

· 儿科用药专栏 ·

大蒜新素对人巨细胞病毒感染 人胚肺成纤维细胞 Caspase-3 表达的影响

孙涛涛, 方峰, 甄宏, 舒赛男, 刘瑾, 周玉峰, 李革
(华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科学系, 武汉 430030)

[摘要] 目的 观察大蒜新素对人巨细胞病毒(HCMV)感染的人胚肺成纤维细胞(HELs) Caspase-3 表达的影响,从细胞凋亡角度探讨大蒜新素抗 HCMV 效应的部分作用机制。方法 用 HCMV AD169 毒株感染 HELs,建立高感染复数(MOI)和低 MOI 感染细胞模型;设药物高、中、低剂量分别为 9,6 和 3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,采用蛋白印迹法检测病毒感染和(或)药物处理后 72 h 细胞 Caspase-3 的表达水平。结果 正常细胞仅见 Caspase-3 P32 表达;HCMV 感染细胞 P32 表达显著增加,还出现活性片段 P17 条带,且高 MOI 组 P17 表达明显高于低 MOI 组;大蒜新素处理低 MOI 感染细胞 P17 表达呈上升趋势,P17/P32 比值也明显增加;大蒜新素处理高 MOI 感染细胞 P17 表达下调,P17/P32 比值也显著下降。结论 HCMV 无论高或低 MOI 感染均可诱导细胞凋亡增多,且高 MOI 诱导作用更强。大蒜新素一方面使低 MOI 感染细胞凋亡增多,另一方面抑制高 MOI 感染细胞的凋亡。前者可能有利于细胞清除病毒,后者则可减少细胞损伤而发挥保护作用。大蒜新素对 HCMV 感染细胞凋亡的调控呈双向性。

[关键词] 大蒜新素;人巨细胞病毒;细胞凋亡;Caspase-3

[中图分类号] R286;R965.0

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2007)05-0493-04

Effect of Allitridin on the Expression of Caspase-3 in Human Embryo Lung Fibroblast Cells Infected by Human Cytomegalovirus

SUN Tao-tao, FANG Feng, ZHEN Hong, SHU Sai-nan, LIU Jin, ZHOU Yu-feng, LI Ge (Department of Pediatrics, Tongji Hospital Affiliated with the Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective To investigate the effect of allitridin on the expression of caspase-3 in human embryo lung fibroblast cells (HELs) infected by human cytomegalovirus (HCMV), in order to explore the partial mechanism of allitridin against HCMV from the view of apoptosis. **Methods** HELs were infected by HCMV AD169 strain with high multiply of infection (MOI = 2.5) and low MOI (0.25), respectively. According to the maximum tolerance concentration (MTC) of allitridin to HELs ($9.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 9, 6 and $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ were determined as the high, medium and low dosage of the drug. The level of caspase-3 protein in each group was analyzed by using western blot assay at 72 h after viral infection and/or drug treatment. **Results** The normal HELs only expressed caspase-3 P32. Whereas, the expression of caspase-3 P32 increased after HCMV infection. Moreover, active fragment of P17 of caspase-3 appeared, and the expression of P17 in high MOI group was obviously stronger than that in low MOI group. Compared with infected controls, the active fragment of P17 was up-regulated in low MOI HELs treated with allitridin, and the ratio of P17 versus P32 also significantly increased. On the contrary the active fragment of P17 was down-regulated in high MOI HELs treated with drug, and the ratio of P17 versus P32 decreased as well.

Conclusion HCMV infection could induce the apoptosis of HELs, and this effect was more intense in high MOI group than that in low MOI. Allitridin could up-regulate the apoptosis of low MOI HELs, while down-regulate that of high MOI cells, supposing that the former was inclined to eliminate the virus from the infected cells, and the latter might protect the cells from injury caused by excess cellular apoptosis. This suggests the regulation of allitridin on HCMV-infected cells was the dual effect.

