

参考文献:

- [1] 王峰, 毕培曦, 董辉, 等. 水杨梅属植物化学成分及其生物活性的研究进展 [J]. 药学学报, 2000, 35(7): 552-558.
- [2] 薛瑶一, 李药兰, 范兆水, 等. 水团花化学成分研究 [J]. 中药材, 2007, 30(9): 1084-1086.
- [3] 余林中, 伍杰勇, 罗桂波, 等. 葛根芩连汤拆方对肺炎链球菌抑菌作用比较研究 [J]. 中草药, 2003, 34(11): 1011-1013.
- [4] 林展, 沈伟哉, 李药兰, 等. 不同溶剂中金莲花提取物体外抑菌作用的比较 [J]. 暨南大学学报: 医学版, 2001, 22(6): 54-55.
- [5] 李春正, 苏艳芳, 靳先军. 牻牛儿苗植物化学成分及生物活性研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(6): 930-938.
- [6] 王明奎, 梁健, 彭树林, 等. 白叶莓根部化学成分的研究 [J]. 中草药, 2003, 34(4): 295-297.

葛根素对人小细胞肺癌 H446 细胞周期和相关周期蛋白表达的影响

李娟, 胡永华*

(北京大学医学部公共卫生学院, 北京 100083)

摘要:目的 观察葛根素诱导人小细胞肺癌 H446 细胞周期的阻滞作用, 进一步探讨其作用机制。方法 采用 MTT 法测定葛根素对 H446 细胞生长的影响, 采用流式细胞术检测处理后 H446 细胞周期分布和周期蛋白 cyclin D₁、CDK₄ 和 P27 表达水平。结果 MTT 法表明葛根素对 H446 细胞生长有较强的抑制作用; 流式细胞仪检测结果发现细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期, 量效关系良好, 并检测到细胞周期蛋白 cyclin D₁、CDK₄ 表达减弱, P27 表达增强。结论 葛根素可通过诱导细胞周期阻滞而发挥体外抗肿瘤作用, 其机制可能涉及细胞周期相关蛋白 cyclin D₁、CDK₄ 和 P27 表达的调控。

关键词: 葛根素; H446 细胞; cyclin D₁ 蛋白; CDK₄ 蛋白; P27 蛋白

中图分类号: R286.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2008)10-1535-03

肺癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 在我国许多城市已位居全部恶性肿瘤死因的首位^[1]。长期的临床证明, 化学治疗肿瘤副作用大, 植物来源抗癌药物越来越受到人们的青睐。葛根素是豆科多年生落叶藤本植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 或甘葛藤 *P. thomsonii* Benth. 的根中葛根异黄酮的主要有效成分之一^[2]。以往研究表明, 葛根总黄酮具有明显的抗肿瘤作用^[3], 但其主要成分葛根素对人小细胞肺癌 H446 细胞的影响还不清楚。本实验的目的在于研究葛根素对人小细胞肺癌 H446 细胞生长的抑制作用和对细胞周期的阻滞作用, 并初步探讨其作用机制。

1 材料

人小细胞肺癌 H446 细胞株由中国科学院上海生命科学院营养所提供; RPMI-1640 培养基和胎牛血清为 Gibco 公司产品; 胰蛋白酶和 MTT 为 Sigma 公司产品; 鼠抗人 cyclin D₁、CDK₄、P27 单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司; 96 孔细胞培养板为美国 Corning 公司产品; HERAcell 150 型 CO₂ 培养箱为德国

Heraeus 公司产品; LH50A 型倒置相差显微镜为日本 Olympus 产品; 流式细胞仪 FACS Calibur 为美国 BD 公司产品。葛根素, 棕黄色粉末 (质量分数 90%), 中国药品生物制品检定所产品, 批号 752-200511, 试验时, 用含 0.1% 二甲基亚砜 (DMSO) 的 RPMI-1640 培养基溶解, 一次性滤器滤过除菌。

2 方法

2.1 H446 细胞悬液制备: 将 H446 细胞培养于含 10% 灭活胎牛血清, 青霉素及链霉素各 100 U/mL 的 RPMI-1640 培养基中, 置于 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养, 隔日换液, 待细胞进入对数生长期后, 贴壁细胞弃去上清液, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 2 次, 0.25% 胰蛋白酶消化, 传化细胞。

