic—industrial gap in finding more effective and safer therapies.

## 神经退行性疾病生物标志物研究

王晓良

中国医学科学院药物研究所 北京 100050

神经推行性疾病中以老年性痴呆（AD）和帕金森氏病（PD）的发病率最高，对中老年人健康危害最大。但它们的发病机理和早期诊断及药物治疗效果判断均不明确。因而生物标志物的研究成为解决以上问题的一个重要研究方向。

近年来 AD 和 PD 的生物标志物研究已引起基础医学、临床医学和药学研究人员的广泛关注，但取得的进展有限，主要是患者组织标本取材困难；动物模型与临床病人差距较大，难以反映人类疾病的真实情况。因而，用动物模型开展的研究虽然较多，但对临床的指导意义不大。如何将基础研究与临床研究结合，有利于疾病的诊断、治疗及新药评价意义重大。

近年来我们应用比较蛋白组学的方法，研究了 AD 和 PD 发生发展中蛋白组学的改变及生物标志物的识别，及它们与 AD、PD 的关联性及特异性。特别是对动物模型中取得的标志性蛋白进行了深入的研究，如将模型中的发现与文献比较，确定了若干与临床 AD 病人相关的重要蛋白分子，这些蛋白可在动物模型中用于疾病发展和药物评价研究。另外，我们将临床 PD 病人血清与正常人血清蛋白对比得到了若干特异性蛋白，该研究可能对临床 PD 的诊断提供重要依据和手段。在此基础上，在不同的动物模型中进行验证，并初步确定其中一些蛋白可作用在模型动物中进行药物评价的新观察指标及神经退行性疾病创新药物的筛选、评价新方法。

以上研究取得的初步结果为蛋白组学在疾病生物标记物研究方面提供了新的依据，对转化医学研究，临床疾病诊断，药物评价及建立与临床接近的药物评价动物模型，寻找药物新靶点，有重要的理论意义和现实意义。

## 抗肿瘤药物研究新进展

陈晓光

中国医学科学院北京协和医学院药物研究所 北京 100050

在癌症发生发展的研究中，人们历经了漫长而曲折的历史，提出了许许多多的理论和学说。

肿瘤研究在经历了上个世纪 70 年代的癌基因时代, 80 年代的抑癌基因时代, 90 年代的多基因时代, 进入新的世纪以来, 人们已不再满足于孤立地研究癌基因或抑癌基因的结构变化, 而是将其以蛋白组的形式、以基因家族的形式与细胞的重要生命活动联系在一起, 引发了一系列的重大突破, 包括肿瘤多步骤理论的提出, DNA 修复理论的形成, 细胞凋亡理论的形成, 细胞周期核心机制的阐明, 细胞周期启动机制的阐明, 细胞中多条信号转导途径的阐明, 最终使科学家们冲出了癌症研究在黑暗中摸索与茫然的处境, 看到了曙光。抗癌药物的研究也随着理论的更新和技术的进步, 从非选择性的细胞毒药物的筛选转向高选择性的靶向药物的寻找。目前已有近百种分子靶向药物用于临床和正在进行临床研究, 为癌症的治疗尤其实体肿瘤的治疗起到了积极地推动作用。

进入新的世纪, 随着分子生物学技术的发展和肿瘤分子机制的深入认识, 新型抗肿瘤药物不断出现。自 2005 年以来, 美国 FDA 和欧洲 EMEA 正式批准上市的抗肿瘤药物有 24 个 (孤儿药除外)。据不完全统计, 2010 年全球正处于临床研究阶段的抗肿瘤新药达 470 多个, 共涉及 2760 多项临床研究, 其中 III 期临床试验达 231 项, 涉及新药 50 多个。其中包括细胞毒药物中的烷化剂、抗代谢药、铂类、蒽环类和微管稳定剂; 内分泌治疗药; 免疫治疗药; 基因治疗药; 分子靶向抗肿瘤药中的酪氨酸激酶抑制剂、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白抑制剂、血管内皮细胞增殖抑制剂、组蛋白去乙酰酶抑制剂、热休克蛋白抑制剂以及多聚 ADP 核糖聚合酶抑制剂等。

近年来, 抗肿瘤药物研究取得了长足的进步, 种类繁多, 其中分子靶向药物的研究占主导地位。但仍存在着许多问题, 首先, 肿瘤发生发展机制尚未完全阐明, 抗肿瘤药物单药治疗效果并未提高 (<30%); 其次, 肿瘤耐药问题仍是目前治疗失败的主要原因之一, 新靶点的揭示和不同靶点药物联合应用, 在某种程度上克服或延缓了耐药问题, 但多药耐药的机制还有待于进一步阐明; 再次, 与传统细胞毒类药物相比, 分子靶向药物的不良反应较少, 但所引起的某些反应仍需引起高度关重视, 如皮肤反应、间质性肺炎、心血管不良反应等; 再者, 分子靶向药物长期应用所带来的耐药问题等等。总之, 随着肿瘤发病机制的逐步阐明, 坚信针对肿瘤的特异性药物将不断出现, 肿瘤患者的生存质量将不断提高, 甚至长期带瘤生存已成为可能, 肿瘤也完全有可能像糖尿病、高血压一样成为一种可控的慢性病与机体长期和平共存。

## 脂肪肉瘤分化与复发的机理及其治疗药的初步研究

徐强 王璐 沈燕

南京大学医药生物技术国家重点实验室 南京 210093

脂肪肉瘤是常见的一种恶性软组织肉瘤, 根据恶性程度不同可分为: 高分化型、粘液型、圆细胞型、多形型和未分化型脂肪肉瘤。手术是脂肪肉瘤治疗的第一选择, 但不断的复发和多次手术给患者造成了极大的痛苦, 且使手术变得越来越困难; 放疗由于总体上不敏感、并非是其主要治疗手段; 化疗一般只适于恶性度较高的脂肪肉瘤类型, 但目前尚无特效的化疗药物, 常用阿霉素、顺铂、异环磷酰胺、长春新碱等联合治疗。尽管人们一直致力于寻找脂肪肉瘤的

特异性治疗药物，但由于对其发生发展机理缺少深入的了解以及缺少合适的病理模型和药物发现技术，这方面的报道甚少。

我们的研究发现姜黄素可选择性地抑制脂肪肉瘤细胞的生存率而并不杀伤正常脂肪来源细胞，姜黄素可诱导脂肪肉瘤细胞发生 Caspase 8/3 通路依赖性的凋亡，其作用系通过直接结合并抑制脂肪肉瘤特异性高表达的肌浆网钙蛋白 (SERCA2b) 的活性，破坏细胞内钙离子的稳态，从而引发脂肪肉瘤细胞的内质网应激。脂肪肉瘤细胞发生内质网应激的过程中，上调的 CHOP 蛋白转录 TRAIL-R2 (DR5)，继而活化其下游的 Caspase 8，引发细胞凋亡。我们还发现脂肪肉瘤细胞高表达 SERCA2b，66.7% 的人脂肪肉瘤临床样本中可检测到 SERCA2b 的阳性表达，且与脂肪肉瘤的恶性程度呈正相关。

脂肪肉瘤是来源于恶化的间叶组织细胞，其恶性程度与分化程度密切相关，我们进一步探讨了 SERCA2b 在脂肪肉瘤细胞分化方面的功能。发现脂肪肉瘤细胞系和原代脂肪肉瘤细胞均可在体内发生分化，稳定表达的 SERCA2b 可引起细胞内 ROS 积累，抑制脂肪细胞分化的关键蛋白 PPAR- $\alpha$  的转录活性及其下游脂肪分化相关基因的转录，最终引起细胞对于分化的抵抗。

鉴于脂肪肉瘤的高复发率，我们建立了以脂肪肉瘤复发为背景的体内模型，从低度恶性的脂肪肉瘤细胞系中，筛选出一高恶性程度亚系，发现整合素 6 在该亚细胞系中表达显著增加，进一步筛选出 6 高表达的干细胞样亚群。后者具有极强的体内增殖能力、体外克隆能力和自我更新能力，复发性脂肪肉瘤样本中也检测到 6 阳性细胞亚群，提示整合素 6 可作为人脂肪肉瘤干细胞样细胞的鉴别 marker 之一。同时，氨基肽酶 N (CD13) 和整合素 6 在该亚群共同高表达，且 Bcl2 表达显著提高，CD13 抑制剂可抑制该细胞亚群，导致细胞线粒体通路的凋亡。

以上结果首次发现能治疗脂肪肉瘤的小分子化合物姜黄素及其作用的靶分子 SERCA2b，在此基础上研究了 SERCA2b 在抵抗脂肪肉瘤分化的作用，进一步发现并鉴定出脂肪肉瘤中存在的干细胞样细胞亚群及其特征。这些发现对于阐明脂肪肉瘤分化及复发的机理、研制脂肪肉瘤治疗药物具有指导意义。

本研究受国家自然科学基金创新群体项目 (30821006) 和江苏省创新学者攀登项目 (BK2008022) 资助。

## 阻止 PD 病理进程的治疗新策略

胡刚

南京医科大学神经药理实验室 南京 210029

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种严重危害中老年人健康、以黑质-纹状体多巴胺 (DA) 能神经元进行性丢失为主要病理特征的第二大类神经退行性疾病。在我国 65 岁以上人群中 PD 的发病率约 2%，占世界 PD 患者总数的 40% 以上，且有逐年增高的趋势，造成巨大的经济和社会负担。半个多世纪以来，多巴胺替代疗法一直是临床治疗 PD 的主要手段。目前临床使用的左旋多巴和多巴胺受体激动剂等药物仅能缓解症状，并不能阻止 PD 的病理进程和降低死

亡率，且长期使用还可导致严重的不良反应。因此，加强 PD 的神经保护和治疗药物的研发显得尤为紧迫和必要。近年来研究认为全身炎症和代谢性疾病（如糖尿病，肥胖）可增加 PD 的发病风险并加重 DA 神经元的退行性病变。代谢异常引起的应激状态激活 NF- $\kappa$ B 信号通路，产生大量致炎因子（TNF- $\alpha$ ，IL- $\beta$  等）诱发全身代谢性炎症。而在老化和 PD 进程中，神经血管结构改变，血脑屏障（BBB）的功能逐渐损伤、减弱，通透性增高，正常状态下不能透过 BBB 的外周损伤因子大量进入脑内，加重神经退行性病变。因此，靶向调节全身炎症和能量代谢，减轻外周损伤对脑的影响，有望成为 PD 临床治疗新的策略和方向。

## 碘化 N-正丁基氟哌啶醇抗心肌缺血再灌注损伤的作用及其分子机制的研究

石刚刚

汕头大学医学院药理学教研室 汕头 515041

碘化 N-正丁基氟哌啶醇（F<sub>2</sub>）是我课题组合成的具有国家发明专利的一个新化合物。在国家自然科学基金—广东省自然科学基金联合基金重点项目、国家新药基金、国家自然科学基金、教育部博士点基金、广东省自然科学基金重点和面上项目等 10 余项基金资助下，我们对 F<sub>2</sub> 的药理效应及其分子机制进行了较为详尽的探讨。基于上述研究成果，在 *Biochem Pharmacol* 等杂志上发表论文 20 余篇，总影响因子累计达 50 分。

整体动物上发现，F<sub>2</sub> 可以改善心肌缺血再灌注（I/R）造成的血流动力学变化和酶学变化、缩小心肌梗死面积、减轻心肌组织炎症。离体 I/R 模型即培养细胞缺氧复氧（H/R）模型上发现，F<sub>2</sub> 对 H/R 所致心肌细胞的搏动异常、酶（CK，LDH 及 cTnI）的漏出、炎症因子（MPO 和 TNF- $\alpha$ ）的分泌、大体形态及超微结构的损伤均有抑制作用；对 H/R 所致心脏微血管内皮细胞酶（LDH）的漏出、与血小板或中性粒细胞间的异常粘附、炎症因子（IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  及 ICAM-1）的分泌有抑制作用；对缺氧所致血管平滑肌细胞的过度增殖有抑制作用。

在探讨分子机制时，首先选取了与心肌 I/R 损伤关系密切且又是信号通路上的关键节点为研究对象，其中包括钙和核转录因子早期生长反应基因-1（Egr-1）。利用激光共聚焦显微镜及膜片钳技术发现，F<sub>2</sub> 可以阻断缺氧引起心肌细胞膜电压依赖性 L 型钙通道的异常开放及钠钙交换体的外向电流；可以抑制缺氧所致的心肌细胞内钙稳态失衡，包括抑制静息钙水平升高、钙瞬变幅度降低及 RT25-75、DT75-25 和 T50 延长。F<sub>2</sub> 的上述作用最终归结为可拮抗细胞内钙超载。利用反义寡核苷酸、Northern-blot 及 Western-blot 等技术，我们在整体动物及多种离体培养细胞（心肌细胞、心脏微血管内皮细胞及血管平滑肌细胞）I/R 模型上证实 F<sub>2</sub> 对 Egr-1 基因和蛋白表达的抑制作用是其对心肌 I/R 损伤多方面保护作用的重要机制。

虽然作为第二和第三信使，钙和 Egr-1 分别能跨胞膜和核膜将外界信号最终转化为细胞应答，但它们之间或之外（胞浆或核内）还有许多重要信号分子参与了 I/R 损伤有关的级联反应。进一步研究中，发现 F<sub>2</sub> 能抑制 H/R 所致经典钙依赖型 PKC $\alpha$  转位，进而抑制 Egr-1 过度表达，即 F<sub>2</sub> 对心肌 I/R 损伤的保护作用与其对 I/R 时异常信号通路—L 型钙通道/胞内钙超载/

PKC $\alpha$ /Egr-1 的调节作用有关。

鉴于实验中同时还观察到 F<sub>2</sub> 能通过激活新型非钙依赖性 PKC $\epsilon$  转位而拮抗心肌细胞 H/R 损伤,加之在 L-型钙通道缺如的心脏微血管内皮上依然观察到 F<sub>2</sub> 的保护作用,我们建立了无细胞外钙的心肌细胞 H/R 模型,借助于信号通路上的工具药,探讨了 F<sub>2</sub> 药理效应的新机制。目前 F<sub>2</sub> 保护效应的非 L 型钙通道介导机制初见端倪,研究表明, F<sub>2</sub> 对无外钙状态下 H/R 所致心肌细胞 ERK 的过度表达有抑制作用,并由此保护非 L 型钙通道参与的心肌细胞 H/R 损伤,而 ERK 上下游通路的研究正在进行中。

总之,研究表明,新化合物 F<sub>2</sub> 可以通过 L 型钙通道依赖和非依赖机制调节 I/R 所致的异常信号通路起到拮抗心肌 I/R 损伤的作用。

## 从分子到药物—纳米技术的作用

曾文峰 张发云 张春玲 梁伟

中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室

蛋白质与多肽药物实验室 北京 100101

纳米技术是在一个介于分子和微米之间的介观尺度上认识物质的性质和功能。在一个微米尺度的细胞内所发生的生命事件基本上是在纳米空间内完成的,如:DNA 的复制到 mRNA 的合成、蛋白质的生成到其定向运输、以及信号通路的传导等。因此,纳米技术在认识生命基本问题的过程将起到关键性的作用。另外,纳米技术在成药性研究中起到日益重要的作用。如药物作用机制的研究,药物效应的评价及药物的靶向输送等。

我国医药工业生产的药品约 97% 以上是仿制国外的品种,缺乏自主知识产权。在新药研发过程中,约 40% 为难溶性化合物,因为吸收、分布和毒性等问题 (ADME/T) 而被迫终止,而传统药物在临床应用中普遍存在选择性差的问题。纳米技术的应用为解决上述问题提供了强有力的手段。

随着细胞分子生物学技术和小动物成像设备的发展,分子成像技术已被广泛应用于从分子和细胞水平对药物的疗效进行成像,从分子病理水平评估疾病发展的过程以及对同一个动物个体的分子变化进行动态跟踪等多个方面。

我们利用单分子荧光纳米技术研究了柚皮素的作用机制。发现:柚皮素可以抑制 TGF- $\beta$ 1 与其特异性的二型受体 T $\beta$ R II 的结合,进而抑制 T $\beta$ R II 与 T $\beta$ R I 的受体二聚化,影响 Smad3 的磷酸化及下游信号的转导。抑制 TGF- $\beta$ 1 与初始 T 细胞 T $\beta$ R II 受体的结合,进而能够抑制其诱导的下游 Foxp3 的表达,起到抑制免疫抑制性 T 细胞 (Treg) 形成的作用。因此,柚皮素对 T $\beta$ R II 与 T $\beta$ R I 的受体二聚化的抑制可能会改善肿瘤的免疫抑制微环境,从而最终抑制肿瘤细胞的转移。



## EFADchip®系统：简单易用的临床分子药理学研究平台

于常海<sup>1</sup> 汤浩<sup>2</sup>

<sup>1</sup>北京大学系统生物医学研究所 <sup>2</sup>海康生命科技有限公司

过去 10 余年中，新药研发成功率出现明显下降。受挫新药主要集中在复杂疾病领域，主流研发模式是在单一基因——疾病——药物研究模式基础上，筛选和设计对精心选择的疾病单一靶点有高选择性的配体，这种模式在解决复杂系统复杂疾病上屡屡受挫。目前，从整个组学、系统、网络的角度，以全面考察内外应激因素的影响为指导思想的多向药理学和网络药理学正逐渐兴起，药理学研究模式正在产生变革。EFADchip®系统为这种变革提供了一个高效易用平台，将有力推动药物研发向新模式转变。

EFADchip®系统是于常海团队最新开发成功的实用型芯片实验室技术平台（LOAC 系统，SCIENCE 专文报道 VOL 332 24 JUNE 2011），其主要功能特点是快速（整个实验在 1 小时内完成）、易用（全自动，不需要专业人员操作）、高通量筛选多个目标和价格合理（有助于控制研发成本）。EFADchip®系统采用革命性的电场辅助快速杂交技术结合纳米银颗粒检测方法，规避了传统 Microarray（微阵列）耗时、需专业人员操作以及昂贵的荧光检测系统等缺点，极大地方便了研究者从功能基因组学角度作药理学研究，它对药物开发具有全局性帮助。

具体而言，在新药开发前期预研阶段，EFADchip®系统协助研究人员快速确定研究方向，缩小研究范围，节约未来的研发时间与成本。在正式研究阶段，EFADchip®系统可在 1 小时内同时完成近百个目标检测的能力，给试验带来迅捷的速度，有新的想法和思路可以马上得到验证，大大节约了时间消耗；同时 EFADchip®系统操作简单、体积小和足够通量，大量节约了仪器设备试剂资源的消耗，缓解研发工作的人力资源压力。药物开发也可根据人群基因差异性，明确药物适用的特定人群，有效规避药物效果差异及毒副作用，提高新药获批的可能性和加快获批速度。在临床试验阶段，EFADchip®系统可指导试验进行，有助于研究者观察相关可能靶点的作用；其近百种目标同时检测能力基本上能满足大多数临床试验对通量的需求，给出足够满足研究者所需但不过量的信息，节约大量的临床试验成本。药物研究和临床工作者经简单培训后即可成为合格的数据提供分析师，加快临床试验进程。

The current status of early stage clinical trials: approaches in research sites

Pei Hu

Phase I Unit, CPRC, Peking Union Medical College Hospital

The presentation intended illuminating how Chinese Phase I unit are developing by using Peking Union Medical college Hospital Phase I Unit as an example. And the questions such as which are being changes over time in terms of organization and studies conducted and which challenges

they are facing will be described to explain the strategy of early phase clinical development for new drug in China.

In order to extend the current phase I studies into data-intensive studies with additional pharmacodynamic assessments, software environment and hardware environment need to be built up. To intensify the data analyses and make better use of the data, PK/PD modeling and simulation approach has becoming a common technique in phase I clinical trial. Case studies of PK/PD modeling will be discussed in the presentation.

In general, the authors believe the combination of their previous researches and the future researches would help to integrate the information from individuals, and then progress to the population level.

## 外源物（药物）所致胎儿发育毒性及机制的研究进展

汪晖

武汉大学基础医学院药理学系 武汉 430071

发育毒性（developmental toxicity）是指胎儿出生前，母体妊娠期接触外源性理化因素引起的在子代的寿命期内出现的任何对发育有害作用，表现为发育生物体的生长迟缓、功能缺陷和结构异常，甚至死亡。能在未诱发母体毒性的剂量下引起发育毒性的物质统称为发育毒物，包括药物、环境毒物等。宫内发育迟缓（intrauterine growth restriction, IUGR）属于出生缺陷病，临床诊断标准：出生时孕周大于 37 周胎儿出生体重小于 2.5kg，或低于其孕龄平均体重的两个标准差。我国正常妊娠人群中 IUGR 的发病率约为 7.5%。IUGR 不仅可造成胎儿窘迫、新生儿窒息和围产儿死亡，其危害还将延续到其出生后，表现为出生后体格、智力发育落后，成年后代谢综合征（如脂肪肝、糖尿病、心脑血管疾病）的易感性增加。已证实，能诱发 IUGR 的药物包括甾体激素、镇静药、抗痉挛药、抗甲状腺药、治疗糖尿病药物、利尿药、麻醉药、抗癌药、抗生素等，其他能诱发 IUGR 的外源物还包括环境毒物（如烟草烟雾和工业毒物）和食品饮料类（如咖啡和乙醇）。外源物（药物）所致 IUGR 及成年代谢综合征易感的发生机制尚不明确，存在多种假说。本文结合多年实验室研究结果，提出“外源物（药物）所致 IUGR 的神经内分泌代谢编程机制”，研究结果包括：（1）（在整体动物水平，证实孕期暴露多种外源物（药物）可影响啮齿动物胚胎（胎儿）生长发育，引起低出生体重和高 IUGR 发生率；（2）（在外源物所致多种 IUGR 模型上，发现胎鼠存在母源性糖皮质激素（GC）过暴露、下丘脑-垂体-肾上腺（HPA）轴功能发育抑制、外周组织糖/脂代谢改变，运用基于 NMR 波谱的体液定量代谢组学技术和主成分分析方法，探寻到 IUGR 胎鼠的血、羊水特征性代谢谱变化，证实外源物可引起宫内 HPA 轴相关的神经内分泌代谢改变；（3）（在外源物所致 IUGR 成年子代模型上，通过观察高脂饮食和慢性刺激对 HPA 轴及外周糖代谢的影响，证实 IUGR 个体存在成年代谢综合征及代谢性疾病（如糖尿病、脂肪肝、肾）的易感现象；（4）（从外源物代谢活化角度，在组

组织和细胞水平发现人胎肾上腺存在完善的外源物代谢功能（I 相酶系、II 相酶系和抗氧化酶系），证实胎肾上腺具有重要的外源物代谢器官性质，提出孕期外源物暴露的原位代谢损伤机制；（4）（从胚胎发育的表观遗传调控角度，在细胞水平证实外源物（药物）可引起胎儿海马 GR、肾上腺 StAR 及肝脏 IGF-1 基因的表观遗传修饰改变，提出孕期外源物暴露的表观遗传机制。本研究结果为阐明外源物（药物）的发育毒性，解析 HPA 轴相关的疾病起源，确定代谢综合征新的危险因素，提供了实验依据。

## 抗菌增敏药物在逆转大肠埃希菌耐药性中的作用及其作用机制

周红

第三军医大学药学院药理教研室 重庆 400038

抗菌药物的广泛使用甚至滥用导致细菌耐药性不断增加，因此寻找新的有效抗菌药物或者通过逆转细菌耐药性提高现有抗菌药物作用的药物是目前抗菌药物研究的焦点。针对细菌耐药的策略包括两种：一是采取直接抗菌策略，对现有抗菌药物进行结构修饰。二是寻找具有增强现有抗菌药物作用的药物（抗菌增敏剂），用以逆转细菌的耐药性。该策略的优势在于抗菌增敏药物本身不需抗菌活性，其用量少，毒性低，可以恢复现有药物的抗菌活性。因此抗菌增敏药物的研究近年来逐渐受到重视。

革兰阴性菌中的大肠埃希菌是导致感染的重要细菌。主动外排泵的表达或活性增强与其多重耐药性密切相关，其中耐药节结化细胞分化家族（resistance-nodulation-division family, RND）在大肠埃希菌的多重耐药中发挥非常重要的作用，因此 RND 是抗菌药物和抗菌增敏药物研发的药靶。本课题组偶然发现抗疟药青蒿琥酯具有抗菌增敏作用，进一步的研究发现青蒿琥酯对  $\beta$ -内酰胺类抗生素的抗菌增敏作用强，利用反义核酸技术和 AcrB 基因过表达或缺失大肠埃希菌发现青蒿琥酯的抗菌增敏作用与 AcrB 基因或 AcrB 蛋白密切相关。上述研究成果为将青蒿琥酯开发为抗菌增敏剂以及获得作用更强的抗菌增敏剂奠定了基础。

## 新疆维吾尔族、哈萨克族正常糖耐量人群和 2 型糖尿病 人群肠道菌群中直肠真杆菌与多形拟杆菌的定量研究

刘晶<sup>1,2</sup> 王焯<sup>1,2</sup> 刘金宝<sup>1,2</sup> 易金阳<sup>1,2</sup> 杨珍珠<sup>1,2</sup>

哈木拉提·吾甫尔<sup>1,2</sup> 毛新民<sup>1,2</sup> 李琳琳<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>新疆医科大学第一附属医院糖尿病 VIP 实验室 乌鲁木齐 830011；

<sup>2</sup>新疆医科大学药理教研室 乌鲁木齐 830011

目的：析新疆维吾尔族、哈萨克族正常糖耐量人群和 2 型糖尿患者群肠道菌群中直肠真杆菌与多形拟杆菌的量变差异，探讨肠道菌群与 2 型糖尿病的相关性。方法：用 16SrDNA 实时荧

光定量 RT-PCR 技术相对定量法。结果：比较 4 组人群肠道菌群中直肠真杆菌与多形拟杆菌数量的对数值，与维吾尔族 NGT 组比较，维吾尔族 T2DM 组中直肠真杆菌的量差异有统计学意义 ( $P=0.0125$ )，与哈萨克族 NGT 组比较，哈萨克族 T2DM 组中直肠真杆菌的量差异有统计学意义 ( $P=0.0261$ )，两民族的 NGT 组、T2DM 组之间直肠真杆菌的量差异均未见统计学意义；与维吾尔族 NGT 组比较，维吾尔族 T2DM 组中多形拟杆菌的量差异有统计学意义 ( $P=0.0003$ )，哈萨克族 T2DM 组与哈萨克族 NGT 组中多形拟杆菌的量差异有统计学意义 ( $P=0.0055$ )，两民族 NGT 组之间多形拟杆菌的量差异有统计学意义 ( $P=0.0154$ )，两民族 T2DM 组之间多形拟杆菌的量差异未见统计学意义。结论：直肠真杆菌与多形拟杆菌数量的变化，与新疆维吾尔族、哈萨克族 2 型糖尿病的发生可能相关，需要进一步深入探讨。

## 青年优秀论文

### RNA-interference-mediated downregulation of Pin1 results in suppressed tumorigenicity of malignant melanoma A375 cells

Jing Jin Xiaoguang Chen

Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica,  
Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union  
Medical College Beijing 100050

The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 is overexpressed in many human cancers including melanoma. To investigate its potential role in oncogenesis of melanoma and the possibility of it as a therapeutic target, we suppressed Pin1 expression in the human malignant melanoma cell line, A375, using microRNA interference technology. By stably transfecting microRNA plasmid targeting Pin1 into melanoma cells, two stable clones in which Pin1 expression was significantly down regulated were established. Both clones were observed reduced proliferation and invasion in vitro and suppressed tumorigenic potential in athymic mice. Furthermore, Pin1 inhibition also resulted in decreased phosphorylation of AKT and repressed expression of JNK and pro MMP2 which were associated closely with the development of melanoma. These findings indicate that Pin1 plays an important role in the tumorigenesis of malignant melanoma and may serve as a promising therapeutic target.

## CYP $\omega$ -羟化酶/20-HETE 通过上调 VEGF 和 MMP-9 表达 促进非小细胞肺癌血管生成和转移

余伟 杨静

武汉大学基础医学院药理学系 武汉 430071

目的：肿瘤转移是非小细胞肺癌（Non-small cell lung cancer, NSCLC）患者的主要死因。本文研究了细胞色素 P450（Cytochrome P450, CYP）（ $\omega$ -羟化酶及其代谢产物 20-羟二十烷四烯酸（20-hydroxyeicosatetraenoic acid, 20-HETE）（在 NSCLC 血管生成及转移中的作用及机制，为寻找抗 NSCLC 的靶标和标志物提供理论和实验依据。方法：首先采用 Transwell 模型研究 20-HETE 类似物（WIT003）对 3 种 NSCLC 细胞侵袭的影响。随后采用 CYP4A11 质粒转染、外源性给予 CYP $\omega$  羟化酶抑制剂（HET0016）、20-HETE 拮抗剂（WIT002）、WIT003、PI3K 的抑制剂（Wortmannin）和 ERK1/2 抑制剂（U0126）处理 A549 细胞，酶学检测 CYP $\omega$  羟化酶活性，ELISA 或 Western Blot 检测相关蛋白表达。最后采用裸鼠皮下移植瘤模型和原位接种转移模型，进一步验证 CYP $\omega$ -羟化酶/20-HETE 在 NSCLC 血管生成和转移中的作用。结果：WIT003 显著促进 3 种 NSCLC 细胞侵袭。CYP4A11 过表达或 WIT003 处理显著增加 VEGF 和 MMP-9 表达，HET0016 和 WIT002 可显著降低 VEGF 和 MMP-9 表达。Wortmannin 和 U0126 可不同程度降低 WIT003 诱导的 VEGF 和 MMP-9 表达。与对照组相比，CYP4A11 过表达显著增加裸鼠移植瘤重（2.5 倍），微血管密度（2 倍）和肺转移数目（3 倍）。HET0016 显著抑制瘤重，微血管密度和自发肿瘤转移，其抑制率分别为 42%，54% 和 29%。结论：CYP $\omega$  羟化酶/20-HETE 促进 NSCLC 血管生成和转移，其机制可能与 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路激活介导的 VEGF 和 MMP-9 表达有关。

## 胆碱拮抗剂 R2HBJJ 诱导非小细胞肺癌细胞 G0/G1 期阻滞 并抑制细胞增殖

华南 郑建全

军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850

目的：评价胆碱拮抗剂 R2HBJJ 对非小细胞肺癌细胞生长的影响，探讨其作用机制。方法：SRB 法测定细胞活力，RT-PCR 检测受体表达，Flow cytometry assay 分析细胞周期及细胞凋亡，Western blot 检测信号分子变化。结果：非小细胞肺癌 H1299、H157、H460、A549 上有不同的胆碱受体亚型表达。R2HBJJ 在体外可明显抑制 H1299、H157 生长。R2HBJJ 可诱导 H1299 细胞发生 G0/G1 期阻滞，时间及浓度依赖性下调 CyclinD1、CDK4、CDK6 表达，并抑制 Rb 蛋白磷酸化。结论：R2HBJJ 诱导 G0/G1 期阻滞从而抑制细胞增殖是其抗肿瘤活性的主要机制。

## 12-bp CpG ODN 通过 NO 途径增强人脑胶质瘤细胞 U87 放射增敏作用的研究

李小丽 周红

第三军医大学药学院药理学教研室 重庆 400038

目的：探讨含 12-bp 的 CpG 寡脱氧核苷酸 (CpG ODN107, CpG 107) (对脑胶质瘤细胞 U87 (WHO grade IV) 的放射增敏作用, 并探讨其放射增敏机制。方法：本研究通过 MTT 法检测 CpG 107 对 U87 细胞的放射增敏作用；采用 U87 细胞接种的裸鼠皮下移植瘤模型, 观察 CpG 107 在体内的放射增敏作用；流式细胞术检测 U87 细胞凋亡及周期分布情况；硝酸还原酶法检测 U87 细胞中 NO 的释放；ELISA 法检测 U87 细胞中 iNOS 与 NF- $\kappa$ B 的表达；酶标微板法检测微量还原型谷胱甘肽 (GSH) 的含量；RT-PCR 检测 U87 细胞中 TLR9 表达的影响, 并采用 MTT 法检测内化抑制剂氯喹 (CQ) 对 CpG 107 放射增敏作用的影响。结果：CpG 107 呈剂量依赖性的提高 U87 细胞对射线的敏感性；在裸鼠皮下移植瘤模型中, CpG 107 能显著增强射线的抗肿瘤作用；CpG 107 联合射线可将 U87 细胞阻滞于 G1 期, 但未见细胞凋亡发生, 给予特异性的凋亡抑制剂 Ac-DEVD-CHO, 仍然能观察到 CpG 107 的放射增敏作用；在给予 CpG 107 联合射线处理后, U87 细胞中 iNOS 与 NO 的表达明显增加, 但 GSH 含量无明显变化；CpG 107 联合射线能显著上调 U87 细胞中 TLR9 表达, 给予内化抑制剂 CQ 能显著逆转 CpG 107 的放射增敏作用；CpG 107 联合射线可明显激活 U87 细胞中 NF- $\kappa$ B 的表达。结论：体内外实验证实 CpG 107 具有放射增敏作用, 其放射增敏机制可能为：通过 TLR9 途径介导 U87 细胞释放放射增敏分子 NO, 且分泌的 NO 能引起细胞周期阻滞于对射线较为敏感的 G1 期, 因此 CpG 107 是具有潜力的放射增敏剂候选药物。

Pharmacological and toxicological target organelles and  
safe use of single-walled carbon nanotubes as drug  
carriers in treating Alzheimer disease

Zhong Yang, Yingge Zhang

Key Laboratory of Nanopharmacology and Nanotoxicology,  
Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, 27 Taiping  
Road, Beijing 100850, China

Identification of pharmacological and toxicological profiles is of critical importance for the use of nanoparticles as drug carriers in nanomedicine and for the bio-safety evaluation of environmental nanoparticles in nanotoxicology. Here we show that lysosomes are the pharmacological target organelles and mitochondria are the toxicological organelles of SWCNT. The gastrointesti-

nally absorbed SWCNT were lysosomotropic but also entered mitochondria at large doses. III PI3K and LAMP-2A genes was involved in such an organelle preference. SWCNT resulted in collapse of mitochondrial membrane potentials, giving rise to overproduction of ROS, leading to damage of mitochondria, which was followed by lysosomal and cellular injury. Based on the dosage differences in target organelles, SWCNT were successfully used to deliver acetylcholine into brain for treatment of Alzheimer's disease with rather high safety range by well controlling the doses, which ensures SWCNT only enter lysosomes, the pharmacological organelles, and no or less enter mitochondria, the toxicological organelles.

