

文章编号:1004-4736(2008)01-0013-04

# 昆虫血淋巴抑制细胞凋亡的研究

张 瑞,张佑红\*

(武汉工程大学化工与制药学院,绿色化工过程省部共建教育部重点实验室,  
湖北省新型反应器与绿色化学工艺重点实验室,湖北 武汉 430074)

**摘 要:**对昆虫血淋巴抑制细胞凋亡的研究在理论和实际中都有重要的价值.通过对昆虫血淋巴抑制细胞凋亡研究历史的探讨,发现昆虫血淋巴中包含抑制细胞凋亡的组分,并且在昆虫血淋巴中含有抑制细胞凋亡的不同分子量蛋白,说明昆虫血淋巴介导的抗细胞凋亡效果可能由不同的蛋白执行.它能抑制由病毒诱导的细胞凋亡,对蛋白和病毒生产系统来说,在细胞培养中添加血淋巴,是生物技术中优化的策略.

**关键词:**昆虫血淋巴;抑制;细胞凋亡;细胞培养

**中图分类号:**Q 939.1/.5 **文献标识码:**A

## 0 引 言

细胞培养在生物学研究中具有十分重要的作用.早期研究建立最佳连续的昆虫细胞系的培养条件是利用补充血淋巴的 Grace 培养基,第一个成功的培养细胞系培养配方就是基于昆虫血淋巴组分<sup>[1~4]</sup>.离体细胞的培养为生命科学实验开辟了一条简便而且深入实际的探索之路.昆虫血淋巴用于细胞培养是离体细胞培养实验的开始,对其进行深入的研究将更能发现昆虫血淋巴在细胞培养中的独特生物学效能,更能探寻细胞培养的内在本质,从而服务于实践.

## 1 昆虫血淋巴与细胞培养

昆虫血淋巴作为培养基补充成分在早期的昆虫组织培养中广泛使用.基于昆虫血淋巴的化学成分分析,一种在昆虫细胞培养中的合成培养基研制成功,但是,过去一直辅加昆虫血淋巴.然而大量获取血淋巴是困难的,在 20 世纪 60 年代,它成功地被胎牛血清、鸡蛋超滤液、火鸡血清、甚至鸡血清所取代<sup>[5~7]</sup>.胎牛血清作为哺乳动物细胞培养物和商业中的应用促成它作为昆虫细胞培养的标准<sup>[8]</sup>.实际上,胎牛血清的应用存在一些问题,包括高昂的代价,因批次不同有很大变异而导致的不可重复生产,不确定的组分,支原体污染的危险增加和由于高浓度蛋白的浓缩而造成下游过程的复杂化<sup>[9]</sup>等.昆虫血淋巴作为培养基在早期昆虫组织培养中的成功使用使它具有研究价值,特别是昆虫血淋巴能抑制细胞凋亡的发现使其成

为一个重要的研究点.

## 2 昆虫血淋巴抑制细胞凋亡

### 2.1 昆虫血淋巴的抑制细胞凋亡作用

一些关于血淋巴的实验,特别是关于家蚕血淋巴的研究进行较多,实验证明,产生被家蚕血淋巴抑制的杆状病毒诱导昆虫细胞凋亡的作用,不是因为病毒附着或内化步骤产生抑制<sup>[10]</sup>.一个可能的解释是家蚕血淋巴包含凋亡抑制组分;另一个可能是家蚕血淋巴增进了杆状病毒基因 P35 的表达,这是一个典型的阻止细胞凋亡的反应.事实上,一些病毒蛋白的表达在加入家蚕血淋巴后加强,这支持第二种可能性<sup>[10]</sup>.然而,如果家蚕血淋巴抑制由化学物质诱导的昆虫细胞凋亡,第二种可能将排除.家蚕血淋巴不仅抑制由病毒诱导的细胞凋亡,也能抑制由多种化学物质如放线菌素 D、喜树碱、星形孢菌素诱导的细胞凋亡<sup>[11]</sup>.此外,它也能抑制人体细胞凋亡<sup>[12]</sup>.因此,家蚕血淋巴通过抑制细胞凋亡延长昆虫细胞的寿命<sup>[10,13]</sup>.

以前实验发现在昆虫细胞-杆状病毒系统中,昆虫血淋巴通过抑制杆状病毒诱导的昆虫细胞凋亡,增长了宿主细胞寿命,还增加了重组蛋白的产量,说明抑制细胞凋亡的组分包含在昆虫血淋巴中<sup>[10,14]</sup>.

### 2.2 昆虫血淋巴中抑制细胞凋亡蛋白及其作用机制

从不同昆虫中提取血淋巴加入细胞培养基中能通过抑制细胞凋亡而增加细胞的寿命. Rhee、Park<sup>[10,13]</sup>等的研究已经显示了蚕血淋巴有明确

收稿日期:2007-07-11

作者简介:张 瑞(1977-),男,湖北阳新人,硕士,研究方向:细胞凋亡.\*通讯联系人.

