

- dependent ciliogenesis and cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68 (7): 2058-2061.
- [10] 季宇彬, 高世勇, 杨红丹, 等. 甜菜碱对人肝癌细胞周期及凋亡的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(6): 884-886.
- [11] 李翠玲, 张玲, 顾洪涛, 等. 淫羊藿苷体内抑瘤作用及其机制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007, 14(2): 137-142.
- [12] Kim W, Yoon J H, Jeong J M, *et al.* Apoptosis inducing activity and efficacy of hexokinase II inhibitor in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(9): 2554-2562.
- [13] Singh R P, Deep G, Blouin M J, *et al.* Silibinin suppresses *in vivo* growth of human prostate carcinoma PC-3 tumor xenograft [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(12): 2567-2574.

中国被毛孢发酵物对 NOD 小鼠 1 型糖尿病的预防作用

寿旗扬^{1,3}, 傅惠英², 陈方明³, 周卫民³, 张才乔¹, 陈民利^{3*}

(1 浙江大学动物科学学院, 浙江 杭州 310029; 2 浙江大学医学院, 浙江 杭州 310058; 3 浙江中医药大学动物实验研究中心, 浙江 杭州 310053)

摘要:目的 观察中国被毛孢发酵物对自发性 1 型糖尿病 NOD 小鼠的预防作用。方法 利用 NOD 小鼠 1 型自发性糖尿病模型, 连续 10 周 ig 给予 1 g/kg 中国被毛孢发酵物后, 观察 NOD 小鼠的体质量、血糖、发病率、谷氨酸脱羧酶 (GAD) 抗体水平、胰岛病变和胰腺纤维化的变化。结果 NOD 小鼠给予 1 g/kg 中国被毛孢发酵物后, 第 6~10 周时血糖和发病率明显降低 ($P < 0.05, 0.01$), 小鼠血清中 GAD 抗体明显降低 ($P < 0.01$), 小鼠胰岛病变和胰腺纤维化评分值显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 胰腺结构较为清晰, 胰岛有少量炎症细胞浸润, 胰岛 β 细胞未见异常。结论 中国被毛孢发酵物有较好的预防 NOD 小鼠 1 型糖尿病发生的作用。

关键词: 中国被毛孢发酵物; NOD 小鼠; 1 型糖尿病

中图分类号: R286.71 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)08-1311-05

Prevention of strain fermentation in *Hirsutella sinensis* on type 1 diabetes of non obese diabetic mice

SHOU Qi-yang^{1,3}, FU Hui-ying², CHEN Fang-ming³, ZHOU Wei-min³,
ZHANG Cai-qiao¹, CHEN Min-li³

(1 College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 3. The Research Center of Laboratory Animal Science, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

Abstract: **Objective** To observe the prevention of strain fermentation in *Hirsutella sinensis* on spontaneous type 1 diabetes of nonobese diabetic (NOD) mice. **Methods** The NOD mice with spontaneous type 1 diabetes were administrated by 1 000 mg/kg strain fermentation in *H. sinensis* for 10 weeks. The index including body weight, blood glucose, incidence, GAD antibody, the islet pathological change, and pancreas fibrillation were tested. **Results** The levels of blood glucose and incidence decreased significantly after treatment by strain fermentation in *H. sinensis* (1 g/kg) for 6—10 weeks ($P < 0.05$ and 0.01). GAD Antibody was depressed obviously ($P < 0.01$) and the islet pathological change and pancreas fibrillation grade decreased remarkably ($P < 0.05$ and 0.01). The construction of pancreas was vivid, the inflammatory cell infiltration accident in islet and the β cell showed no abnormality. **Conclusion** The strain fermentation in *H. sinensis* has obvious prevention in spontaneous type 1 diabetes of NOD mice.