## 何首乌二苯乙烯苷对神经突触的影响及作用机制研究

孙芳玲 李林

首都医科大学宣武医院药物研究室教育部神经变性病重点实验室 北京 100053

目的：突触功能障碍在阿尔茨海默病（AD）、帕金森病（PD）和路易小体痴呆（DLB）等神经退行性疾病的病程进展中起到重要作用。a-synuclein 是脑内一种突触前蛋白，与家族性早发帕金森病密切相关，是散发性帕金森病和其他神经退行性病变中路易小体的主要成分，并且是 AD 老年斑的非 A $\beta$  成份。何首乌二苯乙烯苷是从何首乌中提取的有效成分，我们的前期研究表明，其能够改善 APP 转基因小鼠的认知功能，抑制海马 a-syn 的过表达和聚集；能够抵抗 MPP+ 导致的氧化应激和线粒体损伤，抑制细胞凋亡。但是，二苯乙烯苷是否能够影响海马区其他突触蛋白的表达，是否对黑质纹状体部位的突触结构和功能也有影响，尚不清楚。本研究应用自然衰老动物模型，研究二苯乙烯苷对老年小鼠脑内海马、大脑皮层和纹状体多个脑区神经突触的影响及其作用机制；同时采用 MPP+ 损伤 A53T 突变型 a-syn 基因转染 SH-SY5Y 细胞模型，探讨二苯乙烯苷的干预作用及可能机制。结果：（1）二苯乙烯苷灌胃给药 3 个月可明显缩短老年小鼠在 Morris 水迷宫中的逃避潜伏期，延长避暗试验的潜伏期，减少避暗试验的错误次数；能够明显延长老年小鼠的在棒时间，缩短爬杆时掉转时间和从杆上爬下时间，表明二苯乙烯苷能够改善老年小鼠的学习记忆功能和运动功能。（2）二苯乙烯苷能够明显保护老年小鼠海马 CA1 区突触超微结构，增大纹状体突触后致密物质带，使海马、纹状体的突触连接区域个数增加。（3）二苯乙烯苷能够明显抑制老年小鼠海马、皮层及纹状体组织的  $\alpha$ -syn 表达和聚集，有效地改善衰老造成的  $\alpha$ -syn 异常状态；能够明显增强老年小鼠海马、纹状体的 CaMKII 磷酸化活性，减低 synaptotagmin I 含量，增强 synaptophysin 和 PSD-95 表达，提高 synapsin I 磷酸化活性，从而有效提高突触可塑性。（4）过表达突变型 A53T a-syn 基因使 SH-SY5Y 细胞对 MPP+ 造成的损伤更敏感。MPP+ 促进 a-syn 及其相关作用蛋白 synphilin-1 表达增多，a-syn 形成大量寡聚体，对神经细胞进一步造成损伤。二苯乙烯苷能明显增高 MPP+ 损伤突变型 A53T  $\alpha$ -syn 基因转染 SH-SY5Y 细胞模型中细胞的存活率，保护线粒体功能，降低活性氧自由基水平，降低 Bax/Bcl-2 表达比值，抑制 caspase-3 激活，抵抗细胞凋亡。同

时,二苯乙烯苷能明显抑制模型细胞  $\alpha$ -syn 的过表达和聚集,减低 synphilin-1 表达,提高 PSD-95 的表达。结论:二苯乙烯苷能够明显改善老年小鼠的学习记忆功能和运动能力,抑制海马、纹状体多个部位  $\alpha$ -syn 过表达和聚集,减轻 MPP+ 损伤导致的线粒体功能失调、氧化应激以及  $\alpha$ -syn 的聚集,保护突触结构和功能,进一步扩充了二苯乙烯苷对抗神经退行性疾病的药效学研究,为其开发成为治疗 PDD、DLB 等神经退行性疾病的药物提供实验依据。

## 狂犬病毒糖蛋白衍生肽作为靶脑载体研究

王逸麟 付爱玲

西南大学药学院 重庆 400716

狂犬病毒糖蛋白 (rabies virus glycoprotein, RVG) 为一种嗜神经性的蛋白质,能够促使病毒向中枢神经系统移动。将狂犬病毒糖蛋白 (rabies virus glycoprotein, RVG) 的衍生肽段与荧光素酶 (luciferase) 的基因在 pET28a (+) 上构建新的载体,并通过在 BL21 中表达,将融合蛋白尾静脉注射入昆明种小鼠体内,于 15min、30min、1h、3h、5h 处死小鼠,取全脑、脊髓匀浆后,用荧光素酶测定试剂盒检测融合蛋白在脑内的含量,并通过罗丹明 B 标记分析 RVG 在昆明种小鼠的体内分布 (15min、5h)。结果显示荧光素酶融合蛋白在 15min 时在脑和脊髓均有很高分布,5h 时在体内已基本代谢完全;同时,15min 和 5h 均在大脑和脊髓也观察到罗丹明 B 标记的 RVG,而外周组织的分布却很少。这说明了 RVG 具有很高的嗜神经性。将 RVG 与脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 构建成新的载体,在 BL21 中诱导表达,收集融合蛋白。构建脑缺血模型的小鼠,将其分为对照组、BDNF 治疗组与注射融合蛋白组 (每组 5 只),存活 24 小时后处死取脑, TTC 染色后计算脑缺血面积并计算显著性差异 (P)。通过 RVG-BDNF 融合蛋白治疗的脑缺血模型老鼠,其缺血面积明显小于脑缺血模型鼠与 BDNF 治疗的脑缺血模型鼠,而 BDNF 治疗的脑缺血面积与脑缺血模型鼠的脑缺血面积相差不显著,这说明 RVG-BDNF 融合蛋白能够穿过血脑屏障,达到治疗脑缺血的目的。

## 2-( $\alpha$ -羟基戊基)苯甲酸钾盐 (dl-PHPB)

### 抗血小板聚集作用及机制研究

杨宏艳 王晓良

中国医学科学院药物研究所北京协和医学院 北京 100050

目的:2-( $\alpha$ -羟基戊基)苯甲酸钾盐 (dl-PHPB) 是医科院药物所自行设计合成的全新化合物,目前正开发为治疗脑缺血的一类新药。我室前期实验研究结果表明 dl-PHPB 可改善大脑中动脉栓塞 (MCAO) 大鼠缺血区脑血流,减少梗死体积,抑制血栓形成。但其抗血栓的具体机制尚不清楚。本研究主要针对 dl-PHPB 抗血小板聚集的作用及其相关机制进行了探讨。



方法：采用比浊法测定血小板聚集率，放免法检测血小板内 cAMP 和 TXA<sub>2</sub> 的水平，双波长荧光酶标仪测定血小板浆游离钙含量，Western 检测血小板磷酸化磷脂酶 C (P-PLC $\beta$ ) 和总磷脂酶 C 蛋白表达情况，流式细胞仪检测血小板表面 CD62P 的表达。结果：dl-PHPB 静脉给药显著抑制 ADP (5 $\mu$ M)、collagen (5 $\mu$ g/ml)、AA (1mM) 诱导的大鼠血小板聚集，其中对 ADP 诱导的血小板聚集的抑制作用最强，而对凝血酶 (thrombin, 0.5U/ml) 诱导的血小板聚集没有明显影响。静脉给予 PHPB (1.3、3.9、12.9mg/kg) 对 ADP 诱导的大鼠血小板聚集的抑制率分别为 22.58%、29.38%和 40.19%，且这种抑制作用可以被 PLC 激动剂 m-3mFBS 逆转。400 $\mu$ M 的 m-3mFBS 可以使 dl-PHPB (12.9mg/kg) 的抑制作用由 40.19 $\pm$ 3.37%下降为 8.16 $\pm$ 2.97%。dl-PHPB 对血小板内 cAMP 和 TXA<sub>2</sub> 的水平没有明显影响。dl-PHPB (1.3、3.9、12.9mg/kg) 可以使 ADP 诱导的血小板胞浆内 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 由 676.94 $\pm$ 149.77 nM 分别降至 383.77 $\pm$ 35.22 nM、434.06 $\pm$ 71.44 nM 和 160.42 $\pm$ 89.51 nM。dl-PHPB 增加血小板 P-PLC $\beta$  蛋白表达，降低血小板表面 CD62P 的表达，抑制血小板活化。结论：dl-PHPB 具有抗血小板聚集作用，其抗血小板聚集作用与增加血小板 PLC 磷酸化，降低 PLC 活性，减少血小板胞浆游离钙含量，抑制血小板活化有关。

## 人类和不同种属血脂紊乱动物模型脂蛋白谱的比较研究

杨柳 朱海波

中国医学科学院北京协和医学院药物研究所天然药物活性物质与  
功能国家重点实验室 北京 100050

为了从常见的啮齿和非啮齿类动物中寻找与人类脂蛋白构成相似的动物模型，用于研究血脂紊乱相关疾病发病过程和调血脂药物筛选和药效学评价，本研究利用自主建立的分离检测方法对人类和不同种属动物脂蛋白谱进行了比较研究。研究通过采用蛋白快速分离技术对微量血清中的蛋白进行分离，收集其中的极低密度脂蛋白、低密度脂蛋白和高密度脂蛋白三个脂蛋白亚组分；然后利用灵敏度高、方便快捷的荧光检测方法对脂蛋白亚组分中的总胆固醇、游离胆固醇和甘油三酯进行含量检测；计算脂蛋白亚组分中脂蛋白和脂质含量、脂质和脂蛋白比值、胆固醇脂与总胆固醇比值，获得不同种属脂蛋白中脂质含量信息。通过对人类和不同种属血脂紊乱动物模型脂蛋白谱的研究，绘制了人类、几种啮齿和非啮齿类动物血清脂蛋白谱，发现在常用的啮齿和非啮齿类血脂紊乱动物模型中金黄地鼠和小型猪的脂蛋白谱与人类较为相近，适用于研究人类血脂紊乱发病过程和调血脂药物筛选和药效学评价。

## 碘化 N-正丁基氟哌啶醇对缺氧心肌细胞钙稳态的保护作用

肖剑锋 石刚刚

汕头大学医学院药理学教研室 汕头 515041

目的：碘化 N-正丁基氟哌啶醇 ( $F_2$ ) 是我们课题组在氟哌啶醇的基础上进行结构改造，得到的一个新化合物。前期研究发现  $F_2$  作为 L-型钙通道阻滞剂，剂量依赖地拮抗缺血再灌注所致对大鼠心脏损伤。本研究拟在缺氧过程中观察  $F_2$  对心肌细胞钙稳态（主要是钙瞬变）的影响，并探讨其可能的保护机制。方法：模拟缺氧情况下的钙瞬变图像通过共聚焦显微镜记录，钙瞬变图像采用自编软件分析。肌质网钙储量通过喷终浓度为 15mM caffeine 检测。肌质网钙泵 (SERCA2a) 移除  $Ca^{2+}$  速率  $Ca^{2+}$  通过给予  $5\mu\text{M}$  Thapsigargin (TG) 孵育 6min 阻断 SERCA2a 对  $Ca^{2+}$  的移除，其速率  $V_{SERCA} = V_{TOTAL} - V_{NCX+PMCA}$ 。细胞膜钠钙交换体移除  $Ca^{2+}$  速率通过给予  $5\mu\text{M}$  Thapsigargin +  $5\mu\text{M}$  Carboxyeosin (PMCA 阻断剂) 室温下孵育 6min 求得  $V_{NCX}$ 。结果：缺氧可以导致舒张期  $[Ca^{2+}]_i$  升高，钙瞬变幅度降低，RT25-75、DT75-25 和 T50 延长，肌质网钙储量减少和肌质网钙泵移除  $Ca^{2+}$  速率降低，而  $F_2$  可以剂量依赖地抑制缺氧导致的钙瞬变的改变及肌质网钙储量减少、肌质网钙泵移除  $Ca^{2+}$  速率的降低。结论：缺氧可以导致心肌细胞内钙稳态失衡， $F_2$  对缺氧导致的心肌细胞钙稳态失衡发挥保护作用，其保护作用可能与肌质网钙储量和肌质网钙泵移除  $Ca^{2+}$  速率有关。

## 姜黄素通过诱导人内皮细胞产生自噬抗氧化应激损伤

韩婧 李学军

北京大学基础医学院药理系 北京 100191

目的：研究姜黄素在过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 诱导的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 氧化应激损伤中的作用，并且研究其细胞可能的保护机制。结果通过 MTT 法、TUNEL 荧光染色法检测出提前给予姜黄素 ( $1\mu\text{M}$ ,  $5\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ) 24 小时，显著提高其在  $200\mu\text{M}$   $H_2O_2$  诱导氧化应激损伤中的存活率，减少凋亡细胞数量，有效减少 Caspase-3 与 Caspase-9 活性形式的表达，且有剂量依赖性。经激光共聚焦显微镜发现  $5\mu\text{M}$  姜黄素在抗氧化应激损伤时可引起 HUVEC 自噬。使用蛋白质印迹及免疫共沉淀技术发现，给予  $5\mu\text{M}$  姜黄素可经 PI3K/Akt/mTOR 途径激活自噬信号转导，并促进 Beclin-1 与 Bcl-2 解离引发自噬。进一步使用免疫荧光法观察到  $5\mu\text{M}$  姜黄素可抑制氧化应激损伤过程中转录因子 FoxO1 的向细胞核内转位过程，抑制 Sirt2 表达，增加胞浆中 FoxO1 的磷酸化和乙酰化修饰，进一步促进自噬体产生，达到细胞保护的作用。反之，利用 RNA 干扰技术敲降 FoxO1 表达，则给予  $5\mu\text{M}$  姜黄素的氧化应激损伤组中自噬过程消失。Caspase-3 与 Caspase-9 活性形式的表达和细胞保护作用与损伤模型组无显著差异。结论：姜

黄素可以通过引发 HUVEC 自噬过程在氧化应激损伤条件下起到对细胞保护作用。其机制可能与姜黄素激活自噬信号通路, 促自噬起始蛋白 Beclin-1 从复合体中释放, 抑制 FoxO1 转录因子核转位过程有关, 从而抑制氧化应激所引起的内皮细胞凋亡。

## 人 Toll 样受体 9 结合 CpG ODN 结构域的研究

潘夕春<sup>1</sup> 郑江<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>第三军医大学药学院药理学教研室 重庆 400038

<sup>2</sup>第三军医大学第一附属医院中心实验室 重庆 400038

目的: 脓毒症的发生与单核/吞噬细胞的 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 识别菌体成分后导致多种炎症细胞因子的大量释放密切相关, 因此研究 TLRs 识别病原分子的结构和功能关系, 对寻找新的药物作用靶点、获得新的先导化合物进行脓毒症的防治具有重要意义。本研究拟寻找人 TLR9 识别 CpG ODN 的结构域, 并研究该结构域结合 CpG ODN 的重要氨基酸位点。方法: 人工合成人 TLR9 的亮氨酸重复序列 (leucine-rich repeat, LRR) 片段 LRR2、5、8、11 多肽, 生物传感器检测其与 CpG ODN 的亲合力, 激光共聚焦检测 LRR 多肽对 CpG ODN 在小鼠腹腔巨噬细胞中内化的影响, ELISA 检测 LRR 多肽对 CpG ODN 诱导腹腔巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 活化及细胞因子释放的影响, 确定与 CpG ODN 结合的 LRR; 采用表面电荷分析初步确定该 LRR 与 CpG ODN 结合的氨基酸位点, 并合成突变多肽进行功能验证, 最后用分子对接技术研究人 TLR9 与 CpG ODN 相互作用细节。结果: 仅 LRR11 与 CpG ODN 具有高亲和力; LRR11 在体外可显著抑制 CpG ODN 内化及 CpG ODN 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 活化、细胞因子释放; LRR11 的 5 个正电荷位点 R337、K338、K347、R348 和 H353 形成 2 个正电荷区域, 5 个位点突变均可降低 LRR11 与 CpG ODN 的结合, 其中 R337、K338 影响最大; 分子对接表明 R337 和 K338 通过氢键与 CpG ODN 结合, 而 K347、R348 和 H353 虽然不直接与 CpG ODN 结合, 但可影响人 TLR9 与 CpG ODN 结合面的形状。结论: LRR11 是人 TLR9 结合 CpG ODN 的重要结构域, 5 个正电荷位点尤其是 R337、K338 是关键结合位点。

## GK 和 PPAR $\gamma$ 双靶点激动剂 SHP-14 抗糖尿病作用的研究

雷蕾 申竹芳

中国医学科学院北京协和医学院药物研究所 北京 100050

目的: SHP-14 是定向合成的化合物, 离体实验表明其为 GK 和 PPAR $\gamma$  双靶点激动剂。本文主要研究其作用特点和相关抗糖尿病作用。方法: 离体实验测定 SHP-14 对 GK 活性和 PPAR $\gamma$  转录活性的影响。细胞学实验选用人肝癌细胞 HepG2 评价 SHP-14 促葡萄糖消耗作用和促糖原合成作用, 选用小鼠胰岛 NIT-1 细胞测定其促胰岛素分泌作用。体内活性评价选用正常 ICR 小鼠和自发性 2 型糖尿病模型 KK<sub>ay</sub> 小鼠, 研究 SHP-14 对小鼠空腹血糖和口服葡萄糖

耐量 (OGTT) 的影响。并对 SHP-14 的药代动力学和急性毒性进行了初步评价。结果: 离体实验发现 SHP-14 对 GK 和 PPAR $\gamma$  有明显的激活作用。其浓度为 10 $\mu$ M 时使 GK 活性增加 90%, EC<sub>1.5</sub> 为 2.05 $\mu$ M; 浓度为 1 $\mu$ M 时对 PPAR $\gamma$  的转录活性与阳性对照药罗格列酮相比, 活性为罗格列酮的 65.5%。细胞学实验表明 SHP-14 可促进 HepG2 细胞的葡萄糖消耗, 并呈剂量依赖关系。与对照组相比, SHP-14 浓度为 1 $\mu$ M 和 10 $\mu$ M 分别使 HepG2 细胞的葡萄糖消耗量达 106.3% 和 117.2%。SHP-14 (10 $\mu$ M) 在 15mM 葡萄糖刺激下可促进 NIT-1 细胞的胰岛素分泌, 与对照相比增加 14.0%。体内实验显示 SHP-14 可显著降低正常 ICR 小鼠和 KK<sub>ay</sub> 小鼠的空腹血糖, 改善口服葡萄糖耐量。正常 ICR 小鼠口服给药 (50mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>) 后 2h、4h 和 6h, 与 Nor 组相比分别使血糖下降 13.8%、20.4% 和 20.7%; 口服葡萄糖耐量实验, 60min 和 120min 的血糖显著低于 Nor 组 (分别下降 15.4% 和 16.5%), 血糖曲线下面积相对于 Nor 组下降 12.7%。KK<sub>ay</sub> 小鼠口服给药 (50mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>) 后 4h, 与 Con 组相比, 血糖下降 19.9%; 口服葡萄糖耐量实验, 60min 和 120min 的血糖显著低于 Con 组 (分别下降 15.1% 和 25.7%), 血糖曲线下面积相对于 Con 组下降 15.5%。体内药代动力学实验表明大鼠口服 SHP-14 (50mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>) 后吸收较快, 达峰时间为 0.42—2.08h 不等, 给药后 24h 血中仍存一定浓度原型化合物, C<sub>max</sub> 为 10307.32 $\mu$ g/L, MRT (0— $\infty$ ) 为 4.92h, T<sub>1/2z</sub> 为 3.13h。结论: SHP-14 作为 GK 和 PPAR $\gamma$  双靶点激动剂可通过促进葡萄糖消耗和高糖刺激的胰岛素分泌有效降低血糖, 且其具有较好的药代动力学特征。

## 孕期咖啡因暴露所致子代 HPA 轴高应激敏感性 增加高脂饮食下胰岛素抵抗发生的风险

张郦 汪晖

武汉大学基础医学院药理学系 武汉 430071

目的: 咖啡因是引起胎儿宫内发育迟缓 (IUGR) 的确切诱因之一, IUGR 胎儿成年后代谢综合征易感性增加, 下丘脑—垂体—肾上腺 (HPA) 轴的功能发生改变。为阐明 HPA 轴编程改变与胰岛素抵抗 (IR) 发生风险增加的关系, 本实验在孕期咖啡因暴露所致的 IUGR/出生后高脂饮食诱导 IR 的大鼠模型上, 观察 HPA 轴对慢性刺激敏感性和外周血糖代谢的改变。方法: 孕鼠于妊娠第 11 天开始, 咖啡因组和对照组分别灌胃给予 120mg/kg  $\cdot$  d 咖啡因和等体积生理盐水。仔鼠出生后第一周 (PW 1) 起每周称重; PW 4 开始高脂饲料喂养至处死; PW 16 进行口服糖耐量实验 (OGTT); PW 17 开始 21 天不可预见性慢性刺激; PW 20 再次进行 OGTT; 结束后处死动物, 取血清及组织, HE 染色观察形态学变化。检测血清 ACTH、皮质酮 (CORT)、胰岛素和葡萄糖浓度; 肾上腺 StAR 和 P450sc $\alpha$  的 mRNA 表达。结果: 咖啡因组仔鼠 PW 1 时体重显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 出生后体重增长率与对照组相比无显著差异, 雌鼠仅有升高趋势。HE 染色显示, 咖啡因组肾上腺有增生、肥厚等病理改变, 束状带细胞增多, 细胞浆充满类脂质空泡, 血窦明显扩张; 咖啡因组雄性胰岛细胞轻度水肿, 空泡样变性, 胰岛细胞数目明

显减少。慢性刺激前，咖啡因组血清 ACTH（雌鼠  $P < 0.01$ ）和血清 CORT（雄鼠  $P < 0.01$ ）低于对照组；慢性刺激后，咖啡因组血清 ACTH 和 CORT 水平高于对照组（雌鼠  $P < 0.01$ ），其变化率均高于对照组（雌鼠  $P < 0.01$ ，雄鼠  $P < 0.05$ ）。肾上腺 StAR 和 P450<sub>scc</sub> 的 mRNA 表达均高于对照组（雌鼠  $P < 0.01$ ，雄鼠  $P < 0.05$ ；雄鼠  $P < 0.05$ ）。慢性刺激前，咖啡因组大鼠基础血糖无明显差异，基础血胰岛素雌鼠高于对照组（ $P < 0.01$ ）而雄鼠低于对照组（ $P < 0.05$ ），胰岛素抵抗指数（IRI）高于对照组（雌鼠  $P < 0.01$ ），OGTT 均无显著差异；慢性刺激后，咖啡因组大鼠基础血糖（雄鼠  $P < 0.05$ ）、血胰岛素和 IRI 较对照组均有所升高（雌鼠  $P < 0.05$ ），OGTT 结果提示咖啡因组雌雄大鼠胰岛素释放增加，糖代谢减慢。结论：孕期咖啡因暴露所致 IUGR 仔鼠在高脂饮食下，成年后 HPA 轴的基础活性降低，对慢性刺激的敏感性升高，同时糖代谢减慢，胰岛素抵抗发生或加重。

## 基因芯片结合整合基因网络筛选辐射 损伤后恢复相关基因的研究

张晶 殷明

上海交通大学药学院 上海 200240

由于电离辐射会引起骨髓造血功能紊乱，从而导致贫血、免疫力下降等病症，因此备受人们的关注。然而高剂量辐射刺激后，骨髓修复期阶段的全基因组学的研究仍未见报道。本实验将目光集中于受辐射刺激后小鼠的骨髓修复阶段，通过基因芯片分析以及相关的生物信息学研究，结合文本挖掘，希望全面了解在修复阶段中起关键作用的基因及其信号通路。通过实验，我们发现：1) 从基因芯片得到 1302 个差异表达基因，通过与已有文献比对，得到 11 个与造血干细胞自我更新、增殖相关的基因，包括 ADIPOQ, CCL3, CCND1, CCND2, CDKN1A, CXCL12, JUNB, PTEN, TAL1, THY1 和 TNF；2) 经过功能分析，差异表达基因主要参与免疫反应（包括造血作用），应激反应，细胞生物反应（包括细胞增殖，细胞周期以及细胞粘附）及信号传导等生物学过程；3) 通过动态基因网络分析，我们得到了 25 个核心基因，这些基因参与了免疫反应，基因转录表达以及核小体的组装过程；4) 通过文本分析，我们得到了 514 个与辐射有关的基因，其中 42 个基因与芯片分析得到的差异基因重合；5) 通过蛋白-蛋白相互作用网络的构建以及信号通路分析，构建了参与辐射后骨髓修复阶段的基因相互作用网络及重要的信号通路（包括细胞粘附及免疫相关信号通路）。

经高剂量辐照刺激后，骨髓在损伤期和修复期具有明显差异的全基因表达相。并且在骨髓修复期，免疫反应（包括造血过程）占据了主导作用。通过多方面的分析及数据挖掘，我们确定了几个关键基因，并分析了其在骨髓修复中的生物学作用，其中一部分基因与骨髓造血干细胞的功能及其信号通路有着密切关系。我们的研究可能为研究与疾病或外界刺激相关的核心基因、从系统角度了解生物学过程以及在此基础上进行药理学干预提供参考。

## 左氧氟沙星对家兔前交叉韧带细胞的细胞毒性作用

邓宇 陈廖斌

武汉大学中南医院骨科 武汉 430000

目的：氟喹诺酮类抗生素对纤维结缔组织，肌腱、骺生长板以及关节软骨等均具有毒性作用。本研究从细胞水平，研究左氧氟沙星对家兔的前交叉韧带细胞是否具有细胞毒性作用。方法：采用家兔的原代前交叉韧带细胞，设立正常对照组及梯度浓度的左氧氟沙星处理组（5，10，20，40 和 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）（分别作用 24 和 48 h。以 MTT 法检测细胞活性，透射电镜观察细胞超微结构，流式细胞 Annexin、V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡情况，RT-PCR 检测韧带基质一型胶原合成（Col1A1）、对胶原促降解（MMP-3、MMP-13）及抑制降解（TIMP-1、TIMP-3）的相关功能基因的 mRNA 水平的表达，细胞免疫化学法检测细胞凋亡的标志蛋白活化的 caspase-3 和编码胶原合成的 Col1A1 等功能蛋白的表达水平。结果：左氧氟沙星（10-80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）作用 48 h 后，前交叉韧带细胞数分别减少至对照组的 95.73%、94.26%、89.45%、84.54%和 81.9%。左氧氟沙星 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  作用细胞 48 h，细胞透射电镜观察示，胞浆出现大量空泡和巨大囊泡样改变，线粒体、高尔基体、内质网肿胀明显，凋亡小体和细胞膜气泡形成。Annexin、V-FITC/PI 双染流式细胞检测示，左氧氟沙星（10-80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）作用 48 h 后，细胞凋亡细数呈药物浓度依赖性升高。RT-PCR 检测示，左氧氟沙星作用细胞 24 h 后，显著增高 MMP-3 和 MMP-13 表达，显著降低 TIMP-3 表达，并且该作用具有药物浓度依赖性；同时左氧氟沙星未改变 Col1A1 和 TIMP-3 的表达。细胞免疫化学检测示，左氧氟沙星（10-80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）作用细胞 48 h 可呈浓度依赖性显著增加细胞内凋亡标志蛋白即活化 caspase-3 的表达；并在 40 和 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$  浓度作用下显著降低 Col1A1 蛋白的表达。结论：左氧氟沙星对家兔的前交叉韧带细胞具有明确的毒性作用，并且该作用与氟喹诺酮类抗生素对肌腱的细胞毒性作用相类似。这些研究对指导氟喹诺酮类抗生素的临床用药，防治韧带损伤提供理论支持。

## 专题报告

### 一、抗肿瘤药理

GSTM1、GSTM3、GSTT1、GSTP1 基因多态性与

蒙古族人群肺癌易感性关系

白图雅 常福厚 王敏杰 王光

内蒙古医学院药学院药理学教研室 呼和浩特 010059

目的：研究内蒙古地区 GSTM1、GSTM3、GSTT1、GSTP1 基因多态性与蒙古族人群肺癌

易感性关系。方法：采用等位基因特异性扩增（AS-PCR）、聚合酶链式反应—限制性片断长度多态性（Polymerase Chain Reaction—Restriction fragment Length Polymorphism, PCR—RFLP）以及多重 PCR 分析技术对内蒙古地区 214 例正常蒙古族人及 128 例蒙古族肺癌患者进行 GSTM1、GSTM3、GSTT1、GSTP1 基因多态性分析，并联合吸烟状况，分析 GSTM1、GSTM3、GSTT1、GSTP1 基因多态性及吸烟与肺癌之间的相互关系。结果：（1）在与肺癌易感性关系的分析中发现，与 GSTM1（+）基因型相比，携带 GSTM1（-）基因型的个体患肺癌的危险度升高 2.264 倍（95%CI=1.446~3.545），并经两组间基因型分布的  $\chi^2$  检验，有显著性差异（ $p<0.05$ ）。GSTM3、GSTT1、GSTP1 基因型在对照组与肺癌组中的分布经  $\chi^2$  检验没有显著性差异（ $P>0.05$ ）。（2）在联合吸烟状况与肺癌易感性的关系分析发现，与携带 GSTM1（+）的非吸烟者相比，携带 GSTM1（-）吸烟者患肺癌的危险度升高，OR 值为 5.504（95%CI=2.837~10.676），且结果具有统计学意义（ $P<0.05$ ）。携带 GSTM1（-）的非吸烟者与携带 GSTM1（+）的吸烟者患肺癌的危险度均升高，OR 值分别为 1.546（95%CI=0.771~3.100）和 1.154（95%CI=0.572~2.327），但结果没有显著性差异（ $P>0.05$ ）。与携带 GSTM3（AA）的非吸烟者相比，携带 GSTM3（AA）或 GSTM3（AB+BB）的吸烟者患肺癌的危险性均增加，OR 值分别为 2.517（95%CI=1.345~4.710）和 2.031（95%CI=1.054~3.913），分布频率经  $\chi^2$  检验差异具有显著性（ $P<0.05$ ）。与携带 GSTT1（+）的非吸烟者相比，携带 GSTT1（+）和 GSTT1（-）的吸烟者患肺癌的危险度升高，OR 值分别为 2.153（95%CI=1.176~3.944）和 2.062（95%CI=1.088~3.907），且结果具有统计学意义（ $P<0.05$ ）。与携带 GSTP1（AA）的非吸烟者相比，携带 GSTP1（AA）或 GSTP1（AG+GG）的吸烟者患肺癌的危险性均增加，OR 值分别为 1.806（95%CI=0.981~3.324）和 1.728（95%CI=0.938~3.182），但结果无统计学意义（ $P>0.05$ ）。结论：在与肺癌易感性关系的研究中发现 GSTM3 突变基因型、GSTT1（-）、GSTP1 突变基因型为可疑易感因素，GSTM1（-）、吸烟为肺癌的易感因素。基因联合分析表明，GSTM1、GSTM3、GSTT1 和 GSTP1 在内蒙古蒙古族人群肺癌易感性方面不具有相关性。

## CYP4A/20-HETE 在 Lewis 肺癌转移中的作用 及其分子机制研究

陈丽 赵海霞 余伟 王慧娜 欧阳小明 王雪 杨静  
武汉大学基础医学院药理学系 武汉 430071

目的：细胞色素 P450 4A（Cytochrome 450, CYP4A）及其花生四烯酸产物 20-羟花生四烯酸（20-hydroxyeicosatetraenoic acid, 20-HETE）与肿瘤生长及转移关系密切。本文研究了 CYP4A/20-HETE 在 Lewis 肺癌转移中的作用，并对其分子机制进行了探讨。方法：参照文献，建立 Lewis 肺癌皮下种植瘤模型和肺癌转移模型。随机分为 4 组，每组 8 只。CYP4A 抑制剂（HET0016）组和 20-HETE 拮抗剂（WIT002）组分别 ip HET0016 和 WIT002

(10mg/kg/d); 溶媒对照组 ip 等体积溶媒; 荷瘤对照组 ip 等体积生理盐水, 连续给药 2 周。研究 CYP4A/20-HETE 对 Lewis 肺癌的促转移作用; 收集 HET0016、WIT002、WIT003 预处理的 LLC 及小鼠纤维细胞 L929 细胞及条件培养液, 检测 LLC 表面 CXCR4 密度及 L929 条件培养基中 SDF-1 浓度, 并采用侵袭实验研究 20-HETE 对 LLC 侵袭迁移能力的影响。结果: HET0016 和 WIT002 可显著抑制 Lewis 肺癌模型中肺内转移灶及 AC133+VEGFR2+EPC 数目, 并可减少肿瘤组织中 VEGF、CXCR4 的表达及肺内 SDF-1 分泌。HET0016 和 WIT002 明显降低 LLC 细胞表面 CXCR4 密度及 L929 条件培养基中 SDF-1 含量, 并抑制 SDF-1 诱导的 LLC 细胞侵袭。20-HETE 类似物 WIT003 可部分逆转 HET0016 的抑制作用, AMD3100 或 SDF-1 中和抗体可阻断 WIT003 诱导的 LLC 迁移。结论: CYP4A/20-HETE 在 Lewis 肺癌转移过程中起重要作用, 其机制可能与 SDF-1/CXCR4 轴功能上调有关。

## 缺氧诱导因子-1 抑制剂的发现与抗肿瘤作用机制研究

郎立伟 周晴 李燕 陈晓光

中国医学科学院北京协和医学院药物研究所 北京 100050

肿瘤组织内微环境缺氧是实体瘤发生发展中一个持续存在的重要病理特征之一, 与肿瘤侵袭转移、预后不良、放化疗耐受密切相关, 也是化疗失败的主要原因之一。缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 是调控肿瘤缺氧效应极为重要的核转录因子。

针对 HIF-1 靶点的特异性抑制剂的研发具有重要的意义。

本研究通过建立两种 HIF-1 抑制剂特异性细胞筛选模型: U251-HRE/U251-pGL3 细胞筛选模型、瞬时共转染 pGL2-TK-3HRE 与 pGRL 的 T47D 细胞筛选模型, 对所选定的化合物进行筛选。应用 U251-HRE 模型发现雷公藤甲素可选择性抑制 HIF-1 活性, 其对 HIF-1 抑制的 IC<sub>50</sub> 为  $4.31 \times 10^{-8}$  mol/L, 对其衍生物进行活性筛选, 发现多个  $10^{-7}$  mol/L 水平的化合物。应用 T47D-HRE 模型对三白脂素-8 及衍生物进行筛选, 发现其新的骨架立体结构与 HIF-1 抑制活性的关系, 对在此基础上设计合成的一系列新结构简化物进行筛选, 结果表明 3 个结构简化物抑制活性较三白脂素-8 强 100-1000 倍 (IC<sub>50</sub> 在  $10^{-10} \sim 10^{-11}$  mol/L 水平), 其中 LXY6006 对 HIF-1 抑制活性强、合成工艺简单。LXY6006 对人乳腺癌、胰腺癌、肺癌具有较强的选择性生长抑制作用, 且敏感肿瘤细胞株人乳腺癌 MX-1、人胰腺癌 SW-1990、Capan-2、MIA PaCa-2 常氧条件下高表达 HIF-1 $\alpha$ 。LXY6006 对裸鼠人耐紫杉醇乳腺癌 MX-1/Taxol、人耐紫杉醇肺癌 H460/Taxol 及亲本 H460、人胰腺癌 MIA PaCa-2 均具有明显的生长抑制作用, 抑瘤率分别为 73.4%、49.1% 与 65.5%、74.7%。通过就 HIF-1 抑制剂对 HIF-1 $\alpha$  及其 mRNA、HIF-1 与 DNA 结合的影响, 及对下游基因 VEGF、GLUT-1 等的调控进行较详细的作用机制研究, 为创制分子靶向 HIF-1 抗肿瘤新药奠定基础。



## 注射卡介苗对荷瘤小鼠血清中免疫因子的影响

李超 张海婧 陈晓光

中国医学科学院北京协和医学院药物研究所 北京 100050

目的：观察注射卡介苗后荷瘤小鼠血清中免疫因子的变化对肿瘤转归的影响，探讨机体免疫增强与肿瘤发生发展的关系。方法：选取 C57BL/6 小鼠随机分为正常组、模型组（仅接种恶性黑色素瘤）、卡介苗免疫组、卡介苗免疫后接种肿瘤组，运用卡介苗皮内注射法刺激免疫系统，使小鼠免疫增强，卡介苗免疫 4、8 周后，皮下接种黑色素瘤 B16 细胞，待肿瘤长到一定大小，处死动物，剥瘤称重，计算抑瘤率。同时采用抗体芯片技术，对小鼠血清中 40 种免疫相关蛋白进行定量检测，并进行结果分析。结果：卡介苗免疫 4 周后，模型组瘤重为  $5.3 \pm 1.87\text{g}$ ，卡介苗免疫后接种肿瘤组瘤重为  $3.9 \pm 0.72\text{g}$ ，抑瘤率为 26.4%；卡介苗免疫 8 周后，模型组瘤重为  $4.5 \pm 0.18\text{g}$ ，卡介苗免疫后接种肿瘤组瘤重为  $2.8 \pm 0.65\text{g}$ ，抑瘤率为 37.8%。抗体芯片结果显示，与正常组比较，模型组实验开始后 4 周，血清蛋白 TNFRI 显著升高（血清浓度高于正常组 2 倍），IL-21 显著降低（血清浓度低于正常组 1/2），8 周后血清 TNF- $\alpha$ 、G-CSF、TCA-3、IL-15、LIX、MIP-1 $\alpha$  显著降低；卡介苗免疫组 4 周后血清 MIP-1 $\alpha$ 、TARC、Eotaxin 显著升高，IL-15 显著降低，8 周后血清 BLC、G-CSF、KC 显著升高，TCA-3、MIP-1a、TNF- $\alpha$ 、M-CSF 显著降低；卡介苗免疫后接瘤组 4 周后 TNFRI、Eotaxin、BLC 显著升高，IL-21、M-CSF 显著降低，8 周后血清 TNF- $\alpha$ 、G-CSF、TNFRI、TNFRII、MIP-1a、M-CSF、IL-3、IL-13、IL-15、LIX、PF-4、RANTES、TRAC 显著降低。结论：卡介苗皮内注射可刺激小鼠免疫系统，使其免疫增强，并对黑色素瘤的增殖起到一定抑制作用，血清中免疫相关蛋白 M-CSF、G-CSF、IL-13 和 IL-21 可能与抑瘤作用相关。

## Function of Aurora kinase A in Taxol-resistant breast cancer and its correlation with P-gp

Yan Li, Ke Tang, Haijing Zhang, Yi Zhang, Wanqi Zhou, Xiaoguang Chen  
Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of  
Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050

Breast cancer is one of the most common malignant diseases among women. In early and metastatic breast cancer, Taxane (Taxol) (is widely used as an adjuvant and neoadjuvant therapies. Although breast cancer is initially responsive to Taxol, inherent or developed resistance to Taxol often limits the efficacy of the drug. The oncogene Aurora kinase A is frequently up-regulated in human cancer, and is associated with sensitivity to chemotherapy in certain types of

cancer. In the present study, we aimed to clarify the functional role of Aurora kinase A in breast cancer resistance to Taxol, and to determine the means to overcome this resistance. The correlation between the expression levels of Aurora kinase A and chemoresistance to Taxol in breast cancer cells, and resistance to Taxol in a xenograft model were demonstrated. MTT assay was performed to determine cell viability. Subsequently, the relationship of Aurora kinase A with the expression and functional role of P-gp was clarified, as well as its relationship with p-ERK2, which regulates the expression of P-gp. The expression of Aurora A was determined to be capable of enhancing the sensitivity of cells resistant to Taxol in vitro and in vivo using stable knock-down Aurora kinase A cells. We propose that this kinase may be used as a target for overcoming chemoresistance and enhancing the chemosensitivity of breast cancer to Taxol.

