

• 药理与临床 •

半边旗二萜类化合物 5F 对人高转移卵巢癌细胞系 HO-8910PM NF- κ B (P65)、Smad3 蛋白和 NF- κ B (P65)、ETS-1 mRNA 表达的影响

何太平¹, 陈杰¹, 莫丽儿², 梁念慈^{1*}

(1. 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 广东 湛江 524023;

2. 广东天然药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524023)

摘要:目的 研究半边旗二萜类化合物 5F (11 α -羟基-15-氧-16-烯-对映贝克杉烷-19 酸) 对人高转移卵巢癌细胞系 HO-8910PM 细胞内转录因子 κ BP65 亚基 [NF- κ B (P65)], Smad3 蛋白及 NF- κ B (P65)、ETS-1 mRNA 表达的影响, 探讨其抗肿瘤的作用机制。方法 MTT 法检测 5F 对 HO-8910PM 细胞增殖的影响; Western blot 分析 NF- κ B (P65) 及 Smad3 蛋白的表达; RT-PCR 分析 NF- κ B (P65) 及 ETS-1 mRNA 的表达。结果 5F 能抑制 HO-8910PM 细胞的增殖, 抑制率随剂量的增加而增加, 具有剂量依赖性; 25~100 μ mol/L 5F 作用 HO-8910PM 细胞 24 h 后, NF- κ B (P65)、Smad3 蛋白表达水平明显下降, 并呈剂量效应关系; 5F 明显下调 NF- κ B (P65) mRNA 的表达, 轻微下调 ETS-1 mRNA 的表达。结论 5F 抗肿瘤活性与 NF- κ B (P65)、Smad3 蛋白和 NF- κ B (P65)、ETS-1 mRNA 的表达有关。

关键词:半边旗; 二萜类化合物; 基因表达; 卵巢癌

中图分类号:R979.1; R286.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)04-0545-04

Effect of a diterpenoid 5F from *Pteris semipinnata* on expression of NF- κ B (P65), Smad3 protein and NF- κ B (P65), ETS-1 mRNA in highly metastatic ovarian carcinoma HO-8910PM cells

HE Tai-ping¹, CHEN Jie¹, MO Li-er², LIANG Nian-ci¹

(1. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China;

2. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Objective To study the effect of a diterpenoid 5F (*ent*-11 α -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid) isolated from *Pteris semipinnata* on the expressions of NF- κ B (P65), Smad3 protein and NF- κ B (P65), ETS-1 mRNA, and to investigate the antitumor mechanisms of 5F. **Methods** MTT assay was used to examine the effect of 5F on proliferation of HO-8910PM cells. The expressions levels of NF- κ B (P65) and Smad3 proteins were assessed by Western blot analysis. RT-PCR assay was used to assess the expression levels of NF- κ B (P65) and ETS-1 mRNA. **Results** The proliferation of HO-8910PM cells can be inhibited by 5F in a dose-dependent manner. The expression levels of NF- κ B (P65) and Smad3 proteins decreased obviously in HO-8910PM cells after treatment with 25—100 μ mol/L 5F for 24 h, and the effects appeared in a dose-dependent manner. 5F down-regulated significantly the expression of NF- κ B (P65) mRNA, down-regulated gently the expression of ETS-1 mRNA. **Conclusion** The antitumor activity of 5F is involved in the expression of NF- κ B (P65), Smad3 protein and NF- κ B (P65), ETS-1 mRNA.

Key words: *Pteris semipinnata* L.; diterpenoid; gene expression; ovarian carcinoma

半边旗 *Pteris semipinnata* L. 又名半边莲、半边菊, 属凤尾蕨科植物, 广泛分布于我国南方各省, 民间常用于清热解暑、利水消肿、治疗疝积、风湿痛等。半边旗有效成分 5F (11 α -羟基-15-氧-16-烯-对

映贝克杉烷-19 酸, 简称 5F) 是从半边旗中提取的一种二萜类化合物, 分子式为 C₂₀H₂₈O₄, 相对分子质量为 332.4。具有明显的抗肿瘤活性, 能抑制 RB 磷酸化, 增强 K562 细胞丝裂原活化蛋白激酶 (mito-

收稿日期: 2004-07-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870900); 湛江市 988 兴湛计划项目 (ZK0104)