Key words: strain fermentation in *Hirsutella sinensis* X. J. Liu, Y. L. Guo; non obese diabetic (NOD) mice; type 1 diabetes

1 型糖尿病是一种遗传易感个体通过自身抗原介导的免疫反应所引起胰岛 β 细胞破坏的自身免疫性疾病, 由于自身免疫的损害造成胰岛细胞破坏, 引起胰岛素绝对缺乏, 出现高血糖症状^[1]。非肥胖型

* 收稿日期: 2009-11-11

基金项目: 浙江省科技计划项目 (2004C17001); 浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目资助
作者简介: 寿旗扬 (1979—), 男, 浙江湖州人, 在读硕士, 助理研究员, 主要从事实验动物和动物实验的科研工作。

Tel: (0571) 86613643 E-mail: sqy133@126.com

* 通讯作者 陈民利 E-mail: minlichen01@yahoo.com.cn

糖尿病 (nonobese diabetic, NOD) 小鼠品系于 1980 年由 Makino 等^[2] 通过近亲交配和选择繁殖从 JCR-ICR 小鼠获得。NOD 小鼠能自然发生 1 型糖尿病, 而非实验诱导, 是目前研究 1 型糖尿病的主要动物模型。该品系小鼠通常于 4~5 周龄开始出现胰腺炎, 进行性破坏胰岛 β 细胞, 于 12 周龄时出现明显糖尿病症状, 至 30 周龄时雌性小鼠累计发病率可达到 80%, 而雄性小鼠则不到 20%。通过该模型的研究和干预, 能更好地了解 1 型糖尿病病因、发病机制、病理特征以及药物预防和治疗作用。

中国被毛孢 *Hirsutella sinensis* X. J. Liu, Y. L. Guo 为冬虫夏草无性型, 是从青海冬虫夏草中分离得到的^[3-4]。药理研究证明, 中国被毛孢发酵物具有免疫调节和改善亚健康状态的作用, 而且中国被毛孢在免疫系统、呼吸系统及泌尿系统等多方面药理实验也证明与天然冬虫夏草有相似的功效^[5-8]。本实验观察中国被毛孢发酵物对 NOD 小鼠自发性 1 型糖尿病的预防作用, 为中国被毛孢发酵物预防免疫性 1 型糖尿病的作用提供依据。

1 材料

1.1 药物: 中国被毛孢发酵物干粉 (得率 0.8%~1.5%, 腺苷 $\geq 0.05\%$, 多糖 $\geq 5\%$), 黄色粉末, 由杭州泰士生物科技有限公司提供, 称取适量中国被毛孢发酵物, 加生理盐水, 配成 100 mg/mL 混悬液; FTY720, 白色粉末, 由杭州同明医化科技开发有限公司赠送, 4℃ 保存, 临用前在无菌条件下用生理盐水溶解至 0.1 mg/mL。

1.2 试剂: 血糖试剂条, 美国强生公司, 批号 20080711; 谷氨酸脱羧酶 (GAD) 抗体 ELISA 试剂盒, 北京利米生物科技有限公司。

1.3 动物: 30 只 12 周龄 SPF 级雌性 NOD 小鼠, 10 只 22~24 g 的 SPF 级雌性 ICR 小鼠, 中国科学院上海实验动物中心/上海斯莱克实验动物有限公司提供, 生产许可证: SCXK (沪) 2007-0005。

1.4 仪器: OneTouch[®] Ultra 血糖仪 (美国强生公司); VARIOSKAN FLASH 多功能酶标仪 (美国 Thermo); 725 型 -86℃ 低温冰箱 (美国 FORMA); AG204 电子分析天平 (瑞士 METTLER); HM 335E 型轮转切片机 (德国 MICROM); 染色机 (德国 LEICA); AP280 组织包埋机、脱水机 (德国 MICROM); AXIOVERT200 荧光倒置显微镜 (德国 ZEISS)。

