

• 药理与临床 •

甘草次酸对 K562 细胞增殖抑制作用及其机制研究

柯文娟, 刘新月*, 陈燕, 舒文秀

(华中科技大学同济医学院协和医院血液病研究所, 湖北 武汉 430022)

摘要:目的 研究甘草次酸对髓系白血病细胞系 K562 体外增殖抑制作用, 分析其引起细胞周期的变化及探讨其可能的抗癌机制。方法 MTT 法检测甘草次酸对 K562 细胞增殖活性的影响; Hoechst 33258 染色法观察细胞凋亡形态学改变; 流式细胞术分析细胞周期的变化以及 cyclin D1 和 cyclin E 蛋白表达的变化; RT-PCR 测定细胞中 cyclin D1 和 cyclin E mRNA 表达的改变。结果 甘草次酸对 K562 有增殖抑制作用, 其抑制作用呈现为量效和时效依赖性, 作用 48 h 的 IC_{50} 值为 $(93.1 \pm 3.7) \mu\text{mol/L}$ 。甘草次酸可以诱导细胞发生凋亡, Hoechst 染色可见细胞核内凋亡小体。甘草次酸可以诱导 K562 细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期, 同时 G_2/M 期细胞比例减小, S 期变化不明显, 仅在最大浓度组稍有降低。甘草次酸可以同时下调 K562 细胞内 cyclin D1 和 cyclin E 蛋白和基因的表达, 下调作用与剂量呈正相关。结论 甘草次酸能明显抑制 K562 细胞增殖, 并诱导其周期阻滞于 G_0/G_1 期。该效应可能与其下调周期蛋白 cyclin D1 和 cyclin E 表达有关, 有望成为新型抗肿瘤中药。

关键词: 甘草次酸; 白血病; 细胞周期; cyclin D1; cyclin E

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)05-0714-05

Inhibition of glycyrrhetic acid on proliferation in K562 cells and its mechanism

KE Wen-juan, LIU Xin-yue, CHEN Yan, SHU Wen-xiu

(Institute of Hematology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of glycyrrhetic acid (GA) on the proliferation in K562 cells *in vitro* and explore the possible mechanisms. **Methods** Cell proliferation was detected by MTT assay. Hoechst 33258 staining was used to evaluate the morphological changes in K562 cells induced by GA. The influence on cell cycle was studied by a propidium iodide method. Both flow cytometry (FCM) and RT-PCR techniques were applied to assess the expression of cyclin D1 and cyclin E proteins. **Results** GA presented the striking proliferation inhibition, as well as apoptosis induction potency on K562 cells *in vitro* in a time- and dose-dependent manner, with IC_{50} value for 48 h being $(93.1 \pm 3.7) \mu\text{mol/L}$. Moreover, cells treated with GA showed the accumulation in G_0/G_1 phase, reduction in the percentage of cells in G_2/M phase and no significant change in S phase, except a little reducing in group with maximum concentration of GA. The contents of cyclin D1 and cyclin E were found to be downregulated at both protein and gene levels in K562 cells in a dose-dependent manner when treated with various concentrations of GA. **Conclusion** GA presents the potent inhibition on proliferation of K562, induction on apoptosis, and cell-cycle arrest in leukemia cells in G_0/G_1 phase, which might correspond to the down regulation of the expression of cyclin D1 and cyclin E. GA, as a Chinese materia medica, indicates a potential for acute leukemia.

Key words: glycyrrhetic acid (GA); leukemia; cell cycle; cyclin D1; cyclin E

甘草为我国自古以来广为药用的植物, 其主要活性成分为甘草酸 (glycyrrhizic acid) 和甘草次酸 (glycyrrhetic acid)。甘草酸在人体内经过肠道正常菌群水解作用分解为甘草次酸, 后者为一种五环三萜类化合物, 继而在人体内发挥强大的药理学功

效^[1]。近年来对甘草次酸的研究不断深入, 发现甘草次酸除了传统的止咳平喘、抗炎、抗溃疡、抗过敏、抗病毒等作用外, 对人体多种肿瘤如消化道肿瘤、妇科肿瘤、皮肤癌、黑色素瘤等有显著的抑制作用^[2], 有关甘草次酸对白血病细胞生长作用的报道较少, 对

收稿日期: 2007-08-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572440)