作者简介: 何太平 (1970—), 男, 湖南省祁东县人, 主管检验技师, 硕士, 研究方向为生化药理学。

E-mail: taipinghe@fc18.com; taipinghe@163.com

* 通讯作者 Tel: (0759) 2388501 E-mail: ncliang@gdmc.edu.cn

gen activated protein kinase, MAPK) 的活性及表达^[1], 并影响 K562 细胞中 bcl-2、bax、c-jun、c-fos 癌基因的表达^[2]。本实验分别采用蛋白印迹、RT-PCR 方法研究 5F 对核转录因子- κ B P65 亚基 (nuclear factor-kappaB P65 subunit)、Smad3 蛋白表达以及 NF- κ B (P65)、ETS-1 mRNA 表达的影响, 探讨 5F 抗高转移卵巢癌细胞 HO-8910PM 侵袭转移的作用机制。

1 材料与与方法

1.1 细胞及其培养: 人高转移卵巢癌细胞系 HO-8910PM, 购自中国科学院上海细胞生物学研究所, 由浙江省肿瘤研究所许沈华等^[3]建立。细胞在含 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 完全培养基中, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 饱和湿度孵箱培养。细胞经过消化传代, 取对数生长期的细胞进行培养。

1.2 药品与试剂: 半边旗二萜类化合物 5F 由广东医学院天然药物开发中心提供, 纯度为 98%, 实验前 5F 用 DMSO 溶解, 培养液稀释, DMSO 终体积分数为 0.1% (实验证明该体积分数对细胞无影响)。超级小牛血清购自杭州四季青公司; RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司; 4 \times 上样缓冲液 (125 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 10% β -巯基乙醇, 20% 甘油, 0.04% 溴酚蓝); NF- κ B (P65) 小鼠 IgG 单抗、Smad3 小鼠 IgG 单抗、 β -Actin 山羊 IgG 多抗购自 Santa Cruz 公司, 使用时用 TBS (10 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.05% 聚山梨酯-20, pH 8.0) 按 1:200~1:2000 稀释; 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记马抗山羊 IgG 购自北京中山公司, 使用时用 TBS 按 1:4000~1:10000 稀释; RT-PCR 试剂盒购自 Qiagen 公司; 100 bp DNA Marker 购自华美生物工程公司。

1.3 方法

1.3.1 MTT 法测定 5F 作用 24 h 对 HO-8910PM 细胞增殖的影响: 选取对数生长期 HO-8910PM 细胞, 经胰酶消化、台盼蓝染色后在血球计数板上计数, 确保活细胞在 97% 以上。调整细胞为每孔 8000 个 (100 μ L/孔), 加到 96 孔培养板中。将培养板放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养。待细胞贴壁后取出培养板, 加入不同浓度 5F 1 μ L, 使其终浓度分别为 6.25、12.5、25、50、100、200 μ mol/L, 每个浓度设 3 个平行孔; 同时设置空白对照组、溶剂对照组和调零孔。培养板放回孵箱继续培养 24 h, 取出培

养板, 每孔加入 MTT 50 μ g (10 μ L), 孵育 4 h。吸出上清液, 加入 200 μ L DMSO。在平板摇床振摇 10 min 使甲臜完全溶解。用酶标仪测 570 nm 波长处每孔的吸光度 (A) 值。计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{空白}} - A_{\text{给药}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

1.3.2 Western blot 分析 NF- κ B (P65) 及 Smad3 蛋白表达: 取对数生长期 HO-8910PM 细胞, 稀释成 1×10^6 /mL, 接种于直径 50 mm 的培养皿中培养, 每皿 5 mL。待细胞贴壁后, 分别用 PBS、0.1% DM-SO 和 25、50、100 μ mol/L 5F 处理 HO-8910PM 细胞 24 h, 收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 加入预冷的细胞裂解液 100 μ L, 用细胞刮将细胞刮下, 并转移至预冷的 1.5 mL 离心管中, 置于碎冰上冰育 20 min 后, 于 4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times g$ 离心 15 min。上清液转移至另一 1.5 mL 离心管中, 参照考马斯亮蓝微盘比色法^[4]测定蛋白质。蛋白样品和 4 \times 上样缓冲液按 3:1 混合, 100 $^{\circ}$ C 水中煮沸 5 min 使蛋白质变性。SDS-PAGE 电泳后电转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭后加入第 1 抗体于室温孵育 12 h, 用 TBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入第 2 抗体于室温孵育 2 h, 再用 TBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入发光试剂 (ECL) 显色。实验中曝光 3 张 X 片, 以 β -Actin 作内参, 用图像分析软件 Scion Image 进行吸光度值分析。