2 方法

2.1 分组与给药^[6]: 取 30 只雌性 12 周龄未发病的

NOD 小鼠, 预饲养 1 周后, 按血糖值和体质量随机分成 3 组, 即模型组、中国被毛孢发酵物 (1 g/kg^[6]) 组和 FTY720 (1 mg/kg) 组, 每组 10 只; 另取 10 只雌性 ICR 小鼠, 预饲养 1 周后, 作为对照组。药物组和阳性对照组小鼠分别 ig 给药, 给药容积为 0.1 mL/10 g, 模型组和对照组 ig 给予生理盐水 0.1 mL/10 g, 每日 1 次, 连续给药 10 周。

2.2 指标检测: 小鼠每 2 周称体质量一次, 并尾静脉取血, 用血糖仪测定小鼠的空腹血糖值, 小鼠空腹血糖值 > 10.0 mmol/L 即为发病, 末次给药后 24 h 小鼠取血, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 用 ELISA 法测定血清中 GAD 抗体水平 (A) 值, 小鼠处死后, 取胰腺, 固定于 10% 中性甲醛中, HE 染色, 进行常规病理检查, 进行图像分析。

2.3 病理检查: 各组胰腺 HE 染色切片在显微镜下观察, 对胰腺纤维化程度进行评分, 评分标准为 0 分: 未见胰腺发生纤维化; 1 分: 胰腺纤维化面积 $< 1/4$; 2 分: 胰腺纤维化面积 $1/4 \sim 1/2$; 3 分: 胰腺纤维化面积 $> 1/2$ 。并计数所有镜下所见胰岛, 半定量评分, 取平均值作为该胰腺胰岛病变的评分。评分标准为 0 分: 镜下所见胰岛未见淋巴细胞浸润; 1 分: 镜下所见胰岛淋巴细胞浸润面积 $< 25\%$; 2 分: 镜下所见胰岛淋巴细胞浸润面积 $25\% \sim 50\%$; 3 分: 镜下所见胰岛淋巴细胞浸润面积 $50\% \sim 75\%$; 4 分: 镜下所见胰岛淋巴细胞浸润面积 $> 75\%$; 5 分: 胰岛萎缩, 镜下未见明显胰岛结构。

2.4 统计学分析: 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析和 χ^2 检验。

3 结果

3.1 对 NOD 小鼠体质量的影响: 由表 1 结果可见, 与对照组比较, 模型组小鼠体质量明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 中国被毛孢组小鼠在给药第 8 和 10 周时体质量明显降低 ($P < 0.05$), FTY720 组小鼠在给药第 8、10 周时体质量明显降低 ($P < 0.05$), 但中国被毛孢组小鼠体质量略高于 FTY720 组。

3.2 对 NOD 小鼠空腹血糖的影响: 由表 2 结果可见, 与对照组比较, 模型组小鼠在实验第 6~10 周时血糖明显升高 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 中国被毛孢组小鼠在给药第 6~10 周时血糖明显降低 ($P < 0.05, 0.01$), FTY720 组小鼠在给药第 6~10 周时血糖明显降低 ($P < 0.05, 0.01$), 但中国被毛孢组小鼠血糖略高于 FTY720 组。

3.3 对 NOD 小鼠发病率的影响: 由表 3 结果可

见,与对照组比较,模型组小鼠在实验第 6~10 周时发病率明显升高 ($P < 0.05, 0.01$);与模型组比较,中国被毛孢组小鼠在给药第 6~10 周时发病率

明显降低 ($P < 0.05, 0.01$),FTY720 组小鼠在给药第 6~10 周时发病率明显降低 ($P < 0.05, 0.01$),且两组均无小鼠发病。

