

6 甲基莲心碱对 K562/A02细胞及原代耐药白血病细胞增生、*P-gp/mdr-1*基因表达的影响:甲基莲心碱是拮新康复方中主要有效成分。采用 MTT法、免疫组化 SABC法 RT-PCR法及 western蛋白印迹法,探讨甲基莲心碱对 K562/A02细胞及耐药白血病患者白血病细胞增生及 *P-gp/mdr-1*基因表达,结果显示经甲基莲心碱处理后的耐药白血病细胞有增生抑制。并能降低 *P-gp/mdr-1*基因表达与无药组比较有明显差异 ($P < 0.01$),从而逆转 MDR。

7. 甲基莲心碱对 K562/A02细胞增强 ST571敏感性的研究:慢粒白血病的发病机制与 Bcr/abl融合基因的表达产物有关,它具有酪氨酸激酶的活性,ST571(格列卫)药物是特异性的酪氨酸酶抑制剂,它的出现对慢粒白血病的治疗有着非常重要的意义,但是,临床发现有一部分患者开始对“格列卫”的治疗有较好的疗效,但较快出现耐药性,甲基莲心碱是否可逆转其耐药性?我们采用 MTT法、RT-PCR及 Western蛋白印迹法,探测格列卫、甲基莲心碱单独及两者联合处理 K562/A02细胞的增生及 *P-gp/mdr-1*基因表达的水平,结果显示甲基莲心碱与格列卫联合处理 K562/A02细胞后增生抑制作用较单药组明显增强 ($P < 0.01$),*mdr-1* mRNA 转录水平及 *P-gp*的表达较单药组明显下调 ($P < 0.01$),提示甲基莲心碱能增强 K562/A02细胞对 ST571的敏感性,下调其 *mdr-1*mRNA 的转录和 *P-gp*的表达,从而逆转耐药,为临床采用拮新康治疗耐药慢粒白血病患者提供了实验依据。

上述研究从细胞株到动物模型,从细胞水平、蛋白水平及分子水平研究,拮新康及有效成分甲基莲心碱逆转耐药白血病细胞的耐药机制,研究结果相互已印证,是通过降低 *P-gp/mdr-1*基因表达,降低细胞内谷胱甘肽含量及下调细胞 GST- mRNA 转录和蛋白的表达,增加细胞内化疗药物的浓度,从而逆转白血病细胞 MDR。同时还发现甲基莲心碱能增强 K562/A02细胞对格列卫的敏感性,下调其 *mdr-1* mRNA 的转录和阻断 *P-gp*的表达,从而逆转耐药。

以上述研究结果充分说明了拮新康及其有效成分甲基莲心碱是一种很好的肿瘤耐药逆转剂。本研究采用方法先进、科学性强、有创新性、结论可靠,具有重要的实用价值,为临床应用治疗耐药肿瘤提供了有力的理论与实验依据,为开发中药新药拮新康奠定了科学基础,预计开发进入市场将会产生重大的社会效益。(收稿:2007-07-01)

脑缺血性疾病中星形胶质细胞保护机制研究

王昕虹 柳华东 卢洁 于常海

星形胶质细胞是中枢神经系统中数量最多的细胞,也是最强大的支持细胞。它在维持内环境的稳定,血脑屏障的形成和神经兴奋传递等方面有重要作用。研究发现,星形胶质细胞在缺血状态下具有较强的耐受力,并能保护神经元。近年来,本课题组利用缺氧缺糖培养模拟在体缺血状况,着重对体外培养的原代星形胶质细胞在脑缺血状态下的损伤和抗损伤机制进行了深入研究,获得了一系列新发现。这将为临床预防和治疗脑缺血性疾病提供新的理论基础。

本研究利用多种方法系统观察了缺血损伤后星形胶质细胞的死亡形式,证实星形胶质细胞在脑缺血损伤下是以凋亡的形式死亡的,而不是先前普遍认为的坏死。形态学观察和细胞存活率检测发现,星形胶质细胞在缺血 4h 才开始死亡,到缺血 6~8h 细胞死亡数达 80%~95%。从缺血处理 4h 开始可以检测到显示细胞早期凋亡的 Annexin V 染色阳性的细胞(磷脂酰丝氨酸从细胞膜内翻转到外,Annexin V 荧光染色阳性,是细胞早期凋亡的标志),证实星形胶质细胞在缺血后首先进入了早期凋亡阶段;透射电镜观察发现星形胶质细胞在缺血处理 4h 后发生了染色质聚集,细胞核萎缩,线粒体肿胀的改变;同时 TUNEL、DNA 片段检测也证实星形胶质细胞出现了典型的凋亡表现——DNA 断裂;缺血处理后恢复正常培养,星形胶质细胞中 caspase-3 的酶活性显著增强。上述结果从多方面证实星形胶质细胞在缺血损伤后发生了凋亡。本研究还阐述了缺血损伤后调节星形胶质细胞存亡的分子机制。检测与细胞存活或死亡密切相关的信号分子 Erk1/2 和 Akt 的变化,发

获奖项目:获 2006 年中华医学科技奖二等奖

基金项目:国家自然科学基金(30270426, 30470543);北京市自然科学基金(7032026, 7051004)