1.3.3 半定量 RT-PCR 检测 NF- κ B (P65) 及 ETS-1 mRNA 的表达: 总 RNA 的提取: 分别收集以 PBS、0.1% DMSO 和 25、50、100 μ mol/L 5F 处理 24 h 的 HO-8910PM 细胞, 按 Trizol 试剂盒说明提取总 RNA。引物设计与合成: NF- κ B (P65) 引物设计参照文献^[5], 引物序列为: 同义引物 5'-TCAATGGCTACACAGGACCA-3', 反义引物: 5'-CACTGTACCTGGAAGCAGA-3', 扩增产物长度为 307 bp。ETS-1 引物设计参照文献^[6], 引物序列为: 同义引物: 5'-GTTAATGGAGTCAACCCAGC-3', 反义引物: 5'-GGGTAGCGACTTCTTGTGTTG-3', 扩增产物长度为 274 bp。以 GADPH 为内参照, 引物序列为: 同义引物: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', 反义引物: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3', 扩增产物长度为 452 bp。引物均委托上海生工生物工程公司合成。NF- κ B (P65) 扩增条件: 50 $^{\circ}$ C 逆转录 30 min, 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min, 循环 35 次 (94 $^{\circ}$ C、30 s, 53 $^{\circ}$ C、1 min, 72 $^{\circ}$ C、1 min), 再于 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min; ETS-1 扩增条件: 50 $^{\circ}$ C 逆转录 30 min, 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min, 循环

35次(94℃、30s,50℃、1min,72℃、1min),再于72℃充分延伸10min。取5μL PCR产物加1μL 6×上样缓冲液混匀,1.8%琼脂糖凝胶(含0.5μg/mL 溴化乙锭)在100V恒压电泳约40min,紫外透射仪观察结果并拍照。相片经扫描仪扫描后,用图像分析软件 Scion Image 进行吸光度值分析,算出 NF-κB (P65)、ETS-1 分别与内参照 GADPH 的吸光度值之比作为 NF-κB (P65)、ETS-1 的相对水平。

1.3.4 统计处理:采用 SPSS11.0 统计软件包 One-Way ANOVA 与 Bon-ferroni (方差齐)或 Tamhane's T2 (方差不齐)检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 5F 对 HO-8910PM 细胞增殖的影响:结果表明,5F 能抑制 HO-8910PM 细胞的增殖,抑制率随浓度的增加而增加,具有剂量效应关系,见表 1。

表 1 5F 对 HO-8910PM 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of 5F on proliferation of HO-8910PM cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	抑制率/%
空白对照	—	0.00±0.36
溶剂对照	—	-4.76±1.32
5F	6.25	21.03±1.78**
	12.5	26.40±0.64**
	25	29.94±0.81**
	50	36.82±5.44**
	100	43.84±3.07**
	200	52.05±5.14**

与溶剂对照组比较: ** $P<0.01$

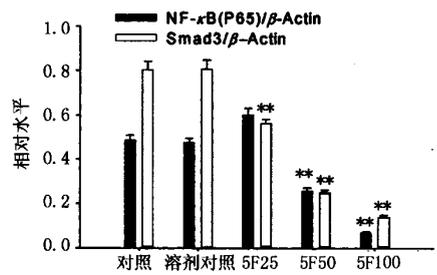
** $P<0.01$ vs solvent control group

2.2 5F 作用 HO-8910PM 细胞 24 h 后对 NF-κB (P65) 及 Smad3 蛋白表达的影响:结果发现,50、100 μmol/L 5F 能够抑制细胞 NF-κB (P65) 的表达,与溶剂对照组相比差异具有非常显著意义 ($P<0.01$);25、50、100 μmol/L 5F 也明显抑制 Smad3 蛋白的表达,与溶剂对照组相比差异也具有非常显著意义 ($P<0.01$),见图 1。

