

效成分为左旋多巴。从猫豆中提取左旋多巴已经在广西实现工业化生产。为拓展猫豆的用途,综合利用猫豆资源,本实验对猫豆中的单体成分猫豆胍(MDG)进行了药理活性研究。研究表明,MDG在较低剂量时,能抑制小鼠自主活动,增大剂量可协同戊巴比妥钠的镇静催眠作用;大剂量时虽不能减少硝酸土的宁致小鼠惊厥的动物数和死亡动物数,但可延长惊厥反应发生的时间和死亡时间;在实验剂量范围内,MDG对氧化震颤素所致小鼠震颤没有明显的对抗作用,不能延长小鼠发生震颤的潜伏期,对震颤持续时间影响不显著,表明MDG在

该实验剂量时,没有抗震颤麻痹作用。

综上所述,猫豆中存在一种具有镇静催眠的化学成分,但活性较弱,经结构修饰有继续研究开发的价值,其镇静催眠作用机制及在其他方面的药理作用有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上册. 上海:上海科学技术出版社, 1977.
 [2] 石世德,周民伟,李建军,等. 安可梦口服液镇静催眠作用的实验研究 [J]. 广东药学院学报, 2004, 20(6): 654-656.
 [3] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2002.
 [4] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2000.

土槿乙酸酰胺对 HeLa 细胞周期的影响

王 辉¹,雷志勇²,陈 虹^{2*},王 贺³,王 敏¹

(1. 武警宁夏总队医院 外一科,宁夏 银川 750004; 2. 武警医学院 生药教研室,天津 300162; 3. 河北医科大学 寄生虫教研室,河北 石家庄 050017)

摘要:目的 通过研究土槿乙酸衍生物土槿乙酸酰胺(PB-LY)对 HeLa 细胞周期的影响,探讨 PB-LY 的抗肿瘤作用机制。方法 采用流式细胞术检测 PB-LY 对 HeLa 细胞周期的影响;采用 RT-PCR 法检测 PB-LY 对 HeLa 细胞周期相关基因 p53 和 p21 mRNA 表达的影响。结果 PB-LY 可明显减少 G₁ 期的 HeLa 细胞比例,明显增加 G₂ + M 期细胞的比例,上调 p53 基因的表达,同时协同下调 p21 基因的表达。结论 PB-LY 可通过增加细胞周期相关基因 p53 基因的表达和减少 p21 基因的表达,使 HeLa 细胞的周期阻断在 G₂ + M 期,从而阻滞 HeLa 细胞的生长。

关键词:土槿乙酸酰胺;细胞周期;HeLa 细胞

中图分类号:R286.91 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2009)02-0278-02

土槿乙酸(pseudolaric acid B, PLAB)的抗肿瘤作用近年来引起人们的高度关注,最近研究表明土槿乙酸及其衍生物可破坏肿瘤细胞的微管结构,抑制微管的聚合和解聚,阻滞肿瘤细胞周期,促进肿瘤细胞发生凋亡^[1-3]。土槿乙酸衍生物土槿乙酸酰胺(18-amide-pseudolaric acid B, PB-LY)是将土槿乙酸与具有组蛋白转移乙酰化酶抑制活性的基因偶联得到的新颖化合物(图 1),对 HeLa 细胞有很强的抑制作用。本实验旨在初步探讨 PB-LY 对 HeLa 细胞周期的影响及其作用机制,为 PB-LY 作为抗肿瘤新药提供理论依据。

1 材料与方

1.1 材料:PB-LY(质量分数 > 95%,由天津武警

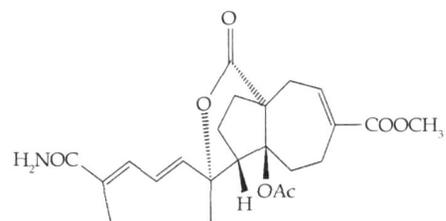


图 1 PB-LY 的化学结构式

Fig.1 Chemical structure of PBLY

医学院生药教研室提供);人宫颈癌 HeLa 细胞(中国医学科学院药物研究所药理室提供);RMP1 1640 培养基(Gibeco 公司);Trizol(Invitrogen 公司);RT-PCR 两步法试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司];EPICS-XL 型流式细胞仪(Comlter Epics 公

* 收稿日期:2008-05-09

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30171108);武警总部课题(WKH2005-7)