KEY WORDS Allitridin; Human cytomegalovirus; Cell apoptosis; Caspase-3

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)感染极为普遍,虽然免疫正常人群一般表现为无症状感染,但在胎儿、婴幼儿、艾滋病患者、器官移植和恶性肿瘤患者等免疫低下和免疫抑制人群,可导致严重疾病,甚至死亡。凋亡是细胞在生理或病理刺激下发生的一种“自杀”现象,对于维持机体的自身稳定具有重要意义。研究发现,HCMV 感染不仅可诱导组织细胞如视

网膜上皮细胞和纤维母细胞凋亡^[1,2],还可诱导一些免疫细胞如小胶质细胞、巨噬细胞、造血干细胞及中性粒细胞发生凋亡^[3,4],病毒诱导细胞凋亡异常增加已被认为是其重要致病机制之一。Caspases 是一类特异性裂解天门冬氨酸残基的蛋白酶家族,是细胞进入凋亡终末途径的始动子和执行者。其中,Caspase-3 被认为是 Caspases 级联“瀑布”下游最关键的蛋白酶。本

研究拟采用蛋白印迹技术从蛋白水平观察 HCMV 感染和大蒜新素处理感染细胞对凋亡关键因子 Caspase-3 的影响,从细胞凋亡的角度探讨大蒜新素抗 HCMV 作用机制。

1 实验材料

1.1 细胞 自制人胚肺成纤维细胞(HELs),第 5 ~ 15 代用于本试验。

1.2 病毒 HCMV AD169 株,由湖北省预防医学科学院病毒所提供,经蚀斑法测定 HCMV AD169 的平均感染性滴度为 4.6×10^6 PFU · mL⁻¹。

1.3 药物 大蒜素注射液(即大蒜新素)由上海禾丰制药有限公司生产,批准文号:4E38003,规格:每支 2 mL,15 mg · mL⁻¹。Western blot 抗体与显色剂:兔抗人 Caspase-3 多克隆抗体、兔抗人肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 和浓缩型 DAB 试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。

2 实验方法

2.1 实验分组 采用 MTT 比色法测得 HELs 对大蒜新素的最大耐受浓度为 $9.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,据此设立高、中、低剂量(分别为 9,6 和 $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)药物处理组。设高、低病毒感染复数(MOI)分别为 2.50 和 0.25。根据病毒感染量和药物处理剂量共设 9 个实验组,即正常细胞组,低 MOI 感染细胞组,低剂量、中剂量、高剂量药物处理低 MOI 感染细胞组,高 MOI 感染细胞组,低剂量、中剂量、高剂量药物处理高 MOI 感染细胞组。

2.2 病毒感染与药物处理 将 HELs 以 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 密度接种于培养瓶中,培养生长至单层。根据细胞数,接种适量病毒,使 MOI 达 2.50 或 0.25。病毒吸附 1 h 后换含药或不含药维持液,继续培养,每天换液 1 次。于感染后 72 h 收获细胞。

2.3 Western-blot 法分析 caspase-3 蛋白表达强度

2.3.1 样本的制备 用 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞,冰冷 PBS 洗 2 次,加入 5 倍体积 0 °C 预冷悬浮缓冲液裂解细胞,冰上悬浮沉淀并混匀,取部分混悬液测定蛋白浓度(Bradford 法),制出标准曲线。其余加入等体积 2 × 加样缓冲液, -20 °C 保存。电泳前 100 °C 变性 5 min。

2.3.2 Western Blot 检测 每孔加入 50 μg 蛋白质,进行 SDS-PAGE 电泳。采用半干法恒流 300 mA 30 min,转移到 NC 膜上,1% 脱脂奶室温封闭 1 h 后,加入 1 : 50 兔抗人 Caspase-3 多克隆一抗和 1 : 400 兔抗人 β -actin 多克隆一抗 4 °C 孵育 20 h,TTBS 洗膜 10 min × 4 次;加入标记有辣根过氧化物酶的山羊抗兔的二抗(工作浓度 1 : 1 000),室温孵育 2 h;用 TBS 洗膜 10 min × 4 次;用浓缩型 DAB 试剂显色。

2.4 结果分析 采用 HMIAS-2000 型全自动医学彩色图像分析系统测定各目的条带的积分吸光度值。被检蛋白分子量分别为 Caspase-3 前体(P32)32 kD,裂解后活性片段(P17)17 kD, β -actin 为 42 kD。以 β -actin 为内参照进行蛋白上样量的校正(校正值 $A = \text{目的条带积分吸光度值} / \beta\text{-actin 条带积分吸光度值}$),以校正值 A 对 Caspase-3P32 和 P17 进行半定量分析。为保证结果的准确性,所有分析皆由同一专业人员操作完成。