表 1 中国被毛孢发酵物对 NOD 小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of strain fermentation in *H. sinensis* on body weight of NOD mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	给药前体质量/ g	给药后体质量/g				
			2 周	4 周	6 周	8 周	10 周
对照	—	28.66 ± 2.05	30.74 ± 2.31	33.84 ± 2.76	35.79 ± 3.38	35.14 ± 2.58	35.71 ± 2.59
模型	—	21.64 ± 1.84 [△]	22.59 ± 1.42 ^{△△}	23.43 ± 1.38 ^{△△}	24.06 ± 1.24 ^{△△}	24.80 ± 0.83 ^{△△}	25.20 ± 0.90 ^{△△}
中国被毛孢	1 000	21.51 ± 0.68	21.69 ± 0.98	22.66 ± 0.99	23.56 ± 0.91	23.80 ± 1.22*	24.12 ± 1.53*
FTY720	1.0	21.64 ± 1.99	21.91 ± 1.22	22.50 ± 1.14	23.56 ± 1.64	23.43 ± 2.05*	23.78 ± 1.36*

与对照组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$

^{△△} $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group

表 2 中国被毛孢发酵物对 NOD 小鼠空腹血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of strain fermentation in *H. sinensis* on fasting blood glucose in NOD mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	给药前血糖/ (mmol · L ⁻¹)	给药后血糖/(mmol · L ⁻¹)				
			2 周	4 周	6 周	8 周	10 周
对照	—	6.04 ± 1.14	4.71 ± 0.72	5.92 ± 0.50	6.60 ± 0.47	6.21 ± 0.55	6.99 ± 0.52
模型	—	4.01 ± 0.56	3.87 ± 0.72	12.21 ± 10.74	14.31 ± 10.02 [△]	17.42 ± 11.74 ^{△△}	21.92 ± 11.58 ^{△△}
中国被毛孢	1 000	3.99 ± 0.43	4.12 ± 0.47	6.11 ± 1.04	6.59 ± 1.12*	6.94 ± 1.27*	6.65 ± 1.45*
FTY720	1.0	4.03 ± 0.64	4.10 ± 0.55	5.30 ± 0.77	5.97 ± 0.57*	6.00 ± 0.77*	5.86 ± 0.57*

与对照组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

[△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

表 3 中国被毛孢发酵物对 NOD 小鼠发病率的影响

Table 3 Effects of strain fermentation in *H. sinensis* on incidence in NOD mice

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	动物/ 只	给药前 发病率	给药后发病数				
				2 周	4 周	6 周	8 周	10 周
对照	—	10	0	0	0	0	0	0
模型	—	10	0	0	2	4 [△]	6 ^{△△}	7 ^{△△}
中国被毛孢	1 000	10	0	0	0	0*	0*	0*
FTY720	1.0	10	0	0	0	0*	0*	0*

与对照组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

[△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs control group

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

表 4 中国被毛孢发酵物对 NOD 小鼠血清中 GAD 抗体水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of strain fermentation in *H. sinensis* on level of GAD antibody in serum of NOD mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	GAD 抗体水平 (A 值)
对照	—	0.397 ± 0.117
模型	—	1.523 ± 0.159 ^{△△}
中国被毛孢	1 000	1.017 ± 0.332*
FTY720	1.0	0.714 ± 0.323*

与对照组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$

^{△△} $P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group

表 5 中国被毛孢发酵物对 NOD 小鼠胰岛病变和胰腺纤维化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effects of strain fermentation in *H. sinensis* on islet pathological change and pancreas fibrillation in NOD mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	胰岛病变评分	胰腺纤维化评分
对照	—	0	0
模型	—	3.84 ± 1.23 ^{△△}	2.10 ± 0.74 ^{△△}
中国被毛孢	1 000	1.15 ± 0.58*	1.40 ± 0.66*
FTY720	1.0	1.02 ± 0.66*	1.20 ± 0.60*

与对照组比较: ^{△△} $P < 0.01$

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

^{△△} $P < 0.01$ vs control group

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

3.4 对 NOD 小鼠血清中 GAD 抗体的影响: 由表 4 结果可见,与对照组比较,模型组小鼠血清中 GAD 抗体水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,中国被毛孢组小鼠血清中 GAD 抗体水平明显降低 ($P < 0.01$),FTY720 组小鼠血清中 GAD 抗体水平明显降低 ($P < 0.01$),但中国被毛孢组小鼠 GAD 抗体水平略高于 FTY720 组。