作者简介:王 辉(1981-),男,安徽阜阳市人,硕士,研究方向为抗肿瘤药理学。

Tel: 13895640605 E-mail: wanghui2178324@163.com

*通讯作者 陈 虹 Tel: (022) 60578193 E-mail: chen hongtian06@yahoo.com

司); DYY-12 型三恒电泳仪 (北京六一仪器厂); PTC-200 型 PCR 仪 (美国 MJ Research 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养: HeLa 细胞接种于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 将培养瓶置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中进行培养。

1.2.2 PB-L Y 对 HeLa 细胞周期的影响: 取对数生长期 HeLa 细胞, 给药组加入含有不同浓度的 PB-L Y (0.5~4 μmol/L), 空白对照组加入 0.1% DMSO; 给药 24 h 后, 收集细胞, 离心后去上清, PBS 洗涤 1 次。将细胞悬浮, 每管加 70% 冷乙醇约 2 mL 固定, 4℃ 过夜, 次日, 1 000 r/min 离心 5 min, 去乙醇, PBS 洗涤 2 次, 1 000 r/min 离心 5 min, 重复离心洗涤 2 次, 将处理好的细胞经尼龙网滤过, PI 染色后在流式细胞仪上测定细胞周期。

1.2.3 HeLa 细胞周期相关基因的变化: 不同浓度的 PB-L Y 作用 HeLa 细胞 24 h, 按 Trizol 试剂盒说明提取 RNA 后, 按 TaKaRa RT-PCR 两步法试剂盒说明进行反转录 PCR 反应, 得到 p53 和 p21 基因的 PCR 产物, 进行凝胶电泳并观察照相。经软件分析得到待测 RNA 扩增产物与内参照 β-actin RNA 扩增产物吸光度值, 计算二者的比值, 以此作为目的基因的相对表达量。

1.3 统计学处理: 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 PB-L Y 对 HeLa 细胞周期的影响: 图 2 可以看出 PB-L Y 对 HeLa 细胞各时相都有影响, 随着 PB-L Y 浓度的增加, G₁ 期细胞的比例降低, S 期细胞的比例略升高后降低, G₂+M 期细胞的比例明显增加。

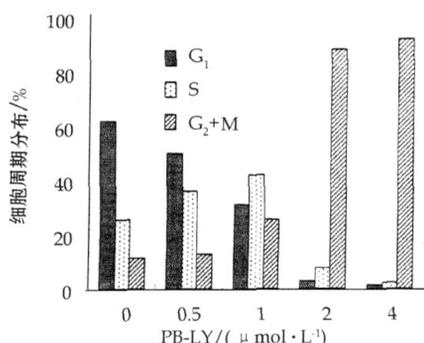


图 2 PB-L Y 对 HeLa 细胞周期的影响

Fig. 2 Effects of PBL Y on cell cycle of HeLa cells

2.2 PB-L Y 对 HeLa 细胞周期相关基因表达的影响: 不同浓度的 PB-L Y 作用于 HeLa 细胞 24 h 后,

随着药物浓度的增高, p53 基因 mRNA 的表达量升高, p21 基因 mRNA 的表达量降低 (表 1 和图 3)。

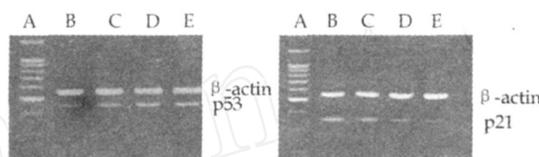
表 1 PB-L Y 作用于 HeLa 后 p53 和 p21 mRNA 的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, n = 4)

Table 1 Effect of PB-L Y on p53 and p21 mRNA expression in HeLa cells ($\bar{x} \pm s$, n = 4)

组别	剂量/(μmol·L ⁻¹)	(p53/β-actin)/%	(p21/β-actin)/%
对照	-	33.74 ± 6.3	75.34 ± 7.4
PB-L Y	0.5	53.19 ± 3.6	63.07 ± 9.6
	1.0	63.02 ± 8.5*	56.96 ± 6.6*
	2.0	80.09 ± 9.1*	35.70 ± 4.6*

与对照组比较: * P < 0.05

* P < 0.05 vs control group



A-Marker B-0.1% DMSO C-0.5 μmol·L⁻¹ PB-L Y
D-1.0 μmol·L⁻¹ PB-L Y E-2.0 μmol·L⁻¹ PB-L Y