3 结果

如图 1 所示,实验组和细胞对照组在 42 kD 处均有 β -actin 条带,各泳道显色基本均一,说明上样量基本一致。正常细胞仅出现 Caspase-3 前体条带 P32,没有活性片段条带 P17;细胞感染 HCMV 后,无论低 MOI 还是高 MOI,P32 条带均显著增宽,并出现活性片段 P17 条带。与低 MOI 感染对照相比,大蒜新素处理低 MOI 感染细胞的 P17 表达呈上升趋势,P17/P32 比值也明显增加;而大蒜新素处理高 MOI 感染细胞后,P17 表达下调,P17/P32 比值下降,结果见表 1。

图 1 Western-blot 结果

1. 正常细胞对照;2. 低 MOI 对照;3. 低 MOI + 大蒜新素 $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;4. 低 MOI + 大蒜新素 $6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;5. 低 MOI + 大蒜新素 $9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;6. 高 MOI 病毒对照;7. 高 MOI + 大蒜新素 $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;8. 高 MOI + 大蒜新素 $6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;9. 高 MOI + 大蒜新素 $9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;10. 分子量 Marker

表 1 Western blot 检测各实验组目的条带校正值 A

项目	正常 细胞	低 MOI	低剂量药 + 低 MOI	中剂量药 + 低 MOI	高剂量药 + 低 MOI	高 MOI	低剂量药 + 高 MOI	中剂量药 + 高 MOI	高剂量药 + 高 MOI
32 kD	0.420	0.648	0.636	0.619	0.600	0.610	0.633	0.730	0.670
17 kD	-	0.117	0.187	0.220	0.164	0.226	0.191	0.184	0.174
17/32	-	0.181	0.294	0.355	0.273	0.370	0.302	0.252	0.258

4 讨论

目前普遍认为,细胞凋亡是一系列高度调控的半胱氨酸蛋白酶 Caspase 级联反应事件的结果。其中, Caspase-3 被证实处于该级联反应的下游,它通常以无活性的蛋白酶原(Procaspase-3)形式存在于细胞浆内,其分子量为 32 kD,故又名 Caspase-3 P32。当 Caspase-3 蛋白酶原被水解激活时,形成 17 kD 的催化亚基 P17 和 11 kD 调节亚基 P11,并进一步形成 (P17P11)₂ 的异四聚体,即活化的 Caspase-3,后者可特异性识别并裂解下游底物,直接导致凋亡的发生。因而,活化的 Caspase-3 被认为是细胞凋亡的标志物。

为明确 HCMV 感染究竟对细胞凋亡有何影响,笔者在本实验中以 Caspase-3 这一凋亡“标志物”为指标,取 HCMV 感染后凋亡发生的高峰期——感染后 72 h^[5]为观测时间点,研究 HCMV 感染对凋亡的影响。结果显示,细胞感染 HCMV 后,无论是低 MOI 还是高 MOI 感染, Caspase-3 P32 的表达均显著增加,并且还出现活性片断 P17 条带,且高 MOI 感染细胞 P17 蛋白表达量明显高于低 MOI 感染细胞,这与聂兴草等^[5]用流式细胞术检测 HCMV 感染人胚肺成纤维细胞后导致凋亡细胞比率增加的结果是一致的。进一步比较高 MOI 与低 MOI 感染细胞 Caspase-3 表达水平,发现虽然二种感染细胞模型 Caspase-3 P32 的表达水平接近,并无明显差别,但高 MOI 感染细胞 P17 表达强度以及 P17/P32 比值却明显高于低 MOI 感染细胞,表明高 MOI 感染细胞的凋亡事件较低 MOI 感染细胞更为严重,这与聂兴草等^[5]发现感染后 72 h 高 MOI(2.50)感染组凋亡细胞比率高达 25.63%、低 MOI 感染(0.25)组凋亡细胞比率仅为 6.63% 的变化是一致的,再一次证实 HCMV 可以诱导人胚肺成纤维细胞发生凋亡,且随病毒感染量的增加凋亡细胞比例明显增加。