### 新型 Hsp90 抑制剂 LD053 抗肿瘤作用及初步机制研究

吕春婉 张翼 陈晓光

中国医学科学院北京协和医学院药物研究所 北京 100050

Hsp90 是一个在进化上高度保守, 广泛存在于真核细胞质中的分子伴侣, 它与许多其他伴侣分子一起, 维持众多客户蛋白的正确构象、稳定性及活性。其客户蛋白大多与肿瘤细胞的增殖、凋亡以及其他一些恶性表型如侵袭转移、血管生成有关。抑制 Hsp90 的功能可诱导这些客户蛋白通过蛋白酶体降解, 因此 Hsp90 已成为新的抗肿瘤分子靶点。迄今已从天然产物中提取并全合成了大量新型 Hsp90 抑制剂, 其中一些正在进行抗癌药物的临床前和临床研究。本研究的目的旨在评价一个新型 Hsp90 抑制剂 LD053 的抗肿瘤活性, 并对其作用机制进行初步研究。首先采用我们实验室已建立的荧光偏振竞争结合实验检测了 LD053 与 Hsp90 的结合强度, 之后又在多种人肿瘤细胞系中检测了该化合物抑制肿瘤细胞增殖的活性, 接下来采用 Western Blot 方法, 检测了其下游蛋白的影响, 并在裸鼠人胃癌 BGC823 异体移植瘤模型检测了其体内抗肿瘤活性。研究表明, LD053 较探针 (VER00051001) 与 Hsp90 有更强的结合力 ( $EC_{50}$ ,  $\sim 10^{-7}$  mol/L), 它在几种肿瘤细胞系中均表现出较强的抗增殖活性 ( $IC_{50}$ ,  $\sim 10^{-6}$  mol/L)。Western Blot 结果显示, LD053 以  $10^{-5}$  M/L 的浓度作用于 BGC823 细胞, 能时间依赖性地降低 p-AKT, AKT, p-GSK3 $\beta$  和 GSK3 $\beta$  的表达量。裸鼠体内实验结果表明, LD053 在 120mg/kg 的剂量下对 BGC823 异体移植瘤的生长具有一定程度的抑制作用, 且无明显毒性。上述研究结果提示, LD053 在治疗肿瘤方面具有潜在的应用价值, 其作用机制与抑制 Hsp90, 从而影响 PI3K/AKT 信号通路有关。

## 慢性髓系白血病对伊马替尼体外耐药的机制研究

丁晓霜 袁霞 陈晓光

中国医学科学院北京协和医学院药物研究所 北京 100050

Imatinib 是第一代非受体酪氨酸激酶抑制剂 (TKI), 它针对慢性髓系白血病 (Chronic myeloid leukemia, CML) 患者体内特征性、过度激活的 Bcr-Abl 激酶发挥作用。虽然 Imatinib 取得了很好的临床疗效, 但随着 Imatinib 使用时间延长, 患者对 Imatinib 耐药问题逐渐显现, 并成为影响 CML 患者预后的主要因素。

我实验室通过体外诱导得到了 K562/G3.0、K562/G5.0 和 K562/G7.0 三株对 Imatinib 不同耐药倍数的细胞株, 并对其耐药机理进行研究, 为研发抗 Imatinib 耐药的新药奠定了基础。在前期研究中, 通过二维凝胶电泳技术, 在 3 株耐药株中发现 9 个差异蛋白点, 其中 8 个在耐药株中表达升高, 而其中 4 个蛋白与肿瘤的关系密切。进一步通过基因芯片技术对耐药细胞株进行了研究, 寻找差异表达基因, 并通过 Realtime PCR 技术对与肿瘤耐药相关或有意义的差异基因进行验证, 同时通过 Western Blot 方法对部分蛋白进行分析。初步结果如下: 1. 耐药株中差异蛋白 Moesin 和 Vimentin 在基因及蛋白水平均较敏感株 K562 表达轻度升高; 2. 差异蛋白 D-3-磷酸甘油酸脱氢酶 (PHGDH) 在耐药株中的基因表达水平大幅增高; 3. 发现与差异蛋白 Annexin1 同一家族的 Annexin4 在耐药株中蛋白表达增高; 4. 与细胞增殖和转化相关的差异基因 PTGS1 (前列腺素 G/H 合酶 1), 在耐药株中随耐药倍数增高表达明显增高; 5. 差异基因 CBL-B 表达的蛋白为泛素连接酶 E3, 其基因表达在耐药株中明显降低。以上结果表明, Imatinib 体外耐药的发生机理可能与多种因素, 如细胞增殖途径活跃、糖代谢途径过度激活和蛋白降解减少等相关, 但其具体机制仍需进一步深入细致地研究。

## 抗癌药物卡波霉素的体外抑瘤作用的初步研究

孙岚 张浩 张英鸽

军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850

目的: 对活性炭纳米粒子 (ACNP) 吸附丝裂霉素 C (MMC) 所制备的新药卡波霉素 (CBMC) 的载体进行优化并对其药效进行研究。方法: 采用球磨悬浮沉淀法制备 MMC 的靶向载体 ACNP; 通过透射电镜 (TEM) 和原子力显微镜 (AFM) 对其粒径和形态进行表征; 将一定配比的 ACNP 与 MMC 超声混悬吸附, 测不同时间点未被吸附的 MMC 的量, 以吸附曲线转弯点的切线与平台线的交叉点处的时间作为吸附达平衡时间; 将不同配比的 ACNP 和 MMC 混悬液吸附达平衡后, 测未被吸附的 MMC 的量, 通过等温吸附公式确定 ACNP 与 MMC 的最佳配比。体外以恒温摇床、透析装置和磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 模拟体内环境对 CBMC 的释药特性进行分析研究。以甲基噻唑蓝 (MTT) 法研究 CBMC 对体外培养人胃癌 BGC-823 细胞株、人食管

癌 EC-109 细胞株、人结肠癌 HCT-8 细胞株和人肝癌 SMMC-7701 细胞株的生长抑制作用, 实验设生理盐水对照组、浓度分别为 0.2、1、5、25、50、100、200、400、800 $\mu\text{g/ml}$  的 CBMC 实验组和相同浓度梯度的 MMC 溶液组 (CBMC 组剂量按含 MMC 的量计)。结果: 球磨悬浮沉淀法制备的 ACNP 颗粒大小均匀、形状规则、近似球状、表面光滑, 平均粒径为  $60\pm 20\text{nm}$ ; 紫外可见分光光度计全波长扫描结果显示, MMC 在 217nm 和 365nm 吸收较强, 且在 365nm 处吸收较为稳定, 故实验中选择 MMC 的测定波长为 365nm。在 0.1—20mg/L 的浓度范围内, MMC 的吸光度 A 与其浓度 C 呈直线正相关, 回归方程为  $A=0.00421+0.06591C$  ( $r=0.99987$ ,  $P<0.0001$ )。在 25 $^{\circ}\text{C}$  时, 25min 左右 ACNP 吸附 MMC 达到平衡状态, 且随着时间的延长吸附量不再发生明显变化; 室温条件下, 所得等温方程式为  $C/X=-0.0123+0.00506C$  ( $r=0.99916$ ,  $P<0.0001$ ), ACNP 对 MMC 的饱和吸附量  $X_m=199.63\text{mg/g}$ 。1g ACNP 吸附 199.63mg MMC 达到饱和。故配制 CBMC 时 MMC 与 ACNP 质量比为 1: 5。CBMC 体外释放实验结果显示, MMC 对照组 8h 累积释放量为 98%, CBMC 释放 28d 累积释放量为 70.15%, 缓释效果明显。体外细胞实验中, 与阴性对照组相比, 对于所选取的四种细胞, 含有相同剂量 MMC 的 CBMC 组与单纯使用 MMC 组抑瘤率相比, 抑瘤效果明显, 结果具有统计学意义, 各组之间的统计结果 P 值大都维持在 0.001 以下, ACNP 组与阴性对照组相比抑瘤率均没有显著性差异。结论: 本实验室通过球磨悬浮沉淀法制备出的活性炭纳米粒子与市售的相比, 颗粒小且均匀, 质量可控, 可批量生产; MMC 与 ACNP 最佳混合吸附配比为 1: 5, 吸附时间为 25min; CBMC 具有明显的缓释效应, 突释效应不明显; 含有相同剂量 MMC 的 CBMC 体外对人胃癌 BGC-823 细胞株、人食管癌 EC-109 细胞株、人结肠癌 HCT-8 细胞株和人肝癌 SMMC-7701 细胞株的抑制作用均好于单独使用 MMC, 活性炭本身没有杀伤细胞的作用, 但可显著增强 MMC 的体外抑制细胞生长的作用。

## 鼠钙网蛋白单克隆抗体的制备

汪龚泽 刘朝奇

三峡大学分子生物学研究所 湖北宜昌 443002

钙网蛋白 (Calreticulin, CRT) 是高度保守, 普遍存在于哺乳动物细胞中的  $\text{Ca}^{2+}$  储存蛋白, 位于内质网腔中, 具有调节细胞凋亡、应激、心血管炎症反应等多种生理和病理生理过程的多功能蛋白。最新研究发现, 当细胞发生凋亡时, 膜表面 CRT 分子增多、聚集成簇, 成为凋亡细胞的“吞噬我”信号, 启动吞噬、清除凋亡细胞被的过程。经提取蛋白质研究发现凋亡细胞表面的 CRT 主要为其保守序列, 也即钙网蛋白的 N、P 段。依此我们通过 PCR 克隆小鼠的 N、P 段序列并将该段构建到 PET-28a (+) 中, 表达融合 his 标签的融合蛋白纯化后免疫小鼠制备单克隆抗体。三次免疫后取脾与杂交瘤细胞 SP20 融合筛选抗小鼠 CRT 的单克隆抗体株, 命名为 7C3。获得的单克隆株分泌的抗体经 ELISA 测定其效价为 64 万, 并经 Wester blot 鉴定制备的单克隆抗体不仅能过特异性的识别原核和真核鼠的 CRT, 同时能识别人、猴、鸡、鸭、鱼、

牛和狗的 CRT 蛋白。同时我们应用化疗药物米托蒽醌诱导小鼠黑色素瘤 B16 细胞, 小鼠淋巴瘤细胞 EL4 细胞 CRT 外翻, 并本别通过免疫荧光和流式细胞术观察 B16 和 EL4 的 CRT 的膜表达情况, 结果显示制备的单克隆抗体能过识别由化疗药物诱导的膜外翻的 CRT。由此, 我们可以得出结论我们制备了小鼠的钙网蛋白的单克隆株, 制备的单克隆抗体能应用于 Wester blot、ELISA、免疫荧光、和流式; 并且由于我们制备的单克隆抗体特异性的识别钙网蛋白的免疫调节活性区, 因此我们相信该单克隆抗体能够很好的应用于抗肿瘤的研究, 并可能成为一种特异性抗肿瘤靶向药物。

## Bcl-2 家族在阿司匹林诱导宫颈癌 Caski 细胞凋亡中的作用

杨建林 韩钰 周永芹 张伟

三峡大学分子生物学研究所 宜昌 443002

目的: 阿司匹林 (acetylsalicylic acid, ASA), 又名乙酰水杨酸, 是非甾体类抗炎药 (NSAIDs) 的代表药物, 主要通过抑制环氧化酶 (COXs) 的活性进而降低前列腺素 (PGs) 的产生发挥作用。文献报道阿司匹林对肿瘤细胞的生长有抑制作用, 可以抑制食管癌、胃癌、结肠癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、肺癌、淋巴瘤以及子宫内膜癌的生长; 普通抗炎抗风湿用的阿司匹林应用在半年以上, 可有效降低宫颈癌的发病率。最近流行病学研究证实, 阿司匹林及其它非甾体类消炎药具有降低肿瘤发病率的作用, 减少 PGE<sub>2</sub> 的产生, 恢复机体的抗肿瘤免疫功能。本研究以人宫颈癌 Caski 细胞为研究对象, 探讨阿司匹林对宫颈癌 Caski 细胞增殖、诱导凋亡的影响, 检测凋亡 bcl-2、bax 和 Caspase 3 基因表达变化以及线粒体内膜跨膜电位的改变, 进一步探讨阿司匹林抑制宫颈癌 Caski 细胞增殖机制, 以期为宫颈癌的预防与治疗提供有益的探索。方法: 阿司匹林以不同浓度 (1, 2.5, 5, 7.5, 10mmol/L) 作用于体外培养人宫颈癌 Caski 细胞。MTT 法检测细胞杀伤率; 流式细胞检测法研究细胞周期时相改变及凋亡峰的出现; 凋亡细胞 DNA Ladder 证实细胞凋亡的发生; Western blot 检测凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 的表达以及荧光染色法观察细胞线粒体膜电位的变化。结果: 阿司匹林可有效抑制人宫颈癌 Caski 细胞的增殖, 随药物剂量和作用时间的延长抑制作用越发显著; 造成 Caski 细胞凋亡峰的出现, 以及细胞周期改变; 药物作用 Caski 细胞后, Bcl-2 表达降低, Bax 表达增加, 线粒体膜电位显著下降。结论: 阿司匹林在体外可有效抑制人宫颈癌 Caski 细胞增殖, 诱导细胞凋亡。具有潜在的临床应用价值。

## 多胺类似物 BENS 联合阿司匹林有效抑制宫颈癌 Siha 细胞增殖

杨建林 韩钰 张伟 王艳林

三峡大学分子生物学研究所 宜昌 443002

目的: N1, N11-bis (ethyl) norspermine (BENS) 是人工合成的与天然多胺有着相似化

学结构的多胺类似物,最近研究证实,对非小细胞肺癌、乳腺癌和结直肠癌细胞有很强的细胞毒作用。阿司匹林 (acetylsalicylic acid, ASA) 是非抗炎药 (nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs) 的代表药物。研究证实,阿司匹林具有高效降低直肠结肠肿瘤发病率的作用;文献报道普通阿司匹林应用在半年以上,可有效降低宫颈癌的发病率。本研究旨在将 BENS 联合阿司匹林体外作用于宫颈癌细胞,研究其是否能更加有效抑制宫颈癌细胞增殖,以期为宫颈癌的预防与治疗提供有益的探索。方法:单独使用 BENS 以及 BENS 与阿司匹林联合使用处理宫颈癌 Siha 细胞,MTT 法检测细胞存活率,Western blot 检测凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 表达,化学分析法测定精胺氧化酶 (SMO) 活性。结果:BENS 联用阿司匹林可显著抑制 Siha 癌细胞增殖,抑制作用随药物作用时间的延长和浓度加大而增加,且细胞 Bcl-2 表达量减少,Bax 表达增加,诱导细胞凋亡发生。与 BENS 单独作用细胞相比具有显著差异性 ( $P < 0.05$ )。药物作用后 24h 后可显著抑制精胺氧化酶活性。结论:BENS 联合阿司匹林可有效抑制 Siha 细胞增殖,促进 Siha 细胞凋亡,其诱导凋亡机制与精胺氧化酶无关。证实 BENS 联合阿司匹林在宫颈癌肿瘤临床治疗中具有潜在的应用价值。

## 花生四烯酸代谢酶:抗肿瘤微环境形成的新靶标

杨静

武汉大学基础医学院药理学系食品与药品安全评价中心 武汉 430071

肿瘤微环境 (Tumor microenvironment) 是由肿瘤细胞、免疫细胞、内皮细胞及细胞外基质等共同构成的局部稳态环境,在肿瘤生长和转移过程中起关键作用。已知花生四烯酸 (Arachidonic acid) 在体内可经环氧化酶 (Cyclooxygenases, COXs)、脂氧酶 (Lipoxygenases, LOXs)、细胞色素 P450 (Cytochrome, CYP) 酶代谢生成类花生酸 (Eicosanoids)。迄今为止,环氧化酶和脂氧酶来源的类花生酸,如前列腺素 (Prostaglandins, PGs) 和白三烯 (Leukotrienes, LTs) 可促进肿瘤间质血管生成,调节肿瘤免疫应答和慢性炎性微环境形成,是正常微环境向肿瘤微环境转变的重要调质。本课题组研究发现 CYP 表氧化酶和  $\omega$ -羟化酶来源的类花生酸,如 EETs (Epoxyeicosatrienoic acids) 和 HETEs (Hydroxyeicosatrienoic acids) 是肿瘤血管生成的重要脂质信号分子。研究还发现 20-HETE 可通过促进内皮祖细胞 (Endothelial progenitor cell, EPC) 招募介导肿瘤间质形成,其机制与 PI3K/Akt 和 MEK/ERK1/2 信号通路激活有关。综上所述,花生四烯酸代谢酶在多种上皮来源的肿瘤组织中高表达,而且与肿瘤微环境密切相关,是肿瘤防治的新靶点。异甘草素等黄酮类小分子化合物和蜈蚣多糖蛋白复合物可通过对花生四烯酸代谢酶的广泛抑制作用达到抗肿瘤微环境形成的目的,有望成为肿瘤防治的有效药物。

## 骨架蛋白 IQGAP1 促进 Aurora-A 激酶蛋白稳定性

尹宁<sup>1,2</sup> 樊飞跃<sup>1</sup> 詹启敏<sup>2</sup>

<sup>1</sup>中国医学科学院放射医学研究所 <sup>2</sup>中国医学科学院肿瘤医院 天津 300192

目的: IQGAP1 是 IQGAPs (IQ motif containing GTPase activating proteins) 家族中的一员, 位于人染色体 15q26。IQGAP1 作为骨架蛋白参与了许多细胞进程。Aurora-A 是 Aurora 激酶家族的重要成员之一, 主要调节中心体和微管的功能, 在细胞有丝分裂过程中发挥重要作用。IQGAP1 和 Aurora-A 在多数肿瘤中均存在过表达, 并对肿瘤的转移及癌症预后有重要影响。本研究的目的就是从分子水平观察 IQGAP1 与 Aurora-A 激酶的相互关系, 并初步探讨其相互作用的机制, 从而为开发新型抗肿瘤药物提供新的思路。结果: 在 HeLa 细胞中过表达 IQGAP1 发现 Aurora-A 激酶的 mRNA、蛋白水平及亚细胞定位均未见明显改变。IQGAP1 RNAi 可以使 Aurora-A 激酶的蛋白表达水平明显下降, 但 mRNA 水平及亚细胞定位未见明显改变。在 HeLa 细胞中转染 pCDNA3.1 myc/his-IQGAP1 后, Aurora-A 激酶对放线菌酮 CHX 的敏感性明显降低。免疫荧光实验发现 Aurora-A 激酶与 IQGAP1 在 HeLa 细胞有丝分裂过程中存在共定位现象。GST-PULL DOWN 和免疫共沉淀实验均发现 IQGAP1 与 Aurora-A 存在相互作用。结论: IQGAP1 与 Aurora-A 激酶存在相互作用, 且 IQGAP1 可能通过抑制 Aurora-A 激酶的降解过程而维持其稳定性。

## 紫杉烷类化合物 Lx2-32c 对乳腺癌耐药细胞 生长抑制作用的研究

周晴 李燕 陈晓光

中国医学科学院北京协和医学院药物研究所 北京 100050

紫杉醇在临床治疗中取得了令人瞩目的成功, 但其耐药现象的出现, 极大限制了其临床应用, 并最终导致化疗失败。本研究旨在考察一种新型紫杉烷类衍生物 Lx2-32c 对乳腺癌耐药细胞的生长抑制作用, 并对其抑制耐药细胞生长的作用机制进行探索。体外实验采用人卵巢癌 MX-1 细胞株及对紫杉醇耐药的 MX-1/T 细胞株, 利用 SRB 法测定 Lx2-32c 对细胞增殖的影响, DAPI 染色法观察 Lx2-32c 对细胞凋亡的影响, 流式细胞术分析 Lx2-32c 对细胞凋亡的影响, Annexin V-FITC/PI 双染法测定 Lx2-32c 对细胞早期凋亡的诱导, DNA ladder 测定 Lx2-32c 对细胞晚期凋亡的诱导, RT-PCR 分析 Lx2-32c 对细胞内多种药泵蛋白及微管蛋白各亚型 mRNA 水平的影响, Western blotting 观察 Lx2-32c 对以上蛋白表达的影响。实验结果表明, Lx2-32c 可抑制 MX-1 细胞和 MX-1/T 细胞增殖, 抑制作用优于阳性药紫杉醇; Lx2-32c 可诱导耐药细胞出现明显的凋亡现象。机制研究表明 Lx2-32c 可影响耐药细胞药泵基因和微管

蛋白各亚型基因的转录表达, 改变 P-gp、BCRP 的蛋白表达水平, 但对 LRP 及 MRP1 蛋白以及  $\alpha$  微管蛋白的表达无显著影响。由此得出, Lx2-32c 具有较强的抗肿瘤耐药作用, 不仅对敏感株细胞, 对紫杉醇耐药的细胞亦有明显生长抑制作用。

## 多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶 (PARP-1) 抑制剂 筛选方法的建立及化合物筛选

朱枝祥 金晶 陈晓光

中国医学科学院北京协和医学院药物研究所 北京 100050

近年来的研究发现, PARP-1 作为一种重要的 DNA 损伤修复酶, 在肿瘤细胞耐受化疗药物过程中起重要作用, 抑制 PARP-1 活性能够明显增强抗肿瘤治疗的疗效, 特别是针对 BRCA 基因缺陷的肿瘤患者疗效更为显著。本研究将带有 PARP-1cDNA 序列及 6 个组氨酸表达序列的 pET32a 蛋白表达质粒转化入 HMS174plyS 表达菌株, 然后对诱导表达条件和纯化条件进行优化, 再利用优化条件进行 PARP-1 的大量表达和纯化; 然后利用 NAD<sup>+</sup> 化学定量法对酶活力、酶反应时间特性、酶活力与温度、pH 的关系、酶活力与酶激活剂 DNA 浓度的关系进行研究, 优化酶反应条件; 最后利用纯化的 PARP-1, 在优化条件下对 3-AB 及本所 600 个新化合物的 PARP-1 活性抑制作用进行测定。研究发现 pET32a-PARP-1 成功转化到 HMS174plyS 表达菌株之后, 在 0.4mM 的 IPTG 诱导下, 培养 3h 能获得较强的 PARP-1 表达, 利用镍柱纯化 PARP-1 效果良好, 50mM 咪唑洗脱液洗脱杂蛋白, 300mM 咪唑洗脱目的蛋白, 可以使 PARP-1 纯度达到 28%。PARP-1 酶反应大部分在 1h 内完成, 在 37℃、pH9.0、DNA 浓度大于 7.35mg/L 条件下酶活性最强。然后在 37℃、pH8.0、DNA 浓度大于 10mg/L 条件下测出阳性化合物 3-AB 对 PARP-1 的 IC<sub>50</sub> 为  $1.2 \times 10^{-5}$  mol/L, 本所 600 个化合物中筛选到一个化合物 W090610-49 对 PARP-1 具有较强的抑制作用, 其 IC<sub>50</sub> 为  $6.6 \times 10^{-6}$  mol/L。从而成功建立起 PARP-1 抑制剂筛选方法, 筛选获得的一个活性化合物 W090610-49 可作为先导化合物进一步做结构修饰, 进而寻找到高活性的 PARP-1 抑制剂。

## 二、神经药理

FLZ 通过激活 Akt/mTOR 信号通路和提高 RTP801 表达保护多巴胺能神经元

鲍秀琦 孙华 张丹

中国医学科学院北京协和医学院药物研究所 北京 100050

目的: 帕金森氏病 (Parkinson's disease, PD) 是发病率仅次于老年性痴呆的神经退行性疾病。主要病理特征是黑质致密体部位多巴胺能神经元变性, 纹状体内多巴胺能神经递质含量显



著减少。目前 PD 的治疗仍以药物为主，但目前上市的治疗 PD 的药物只起到改善症状的作用。FLZ 是从番荔枝叶中分离并经人工全合成的番荔枝酰胺衍生物，现已具有开发成为拥有我国自主知识产权抗神经退行性疾病一类新药的良好前景，FLZ 对实验性 PD 具有明显的防治作用，其机制可能为抗神经细胞炎症、抗凋亡和神经营养作用，因此认为 FLZ 是一种新型的神经保护剂，但 FLZ 治疗 PD 与其直接保护多巴胺能系统是否有关尚未完全阐明。本实验采用 MPTP 诱发的 PD 亚急性小鼠模型和 MPP<sup>+</sup> 损伤的多巴胺能 MN9D 细胞研究 FLZ 对多巴胺能系统的影响及相关机制。

方法：动物试验中，FLZ (25 mg/kg, 50mg/kg 和 75mg/kg) 口服给予 C57 小鼠，1h 后腹腔注射 MPTP30mg/kg，每天一次，连续 5 天。MPTP 停止注射后继续给予小鼠 FLZ，每天一次，连续 7 天。小鼠于实验的第 3d, 6d 和 12d 转棍测试，于第 4d, 7d 和 11d 爬杆测试，第 13d 处死，取黑质和纹状体做各项指标的检测。在 MN9D 细胞实验中 FLZ (0.1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M 和 10 $\mu$ M) 提前 1h 给药，然后加入 30 $\mu$ M MPP<sup>+</sup>，24h 后收集细胞检测各项指标。

结果：FLZ 于实验第 3d, 6d 和 12d 可剂量依赖性的改善小鼠转棍杆行为障碍。于第 4d, 7d 和 11d 明显改善小鼠爬杆行为障碍。FLZ 对小鼠行为学的改善作用与其提高纹状体多巴胺水平，黑质酪氨酸羟化酶 (TH) 阳性神经元数量以及 TH 活性有关。机制研究表明 FLZ 可明显提高小鼠黑质 Akt 和 mTOR 磷酸化水平，激活 mTOR 的两个重要底物 4E-BP1 和 p70S6 激酶。PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002 可明显抑制 mTOR 的磷酸化，减弱 FLZ 对 MN9D 细胞的保护作用。 $\alpha$ -synuclein 可与 TH 结合抑制其活性，FLZ 能抑制  $\alpha$ -synuclein 与 TH 的相互作用。另外研究发现 FLZ 能显著降低小鼠黑质和 MN9D 细胞 RTP801 的表达。

结论：以上研究表明 FLZ 可能通过激活 Akt/mTOR 信号通路，抑制 RTP801 的表达提高多巴胺神经元的功能，发挥其治疗 PD 的作用。结果同时表明 FLZ 是一种新型的神经保护剂，是非常有前景的治疗 PD 的候选药物。

## 多肽引导外源性蛋白质入脑转运的研究

付爱玲

西南大学药学院 重庆 400716

现代老年社会需要大量治疗脑肿瘤、中风、老年性痴呆等中枢神经系统 (CNS) 疾病的药物。然而，市场上治疗 CNS 的药物严重不足，与种类繁多的心血管系统药物相比，CNS 药物的数量少于 5 倍以上。使用综合药物化学数据库分析了超过 7, 000 种药物，能够影响 CNS 的药物仅有 5%，而这些药物主要用于治疗抑郁症和失眠等精神性疾病。

CNS 药物发展的瓶颈在于血脑屏障 (BBB)。BBB 阻碍了具有治疗潜力的大分子蛋白质从外周顺利进入脑内。脑表面积约为 12m<sup>2</sup>，共包含约一亿条毛细血管，每根神经几乎都有一条毛细血管，从毛细血管到神经之间 BBB 的平均距离约为 8~20 $\mu$ m，分子量 50, 000 Da 的大分子物质在 1 秒内的扩散距离约是 40 $\mu$ m。即一旦大分子物质能够通过 BBB，在脑中的浓度将会快速增

加,并在脑内呈一致性分布。因此,使用载体引导外源分子通过 BBB 进入 CNS 是大分子蛋白质入脑的理想途径。

能够携带蛋白质通透血脑屏障的多肽载体大致可分为两类:细胞穿透肽和血脑屏障上蛋白质受体的单克隆抗体片段。本人在国内外曾对这两类载体均进行过深入的研究,并发表了相关论文。这两类载体虽然可以将外源蛋白质如胆碱乙酰基转移酶或者神经营养因子携带入脑,但细胞穿透肽进入体内后无组织特异性,所携带蛋白在外周组织分布较多。因此,探索其它高效的靶脑载体,是实现蛋白质等大分子物质输送至脑内的必要策略。

自然界存在着嗜神经性的生物体,如狂犬病毒、朊病毒和破伤风杆菌。这些嗜神经的生物体与神经细胞具有高度的特异性。其中狂犬病毒糖蛋白衍生肽和破伤风杆菌衍生肽(TTC)分别具有 CNS 侵嗜性和运动神经元的靶向性。大分子蛋白质入脑载体的开发,无疑将对未来 CNS 生物药物的研发产生促进作用。

## The disturbance of purinergic P2X7—FasL signaling participate in brain ischemia—induced neuronal death

Gengsheng Zhang, Rongrong Tao, Jiyun Huang, Meihua Liao, Feng Han  
Institute of Pharmacology, Toxicology and Biochemical Pharmaceutics,  
Zhejiang University, Hangzhou, China.

Ischemic stroke, a significant cause of neurovascular dysfunction, can result in cerebral hypoperfusion and lead to death of brain tissue within minutes to hours. The association between ischemic injury and increased microglia—induced neurotoxicity has been accepted for several years based on experimental data. The present study addressed the morphological and biochemical aspects of FasL and its expression during the pathological process of cerebral ischemia in vivo. Intriguingly, enhanced P2X7 immunoreactivity coincided with increased anti—FasL immunoreactivity in same ischemic areas. We characterized a mechanism whereby activated microglia mediate neuronal cell death via P2X7 purinergic receptors and FasL/Fas signaling in response to ischemia. In animals treated with minocycline (45 mg/kg), less FasL expression and Fluoro—Jade C—positive structures were observed in the ipsilateral brain hemisphere of ischemic rats. Based on our observations, we predict that the early activation of P2X7 purinoceptors in microglia results in gradual accumulation of FasL and the subsequent activation of downstream cell death signaling. Taken together, these results suggest the potential of a novel therapeutic neuroprotective approach using pharmacological blockade of sustained microglial activation against neurovascular disorders.