作者简介: 柯文娟 (1981—), 女, 湖北省鄂州市人, 华中科技大学协和医院血液科在读研究生。

Tel: (027) 62174781 E-mail: w. kewenjuan@163.com

* 通讯作者 刘新月 Tel: (027) 85726387 E-mail: liuxinyue87306548@sina.com

其抗肿瘤的确切机制亦不清楚。本研究观察甘草次酸对髓系白血病细胞系 K562 细胞生长的抑制作用,探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 细胞:K562 细胞系为华中科技大学协和医院血液病研究所保存的细胞株。细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养于 37 ℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中。细胞隔日换液传代 1 次,取处于对数生长期且台盼蓝拒染法测定活性在 95% 以上的细胞进行实验。

1.2 药物和试剂:甘草次酸 (C₃₀H₄₆O₆, 质量分数 99%),Sigma 公司,DMSO 溶解成 12 mmol/L 的母液后分装于 -20 ℃ 保存;小鼠抗人单克隆抗体 cyclin D1 (美国 BD 公司, Lot 55544) 和 cyclin E (美国 BD 公司, Lot 28046);FITC-羊抗小鼠 IgG、四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、碘化丙啶 (PI)、核糖核酸酶 A (RNase A)、Hoechst 33258 (武汉凌飞公司);RPMI-1640 培养基 (Gibco 公司);胎牛血清 (杭州四季青公司);trizol (Invitrogen);RT 试剂盒、PCR 试剂盒 (Toyobo);cyclin D1、cyclin E、GAPDH 和 β -actin 的上下游引物 (上海英骏公司设计合成,扩增片段长度分别为 348、260、452、218 bp);Marker (武汉天根公司)。

1.3 仪器和设备:细胞培养箱 (Forma 3111, Thermo Electron),倒置显微镜 (CKX41, Olympus),流式细胞仪 (FACScalibur, Becton Dickinson),酶标仪 (SunRise, Australia),激光共聚焦显微镜 (FV500, Olympus)。

2 方法

2.1 MTT 法测定药物对细胞增殖抑制作用:K562 细胞以每孔 1×10^5 个,体积 100 μ L 接种于 96 孔板,37 ℃、5% CO₂ 温箱内培养 1 d。各组分别加入 100 μ L 用 RPMI-1640 培养液稀释的 40、60、80、100、120、140 μ mol/L 甘草次酸工作液,空白孔用不含有细胞的培养液代替。分别培养 24、36、48、60、72 h 后向每孔加入 20 μ L MTT 溶液 (5 mg/mL),置于温箱中孵育 4 h 后离心,小心移除上层液体,再加入 150 μ L DMSO 充分溶解孔内紫色结晶。酶标仪上测量波长 570 nm,参比波长 620 nm 处测量各孔吸光度 (A) 值。计算细胞增殖抑制率^[1]。实验重复 5 次。

细胞增殖抑制率 = $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$

2.2 Hoechst 33258 染色法观察细胞凋亡的形态

学改变:将细胞分别用 80、100、120 μ mol/L 甘草次酸干预后置于培养箱中培育 48 h。同时设立阴性对照。获取细胞后离心,PBS 洗 1 次,用 -20 ℃ 预冷 70% 乙醇固定 4 ℃ 过夜。离心后 PBS 洗 1 次,100 μ L PBS 重悬。将细胞滴片置于经 10% 多聚赖氨酸预处理的玻片上。待细胞干燥后滴加 10 μ g/mL Hoechst 33258 染液 20 μ L,37 ℃ 避光孵育 30 min^[3]。在激光共聚焦显微镜下观察细胞核的形态学变化,并照相保存。实验重复 3 次。

2.3 DNA 倍体分析检测细胞周期:各组细胞用甘草次酸干预处理同 2.2 方法。收集细胞后 PBS 洗 1 次,用 70% 的 -20 ℃ 预冷的乙醇固定 4 h。离心去除固定液,PBS 洗 1 次。加入 30 μ L 50 μ g/mL 的 PI,30 μ L 10 mg/mL 的 RNase A 和 240 μ L 的 PBS,4 ℃ 避光孵育 30 min 后上流式细胞仪检测,流式细胞仪变异系数纠正于 3% 以下,用 Cell Modifit 软件分析细胞周期。实验重复 3 次。