笔者以往对大蒜新素抗 CMV 作用进行了一系列

[收稿日期] 2006-11-10 [修回日期] 2006-12-05

[作者简介] 孙涛涛(1980-),女,山东日照人,硕士,主要从事中药抗病毒机制研究。电话:027-83663579, E-mail: chaosun45@163.com。

[通讯作者] 方峰(1956-),女,湖南临湘人,教授,博士生导师,主要从事儿科疾病的基础与临床研究。电话:027-83662684, E-mail: ffang@tjh.tjmu.edu.cn。

体内外研究,发现该药具有中效抗 CMV 效应;能明显抑制 HCMV 实验毒株和临床毒株的增殖;可明显减少小鼠巨细胞病毒(murine cytomegalovirus, MCMV)肝炎模型鼠肝内 MCMV 病毒负荷量和改善肝脏病变和肝功能损害^[6,7]。那么,大蒜新素对 HCMV 感染所诱导的细胞凋亡又有何影响呢?笔者在本实验中发现,大蒜新素对 Caspase-3 蛋白水平的影响呈双向性:大蒜新素一方面促进低 MOI 感染细胞发生凋亡;而另一方面却抑制高 MOI 感染细胞的凋亡。即当细胞受少量病毒(低 MOI)感染时,大蒜新素的作用倾向于促进感染细胞发生凋亡,从而达到清除病毒的目的;而在细胞受到大量病毒(高 MOI)侵袭时,大蒜新素的作用则倾向于抑制感染细胞发生凋亡,通过抑制细胞凋亡来减少细胞组织损伤而具有保护作用。众所周知, HCMV 是一种增殖缓慢的病毒,在感染后 16~24 h 才开始启动其 DNA 复制,感染后 24~48 h 才开始释放子代病毒。不同剂量 HCMV 感染引起的细胞病变有明显差别。在本实验中观察到,低 MOI 感染细胞在病毒感染约 48 h 后才开始出现细胞病变,而高 MOI 感染细胞在感染后 24 h 即有约 50% 细胞出现典型细胞病变。大蒜新素对不同剂量 HCMV 感染细胞发生凋亡的双重效应可能与不同病毒负荷状态下病毒增殖速度、病毒增殖量、感染细胞内或表面的病毒蛋白表达量、感染细胞的状态和病变程度等多种因素有关,其确切机制有待进一步深入研究。

在观察大蒜新素影响高、低 MOI 感染细胞凋亡水平时,并没有观察到 Caspase-3 P17 的增加或减少与药物剂量呈明显正相关关系。这可能与 P17 基础表达水平较低有关。加用药物后虽然对其有影响,但是在蛋白低水平表达状态下这种影响的差异必须放大才容易被检出,同时,低表达水平更易受到实验操作、结果分析等其他多种因素的干扰。由于实验条件的限制,本试验中 Western blot 采用的是酶显色法,试验灵敏度会差一些,若采用化学发光法显色来重复试验也许能得到更有价值的结果。

笔者以前的研究证明,大蒜新素可在转录水平下调凋亡促进基因 fas 的表达和上调凋亡抑制基因 bcl-2 mRNA 水平^[5];而本研究又证明大蒜新素还可通过对

Caspase-3 在蛋白水平的影响,发挥其调控 HCMV 感染细胞凋亡的作用。由此推测,大蒜新素可从多个环节干扰凋亡途径。有研究证实,Caspase-3 是 Bcl-2 的生理性蛋白酶^[8],如果 Bcl-2 被 Caspase-3 剪切,其形成的片段可以进一步促进下游 Caspase-3 激活,放大 Caspase 级联反应,形成一个 Caspase 级联反应的阳性反馈环路;如果 Caspase-3 被抑制,Bcl-2 表达则会增加。可见大蒜新素干扰凋亡途径的多个环节之间又是互通的和互成网络的,值得进一步深入探讨。

[参考文献]

[1] BUGGAGE R R, CHAN C C, MATTESON D M, *et al.* Apoptosis in cytomegalovirus retinitis associated with AIDS [J]. *Eye Res*, 2000, 21(3):721-729.