## 补肾中药治疗阿尔茨海默病的作用机制研究

李林

首都医科大学宣武医院药物研究室 北京 100053

阿尔茨海默病 (AD) 是老年人中最常见的神经退行性疾病, 其发病机制复杂, 包括 A $\beta$  大量产生和沉积、tau 蛋白过度磷酸化、神经炎症、氧化应激、线粒体功能缺陷、神经营养因子减少、突触丢失、胆碱能神经元死亡等。因此, 仅针对单一靶点的药物治疗效果并不理想。对于病因不清、发病机制复杂的多因素疾病, 中药可能具有优势。

本研究室自 1995 年开始进行中药治疗 AD 的研究和新药开发, 自行研制了含 6 味中药的新复方制剂参乌胶囊、中药有效组分新药泰思胶囊。我们首次发现参乌胶囊和补肾中药何首乌的有效组分二苯乙烯苷 (泰思胶囊)、淫羊藿的有效组分淫羊藿黄酮和淫养藿苷、山茱萸的有效组分环烯醚萜苷在多种拟 AD 动物模型和细胞模型上具有良好的药效学作用, 包括: (1) 改善学习记忆功能; (2) 减少脑内淀粉样斑块数量, 抑制 A $\beta$  产生, 减少  $\beta$ -分泌酶或  $\beta$ -分泌酶含量, 抑制小胶质细胞激活, 减少炎性细胞因子含量, 抗氧化应激; (3) 增高蛋白磷酸酶-2A 含量, 抑制 tau 蛋白过度磷酸化, 保护细胞骨架的形态; (4) 增强线粒体功能, 增多突触含量, 增强内源性神经营养因子 NGF、BDNF 及其受体表达, 激活神经元存活信号转导通路, 改善神经再生的微环境, 减少胆碱能神经元死亡; (5) 促进内源性神经干细胞增殖和向神经元分化; 并能使移植入基底前脑的神经干细胞存活数量增多、向神经元和星形胶质细胞分化增多、胆碱能神经元数量增多。目前参乌胶囊已完成治疗 AD 的 3 期临床研究, 取得良好疗效; 何首乌二苯乙烯苷 (泰思胶囊) 已进入治疗 AD 的 2 期临床研究。

由于上述药物都属于补肾中药, 而传统中医有“肾生髓, 脑为髓海”的理论和“补肾填髓”的治则, 我们提出新的观点: 中医“补肾填髓”的现代生物学基础包括增强神经元能量代谢, 减少神经毒素产生, 增多神经营养因子及其受体, 从而减少神经元丢失和死亡, 促进神经再生。在这种新理论的指导下, 我们继续进行了补肾中药治疗其他神经退行性疾病、多种原因引起的脑损伤的研究。

### 二苯乙烯苷对转 $\alpha$ -synuclein 蛋白基因细胞的影响

李雅莉 张兰 李林

首都医科大学宣武医院药物研究室神经变性病教育部重点实验室 北京 100053

目的: 建立  $\alpha$ -synuclein 基因转染细胞+A $\beta$  的拟 AD 细胞模型, 研究二苯乙烯苷在体外对拟痴呆细胞模型的作用, 探讨何首乌主要有效成分二苯乙烯苷 (TSG) 神经保护的作用机制, 为阐明何首乌的增效机制提供试验依据。方法: TSG 购自中国药品生物制品检定所, 纯度 > 99%。过表达 A53T 突变型  $\alpha$ -synuclein 基因的 SY5Y 细胞和相应的空载体细胞由医科院药物所

陈乃宏教授馈赠。通过 CCK8 等检测 A $\beta$ 25-35 损伤细胞的浓度、时间曲线,以建立 A $\beta$  损伤的细胞模型。高糖 DMEM 培养基中加入 15% 胎牛血清及 G418,接种于 96 孔培养板培养,待细胞融合率达到 70% 进行分组。将不同浓度的 TSG (3.125nM、6.25nM、12.5nM、25nM 及 50nM) 分别与转染  $\alpha$ -synuclein 基因及空载体的 SY5Y 细胞共同孵育 24h,之后弃去含药培养基并加入工具药 A $\beta$ 25-35 孵育 24h。应用 CCK8 试剂盒测定细胞的存活率,DCFH-DA 测定细胞的活性氧 (ROS) 水平。结果:25 $\mu$ M 的 A $\beta$ 25-35 作用 24h 即可对 A53T $\alpha$ -synuclein 基因转染细胞造成明显损伤,而 A53T $\alpha$ -synuclein 基因转染细胞较空载体 SY5Y 细胞对 A $\beta$ 25-35 损伤更为敏感。TSG 与细胞共同孵育 24 小时,药物浓度范围在 3.125-50nM 范围内,细胞生长状况良好,OD 值无明显降低。细胞与 A $\beta$ 25-35 孵育 24h 后,细胞活力下降了 45%,而 TSG 可以明显拮抗 A $\beta$ 25-35 引起的细胞存活率下降,并随剂量的增加保护作用上升,至 50nM 保护作用最强 ( $P < 0.05$ )。细胞受 A $\beta$ 25-35 的损伤,细胞内的活性氧水平显著升高,而 TSG 则显著抑制了 A $\beta$ 25-35 的损伤,使得胞内 ROS 水平降低 ( $P < 0.05$ )。结论:成功建立了  $\alpha$ -synuclein 基因转染细胞复合 A $\beta$  损伤的拟痴呆细胞模型。作为中药何首乌的主要有效成分,二苯乙烯苷具有明显的神经保护作用,为进一步阐明何首乌的作用机制提供了理论基础,同时也为开发防治老年性痴呆等神经系统退行性疾病的新药提供了良好的前景。

## 激动剂特异性调控 $\delta$ 阿片受体信号转导的机制

刘景根

上海药物研究所 上海 201203

阿片受体是 G 蛋白耦联受体 (GPCR) 家族的成员之一,它主要介导内源性阿片肽和各种结构的阿片类生物碱产生的生理学效应。虽然已发现不同的阿片受体激动剂对受体脱敏和内吞的作用各不相同,但其内在机制尚不明确。我们研究了  $\delta$  阿片受体 ( $\delta$ OR) 的两种配体 DPDPE 和 TIPP 引起的信号转导事件,发现虽然两者都能抑制腺苷酸环化酶 (AC) 和激活胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2),仅 DPDPE 能引起  $\delta$ OR 脱敏和内吞。我们还发现,DPDPE 能使非受体酪氨酸激酶 Src 磷酸化并与细胞膜上受体结合,从而激活 G 蛋白耦联受体激酶 2 (GRK2),进而磷酸化受体 C 端的丝氨酸残基,并使  $\beta$ -arrestin1/2 上膜。同时,我们也发现 DPDPE 能通过依赖于 Src 的途径使  $\beta$ -arrestin1 脱磷酸。以上结果提示 DPDPE 可通过两种方式调节  $\beta$ -arrestin 的功能:促进  $\beta$ -arrestin 上膜和脱磷酸。DPDPE 的这些作用可被 Src 抑制剂 PP2 阻断。与 TIPP 相同,另一种不能引起  $\delta$ OR 脱敏和内吞的激动剂,吗啡也不能通过 Src 来调节  $\delta$ OR 的信号转导。

我们还发现了  $\delta$  阿片受体配体 DPDPE 和 TIPP 能通过不同方式激活 ERK。DPDPE 主要通过 G 蛋白依赖的方式,而 TIPP 则主要通过  $\beta$ -arrestin1/2 的依赖的方式。这一不同是由 DPDPE 和 TIPP 不同的磷酸化受体的 Ser363 残基决定的。当  $\delta$ OR 的 Ser363 位点发生无义突变时,DPDPE 也能通过  $\beta$ -arrestin1/2 激活 ERK。此外,我们还发现 TIPP 激活的 ERK 能使 GRK2 和  $\beta$ -arrestin1 磷酸化,而 DPDPE 激活的 ERK 不能;当转入 Ser363 突变的  $\delta$ OR 后,DPDPE

也能使 GRK2 和  $\beta$ -arrestin1 磷酸化。更重要的是, 通过  $\beta$ -arrestin 依赖性的途径激活的 ERK 能够磷酸化细胞质中的 GRK2 和  $\beta$ -arrestin1 并使之失活, 这一作用可能是 TIPP 不能引起  $\delta$ OR 脱敏和内吞的机制。

## 多种哺乳动物血浆中胆碱酯酶活性的比较研究

任汝通<sup>1</sup> 傅风华<sup>2</sup> 李前<sup>1</sup>

<sup>1</sup>军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850

<sup>2</sup>烟台大学药学院 烟台 264005

研究目的: 本文旨在研究分别属于灵长目、食肉目、啮齿目、偶蹄目、兔形目的 9 种哺乳动物血浆中乙酰胆碱酯酶 (AChE) 和丁酰胆碱酯酶 (BChE) 活性的差异, 并探讨影响不同种属动物胆碱酯酶活性的相关因素。实验结果: 通过文献追溯及对人、猕猴 (灵长目), 比格犬 (食肉目), 昆明小鼠、SD 大鼠 (啮齿目), 牛、羊 (偶蹄目)、大耳白兔 (兔形目) 血浆中的乙酰胆碱 (ACh)、AChE 和 BChE 活性进行测定。猪、牛、羊血浆中的 ACh 含量较高, 但 BChE 的活性较低。AChE 活性高低顺序: 小鼠>猕猴>人>犬>兔>猪>大鼠 (雄性)>羊>牛, 而 BChE 活性有着相似的顺序: 猕猴>人>小鼠>犬>兔>猪>大鼠 (雄性)>羊>牛。SD 大鼠的雌雄差别很大, 雌性的 AChE ( $1.08 \pm 0.15$  U/ml) 和 BChE ( $0.42 \pm 0.09$  U/ml) 活性明显高于雄性大鼠的活性 (AChE:  $0.31 \pm 0.03$  U/ml; BChE:  $0.13 \pm 0.01$  U/ml)。我们对不同动物 AChE 和 BChE 活性的相关性进行了统计, 相关系数为 0.77 ( $P < 0.05$ )。同时从 Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) 数据库中获得各种动物 BChE 的氨基酸序列信息, 并进行了进化树的模建。BChE 的氨基酸序列进化树表明 BChE 亲缘关系较近的动物活性也相似, 但小鼠和大鼠除外。实验结论: 先前的文献报道, 血浆或组织中的 ACh 高水平可能会导致 BChE 的活性较高, 但本文结果表明 ACh 的水平与 BChE 的活性并无明显关系, 而 BChE 的活性与 AChE 活性有一定的正相关性, 两者共同维持胆碱能系统的正常工作; 灵长目动物 BChE 的活性比其他动物高, 可能是由于灵长目动物羧酸酯酶活性较低造成的; 杂食动物和食肉动物的 BChE 活性比食草动物高, 这可能与 BChE 的解毒功能, 脂肪代谢及它们要面对更复杂的捕食环境有关, 有文献已经报道了 BChE 基因切除的小鼠在高脂肪食物的喂养下更容易肥胖; 小鼠和大鼠 BChE 活性的差异可能是由于小鼠体积小, 有更高的代谢率造成的; 大鼠雌雄的差异可能是由于体内激素水平不同造成的, 而在 25 个月之后 BChE 活性的雌雄差别就已经消失。

## 帕罗西汀抗抑郁作用与 BDNF、CRF、NET 和 5-HTT 表达关系

王涵 李娜 文威 周岐新

重庆医科大学药理学教研室 重庆 400016

目的: 研究 CUMS 致大鼠抑郁症 BDNF、CRF、NET 和 5-HTT 表达与帕罗西汀抗抑郁作

用的关系。方法：1. 应用 CUMS 加孤养建立大鼠抑郁模型。采用 open-field、糖水消耗和高价迷宫实验评价大鼠抑郁行为；以常规生物化学方法测定大鼠血清和皮质 SOD 及 CAT 活力和 MDA 含量；以放射免疫法测定血浆 CORT 水平；以免疫组化染色观察海马 BDNF 表达；以 PCR 法检测海马 BDNF 和 5-HTT，脑桥 NET 和下丘脑 CRF mRNA 表达；以 HE 染色观察海马病理形态学改变。3. 以盐酸帕罗西汀 1.8 mg/kg/d 灌胃给予观察对 CUMS 致大鼠抑郁行为的干预作用以及对正常大鼠神经精神的影响。结果：1. 模型组 (MG) 大鼠开场实验水平得分、垂直得分和理毛次数，糖水消耗，以及高架迷宫实验进入开臂次数、在开臂停留时间和探究时间均显著低于对照 (NG) 组；帕罗西汀给予显著阻遏 CUMS 所致的上述行为学改变；帕罗西汀给予对未接受 CUMS 大鼠 (PNG 组) 行为无明显影响。2. 与 NG 组相比，MG 组大鼠血浆和皮质 SOD、CAT 活力显著降低而 MDA 含量显著升高，血浆 CORT 也显著升高；MG 组海马 5-HTT 和 BDNF 以及脑桥 NET 表达显著降低而下丘脑 CRF 表达显著升高。帕罗西汀给予能明显抑制 CUMS 所致的上述改变。帕罗西汀给予对未接受 CUMS 的大鼠 (PNG 组) 无明显影响。3. 与 NG 组相比，MG 组大鼠海马 CA2 和 CA3 区域出现明显神经细胞核固缩、染色加深和形状不规则等病理形态学改变；帕罗西汀给予 (PMG 组) 能明显阻遏 CUMS 所致的海马细胞损伤。结论：帕罗西汀明显改善 CUMS 所致的大鼠抑郁行为；其作用机制至少与逆转 CUMS 所致的机体氧化应激反应和抗氧化应激反应失衡，阻遏 CUMS 所致海马 5-HTT、BDNF 及脑桥 NET 表达下降和下丘脑 CRF 升高有关。帕罗西汀对未接受 CUMS 的大鼠行为，氧化和抗氧化应激反应功能，HPA 轴，BDNF 及 NET 和 5-HTT 表达无显著影响。

## 瑞波西汀抗抑郁作用与 HPA 轴、BDNF、NET 及 5-HTT 表达的关系

李娜 王涵 文威 周岐新

重庆医科大学药理学教研室 重庆 400016

目的：研究瑞波西汀抗慢性轻度不可预见刺激 (CUMS) 所致大鼠抑郁症作用与 HPA 轴、BDNF、NET 及 5-HTT 表达的关系。方法：1. 雄性 SD 大鼠 60 只，随机分为四组，即正常对照组 (NG)、模型组 (MG)、瑞波西汀处理的正常对照组 (RNG) 和瑞波西汀处理的模型组 (RMG)。采用孤养结合 CUMS 方式建立大鼠抑郁模型；瑞波西汀灌胃给予剂量为 0.7 mg/kg/d，MG 和 NG 组给予等体积溶剂。2. 采用开场实验 (open-field)、糖水消耗和高架十字迷宫检测大鼠抑郁行为。3. 采用生物化学方法分别测定大鼠血清和大脑皮质的 MDA 含量与 SOD、CAT 活力；放射免疫法检测血清 CORT 含量；免疫组化染色检测海马 BDNF 表达；RT-PCR 检测脑桥 NET、海马 5-HTT 与 BDNF 以及下丘脑 CRF mRNA 表达；Western-blot 检测脑桥 NET、海马 5-HTT 蛋白表达。4. HE 染色光镜观察海马病理形态学的改变。结果：1. 开场实验中，大鼠水平得分、垂直得分和理毛次数；高架迷宫实验中，大鼠进入开臂的次数和时间以及在开臂向下探究的次数；以及糖水消耗率均显示 MG 组明显低于 NG 组。瑞波西汀处理显著改善 MG 组大鼠表现的抑郁行为。而瑞波西汀处理对未接受 CUMS 大鼠的行为无明显影响。

实验末, MG 组大鼠体重也显著低于 NG 组、RMG 组与 RNG 组。2. 与 NG 组相比, MG 组血清和皮质 MDA 含量显著升高, SOD、CAT 活力显著下降, 血清 CORT 浓度增加, 脑桥 NET、海马 5-HTT 和 BDNF 表达明显降低, 下丘脑 CRF 表达显著增加。瑞波西汀处理明显阻遏 CUMS 诱导的上述变化; 但瑞波西汀处理对 NG 组大鼠 MDA 水平, SOD 及 CAT 活力, CORT 水平, NET、5-HTT、BDNF 和 CRF 表达无明显影响。3. 与 NG 组相比, MG 组大鼠海马神经细胞出现明显损伤; 瑞波西汀处理明显减轻 MG 大鼠海马神经细胞损伤。结论: CUMS 致大鼠产生抑郁行为, 其机制可能与大鼠氧化应激与抗氧化应激系统失衡, 由此致 CORT 增加, NET、5-HTT 及 BDNF 表达降低有关; 瑞波西汀通过逆转氧化应激与抗氧化应激系统失衡, 降低 CORT 水平, 增加 BDNF、NET 及 5-HTT 的表达而改善大鼠抑郁行为。

### Protective effect of Rolipram on memory impairments in rats injected with amyloid- $\beta$ (25-35)

Jiangping Xu, Chuang Wang, Yufang Cheng

Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences,  
Southern Medical University, Guangzhou 510515

Phosphodiesterase-4 (PDE4) (inhibitor blocks the hydrolysis of cAMP via inhibition of PDE4 and is attractive candidate for novel anti-AD cognitive disorder drugs. We examined whether treatment with Rolipram, a cyclic nucleotide phosphodiesterase type 4 inhibitor (PDE4), would reverse the learning impairment induced by A $\beta$  (25 - 35). Our aim was to study the effects of CREB and pCREB levels in the hippocampus and cortex of the rat after injection of the A $\beta$  (25 - 35). We wanted to determine whether Rolipram improves the memory correlated with CREB and pCREB. In addition we examined the working spatial memory in a Morris water maze and passive avoidance task. The animals received a 16-day treatment of Rolipram after the A $\beta$  (25 - 35) (injection. Our results showed a significant increase of pCREB in the hippocampus and cortex of Rolipram-treated rats. There were impairments in the spatial memory evaluated in the Morris water maze and passive avoidance task. Our results suggest that Rolipram may protect memory against A $\beta$  (25 - 35) - caused impairments by inhibiting the effects of PDE4 in the hippocampus and cortex and suggests a possibility of PDE4 inhibitor rolipram as a potential therapeutic agent against memory impairments in rats induced by A $\beta$  (25 - 35). The PDE4 inhibitor may serve as a cognitive enhancer for therapeutic treatment of age-related cognitive decline and Alzheimer's dementia (AD).

## APP 转基因小鼠脑内突触及相关蛋白的改变以及淫羊藿黄酮的干预作用

张兰 楚晋 李林

首都医科大学宣武医院药物研究室教育部神经变性病重点实验室 北京 100053

目的：阿尔茨海默病（Alzheimer disease, AD）是一种进行性中枢神经系统变性疾病，其发病机制和病理过程尚不十分清楚，因而缺乏针对关键靶点的有效治疗药物。我们以往研究发现，淫羊藿黄酮具有一定神经保护作用。为进一步探讨中药淫羊藿有效成分是否在防治 AD 中能发挥作用及其药理机制，我们观察了拟 AD 动物模型——APP 转基因模型小鼠脑内突触及相关蛋白的改变以及淫羊藿黄酮的干预作用。

方法：同月龄同背景 C57BL/6J 小鼠为正常对照组，同月龄 APP 转基因阴性小鼠作为阴性对照组，4 月龄 APP695V717I 转基因小鼠分为模型组和用药组，持续饲养 6 个月至 10 月龄；其中，用药组分为淫羊藿黄酮小、大剂量组（30mg/kg、100mg/kg）；自 4 月龄始灌胃给药至 10 月龄。Morris 水迷宫和物体识别试验检测小鼠学习记忆能力。免疫组化法及免疫印迹法（Western Blotting）检测海马和皮层突触素（synaptophysin, SYP）、突触后致密物质-95（PSD-95）； $\alpha$ -突触核蛋白（ $\alpha$ -syn, AD 病人脑内老年斑另一核心成分）的表达。透射电镜观察海马神经毡突起内线粒体、细胞骨架蛋白、突触数目及突触内囊泡超微结构变化。免疫荧光双标法检测皮层及海马神经元  $\alpha$ -syn 分别与 A $\beta$ 、泛素（Ub）及淀粉样纤维共同定位，parkin 蛋白分别与  $\alpha$ -syn 及 Ub 的共同定位。

结果：（一）APP 转基因模型小鼠的增龄变化：

4 月龄 APP 转基因小鼠在 Morris 水迷宫实验中的潜伏期明显延长；海马 CA1 区神经元突起内超微结构和突触结构基本正常，但突起内线粒体结构轻度肿胀并伴有部分内嵴和外膜断裂，突触连接减少，突触数密度有降低趋势，突触囊泡明显减少；海马和皮层的突触素和突触后致密物质-95（PSD-95）表达有降低趋势。4 月龄转基因小鼠大脑海马与皮层  $\alpha$ -syn 表达已明显增加。

10 月龄 APP 转基因小鼠在 Morris 水迷宫实验中潜伏期和游泳距离均明显延长；物体识别实验中分辨指数也明显下降；海马 CA1 区突起内线粒体肿胀、嵴断裂甚至空泡化，突触数量减少，突触前后膜及突触间隙结构模糊不清，突触后致密物质变薄，神经毡内多数突触小泡减少甚至消失；皮层和海马 CA1 区、CA3 区及齿状回的突触素表达明显降低，皮层和海马 PSD-95 蛋白表达明显减少。10 月龄转基因小鼠大脑海马与皮层中  $\alpha$ -syn 表达明显增加；免疫荧光双标结果显示，10 月龄转基因小鼠海马与皮层顶叶神经元内  $\alpha$ -syn、泛素分别与淀粉样纤维存在共同定位；parkin 分别与  $\alpha$ -syn 及泛素存在共同定位，提示  $\alpha$ -syn 经由泛素-蛋白酶体途径（UPP）降解异常，发生聚集，参与淀粉样斑块形成。

（二）淫羊藿黄酮的干预作用：

淫羊藿黄酮灌胃给药 6 个月可明显缩短 10 月龄 APP 转基因小鼠 Morris 水迷宫的潜伏期和



游泳距离；提高其在物体识别实验中的分辨指数。减轻模型小鼠神经元突触损伤，使模型小鼠海马 CA1 区神经毡突起内线粒体轮廓清晰，嵴多而明显，突触连接丰富，结构基本正常，突触前后膜及突触间隙结构清晰，突触后致密物增厚，囊泡数量增加；增加 APP 转基因模型小鼠皮层及海马突触素和 PSD-95 蛋白的表达。淫羊藿黄酮能抑制 10 月龄 APP 转基因小鼠皮层及海马中  $\alpha$ -syn 蛋白过表达和聚集。淫羊藿黄酮使  $\alpha$ -syn 降解的主要途径——泛素——蛋白酶体途径中的关键成分：泛素、parkin、UCH-L1、HSP70 的表达都有所提高，提示淫羊藿黄酮通过促进  $\alpha$ -syn 降解以发挥神经保护作用。

结论：APP 转基因小鼠脑内出现多种拟 AD 病理改变，且随龄龄逐渐加重，包括学习记忆能力下降、神经元突触的病理改变、 $A\beta$  生成及  $\alpha$ -syn 相关的病理改变。APP 转基因小鼠脑内  $\alpha$ -syn 表达增高与其降解途径功能下降密切相关。中药淫羊藿有效部位淫羊藿黄酮可明显改善神经元突触结构 \ 功能，并最终改善学习记忆能力。其机制与药物通过直接抑制  $\alpha$ -syn 过表达及间接改善 UPP 降解功能减少  $\alpha$ -syn 聚集相关。 $\alpha$ -synuclein 可以做为 AD 研究及药物研发的新靶点。淫羊藿黄酮及淫羊藿苷对防治 AD 具有良好的应用前景。

## The role of peripheral anionic sites in the regulation of the spatial structure of acetylcholinesterase tetramer for high efficiency

Shuang Jiang<sup>1,2</sup>, Xiaobo Wang<sup>2</sup>, Ronggang Xi<sup>2</sup>, Yingge Zhang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850

<sup>2</sup>210th Hospital of People Liberation Army, Dalian, 116021

To study how acetylcholinesterase (AChE) (solve the paradox between its high efficiency and the narrow active center gorge (ACG), and to explore the role of peripheral anionic site (PAS) (in adjusting the active center gorge. Iced-bath ultrasound was used to prepare phospholipid membrane. Ves-fusion technique was applied in the reconstitution of G4 AChE in the phospholipid membrane on mica. The changes of submolecular structure of AChE incorporated in a mica-supported artificial lipid layer were imaged with AFM before and after reacted with substrate acetylcholine (ACh) (or propidium (PAS inhibitor) - ACh. Before reacted with substrates, single AChE G4 particle was ellipsoid in shape, and had smooth surface with a central projection and clear border and the four subunits of single enzyme particle were arranged tightly, no separated subunits being seen, with a mean size of (89±7) (nm long, (68±9) (nm wide and (6±3) (nm high. After reacted with 7 $\mu$ M S-ACh, loose arrangement of subunits of G4 AChE was seen, with the mean size of (104±7) (nm long, (91±5) (nm wide and (8±2) (nm high, and there was an apparent free space in the middle of the four subunits of the AChE G4, which was consistent with the results of the X - ray diffraction crystallography and molecu-

lar dynamics study. The apparent free space was the central path of AChE G4, changing from small to big to small to lateral door appearance, with the mean size of  $(60 \pm 5)$  nm long and  $(51 \pm 9)$  nm wide. The mean size of lateral door was  $(52 \pm 5)$  (nm wide and  $(32 \pm 3)$  (nm deep. In the presence of PAS inhibitor, ACh couldn't cause topological structure changes of AChE G4. AFM verified the central path might govern the turnover of the enzyme morphologically and the interactions between PAS and ACh might gate the creation of central path and the open of ACG in monomer; and the combination of ACh with PAS is conducive to the open of ACG while PAS inhibitor can inhibit this action. Resolution at inframolecular level is favorable to provide substantial information on how the spatial structure to adapt to the high efficiency of AChE molecules.

## 线粒体解耦联蛋白 2 介导硫化氢对帕金森病模型鼠的神经保护作用

鲁明 苏存锦 乔晨 丁建花 胡刚

南京医科大学神经药理实验室 南京 210029

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是严重危害中老年人健康、以黑质-纹状体多巴胺能神经元进行性丢失为主要病理特征、发病率仅次于阿尔茨海默病的第二大神经退行性疾病, 加强其神经保护治疗尤为必要和紧迫。硫化氢 ( $H_2S$ ) 是一种内源性气体信号分子, 参与哺乳动物众多生物学功能的调节。 $H_2S$  也是一种重要的神经调质, 激动 ATP 敏感性钾通道 (K-ATP 通道) 是最早报道的  $H_2S$  引起多种细胞效应的分子机制。研究已阐明  $H_2S$  调节脑内氧化应激、神经炎症和细胞凋亡, 可能与 PD 的病理机制相关, 但至今尚未见确切报道。

目的: 应用野生型 (wild-type, WT)、Kir6.2 敲除 (Kir6.2 knockout, Kir6.2<sup>-/-</sup>) 和线粒体解耦联蛋白 2 敲除 (UCP2<sup>-/-</sup>) 小鼠, 建立亚急性 MPTP PD 模型, 从整体、细胞及分子水平研究、阐明  $H_2S$  对 PD 的神经保护作用及其机制。

结果: 1) 在亚急性 MPTP PD 模型中, Kir6.2<sup>+/+</sup> 和 Kir6.2<sup>-/-</sup> 两种基因型小鼠中脑 TH 神经元损伤, 胶质细胞活化, 神经干细胞增殖及纹状体神经递质水平变化均无显著性差异 ( $p > 0.05$ )。2) NaHS 预处理提高模型中 Kir6.2<sup>+/+</sup> 和 Kir6.2<sup>-/-</sup> 两种基因型小鼠的存活率, 且显著改善两种基因型小鼠黑质致密部 TH 神经元减少、星形胶质细胞和小胶质细胞的增殖活化; 减轻 SGZ 区神经干细胞增殖的抑制 ( $p < 0.05$ ); 但对纹状体多巴胺及其代谢产物水平改变无显著影响 ( $p > 0.05$ )。3) NaHS 改善 MPP<sup>+</sup> 诱导的两种基因型 TH 神经元数目和平均突起长度减少; 抑制 MPP<sup>+</sup> 引起的神经元内质网应激中蛋白伴侣分子 GRP78、转录因子 CHOP、效应分子 Caspase12 和溶酶体自噬标志物 LC3 的表达上调, 并抑制下游 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活。4) UCP2 敲除取消 NaHS 对 MPTP 模型小鼠 SNc 区 TH 神经元的保护作用, 提示  $H_2S$  的神经保护作用依赖 UCP2。

结论: 1.  $H_2S$  对 MPTP PD 模型小鼠的神经损伤具有确切的保护作用。2.  $H_2S$  的神经保护

作用不依赖 Kir6.2/K-ATP 通道, 而依赖于 K-ATP 通道上游的 UCP2, 进而抑制细胞内质网应激, 减轻神经损伤。

## DJG108 对小鼠醋酸扭体的影响

徐瑞明

中国医学科学院药物研究所 北京 100050

雄性昆明小鼠, 体重 18~22g, 禁食过夜后灌胃给予 DJG108 2、10、50mg/kg。30 分钟后腹腔注射 0.7% 醋酸 0.1ml/10g 体重。观测小鼠在注射醋酸后首次扭体时间和 10 分钟内扭体次数, 与对照组进行比较。对照组首次扭体时间为  $214 \pm 43$ 。2、10、50mg/kg 扭体数为  $284 \pm 99$ ,  $224 \pm 76$ ,  $306 \pm 145$ , 所用剂量有一定延长首次扭体时间作。

对照组扭体数为  $17.8 \pm 6.6$ 。2、10、50mg/kg 扭体数为  $10.2 \pm 6.1$ ,  $13.5 \pm 4.3$ ,  $7.0 \pm 3.9^{**}$ 。2、10mg/kg 有一定的止痛作用, 50mg/kg 可明显减少醋酸引起的小鼠扭体次数。

## TREK-1 双孔钾离子通道的门控机制研究

马晓芸 华南 于金梅 张树卓 刘晓燕 吴宝红 郑建全

军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850

**【研究目的】**: 离子选择器构象的变化是钾离子通道控制钾离子流出的最有效策略, 是门控机制研究的重要内容。TREK-1 属于双孔钾离子通道, 在生理条件下可以产生自发的外向整流型背景电流, 通过维持可兴奋细胞静息膜电位决定产生动作电位的阈值, 参与神经保护、脑血管舒张以及肾上腺皮质激素分泌等生理功能。另外, 该通道还与抑郁症和肿瘤病理密切相关。尽管已知 TREK-1 的活性受胞内外许多信号的调控, 但其详细的门控机制却知之甚少。为进一步探索该通道的功能, 本课题拟探讨 TREK-1 离子选择器构象的变化对该通道电流的调控作用。**【研究结果】**: 首先, 我们发现胞外应用  $Ba^{2+}$  可强烈抑制 TREK-1 通道电流, 这种抑制呈时间和浓度依赖性。进一步的点突变研究表明,  $Ba^{2+}$  通过与该通道离子选择器内第四个钾离子结合位点 (S4) 结合来发挥这种抑制作用。根据  $Ba^{2+}$  的这种特性, 我们以该离子为工具, 对该通道的门控机制进行了探讨。结果表明, 胞外无钾和低 pH 所致的两种 TREK-1 非通导 (non-conductive) 构象都表现为抑制  $Ba^{2+}$  的解离; 在  $Ba^{2+}$  的结合方面, 胞外不同浓度的钾离子外液导致  $Ba^{2+}$  结合速率的不同, 而在胞外不同 pH 值外液  $Ba^{2+}$  结合速率相似, 表明这两种非通导构象之间仍然存在区别。最后, 在以上实验基础上, 我们对 N 末端截短形式 TREK-1 ( $\Delta N41$ , 一种天然存在的表达形式, 由选择性翻译起始机制产生) (进行了鉴定, 发现其孔区处于组成型非通导状态。**【结论】**: 胞外钾离子和质子对 TREK-1 的调控通过离子选择器的构象来实现, N 末端截短形式 TREK-1 具有组成型非通导孔区结构, 而  $Ba^{2+}$  的结合和解离速率的变化可以作为 TREK-1 孔区构象变化的标记。我们的研究为 TREK-1 离子选择器构象的变化提供了功能学证据。

## Kir6.2 构成的 K-ATP 通道在 LPS 诱导的肝胰损伤中的保护作用

杜仁红 王玲 丁建花 胡刚

南京医科大学神经药理实验室 南京 210029

脓毒败血症 (sepsis) 是一种高发病率和死亡率的急性综合征, 以广泛的炎症反应及感染的器官细胞死亡为特征, 最终导致多器官功能衰竭 (multiple organ failure, MOF), 其中肝损伤是多器官功能衰竭的一个重要标志。氧化应激、线粒体功能障碍、内质网应激、及大量的炎症因子释放在脓毒败血症引起多器官功能衰竭过程中起着非常重要的作用, 但确切的机制目前仍然不清楚, 且临床针对上述机制的治疗效果并不理想。因此阐明引起器官损伤特别是肝损伤的详细病理机制对于降低脓毒败血症的死亡率十分必要。ATP 敏感性钾通道 (ATP-sensitive potassium channel, K-ATP 通道) 是机体内耦联细胞能量代谢和电活动的独特生物感受器, 参与调节许多细胞生理病理活动。有研究发现 K-ATP 通道在缺血再灌注肝损伤中有一定的保护作用, 但 K-ATP 通道在 LPS 诱导的急性肝损伤的作用尚无报道。

目的: 应用野生型 (wild-type, WT)、Kir6.2 敲除 (Kir6.2 knockout, Kir6.2<sup>-/-</sup>) 小鼠, 研究、阐明 K-ATP 通道对 LPS 诱导的急性肝损伤的保护作用及其机制。

结果: 1) Kir6.2 敲除加重了 LPS 诱导的急性肝损伤 ( $p < 0.05$ )。2) Kir6.2 敲除小鼠核内 p65 的表达明显上调, caspase-1 的活性显著增强, 血清 IL-1 $\beta$  和 TNF $\alpha$  增多, 表明 Kir6.2 敲除增强了 LPS 诱导的 NF- $\kappa$ B 信号通路和炎症小体的激活, 及其下游炎症因子的生成 ( $p < 0.05$ )。3) Kir6.2 敲除小鼠内质网应激中蛋白伴侣分子 GRP78、转录因子 CHOP、效应分子 Caspase12 和溶酶体自噬标志物 LC3 II 的表达显著上调, 提示 Kir6.2 敲除加剧了内质网应激导致的凋亡及自噬 ( $p < 0.05$ )。4) Kir6.2 敲除小鼠血清胰岛素明显降低, 其下游 p-AKT 表达显著下调, 表明 Kir6.2 敲除抑制了胰岛素-AKT 细胞存活通路 ( $p < 0.05$ )。

结论: 1. Kir6.2 构成的 K-ATP 通道对 LPS 诱导的急性肝损伤具有确切的保护作用。2. K-ATP 通道抑制 LPS 诱导的 NF- $\kappa$ B 信号通路和炎症小体的激活, 减少炎症因子的生成; 减弱内质网应激导致的凋亡及自噬; 增强胰岛素-AKT 细胞存活通路, 发挥保护作用。

### 三、心血管药理

#### 巴戟多糖对分子搭桥中 TRPC6 通道及血管生成基因谱的影响

冯国清 白洁

郑州大学基础医学院药理学系 郑州 450001

目的: 观察巴戟多糖 (MOO) 促进人脐静脉内皮细胞 (ECV304) 增殖中对其下游瞬时受体电位蛋白 C 家族中 TRPC6 通道蛋白信号转导的影响和血管生成基因谱的作用, 以探讨

MOO 促分子搭桥的药理作用机制。方法：对正常传代生长 3~8 代的 ECV304 细胞进行缺氧 1h、复氧 2h 处理，将细胞分为：正常培养组，缺/复氧模型组 (H/R)，H/R+阳性药物组，H/R+MOO 小 ( $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、中 ( $150\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、大 ( $450\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 剂量组后给予不同剂量药物干预 24h~48h，用倒置显微镜观察其生长状态后，①加入 Trizol 试剂，并反复吹打使细胞均匀后，进行内皮细胞血管生成基因芯片 (Endothelial Cell Biology Microarray) 检测各组血管生成基因 mRNA 表达情况；②提取各组细胞蛋白用蛋白印记法 (Western-blot) 检测各药物组 TRPC6 表达情况。结果：1. 与正常组相比，模型组 TRPC6 蛋白表达量显著减少 ( $0.29 \pm 3.42 \times 10^{-2}$  vs  $0.63 \pm 3.75 \times 10^{-2}$ ,  $P < 0.05$ )；与模型组相比，用药各组 TRPC6 蛋白表达均显著较高 ( $0.85 \pm 5.16 \times 10^{-2}$ 、 $0.46 \pm 3.88 \times 10^{-2}$ 、 $0.64 \pm 5.89 \times 10^{-2}$ 、 $0.95 \pm 3.90 \times 10^{-2}$  vs  $0.29 \pm 3.42 \times 10^{-2}$ ,  $P < 0.05$ )，MOO 各组表达量与用药剂量正相关。与阳性对照药相比，MOO 小、中剂量组 TRPC6 蛋白表达少于阳性药物组 ( $0.46 \pm 3.88 \times 10^{-2}$ 、 $0.64 \pm 5.89 \times 10^{-2}$  vs  $0.85 \pm 5.16 \times 10^{-2}$ ,  $P < 0.05$ )，而 MOO 大剂量组 TRPC6 蛋白表达高于阳性药物组 ( $0.95 \pm 3.90 \times 10^{-2}$  vs  $0.85 \pm 5.16 \times 10^{-2}$ ,  $P < 0.05$ )。MOO 中剂量组 TRPC6 蛋白表达水平与正常细胞无显著差异 ( $P > 0.05$ )。2. 基因芯片检测结果显示：与模型组和正常组相比 MOO 可上调 37 种 mRNA 的表达，其中 ANGPT2、ANGPTL3、ANGPTL4、ANPEP、CSF3、CXCL11、ECGF1、FIGF、NRP1、NRP2、PGF、PLG、SH2D2A、TIMP1、TNFRSF12A、VEGFB、FGF6、VEGF 均可促进细胞增殖参与血管新生；与模型组相比 MOO 可下调 46 种 mRNA 的表达其中 COL4A3、IFNB1、IL10、SERPINF1 对细胞增殖有负向调节作用。在所上调的基因中，MOO 可通过促使 TRPC6 信号通路中 ANGPT2、VEGFB、FGF6、VEGF 的 mRNA 表达升高，使细胞内  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高，从而增加细胞的通透性，促进细胞增殖及血管新生过程。结论：1. MOO 可剂量依赖性的提高细胞内 TRPC6 蛋白的表达及 TRPC6 信号通路中多种促血管生成基因 mRNA 的表达。2. MOO 促进分子搭桥的作用机制与其促进 TRPC 通道信号转导，提高 TRPC6 蛋白表达有关

