

小白菊内酯对人肝癌 BEL-7402 细胞 p53 蛋白和增殖细胞核抗原表达的影响

张 雯, 宋晓凯*

(天津理工大学生物与化学工程学院, 天津 300191)

小白菊内酯 (parthenolide) 为一种西方传统药物, 是从艾叶菊属的短舌匹菊 (小白菊) *Pyrethrum Parthenium* (L.) Smith 中提取的化学成分 ($C_{15}H_{20}O_3$), 主要用于治疗皮肤感染、风湿病和偏头痛^[1]。小白菊内酯以时间依赖关系抑制 c-fos 和 c-myc 蛋白表达, 但不影响 p15、p16、p18、p19 蛋白表达, 以剂量依赖关系使血管平滑肌细胞 (VSMC) 周期中的 G₀/G₁ 期细胞比例明显增多, S 期细胞比例显著减少, 同时抑制 VSMC 的 [³H]TdR 掺入^[2]; 前期研究表明小白菊内酯抑制人肝癌细胞 BEL-7402 细胞增殖, 并诱导其凋亡^[3]。本研究以 BEL-7402 细胞为靶细胞, 研究小白菊内酯对其 p53 蛋白和增殖细胞核抗原 (PCNA) 表达的影响, 探讨其抑制细胞增殖的机制。

1 材料与方法

1.1 药品与主要试剂: 小白菊内酯 (质量分数 > 99%), 购自上海康成生物工程有限公司, 用三蒸水配制成 10.0 μg/μL 储存液; 环磷酸腺苷购自江苏恒瑞医药股份有限公司。MTT, 250 mg, Sigma 分装; RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自中国科学院血液病研究所; DAB 显色试剂盒、Sp 试剂盒、小鼠 p53 单抗、PCNA 单抗购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 主要设备: 倒置式生物显微镜 (Nikon ECLIPSE TE 300); 5% 二氧化碳培养箱 (Thermo Forma MODEL 3111); 自动酶标读数仪 (TACAN SPECTRA I)。

1.3 细胞株及细胞培养: 人肝癌细胞株 BEL-7402 由北京医科大学实验中心细胞库提供。用 RPMI-1640 培养液 (含 15% 胎牛血清), 在 37 ℃、5% CO₂ 孵箱中常规培养。取对数生长期的细胞用于实验。

1.4 MTT 比色法^[4]测定细胞增殖抑制率: 将对数生长期的肝癌细胞制成 1×10^5 /mL 的细胞悬液, 接

种于 96 孔培养板内, 每孔 200.0 μL, 于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养, 待细胞生长至一定浓度后换上含有不同质量浓度药物的培养液, 各设 6 个复孔, 对照组不加药, 继续培养 48 h, 加入 0.5% MTT (5.0 mg/mL), 每孔 20.0 μL, 孵育 4 h, 再加入 DMSO 100.0 μL, 轻微振荡使紫蓝色沉淀溶解, 用酶标仪测定 492 nm 波长吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖抑制率。

$$\text{抑制率} = (1 - A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}) \times 100\%$$

1.5 免疫组织化学法^[4]检测 p53 表达: 细胞接种于 12 孔板, 加药 (小白菊内酯 7.5、15 μg/mL) 培养 48 h, 无水乙醇固定 10 min; PBS 缓冲液洗涤 5 min, 共 3 次; 3% H₂O₂ 内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育 30 min; PBS 洗涤 5 min, 共 3 次; 正常羊血清室温孵育 30 min; 一抗 4 ℃ 孵育过夜; PBS 洗涤 5 min, 共 3 次; 生物素标记的二抗 37 ℃ 孵育 30 min; PBS 洗涤 5 min, 共 3 次; 链菌素亲生物蛋白-过氧化物酶 37 ℃ 孵育 30 min; DAB 显色 35 min, 苏木素复染核。高倍镜下每张选 4 个视野观察。