作者单位:100083 北京大学神经科学研究所/北京大学基础医学院神经生物学系、教育部神经科学重点实验室、卫生部神经科学重点实验室

现星形胶质细胞中磷酸化 Erk1/2与 Erk1/2蛋白的比例在缺血损伤后迅速升高,在 4h达高峰;磷酸化 Akt与 Akt蛋白的比例在缺血损伤后 4~6h升高,也是 4h达高峰。这两条通路激活的高峰时间均与星形胶质细胞开始发生凋亡的时间一致。利用抑制剂的实验证实,缺血处理后 Erk1/2通路的激活是通过升高 Bcl-2的蛋白含量而保护星形胶质细胞;而抑制 PBK也可达到相同的效果。这些结果证实了缺血损伤后 MAPK/Erk1/2和 PBK/Akt通路参与并调控星形胶质细胞的存亡。另外,在缺血损伤后星形胶质细胞中 L-1, L-6和 TNF- 的基因表达水平升高,在细胞培养基中 L-1、L-6、TNF- 和 IFN- 的蛋白含量升高,证实缺血处理后星形胶质细胞合成并释放细胞因子。这些细胞因子可能也参与调节星形胶质细胞的存亡。

本研究进一步重点探讨了缺血损伤后星形胶质细胞的保护机制。我们发现两种重要的蛋白——14-3-3g和脑红蛋白(Ngb),都对缺血损伤的星形胶质细胞发挥了保护作用。14-3-3g属于 14-3-3蛋白家族。以往的研究认为它主要是在神经元中表达,而本研究在利用 RNA 指纹图谱技术筛选差异表达基因的过程中惊奇地发现,14-3-3g蛋白在缺血处理的原代培养的星形胶质细胞中表达显著升高。Western blot和免疫荧光染色结果进一步证实星形胶质细胞中存在 14-3-3g的蛋白表达。Northern blot和 Western blot结果表明星形胶质细胞中 14-3-3g在缺血 1h就显著升高,并持续到缺血 2~6h。并且在比较缺血处理后星形胶质细胞中 14-3-3各亚型的基因表达时发现 5种亚型——b, g, z, e, h中只有 g亚型特异性表达上调。在此基础上,我们进一步研究了 14-3-3g在缺血处理后的星形胶质细胞中的功能和作用机制免疫荧光染色研究发现,在缺血处理后 14-3-3g蛋白在存活的星形胶质细胞中表达升高,而在凋亡的细胞中表达降低。转染 14-3-3g正义寡核苷酸能促进受损伤的星形胶质细胞存活,抑制其凋亡;而转染 14-3-3g反义寡核苷酸则促进细胞死亡。上述结果证实 14-3-3g蛋白对缺血损伤的星形胶质细胞有保护作用。我们又研究了 14-3-3g抗凋亡作用的机制,免疫共沉淀等实验阐明 14-3-3g是通过与磷酸化 Bad主要是磷酸化 Bad 112结合从而发挥其阻止 Bad进入线粒体启动凋亡程序而起到抗凋亡的作用的。

脑红蛋白(neuroglobin, Ngb)是 2002年新发现

的携氧球蛋白。目前对 Ngb的研究和 14-3-3g一样大都集中在神经元中,而星形胶质细胞中是否含有功能性的 Ngb并不清楚。本研究首次从核酸和蛋白层面上明确了 Ngb确实存在于原代培养的星形胶质细胞中。虽然星形胶质细胞中 Ngb的表达量显著低于神经元,但仍能发挥其抗缺血损伤的功能。我们转染 Ngb反义寡核苷酸后检测缺血损伤后星形胶质细胞的存活率,发现原代培养的星形胶质细胞死亡增加,其凋亡率比未转染或转染了正义寡核苷酸的细胞升高了 2.5倍。上述研究证实了 Ngb在原代星形胶质细胞有表达,并且它在缺血状态下发挥了重要的抗凋亡作用。目前我们对 Ngb的抗凋亡机制还在进行深入的研究。本课题组对脑缺血性疾病中星形胶质细胞的损伤和抗损伤机制的研究将为脑缺血性疾病的临床治疗研究提供一定的理论依据。

(收稿:2007-07-03)

心律失常 Lorenz图智能化诊断模型研究*

李方洁 杨新春 白净 张瑞麟
张永红 蔡敬怡

目前,动态心电图是用于长程心电数据分析的唯一方法,但其对心电信息的处理模式仍是沿用传统识图的方法,只是用计算机代替人工操作。对国内外动态心电图技术回顾总结表明,动态心电图对心律失常的自动识别和分析功能仍有很大不足,常见心律失常都需要心电图医生反复修改,才能得出正确的诊断报告。本项研究用 10余年时间,通过 Lorenz图与动态心电图诊断对比、与腔内电生理对比、不同心律失常 Lorenz相互对比的临床观察,首次系统地采用非线性分析的 Lorenz图方法,建立了临床常见心律失常 Lorenz图智能化诊断模型。

获奖项目:获北京市科技成果、中国中医科学院科技进步奖

基金项目:首都医学发展基金自主创新项目

作者单位:100102 北京,中国中医科学院望京医院(李方洁、张瑞麟、蔡敬怡);首都医科大学附属北京朝阳医院(杨新春);清华大学(白净、张永红)