## 巴戟天糖链对 ECV304 细胞增殖中细胞周期和 BKCa 通道的影响

冯国清 陈徐旭

郑州大学基础医学院药理学系 郑州 450001

目的：观察巴戟天糖链 (MOO) 促进人脐静脉内皮细胞 (ECV304) 增殖中对细胞周期和大电导钙激活钾通道 ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) 影响的作用，以探讨 MOO 促进血管内皮细胞增殖的药理学机制。方法：对正常传代生长 3~8 代的 ECV304 细胞进行缺氧 1h、复氧 2h 处理，将细胞分为：正常培养组，缺/复氧模型组 (H/R)，H/R+阳性药物组，H/R+MOO 小 ( $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、中 ( $150\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、大 ( $450\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 剂量组。各组细胞继续培养 24h 后：①加入胰蛋白酶 (含 EDTA) 吹打使分散均匀，用 70%乙醇固定，检测时去除乙醇再加入 RNA 酶，用 PI 染料染色 30min 后进行流式细胞仪 (FCM) 检测；②各组细胞采用二次贴壁法处理，继续培养 12h 后应用全细胞膜片钳技术记录各组细胞中  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道的电流。结果：1. 流式细胞仪分析细胞各周期

分配比例的变化: 各实验组细胞周期的分配发生变化, G1 期细胞所占的比例下降, G2/S% 期细胞所占比例上升, 分别为  $31.44 \pm 0.42\%$ 、 $43.20 \pm 1.09\%$ 、 $46.49 \pm 1.65\%$ 、 $33.45 \pm 0.87\%$ 、 $34.43 \pm 0.66\%$ 、 $55.44 \pm 0.76\%$ 。以 G2/S% 为评价标准, 模型组与正常组之间比较, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。MOO 不同剂量组之间比较, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 且呈剂量依赖性。MOO 大剂量组与阳性药物组之间比较, 有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。2. 全细胞膜片钳记录各实验组细胞中 % 通道的电流: 在 +60mV 指令电压刺激下, 各实验组细胞 BKCa 通道的电流密度分别为:  $13.75 \pm 0.51 \text{pA/pF}$  ( $n=18$ )、 $14.85 \pm 0.72 \text{pA/pF}$  ( $n=7$ )、 $18.94 \pm 0.85 \text{pA/pF}$  ( $n=12$ )、 $15.97 \pm 0.79 \text{pA/pF}$  ( $n=11$ )、 $17.68 \pm 0.68 \text{pA/pF}$  ( $n=9$ )、 $19.72 \pm 1.03 \text{pA/pF}$  ( $n=15$ )。模型组与正常组间比较, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。MOO 不同剂量组之间比较, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 呈剂量依赖性。MOO 大剂量组与阳性药物组之间比较, 有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。结论: 1. MOO 可提高 ECV304 细胞缺/复氧损伤后 G2 期+S 期细胞比例, 促进细胞增殖, 并呈剂量依赖性。2. MOO 激活 ECV304 细胞 BKCa 通道作用, 为其减轻血管内皮细胞损伤并促进其增殖的机制之一。

### 血管紧张素 II 对人脐静脉内皮细胞 RAMP1 表达和分布的影响

许俊 唐江琼 刘彦梅 郭锋 罗平 陈临溪 秦旭平

南华大学药物药理研究所动脉硬化化学湖南省重点实验室 衡阳 421001

目的: 观察血管紧张素 II 对人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 降钙素基因相关肽受体修饰蛋白 (RAMP1) 含量的影响。进一步探讨 ERK1/2 信号蛋白在介导血管紧张素 II 刺激 RAMP1 变化中的作用。方法: 用血管紧张素 II 刺激 HUVEC, MTT 和流式细胞仪法观察 HUVEC 增殖和凋亡情况; 蛋白印迹术观察 RAMP1 表达和分布的变化及 ERK1/2 磷酸化水平的影响。PCR 观察 RAMP1 mRNA 表达的变化。结果: 血管紧张素 II (100mM) 对 HUVEC 增殖和活性有明显的抑制作用, 对细胞中 RAMP1 总蛋白和 RAMP1 mRNA 表达无明显变化; 但能减少 RAMP1 膜分布 ( $p < 0.01$ ); ERK1/2 阻断剂 PD98059 能抑制 ERK1/2 激活的同时, 也能增加 RAMP1 的膜分布。结论: 血管紧张素 II 对 HUVEC RAMP1 总蛋白表达无影响, 但可减少 RAMP1 的膜分布, 其信号通路与 ERK1/2 有关。

### 碘化 N-正丁基氟哌啶醇对缺氧大鼠心肌细胞钠钙 交换体电流及钙电流的影响

黄勇攀 石刚刚

汕头大学医学院药理学教研室 汕头 515041

目的: 心肌细胞肌膜上的钠钙交换体、L-型钙通道共同参与胞内钙离子稳态的调节, 对维

持胞内钙离子的平衡起着重要的作用。碘化 N-正丁基氟哌啶醇 ( $F_2$ ) 为本研究室改造合成的新化合物, 前期研究发现  $F_2$  可以拮抗缺血再灌注 (I/R) 所致对大鼠心脏损伤、抑制正常心肌细胞的 L-型钙通道电流进而减少细胞内游离钙离子的浓度, 但  $F_2$  如何调节缺氧状态下心肌细胞钙离子的平衡尚不清楚, 本实验旨在研究  $F_2$  对缺氧大鼠心肌细胞钠钙交换体电流及 L-型钙通道电流的作用并探讨其保护 I/R 心肌组织的分子机制。方法: 采用 Langendorff 灌流系统灌流 SD 大鼠心脏, 标准酶解法消化分离得到单个心室肌细胞, 给予正常台式液灌流若干分钟, 之后灌流充 90%  $N_2$ -10%  $CO_2$  的缺氧液建立体外缺氧模型, 采用全细胞膜片钳记录对照、模型以及不同浓度  $F_2$  (0.1, 1, 10  $\mu M$ ) 对钠钙交换体内、外向电流及 L-型钙通道电流, 观察缺氧以及缺氧时  $F_2$  对钠钙交换体内、外向电流及 L-型钙通道电流的影响。结果缺氧时钠钙交换体内、外向电流均减少, 主要以外向电流减少为主, L-型钙通道电流增大。 $F_2$  呈浓度依赖地抑制内、外向电流, 及 L-型钙通道电流, 钙电流 I-V 曲线上移。结论:  $F_2$  能抑制缺氧所致的异常钠钙交换体电流及 L-型钙钙电流, 防止缺氧时心肌细胞的钙超载, 从而保护心肌细胞。

## 高糖诱导的血脑屏障损伤的分子基础和机制

刘超

湖北省咸宁学院糖尿病及心脑血管病变实验室 咸宁 437100

目的: 在细胞水平探讨 AMPK→NADPH 氧化酶→氧化应激→紧密连接蛋白→血脑屏障之间的内在联系, 研究 AMPK 对氧化应激、紧密连接相关蛋白及血脑屏障的调控作用, 明确糖尿病引起血脑屏障通透性改变的分子基础和机制。方法和结果: 采用人脑微血管内皮细胞 (HBMEC) 和星形胶质细胞条件培养液构建离体血脑屏障模型, 给予高糖处理 2 小时到 1 周, 在不同时间点采用跨细胞电阻 (TEER) 或 FITC-dextran 荧光探针标记方法检测血脑屏障的完整性, 结果显示, 随着高糖处理时间的延长, 血脑屏障的渗透性明显增加, 而紧密连接蛋白 Occludin, Claudin-5 和 ZO-1 的表达明显减少; 采用 DHE 荧光标记和 HPLC 方法检测 ROS 水平, 结果显示, 高糖处理 HBMEC 72h 可诱导 ROS 产生明显升高, 而转染过表达 Cu-ZnSOD 和 Catalase 的腺病毒可抑制 ROS 形成, 并上调因高糖处理而减少的紧密连接相关蛋白; NADPH 氧化酶是血管内皮细胞中 ROS 产生的主要来源, 实验发现高糖处理 HBMEC 72h 可上调 NADPH 氧化酶 GP91phox, NOX4 和 Rac1 等亚基的表达, 给予 NADPH 氧化酶抑制剂 Apocynin 可抑制 ROS 的产生, 并上调高糖处理后的紧密连接相关蛋白的表达; AMP 激活的蛋白激酶 (AMPK) 广泛参与调节细胞代谢和功能, 实验发现高糖处理 72h 可抑制 AMPK 活性, 给予 AMPK 的药理激动剂 AICAR 或转染腺病毒 AMPK-CA (overexpression of constitutively active AMPK) 可抑制 NADPH 氧化酶的亚基的上调, 抑制 ROS 水平的升高, 上调紧密连接相关蛋白的表达; 而给予 AMPK 的药理拮抗剂 Compound C 或转染腺病毒 AMPK-DN (overexpression of dominant negative AMPK) 则效应相反。结论: 糖尿病慢性高糖诱导血脑屏障通透性增加的分子基础是紧密连接相关蛋白的丢失, 核心事件是 NADPH 氧化酶过度激活导致的氧

化应激损伤, AMPK 信号通路参与上游调控作用。

## 桑色素单硫酸酯钠盐对血栓形成的影响

刘文 何太平 梁念慈

广东医学院生物化学与分子生物学研究所 湛江 524023

目的: 研究桑色素单硫酸酯钠盐 (SMMS) 对血栓形成和全血血小板聚集影响。方法: 用化学方法合成和用 Sephadex LH-20 柱层析来纯化桑色素硫酸酯钠盐, 并用 ESI 鉴定为 SMMS; 用血栓生成仪检测 SMMS 对大鼠颈动脉血栓形成的影响; 全血与 SMMS 孵育 5min, 然后用凝血酶 (500 U/L) 诱导, 用全血血小板聚集仪检测 SMMS 对全血血小板聚集的影响; 血小板悬液与 SMMS 孵育 5min, 然后用凝血酶 (500 U/L) 作用 1min, 用 NIKON TE2000-E 荧光倒置显微镜观测血小板聚集情况。结果: SMMS 5mg/kg 和 10mg/kg 抑制大鼠颈总动脉血栓形成, 其抑制率分别为 85% 和 87%; SMMS 160、320 和 640 $\mu$ mol/L 抑制凝血酶诱导的全血血小板聚集, 其抑制率分别为 43%、71% 和 81%; 荧光倒置显微镜观测到血小板聚集的抑制作用随 SMMS 浓度的加大而增强。结论: SMMS 对血栓形成有抑制作用, 其作用机理与其抑制全血血小板聚集有关。

## 碘化 N-正丁基氟哌啶醇对缺血再灌注心肌细胞肌浆网钙泵的保护作用

王春燕 石刚刚

汕头大学医学院药理学教研室 汕头 515041

目的: 心肌肌浆网  $Ca^{2+}$ -ATPase 酶 (SERCA) (在心肌细胞中含量丰富, 心肌舒张时大多数钙离子的转移由 SERCA 完成, SERCA 在心肌钙稳态的调节中发挥重要作用。碘化-N-正丁基氟哌啶醇 ( $F_2$ ) 是我课题组合成的一个新化合物。前期研究表明  $F_2$  对心肌缺血再灌注 (I/R) 损伤以及心肌细胞的缺氧-复氧损伤有明显的保护作用, 这与其拮抗细胞内钙超载密切相关。由于 I/R 时引起钙超载的主要原因包括外钙内流增加及内钙清除减少, 因此我们在发现  $F_2$  具有阻断细胞膜上 L-型钙通道、减少钙内流后的作用后, 对主要负责清除内钙的 SERCA 作用如何, 是我们后续工作的重点内容。本研究在建立大鼠心肌 I/R 模型的基础上, 通过测定 SERCA 活性和蛋白表达的变化, 观察  $F_2$  对 I/R 状态下心肌细胞内 SERCA 功能的影响, 进一步明确  $F_2$  对心肌损伤保护作用的机制。方法: 成年 SD 大鼠随机分成以下几组: 假手术 (Sham) 组、不同时间 I/R 组: 缺血 30min, 再灌注 0min、30min 和 120min; 每个 I/R 组又设相应五个不同剂量的  $F_2$  组: 0.25mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg 和 4mg/kg; 结扎成年 SD 大鼠冠状动脉左前降支造成心肌缺血, 解除结扎即为再灌注; Western-blot 方法检测左心室缺血心肌组织匀浆 SERCA 蛋白表达的变化, 比色法测心肌组织 SERCA-ATPase 分解 ATP 生成 ADP 及无机磷的含量, 判断其活性的变化。结果: 与相应 Sham 组相比, I/R 状态下 SERCA 的活性均降低,



不同剂量  $F_2$  组: 0.25mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg 和 4mg/kg, 可量效依赖地改善 I/R 引起的 SERCA 的活性降低; Western-blot 结果显示: 缺血 30min, 再灌注 0min、30min 和 120min SERCA 蛋白表达量均未发生变化, 实验中不同剂量  $F_2$  对 SERCA 蛋白表达均未影响。结论: 心肌缺血及再灌注可导致 SERCA 活性下降, 但其蛋白表达未发生变化;  $F_2$  可剂量依赖性地改善 I/R 状态下 SERCA 的活性, 这可能是  $F_2$  发挥心肌保护作用的另一重要机制。

## 碘化 N-正丁基氟哌啶醇对培养大鼠心肌细胞 缺氧复氧损伤及蛋白激酶 C 活性的影响

王锦芝 石刚刚

汕头大学医学院药理学教研室 汕头 515041

目的: 前期研究表明, 碘化 N-正丁基氟哌啶醇 ( $F_2$ ) 心肌保护作用的机制可能与其拮抗钙超载及抑制早期生长反应基因-1 (Egr-1) mRNA 及蛋白表达相关, 作为 Egr-1 的上游信号分子蛋白激酶 C (PKC), 其抑制剂能够下调心肌细胞缺氧复氧 (H/R) Egr-1 蛋白的高表达。本研究拟探讨  $F_2$  对缺氧复氧 (H/R) 所致心肌细胞损伤及蛋白激酶 C (PKC) 各亚型转位的影响。方法: 用 1-3 d 的 Sprague-Dawley (SD) 新生乳鼠进行心肌细胞原代培养, 取生长 4-5 d 的心肌细胞分为对照组、缺氧复氧组、特异性 PKC $\epsilon$  抑制剂组、特异性 PKC $\alpha$  抑制剂组、特异性 PKC $\epsilon$  抑制剂+ $F_2$  组, 除对照组外其他各组均做缺氧复氧模型。采用非放射性同位素法测定缺氧复氧 PKC 活性、蛋白免疫印迹法检测培养心肌细胞 PKC 蛋白转位; 流式细胞仪定量检测心肌细胞凋亡、ELISA 方法检测肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的分泌、并检测乳酸脱氢酶 (LDH) 和肌酸激酶 (CK) 酶活性, 观察心肌细胞损伤及凋亡情况。结果: 心肌细胞缺氧 120min 复氧 30min 时, 与对照组相比, PKC 总活性明显升高; 除 PKC $\beta$  亚型外, PKC $\alpha$ 、 $\epsilon$  和  $\delta$  均发生转位。cPKC 特异性抑制剂 G $\gamma$  6976 可下调 Egr-1 蛋白高表达, 减少 CK、cTnI 泄漏和 TNF- $\alpha$  的分泌, 降低早期凋亡细胞检出率。PKC $\epsilon$  亚型特异性抑制剂  $\epsilon$ V1-2 可增加 CK、cTnI 漏出, 加快细胞早期凋亡进程, 但对 TNF- $\alpha$  的分泌和 Egr-1 蛋白高表达没有影响。缺氧复氧模型组给予  $F_2$  预处理后, PKC $\alpha$  转位受到抑制而 PKC $\epsilon$  转位程度增加, PKC $\beta$  和  $\delta$  转位不受影响;  $F_2$  与缺氧复氧组比较, 心肌细胞缺氧复氧后凋亡率呈剂量依赖性降低, 且  $F_2$  对心肌细胞凋亡程度的改善可被 PKC $\epsilon$  抑制剂所阻断。同时, PKC 激动剂 thymeleatoxin (TXA) 可抑制  $F_2$  对 Egr-1 蛋白高表达的下调, 拮抗  $F_2$  的心肌保护作用。结论: 心肌细胞 H/R 过程中 PKC 各亚型活性的变化与 H/R 所致损伤有关,  $F_2$  可改善缺氧复氧所致的心肌细胞损伤, 该作用机制可能与其抑制钙依赖 PKC $\alpha$  转位, 增加 Egr-1 蛋白表达; 激活非钙依赖 PKC $\epsilon$  转位相关。

## The effect of Resveratrol on Cell Apoptosis via SIRT1

WeiRong Wang, Rong Lin, QinQin Lin,

LiNa Yang, JiYe Zhang, KaiFan Zhang

Department of Pharmacology, Key Laboratory of Environment and

Genes Related to Diseases, School of Medicine, Xi'an

Jiaotong University, Xi'an, Shanxi 710061

**Aim:** SIRT1 is a nicotinamide adenosine dinucleotide — dependent histone deacetylase. SIRT1 plays a key role in the pathogenesis of cardiovascular diseases by regulating the cell apoptosis of vascular endothelial cells, vascular smooth muscle cells and cardiomyocyte. Recently, the contribution of vascular adventitial fibroblasts (VAFs) (to neointima formation and vascular remodeling has received considerable attention in cardiovascular diseases. So our study was to investigate the relationship between Resveratrol and apoptosis of VAFs via SIRT1. **Methods:** The VAFs derived from SD rats were cultured by the explanting method. The cells were treated with SIRT1 agonist resveratrol ( $20\mu\text{mol/L}$ ) (or SIRT1 inhibitors nicotinamide ( $10\text{ mmol/L}$ ) (and Sirtinol ( $15\mu\text{mol/L}$ ) (for 1 h and subsequently induced by  $20\mu\text{g/L}$  TNF- $\alpha$  for 24 h. The cell apoptosis was analyzed by flow cytometry. The SIRT1 and forkhead box O1 (FOXO1) (expressions treated with resveratrol, nicotinamide and Sirtinol were detected by Western blot. The SIRT1, FOXO1 and Bcl-2 expressions in VAFs induced by  $20\mu\text{g/L}$  TNF- $\alpha$  were detected by Western blot. The cell cycle of VAFs induced by  $20\mu\text{g/L}$  TNF- $\alpha$  was also measured by flow cytometry. **Results:** There is a significant increase in the apoptosis rate of VAFs induced by  $20\mu\text{g/L}$  TNF- $\alpha$  compared with the control group, while resveratrol decreased TNF- $\alpha$ -induced apoptosis and nicotinamide and Sirtinol increased TNF- $\alpha$ -induced apoptosis ( $P < 0.01$ ). Resveratrol upregulated SIRT1 expression and downregulated FOXO1 expression, while nicotinamide and Sirtinol downregulated SIRT1 expression and upregulated FOXO1 expression. The FOXO1 expression was upregulated and SIRT1 and Bcl-2 expressions were downregulated by  $20\mu\text{g/L}$  TNF- $\alpha$  in VAFs. The amount of G0 /G1 stage cells decreased and the S stage cells increased in  $20\mu\text{g/L}$  TNF- $\alpha$  group compared with control group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions:** Our results suggest that TNF- $\alpha$  can induce the apoptosis of VAFs and SIRT1 regulates the cell apoptosis of VAFs induced by TNF- $\alpha$ . The latest research indicates that SIRT1 regulates the cell apoptosis, cell cycle and vascular growth by FOXO1 signal pathway. Our study also suggests that Resveratrol may regulate TNF- $\alpha$ -induced cell apoptosis via the SIRT1-FOXO1 pathway by regulating the expressions of FOXO1 and Bcl-2 in VAFs.

## CGRP 通过抑制 p38 MAPK /Nox4 通路对氧化应激损伤 HUVEC 的保护作用

徐竞鸥 于潇华 刘彦梅 郭锋 罗平 唐江琼 陈临溪 秦旭平  
南华大学药物药理研究所动脉硬化化学湖南省重点实验室 衡阳 421001

目的：观察降钙素基因相关肽（CGRP）和/或过氧化氢（ $H_2O_2$ ）对人脐静脉内皮细胞（HUVEC）增殖和凋亡的影响，以及对 P38 MAPK 磷酸化和 NADPH 氧化酶（NOX4）的调节作用。以探讨 CGRP 对  $H_2O_2$  诱导 HUVEC 增殖和损伤的保护作用及分子机制。方法：体外培养 HUVEC，采用噻唑蓝比色（MTT）法观察 CGRP/ $H_2O_2$  对细胞增殖的情况；流式细胞术核染色和 PI 染色观察细胞周期和凋亡情况；WESTERN BLOT 法检测 P38、磷酸化 P38 MAPK 以及 NOX4 表达情况；RT-PCR 和 QT-PCR 法检测 NOX4 表达变化。结果：不同浓度  $H_2O_2$ （10~5000 $\mu$ M）在不同时间对 HUVEC 增殖和细胞周期的影响不同；10~1000 $\mu$ M  $H_2O_2$  在 6 小时可以诱导细胞增殖，但随着在孵育时间的延长在 24H 时对细胞增殖的抑制作用明显增加。而高浓度 5000 $\mu$ M  $H_2O_2$  在不同时间都能抑制细胞的增殖，诱导细胞凋亡。 $H_2O_2$  处理 24H 时  $IC_{50}$  约为 500 $\mu$ M。单独应用 10NM 或 100NMCGRP 均可以诱导 HUVEC 增殖，其中 100NMCGRP 能诱导静止期 HUVEC 进入 S 期，诱导病理增殖 HUVEC 回到 G1 期。WESTERN BLOT 显示 500 $\mu$ M  $H_2O_2$  能诱导 P38 MAPK 持续磷酸化，CGRP 能在 30MIN 内抑制  $H_2O_2$  诱导的 P38 MAPK 磷酸化。结论： $H_2O_2$  能持续激活 P38 MAPK 磷酸化，在 24H 时激活 NOX4 表达；CGRP 预处理能抑制 P38 磷酸化激活，能在一定程度上抑制 NOX4 蛋白和 MRNA 的表达，这可能是 CGRP 保护氧化损伤内皮细胞机制之一。

## 全脑缺血再灌注大鼠皮层金属离子含量变化

余丽娟 杨俊卿  
重庆医科大学药学院药理教研室 重庆 400016

目的：观察全脑缺血再灌注大鼠皮层金属离子含量的变化。方法：采用双侧颈总动脉夹闭合并低血压方法，建立大鼠全脑缺血再灌注（I/R）损伤模型。Morris 水迷宫检测大鼠空间学习记忆能力，HE 染色观察皮层组织病理形态学改变，电感耦合等离子体发射光谱检测大鼠皮层金属离子含量。结果：全脑缺血再灌注导致大鼠空间学习记忆能力明显降低，皮层神经元出现明显核固缩及细胞丢失。大鼠皮层组织中金属离子铁、锰、铝、铜、锌的基础水平，皮层组织中金属离子的绝对含量（ $\mu$ g/g）锌最高，锰最低，相差近 400 倍；铁与铝的水平相近。大鼠皮层铁、锰、铝、铜、锌的基础水平顺序为锌>铁>铝>铜>锰。全脑缺血再灌注组大鼠皮层组织中金属离子铁、锰、铝、铜、锌水平与假手术组相比明显增加，但是各金属离子变化的时间移行特征不同。锌离子在 I/R 后变化最早，第 30 min 即显著性增加，第 7 d 达峰；锰离子次之，在 I/R 后第 2 h 即显著性增加，第 48 h 达到高峰；铁离子在 I/R 后第 48 h 显著性增加，第 15 d

达峰；铜离子在 I/R 后第 7 d 才有显著性增加，并且为最高值；而铝离子最晚，在 I/R 后第 15 d 升高才有显著性（但也有可能是在 7—15d 已明显升高，由于取样点的关系未能发现）。所有测定的金属离子在再灌注第 30 d 时已下降，但仍明显高于假手术组。全脑缺血再灌注组大鼠皮层组织中金属离子铁、锰、铝、铜、锌水平升高的幅度也各不同。铜离子的峰值约为假手术组的 1.3 倍；铁离子约为假手术组的 1.4 倍；铝离子约为假手术组的 1.7 倍；锰离子约为假手术组的 1.9 倍；锌离子约为假手术组的 3.8 倍，即升高幅度顺序为锌>锰>铝>铁>铜。结论：研究结果提示全脑缺血再灌注损伤可导致大鼠皮层金属离子铁、锰、铝、铜、锌的含量均明显增加，其升高的机制不清楚，需要进一步深入研究。

## 新结构类型化合物调血脂分子药靶探究

朱海波

中国医学科学院北京协和医学院药物研究所

天然药物活性物质与功能国家重点实验室 北京 100050

高脂血症是脑卒中、冠心病、心肌梗塞、心脏猝死的重要危险因素，也是高血压、糖尿病发生的主要诱因。新结构新机制调血脂药物的研发是国际制药领域基础和应用研究的热点课题。

本研究采用多种技术和手段对源于天然产物的新结构类型化合物 WS070117 调血脂作用机制进行系统探究，以期揭示与传统调血脂药物结构类型不同的新结构化合物分子靶点，为其新药开发提供依据。

以自主建立快速蛋白分离和荧光标记技术证实：在啮齿类动物中，金黄地鼠和 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠的血脂蛋白谱与人类最为接近。新结构类型化合物 WS070117 能明显降低高脂血症金黄地鼠血浆胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平。

超声影像学 and 油红染色病理结果均显示 WS070117 改善动物肝脏脂肪变性。高分辨魔角探头检测则发现该化合物不仅能够降低血中大分子低密度脂蛋白含量，而且有增加血浆和肝脏中内源性小分子物质如牛磺酸、甜菜碱等心血管保护物质作用。

WS070117 能明显改善正常和高脂饲料喂养 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠血脂代谢紊乱，抑制肝脏、血管壁中氧自由基生成和动脉粥样硬化斑块形成。体外研究结果表明 WS070117 对 4 种自由基有清除作用，且能直接抑制人源化 LDL 氧化过程。

液质联用和微量核磁共振波谱技术研究表明 WS070117 进入体内经酯酶水解很快转化为代谢产物 M1，M1 可进一步加合 II 相基团（葡萄糖醛酸和磺酸）随胆汁和尿液排出体外。M1 腹腔注射给药 40mg/kg 能显著降低高脂血症金黄地鼠血浆 TC 和 LDL-C，而口服相同剂量 M1 未见上述作用。上述结果表明 M1 是 WS070117 进入体内的活性代谢产物。

分子生物学和同位素测定技术表明 M1 对传统降血脂药物作用靶点（HMG-CoA 还原酶、PPAR $\alpha/\gamma$ 、LDL 受体、FAS）未见明显影响。分子对接结果表明 M1 能以疏水、静电和氢键相互作用与 AMP 激活的蛋白激酶（AMPK）调节性  $\gamma$  亚基直接结合，等温滴定量热实验结果证实

了上述观点。采用国际通用的 AMPK 活性检测方法——<sup>32</sup>P 标记技术，分别从分子、细胞和动物水平证实 M1 及 WS070117 激活 AMPK。采用 HPLC—MS/MS 技术发现 M1 进入细胞可生成磷酸化产物 MP，在 12h 内 MP 水平持续升高，与给药后细胞内 AMPK 活性升高呈正相关，为分子水平 M1 及 WS070117 激活 AMPK 强度不如细胞水平提供依据。

WS070117 可明显抑制油酸诱导的 HepG2 细胞脂质堆积，以时间和浓度依赖性方式促进细胞内 AMPK 磷酸化表达，抑制下游乙酰辅酶 A 羧化酶（ACC）活性，使胆固醇和甘油三酯合成受阻，AMPK 特异性抑制剂 Compound C 或 siRNA 干扰 AMPK $\gamma$  亚基可抑制上述作用。采用高效液相、特异性抑制剂等技术手段证实 WS070117 在细胞水平激活 AMPK 与其上游调控元件 LKB-1、CaMKK 及细胞 AMP:ATP 比值无关。上述结果表明 WS070117 通过直接激活作用使细胞内 AMPK 活性升高，促进其信号下游分子元件活性改变，从而发挥调血脂作用。

新结构类型化合物 WS070117 通过激活 AMPK 信号通路发挥调血脂作用，其抗氧化作用在抑制动脉粥样硬化发生中扮演重要角色。

## 新结构类型调血脂化合物与靶蛋白 AMPK 分子间相互作用初步解析

李瑾 朱海波

中国医学科学院北京协和医学院药物研究所

天然药物活性物质与功能国家重点实验室 北京 100050

AMP 激活的蛋白激酶（AMPK）激动剂目前是研究肥胖、糖尿病等代谢性疾病的国际热点。

本研究试图从分子层面解析新结构类型调血脂化合物 WS070117 与靶蛋白 AMPK 的相互作用方式。采用国际通用的 AMPK 活性检测方法——<sup>32</sup>P 标记技术，分别从分子、细胞和动物水平证实 WS070117 增加 AMPK 活性。

分子对接结果表明 WS070117 能以疏水、静电和氢键相互作用与 AMPK 调节性  $\gamma$  亚基直接结合，等温滴定量热实验结果证实了上述观点。表面等离子共振实验从动力学角度阐明 WS070117 与 AMPK $\gamma$  亚基结合模式为快速结合快速解离，平衡解离常数在  $\mu\text{M}$  级。

圆二色谱实验从蛋白结构角度表明 WS070117 结合可以引起 AMPK $\gamma$  亚基二级结构和三级结构改变， $\alpha$  螺旋含量减少 13.5%，苯丙氨酸构象发生改变。核磁共振波谱实验从小分子化合物结构角度说明 WS070117 嘌呤环、乙酰基和苯环上的氢与 AMPK $\gamma$  亚基有相互作用。

上述结果为证实 WS070117 为新型 AMPK 小分子激动剂提供有力证据，为阐明 WS070117 激活 AMPK 分子作用机制提供实验依据。

## 探讨化合物 WS070117 调血脂靶点及相互作用机制

连泽勤 朱海波

中国医学科学院北京协和医学院药物研究所

天然药物活性物质与功能国家重点实验室 北京 100050

2', 3', 5'-tri-O-acetyl-N<sup>6</sup>-(3-hydroxyaniline) (adenosine (WS010117)) 是我所合成的新结构类型化合物。其可以改善高脂饲料诱导的啮齿类动物（金黄地鼠，豚鼠和家兔）血清脂质紊乱，抑制脂肪肝形成和脂肪组织脂肪堆积。体外高脂肪酸诱导细胞脂肪变性模型研究显示，WS070117 通过抑制脂肪酸从头合成和促进脂肪酸氧化，缓解细胞脂肪变性，降低细胞内总胆固醇和甘油三酯含量。核磁共振代谢组学研究表明 WS070117 促进细胞能量生成，降低细胞内脂质含量，提高保护肝细胞功能的代谢物生成。结合分子对接结果分析，AMP 激活的蛋白激酶（AMPK）可能是 WS070117 作用靶点之一。

WS070117 激活 HepG2 细胞内 AMPK 活性，提高 AMPK 磷酸化水平，呈剂量和时间依赖性。WS070117 通过激活 AMPK，抑制其下游分子乙酰 CoA 羧化酶（ACC）活性。WS070117 提高脂质变性细胞中 AMPK 磷酸化水平，与金黄地鼠肝细胞 AMPK 磷酸化升高一致，提示 WS070117 改善脂质代谢与提高 AMPK 活性相关。

对 AMPK 上游调控因子研究发现：WS070117 能够在分子水平激活 AMPK 活性；不影响细胞内 AMP/ATP 比值；HeLa 细胞系天然缺失 LKB-1，WS070117 仍然能激活细胞中的 AMPK，且这一作用不被 CaMKK 抑制剂所阻断。上述结果提示 WS070117 激活 AMPK 不依赖其上游调控因子。分子对接结果显示，WS070117 与 AMPK $\gamma$  亚基上 AMP 模拟结合腔具有较高结合活性。通过核磁共振和表面等离子共振技术证实 WS070117 与 AMPK $\gamma$  亚基存在直接相互作用，并具有快速结合解离特点，其嘧啶环、苯环和甲氧基是与靶蛋白相互作用的位点结构。根据 AMPK $\gamma$  亚基设计 siRNA 干扰后，WS070117 不能提高细胞内 AMPK 活性，对肝细胞脂肪酸氧化和脂质从头合成的影响也消失。

综上所述，作为新结构类型 AMPK 激动剂，WS070117 通过与 AMPK $\gamma$  亚基直接相互作用，激活细胞内 AMPK，抑制下游分子 ACC 活性，实现其调节脂质代谢紊乱作用。WS070117 可能是一个潜在的新结构类型、新作用机制调血脂药物，有进一步开发价值。

## 人源性细胞膜穿透肽的开发及应用

柳长柏 马杰兰 张洁

三峡大学分子生物学研究所 宜昌 443002

随着对基因组信息解读的不断深入，越来越多的生物大分子作为候选药物进入了分子治疗领域，但由于细胞膜的屏障作用使大多数生物大分子难于进入细胞内部发挥效能。细胞膜穿透

肽 (CPP) 是一类能穿透细胞膜和/或核膜的短肽并能引导所携带的蛋白质、核酸甚至纳米颗粒等进入细胞 (核) 内。作为一种全新的非病毒药物载体, 以其安全、易于组装等诸多优点被寄予厚望。但是迄今的 CPPs 穿膜效率并不理想, 数量有限、特别是人源性 CPPs 稀少, 亟需探索开发更多、更好的 CPPs 以提高其载药效率、安全性和应用范围。近年来我们在 CPP 开发及应用方面进行了一些尝试, 诸如探索和优化 CPP 的穿膜条件, CPP 的靶向及穿膜效应, CPP 介导的 DNA 转染效率, 以及设计开发新的人源性 CPP 等。对 CPP 的深入研究将为推广基因工程蛋白药物的应用和基因治疗研究提供新兴载药工具。