1.6 PCNA 表达检测: 细胞培养与免疫组化染色步骤同 1.5, 其中一抗为 PCNA 单抗, 其余操作相同。

1.7 免疫组化结果的观察方法: PCNA 或 p53 蛋白表达阳性, 均呈现为细胞核的棕黄染色 (可伴有或不伴有胞浆染色)。参照 Carcangiu 的方法^[5], 把细胞阳性染色的程度分为强 (+++)、中 (++)、弱 (+) 和阴性 (-) 4 级。其中还可根据阳性细胞的比例分为: “+++”级——阳性细胞占 60% 以上, 通常阳性细胞呈片块状分布, 为棕黄色染色; “++”级——阳性细胞在 60%~20%, 阳性细胞多呈局灶性或小巢状分布, 呈黄色染色; “+”级——阳性细胞在 20% 以下, 阳性细胞一般分散存在, 为淡黄色染色及“-”——阳性细胞在 5% 以下, 偶见单个阳性细胞, 呈浅黄色。

收稿日期: 2005-04-13

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (033607611); 天津市高校科技发展基金资助项目 (2001YY15)

作者简介: 张 雯 (—), 女, 天津理工大学 2003 级应用化学专业硕士研究生。E-mail: zhangwen_zhw_79@163.com

* 通讯作者 宋晓凯 Tel: (022) 23679245 E-mail: sxx581214@eyou.com Fax: (022) 23679249

1.8 统计学处理:计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验;阳性率的显著性检验采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 MTT 法检测小白菊内酯对人肝癌细胞增殖的抑制作用:不同质量浓度小白菊内酯作用细胞后,细胞生长受到不同程度的抑制,且抑制作用随小白菊内酯质量浓度的升高而增强,见表 1。

表 1 小白菊内酯对 BEL-7402 细胞增殖的作用 ($n=6$)

Table 1 Inhibition of parthenolide on BEL-7402 cell proliferation ($n=6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A 值($\bar{x} \pm s$)	抑制率/%
对照	—	0.160±0.390	—
小白菊内酯	5	0.140±0.021	12.50
	7.5	0.114±0.005	28.75
	15	0.106±0.007	33.75
	30	0.122±0.008	23.75
	40	0.121±0.006	24.38
	80	0.110±0.009	26.25

2.2 小白菊内酯对肝癌细胞 p53 蛋白表达的影响:见表 2。小白菊内酯 (7.5、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 可促进 p53 蛋白表达,与对照组比较差异非常显著 ($P<0.01$),且小白菊内酯两个剂量组间比较差异非常显著 ($P<0.01$)。环磷酰胺 (16.7 mg/mL) 组与对照组比较差异显著 ($P<0.05$)。

表 2 小白菊内酯对 BEL-7402 细胞 p53 蛋白表达的影响

Table 2 Effect of parthenolide on p53 protein expression of BEL-7402 cell

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	例数	p53 蛋白表达程度			
			+++	++	+	—
空白	—	8	0	1	4	3
环磷酰胺	16 700	8	4	3	1	0
小白菊内酯	7.5	8	2	4	1	1
	15	8	5	2	0	1

2.3 小白菊内酯对肝癌细胞 PCNA 蛋白表达的影响:小白菊内酯可抑制 PCNA 蛋白的表达,小白菊内酯 7.5 和 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组间差异显著 ($P<0.05$)。小白菊内酯 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组与空白组比较差异显著 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 小白菊内酯对 BEL-7402 细胞 PCNA 表达的影响

Table 3 Effect of parthenolide on PCNA expression of BEL-7402 cell

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	例数	PCNA 表达			
			+++	++	+	—
空白	—	8	4	3	1	0
环磷酰胺	16 700	8	0	4	1	3
小白菊内酯	7.5	8	1	2	5	0
	15	8	0	1	6	1