2.4 流式细胞仪检测细胞 cyclin D1 和 cyclin E 蛋白的变化:获取各组药物干预的细胞同前,另设空白对照和阴性对照。4% 多聚甲醛固定 15 min,0.25% triton-X100 冰上破膜 10 min,3% BSA 孵育 0.5 h 阻断非特异性反应,按照 $1 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ 个细胞用量加入相应一抗,室温下避光孵育 1 h,加入 1:100 的 FITC-羊抗小鼠二抗 100 μ L,避光孵育 0.5 h。300 μ L PBS 重悬细胞,上流式细胞仪检测 486 nm 激发波长下的荧光表达量。实验重复 3 次。

2.5 RT-PCR 检测细胞 cyclin D1 和 cyclin E mRNA 水平:收集各组细胞 1×10^6 个,Trizol 1 mL 吹打混匀,经氯仿抽提,异丙醇沉淀,75% 乙醇溶解等步骤后获得细胞总 RNA^[3]。用紫外分光光度计测定 RNA 纯度 ($A_{260}/A_{280} > 1.8$) 同时进行 RNA 定量。逆转录反应体系为:总 RNA 模板 4~6 μ g,5 $\times$ RT 缓冲液 4 μ L,dNTP 2 μ L,RNasin 1 μ L,Oligo (dT) 1 μ L, M-MLV 酶 1 μ L,ddH₂O 补足至 20 μ L,冰上加样完成后短暂离心,RT 条件为 30 ℃、10 min,42 ℃、20 min,99 ℃、5 min,4 ℃、5 min。反应完成后将产物 cDNA 置于 -20 ℃ 保存。PCR 反应体系:H₂O 12 μ L,6 $\times$ 缓冲液 2 μ L,Mg²⁺ 1 μ L,dNTP 1 μ L,cyclin D1 和 β -actin 的上下游引物各 0.5 μ L 或者 cyclin E 和 GAPDH 的上下游序列各 0.5 μ L (各序列引物见表 1),cDNA 1 μ L,Taq 酶 1 μ L,冰上加样完成后短暂离心,PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃、30 s,60 ℃、1 min 10 个循环保温,94 ℃、30 s,53 ℃、30 s,72 ℃、30 s 25 个

表 1 cyclin D1 和 cyclin E 的引物序列

Table 1 Primer sequence of cyclin D1 and cyclin E

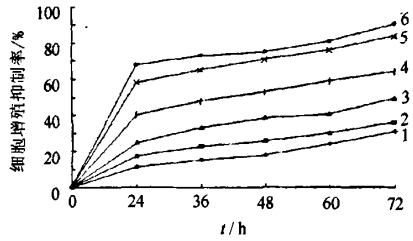
引物	序列	
	正向	反向
cyclin D1	5'-GATCAAGTGTGACCCGGACT-3'	5'-GAGATGGAAGGGGAAAGAG-3'
cyclin E	5'-CCATCCTTCTCCACCAAGA-3'	5'-AGCACCTTCCATAGCAGCAT-3'
β -actin	5'-CTGTCCCTGTATGCCTCTG-3'	5'-ATGTCACGCACGATTTC-3'
GAPDH	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3'

循环变性退火和延伸,72 ℃、7 min 维持延伸。反应完成后取 10 μ L 产物混入 2 μ L 6 $\times$ 负载缓冲液中在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳。紫外线凝胶成像系统上观察摄像,结果用 Leica Q Win 图像分析软件进行条带吸光度值分析,用 cyclin D1/ β -actin 和 cyclin E/GAPDH 值反映 cyclin D1、cyclin E 转录本的量。实验重复 3 次。

2.6 统计学方法:应用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 甘草次酸对 K562 细胞增殖的影响:甘草次酸对 K562 细胞有显著的生长抑制作用,且该作用呈量效和时效关系(图 1)。不同浓度甘草次酸处理组的 K562 细胞的增殖抑制率均明显高于对照组,差异均



1~6-40、60、80、100、120、140 μ mol $\cdot$ L⁻¹

图 1 不同浓度甘草次酸对 K562 细胞增殖作用的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 1 Effect of GA in various concentration on proliferation of K562 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

有统计学意义。甘草次酸作用于 K562 细胞 48 h 的半数抑制浓度 (IC₅₀值) 为 (93.1 $\pm$ 3.7) μ mol/L。

3.2 甘草次酸对 K562 细胞凋亡的影响:甘草次酸对 K562 细胞有促凋亡作用。80、100、120 μ mol/L 的甘草次酸处理 48 h 后的 K562 细胞经 Hoechst 染色后在激光共聚焦显微镜下显示,细胞核呈现不同程度的晚期凋亡特征,表现为染色质浓缩,体积变小,变形,细胞核裂解为碎块,产生凋亡小体。随着药物浓度的增加,凋亡特征表现越为显著(图 2)。