的作用:延长细胞的寿命和在感染杆状病毒后延长细胞死亡时间.这些作者提出,家蚕血淋巴抑制杆状病毒诱导的凋亡.通过进一步研究,他们和 Kanaya<sup>[15]</sup>等分别报道了从家蚕血淋巴中纯化和鉴定了 15.2 kDa 蛋白,此蛋白能促进家蚕核型多角体病毒(BmNPV)在体外的复制,并能增加重组蛋白的表达,表达量大约是普通培养基的 6 000 倍.

从家蚕血淋巴中获得几种抗细胞凋亡蛋白.从数据库中用 N-末端氨基酸序列的结果显示抗细胞凋亡蛋白显示出很高的活性,是一种 30 kDa 蛋白<sup>[14]</sup>.此外, Kim<sup>[14,16]</sup>等已经从家蚕血淋巴中分离一种抗细胞凋亡因子,显示出高的抗细胞凋亡活性,也是 30 kDa 蛋白. Maranga<sup>[17]</sup>等的研究说明 *Lonomia obliqua* 血淋巴能有效的加强 Sf 9 细胞的生长和延长寿命.从 *Lonomia obliqua* 血淋巴纯化的蛋白能将由营养排除和一种化学物质放线菌素 D 诱导的细胞凋亡降低到最小.

从不同的昆虫血淋巴分离出来不同的分子量蛋白质能抑制细胞凋亡,说明昆虫血淋巴介导的抗细胞凋亡效果可能由不同的蛋白执行<sup>[18]</sup>.

家蚕血淋巴抑制细胞凋亡的组分在以前的研究中被分离和鉴定,显示 95% N-末端氨基酸序列与一种结构相关的 30 kDa 蛋白同源.通过转染 30 Kc6 基因在哺乳动物细胞 HEK293 和 CHOK1 表达 30 kDa 蛋白. 30 Kc6 基因的表达抑制细胞凋亡,可与家蚕血淋巴抑制细胞凋亡相比较,说明胞内的基因表达和外部的血淋巴添加都能抑制细胞凋亡. 30 Kc6 基因的表达导致 Caspase3 在胞内活性的降低.然而, Caspase3 的体外分析结果显示 30 Kc6 蛋白并不抑制 Caspase3 的活性.这说明 30 Kc6 蛋白抑制细胞凋亡是通过作用在比激活 Caspase3 更远的上游事件<sup>[19]</sup>.

为了生产人红细胞生成素,中国仓鼠卵巢细胞首先被培养在含有胎牛血清的培养基(生长培养基)中,然后在一个含有丁酸钠的无血清培养基(生产培养基)中.丁酸钠增加重组蛋白的生产,但也诱导细胞凋亡,从而减小细胞的存活力和生产力.在以前的研究中,发现家蚕血淋巴能抑制昆虫和哺乳动物细胞凋亡.为了克服丁酸钠引起的细胞凋亡,添加家蚕血淋巴到生长培养基中,这种处理增加了细胞的寿命和生产人红细胞生成素的能力.结果表明,人红细胞生成素的容量生产力增加了 5 倍.在这个实验中发现家蚕血淋巴能抑制细胞色素 C 从线粒体释放到细胞溶胶,并抑制 Caspase3 的激活和其它随后的 Caspase 反应<sup>[20]</sup>.

报道证明家蚕血淋巴抑制细胞凋亡和增加在中国仓鼠卵巢细胞中生产重组人红细胞生成素的产量.在家蚕血淋巴中抑制细胞凋亡组分是 30 kDa 蛋白家族的一个成员.在这个研究中,中国仓鼠卵巢细胞系生产人红细胞生成素是在遗传学上操纵而表达 30 Kc6 基因的,此基因编码家蚕血淋巴中的 30 kDa 蛋白. 30 Kc6 基因的瞬时表达显著地抑制由血清诱导的细胞凋亡.研究者建立了带有抗细胞凋亡特质的表达 30 Kc6 基因的稳定的细胞系. 30 Kc6 基因的稳定表达抑制由于血清诱导而导致的细胞凋亡,增加细胞密度达原来的 5 倍,并使人红细胞生成素的效价达到原来的 10 倍. 30 Kc6 基因的表达对细胞的生存力和生产力的提高确有助益,是因为这个基因稳定的保持了线粒体的活性. 30 Kc6 基因的表达有效的抑制线粒体膜的去极化,接着平衡 ATP 的产生/消耗<sup>[21]</sup>.