3 讨论

本实验中 MTT 检测可见小白菊内酯能明显抑制 BEL-7402 细胞增殖,并呈量效关系。

p53 基因是一种抑癌基因,定位在人第 17 号染色体短臂 (17q13) 上,编码为一个由 357 个氨基酸组成的、相对分子质量为 5.3×10^4 的核酸蛋白^[6]。p53 基因分野生型和突变型两种。正常细胞内的 p53 基因为野生型,具有抑癌功能,但其表达的蛋白在细胞内的量很小。当 p53 基因发生突变时,其产物 p53 蛋白构象发生改变后稳定性明显提高,能与一些癌蛋白形成稳定的复合物,其半衰期大大延长,免疫组织化学方法能够检测到^[7],因而用免疫组织化学方法检测到的是突变型的 p53 蛋白。突变型的 p53 蛋白不但丧失抑癌活性,而且具有恶性的转化功能^[8],所以越来越引起人们的重视。然而也有报道称某些突变型 p53 可抑制细胞生长,促进细胞凋亡^[9,10]。本实验发现经小白菊内酯处理后,BEL-7402 细胞 p53 表达不但没有减弱,反而显著增强。

PCNA 是一种相对分子质量为 3.6×10^4 的酸性核蛋白,是 DNA 多聚酶的辅助蛋白,起调节 DNA 多聚酶 δ 活性的作用,PCNA 随细胞增殖周期的不同而变化。它在 G_1 后期开始增加,S 期达高峰。PCNA 参与 DNA 合成,而 DNA 合成又是细胞分裂增殖的必要条件^[11]。

本实验结果表明小白菊内酯对人肝癌 BEL-7402 细胞的增殖具有抑制作用,其机制可能与促进 p53 蛋白表达和抑制 PCNA 蛋白表达有关。

致谢:本实验得到了天津中医学院中心实验室及范英昌等老师的大力协助。

References:

- [1] Heinrich M, Robles M, West J E, *et al.* Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae) [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1998, 38(6): 539-565.
- [2] Weng S X, Shan J, Lin X X, *et al.* Studies on the effect of parthenolide on the proliferation of rat vascular smooth muscle cells and the mechanism [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(7): 647-649.
- [3] Song X K, Zhang W. Experimental study on parthenolide inducing human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402 apoptosis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(11): 1691-1693.
- [4] Wang R Q, Zhou Z C, Yang J M, *et al.* Expression of c-myc, c-erbB-2 and p53 proteins in hepatocellular carcinoma tissues [J]. *Chin J Clin Exp Pathol* (临床与实验病理学杂志), 1997, 13(1): 4-6.
- [5] Carcangiu M L, Chambers J T, Voydeck I M, *et al.* Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptor content in 183 patients with endometrial carcinoma part 1. Clinical and histological correlations [J]. *Am J Pathol*, 1990, 94(3): 247.
- [6] Qu Y, Huang J M, Shan C G, *et al.* The significance of immunohistochemical testing p53 expression in nasopharyngeal lesions [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med* (现代中西医结合杂志), 2003, 11(5): 448-449.

- [7] Wang Y. Research and development of p53 gene [J]. *Foreign Med Sci; Cancer Sect* (国外医学:肿瘤学分册), 1993, 29(3): 129.
- [8] Xiao C J. Apoptosis and correlated genes and tumors [J]. *Jiangxi Med J* (江西医药), 1996, 31(5): 300.
- [9] Oh S J, Im M Y. The p53 mutation which abrogates transactivation while maintaining its growth suppression activity [J]. *Mol Cells*, 2000, 10(4): 386-391.
- [10] Kaneuchi M, Yamasita T, Shindoh M, et al. Induction of apoptosis by the p53-273L (Arg→Leu) mutant in HSC3 cells without transactivation of p21 Waf1/Cip1/Sdi1 and bax [J]. *Mol Carcinog*, 1999, 26(1): 44-52.
- [11] Yu C C, Filipe M I. Update on proliferation associated antibodies applicable to formalin-fixed paraffine embedded tissue and their clinical applications [J]. *Histochem J*, 1993, 25(12): 843-853.