3.3 甘草次酸对 K562 细胞周期的影响:不同浓度

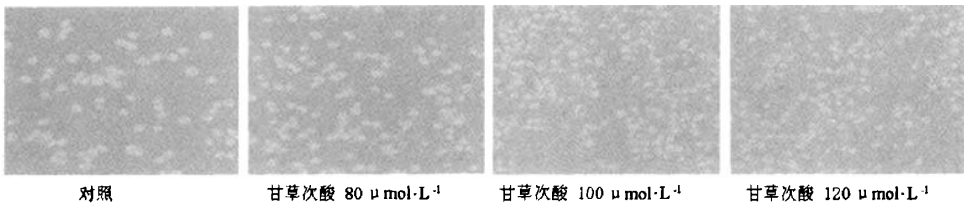


图 2 甘草次酸作用 K562 细胞 48 h 后激光共聚焦显微镜下细胞形态学变化

Fig. 2 Morphological changes of K562 cells treated by GA for 48 h under laser confocal microscope

甘草次酸作用 K562 细胞 48 h 后,细胞周期发生改变。随着药物浓度的增加,主要表现为 G₀/G₁ 期细胞发生阻滞,100、120 μ mol/L 甘草次酸作用显著 ($P < 0.05, 0.01$)。S 期和 G₂/M 期细胞比例在 80、100 μ mol/L 浓度组变化不明显,在 120 μ mol/L 干预组有明显变化 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

3.4 甘草次酸对 K562 细胞 cyclin D1 和 cyclin E 蛋白表达的影响:甘草次酸可使细胞中 cyclin D1 和 cyclin E 蛋白表达下降,与对照组相比,不同浓度药物处理组中的 cyclin D1 和 cyclin E 蛋白表达均为下降,且呈剂量依赖性,各组平均荧光强度与对照组之间差异均有统计学意义 ($P < 0.05, 0.01$),结果见表 3。

3.5 甘草次酸对 K562 细胞中 cyclin D1 和 cyclin

表 2 甘草次酸对 K562 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of GA on cell cycle of K562 cells

组别	C/ (μ mol $\cdot$ L ⁻¹)	细胞周期/%			凋亡率/%
		G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S	
对照	—	44.10 $\pm$ 1.63	13.07 $\pm$ 1.52	42.66 $\pm$ 1.58	0.30 $\pm$ 0.07
甘草次酸	80	43.87 $\pm$ 1.83	12.55 $\pm$ 1.14	43.94 $\pm$ 2.21	2.33 $\pm$ 0.19*
	100	52.34 $\pm$ 0.95*	11.31 $\pm$ 1.11	36.72 $\pm$ 1.90	3.34 $\pm$ 0.19*
	120	61.28 $\pm$ 1.22**	7.08 $\pm$ 0.68*	32.98 $\pm$ 0.98*	7.75 $\pm$ 0.21**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

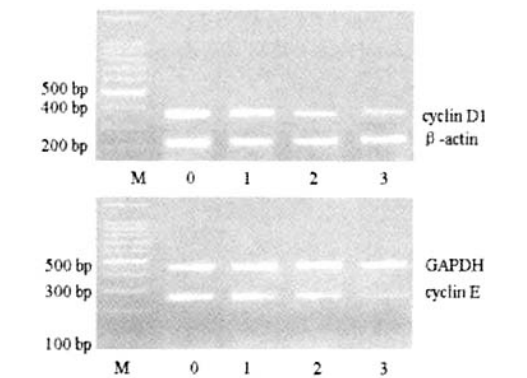
E mRNA 表达量的影响:甘草次酸作用细胞后可以使细胞中 cyclin D1 和 cyclin E mRNA 的表达降低。表现为随着药物浓度的增加,两种 mRNA 量呈现剂量依赖性降低。对各组 PCR 的产物进行电泳

分析可见,各浓度甘草次酸干预组的条带明显变暗变细(图3),3次实验的图像分析结果表明显著的变化趋势,差异具有统计学意义($P<0.05,0.01$),见表4。这一结果提示甘草次酸可以下调 cyclin D1 和 cyclin E 的基因表达。