### 3 昆虫血淋巴抑制细胞凋亡的实际意义

在生物技术中,高密度培养对最大产量的获得来说是重要因素,大多数的策略是养分流加,分批补料培养或者是灌流.这些过程主要问题是消除生产限制因子.这些因素与营养成分的排除、有毒的代谢副产物的存在或养分限制相关.早期的例子是持续流加,最大的可变的细胞浓度增加到 18%和稳定期延长到 3 天<sup>[22]</sup>.在以前的研究中,哺乳动物细胞培养中的细胞凋亡可通过养分排除来诱导,也能通过培养辅料来抑制<sup>[23]</sup>.蛋白质表达系统中的细胞凋亡最小化,能大大增加蛋白质的产量,而且它的应用相当可观地增加了生物技术应用的价值<sup>[24]</sup>.在昆虫细胞/杆状病毒系统中重组蛋白在加入家蚕血淋巴后产量增加<sup>[16]</sup>,这已被广泛用于生产重组蛋白.例如家蚕血淋巴抑制细胞凋亡和增加在中国仓鼠卵巢细胞中生产重组人红细胞生成素的产量,就是利用 30 Kc6 基因能提供一个新的宿主细胞工程方法去提高重组蛋白的生产<sup>[21]</sup>.从中可以得出结论,添加总的或部分的血淋巴片段在细胞培养中极为重要,对蛋白和病毒生产系统来说,在生物技术应用中是最优化的策略<sup>[17]</sup>.

### 4 昆虫血淋巴抑制细胞凋亡的研究前景

对昆虫血淋巴抑制细胞凋亡的研究在理论和实际中都有重要的价值.对不同发育阶段昆虫幼虫的研究,可能有不同的结果,因为它们有不同的

性质.昆虫变态的过程是高度调控的生长/活化/分化信号和在特定组织的细胞凋亡.某种信号可能在昆虫血液的循环中使血淋巴研究更有趣,涉及到细胞培养和培养基的发展<sup>[17]</sup>.实验表明,昆虫血淋巴中存在尚未鉴定但能直接调节一些细胞功能的蛋白,具有十分巨大的生物技术应用价值,因而它是一个极具应用价值的复合物.从 *Lonomia obliqua* 的血淋巴里部分鉴定三种潜在的复合物:蔗糖水解酶在培养基中诱导高水平的葡萄糖产物,一种对应保持高水平的细胞存活力的在培养中抗细胞凋亡的因子,以及潜在的在培养中增加细胞的产量的细胞生长促进因子<sup>[17]</sup>.作为培养基的辅加物,血淋巴有三种主要效果:促进生长,养分和延长细胞寿命.这些作用都具有十分中重要的研究价值.实验表明,昆虫血淋巴能抑制由多种化学物质如放线菌素 D,喜树碱和星形孢菌素,丁酸钠诱导的细胞凋亡,也能抑制病毒诱导的细胞凋亡,让细胞培养和病毒蛋白生产系统成为一个颇具前景的发展方向.