3.5 对 NOD 小鼠胰岛病变和胰腺纤维化的影响: 由表 5 和图 1 结果可见,对照组小鼠胰腺结构清晰,胰岛未见炎症细胞浸润,胰岛 β 细胞未见异常。与对照组比较,模型组小鼠胰岛病变和胰腺纤维化评分值显著增加 ($P < 0.01$),胰岛内大量淋巴细胞浸

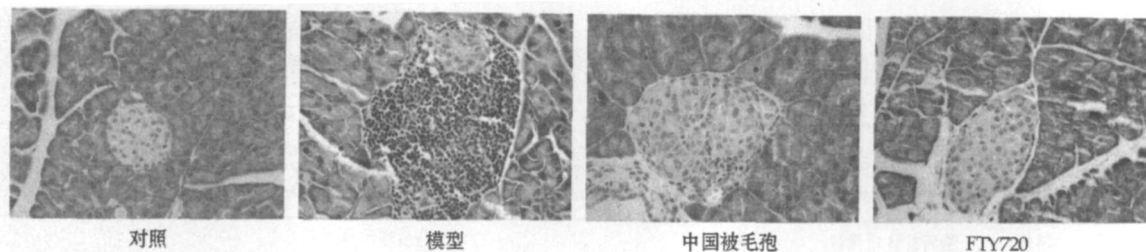


图1 中国被毛孢发酵物对 NOD 小鼠胰岛病理改变的影响

Fig.1 Effects of strain fermentation in *H. sinensis* on islet pathological change in NOD mice

润,胰岛受累面积超过 1/2,β 细胞显著减少,胰岛逐渐消失;与模型组比较,中国被毛孢和 FTY720 组小鼠胰岛病变和胰腺纤维化评分值显著降低 ($P < 0.05, 0.01$),胰腺结构较为清晰,胰岛有少量炎症细胞浸润,胰岛 β 细胞未见异常,但中国被毛孢组小鼠胰岛病变和胰腺纤维化程度略重于 FTY720 组。

4 讨论

1 型糖尿病是一种在遗传基础上由环境因素触发的慢性自身免疫性疾病,以特异性损伤胰岛 β 细胞为特征。其发病与免疫调节失衡密切相关。当机体对胰岛多种抗原成分失去耐受后,主要组织相容性复合物(MHC)-II 类分子与其处理的 B 细胞抗原共同激活辅助性 T 淋巴细胞中的 Th₁ 细胞,抑制 Th₂ 细胞,导致细胞因子不平衡;进而激活细胞毒性 T 细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞,从而产生氧自由基、一氧化氮和细胞因子等,对胰岛 β 细胞产生直接毒性^[9]。而临床上 1 型糖尿病的治疗手段主要为胰岛素注射,但不能恢复正常的血糖调控和经常导致各种严重并发症。如能在 1 型糖尿病发病前期应用免疫干预治疗,以阻止胰岛的自身免疫过程,就达到预防或减轻 1 型糖尿病发病的目的,本实验利用免疫调节剂中国被毛孢发酵物预防 NOD 小鼠 1 型糖尿病的发病。

FTY720 是从寄生蝉幼虫的子囊菌培养液中提取的抗生素成分 ISP-1 经化学修饰的合成药物^[10],是一种新型免疫抑制剂,具有较好的免疫抑制作用^[11-13],已有报道 FTY720 能预防啮齿类自体免疫性糖尿病的发生^[14-15]。本实验以 FTY720 作为阳性对照,观察中国被毛孢发酵物对 NOD 小鼠自发 1 型糖尿病的预防作用。结果表明,中国被毛孢发酵物和 FTY720 在给药第 6~10 周时小鼠血糖和糖尿病发生率明显降低,而且其胰岛病变和胰腺纤维化评分值显著降低,胰岛炎症细胞浸润减少,胰岛 β 细胞未见异常,胰腺结构较为清晰,说明中国被毛孢发酵物能抑制 NOD 小鼠的胰岛炎的发生。1 型糖