图 3 PB-L Y 对 HeLa 细胞 p53 和 p21 mRNA 表达的影响

Fig. 3 Effect of PB-L Y on mRNA expression of p53 and p21 in HeLa cells

3 讨论

在细胞分裂周期中有 3 个专一的细胞周期调控点, 分别调控 G₀/G₁、G₁/S、G₂/M^[4], 如果在调控点被检测出有损伤的 DNA 无法被修复, 则先被阻滞在细胞周期的某一时相, 然后启动细胞凋亡机制清除该细胞; 若细胞失控性生长则成为肿瘤细胞^[5]。本实验结果表明, PB-L Y 可使 HeLa 细胞停滞在 G₂+M 期, 可能阻止受损的 DNA 和未完成复制的 DNA 进入有丝分裂, 从而发挥抗肿瘤作用。

研究发现许多癌基因、抑癌基因直接参与细胞周期的调控, 或者本身就是细胞周期调控机制的主要成分, p53 蛋白具有细胞生长阻滞作用, 如果 DNA 受损伤, p53 蛋白就使细胞停留在 G₁ 期, 修复后再进入 S 期; 如果损伤不能修复, 则诱导其凋亡, 从而避免细胞癌变。除主要引起 G₁ 期阻滞外, p53 还可使细胞阻滞在 G₂ 期^[6]。从本实验结果推测 PB-L Y 可通过上调 HeLa 细胞 p53 基因的表达, 而阻断 HeLa 细胞从 G₂+M 期进入 G₁ 期。p21 蛋白是人们认识最早的一种细胞周期蛋白依赖激酶的抑制蛋白, 当损伤和细胞衰老时, p53 增多并诱导 p21 转录, 阻滞细胞周期的运行, 使细胞周期停滞于 G₁ 期, 不能进入期 S 期^[7]。p21 同时也可以通过 p53 非依赖性方式被其他因子所诱导产生而发挥其生理作

(下转附 3 页)

在厌氧条件下温孵培养 24 h, 可检出两种代谢产物: 20(S)-人参皂苷 Rh₂ 和 20(S)-原人参二醇; 将 20(R)-人参皂苷 Rg₃ 与人新鲜粪便在厌氧条件下温孵培养 72 h, 也得到两个代谢产物: 20(R)-人参皂苷 Rh₂ 和 20(R)-原人参二醇^[21]。

3 结语

目前对于人参皂苷的药动学研究虽然还不太完全, 但已为人参和其他甾体皂苷的药物代谢和药物动力学研究提供了有益的实验方法和实验证据, 相信随着药效基础研究、药理研究和分析手段的发展, 人参皂苷的体内过程将进一步明确, 为人参皂苷应用开拓广阔的前景。

参考文献:

[1] 黎阳, 张铁军, 刘素香, 等. 人参的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 164-附 2.

[2] Odani T, Tanizawa H, Takino Y. Studies on the absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. The absorption, distribution and excretion of ginsenoside-Rg₁ in the rats [J]. Chem Pharm Bull, 1983, 31(3): 1059-1066.

[3] Takino Y, W Karikura M, Hirata T, et al. Studies on distribution and excretion of ginsenoside-Rb₂ in rats after oral administration [J]. Ginseng Rev, 1993(16): 36-40.

[4] 彭纓, 王淑君, 潘卫三, 等. 人参皂苷 Re 大鼠体内药代动力学研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(4): 197-200.

[5] Odani T, Tanizawa H, Takino Y. Studies on the absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. The absorption, distribution and excretion of ginsenoside-Rg₁ in rats [J]. Chem Pharm Bull, 1983, 31(1): 292-298.

[6] 霍玉书, 张树臣. [³H]人参皂苷单体 Rg₁ 药物动力学及体内分布 [J]. 中国药理学报, 1986, 7(6): 519-521.

[7] 杨秀伟. 中药成分代谢分析 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003.

[8] 庞焕, 汪海林, 富力, 等. 20(R)-人参皂苷-Rg₃ 人体药代动力学研究 [J]. 药理学报, 2001, 36(3): 170-173.

[9] 顾轶, 王广基, 孙建国, 等. LC-MS 法测定 Beagle 犬血浆中人参皂苷 20(R)-Rh₂ 及其药代动力学研究 [J]. 中国临床

药理学与治疗学, 2006, 11(3): 256-260.

[10] 赵雷, 陈昕, 陈晓. 肠内菌对人参皂苷 Rb₁ 的代谢特点 [J]. 长春中医药大学学报, 2004, 20(1): 45-49.

[11] W Karikura M, Miyase T, Tanizawa H, et al. Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of Ginseng saponins. The decomposition of ginsenoside-Rb₂ in the stomach of rats [J]. Chem Pharm Bull, 1991, 39(2): 400-404.