表 3 甘草次酸对 K562 细胞 cyclin D1 和 cyclin E 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of GA in various concentrations on expression of cyclin D1 and cyclin E proteins in K562 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)			
组 别	C/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	cyclin D1	cyclin E
对照	0	2.40 $\pm$ 0.18	2.79 $\pm$ 0.22
甘草次酸	80	2.11 $\pm$ 0.10*	2.45 $\pm$ 0.17
	100	1.89 $\pm$ 0.23*	2.16 $\pm$ 0.11*
	120	1.33 $\pm$ 0.11**	1.92 $\pm$ 0.13**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group



0-对照组 1~3-80、100、120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘草次酸组
0-control group 1~3-80, 100, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA group

图 3 甘草次酸作用 K562 细胞 cyclin D1 和 cyclin E mRNA 的表达

Fig. 3 Effect of GA on expression of cyclin D1 and cyclin E mRNA in K562 cells

表 4 甘草次酸对 K562 细胞 cyclin D1 和 cyclin E mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of GA in various concentrations on expression of cyclin D1 and cyclin E in K562 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)			
组 别	C/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	cyclin D1/ β -actin	cyclin E/GAPDH
对照	0	1.13 $\pm$ 0.10	1.01 $\pm$ 0.08
甘草次酸	80	0.93 $\pm$ 0.12*	0.88 $\pm$ 0.13*
	100	0.63 $\pm$ 0.09**	0.56 $\pm$ 0.09**
	120	0.28 $\pm$ 0.03**	0.19 $\pm$ 0.02**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

4 讨论

近年来国内外文献均有报道甘草次酸对多种肿

瘤细胞有抗癌效应^[2],Malagol 等^[3]等亦报道甘草次酸能抑制人 HSB-2 淋巴细胞性白血病细胞的增殖。本实验研究甘草次酸对髓系白血病细胞系 K562 的作用,分析其对细胞凋亡和细胞周期的影响。实验显示,甘草次酸对 K562 细胞有明显的增殖抑制作用,且该效应呈现量效和时效关系。在激光共聚焦显微镜下可以观察到,不同浓度的甘草次酸能不同程度诱导细胞产生凋亡小体,说明细胞在甘草次酸诱导下发生凋亡是其增殖被抑制的主要途径。流式细胞仪进行细胞周期分析可以看到,K562 经甘草次酸处理 48 h 后, G_0/G_1 期细胞比例逐渐升高,S 期细胞在最高浓度组降为最低,表明甘草次酸具有调节细胞周期运行,阻滞细胞于 G_0/G_1 期的作用。流式细胞术检测 cyclin D1 和 cyclin E 蛋白可见,甘草次酸可以降低这两种蛋白在细胞当中的表达量。RT-PCR 检测相应的 mRNA,亦可见其表达量随着剂量增大而逐渐减小,与其对应的蛋白量变化趋势一致。

细胞的增殖和分化是通过细胞周期的运转来实现的,细胞周期调控机制紊乱是细胞增殖失控从而导致癌变的重要原因。细胞周期蛋白(cyclins)是细胞周期运行中一类重要的调节因子,cyclins 在功能上主要与特定的细胞周期素依赖激酶(CDKs)结合,形成 cyclins-CDKs 复合物,进而通过对特异底物的磷酸化以周期依赖的方式促进细胞增殖^[4,5]。cyclin D1 和 cyclin E 均在 G_1 期与相应的 CDKs 结合,促进细胞加速通过 G_1 期,因而又称为 G_1 期正性调控因子^[5]。Cyclin D1 和 cyclin E 的过量表达可缩短 G_1 期时间或加速 G_1 期进程,甚至可使细胞逃脱检测点的监控,直接进入 S 期,导致细胞失控生长^[6]。Cyclin D1 是 G_1 期周期蛋白,由定位于人染色体 11q13 的 cyclin D1 基因编码,含 295 个氨基酸,相对分子质量为 34 000^[7]。向正常的 G_1 期纤维母细胞内微注射抗 cyclin D1 抗体,能阻止细胞进入 S 期,表明 cyclin D1 在 G_1 期起着重要的作用^[7,8]。近几年的研究已经发现在乳腺癌、肝癌、肠癌、肺癌中 cyclin D1 基因扩增,cyclin D1 mRNA 转录及相关蛋白的过度表达^[6]。在急性白血病患者中也有 cyclin D1 mRNA 过度表达的情况,与临床复发关系较为密切^[7]。目前比较认同 cyclin D1 是一个原癌基因,也有学者认为 cyclin D1 就是癌基因,它的活化直接导致了肿瘤的发生发展^[6]。Cyclin E 由定位于 19q12-13 的 cyclin E 基因编码^[9],其表达升高始于 G_1 中期,至 G_1 晚期的 G_1 、S 交界处达高峰,后随