尿病患者的血清中可以检出多种针对胰岛 β 细胞及其成分的自身抗体,如胰岛 β 细胞抗体(ICA)、胰岛素抗体(IAA)和 GAD 抗体,多发性内分泌自身免疫性疾病的 GAD 抗体阳性率增加,1 型糖尿病中 GAD 抗体阳性率为 60.9%~78.8%,说明 GAD 抗体与自身免疫病的病理机制有关^[16]。NOD 小鼠给予中国被毛孢发酵物后,血清中 GAD 抗体明显降低,其作用可能与中国被毛孢发酵物具有免疫调节作用有关。

综上所述,中国被毛孢发酵物能有效预防自发性 1 型糖尿病 NOD 小鼠的发病,但其抑制 NOD 小鼠发病和免疫调节作用机制有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 余升红. 1 型糖尿病的预防和治疗 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16(2): 120
- [2] Makiuo S, Kusunoto K, Muraoka Y, et al. Breeding of non-obese, diabetic strain of mice [J]. *Jikken Dobutsu*, 1980, 29(1): 1-13
- [3] 沈南英, 曾璐, 张显耻, 等. 冬虫夏草真菌的分离 [J]. 食用菌, 1983 (5): 1
- [4] 刘锡璠, 郭英兰, 俞永信, 等. 冬虫夏草菌无性阶段的分离和鉴定 [J]. 真菌学报, 1989, 8: 35
- [5] 葛飞, 桂琳, 李婉珍, 等. 中国被毛孢菌丝体对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2008, 13(8): 852
- [6] 傅惠英, 寿旗扬, 李艳伟, 等. 中国被毛孢发酵物对睡眠剥夺亚健康大鼠的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(6): 59
- [7] 祝希媛, 史勇, 刘晓明, 等. 人工培养冬虫夏草菌粉对细胞免疫的抑制作用 [J]. 中西医结合杂志, 1990, 6(4): 43
- [8] 管德林, 于惠元, 贾保祥. 人工培养冬虫夏草 (Q80) 在鼠肾移植中的实验研究 [J]. 中华泌尿外科杂志, 1991, 12(5): 332
- [9] Rabinovitch A. Immunoregulatory and cytokine imbalance in the pathogenesis of IDDM [J]. *Diabetes*, 1994, 43: 613-618
- [10] Fujita T, Inoue K, Yarnamoto S, et al. Fungal metabolites. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolites [J]. *J Immunol*, 1994, 47: 208
- [11] 陈民利, 王德军, 潘水珍, 等. 盐酸奥芬米洛对肾移植犬酸碱代谢的影响 [J]. 浙江中医学院学报, 2005, 29(5): 55
- [12] 徐孝平, 王辉, 陈民利, 等. 盐酸奥芬米洛对二硝基氟苯

- 诱导小鼠迟发型变态反应的影响[J]. 浙江中医药大学学报, 2006, 30(6): 617.
- [13] 王 辉, 林 琳, 陈民利, 等. 盐酸奥芬米洛对小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(3): 177.
- [14] Fu F, Hu S, Li S, *et al.* FTY720, a novel immunosuppressive agent with insulinotropic activity, prolongs graft survival in a mouse islet transplantation mode [J]. *Transplan Proc.*, 2001, 33(1-2): 672.
- [15] Maki T, Gottschalk R, Monaco A P. Prevention of autoimmune diabetes by FTY720 in nonobese diabetic mice [J]. *Transplantation*, 2002, 74(12): 1684.
- [16] ElAmine M, Melo M, Kung Y H, *et al.* Mechanisms of tolerance induction by a gene transferred peptide IgG fusion protein expressed in B lineage cells [J]. *Immunology*, 2000, 165: 563-5636.