[2] ARRODE G, BOCCACCIO C, LULE J, *et al.* Incoming human cytomegalovirus pp65 (UL83) contained in apoptotic infected fibroblasts is cross-presented to CD8 (+) T cells by dendritic cells [J]. *J Virol*, 2000, 74(21):10018-10024.

[3] KOSUGI I, KAVASAKI H, TSUCRIDA T, *et al.* Cytomegalovirus infection inhibits the expression of N-methyl-D-aspartate receptors in the developing mouse hippocampus and

primary neuronal cultures [J]. *Acta Neuropathol (Berl)*, 2005, 109(5):475-482.

[4] SINDRE H, ROLLAG H, OLAFSEN M K, *et al.* Human cytomegalovirus induces apoptosis in the hematopoietic cell line MO7e [J]. *APMIS*, 2000, 108(3):223-230.

[5] 聂兴草, 方峰, 李红, 等. 大蒜新素对人巨细胞病毒感染的人胚肺成纤维细胞凋亡的影响 [J]. *中草药*, 2004, 35(9):1015-1018.

[6] ZHEN H, FANG F, YE D Y, *et al.* Experimental study on the action of allitridin against human cytomegalovirus in vitro: inhibiting effects on immediate-early genes [J]. *Antivir Res*, 2006, 72(1):68-74.

[7] LIU Z F, FANG F, DONG Y S, *et al.* Experimental study on the prevention and treatment of murine cytomegalovirus hepatitis by using allitridin [J]. *Antivir Res*, 2004, 61(2):125-128.

[8] YANG H L, DONG Y B, ELLIOTT M J, *et al.* Caspase activation and changes in Bcl-2 family member protein expression associated with E2F-1-mediated apoptosis in human esophageal cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(4):1579-1589.

苯巴比妥在癫痫儿童中的群体药动学研究

王刚, 刘彬, 梁荆芬

(重庆医科大学儿童医院临床药学研究室, 400014)

[摘要] **目的** 通过临床数据研究儿童苯巴比妥的群体药动学。**方法** 采集 298 例儿童癫痫患者服用苯巴比妥常规治疗的监测资料数据, 利用 CPKDP 程序分析药动学参数, 结合 Bayesian 反馈法及二步迭代估算儿童个体药动学参数。**结果** 癫痫儿童苯巴比妥群体药动学主要参数 K_e 、 V_d 、 CL 在单用苯巴比妥组分别为 0.351 h^{-1} 、 $0.452\text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $5.135\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$; 其中性别、身高以及辅助用药、用药持续时间未见明显影响; 儿童年龄、体重、合并丙戊酸 (vaproic, VPA)、氯硝西洋 (clonazepam, CNP)、托吡酯 (topiramate, TPM)、苯妥因 (phenytion, PHT)、卡马西平 (carbamazepine, CBZ) 为影响苯巴比妥清除率的重要因素, 其中 VPA、CBZ 和 PHT 均增加 PB 的清除率, 而 CNP、TPM 则会降低其清除率。**结论** 根据癫痫儿童的群体药动学模型, 结合患儿的年龄、体重、服药剂量以及合并药等资料, 可估算其清除率, 预测患儿体内的药物浓度, 制定个体化给药方案。

[关键词] 苯巴比妥; 群体药动学; 儿童; 癫痫; 非线性混合效应模型

[中图分类号] R971.6; R969 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2007)05-0496-05

Population Pharmacokinetics of Phenobarbital in Epileptic Children

WANG Gang, LIU Bin, LIANG Jing-fen (Department of Clinical Pharmacy, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

ABSTRACT Objective To investigate the population pharmacokinetics (PPK) of phenobarbital (PB) in epileptic children. **Methods** The data from 298 epileptic children who took phenobarbital were collected. The PPK parameters were estimated by CPKDP program with Bayesian's feedback and iterative two stage method. **Results** The main parameters of the PPK including K_e , V_m , and CL were 0.351 h^{-1} , $0.452\text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $5.135\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively, in phenobarbital alone group. They were not influenced by the children's sex, stature, adjuvant drug administration or drug-taking duration. The epileptic children's age, body weight, and combination of vaproic sodium (VPA), phenytion (PHT), clonazepam (CNP),