细胞进入S期开始下降,到G₂/M期降为零^[8]。Cyclin E/CDK2参与G₁/S期的pRb磷酸化作用,能加速S期,对DNA复制的启动十分重要。Ohtsubo等^[6]发现向G₁期正常的人成纤维细胞微注射抗cyclin E抗体可以抑制细胞进入S期。在乳腺癌、结肠癌、前列腺癌中,均有cyclin E的过度表达。研究报道^[7,8],cyclin E参与白血病的发生,在急性白血病中cyclin E表达增高,其表达水平与疾病恶性程度有关,高表达者预后差,生存期短。

在本实验中证实,对K562细胞进行甘草次酸干预后,细胞中的两种G₁期调控蛋白cyclin D1和cyclin E表达水平均被下调,细胞周期发生改变,这可能是甘草次酸抑制肿瘤细胞增殖的主要机制。然而此过程中甘草次酸除了下调cyclin D1和cyclin E的表达水平外,是否还牵涉到抑制CDKs的活性或者激活CDI活性^[6],还有待进一步研究。同时,甘草次酸在动物模型体内的作用研究尚在实验摸索中。

参考文献:

- [1] Kim D H, Lee S W, Han M J, *et al.* Biotransformation of glycyrrhizin to 18-beta-glycyrrhetic acid-3-O-beta-D-glucuronide by *Streptococcus* LJ-22, a human intestinal bacterium [J]. *Biol Pharm Bull*, 1999, 22(3): 320-322.
- [2] Rossi T, Castelli M, Zandomenighi G, *et al.* Selectivity of action of glycyrrhizin derivatives on the growth of MCF27 and HEP2 cells [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(5A): 3813.
- [3] Malagoli M, Castelli M, Baggio A, *et al.* Effect of glycyrrhizin and its diastereoisomers on the growth of human tumor cells: pre2 liminary finding [J]. *Phytother Res*, 1998, 12(2): 952-957.
- [4] Peter M, Herskowitz I. Joining the complex: cyclin 2 dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle [J]. *Cell*, 1994, 79(2): 181-184.
- [5] Hirama T, Koeffler H P. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer [J]. *Blood*, 1995, 86: 841-854.
- [6] Ohtsubo M, Theodoras A M, Schumacher J, *et al.* Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G₁ to S phase transition [J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(5): 2612-2624.
- [7] Scuderi R, Palucka K A, Pokrovskaja K, *et al.* Cyclin E over expression in relapsed adult acute lymphoblastic leukemias of B cell lineage [J]. *Blood*, 1996, 87(8): 3360-3367.
- [8] Ito M, Tsurusawa M, Zha Z, *et al.* Cell proliferation in childhood acute leukemia. Comparison of Ki267 and proliferating cell nuclear antigen immunocytochemical and DNA flow cytometric analysis [J]. *Cancer*, 1992, 69(8): 2176-2182.
- [9] Koff A, Cross F, Fisher A, *et al.* Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family [J]. *Cell*, 1991, 66(6): 1217-1228.

大黄素对 LoVo 细胞水通道蛋白2表达的调节效应

张文生¹, 李 锋^{1*}, 鲍军强¹, 王胜春², 尚刚伟³, 李军昌¹, 王长海¹

(1. 第四军医大学西京医院 中医科暨全军中医内科专科中心, 陕西 西安 710032; 2. 第四军医大学西京医院 药剂科, 陕西 西安 710032; 3. 第四军医大学唐都医院疼痛生物医学研究所, 陕西 西安 710038)