去甲斑蝥素干扰 HL-60 肿瘤细胞周期及其机制研究

李金龙^{1,3}, 蔡于琛^{1,2}, 胡志明³, 高基民³, 冼励坚^{1,2*}

(1 华南肿瘤学国家重点实验室, 广东 广州 510060; 2 中山大学肿瘤防治中心, 广东 广州 510060;

3 南方医科大学生物技术学院 生物治疗研究所, 广东 广州 510515)

摘要:目的 明确去甲斑蝥素 (norcantharidin, NCTD) 对肿瘤细胞周期的影响, 进一步阐明 NCTD 的抗肿瘤作用机制。方法 体外培养 HL-60 细胞, NCTD 作用后采用³H-TdR 掺入实验检测 DNA 复制; 流式细胞术检测细胞周期进程; Western blotting 检测细胞周期调控蛋白 Cdk1、Cyclin B1、Cdc 25c 表达变化。结果 不同浓度 (16~128 μmol/L) NCTD 作用于 HL-60 细胞 12 h 后, DNA 复制受到抑制, 细胞周期出现明显的 S 期累积, 并呈剂量依赖性趋势; 同时观察到 G₂/M 的阻滞, 且调控 G₂/M 周期进程的调节蛋白 Cdk1、Cyclin B1 及 Cdc 25C 蛋白表达下调。结论 NCTD 可抑制 HL-60 细胞 DNA 复制、下调周期调控蛋白从而干扰肿瘤细胞的周期进程。

关键词: 去甲斑蝥素; DNA 复制; HL-60; 细胞周期

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)08-1315-04

Norcantharidin disturbed cell cycle progress in cancer HL-60 cells and its mechanism

LI Jinlong^{1,3}, CAI Yuchen^{1,2}, HU Zhiming³, GAO Jimin³, XIAN Lirjian^{1,2}

(1 State Key Laboratory of Oncology in Southern China, Guangzhou 510060, China; 2. Cancer Center,

Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 3. Institute of Biotherapy, School

of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To confirm the influence of norcantharidin (NCTD) on cancer cell cycle, and to further explore the anti-cancer mechanism of NCTD. **Methods** HL-60 Cells were cultured and treated with NCTD, ³H-TdR incorporation assay was performed to reflect DNA replication, flow cytometry was used to detect cell cycle progress, and the cell cycle regulation proteins were detected by Western blotting. **Results** After treatment with NCTD for 12 h, DNA replication was significantly inhibited and the cell cycle was arrested mainly at S phase in a dose-dependent manner. G₂/M Phase accumulation was also observed and G₂/M regulation proteins Cdk1, Cyclin B1, and Cdc25c were downregulated. **Conclusion** NCTD could interfere with cancer cell cycle through inhibiting DNA replication and deregulating cell cycle regulation protein.

Key words: norcantharidin (NCTD); DNA replication; HL-60; cell cycle

去甲斑蝥素 (norcantharidin, NCTD) 是斑蝥素的衍生物, 与斑蝥素构型相似, 唯 1、2 位无甲基。去除两个甲基后, NCTD 的泌尿系刺激作用基本消失, 而且保留了抗癌活性^[1]。研究表明, NCTD 可

以有效抑制肿瘤细胞的增殖、诱导肿瘤细胞凋亡^[2-4]。NCTD 目前临床主要用于治疗原发性肝癌、食道癌和胃癌等, 但是 NCTD 的抗肿瘤作用机制尚不明确^[5]。

* 收稿日期: 2009-11-03

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (30901822)

作者简介: 李金龙 (1975—), 男, 山东人, 博士, 讲师, 研究方向为肿瘤药理。Tel: (020) 62789135 E-mail: lijnlong75@sina.com