2.3 5F 作用 HO-8910PM 细胞 24 h 后对 NF-κB (P65) 及 ETS-1 mRNA 表达的影响:结果显示,5F 处理 HO-8910PM 细胞 24 h 后,与内参照 GADPH 比较,5F 使 NF-κB (P65) mRNA 表达明显减少,见表 2;5F 使 ETS-1 mRNA 的表达轻微减少,见表 3。

3 讨论

NF-κB 是一类几乎存在于所有细胞内,能与多种基因的启动子或增强子 NF-κB 结合位点发生特异性结合并启动基因转录的一组转录调节因子。NF-κB 是由亚单位 P50 和 P65 组成的异源二聚体,



与溶剂对照组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs solvent control group

图 1 5F 作用 24 h 后 HO-8910PM 细胞 NF-κB (P65) 和 Smad3 蛋白表达水平变化的图像分析 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Image analysis of NF-κB (P65) and Smad3 protein changes after expression of HO-8910PM cells in treatment with 5F for 24 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 2 NF-κB (P65) PCR 产物的吸光度分析 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Absorbance analysis of NF-κB (P65) PCR product ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NF-κB (P65)	GADPH	NF-κB (P65)/GADPH
对照	—	52 217±4 561	43 436±4 025	1.20±0.11
溶剂对照	—	44 430±4 032	43 152±3 967	1.03±0.09
5F	25	40 692±3 879	44 698±4 274	0.91±0.09
	50	34 789±2 896	45 211±3 850	0.77±0.06**
	100	14 407±1 268	39 608±3 898	0.36±0.03**

与溶剂对照组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs solvent control group

表 3 ETS-1 PCR 产物的吸光度分析 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Absorbance analysis of ETS-1 PCR product ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	ETS-1	GADPH	ETS-1/GADPH
对照	—	17 825±1 006	9 245±653	1.93±0.11
溶剂对照	—	19 192± 984	12 736±808	1.51±0.08
5F	25	13 954± 860	8 769±524	1.59±0.10
	50	14 031±1 123	9 018±636	1.56±0.12
	100	2 480± 219	8 863±749	0.28±0.02**

与溶剂对照组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs solvent control group

P50 与 DNA 直接结合,P65 具有转录活性。静息状态下,NF-κB 和抑制性蛋白 IκB-α 结合滞留于细胞浆中,在一定刺激作用下 IκB-α 解离,NF-κB 释放进入细胞核激活靶基因。近年研究发现多种致癌因素通过激活 NF-κB,促进细胞生长,使细胞发生恶性转化并促进肿瘤细胞的转移^[7-10]。NF-κB 还可以通过上调与细胞生存、增殖相关的基因表达或诱导凋亡抑制因子的过表达以及阻断凋亡途径中的某个信号分子的表达而发挥抗凋亡作用。因此抑制 NF-κB 的表达或活性,能促进肿瘤细胞的凋亡,抑制其生长和转移,干预了肿瘤演变的整个过程。研究发现,5F

作用 HO-8910PM 细胞 24 h 后,明显抑制 NF- κ B P65 亚基的表达,从而调控靶基因如 VEGF、尿激酶型纤溶酶原激活剂 (urokinase-type plasminogen activator, uPA) 和 FAK 的表达,降低 HO-8910PM 细胞的侵袭转移能力。Smad3 是转化生长因子- β (TGF- β) 信号转导通路中的一个关键的信号分子。研究表明,磷酸化激活 Smad 后,Smad3-Smad4 复合物与 Smad 结合元件 (Smad binding element, SBE) 结合,启动相关靶基因的表达,从而影响肿瘤的发生与发展。TGF- β 通常会抑制细胞生长,但是,有研究表明 TGF- β 在很多晚期实质性肿瘤会过度表达,有利于肿瘤细胞逃避免疫监控,并促进肿瘤新生血管生成。Lindemann^[11] 的研究表明,在侵袭性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中,两种 TGF- β 的抑制物 SB-202190 和 SB-203580 可明显延迟由 TGF- β 诱导的 Smad3 在核中的堆积,并下调纤维酶原激活物的抑制因子 (plasminogen activator inhibitor, PAI) 和 uPA 的表达,抑制 MDA-MB-231 的侵袭能力。研究中首次发现,5F 也能明显抑制 Smad3 蛋白的表达,推测 5F 能降低 TGF- β 蛋白表达水平,从而影响侵袭转移相关蛋白 VEGF、uPA 的表达,抑制 HO-8910PM 细胞的侵袭转移能力。癌基因 ETS 家族也在肿瘤发生发展中起着重要作用,特别是其作为转录因子在肿瘤转移中的调控作用。研究表明癌基因 ETS 影响蛋白水解酶的表达以及肿瘤的血管生成。ETS-1 是研究较多的 ETS 家族成员,作为转录因子在细胞侵袭运动、血管生成、细胞凋亡等中发挥重要作用^[12,13]。5F 作用 HO-8910PM 细胞使 ETS-1 mRNA 的表达下降,从而影响肿瘤细胞的侵袭转移能力。5F 抗高转移卵巢癌 HO-8910PM 细胞侵袭转移的作用机制与 NF- κ B、Smad3 和 ETS-1 这 3 个靶点密切相关。