## 物质粒子尺度与功能间的关系

张英鸽

军事医学科学院毒物药物研究所纳米药理毒理学重点实验室 北京 100850

物质结构与性质之间关系的建立对于人类认识物质世界是一个重要的方法。元素周期表的建立极大的促进了化学科学的发展, 已为人们所熟知。虽然物质都具有波一粒二相性, 但粒子是人们了解最多的一种最基本的物质存在方式。尺度是物质粒子最重要的属性之一。按照尺度, 自然界的物质粒子可被分为几个大小水平。不同大小水平上的物质都有自己特有的运动和相互作用规律。粒子在小与他们的运动及相互作用之间的关系的阐明, 是人类对自然界的物质认识进步的产物。正像人们通过化学元素周期表和达尔文生物进化论而加深对化学科学和生命科学的理解那样, 对于这些结果进行分析, 将大大加深我们纳米科学和技术及生命科学的理解。在此之前, 物理学家们曾按尺度的大小将自然界的物质分为微观、介观和宏观三个水平, 但这三个水平不能揭示物质大小与其功能间的关系。另外, 关于不同水平上的粒子的名称很多, 如在高能物理领域中的基本粒子和高能粒子和在化学领域中的原子、分子和离子等。这些粒子名称只不过是人们对于某一物体的称呼。在这些粒子的概念之间容易混淆, 不能对科学探索有所启示。因此, 有关物质大小与其功能间的关系这一问题, 在我们的专著《纳米毒理学》一书中已经提及。这里我们试图对这一问题进行更深入的分析, 并试图建立物质粒子大小水平与其功能间的关系。

随着纳米科学和纳米技术的发展, 物质的尺度谱现在可以建立起来了。按照粒子的尺度, 自然界的物质从小到大, 从简单到复杂可被划分为六个层次 (图 1)。这六个层次分别是 (1) 点粒子: 主要包括各种各样的光子等无质量粒子, 不参与化学物质的结构组成, 只作为能量的载体而存在, 没有可测定的空间尺度; (2) 基本结构粒子: 为组成化学物质的最基本结构单位粒子, 主要包括夸克、介子、电子、中子及质子等先前物理学中所称的基本粒子, 支配粒子间相互作用的力有四种, 粒子的特征尺度为  $10^{-18} \sim 10^{-15} \text{ m}$ ; (3) 化学粒子: 为保持物质化学性质的最小粒子, 主要包括原子、分子和离子, 支配粒子间相互作用的力主要是电磁相互作用, 其特征尺度为  $10^{-15} \sim 10^{-9} \text{ m}$ ; (4) 纳米粒子: 为保持物质的生物学性质最小粒子, 主要包括蛋白质和核糖核酸等生物大分子; 无机纳米粒子种类和数量众多, 支配纳米粒子间相互作用的力主要

是弱相互作用。纳米粒子的特征尺度为  $10^{-9} \sim 10^{-6}$  m；(5) 宏观粒子：宏观粒子为保持物质生命活动的最小粒子，主要包括各种各样的微生物、动物及植物等各种生命个体；无机的宏观粒子则包括各种各样的具有宏观尺度的物体，各种机器是人造的具有复杂功能的宏观粒子。宏观粒子的特征尺度为  $10^{-6} \sim 10^2$  m；(6) 天体粒子：是在宇宙中运行的各种天体，目前人们所知的最小天体近似为  $10^3$  m，因此暂时可以大致确定天体粒子的下限为 103 m。就目前所知，点粒子为最简单的粒子，其活动最为简单，点粒子之间中没有已知的相互作用；基本结构粒子已具有相当复杂的活动，粒子之间具有复杂的相互作用，这些相互作用引起各种基本结构粒子的产生；化学粒子的活动更为复杂，粒子之间也具有更为复杂的相互作用，这些相互作用产生不可胜记的新的分子和离子，构成五彩缤纷的化学世界；纳米粒子的功能活动又比化学粒子更为复杂，粒子间的相互作用产生各种各样具有生命特征的生物粒子；到了宏观尺度，粒子的功能活动达到最为复杂，粒子间的相互作用产生各种各样的新的生命个体，这些生命个体可以具有学习、记忆及思维等高级神经活动；相对于天体粒子的功能活动，相对于前面所述的五种粒子来说，我们目前所知甚少。

#### 四、抗炎免疫药理

Inhibition of acid-sensing ion channels by amiloride protects rat articular chondrocytes from acid-induced apoptosis through mitochondrial-mediated pathway

Chao Rong, Feihu Chen, Sheng Jiang,

Wei Hu, Nian Wang, Fanrong Wu

College of Pharmacy, Anhui Medical University;

Key Laboratory of Natural Product Bioactivity of Anhui Province;

Three-level Laboratory of Scientific Research of Traditional Chinese

Medicine of State Administration of Traditional Chinese Medicine of

China "Pharmacology of Traditional Chinese Medicine"; Hefei, Anhui 230032

Objective: Cartilage homeostasis is profoundly affected by local acidosis in the joints. The diuretic amiloride has recently been proven neuroprotective in models of cerebral ischemia, a property attributable to the drug's inhibition of acid-sensing ion channels (ASICs). However, little known about its effect on the apoptosis induced by extracellular acid in articular chondrocytes. The present study aims to investigate whether amiloride could restrain the acid-induced apoptosis of rat articular chondrocytes in vitro. Methods: Primary rat articular chondrocytes were isolated, cultured and divided into five groups, Chondrocytes cultured in the pH7.4 solution without amiloride were used as controls. The cells have been induced to apoptosis by expo-



sure to extracellular solution (pH6.0), while simultaneously treated with various concentrations of amiloride (50, 100, 200 $\mu$ M). The apoptotic rate, mitochondrial function, the levels of apoptosis-related genes Bcl-2 family mRNA and the activity of caspase-3/9 in chondrocytes were examined. Results: The results showed that amiloride could inhibit chondrocyte apoptosis in a dose-dependent decline of apoptosis with ratio of 27.7%, 20.2% and 15.9%, respectively. Furthermore, it could partly restore the levels of mitochondrial membrane potential by regulation of Bcl-2 family genes mRNA expression, and activity of caspase-3/9 in chondrocytes induced by extracellular acid. Conclusions: Our findings demonstrated that amiloride could protect acid-induced apoptosis in rat articular chondrocytes by increasing anti-apoptotic ability, down-regulation of proapoptotic factors, protecting mitochondrial function.

### bFGF 及相关细胞因子转染对人骨关节炎软骨细胞的作用

陈彪<sup>1</sup> 陈廖斌<sup>1</sup> 秦俊<sup>1</sup> 汪晖<sup>2</sup> Jaques Magdalou<sup>3</sup>

<sup>1</sup>武汉大学中南医院骨科;<sup>2</sup>武汉大学基础医学院药理学系

<sup>3</sup>法国南锡一大医学院, 法国国家科研中心 UMR7561 研究处

目的: 探讨腺病毒介导的人碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 单独及与白细胞介素-1 受体拮抗蛋白 (IL-1Ra) 和/或胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 共同转染人骨关节炎 (OA) 软骨细胞后对软骨细胞的影响。方法: 采用单独 AdhbFGF 或多重组合的重组腺病毒载体转染单层培养的人 OA 软骨细胞。6 d 后分别检测培养上清液中目的基因表达和糖胺聚糖 (GAG) 含量。MTT 法及流式细胞术分析软骨细胞的增殖及凋亡。甲苯胺蓝染色及 II 型胶原免疫组化观察软骨细胞基质的合成。免疫印迹法检测 II 型胶原、基质金属蛋白酶-3 (MMP-3) 及其抑制剂-1 (TIMP-1) 的表达。采用单向方差分析进行组间两两比较。结果: 各基因转染后, 细胞上清液目的基因表达与 OA 对照组相比明显增高 ( $P < 0.05$ )。bFGF 单独转染可促进软骨细胞增殖, 增加 II 型胶原和蛋白多糖的合成 ( $P < 0.05$ )。与 bFGF 单独转染相比, 联合 IL-1Ra 和 (或) IGF-1 共同转染后, 可降低软骨细胞的凋亡率 ( $P < 0.05$ ), 进一步增加了软骨基质的生物合成 ( $P < 0.05$ )。同时, 抑制了 MMP-3 的表达, 增加了 TIMP-1 的表达。结论: 腺病毒介导的 bFGF 转染人 OA 软骨细胞可促进细胞增殖, 增加基质的合成。与 IL-1Ra 和 IGF-1 共转染后可发挥协同作用, 进一步增加基质合成; 同时抑制了基质的降解。

### 糖皮质激素对 IL-13 刺激肺成纤维细胞的影响

陈晓红 李怡然

第三军医大学药理学教研室 重庆 400038

目的: 观察 IL-13 激活肺成纤维细胞的作用, 研究吸入型糖皮质激素布地奈德 (BUD) 对

IL-13 作用的干预及其机制。方法：IL-13 加入培养的肺成纤维细胞，采用噻唑蓝法、免疫组织化学法、免疫印迹法、逆转录聚合酶链反应、ELISA 等方法检测细胞增殖、 $\alpha$ -肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 表达及分泌 IL-6、嗜酸粒细胞趋化因子 (eotaxin) 的变化，观察 BUD 的作用并从 IL-13 的信号途径和 mRNA 衰变分析 BUD 的作用机制。结果：加入 20 ng/ml 的 IL-13 后，成纤维细胞分泌 IL-6 明显增加 ( $20 \pm 2$ ) (pg/ml 和 ( $140 \pm 8$ ) (pg/ml，分泌 eotaxin 也明显增加 ( $64 \pm 25$ ) (pg/ml 和 ( $340 \pm 51$ ) (pg/ml。 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L BUD 组 IL-6 表达水平较 IL-13 组明显下降，分别为  $55 \pm 14$ 、 $42 \pm 5$ 、 $40 \pm 3$ 、 $32 \pm 6$  pg/ml g/ml。BUD 组 IL-6 mRNA 表达比 IL-13 组明显减少。细胞上清液中 eotaxin 水平较 IL-13 组明显降低，分别为  $287 \pm 59$ 、 $263 \pm 57$ 、 $235 \pm 59$ 、 $183 \pm 72$  pg/ml。IL-13 诱导成纤维细胞表达  $\alpha$ -SMA mRNA 及蛋白明显增加，并促进成纤维细胞增殖 ( $1.47 \pm 0.20$ ) 倍。BUD 对 IL-13 诱导的  $\alpha$ -SMA mRNA 及蛋白的表达无明显影响，并明显具有协同 IL-13 促进成纤维细胞增殖的作用。IL-13 主要通过 JAK/STAT6 信号途径激活成纤维细胞，BUD 不影响 STAT6 磷酸化，也不影响 STAT6 转录活性。mRNA 衰变分析表明，BUD 不影响 IL-6 mRNA 衰变，但促进 eotaxin mRNA 衰变。结论：BUD 对 IL-13 刺激成纤维细胞的作用具有多重调节效应。BUD 抑制 IL-13 诱导成纤维细胞合成、释放炎症介质 IL-6 和 eotaxin 的作用，有利于改善气道上下皮纤维化，但对于 IL-13 促进成纤维细胞转化为肌成纤维细胞及其增殖方面起负面影响。

## 脂质体转染 TRPM7 siRNA 对肝星状细胞系 HSC-T6 细胞增殖的影响

贾丽莎 李俊 黄艳 黄成

安徽医科大学药学院天然药物活性研究省级重点实验室

国家中医药管理局中医药三级实验室“中药药理实验室” 合肥 230032

目的：通过利用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 下调 TRPM7 基因的表达，研究 TRPM7 对大鼠肝星状细胞系 HSC-T6 细胞活化、增殖的影响。

方法：人工合成抑制 TRPM7 基因的 siRNA 片段，通过脂质体 Lipofectamine™2000 转染到 HSC-T6 细胞内，用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法测量细胞增殖变化；流式细胞术检测细胞周期变化；RT-PCR 检测 I 型胶原、 $\alpha$ -SMA 及 TRPM7 的 mRNA 表达。结果：转染 siRNA 后的 HSC-T6 细胞增殖受到显著抑制，I 型胶原、 $\alpha$ -SMA 及 TRPM7 mRNA 表达显著下降。结论：应用 RNA 干扰靶向抑制 TRPM7 基因可以显著抑制 HSC-T6 细胞的活化及增殖，下调 TRPM7 基因的表达可能是潜在的肝纤维化治疗方法。

## ASIC1a 过表达对佐剂性关节炎大鼠关节软骨细胞代谢的影响

江晟 陈飞虎 荣超 王念 胡伟 吴繁荣

安徽医科大学药学院天然药物活性研究省级实验室

国家中医药管理局中医药科研三级实验室“中药药理实验室” 合肥 230032

目的：构建真核表达 pcDNA3.1/ASIC1a 质粒，转染佐剂性关节炎（AA）大鼠关节软骨细胞，建立酸敏感离子通道 1a（Acid-sensing ion channel 1a, ASIC1a）基因在关节软骨细胞中过表达的模型，观察 ASIC1a 过表达对 AA 大鼠关节软骨细胞代谢的影响，探讨 ASIC1a 在 AA 大鼠关节软骨破坏中作用。方法：利用聚合酶链反应技术扩增目的基因 ASIC1a，并用限制酶 Xba I 和 BamH I 进行双酶切，同时用这两种酶双酶切质粒 pcDNA3.1，将两种酶切产物按常规方法连接并转化入大肠杆菌，挑去菌落培养，提取质粒，进行酶切鉴定及测序，然后利用转染试剂盒将所构建质粒转染入关节软骨细胞中建立 ASIC1 过表达模型，分别利用 RT-PCR 和 Western blot 技术检测 AA 大鼠软骨细胞和过表达模型细胞中 ASIC1a mRNA 和蛋白的表达情况，激光共聚焦显微镜观察胞外酸化  $Ca^{2+}$  内流情况，免疫细胞化学法检测 AA 大鼠关节软骨细胞与过表达组细胞的 II 型胶原含量，检测酸化后不同时间段和不同胞外酸化程度下细胞上清液中乳酸脱氢酶水平。结果：pcDNA3.1/ASIC1a 质粒转染细胞后，获得稳定阳性克隆细胞，通过对 ASIC1a mRNA 及其蛋白相对表达量检测，表明转染后细胞 mRNA 和蛋白表达都相对上升；胞外酸化后两组细胞  $Ca^{2+}$  内流均增加，过表达组趋势更加明显；未过表达的关节软骨细胞中 II 型胶原含量高于过表达组（ $P < 0.05$ ）；细胞上清液中 LDH 含量随时间延长和胞外 pH 的降低而增加，与未过表达组细胞相比过表达组增加趋势明显（ $P < 0.01$ ）。结论：AA 大鼠关节软骨细胞存在 ASIC1a 的表达，且通过基因水平干预使 ASIC1a 过表达后，软骨细胞对胞外钙离子通透性，细胞外基质中 II 型胶原含量，以及细胞上清液中 LDH 含量均发生变化，表明 ASIC1a 在 AA 大鼠关节软骨细胞代谢中发挥着重要作用，这为类风湿性关节炎软骨破坏机制的研究提供新的方向。

## 两种抗补体蛋白对脂多糖致急性肺损伤的保护作用研究

李敏<sup>1,2</sup> 沈良贤<sup>3</sup> 张湘燕<sup>1,2</sup> 孙黔云<sup>3</sup>

<sup>1</sup>贵州省人民医院呼吸内科 <sup>2</sup>贵州省呼吸疾病研究所

<sup>3</sup>贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室 贵阳 550002

目的：探讨补体系统不同成分在急性肺损伤（acute lung injury, ALI）中的作用，进一步认识补体参与 ALI 病程发展的方式和机理。方法：分别采用 Atrase A 和眼镜蛇毒因子（cobra venom factor, CVF）两种不同类型的蛇毒抗补体蛋白抑制大鼠体内补体。实验采用脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）致大鼠 ALI 模型，其中控制补体的实验组分别提前 2 h 给予 Atrase A

和提前 24 h 给予 CVF。在给予 LPS 后 1 h、6 h、12 h 采集标本，测定各组血清补体活性和肺含水量，取支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid, BALF）测定细胞数、蛋白含量、TNF- $\alpha$  和 P-selectin 含量，比色法测定肺组织匀浆中髓过氧化物酶（myeloperoxidase, MPO）含量，取肺组织行病理切片检查。通过对上述实验指标的分析，比较两种不同的补体干预方式对 LPS 致大鼠 ALI 的作用和影响，探讨补体不同成分在 ALI 中的作用。结果：模型组给予 LPS 后血清补体活性明显下降，出现了典型的 ALI 病理改变。两种抗补体蛋白均能明显降低肺组织 MPO 含量、BALF 中细胞数、TNF- $\alpha$  和 P-selectin 含量，有效减轻肺组织炎症反应和病理损伤，但对肺含水量和 BALF 中蛋白含量的影响无统计学意义。分析比较两种抗补体蛋白实验组的结果，表明两者的保护作用特点存在显著差异，采用 CVF 完全去除补体（C3 和 C5-C9）仅在 ALI 早期有明显的保护作用，而仅部分抑制补体的 Atrase A 则明显优于 CVF。结论：抑制补体能显著减轻 LPS 导致的急性肺损伤，CVF 所作用的 C3 和 C5-C9 参与了 ALI 的早期病理损伤，Atrase A 所作用的特定补体靶标成分在 ALI 病理进程中则扮演了更重要的角色。

## The effect of acute and chronic allergen challenge in a new mouse model of allergic asthma

Renping Liu<sup>1</sup>, Aiming Meng<sup>1</sup>, Qi Hou

Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; <sup>1</sup>Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

**Background:** Existing asthmatic murine models develop tolerance when repetitively exposed to the same allergen. However, patients with asthma are chronically exposed to more than one allergen. Because asthma is a complex multi-factorial disease, it is unlikely that an animal model for asthma challenged by a single allergen really reflects all of the morphological and functional features of the chronic human disease.

**Objective:** In this study, we have established a chronic asthma model that imitates well some features of human allergic asthma long after the discontinuation of exposure to the combined extract of dust mite, ragweed and *Aspergillus* species. This is compared with the asthmatic model with the acute challenge of OVA and with the chronic challenge of the combined allergens. **Methods:** The crude extract of dust mite (5 $\mu$ g, *D farinae*), ragweed (50 $\mu$ g), and *Aspergillus* species (5 $\mu$ g) (in alum were subcutaneously (100 $\mu$ l behind the ear) (injected into female BALB/c mice (18 g weight) (once per week for 2 weeks and then challenged intranasally (15 $\mu$ l in saline) (twice a week for 8 weeks. As a control, we also designed an acute model with subcutaneous (100 $\mu$ l behind the ear) (injection of OVA allergen (60 $\mu$ g) (in alum once per

week for 2 weeks, then challenged intratracheally (100 $\mu$ g in 50 $\mu$ l saline) (on days 28, 29, and 30. In the drug group, dexamethasone (1mg/kg weight) (was intraperitoneally administered one hour before intratracheal challenges. Within three days after the last challenge, the inflammatory responses, morphologic changes, total serum IgE antibody, and the number of immune cell in bronchoalveolar lavage fluid were then monitored. Result; We have demonstrated that the chronic challenge of combined allergens could more effectively provoke the typical features of chronic asthma than single allergen. In chronic asthma model, hematoxylin and eosin - stained lung sections from chronically challenged animals with combined allergens showed a 6 - fold increase of inflammatory region than the saline group. In acute asthma model, antigens showed a 5 - fold increase over OVA. Dexamethasone greatly reduced inflammatory region (nearly to the level of the control group) . Toluidine blue solution stained lung sections showed a 5 - fold increase of toluidine blue - positive intraepithelial mast cells in the chronic asthmatic model group and a 3 - fold increase in the acute asthmatic model group. The periodic acid - Schiff stained lung sections showed a 45 - fold and 10 - fold increase in mucus production in the chronic and acute asthmatic model groups respectively. Both combined allergens and OVA challenges caused a significant increase of eosinophils in total bronchoalveolar lavage fluid. Neutrophils, lymphocytes, monocytes were also elevated in the acute and chronic asthmatic models. All challenged animals had increased levels of IgE in total serum, and dexamethasone greatly reduced it. Conclusions; Sensitivity to the combined allergens leads to the establishment of chronic asthma model. The chronic challenge of combined allergens exacerbated the level of inflammation, caused the peri-bronchial accumulation of mast cells and goblet cell hyperplasia, and elevated the number of white blood cells, eosinophils, neutrophils, lymphocytes, monocytes in total bronchoalveolar lavage fluid and the level of total IgE in serum. In comparison, OVA - challenges caused less asthmatic symptoms. Immunosuppressive drug, dexamethasone, greatly reduced some features of chronic asthma.

## 香烟凝集物通过 SIRT1 - FOXO3a 途径诱导 Beas - 2b 细胞凋亡

史记 孟爱民 侯琦

中国医学科学院放射研究所中国医学科学院药物研究所 北京 100085

目的：近几年来，随着慢性阻塞性肺疾病（COPD）的发病率和致死率的逐渐升高，对其发病机制的研究也成为迫在眉睫的重要任务。而吸烟是导致 COPD 发病的主要因素，因此，本研究的目的就是建立香烟凝集物诱导人支气管上皮细胞凋亡的稳定模型，并初步探讨其机制，为开发和优化治疗 COPD 的药物提供参考。结果：MTT 实验发现 50 $\mu$ mol/L - 200 $\mu$ mol/L 的香烟凝集物对 Beas - 2b 细胞活力的影响呈剂量依赖性，其中 150 $\mu$ mol/L 浓度可使细胞活力降低

81%；流式细胞仪检测细胞周期无明显变化，观察凋亡峰发现 150 $\mu\text{mol/L}$  可使细胞凋亡率达 36%；荧光显微镜观察 Hoechst33258 染色也证实了细胞凋亡的发生；Western Blot 检测发现，与对照组相比，10 $\mu\text{mol/L}$ —50 $\mu\text{mol/L}$  香烟凝集物能不同程度降低细胞内 SIRT1 的表达，且呈剂量依赖性，而 60 $\mu\text{mol/L}$ —200 $\mu\text{mol/L}$  浓度组 SIRT1 的表达未见与 50 $\mu\text{mol/L}$  浓度组有显著差别；用 150 $\mu\text{mol/L}$  香烟凝集物染毒细胞，Western Blot 检测总 FOXO3a 的表达发现对照组与染毒组之间无明显差别，但与对照组相比，染毒组中乙酰化的 FOXO3a 的表达有所升高。结论：香烟凝集物能够诱导人支气管上皮细胞凋亡，并且可能是通过 SIRT1—FOXO3a 通路实现的。

## 眼镜蛇毒 PⅢ型金属蛋白酶 Atrase B 结构与功能研究进展

孙黔云 鲍娟 王彩娥 叶巧玲

贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室 贵阳 550002

研究目的：探讨眼镜蛇毒金属蛋白酶的结构与功能的关系以及其生物学意义，丰富和拓展对眼镜蛇毒金属蛋白酶结构与功能的认识和理解，促进对相关科学问题的认识，为蛇伤防治策略提供有益的参考和新的思路，为评价其潜在的应用提供科学的依据。研究方法：通过蛋白分离纯化，获得目标蛋白，测定目标蛋白的相关理化性质。通过基因克隆，获得目标蛋白的 cDNA 全序列，对其一级结构进行分析。对目标蛋白的酶学性质、抗补体作用、抑制血小板活化及聚集的作用、对人血管内皮细胞的作用以及抗补体介导急性肺损伤的作用进行研究。结果：通过多步分离纯化，从眼镜蛇毒中得到一个碱性的单链糖蛋白 Atrase B，其精确分子质量为 49.4kDa，N 端氨基酸序列为 TNTPE QDRYL QDKKY IEFYV。通过基因克隆，获得了编码目标蛋白的基因序列。序列结构分析表明，Atrase B 是 P<sub>III</sub>型的蛇毒金属蛋白酶，由金属蛋白酶结构域、去整合素结构域和富含半胱氨酸结构域组成。在其去整合素结构域中，存在一个 XXCD 序列，而在其富含半胱氨酸结构域中，出现一个 RGD 序列。Atrase B 属于  $\mu$ -纤溶酶，二硫键对于维持其酶活性中心结构是必须的。Atrase B 没有水解纤维蛋白、azocasein 和 BAEE 的活性。小鼠足趾注射 Atrase B 后可出现轻微的水肿，但其没有出血毒活性。Atrase B 能抑制补体激活的经典途径和替代途径，其机制在于 Atrase B 酶切了补体的 B 因子和 C6。Atrase B 能有效抑制瑞斯托霉素、凝血酶诱导的血小板聚集，能显著抑制补体激活引起的血小板膜 P-selectin、膜糖蛋白 GPⅡb/Ⅲa 在血小板膜上的表达和血小板聚集。高剂量的 Atrase B 能诱导体外培养的内皮细胞释放炎症介质和失巢凋亡。Atrase B 能有效减轻补体介导的急性肺损伤，可明显降低损伤的肺组织中 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1 和 MPO 的含量，减少中性粒细胞在肺组织中的聚集。结论：眼镜蛇毒 P<sub>III</sub>型金属蛋白酶 Atrase B 具有多种基于其结构的生物学活性。这些活性有助于进一步认识和理解目标蛋白在眼镜蛇毒中的生物学功能和意义，其抗补体与抗凝的作用可能具有潜在的应用价值。

## 脂糖激活补体诱导内皮细胞释放粘附分子和凋亡

孙黔云<sup>1</sup> 沈良贤<sup>3,2</sup> 李敏<sup>3</sup> 石京山<sup>2</sup>

<sup>1</sup>贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室 贵阳 550002 <sup>2</sup>遵义医学院 遵义 563000

<sup>3</sup>贵州省人民医院呼吸疾病研究所 贵阳 550002

目的：在细胞水平上研究脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 激活血清补体对内皮细胞的作用和影响，进一步探讨临床上常见的细菌感染释放内毒素引发炎症的作用和机理，为相关临床防治策略、新药研发提供有益的思路和有价值的参考。方法：研究 LPS 激活血清补体的作用方式和特点，观察 LPS 激活补体对内皮细胞表达粘附分子和凋亡的影响。采用补体溶血活性测定方法研究脂多糖激活补体经典和替代途径的作用，采用 ELISA 检测内皮细胞释放 P-selectin、E-selectin 和 ICAM-1 的变化，化学发光法检测 Caspase-3/7 活化情况，SRB 法检测 LPS 激活补体对内皮细胞生长的影响。结果：LPS 能够激活血清补体，对补体经典和替代途径溶血活性产生显著影响，这种激活呈现量效、时效性。LPS 激活血清补体可诱导内皮细胞瞬时显著释放 P-selectin, E-selectin 和 ICAM-1 表达也明显上调，同时可导致 Caspase-3/7 活化。结论：LPS 作用于血清补体可激活和损伤血管内皮细胞，导致内皮细胞显著表达粘附分子以及发生凋亡。本研究提示 LPS 激活血清补体在炎症的启动和放大中可能扮演了重要角色以及抑制 LPS 激活血清补体的潜在临床治疗价值。

## CYP $\omega$ -羟化酶抑制剂 HET0016 对 Cuprizone 诱导的小鼠脱髓鞘作用的影响

王慧娜 余伟 陈丽 王雪 欧阳小明 杨静

武汉大学基础医学院药理学系 武汉 430071

目的：细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP)  $\omega$  羟化酶及其代谢产物 20-羟基-二十碳四烯酸 (20-hydroxyeicosatetraenoic acid, 20-HETE) 在脑血管生成和血流量调节过程中起重要作用。本课题研究了 CYP $\omega$ -羟化酶抑制剂 HET0016 (N-hydroxy-N-(4-butyl-2-methylphenol) (formamidine) 对 cuprizone 诱导的小鼠脱髓鞘作用的影响，为多发性硬化新药的研发提供理论和实验依据。方法：将小鼠随机分为 4 组，每组 12 只。除正常对照组外，其余各组小鼠喂食含 0.2% cuprizone 的饲料，连续六周，制备多发性硬化模型。HET0016 高、低剂量组分别 ip HET0016 2.0 和 0.2mg/kg；正常对照组 ip 等体积 10% 卵磷脂注射液；模型对照组 ip 等体积 10% 卵磷脂注射液。每天给药一次，连续给药两周，末次给药 12 h 后处死动物，取脑组织备用。每周观察各组动物行为学改变。采用组织化学法观察脑胼胝体髓鞘病理学改变。明胶酶谱法检测基质金属蛋白酶-9 (Matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 活性。结果：①喂

食含 0.2% cuprizone 饲料 3、4、5 和 6 周, 模型对照组一次性正确反应次数分别下降 27.4%、26.8%、26.0% 和 24.4%, 且胼胝体部位髓鞘明显脱失, 提示小鼠脱髓鞘模型制备成功; ②与模型对照组相比, HET0016 高、低剂量组一次性正确反应次数显著增加; ③HET0016 高、低剂量组胼胝体部位可见髓鞘显著再生; ④与模型组相比, HET0016 高、低剂量组 MMP-9 活性显著降低。结论: HET0016 对多发性硬化小鼠有显著治疗作用, 其机制可能与抑制 MMP-9 活性有关。

## 橙皮苷对非酒精性脂肪肝大鼠 COX-2 表达及活性的影响

王雯 李俊 李荣 黄艳 熊立 凡小燕 任丹阳

安徽医科大学药学院天然药物活性研究省级重点实验室

国家中医药管理局中医药三级实验室“中药药理实验室” 合肥 230032

目的: 研究橙皮苷 (HDN) 对大鼠非酒精性脂肪肝 (NAFLD) (COX-2 表达及活性的影响。方法: 高脂乳剂诱导大鼠非酒精性脂肪肝 (NAFLD) (模型, 随机分为正常对照组、模型组、橙皮苷 (80、160、320 mg/kg) 组、塞来昔布组 (10 mg/kg) 和凯西莱组 (60 mg/kg), 采用病理组织学方法及对血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 水平的检测评价 HDN 对大鼠 NAFLD 的治疗作用; 采用放射免疫测定法测定血浆中 COX-2 催化产物 6-酮-前列腺素  $F_{1\alpha}$  (6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ ) 和血栓素 B2 (TXB2) 的含量变化; RT-PCR 法检测肝组织中 COX-2 和 IL-8 mRNA 的表达。结果 HDN 能改善肝细胞脂肪变性、明显降低大鼠 NAFLD 血脂 TC、TG 水平和 COX-2 催化产物 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ 、TXB2 的含量, 抑制 COX-2 和 IL-8 mRNA 的表达。结论 HDN 对大鼠 NAFLD 有一定治疗作用, 其机制可能与其抑制肝组织中 COX-2 的表达及活性有关。

## M1 suppresses airway inflammation in a mouse model of asthma

Lingling Xuan, Qi Hou

Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica,

Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, China.

Objective: To investigate the efficacy of M1 for the treatment of bronchial asthma in ovalbumin (OVA) -induced asthmatic BALB/c mouse model. Methods: BALB/c mice were divided into four groups: Control group: mice were treated with saline; Model group: mice were sensitized and challenged with OVA; M1 group: mice were sensitized and challenged with OVA as the model group and were treated with 0.05 mM/kg M1; Dexamethasone group: mice were sensitized and challenged as above and were given 1mg/kg Dexamethasone. Animals were sacrificed 24h after the last challenge. The infiltration of cells, cytokine production, immunoglobulin E (IgE) (and ceramide levels in bronchoalveolar lavage and lung tissues were examined.



Results: In bronchoalveolar lavage (BAL) (fluid, the M1-treated mice had significantly lower total leukocyte counts than those of the model group, with a mean of  $4.05 \times 10^6$  cells/ml in comparison with  $5.16 \times 10^6$  cells/ml in the model group ( $P < 0.05$ ), and lower eosinophil and differential lymphocyte counts. The mean IgE level in the M1 group was  $197.2 \pm 16.3 \mu\text{g/ml}$  and  $230.6 \pm 19.5 \mu\text{g/ml}$  for the model group. M1 treatment reduced IL (interleukin) -4, IL-5 and IL-17 levels (by 50%, 45% and 60% respectively) (in BAL fluid. In addition, pretreatment with M1 also showed strong suppression of ceramide expression in lung tissues with the concentration decreasing from  $54.7 \pm 6.8 \text{ ng/ml}$  to  $39.2 \pm 4.3 \text{ ng/ml}$  ( $p < 0.01$ ). The effectiveness of M1 was similar to that of Dexamethasone, which was used as a positive control. These results support the utility of M1 as a protective agent against asthma. Conclusion: M1 displayed anti-inflammatory and anti-allergic effects in a mouse asthma model and may possess new therapeutic potential for the treatment of allergic bronchial asthma.