[12] W Karikura M, Miyase T, Tanizawa H, et al. Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of Ginseng saponins. The decomposition of ginsenoside-Rb₂ in the large intestine of rats [J]. Chem Pharm Bull, 1990, 38(10): 2859-2861.

[13] Hasegawa H, Sung J H, Matsumiya S, et al. Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria [J]. Planta Med, 1996, 62: 453-457.

[14] Hasegawa H, Sung J H, Benno Y. Role of human intestinal Prevotella oris in hydrolyzing ginseng saponin [J]. Planta Med, 1997, 63: 436-440.

[15] 杨柳, 许舜军, 曾星, 等. 大鼠尿中人参皂苷 Rd 及其代谢物的 LC-MS 研究 [J]. 药科学报, 2006, 41(8): 742-746.

[16] Bea E A, Shin J E, W Kim D H. Metabolism of ginsenoside-Re by human intestinal microflora and its estrogenic effect [J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(10): 1903-1908.

[17] 王毅, 刘铁汉, 王巍, 等. 肠内菌群对人参皂苷 Rg₁ 的代谢转化作用的研究 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(3): 188-190.

[18] Odani T, Tanizawa H, Takino Y. Studies on the absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. Decomposition of ginsenoside-Rg₁ and Rb₁ in the digestive tract of rats [J]. Chem Pharm Bull, 1983, 31(10): 3691-3697.

[19] Takino Y, Odani T, Tanizawa H, et al. Studies on the absorption, distribution, excretion and metabolism of Ginseng saponins. Quantitative analysis of ginsenoside-Rg₁ in rats [J]. Chem Pharm Bull, 1982, 30(6): 2196-2201.

[20] 陈英杰, 荻原幸夫. 20(S)-人参皂苷-Rg₂ 的代谢产物研究 [J]. 沈阳药学院学报, 1987, 4(3): 202.

[21] Bae E A, Han M J, Choo M W K, et al. Metabolism of 20(S)-and 20(R)-ginsenoside Rg₃ by human intestinal bacteria and relation to *in vitro* biological activities [J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25(1): 58-63.

(上接第 279 页)

用^[8]。本实验表明, PB-L Y 可以使 HeLa 细胞的细胞周期阻滞在 G₂ + M 期, 而不是阻滞在 G₁ 期, 同时 p21 mRNA 的表达亦是减少的, 说明 PB-L Y 可能抑制 p21 基因的表达, 通过 p53 非依赖性方式使 HeLa 细胞周期阻滞在 G₂ + M 期。

综上所述, 本实验证明了 PB-L Y 可能是通过增加 HeLa 细胞 p53 基因的表达, 同时减少 p21 的表达, 使 HeLa 细胞周期阻滞在 G₂ + M 期, 发挥抗肿瘤作用, PB-L Y 作为一种新型的抗肿瘤药物, 具有一定的开发前景, 其作用机制仍需进一步深入研究。

参考文献:

[1] 熊斌, 雷志勇, 陈虹, 等. 土槿乙酸衍生物 PBA-DI 诱

导 HeLa 细胞凋亡及其机制 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21(7): 867-871.

[2] Liu B, Chen H, Lei Z Y, et al. Studies on anti-tumour activities of pseudolaric acid-B (PLAB) and its mechanism of action [J]. J Asian Nat Prod Res, 2006, 8(3): 241-252.

[3] Gong X F, Wang M W, Tashiro S, et al. Pseudolaric acid B induces apoptosis through p53 and Bax/Bcl-2 pathways in human melanoma A375-S2 cells [J]. Arch Pharm Res, 2005, 28(1): 68-72.

[4] 姚逸临. 肿瘤抑制基因 p53 的研究进展 [J]. 广东医学, 2006, 27(8): 1263-1265.

[5] Damia G, Broggin M. Improving the selectivity of cancer treatments by interfering with cell response pathways [J]. Eur J Cancer, 2004, 40: 2550-2559.

[6] Hofseth L J, Hussain S P, Harris C C, et al. p53: 25 years after its discovery [J]. Trends Pharmacol Sci, 2004, 25: 177-181.

[7] 吴艳萍, 李立平, 张颖, 等. 细胞周期调控分子与肿瘤关系的研究进展 [J]. 军医进修学院学报, 2006, 27(4): 306-308.

[8] Hou X W, Ma Q Y, Gao Y F, et al. The expression and significance of p53 and p21 (WAF1/CIP1) in thyroid carcinoma [J]. Acad J XJTU, 2005, 17(1): 86-89.