苁蓉总苷对血管性痴呆大鼠学习记忆的影响及机制研究

皋 聪¹, 王传社^{2,3}, 巫冠中¹, 胡 梅¹, 屠鹏飞^{2,4*}

(1. 中国药科大学 药理教研室, 江苏 南京 210009; 2. 北京大学 中医药现代研究中心, 北京 100083;

3. 北京大学 基础医学院, 北京 100083; 4. 北京大学 药学院, 北京 100083)

人口的老龄化已使寻找安全有效的防治老年痴呆症药物成为药物研究的热点。近年来, 中医学使用以补肾益髓为主、兼补心脾的方法治疗老年痴呆症取得了较大的进展。肉苁蓉始载于《神农本草经》, 具有补肾阳、益精血、润肠通便之功效, 现广泛用于治疗老年性痴呆、阳痿、习惯性便秘等病症^[1,2]。研究表明其具有抗痴呆、抗氧化、抗缺氧、抗辐射、增强免疫功能等作用, 主要成分为苯乙醇苷类^[3~6]。苁蓉总苷是从管花肉苁蓉 *Cistanche tubulosa* (Schrenk) R. Wight 的干燥肉质茎中提取精制而成的, 含苯乙醇苷类 90.7%, 其中含主要成分松果菊苷 (echinacoside) 44.3%。本实验研究苁蓉总苷对血管性痴呆大鼠学习记忆障碍以及正常大鼠血栓形成和血小板聚集的影响, 为其开发成为促智和防治老年性痴呆症的新药提供依据。

1 材料

1.1 动物: SD 大鼠, 雄性, 体重 470~570 g, 由上海西普马-必凯实验动物有限公司提供, 合格证号: 沪动合格字第 152 号。

1.2 药物与试剂: 苁蓉总苷, 管花肉苁蓉的提取物, 含苯乙醇总苷 90.7%、松果菊苷 44.3%, 深褐色粉末, 由北京大学中医药现代研究中心化学室提供, 批号为 980601。吡拉西坦片, 宜兴制药厂生产, 批号为 980521。阿司匹林肠溶片, 南京第二制药厂生产, 批号为 000402。各药用前以蒸馏水配制。肝素钠, 中国医药(集团)上海化学试剂公司产品, 批号为 F000128。戊巴比妥钠, 中国医药(集团)上海化学试

剂公司进口分装, 批号为 971104。二磷酸腺苷二钠 (ADP), 中科院上海生化所东风生化技术公司产品, 批号为 9305122, 用前配成 1 mg/mL 储备液冰箱保存, 用时以磷酸缓冲液稀释 3 倍。

1.3 仪器: MG-3 型 Y 型电迷宫, 张家港教学实验器械厂生产。SPA-4 多功能血小板聚集仪, 上海科达测试仪器厂生产。

2 方法

2.1 大鼠局灶性脑缺血-再灌注致血管性痴呆模型制备及检测

2.1.1 分组与给药: 将大鼠按体重随机分为 6 组, 分别为假手术组、模型组、阳性对照组 (吡拉西坦 300 mg/kg) 及苁蓉总苷高、中、低剂量 (200、100、50 mg/kg) 组。各组 ig 给药, 0.5 mL/100 g, 每日 1 次, 假手术组和模型组给予等体积的蒸馏水, 连续给药 30 d。

2.1.2 模型的制备^[7]: 于给药的第 16 天, 大鼠以水合氯醛 360 mg/kg ip 麻醉。正中切开颈部皮肤, 分离右侧颈部肌肉, 游离颈总动脉和颈外动脉, 结扎并剪断颈外动脉分支。分离颈内动脉, 直至暴露翼腭突动脉。用动脉夹夹闭该侧颈总动脉, 颈外动脉切口, 将头端钝圆、直径 0.28 mm 的碳素渔线从大鼠颈外动脉插入颈内动脉并进入颅内, 直到有轻微阻力, 这时大脑中动脉的所有血供被阻断。缺血 40 min 后将渔线抽出, 结扎颈外动脉, 再通颈总动脉, 消毒、缝合, im 青霉素防止感染。假手术组只分离和结扎颈外动脉, 不插渔线、不夹闭颈总动脉。

收稿日期: 2005-01-20

基金项目: 科技部创新药物与中药现代化专项 (96-910-05-248)

作者简介: 皋 聪 (1967—), 男, 讲师, 主要从事神经药理学研究工作。E-mail: gaocongcpu@163.com

* 通讯作者 屠鹏飞 Tel/Fax: (010) 82802850 E-mail: pengfeitu@bjmu.edu.cn