## 淫羊藿黄酮对实验性自身免疫性脑脊髓炎大鼠的干预及机制研究

尹琳琳 李林

首都医科大学宣武医院药物研究室 神经变性病教育部重点实验室 北京 100053

目的: 建立实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 大鼠模型, 观察其组织病理特征。并进一步研究中药有效成分淫羊藿黄酮 (Epimedium Flavone, EF) 对该模型病理特征的干预及其作用机制。方法: 采用豚鼠全脊髓匀浆制备抗原免疫 Lewis 大鼠建立 EAE 动物模型, 每天监测动物体重和行为学变化; 应用 HE 染色观察脑和脊髓炎性浸润、血管袖套形成等变化; LFB 染色观察脊髓脱髓鞘变化; 电子显微镜观察髓鞘超微结构变化; 并考察 EF 对上述指标的干预作用及机制。结果: (1) EAE 模型大鼠体重明显下降; 神经功能损伤评分增高, 脑和脊髓等组织血管周围和脑实质有大量炎性细胞浸润; 髓鞘大面积脱失、板层松散。(2) EF 灌胃给药能显著延缓发病、改善症状。(3) EF 能抑制中枢神经系统炎症反应、增强脑和脊髓神经营养因子的表达。结论: EF 能显著降低 EAE 大鼠行为学评分, 改善 EAE 大鼠脑和脊髓的炎性脱髓鞘变化, 减轻神经细胞结构损伤, 改善其临床症状, 上述作用很可能通过抑制中枢炎症反应、增强神经营养因子的表达而实现。

## 内质网应激对博莱霉素诱导的大鼠肺纤维化的影响

王亚丽 李俊 黄艳 黄成 于明哲

安徽医科大学药学院 天然药物活性研究省级重点实验室

国家中医药管理局中医药三级实验室“中药药理实验室” 合肥 230032

目的: 观察内质网应激 (ERS) 在博莱霉素 (BLM) 诱导的大鼠肺纤维化形成过程中的影

响。方法：将 48 只雄性 Wistar 大鼠随机分成正常组（C 组）和模型组（B 组），每组 24 只。C 组气管一次性滴注 BLM（5mg/Kg），B 组则滴注等量 0.9% 生理盐水，进行造模。两组动物均于造模后的第 7 天、第 14 天和第 28 天分别随机处死 8 只，各组取动物肺组织行病理切片，采用苏木精—伊红染色（HE 染色）、Masson 三联染色和原位末端标记（TUNEL）法观察肺组织病理形态和细胞凋亡情况，并评价成模效果。采用 RT-PCR、Western blot 检测组织中内质网标志性蛋白：葡萄糖调节蛋白 78（GRP78/Bip）、转录因子 GADD153/CHOP 的表达变化。结果：HE 染色和 Masson 染色显示博莱霉素成功诱导了大鼠的肺纤维化，TUNEL 法发现与正常组比较，模型组细胞凋亡较多，且随时间延长而增多，28 天时尤为明显。RT-PCR、Western blot 显示与正常组相比，模型组中 GRP78 表达随时间延长而逐渐减弱，而 CHOP 表达则随时间延长而逐渐增强。结论：博莱霉素诱导的大鼠肺纤维化过程中，内质网应激相关基因的表达发生了变化，表明内质网应激可能参与了博莱霉素诱导的大鼠肺纤维化过程。

## MeCP2 在大鼠肝纤维化过程中对 RASAL1 表达的调控作用机制研究

陶辉 李俊 黄成 卞尔宝 李政通 李浩 张磊 黄艳 吕雄文

安徽医科大学药学院天然药物活性研究省级重点实验室

国家中医药管理局中医药三级实验室“中药药理实验室” 合肥 230032

目的：探讨大鼠肝纤维化形成过程中甲基化 CpG 结合蛋白 2（MeCP2）的表达水平变化及其对 RASAL1 表达的调控作用机制研究。方法：运用皮下注射  $CCl_4$  构建大鼠肝纤维化模型，同时应用 PDGF-BB10ng/ml 刺激大鼠肝星状细胞系（HSC-T6）建立体外肝纤维化模型，运用 HE 染色、Massion 三色染色检测肝纤维化的变化；免疫组织化学法观察肝组织 MeCP2 和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白（ $\alpha$ -SMA）的表达；用大鼠 MeCP2 基因的小干扰 RNA 瞬时转染 HSC-T6；分别运用 RT-PCR 检测  $\alpha$ -SMA、I 型胶原（collagen I）、Ras-GTP 酶激活样蛋白 1（RASAL1）及 MeCP2 的 mRNA 表达水平；Western blot 法检测 MeCP2， $\alpha$ -SMA，RASAL1 蛋白的表达水平，以及 Ras/MAPK 通路下游蛋白 p-ERK1/2，ERK1/2 蛋白的表达。结果：在大鼠肝纤维化体内体外模型中显示 MeCP2， $\alpha$ -SMA，collagen I 在大鼠肝纤维化模型组高表达（ $p < 0.01$ ），而 RASAL1 在肝纤维化模型中低表达（ $p < 0.05$ ）。瞬时转染 siRNA-MeCP2 显示沉默 MeCP2 组能上调 RASAL1 的表达，与空白对照比较有显著性差异（ $p < 0.01$ ）。随着大鼠肝纤维化体内体外模型的形成，p-ERK1/2 蛋白表达逐渐升高（ $p < 0.05$ ），与 RASAL1 的表达呈负相关。表明 MeCP2 可负调控 RASAL1 的表达，通过影响 Ras/MAPK 通路中的 ERK1/2 蛋白的表达变化，进而调控肝纤维化的形成。结论：大鼠肝纤维化的形成可能与 MeCP2 蛋白的高表达相关，同时 MeCP2 对 RASAL1 的表达负性调控可能是肝纤维化形成的机制之一。

## 硝克柳胺对 TGF- $\beta$ 受体 II 的抑制作用研究

张海婧 丁晓霜 周琬琪 金晶 李燕 张翼 陈晓光

中国医学科学院药物研究所 北京 100050

转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 及其受体的表达与肾脏纤维化的发生有着密切的关系。其中 TGF- $\beta$  受体 II (TGF- $\beta$  R II) 在 TGF- $\beta$ 1 的信号通路中发挥着非常重要的作用, 它可以通过磷酸化 TGF- $\beta$  受体 I, 继而磷酸化下游信号蛋白, 导致肾脏纤维化。硝克柳胺是一个具有明确肾功能不全治疗作用, 且毒性低、活性高、作用机理新的一个小分子化合物。本研究旨在进一步探讨硝克柳胺治疗慢性肾功能不全的作用机理。通过基因重组技术, 表达和纯化了 TGF- $\beta$ R II 蛋白。运用质谱技术鉴定纯化蛋白为 TGF- $\beta$ R II 后, 采用 Western-blot 技术用特异性磷酸化抗体表明纯化的 TGF- $\beta$ R II 蛋白具有激酶活性。体外检测显示硝克柳胺可抑制 TGF- $\beta$ R II 自动磷酸化作用, 体内实验也证明硝克柳胺可抑制 TGF- $\beta$ R II 激酶下游 Smad2/3 蛋白磷酸化。体内和体外实验结果均表明, 硝克柳胺可能通过抑制 TGF- $\beta$ R II 及其下游蛋白的磷酸化, 从而抑制或减缓肾脏纤维化的进程。

## 重组人白介素-2 舌下给药对甲苯-2, 4-二异氰酸酯 (TDI) 所致大鼠变应性鼻炎的药效学研究

周琬琪 张海婧 张翼 陈晓光

中国医学科学院北京协和医学院药物研究所 北京 100050

摘要: 过敏性鼻炎是发生在鼻黏膜的变态反应性疾病, 主要以鼻痒, 喷嚏, 清水样鼻涕, 鼻黏膜肿胀为主要特点的疾病。本实验采用甲苯-2, 4-二异氰酸酯 (TDI) 造模, 于造模第 8d 开始, 每日给药 2 次, 连续给药 14d。rhIL-2 舌下给药高、低剂量组给药剂量分别为 4000 IU/kg/天和 1000 IU/kg/天。模型组给予等体积的生理盐水。以鼻部症状和体征为主要观察指标, 分别于实验第 7d、9d 和 15d 给药结束后, 按照造模方法, 以 10%TDI 橄榄油滴鼻激发, 观察 30min 内的行为学改变情况。在 15d 给药结束后, 取大鼠鼻黏膜甲醛固定后病理送检。结果表明舌下给予 rhIL-2 对 SD 大鼠的体重无明显影响, 低剂量可使胸腺系数降低 ( $P < 0.05$ ), 高剂量可使对脾脏系数降低 ( $P < 0.05$ )。行为学打分表明高剂量舌下给予 rhIL-2 对 SD 大鼠的过敏性鼻炎症状有一定缓解作用。病理结果显示高剂量组粘膜增厚不明显, 粘膜炎性细胞浸润明显轻于模型组。本实验研究结果证明高剂量舌下给药 rhIL-2 对大鼠变应性鼻炎模型有一定疗效, 所用剂量下 rhIL-2 未发现明显的毒副作用。

Protective effects of total triterpenoids of *Prunella Vulgaris* L.  
(TTP) (against carbon tetrachloride—induced acute liver injury in rats

Shengpeng Zhang, Jun Li, Cheng Hang, Jiali Xie, Yong He

College of Pharmacy, Anhui Medical University;

Key Laboratory of Natural Product Bioactivity of Anhui Province;

Three—level Laboratory of Scientific Research of Traditional Chinese Medicine

of State Administration of Traditional Chinese Medicine of People's

Republic of China“Pharmacology of Traditional Chinese Medicine”,

Hefei, Anhui 230032, China

**OBJECTIVE:** To investigate the hepatoprotective effect of total triterpenoids of *Prunella vulgaris* L. (TTP) (on rats. **METHODS:** Sixty rats were randomly divided into six groups as follows: control group, CCl<sub>4</sub> group, TTP (62.5, 125 and 250 mg/kg) (groups and bifendate (100 mg/kg) (group. Rat acute liver injury model was induced by peritoneal injection of 50% CCl<sub>4</sub> (2ml/kg, dissolved in corn oil) . Rats in therapeutic groups were pretreated with TTP or bifendate six days before CCl<sub>4</sub> was given. Sixteen hours following CCl<sub>4</sub> injection, the rats were bled and the blood was collected. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT) (and aspartate aminotransferase (AST), hepatic malondialdehyde (MDA) (content and superoxide dismutase (SOD) (activities in different groups were investigated. In addition, histopathologic changes of the liver were detected with hematoxylin—eosin (HE) . CYP2E1 protein and mRNA expressions in liver tissue were evaluated by Western blotting, immunohistochemical staining and transcriptase—polymerase chain reaction, respectively. **Results:** TTP effectively reduced the CCl<sub>4</sub>—induced elevated serum ALT, AST levels, hepatic MDA content, and restored hepatic SOD activities in acute liver injury rats. Furthermore, TTP restored CYP2E1 expression at both protein and mRNA levels in a dose—dependent manner. **CONCLUSION:** These results indicate that TTP had protective and therapeutic effect on rat liver injury, which might be associated with its antioxidant properties and inhibition of CYP2E1 activation.

TRPM7 对 TRAIL 诱导的大鼠肝星状细胞凋亡的影响

刘红 李俊 黄成 周德喜

安徽医科大学药学院天然药物活性研究省级重点实验室

国家中医药管理局中医药三级实验室“中药药理实验室” 合肥 230032

目的：观察瞬时受体电位通道 7 (TRPM7) 在大鼠肝星状细胞系 HSC—T6 的表达，探讨其

对肿瘤坏死因子相关凋亡配体 (TNF-related apoptosis inducing ligand) TRAIL 诱导的 HSC-T6 凋亡的影响。方法: 培养传代 HSC-T6 细胞系, 运用非特异性离子通道阻断剂 2-氨基乙氧基苯硼酸 (2-aminocethoxydiphenyl borate, 2-APB) (和钆离子 ( $Gd^{3+}$ ) 阻断离子通道, 观察该通道与细胞凋亡的关系。取对数期细胞, 根据处理方式不同, 分为正常组, TRAIL 组, 2-APB 组,  $Gd^{3+}$  组, TRAIL 联合 2-APB, TRAIL 联合  $Gd^{3+}$  组。RT-PCR 检测以上各组 TRPM7、Caspase-3、 $\alpha$ -SMA 和一型胶原的表达; Western blotting 分析 TRPM7 和凋亡蛋白 Caspase-3 表达变化; 流式细胞术检测各组细胞凋亡率; 比色法测定 Caspase-3 相对活性。结果: RT-PCR 和 Western blotting 均检测到 TRPM7 在 HSC-T6 中表达, 100 $\mu$ mol/L 2-APB 和 50  $\mu$ mol/L  $Gd^{3+}$  能显著抑制 TRPM7 的表达, 早期凋亡率为 61.93% 和 57.13%。体外给予 TRAIL 诱导 HSC-T6 凋亡, 早期凋亡率为 25.23%。运用 TRAIL 联合 2-APB 或  $Gd^{3+}$  能明显提高由 TRAIL 诱导的细胞凋亡, 凋亡率分别为 73.36% 和 70.40%。结论: 运用非特异性离子通道阻断剂阻断 TRPM7 的表达, 可显著提高由 TRAIL 诱导的大鼠肝星状细胞系 HSC-T6 的凋亡。

### HIV-1 Nef expressed in THP-1 expand Treg cells of PBMC in vitro

Xiaolin Qi, Gongze Wang, Jiqin Nie, Chaoqi Liu

Institute of Molecular Biology of Three Gorges University,

Yichang 443002, Hubei Province, P. R. China

CD4+CD25+ regulatory T cells (Tregs) (represent a unique T-cell lineage that is endowed with the ability to actively suppress immune responses. In human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) (infection, Treg cells appear to play opposing roles, contingent on disease stage. Both animal and human studies demonstrate that Tregs numbers are elevated in the acute stage of virus infection and could dampen the virus-specific adaptive T-cell response, which may promote viral chronic infection. Tregs now act as a marker of severity of HIV infection and a potential prognostic marker of disease progression. HIV-1 nef is one of the early regulatory genes which plays an important role in viral replication and pathogenesis. In order to investigate the interaction of HIV-1 Nef and Treg cell regulation, we established HIV-1 Nef stable expressed cell strain in THP-1 cells (THP-1-Nef). PBMC cells were prepared and co-cultured with THP-1-Nef cells. And lymphocyte proliferation and CD25+foxp3+ cells were detected by Flow cytometry. The results showed that HIV-1 Nef protein was a useful and potent factor to increasing Tregs numbers and inhibiting lymphocyte proliferation in vitro. Our results suggest new strategies for therapeutic and preventive interventions of HIV infection.

## 白藜芦醇的类似物对流感病毒神经氨酸酶的抑制作用

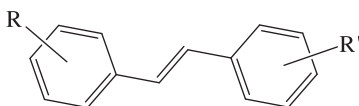
王琳 刘艾林 朴志松 周丹

中国医学科学院中国协和医科大学药物研究所 北京 100050

流行性感冒, 简称流感, 是由流感病毒引起的一种严重危害人类健康的急性呼吸道传染病, 特别是对婴幼儿及老年人危害很大, 病死率高。目前, 临床上用于治疗流感的合成药物有四个, 共分两种类型。一种类型药物即金刚烷胺 (Amantadine) 和金刚乙烷 (Rimantadine), 其作用机制是干扰甲型流感病毒外膜的 M2 离子通道来阻止病毒脱壳从而起到抗流感病毒的作用, 被称为 M2 离子通道蛋白抑制剂。他们仅用于预防及治疗甲型流感病毒引起的流感, 对乙型流感无效, 并且有一定副作用及产生耐药性而失去防治效果; 另一类药物是扎那米韦 (Zanamivir) 和奥司他韦 (Oseltamivir), 其作用靶点是流感病毒神经氨酸酶 (neuraminidase), 被称为神经氨酸酶抑制剂, 上述两个药对甲型、乙型流感均有预防及治疗作用, 他们也存在一些毒副作用, 并已在流感病人中分离到耐药毒株, 而且价格昂贵, 因此寻找新型的神经氨酸酶抑制剂是很迫切需要的。

白藜芦醇 (3, 5, 4'-三羟基反式二苯乙烯, resveratrol) 最初是从北美植物——白藜芦 (white hellebore) 根部分离得到, 故得此名, 此后在浆果、葡萄、花生等多种植物中也分离到此天然产物。白藜芦醇的生物活性非常广泛, 包括抗肿瘤、抗菌、抗氧化、抗病毒、降血脂等。我们设计、合成了白藜芦醇的类似物, 并评价其对流感神经氨酸酶的抑制活性 (见表 1), 初步构效关系表明二苯乙烯骨架上羟基取代数目可能与抑制神经氨酸酶活性有关, 分子中有 4-5 个羟基取代活性较高, 羟基被甲氧基取代或氯离子取代则活性降低, 但实验数据表明上述白藜芦醇的类似物与阳性对照药奥司他韦相比, 体外抑制神经氨酸酶的活性要弱得多, 因此进一步优化合成新的类似物以期找到活性强的神经氨酸酶抑制剂, 开发流感病毒的候选药物是今后研发的方向。

表 1 多羟基取代反式二苯乙烯化合物对流感病毒神经氨酸酶的抑制作用



化合物编号	R	R'	抑制率%	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
1	3, 4, 5- (OH) <sub>3</sub>	3, 5- (OH) <sub>2</sub>	74.93	17.67±3.11
2	3-OH	3, 4- (OH) <sub>2</sub>	68.63	24.42±1.53
3	3, 4, 5- (OCH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	3-OCH <sub>3</sub> , 4-OH	56.89	>40
4	3, 5- (OH) <sub>2</sub>	3, 4- (OH) <sub>2</sub>	77.39	14.37±2.30
5	3, 5- (OH) <sub>2</sub>	3, 5- (OH) <sub>2</sub>	56.90	27.79±2.02

续表

化合物编号	R	R'	抑制率%	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
6	3, 5-(OH) <sub>2</sub>	H	32.04	—
7	3, 5-(OH) <sub>2</sub>	4-Cl	39.51	—
8	4-OH	3, 4-(OH) <sub>2</sub>	65.74	36.65±0.48
9	3, 5-(OH) <sub>2</sub>	3-OH	62.19	36.55±3.00
10	3, 4, 5-(OH) <sub>3</sub>	3-OH	77.50	21.91±6.24
阳性对照药	Oseltamivir		78.1±1.2	0.068±0.004

## 新型甲型 H1N1/季节性流感病毒神经氨酸酶抑制剂评价体系的建立

张超 郭颖

中国医学科学院北京协和医学院药物研究所 北京 100050

流感病毒 (Influenza Virus) 表面糖蛋白神经氨酸酶 (Neuraminidase, NA) 的主要作用为通过切割子代流感病毒血凝素蛋白 (Hemagglutinin, HA) 与唾液酸的连接, 使子代流感病毒颗粒从宿主细胞表面释放。本文以 2009 年出现的新型甲型 H1N1 流感病毒 [A/California/04/2009 (H1N1), 简称 CA/04] 及一株普通流感病毒 [A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), 简称 PR/8] 的神经氨酸酶为靶点, 建立野生型与达菲耐药型酶学水平与细胞水平药物评价体系。

酶学水平模型的方法为采用瞬时转染 NA 表达质粒的细胞裂解液作为酶源, 与底物 4-MU-NANA 反应, 通过测定产物生成量来反映酶催化活性; 细胞水平模型采用重组病毒技术, 在病毒释放环节加入待测化合物, 通过测定生成病毒量反映化合物对流感病毒释放的影响。

阳性药物达菲和扎纳米韦验证模型, 结果表明: 所建立野生型和耐药模型 (CA/04: H275Y/N295S/E119V; PR/8: H260Y/N280S) 能够反映化合物对神经氨酸酶的抑制作用, 试验结果与临床报道一致。

## 五、抗糖尿病药理

### 中药复方 FF16 增加小鼠胰岛素敏感性作用的实验研究

陈玲 田金英 张晓琳 韩静 李娟 付健阳 叶菲

中国医学科学院药物研究所 北京 100050

目的: 观察中药复方 FF16 对 KKAY 小鼠和 IRF 小鼠的胰岛素增敏作用。方法: 分别应用自发性 2 型糖尿病 KKAY 小鼠模型和高脂饲料诱导的胰岛素抵抗肥胖 IRF 小鼠模型, 以胰岛素耐量实验、葡萄糖耐量实验、胰岛素抵抗指数 HOMA-IR、全身胰岛素敏感指数 IS<sub>wt</sub> 和荧光示踪的正常葡萄糖-高胰岛素钳夹 (正糖钳) 实验等方法评价机体对胰岛素的敏感性。以葡萄糖

氧化酶方法检测血糖水平。以酶联免疫 ELISA 法测定血胰岛素水平。以酶学的方法检测 PTP1B 酶活性。结果：中药复方 FF16 可明显改善 KKAy 小鼠的葡萄糖耐量和胰岛素耐量；使 KKAy 小鼠 HOMA-IR 指数降低 44.8%；使 ISWB 指数升高 98.3%；使正糖钳实验中胰岛素依赖的葡萄糖处置能力增加 3.0 倍，分别使肝脏、脂肪和骨骼肌的葡萄糖摄取能力增强 1.5、2.2 和 2.8 倍。在 IRF 小鼠模型上，FF16 亦显示明显的胰岛素增敏作用，并呈剂量相关性。FF16 抑制 PTP1B 蛋白活性的  $IC_{50}$  为  $0.2249\mu\text{g/ml}$ ；并可明显抑制 IRF 小鼠肝脏 PTP1B 蛋白表达。结论：中药复方 FF16 对 KKAy 小鼠和 IRF 小鼠具有明显胰岛素增敏作用，PTP1B 是其作用靶点之一。

## SGLT-2 抑制剂筛选细胞模型的建立及应用

环奕 李林忆 刘景龙 申竹芳

中国医学科学院药物研究所 北京 100050

钠依赖的葡萄糖转运体-2 (Sodium-glucose cotransporter-2, SGLT-2) 主要表达于肾近曲小管上皮细胞，负责重吸收原尿中 90% 以上的葡萄糖。研究发现 SGLT-2 抑制可以有效降低糖尿病患者的血糖，是目前糖尿病治疗的药物新靶点之一。本实验室成功构建了人源 SGLT-2 真核表达质粒，转染 293E 细胞，实现人源 SGLT-2 在细胞膜的定位高表达，并筛选 SGLT-2 稳定表达的细胞株。通过检测细胞在药物作用下，钠离子依赖的葡萄糖摄取水平变化来反映药物的 SGLT-2 的影响。在本模型中，阳性化合物根皮苷 (Phlorizin) 对 SGLT-2 的葡萄糖摄取明显抑制，且具有浓度依赖关系，其  $IC_{50}$  为 10 nM。目前该模型已用于未知化合物的活性筛选。其方法尚在进一步优化和规范化，以达到高通量药物筛选的目的。

## Genistein accelerates refractory wound healing by decreasing superoxide and FoxO1/iNOS in type 1 diabetes

Lu Tie, <sup>1</sup>Jing Han, <sup>1</sup>Yu An, <sup>1</sup>Yilixiati Xiaokaiti, <sup>1</sup>Yuan Xiao,

<sup>1</sup>Yan Pan, <sup>1</sup>Alex F. Chen, <sup>2</sup>Xue-Jun Li<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Natural & Biomimetic Drugs and  
Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences,  
Peking University, Beijing, 100191, China

<sup>2</sup>Department of Surgery, Vascular Medicine Institute and McGowan  
Institute of Regenerative Medicine, University of Pittsburgh School of  
Medicine, Pittsburgh, PA 15213, USA

Aims/hypothesis Refractory wound in diabetic patients is a serious complication that often leads to amputation with limited treatment regimens. The present study was designed to deter-



mine the protective effect of soy isoflavone genistein on diabetic wound healing and investigate the underlying mechanisms. Methods Streptozotocin (STZ) -induced type 1 diabetes mice with full -thickness excisional wound were received 0.2, 1 and 5 mg/kg/day of genistein via subcutaneous injection. Results Genistein dose-dependently rescued the delay of wound closure in diabetic mice. 5 mg/kg/day of genistein treatment significantly increased the mean perfusion rate, in vitro genistein protected against high glucose-induced impairment of capillary tube formation in cultured endothelial cells. Under diabetic condition, there is significant increased superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) (production and decreased nitrite levels in wound tissues. Genistein treatment in all dose range significantly normalized the elevated  $O_2^{\cdot-}$  production and reversed the attenuated nitrite level. In the diabetic wound tissues, the inducible nitric oxide synthase (iNOS) (was largely activated and genistein administration maintained increased iNOS activity. Moreover, genistein attenuated diabetic cutaneous SIRT1 and forkhead box O transcription factor 1 (FoxO1) (levels and potentiated ac-FoxO1 in a dose-dependent manner. Conclusions/interpretation Genistein could rescue the delayed wound healing and improved wound angiogenesis in STZ-induced type 1 diabetes mice, at least in part, by suppression of FoxO1, iNOS activity and oxidative stress.

## 六、抗辐射损伤

### 复方丹参和盐酸川芎嗪促进辐射后脐静脉内皮细胞的增殖与迁移作用机制的研究

李怡然 陈晓红

第三军医大学药学院药理学教研室 重庆 400030

目的：放射复合伤是战争中救治难度最大的伤类之一。在伤口愈合的过程中，由于同时受到放射损伤的影响，其愈合速度远远低于单一的创伤。血管内皮细胞 (Vascular Endothelial Cell, VEC) 是机体中一类重要的细胞群体，在体内广泛分布，可以促进血管生成，其增殖与迁移能够决定血管形成速度，研究促进血管内皮细胞增殖、迁移的药物对伤口快速愈合具有重要意义。复方丹参和川芎嗪是从临床上常用的活血化瘀药物，因此本文选用 HUVEC 作为细胞模型观察复方丹参和盐酸川芎嗪对辐射后的 HUVEC 增殖和迁移是否具有保护和促进作用，为治疗放射复合伤奠定基础。方法：MTT 比色法、细胞划痕迁移实验和 Transwell 迁移实验。结果：经过辐射后的 HUVEC 较对照的迁移速率有明显的下降。以 VEGF 处理细胞作为阳性对照，复方丹参和盐酸川芎嗪对未经辐射的细胞增殖和迁移均有明显促进作用，同样对于  $8Gy^{60}Co\gamma$  射线辐照后的 HUVECs 的增殖和迁移也有明显的促进作用。Transwell 迁移结果显示复方丹参和盐酸川芎嗪对 HUVECs 的迁移也有明显促进作用。结论：复方丹参和盐酸川芎嗪对于 HUVECs

细胞具有辐射保护作用。对于辐照后的 HUVECs 增殖和迁移具有明显的促进作用。

## 造血干细胞辐射损伤机制研究

孟爱民 张恒 李德冠

中国医学科学院放射医学研究所天津市分子核医学重点实验室 天津 300192

临床上放射性治疗设备及介入诊治手段应用增多, 接受肿瘤放化疗的患者生存期延长, 人类太空活动增加, 核电事业的迅速发展, 使接受过量照射的人数日益增加。辐射 (IR) 可以导致造血干细胞 (HSC) 损伤, 引起骨髓持久抑制甚至个体死亡, 临床上缺乏有效的治疗手段, 迫切需要对其损伤机制进行研究。

动物试验发现 HSC 在接种到接受致死剂量辐射受体小鼠后可以重建造血系统, 但连续移植四代以后会失去造血功能, 提示 HSC 过度增殖可出现衰老。研究发现随年龄增长 LT-HSC 自我更新及多分化功能下降, 应激性凋亡升高, p16<sup>INK4a</sup> 表达升高。敲除 p16<sup>INK4a</sup> 后老年小鼠 LT-HSC 功能则得到不同程度的恢复, 提示 p16<sup>INK4a</sup> 在 HSC 衰老中具有作用。我们研究发现放疗诱导骨髓长期抑制与 HSC 出现衰老有关, 表现为集落形成活性下降、SA- $\beta$ -gal、p16<sup>INK4a</sup> 升高, 第一次为 IR 引起 HSC 衰老的提供了证据。

在正常小鼠骨髓中, ROS 低水平 HSC 亚群, 具有骨髓连续移植造血重建功能, 而 ROS 高水平 HSC 亚群重建能力逐渐下降, 提示 ROS 在维持 HSC 自我更新及静止状态具有重要的作用。参与调节细胞内 ROS 水平的基因缺陷, 如 Atm、FOXO 敲除小鼠, 表现出 HSC 内 ROS 水平升高, HSC 不能维持在静止期、自我更新能力下降。

我们研究发现接受亚致死剂量全身照射 (TBI) 的小鼠, ROS 在 HSC 中选择性持续增高, 导致 HSC 衰老样改变。应用抗氧化剂 NAC 可以降低 TBI 后 HSC 的 ROS 水平, 改善 HSC 功能。HSC 内由 NADPH 氧化酶 (NOXs) 可以生成内源性 ROS, 我们发现 TBI 可以通过上调 NOX4 生成过量 ROS, 引起 HSC 功能损伤, 阻断 NOX4 功能可以改善 HSC 辐射损伤。

HSC 中 ROS 升高可以激活 p38MAPK, 上调 p16<sup>INK4a</sup>, 导致 HSC 自我更新能力下降。我们发现 IR 可激活 HSC 中 p38 表达, p38 抑制剂可减轻 IR 诱导的 HSC/HPC 增殖功能下降; p38 可以介导 IR 引起的 HSC 中 p16mRNA 稳定性增加。p53 是受 p38 调控的转录因子, 氧化应激状态可以通过 p53/p21 途径引起细胞周期阻滞或细胞凋亡, p53 可以上调多种抗氧化分子的表达, 对抗细胞的过氧化导致的 DNA 损伤。

阐明造血干细胞辐射损伤机制将为寻找持久性骨髓损伤的治疗靶点提供依据, 也为阐明 IR 对其他组织干细胞损伤及肿瘤干细胞治疗反应性的研究提供借鉴。

## 白藜芦醇对造血系统辐射损伤的防护作用

张恒<sup>1,2</sup> 翟志斌<sup>1,2</sup> 王月英<sup>1,2</sup> 张俊伶<sup>1,2</sup> 吴红英<sup>1,2</sup> 王小春<sup>1,2</sup> 李德冠<sup>1,2</sup>

常建辉<sup>1,2</sup> 路璐<sup>1,2</sup> 王金红<sup>3</sup> 鞠振宇<sup>4</sup> 侯琦<sup>5</sup> 周道洪<sup>1,6</sup> 孟爱民<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>北京协和医学院中国医学科学院放射医学研究所 <sup>2</sup>天津市分子核医学重点实验室

<sup>3</sup>中国医学科学院血液病研究所 <sup>4</sup>中国医学科学院实验动物研究所

<sup>5</sup>中国医学科学院药物研究所 <sup>6</sup>Department of Pharmaceutical Sciences and

Winthrop P. Rockefeller Cancer Institute, University of Arkansas for Medical

Sciences, Little Rock, AR

背景：骨髓抑制是辐射损伤的主要表现，也是临床进行肿瘤放疗时最常见的副作用。骨髓幼稚型造血细胞（hematopoietic progenitor cells, HPCs）（对缺血应激产生快速增殖反应，受到辐射损伤后引起急性骨髓抑制；造血干细胞（hematopoietic stem cell, HSC）具有自我更新、增殖、分化生成全血细胞的功能，受损后引起骨髓持久抑制甚至个体死亡。白藜芦醇（Resveratrol, Rev）是一种非黄酮多酚类化合物，具有抗氧化、抗衰老、抗凋亡的作用，其对造血系统辐射损伤的防护作用还未见报道。目的：研究白藜芦醇对造血系统辐射损伤的防护作用并探讨其机制。材料和方法：选取 C57BL/6 小鼠 30 只，分为对照组、照射组和给药组（n=10），照射组和给药组接受 6.0Gy 剂量的  $\gamma$  射线照射，给药组照射前 7 天至照射后 28 天每日灌胃给 Rev（20mg/kg）。照射后第 29 天取小鼠外周血测血常规；取股、胫骨冲洗骨髓细胞（BMN）并计数，半数 BMN 用密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞（BMMNC）后分别进行鹅卵石造血区形成细胞（CAFC）试验，克隆形成实验，竞争移植实验；其余 BMN 用流式细胞计数仪计数并分选出 HPC、短期造血干细胞（ST-HSC）和长期造血干细胞（LT-HSC），提取总 RNA 并逆转录成 cDNA，用实时荧光定量 PCR 法（qRT-PCR）法检测 NOX4、SOD2 和 GPX1 基因 mRNA 的表达水平。使用 ANOVA 方差分析进行组间显著性差异分析， $P < 0.05$  为差异有统计学意义。结果：外周血和 BMN 计数表明，TBI 可以降低小鼠 WBC、LYM%、PLT、BMN 等指标，给药组小鼠 WBC，LYM%，BMN 高于照射组（117.4%， $p < 0.01$ ；12.4%， $p < 0.05$ ；56.0%， $p < 0.001$ ）；分选数据表明，照射组 HPC、ST-HSC、LT-HSC 占 BMN 的比例均低于对照组（26.2%，50.6%和 8.54%），而给药组均高于照射组（21.1%和 69.4%和 764.1%）。CAFC 实验中 7~35 天计数结果中照射组 CAFC 存活率均低于 10%，而给药组第 7、35 天 CAFC 存活率均高于照射组（84.6%、49.5%， $p < 0.001$ ）；克隆形成实验中照射组 CFU-GM 计数较对照组降低 61.0%（ $p < 0.01$ ），给药组高于照射组 33.6%（ $p < 0.05$ ）；竞争移植实验中照射组供体细胞比例较对照组降低 35.58%（ $p < 0.01$ ），给药组高于照射组 43.4%（ $p < 0.01$ ）。qRT-PCR 实验表明，在 mRNA 水平，电离辐射可以在 HPC、ST-HSC 和 LT-HSC 中上调内源性 ROS 生成基因 NOX4（13.3~119.5%），下调 ROS 灭活基因 SOD2 和 GPX1（8.1~69.2%）；Rev 可以降低 NOX4 的表达（43.6%~55.8%），上调 SOD2 和 GPX1 的表达（167.8

~258.3%)。结论：对不同分化程度细胞计数资料均表明 Rev 在数量上对造血系统具有辐射防护作用，CAFC、克隆形成实验和竞争移植实验从功能上表明 Rev 对造血细胞具有辐射防护作用；对 ROS 相关基因表达研究提示 Rev 可能是通过下调内源性 ROS 生成基因，上调 ROS 灭活基因降低造血细胞的 ROS 水平，对造血系统辐射损伤起到防护作用。

## 辐射对小鼠免疫系统损伤远期影响研究

李德冠 王月英 路璐 吴红英 张俊伶 王小春 张恒 常建辉 孟爱民

中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所 天津 300192

目的：免疫系统对辐射极为敏感，受照后会形成损伤，且恢复也很缓慢。本研究探讨 4Gy<sup>137</sup>Cs<sub>γ</sub> 射线一次性全身照射小鼠免疫细胞对 LPS 刺激反应性的远期影响。材料与方法：将 C57BL/6 实验小鼠分为假照射组和照射组，照射组给予 4Gy 照射。照射 10 周后小鼠按组别分别提前 24h 和 1h 腹腔注射 LPS (20mg/kg)，对照组注射生理盐水。取外周血进行白细胞计数及 CD4、CD8、B220 细胞比例检测，脾脏与胸腺称重，计算脏器指数。单侧股骨有核细胞计数，测量骨髓细胞 CFU-GM 功能。结果和讨论：与假照射对照组小鼠比较，照射对照组小鼠的外周血白细胞与骨髓细胞计数基本恢复，但 CD 4，CD8 细胞比例和脾脏、胸腺指数及 CFU-GM 集落数显著升高，B 细胞比例显著下降，差异有统计学意义 (P<0.05)。与假照射 LPS 1h 组小鼠比较，照射 LPS 1h 组小鼠的骨髓细胞计数，CD4 细胞显著降低，CFU-GM 集落数显著升高，差异有统计学意义 (P<0.05)。与假照射 LPS 24h 组小鼠比较，照射 LPS 24h 组小鼠 CD8 细胞比例显著降低，胸腺指数及 CFU-GM 集落数显著升高，差异有统计学意义 (P<0.05)。在受到 LPS 刺激后，照射组与假照射组小鼠的白细胞和骨髓细胞计数，CD4 细胞比例及脾脏指数变化趋势一致；对照组小鼠胸腺指数与 B 细胞显著下降 (P<0.05)，而照射组小鼠未见显著变化。本实验结果提示小鼠受 4Gy 照射 10 周后，免疫系统对 LPS 刺激反应性与未照射组小鼠不完全一致，其意义有待进一步深入研究。

## 七、药物代谢

### FB2 与大鼠和人肝微粒体 CYP450 同工酶的相互作用

黄凯 扈金萍 盛莉 陈晖 李燕

中国医学科学院北京协和医学院药物研究所 北京 100050

目的：FB2 是新型 Abl/Scr 双重酪氨酸激酶抑制剂，拟用于治疗慢性髓细胞性白血病。本研究选择大鼠和人肝微粒体体外温孵系统，应用特异性探针底物法/抑制剂法，探讨参与 FB2 代谢的主要 CYP450s 以及 FB2 对 CYP450s 的抑制作用。方法：应用 CYP450s 选择性抑制剂咪拉茶碱 (CYP1A2)、磺基苯吡唑 (CYP2C6/2C9)、噻氯匹定 (CYP2C11/2C19)、奎尼丁