摘 要:目的 探讨大黄素对体外培养 LoVo 细胞水通道蛋白2(aquaporin 2, AQP2)表达的调节效应。方法 体外培养 LoVo 细胞并予不同质量浓度大黄素含药培养液 24 h 处理及大黄素含药培养液 (20 mg/L) 不同时间处理, 采用免疫细胞化学方法观察 LoVo 细胞 AQP2 蛋白表达位置并初步观察 AQP2 蛋白表达的变化趋势, 采用 Western blotting 及半定量 RT-PCR 检测 AQP2 蛋白及 mRNA 的表达。结果 AQP2 表达于 LoVo 细胞的细胞膜, 且与大黄素用药浓度及用药时间存在着相关性。进一步的 Western blotting 证实, 不同质量浓度大黄素含药培养液均可抑制 AQP2 蛋白的表达, 药物质量浓度愈大, AQP2 蛋白的表达愈低, 其中大黄素 20 mg/L 组及 40 mg/L 组 AQP2 蛋白表达显著性降低; 大黄素作用 3、6 h 组, AQP2 蛋白表达上升, 但与对照组比较, 无显著差异; 作用 12、24、48 h 组, AQP2 蛋白表达呈进行性下降趋势。半定量 RT-PCR 结果显示, 随着大黄素质量浓度的增加, AQP2 mRNA 表达呈进行性下降趋势; 在时间-效应方面, 随着用药时间的延长, AQP2 mRNA 表达呈进行性下降趋势。结论 大黄素可抑制 LoVo 细胞 AQP2 基因转录与翻译, 这提示大黄素对 AQP2 表达的调节效应可能与大黄的泻下作用有关。

关键词: 大黄素; LoVo 细胞系; 水通道蛋白2

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)05-0718-06

收稿日期: 2007-09-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572385)

作者简介: 张文生 (1976—), 男, 山西太原人, 主治医师, 硕士, 研究方向为中药防治肾病效应机制与临床评价。

Tel: (029) 82502068 E-mail: zwsqhdpy@fmmu.edu.cn

* 通讯作者 李 锋 Tel: (029) 84775351 E-mail: lifeng@fmmu.edu.cn

甘草次酸对K562细胞增殖抑制作用及其机制研究

作者：[柯文娟](#)，[刘新月](#)，[陈燕](#)，[舒文秀](#)，[KE Wen-juan](#)，[LIU Xin-yue](#)，[CHEN Yan](#)，[SHU Wen-xiu](#)

作者单位：[华中科技大学同济医学院协和医院血液病研究所, 湖北, 武汉430022](#)

刊名：[中草药](#) **ISTIC** **PKU**

英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)

年，卷(期)：2008, 39(5)

被引用次数：10次

参考文献(9条)

1. [Kim D H;Lee S W;Han M J](#) [Biotransformation of glycyrrhizin to 18-beta-glycyrrhetic acid-3-O-beta-Dglucuronide by Streptococcus\[J-22, a human intestinal bacterium](#) 1999(03)

2. [Rossi T;Castelli M;Zandomenighi G](#) [Selectivity of action of glycyrrhizin derivatives on the growth of MCF27 and HEP2 cells](#) 2003(5A)

3. [Malagoli M;Castelli M;Baggio A](#) [Effect of glycyrrhizin and its diastereoisomers on the growth of human tumor cells:pre2 liminary finding](#) 1998(02)

4. [Peter M;Herskowitz I](#) [Joining the complex:cyclin 2 dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle](#)[外文期刊] 1994(02)

5. [Hirarna T;Koeffler H P](#) [Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer](#) 1995

6. [Ohtsubo M;Theodoras A M;Schunutcher J](#) [Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1 to S phase transition](#) 1995(05)

7. [Scuderi R;Palucka K A;Pokrovskaja K](#) [Cyelin E over expression in relapsed adult acute lymphoblastic leukemias of B cell lineage](#) 1996(08)

8. [Ito M;Tsurusawa M;Zha Z](#) [Cell proliferation in childhood acute leukemia. Comparison of Ki267 and proliferating cell nuclear antigen immunocytochemical and DNA flow cytometric analysis](#)[外文期刊] 1992(08)

9. [Koff A;Cross F;Fisher A](#) [Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family](#)[外文期刊] 1991(06)

本文读者也读过(9条)

1. [王玥](#). [张金玲](#). [周飞红](#). [段逸群](#). [WANG Yue](#). [ZHANG Jin-ling](#). [ZHOU Fei-hong](#). [DUAN Yi-qun](#) [甘草次酸对黑素瘤细胞侵袭力及明胶酶表达的影响](#)[期刊论文]-[中国皮肤性病学杂志](#)2009, 23(4)

2. [张金玲](#). [刘新月](#). [邹萍](#). [ZHANG Jin-ling](#). [LIU Xin-yue](#). [ZOU Ping](#) [甘草次酸对白血细胞侵袭力及明胶酶活性的影响](#)[期刊论文]-[中国中西医结合杂志](#)2008, 28(10)