#### 参考文献:

- [1] Grace T. Effects of various substances on growth of silkworm tissue in vitro [J]. Aust J Biol Sci, 1958, 11:407~417.
- [2] Grace T. Establishment of four strains of cells from insect tissues growth in vitro [J]. Nature, 1962, 195:788-789.
- [3] Grace T D C. Establishment of a line of cells from the silkworm *Bombyx mori* [J]. Nature, 1967, 216: 613.
- [4] Wyatt S. Culture in vitro of tissue from the silkworm *Bombyx mori* [J]. Gen Physiol, 1956, 39:841~852.
- [5] Vaughn J L, Goodwin R H, Tompkins G J et al. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. In Vitro, 1977, 13:213~217.
- [6] Yunker C E, Vaughn J L, Cory J. Adaptation of an insect cell line (Grace's *Antheraea* cells) to medium free of insect hemolymph [J]. Science, 1967, 155: 1565~1566.
- [7] Goodwin R II. Insect cell culture: improved media and methods for initiating attached cell lines from the Lepidoptera [J]. In Vitro, 1975, 11(6):369~378.
- [8] Vaughn J L, Weiss S A. Large-scale propagation of insect cells [J]. Bioprocess Technol, 1990, 10:597~618.
- [9] Zhang J, Kalogerakis N, Behic L A et al. Investigation of reduced serum and serum-free media for the cultivation of insect cells (*Bm5*) and the production of baculovirus (*BmNPV*) [J]. Biotechnol. Bioeng, 1992, 40:1165~1172.
- [10] Rhee W J, Park T H. Silkworm hemolymph inhibits baculovirus-induced insect cell apoptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 271:186~190.
- [11] Rhee W J, Kim E J, Park T H. Silkworm hemolymph as a potent inhibitor of apoptosis in Sf9 cells [J]. Biochem and Biophys Res Commun, 2002, 295:779~783.
- [12] Choi S S, Rhee W J. Inhibition of human cell apoptosis by silkworm hemolymph. [J]. Biotechnol Prog, 2002, 18:874~878.
- [13] Rhee W J, Kim E J, Park T H. Kinetic Effect of Silkworm Hemolymph on the Delayed Host Cell Death in an Insect Cell-Baculovirus System [J]. Biotechnol Prog, 1999, 15:1028~1032.
- [14] Kim E J, Rhee W J, Park T H. Isolation and Characterization of an Apoptosis-Inhibiting Component from the Hemolymph of *Bombyx mori* [J]. Biochem. and Biophys. Res Commun, 2001, 285:224~228.
- [15] Kanaya T, Kobayashi J. Purification and characterization of an insect haemolymph protein promoting in vitro replication of the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus [J]. J Gen Virol, 2000, 81: 1135~1141.
- [16] Kim E J, Park H J, Park T H. Inhibition of apoptosis by recombinant 30K protein originating from silkworm hemolymph [J]. Biochem and Biophys Res Commun, 2003, 308:523~528.
- [17] Maranga L, Mendonca R Z, Bengala, et al. Enhancement of Sf-9 cell growth and longevity through, supplementation of culture medium with hemolymph [J]. Biotechnol Prog, 2003, 19:58~63.
- [18] Souza A P, Peixoto C C, Maranga L, et al. Purification and Characterization of an Anti-Apoptotic Protein Isolated from *Lonomia obliqua* Hemolymph [J]. Biotechnol Prog, 2005, 21:99~105.
- [19] Kim E J, Rhee W J, Park T H. Inhibition of apoptosis by a *Bombyx mori* gene [J]. Biotechnol Prog, 2004, 20(1):324-9.
- [20] Choi S S, Rhee W J, Park T H. Beneficial effect of silkworm hemolymph on a CHO cell system: Inhibition of apoptosis and increase of EPO production [J]. Biotechnol Bioeng, 2005, 91(7):793~800.

- [21] Choi S S, Rhce W J, Kim E J, et al. Enhancement of recombinant protein production in Chinese hamster ovary cells through anti-apoptosis engineering using 30Kc6 gene [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 95(3): 459~467.
- [22] Mendonca R Z, Palomares L A, Ramirez O T. An insight into insect cell metabolism through selective nutrient manipulation [J]. *J Biotechnol.*, 1999, 72: 61~75.
- [23] Mendonca R Z, Arro'zio S J, Antoniaci M M, et al. Metabolic-active-high-density VERO cell cultures on microcarriers following Apoptosis prevention by galactose/glutamine feeding [J]. *J Biotechnol*, 2002, 97: 13~22.
- [24] Mastrangelo A J, Bctenbaugh M J. Overcoming apoptosis: new methods for improving protein-expression systems [J]. *Tibtech*, 1998, 16(2): 88~95.

## Research advance on insect hemolymph inhibiting apoptosis of cells

**ZHANG Rui, ZHANG You-hong**

(School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology;  
Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, Hubei Key Lab of  
Novel Reactor and Green Chemical Technology, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** Studies on insect hemolymph inhibition cell apoptosis is valuable in theory and practice. The history of studies on insect hemolymph inhibition cell apoptosis were discussed, and cell cultures supplementation with insect hemolymph were investigated, which suggested that there were apoptosis-inhibiting component from insect hemolymph, and they were just different protein. This suggested that the anti apoptotic effect mediated by insect hemolymphs may be performed by different proteins. Insect hemolymph inhibited virus-induced cell apoptosis. From studies, we concluded that the addition of hemolymph could be of substantial importance in cell culture with biotechnological applications, allowing the development of optimized strategies for cell, protein, and virus production on systems.

**Key words:** insect hemolymph; inhibit; Apoptosis; cell culture

本文编辑:陈晓革



(上接第 9 页)

## Measurement and correlation of tinidazole solubilities in water systems

**ZOU Ying, LIU Yong-qiong, ZHU Hong, WANG Jian**

(School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology;  
Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, Hubei Key Lab of  
Novel Reactor and Green Chemical Technology, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** The solubilities of tinidazole in water, 5% glucose and 10% NaCl solutions, were measured by using a solid liquid equilibrium cell at 278.15 ~ 318.15 K, respectively. And the ideal solution model and a empirical equation were applied to correlate the solid-liquid equilibrium data. The solubility data obtained in water and 5% glucose solution systems are correlated with the idea solution model with satisfactory results. And the empirical equation can correlated the solubility data well with a lower error between the two correlated methods.

**Key words:** tinidazole; solubility; solid-liquid equilibrium; HPLC; ideal solution model; empirical equation

本文编辑:陈晓革