(CYP2D2/2D6)、戒酒硫 (CYP2E1) (和酮康唑 (CYP3A2/3A4) (研究大鼠和人肝微粒体中参与 FB2 主要代谢产物生成的 CYP450s。通过测定 CYP450s 特异性探针底物右美沙芬 (CYP2D2/2D6)、双氯酚酸钠 (CYP2C6/2C9)、美芬妥英 (CYP2C11/2C19)、咪达唑仑 (CYP3A2/3A4)、非那西丁 (CYP1A2) 和氯唑沙宗 (CYP2E1) 代谢产物的生成, 研究 FB2 对大鼠和人肝微粒体 CYP450s 活性的抑制作用。结果: 大鼠肝微粒体 CYP3A2、2E1、2C11 是参与 FB2 体外主要羟化产物 FB7 和 FB10 生成的主要同工酶, CYP1A2、2C6、2D2 也有部分参与。FB2 (10 $\mu$ M) 对 CYP1A2、2C11、2D2、2C6 和 2E1 的抑制率分别为 52.96%、52.68%、47.89%、31.78%、49.7%。人肝微粒体中 CYP3A4、2E1 是参与 FB2 羟化产物 FB7 和 FB10 的主要同工酶, FB2 (10 $\mu$ M) 对 CYP1A2、2D6、2C9、2E1 和 3A4 的抑制率分别为 14.60%、31.40%、11.38%、37.26%、54.56%。FB2 (1-5 $\mu$ M) 对大鼠和人肝微粒体 CYP450s 的抑制作用均较弱。结论: FB2 在大鼠和人肝微粒体中的代谢转化是多个 CYP450 同工酶参与的过程, 主要代谢产物为 4-羟基和 6-羟甲基化产物。FB2 (10 $\mu$ M) 对大鼠和人肝微粒体多个 CYP450 同工酶均有不同程度的抑制作用。

## CPRC-130 及其代谢物人血浆浓度与剂量关系研究

刘明 王洪允 江骥 胡蓓

中国医学科学院中国协和医科大学北京协和医院临床药理研究中心 北京 100730

研究目的: 通过 LC-MS/MS 方法测定给药 225、300、400、500mg 后 24 小时内受试者血浆样品中的 CPRC-130 及其代谢物 M01、M03、M05、M06 的浓度, 对各剂量组受试者血浆中待测物浓度与给药剂量的关系进行分析。研究方法: 人体药代动力学试验于给药前 30min 采空白血、给药后 10min、20min、30min、45min、1hr、1.5hr、2hr、3hr、5hr、7hr、9hr、12hr、24hr 进行血样采集, 置肝素钠抗凝试管, 4 $^{\circ}$ C 离心, 3000rpm, 离心 10min, 取血浆样品 200 $\mu$ L, 加入 20ng/mL 内标 (IS) 工作液 20 $\mu$ L, 并加入含 1% 甲酸和 10mmol/L 甲酸铵的水溶液 500 $\mu$ L, 混匀后上固相萃取柱; 之后先以 800 $\mu$ L 30% 甲醇淋洗, 再以 800 $\mu$ L 纯甲醇洗脱; 收集洗脱液, 在 40 $^{\circ}$ C 环境下以氮气吹干, 并以含 1% 甲酸和 10mmol/L 甲酸铵的水溶液 220 $\mu$ L 复溶, 取复溶后的溶液 10 $\mu$ L 进样。以通过方法学考核的 HPLC-MS/MS 方法进行测定, 记录质量色谱图及化合物的峰面积, 采用内标法进行定量。HPLC 条件: XTera MS C18 2.1mm $\times$ 50mm (2.5 $\mu$ m) 色谱柱; 流动相由 30% 乙腈和 70% 的 0.1% 甲酸 10mM 甲酸铵组成; 流速 0.2mL/min, 柱温为 40 $^{\circ}$ C。每一个样品分析用时 4.5min。串联质谱条件: 采用电喷雾离子源 (Electrospray ionization, ESI), 在正离子电离模式下, 选用多反应监测 (Multiple reaction monitoring, MRM) 的质谱扫描方式进行测定。每个批次均按照空白样品 (DB)、加入内标的空白样品 (BK)、标准曲线样品、待分析临床样品顺序进行分析, 测定中平均分布占待分析临床样品数量 5% 以上的质控样品 (QC)。用测得浓度的对数值对取样时间做药时曲线 (半对数曲线), 观察血浆药物及其代谢物浓度与给药剂量的关系。结果: 从药时曲线看, CPRC-130 及其代谢物都在

225、300、400、500mg 给药剂量下，均表现出曲线下面积随剂量而增加，药物在血浆中的主要存在形式（代谢物 M05 和 M06）表现出明显的线性消除的药代动力学特征。结论：本试验以通过方法学考核的 HPLC-MS/MS 方法测定人血浆中原药 CPRC-130 及其代谢物 M01、M03、M05、M06 的浓度，并对药时曲线进行了分析，得出结论：在 225、300、400、500mg 给药剂量下，曲线下面积随剂量而增加，且未表现出代谢饱和的特征。

## 抗焦虑药 AF5 在人体内的主要代谢产物

杨芬 王洪允 江骥 胡蓓

中国医学科学院北京协和医院 北京 100730

目的：对抗焦虑药 AF5 在人体内的主要代谢产物进行鉴定，研究 AF5 在人体内的生物转化特征。方法：收集健康受试者口服给药前及给药后的血、尿及粪样。全血经 EDTA 抗凝后分离血浆，于 -30℃ 保存。血浆经叔丁基甲醚液液萃取 (v/v, 6:1)，氮气吹干后流动相复溶；尿液样本以甲醇等比稀释；粪便样本经甲醇提取。所有样本经 0.22μm 滤膜过滤后进行分析。色谱条件：液相系统为 waters 公司的 UPLC Aquility 系统。色谱柱为 Acquity UPLC BEH C18 2.1 mm×50mm (1.7μm)；流动相是甲醇和水，流速 0.4mL/min，采用程序洗脱，柱温 35℃。进样量 5μL。质谱条件：AB Sciex 公司的 Q-trap 5500，ESI 源，正离子方式检测。IS：4000V，离子源温度：300℃，DP：50V。对 AF5 及其几种代谢物的对照品进行 LC-MS 分析，获得色谱图及结构碎片信息，并推测其裂解途径。将获得的血浆、尿及粪便样本同样进行 LC-MS/MS 分析，通过 pMRM（预测性的多反应监测）、NL（中性丢失）、EMS（增强型全扫描）结合 IDA（信息相关采集）等扫描模式，获得大量数据。利用 Lightsight 软件对数据进行提取并进行比对分析，通过 XIC（提取离子流色谱图）及二级质谱图得到保留时间及代谢物的结构信息，并与合成的对照品对比，推测代谢物的结构。

结果：受试者口服 AF5 后，在血浆、尿液和粪便中分别检测到 19 种、14 种、23 种代谢物。结论：AF5 在人体内的主要代谢途径是氧化、羟基化、磷酸化以及氧化或羟基化后的葡萄糖醛酸化等。

## 高效液相色谱法测定大鼠血浆中 5, 7, 3'-三乙酰橙皮素 活性代谢物橙皮素的浓度

秦娣 李俊 李荣 黄艳 任丹阳 陈昭琳

安徽医科大学药学院天然药物活性研究省级重点实验室

国家中医药管理局中医药三级实验室“中药药理实验室” 合肥 230032

目的：建立高效液相色谱法测定大鼠血浆中 5, 7, 3'-三乙酰橙皮素活性代谢物橙皮素的

浓度。方法：以橙皮苷为内标，血浆样品经  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶水解后，用乙酸乙酯萃取，取乙酸乙酯层 45℃ 真空干燥后用流动相复溶。采用 C18 柱，以甲醇-0.5%冰醋酸 (41:59) 为流动相，流速：1.0 mL · min<sup>-1</sup>，柱温：40℃，检测波长：288 nm，进样量：20  $\mu$ L。结果：橙皮素在 0.05~25  $\mu$ g · mL<sup>-1</sup> 范围内线性关系良好 ( $r^2=0.9994$ )，各样品的提取回收率均大于 80%，日内、日间精密度 RSD 均小于 10%。结论：该方法灵敏度高，专属性强，准确可靠，适用于 5, 7, 3-三乙酰橙皮素在大鼠体内的药代动力学研究。

## 地西洋在体鼻腔吸收动力学及薄荷醇的促进作用

张瑞涛

三峡大学医学院形态学部 宜昌 443002

目的：研究地西洋鼻腔吸收的主要影响因素、吸收动力学及促透剂薄荷醇对其吸收的影响。方法：建立家兔在体鼻腔循环吸收的动物模型，取样时间为 0、5、10、15、30、45、60、75、90 min，计算吸收速率常数 K、吸收半衰期  $T_{1/2}$  及药物吸收百分率，研究在鼻腔灌流液体积、循环液流速和 pH 值一定的条件下，地西洋的浓度、吸收促进剂薄荷醇对地西洋鼻腔吸收的影响。结果：在鼻腔灌流液体积为 5 ml，循环液流速 2.0 mL · min<sup>-1</sup>，循环液的 pH 值在 5.9~6.1 的中性吸收环境时，地西洋浓度在 0.25 g · L<sup>-1</sup>~1.00 g · L<sup>-1</sup> 时，随着地西洋浓度的增加，药物的 K 值增加不明显，吸收半衰期  $T_{1/2}$  及药物吸收百分率变化不大；薄荷醇含量为 0.2% 时对地西洋鼻腔吸收有最佳的促进效果（吸收速率常数为 0.4424 ± 0.0023 h<sup>-1</sup>），且能加快地西洋的吸收 ( $T_{1/2}$  为 0.32 ± 0.07 h<sup>-1</sup>)，缩短地西洋的吸收半衰期；0.2%~0.4% 范围内，随薄荷醇浓度的增加，吸收速率常数反而减小。结论：地西洋可以经鼻腔吸收，鼻腔吸收的机制为被动扩散；0.2% 薄荷醇更能够促进地西洋的鼻腔吸收。

## 八、新技术方法

### 纳米活性炭对多烯紫杉醇的吸附与缓释功能的实验研究

蔡要欣 张英鸽

军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850

用 ACNP 吸附抗肿瘤药物可作为靶向药物递送系统，将药物特异地递送到肿瘤组织、无法切除的微小肿瘤转移灶以及与其转移和复发的相关部位，降低药物在与疗效无关的部位的浓度，尤其是血液循环系统中的药物浓度，以增强药物对肿瘤细胞的杀伤作用，减少或避免肿瘤的复发和转移，同时降低药物对机体的毒副作用。目的：研究纳米活性炭 (activated carbon nano-particles, ACNP) 对多烯紫杉醇 (Docetaxel, DOC) 的吸附与缓释功能。方法：将 Doc 溶于三蒸水中，再将 ACNP 混悬于紫杉醇溶液中，在室温、pH7.0、超声条件下吸附 30 min，采用紫

外分光光度法和透析法检测不同粒径（分为小粒径 ACNP 组和大粒径 ACNP 组，其中小粒径 ACNP 组的平均粒径为  $60 \pm 10 \text{ nm}$ ；大粒径 ACNP 组的平均粒径为  $100 \pm 10 \text{ nm}$ ）ACNP 对 DOC 的吸附与缓释功能，并对两组的吸附与缓释功能进行比较。设一系列时间点反复更换溶剂，分别测所设时间点游离 DOC 的浓度，观察 ACNP 吸附 DOC 的缓释功能。结果：ACNP 对 DOC 具有吸附性，小粒径 ACNP 组的饱和吸附量 ( $X_m$ ) 为  $195.69 \text{ mg/g}$ ，大粒径 ACNP 组的  $X_m$  为  $113.5 \text{ mg/g}$  达饱和后吸附量稳定；被小粒径 ACNP 稳定吸附达饱和的 DOC 制剂 12h 的累计释放率为 76.3%，被大粒径 ACNP 稳定吸附达饱和的 DOC 制剂 12h 的累计释放率为 75.9%。结论：本实验室自制不同粒径的 ACNP 可稳定吸附 DOC，其中小粒径 ACNP 对 DOC 的吸附功能明显优于大粒径 ACNP。

## CdSe 量子点在不同生理条件下中的分散分布

鄂晓 张英鸽

军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850

目的：利用原子力显微镜技术 (AFM) 观察量子点在不同溶液中的分布规律。方法：将两种不同厂家制作的 CdSe 量子点以等浓度加入到全血、血浆、生理盐水及纯水中，制备成适于 AFM 观测的样片，观察成像。结果：量子点在四种溶液中有着不同的分布特点：全血中的量子点与其中的蛋白结合产生大量、花朵样的不规则团聚现象，团聚后量子点团的粒径在  $50 \sim 100 \text{ nm}$ ；血浆中的量子点依附于血浆中某些物质呈紧密、规则的柏枝状分布，血浆中量子点的粒径在  $50 \text{ nm}$  左右；生理盐水中的量子点有着与血浆类似的分布，CdSe 量子点较血浆中分布相对疏松，量子点可能与盐离子之间相互作用形成颗粒样的树枝状分布，其粒径在  $35 \sim 50 \text{ nm}$ ；纯水中的量子点虽有轻微团聚现象，总体分散比较均匀，多呈几聚体存在，高度一般在  $4 \sim 10 \text{ nm}$ ，几聚体直径在  $10 \sim 30 \text{ nm}$  范围内。结论：生理条件下，体液中的各种蛋白及有机小分子、无机盐离子都对量子点的分散分布有不同程度的影响，希望对量子点在后续的生物安全性试验方面有参考作用。

## 纳米活性炭粒子跨膜转运方式及引起的生物学效应研究

彭飞 张英鸽

军事医学科学院毒物药物研究所纳米药理毒理学重点实验室 北京 100850

用体外细胞实验探讨纳米活性炭粒子 (activated carbon nanoparticles, ACNP) 侵入细胞的方式及作用机制。体内研究其在小鼠体内的移行分布，组织损伤，探讨体内的排泄方式。为进一步研究纳米粒子的生物安全性及临床前研究提供依据。MTT 结果显示，ACNP 对 HeLa 细胞有一定的细胞毒性并与时间和剂量成正相关；AFM 结果显示，ACNP 造成 HeLa 细胞体积缩小、表面变粗糙、分泌的粘附物减少；TEM 观察发现，ACNP 不受包吞抑制剂和低温处理的影



响,能通过细胞膜进入细胞质进而进入细胞核,引起细胞表面微绒毛消失,线粒体肿胀,细胞核皱缩等现象;彗星实验结果显示,ACNP能引起HeLa细胞核DNA损伤;体内试验结果显示,静脉注射ACNP在肝、脾、肺中分布较多并造成肝实质细胞变性,细胞间距变大;肺泡处细胞充血;组织TEM观察发现ACNP可通肾小球滤过。结论ACNP可抑制HeLa细胞的增值、引起细胞膜通透性改变、诱导细胞凋亡及产生DNA损伤。ACNP可通过胞吞机制之外的方式进入细胞质,进而进入细胞核。ACNP主要通过肾脏排泄,也可通过空肠、回肠、结肠等组织排出体外。

## APJ受体的生物信息学分析

黄浩 陆启轩 陈临溪 杨莉 毛小环 李兰芳 秦旭平 曹建刚

南华大学药物药理研究所 衡阳 421001

目的:APJ受体是apelin肽的G蛋白偶联受体,本实验室发现apelin/APJ系统促进血管平滑肌细胞增殖、促进单核细胞-血管内皮细胞粘附,为进一步了解APJ受体功能,将对褐家鼠APJ受体进行生物信息学分析,并预测其结构和功能。

方法:用TMpred、TMHMM,COILS等在线软件预测APJ受体的基本性质,Bioedit软件分析其亲疏水性。在线软件PredictProtein预测APJ受体的二级结构。用motifcan和SMART预测模体和结构域。

结果:1.基本性质预测显示,APJ受体由377个氨基酸残基组成,分子量为42349.0,理论等电点为6.96。

2.亲疏水性分析显示,APJ受体存在6个明显的疏水区,分别位于35位、70位、110位、150-160位、210位和250位左右。其中,软件评分显示第250位的氨基酸(缬氨酸,Val)具有最高分值,表明该位点的氨基酸疏水性最强。还有5个比较明显的亲水区,分别位于50-60位、90位、130-140位、170-180位和230-240位。其中,第237位左右的氨基酸(甘氨酸,Gly)具有最低分值,表明该位点的氨基酸亲水性最强。

3.二级结构预测显示, $\alpha$ -螺旋占37.67%, $\beta$ -折叠占17.24%,其他不规则卷曲占45.09%。

4.模体和结构域预测显示,APJ受体包含2个N-糖基化位点,分别位于13-16位和173-176位;6个CK2-磷酸化位点,分别位于15-18位,54-57位,87-90位,189-192位,336-339位和374-377位;5个烷基化位点,分别位于40-45位,96-101位,144-149位,198-203位,331-336位;4个PKC-磷酸化位点,分别位于54-56位,87-89位,99-101位和174-176位;5个酰基化位点,分别位于40-45位,96-101位,144-149位,198-203位和331-336位;G蛋白偶联受体F1\_1型结构域位于113-129位;G蛋白偶联受体F1\_2型结构域和7tm-1结构域均位于43-307位。其中,7tm-1结构域预测可信度相对最高。

结论:生物信息学分析推测APJ受体是一个具有7次跨膜结构域的疏水性蛋白, $\alpha$ -螺旋和

不规则卷曲是其二级结构的主要成分，同时该蛋白具有多个磷酸化、烷基化以及酰基化位点。

## 激光光纤荧光光谱法对光敏剂福大赛因注射后不同时间 在裸鼠肿瘤及周围组织内含量分布的研究

付招娣 刘红岩 程桂芳 白金叶 关慕珍

中国医学科学院药物研究所 北京 100050

采用半导体激光光纤荧光光谱法，研究了光敏剂“福大赛因”在荷人食管癌肿瘤小鼠肿瘤及周围组织内的分布。

选用荷人食管癌 CaEs-17 皮下移植性肿瘤裸鼠模型，利用“福大赛因”在 635nm 波长光激发下，发射波长为 685nm 的荧光性质，和 AvaSpec-2048TEC 热电致冷式光纤光谱仪，检测“福大赛因”给药后不同时间的裸鼠活体及处死后动物标本的体表荧光和肿瘤的荧光峰值，以反映药物含量，并与常规荧光分析法进行的药物组织分布结果进行比较。

荧光峰值动态检测观察到，福大赛因给药 1h 后迅速分布于荷瘤小鼠肿瘤组织内，4 h~8 h 时达高峰，24 h~48 h 时仍维持在较高水平。注射后 2h 内，肿瘤组织表面荧光值即开始与肿瘤周围正常组织表面、腹部皮肤及远端肢体出现差距，4h 后差距逐渐增加并持续。36h 后肿瘤与非肿瘤部位荧光比值逐渐减小。荷瘤裸鼠肿瘤表面与肿瘤周围皮肤在 8h~30h 时段，荧光对比度达到 1.31~1.38 间。腹部皮肤于 4h~30h 时段，荧光对比度保持在 1.69~1.55 间，远端肢体在 4h~30h 时段，荧光度比值保持在 1.51~1.7 间。提示福大赛因静脉注射后，药物迅速到达肿瘤部位，并与周围组织形成一定分布差别，其中于给药后 8h~30h 时段差别较为明显。

观察与比较给药后活体及处死后标本相同部位的荧光峰值显示，给药 8h 内，活体裸鼠各部位荧光峰值高于处死后的动物标本。8h 后，活体与处死后标本在各相同时点荧光峰值数据接近，动态趋势相同。活体和处死后标本相同部位荧光检测结果基本一致。

用激光光纤荧光光谱法检测福大赛因在动物肿瘤和周围正常组织及脏器内的分布的结果与荧光分析法大致相同。该方法简便，结果可靠，重复性较好，为光纤荧光法应用于临床提供了实验依据。

## 吲哚-2, 3-二酮的电化学方法测定

倪倍倍 董希英 刘宝玫 宋丽阳 杨杰 岳旺

青岛大学医学院 青岛 266021

目的：吲哚-2, 3-二酮 (1H-Indole-2, 3-dione)，是海洋生物龙虾生存的必需物质，也是人体老化酶单胺氧化酶 B (MAO-B) 抑制因子，具有抗衰老活性。尿液中吲哚-2, 3-二酮浓度异常变化涉及衰老性疾病。基于吲哚-2, 3-二酮对光泽精电化学发光的增强作用，建

立了电化学发光法测定吡啶-2,3-二酮浓度。方法：使用线性扫描法对吡啶-2,3-二酮在铂电极 (PT) 上进行还原扫描, 测定电化学发光强度 (ECL)。扫描电位范围  $0 \sim -1V$ , 扫描速率  $0.05V/s$ , 高压  $800V$ , 采样速率  $10T/s$ 。  $\Delta I = I_s - I_0$  ( $I_0$  是未加入 2,3-吡啶酮时光泽精的空白电化学发光值;  $I_s$  是加入吡啶-2,3-二酮后的电化学发光值)。在最佳条件下, 此方法线性良好。结果吡啶-2,3-二酮浓度在检测范围  $9.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-5} g/mL$  范围内与光泽精电化学发光增强值呈线性。线性方程为  $\Delta I = 29.033c + 172.83$  ( $\Delta I$  是吡啶-2,3-二酮对光泽精电化学发光的增强值,  $c$  为吡啶-2,3-二酮浓度), 相关系数  $r = 0.9936$ , 检测限为  $2.1 \times 10^{-8} g/mL$ 。结论: 该方法准确、快速、灵敏, 可用于人尿液中吡啶-2,3-二酮的含量测定, 样品回收率在  $81.7 \sim 110.1\%$ 。

## HPCE 测定野菊花中 9 种黄酮类化合物的含量

吴婷妮 余长柱 李俊

安徽医科大学药学院天然药物活性研究省级重点实验室

国家中医药管理局中医药三级实验室“中药药理实验室” 合肥 230032

目的: 建立野菊干燥头状花序中 10 种黄酮类物质的毛细管电泳分析方法。方法: 采用区带毛细管电泳法系统分离黄酮。压力进样  $20\text{pai}$ ,  $5s$ ; 运行时间  $35\text{min}$ , 电压  $15\text{kV}$  (恒压分析); 柱温  $30^\circ\text{C}$ ; 检测波长:  $330\text{nm}$ ; 运行缓冲液为硼砂-磷酸二氢钠系统 ( $20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  硼砂,  $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钠),  $\text{pH} = 9.6$ 。结果: 通过对  $\text{pH}$  值, 缓冲溶液浓度的优选, 在该系统条件下, 供试品中 10 种黄酮被很好分离并定量。结论: 该方法可以为野菊花药材的质量鉴定, 为黄酮类药物制剂的分离测定提供依据。方法简便准确。

## 应用定量 PCR 技术检测 HIV-1 逆转录环节的方法的建立

杨颖 陈勃 郭颖

中国医学科学院北京协和医学院药物研究所 北京 100050

HIV-1 的逆转录作用是其正链 RNA 在逆转录酶催化下生成双链 DNA 的过程, 是 HIV-1 复制的重要环节, 现已成为抗 HIV-1 药物研究的重要靶点。本研究应用 SYBR Green I 荧光定量 PCR 技术建立了检测 HIV-1 逆转录环节的评价方法, 并以此方法评价了抗 HIV-1 药物的作用机制。本方法提取被 HIV 感染细胞基因组 DNA, 并以此为模板, 依据 HIV-1 基因组 R/U5 序列、U3 序列、R/PBS 序列和 U5/Gag 序列设计特异性的引物, 采用实时 SYBR Green I 荧光定量 PCR 法扩增 HIV-1 逆转录环节各个步骤的产物, 以  $\beta$ -Actin 和 GAPDH 为内参, 定量测定药物对 HIV-1 逆转录的起始、负链的转移、正链的起始和完整双链 DNA 合成等各步骤产物的影响。结果显示, 应用所设计的 R/U5、U3、R/PBS 及 U5/Gag 引物的扩增效率均在  $90\% \sim 110\%$  之间, 且与内参引物  $\beta$ -Actin 和 GAPDH 的扩增效率差距在  $5\%$  以内, 符合相对定

量的要求,应用阳性药物依法维纶(EFV)验证结果与文献报道一致,本方法灵敏度高、特异性好,扩增结果稳定可靠,可用于 HIV-1 复制抑制剂机理的研究。

## 九、生殖毒理

### 吡咯西啶双烷生物碱所致的胎儿发育毒性研究

寇皓<sup>1</sup> 郭喻<sup>1</sup> 熊婕<sup>1</sup> 马振国<sup>1</sup> 郑江<sup>2</sup> 汪晖<sup>1</sup>

<sup>1</sup>武汉大学基础医学院药理学系 武汉 430071

<sup>2</sup>Center for Developmental Therapeutics, Seattle Children's

Research Institute; Division of Gastroenterology, Department of Pediatrics,

University of Washington, Seattle, WA 98101, USA

目的:吡咯西啶双烷生物碱类(pyrrolizidine alkaloids, PAs)是一类在传统草药、补剂、茶等植物中广泛存在的生物碱,本研究从整体水平研究孕中晚期 PAs 暴露所致小鼠发育的毒性作用。方法:小鼠孕第 7 日起分别灌胃给予小、大倒千里光碱(retrorsine, Ret, 10 和 20 mg/kg·d)或野百合碱(monocrotaline, MCT, 80 mg/kg·d),对照组给予等体积的溶媒,孕 17 日剖腹取胎鼠,记录胎鼠生长发育指标(体重、身长、尾长);ELISA 法检测胎血促肾上腺皮质激素(ACTH)及皮质酮(CORT)浓度;HE 染色观察胎鼠肝、肺形态学改变;Ehlich 法检测胎鼠肝、肺 PAs 代谢物含量;并检测胎鼠肝、肺还原型谷胱甘肽(GSH)含量,胎鼠肝脏丙氨酸转氨酶/天门冬氨酸转氨酶(ALT/AST)活力及相关抗氧化指标:谷胱甘肽巯基转移酶(GST)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、谷胱甘肽还原酶(GR)和超氧化物歧化酶(SOD)活性,以及丙二醛(MDA)含量。结果:小剂量 Ret 组胎鼠体重和身长均较正常对照组降低( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),大剂量 Ret 和 MCT 组胎鼠的生长发育指标也有降低趋势;Ret 处理组胎血皮质酮均高于正常,大剂量 Ret 暴露能显著升高胎血 ACTH 水平( $P < 0.05$ );胎鼠肝脏部分出现淤血,肺脏部分细胞呈坏死状;各 PA 处理组胎肝、肺组织均能检测到 PAs 代谢产物;与对照组比较,Ret 可降低胎肝、肺 GSH 含量,但无明显的量效关系,而 MCT 则无显著影响;各 PA 处理组胎鼠肝脏 GPT、GOT、GST、GPx 以及 GR 活性均较对照组有不同程度降低,MDA 含量均升高,以大剂量 Ret 组尤为显著( $P < 0.05$ ),而 PAs 各组 SOD 活力则均低于正常对照( $P < 0.01$ )。结论:Ret 和 MCT 具有发育毒性,尤以 Ret 的毒性作用明显,其机制可能与原位氧化代谢损伤有关;胎血糖皮质激素水平的升高可能是通过母源性过暴露导致。

## 孕期咖啡因摄入所致 IUGR 胎鼠肝脏 IGF-1 基因的表达抑制及表观遗传修饰改变

刘瑾<sup>1</sup> 徐丹<sup>1,2</sup> 刘莲<sup>1</sup> 杨明锐<sup>1</sup> 平洁<sup>1,2</sup> 汪晖<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>武汉大学基础医学院药理学系 武汉 430071

<sup>2</sup>武汉大学食品与药品评价研究中心 武汉 430071

目的：妊娠期咖啡因摄入是引起胎儿生长发育迟缓的危险因素之一。胎儿时期，胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 是促进胎儿生长发育的重要激素，胎儿血 IGF-1 浓度与胎儿出生体重呈正比。本课题在孕期咖啡因摄入所致的宫内发育迟缓 (IUGR) 大鼠模型上，观察胎鼠肝脏 IGF-1 表达、IGF-1 基因 DNA 甲基化修饰、组蛋白甲基化修饰改变以及 IGF-1 类胰岛素信号通路功能改变，初步探讨咖啡因所致 IUGR 胎鼠肝脏 IGF-1 表达及功能改变的表遗传机制。方法：采用孕中晚期连续灌胃咖啡因 (120 mg/kg·d) 10 天建立咖啡因所致大鼠 IUGR 模型，实时定量 PCR 技术检测胎肝 IGF-1 和 IGF-1 类胰岛素信号通路上多个基因——胰岛素样生长因子受体 (IGF-1R)、胰岛素受体底物-1 (IRS-1)、蛋白激酶 (Akt2/PKB)、葡萄糖转运体 4 (GLUT4) 的 mRNA 表达；亚硫酸氢盐修饰后测序 (BSP) 技术检测 IGF-1 启动子 2 区 DNA CpG 位点甲基化修饰情况；染色质免疫共沉淀 (ChIP) 技术检测 IGF-1 组蛋白甲基化 H3K4me2 和 H3K4me3 的修饰情况。结果：①IUGR 发生率：与对照组相比，咖啡因组的雄性和雌性胎鼠体重分别降至对照组的 82% ( $P < 0.01$ ) 和 79% ( $P < 0.01$ )，IUGR 发生率分别达 87% ( $P < 0.01$ ) 和 64% ( $P < 0.01$ )。②IGF-1 和 IGF-1 类胰岛素信号通路：咖啡因组雄性胎鼠肝脏 IGF-1 的 mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.01$ )，IGF-1R、IRS-1、Akt2/PKB、GLUT4 的 mRNA 表达也出现一定程度的降低。③IGF-1 启动子 2 区 (P2) 甲基化修饰：咖啡因组雄性胎鼠肝脏 IGF-1 P2 (nt: -270~-6) CpG 位点总体甲基化率及单个 CpG 位点甲基化率有升高趋势。④IGF-1 基因组蛋白甲基化修饰：咖啡因组雄性胎鼠启 P2 H3K4me2 和 H3K4me3 分别降至正常对照组的 66.8% 和 39.1%；外显子 5 (Exon 5) 区 H3K4me2 和 H3K4me3 分别为正常对照组的 50.7% 和 27.7%；3 端非翻译区 (3' UTR) H3K4me2 和 H3K4me3 分别为正常对照组的 63.8% 和 47.0%。结论：孕期咖啡因摄入可引起 IUGR 胎肝 IGF-1 表达抑制、IGF-1 基因 P2 区 DNA 甲基化修饰升高和 H3K4me2、H3K4me3 修饰降低，这些表观遗传修饰改变可能是咖啡因引起 IGF-1 表达降低及其信号通路抑制的主要原因。

## 孕期尼古丁暴露所致成年雌性大鼠脂肪 肝易感的宫内代谢编程机制

沈朗<sup>1</sup> 平洁<sup>1,2</sup> 吴勇<sup>1</sup> 张郦<sup>1</sup> 刘岩松<sup>1</sup> 刘莲<sup>1</sup> 鄢友娥<sup>1</sup> 汪晖<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>武汉大学基础医学院药理学系 武汉 430071

<sup>2</sup>武汉大学食品与药品评价研究中心 武汉 430071

目的：孕期尼古丁暴露（PNE）是宫内发育迟缓（IUGR）的确切诱因之一。流行病学调查显示，IUGR 胎儿成年后代谢综合征发生风险增加。脂肪肝被认为是代谢综合征在肝脏的表现，且雌性较为明显，其发病机制的核心环节是肝脏胰岛素抵抗及脂质代谢紊乱。PNE 致 IUGR 成年后发生脂肪肝的风险是否增加？其机制如何？尚未见研究报道。本研究在 PNE 所致大鼠 IUGR 模型上，首先观察高脂饮食至成年子代的肝脏病理学改变以及外周糖/脂代谢变化，进一步分析 IUGR 胎鼠血糖/脂代谢产物变化、血胰岛素及脂肪激素的变化，检测胎肝糖皮质激素（GC）活化代谢通路、糖/脂代谢通路的改变，以探讨 PNE 所致成年脂肪肝易感的宫内代谢编程机制。方法：健康 Wistar 孕鼠随机分为对照组及尼古丁暴露组。自孕 9 d 起灌胃给予尼古丁 2.0mg/kg.d，部分孕鼠于孕 20 d 异氟醚麻醉后取胎鼠，留取雌性胎鼠血清和肝脏；其余孕鼠自然生产，挑选仔鼠 8~12 只/窝的母鼠继续饲养，断奶后给予高脂饮食（92.5% 正常饲料、0.5% 胆固醇、7% 猪油）饲养。每周监测体重，至出生后 24 w 行口服糖耐量实验（OGTT），然后异氟醚麻醉处死动物，留取雌鼠血清和肝脏。HE 染色检测成年鼠肝脏病理组织学改变；GeXP 多重基因表达分析技术检测胎肝 GC 活化代谢通路、糖/脂代谢通路关键基因的 mRNA 表达；ELISA 法测定血清皮质酮、脂联素、瘦素水平；放免法测定血清胰岛素水平；生化法检测葡萄糖、甘油三酯（TG）、游离脂肪酸、胆固醇、LDL、HDL 及肝脏局部 TG。结果：①成年鼠：与对照组相比，PNE 可致仔鼠出生体重降低（ $P < 0.05$ ），高脂饮食饲养后出现“追赶性生长”（ $P < 0.01$ ），肝组织 TG 升高（ $P < 0.05$ ），肝细胞大量脂肪变性；OGTT 显示 PNE 成年鼠空腹血糖升高，糖耐量异常（ $P < 0.05$ ），空腹血胰岛素降低（ $P < 0.05$ ）；血 TG、胆固醇和 LDL 含量均升高（ $P < 0.05$ ），HDL 无显著差异，脂联素及瘦素均降低（ $P < 0.05$ ）；血皮质酮升高；②胎鼠：与对照组相比，PNE 所致 IUGR 胎鼠血糖升高（ $P < 0.05$ ），血胰岛素降低（ $P < 0.05$ ）；血胆固醇、TG 降低（ $P < 0.05$ ）；血脂联素、瘦素降低（ $P < 0.05$ ）；血皮质酮升高；多重基因表达分析显示，胎肝 GC 活化代谢相关酶及受体（ $11\beta$ -HSD-1 和 GR）的表达均升高（ $P < 0.05$ ）；胰岛素样生长因子（IGF）和胰岛素信号通路（IGF1R、IRS1、IRS2、IGFBP3、SREBP1c、GSK3 $\beta$ ）抑制、脂联素和瘦素信号通路（ADipoR2、JAK2、AMPK $\alpha$ 、PPAR $\alpha$ 、HNF4、HMG-CoA reductase、ACC、CPT1a）增强。结论：PNE 可致子代成年雌性大鼠出现糖耐量异常及血脂紊乱，继而发生脂肪肝，其机制可能与宫内时期血高 GC 引起的胎肝 GC 代谢活化及糖、脂代谢通路编程改变有关。

## 海带多糖对铅中毒雄性小鼠生殖的影响

石振艳 毛小红 倪倍倍 王园园 岳旺

青岛大学医学院 青岛 266021

目的：通过建立铅中毒模型，研究海带多糖对醋酸铅染毒雄性小鼠生殖的影响。方法：将雄性昆明种小鼠随机分为空白组、模型组、青霉胺组、海带多糖低、中、高剂量组。除空白组外，其他组腹腔注射醋酸铅染毒，并以相应药物治疗。30 天后与正常雌鼠交配两个性周期，观察交配率、受孕率及畸胎率，交配结束后处死雄性小鼠测定血铅水平、雄性器官指数、精子畸形率活动度。结果：雌雄小鼠交配率增加，受孕率升高，畸胎率降低 ( $P < 0.05$ )。模型组雄鼠的血铅浓度高于空白组及各实验组 ( $P < 0.01$ )；海带多糖组雄鼠的睾丸、附睾脏器指数高于模型组 ( $P < 0.05$ )，海带多糖组精子畸形比率低于模型组 ( $P < 0.01$ )，而活动率高于模型组 ( $P < 0.05$ )；海带多糖组海带多糖低、中、高剂量组精原细胞、初级精母细胞及精子细胞数目增多 ( $P < 0.05$ )。结论：天然产物海带多糖对醋酸铅染毒雄性小鼠生殖有保护作用。