References:

- [1] Wang J B, Liang N C, Mo L E. The effects of a diterpenoid compound 5F isolated from *Pteris semipinnata* L. on the activity and expression of mitogen activated protein kinase in k562 cells [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2002, 18(3): 294-297.
- [2] Wang J B, Liang N C, Mo L E. The effects of a diterpenoid compound 5F isolated from *Pteris semipinnata* L. on the expressions of several oncogenes of k562 cells [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2002, 18(4): 418-421.
- [3] Xu S H, Qian L J, Niu H Z, et al. Establishment of a highly metastatic human ovarian cancer cell line (HO-8910PM) and its characterization [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 1999, 18(2): 233-239.
- [4] Wang D N, Zhao Y W, Tian H R. Protein quantification with coomassie brilliant blue microplate-colorimetric [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2001, 22(6): 528-529.
- [5] Xie D H, Tang X D, Xia S J, et al. Expressions of NF- κ B in human bladder cancer and its clinical significance [J]. *Chin J Cancer* (癌症), 2002, 21(6): 663-667.
- [6] Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, et al. Involvement of the Ets-1 gene in overexpression of matrilysin in human hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(22): 6519-6525.
- [7] Perkins N D. Oncogenes, tumor suppressors and p52 NF- κ B [J]. *Oncogene*, 2003, 22(48): 7553-7556.
- [8] Sclabas G M, Fujioka S, Schmidt C, et al. NF- κ B in pancreatic cancer [J]. *Int J Gastrointest Cancer*, 2003, 33(1): 15-26.
- [9] Lin A, Karin M. NF- κ B in cancer: a marked target [J]. *Semin Cancer Biol*, 2003, 13(2): 107-114.
- [10] Orłowski R Z, Baldwin A S. NF- κ B as a therapeutic target in cancer [J]. *Trends Mol Med*, 2002, 8(8): 385-389.
- [11] Lindemann R K, Nordheim A, Dittmer J. Interfering with TGF β -induced Smad3 nuclear accumulation differentially affects TGF β -dependent gene expression [J]. *Mol Cancer*, 2003, 2(1): 20-22.
- [12] Rothhammer T, Hahne J C, Florin A, et al. The Est-1 transcription factor is involved in the development and invasion of malignant melanoma [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(1): 118-128.
- [13] Mukherjee T, Kumar A, Mathur M, et al. Ets-1 and VEGF expression correlates with tumor angiogenesis, lymph node metastasis, and patient survival in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003, 129(7): 430-436.

药根碱、小檗碱、黄连煎剂及模拟方对小鼠血糖的影响

付 燕^{1,2}, 胡本容¹, 汤 强¹, 付 琴¹, 张庆业¹, 向继洲¹

(1. 华中科技大学同济医学院药理学系, 湖北 武汉 430030; 2. 广州市脑科医院, 广东 广州 510000)

摘要:目的 研究药根碱 (Jat) 的降血糖作用, 并比较 Jat、小檗碱 (Ber)、黄连煎剂 (HLD) 及模拟方 (Ber+Jat) 对小鼠血糖水平的影响。方法 采用薄层扫描法测定 HLD 中 Ber 和 Jat 的质量分数, 并根据其比值配制模拟方。

收稿日期: 2004-07-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30171151)

作者简介: 付 燕 (1979—), 女, 湖北省黄石市人, 药理学专业硕士, 研究方向为心血管药理和神经药理学。

E-mail: Fuyan_1111@hotmail.com