3. [刘新月](#). [杨海燕](#). [陈开澜](#). [孙春艳](#). [LIU Xin-yue](#). [YANG Hai-yan](#). [CHEN Kai-lan](#). [SUN Chun-yan](#) [甘草次酸抑制K562细胞增殖的机制的实验研究](#)[期刊论文]-[中国医院药学杂志](#)2005, 25(4)

4. [陆洋](#). [李娟](#). [杜守颖](#) [甘草次酸在大鼠体内药动学的RP-HPLC研究](#)[期刊论文]-[中国中药杂志](#)2008, 33(11)

5. [何子双](#). [胡元亮](#). [黄瑞林](#). [印遇龙](#). [HE Zi-shuang](#). [HU Yuan-liang](#). [HUANG Rui-lin](#). [YIN Yu-long](#) [甘草次酸对早期断奶仔猪血液挥发性脂肪酸和血液生化指标的影响](#)[期刊论文]-[广东农业科学](#)2008(2)

6. [刘彬](#). [齐云](#) [120甘草酸及甘草次酸的药理学研究进展](#)[期刊论文]-[国外医药（植物药分册）](#) 2006, 21(3)

7. [高焕](#). [杨淑娟](#). [郭利伟](#). [范云鹏](#). [王德云](#). [GAO Huan](#). [YANG Shu-juan](#). [GUO Li-wei](#). [FAN Yun-peng](#). [WANG De-yun](#) [甘草](#)

[多糖和甘草酸对NDV感染鸡胚成纤维细胞能力的影响](#)[期刊论文]-[畜牧与兽医](#)2010, 42(11)

8. [周能](#), [潘彤](#), [梁逸曾](#), [ZHOU Neng](#), [PAN Tong](#), [LIANG Yi-zeng](#) [甘草次酸对中药活性成分与血清蛋白结合的影响](#)[期刊论文]-[时珍国医国药](#)2009, 20(12)

9. [黄炜](#), [陈新美](#), [张志凌](#), [罗惠玲](#), [张东方](#), [HUANG Wei](#), [CHEN Xin-mei](#), [ZHANG Zhi-Ling](#), [LUO Hui-ling](#), [ZHANG Dong-fang](#) [18 \$\beta\$ -甘草次酸诱导人乳腺癌细胞凋亡及其细胞内Ca²⁺水平的变化](#)[期刊论文]-[中国癌症杂志](#)2006, 16(2)

引证文献(10条)

1. [靳如芳](#), [刘静](#), [张金晓](#), [田义红](#) [甘草次酸及其衍生物TY501对小鼠巨噬细胞RAW264. 7增殖的影响](#)[期刊论文]-[药物评价研究](#) 2011(4)

2. [张明发](#), [沈雅琴](#) [甘草酸及其苷元甘草次酸的糖皮质激素样作用](#)[期刊论文]-[现代药物与临床](#) 2011(1)

3. [杨洁红](#), [张宇燕](#), [万海同](#), [朱振洪](#), [李金辉](#) [附子生物碱与甘草活性物质组合抗大鼠佐剂性关节炎的实验研究](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2010(3)

4. [庄静](#), [刘丽娟](#), [王明霞](#), [韩娜娜](#), [卜美玲](#) [肺积1号方对Lewis肺癌小鼠移植瘤细胞周期及CyclinD1表达的影响](#)[期刊论文]-[齐鲁护理杂志](#) 2011(17)

5. [郑艳](#), [胡汉昆](#) [甘草次酸与甘草酸二铵抗炎护肝作用的实验研究](#)[期刊论文]-[中国药师](#) 2012(5)

6. [李钻芳](#), [陈文列](#), [陈荣](#) [激光共聚焦显微术在中药与天然药诱导肿瘤细胞凋亡研究中的应用](#)[期刊论文]-[环球中医药](#) 2011(1)

7. [崔李平](#), [王玉丽](#), [张士俊](#), [付海霞](#), [徐为人](#), [汤立达](#), [王建武](#) [甘草次酸衍生物对大鼠肾损伤的保护作用](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2011(6)

8. [冯磊](#), [花慧](#), [邱丽颖](#), [张莲芬](#), [金坚](#) [王不留行抑制血管形成作用的研究](#)[期刊论文]-[中药材](#) 2009(8)

9. [刘磊磊](#), [陈娟](#), [师彦平](#) [清热解毒中药抗肿瘤作用研究进展](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2012(6)

10. [康蕾](#), [李学强](#), [王凤荣](#) [18 \$\beta\$ -甘草次酸结构修饰及生物活性研究进展](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2012(7)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200805028.aspx