2.2 MTT 法检测葛根素对 H446 细胞生长的抑制作用: 将 1×10⁴/mL H446 细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μL, 培养 24 h 后细胞贴壁, 弃去原培养液, 分别加入不同终质量浓度的葛根素 (40、80、160、320、640 μg/mL) 各 100 μL, 另设不加药物的对照组, 培养 72 h 后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液, 继续孵育 4 h 终止培养, 弃去 MTT, 每孔加

收稿日期: 2007-12-11

作者简介: 李娟 (1981-), 女, 河南安阳人, 北京大学医学部在读博士研究生, 主要研究方向为营养与疾病。

E-mail: taozilijuan@126.com

* 通讯作者 胡永华 Tel/Fax: (010) 82801189 E-mail: yihu@bjmu.edu.cn

入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 用酶联免疫检测仪于 490 nm 处检测各孔吸光值 (A) 值, 计算细胞生长抑制率。

细胞生长抑制率 = (1 - 实验组 A 值 / 对照组 A 值) × 100%

2.3 流式细胞仪检测细胞周期和细胞周期蛋白: 实验组 160、320、640 μg/mL 葛根素作用于 H446 细胞 72 h, 对照组只加等量含 0.1% DMSO 的 RPMI-1640 培养基, 分别收集各组细胞, 每组设 5 个复孔, PBS 洗 3 遍, 注入预冷的 70% 乙醇, 固定过夜, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃去乙醇, 以 PBS 洗 1 次, 重悬于 PBS 中, 加入 1 mL PI, 混匀, 4 ℃ 避光反应 30 min 后, 用流式细胞仪在 488 nm 波长处检测细胞周期分布, 计算细胞增殖指数 (proliferation index, PI)。

$$PI = (S + G_2/M) / (G_0/G_1 + S + G_2/M) \times 100\%$$

取冷乙醇固定的细胞, 分别加入鼠抗人 cyclinD₁、CDK₄、p27 单克隆抗体工作液 100 μL, 室温孵育 30 min, PBS 洗 1 遍, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入羊抗鼠 IgG 二抗工作液 100 μL, 避光室温孵育 30 min, PBS 洗 1 遍, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清以去除未结合的荧光二抗, 加入 0.1 mL PBS 后, 上机检测细胞周期蛋白表达情况。结果判定: 蛋白表达定量分析以荧光指数 (FI) 表示其相对量。FI > 1.0, 为阳性表达, FI < 1.0, 为阴性表达。

FI = 实验组蛋白表达的平均荧光强度 / 对照组蛋白表达的平均荧光强度

2.4 统计学处理: 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用 *t* 检验, 多组间比较用单因素方差分析, 应用 SPSS 13.0 统计软件计算, 所有实验结果均重复 3 次。

3 结果

3.1 葛根素对 H446 细胞生长的影响: 与对照组比较, 较高质量浓度的葛根素 (80~640 μg/mL) 对 H446 细胞的生长具有抑制作用, 并呈现良好的剂量依赖关系, 随着药物质量浓度的增加, 其抑制生长的作用逐渐增强, 结果见表 1。

3.2 葛根素对 H446 细胞周期和 PI 的影响: 葛根素可以改变 H446 细胞周期分布, H446 细胞 G₀/G₁ 期明显升高, S 期和 G₂/M 期均明显下降。细胞周期动力学显示, 与对照组相比, H446 细胞 PI 减小。且这种效应具有良好的剂量依赖关系, 结果见表 2。

3.3 葛根素对 H446 细胞周期蛋白 cyclin D₁、CDK₄ 和 P27 表达的影响: 以 FI 进行蛋白表达分析, 经 320 μg/mL 葛根素作用 72 h 后, H446 细胞

中 cyclin D₁、CDK₄ 蛋白阴性表达, P27 蛋白阳性表达, 结果见表 3。

表 1 葛根素对 H446 细胞生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, n=5)

Table 1 Inhibition of puerarin on H446 cell growth ($\bar{x} \pm s$, n=5)

组别	剂量/(μg · mL ⁻¹)	细胞生长抑制率/%
对照	—	—
葛根素	40	1.10 ± 0.11
	80	2.60 ± 0.82**
	160	7.50 ± 1.46**
	320	14.30 ± 1.41**
	640	21.70 ± 0.55**

与对照组比较: **P < 0.01

**P < 0.01 vs control group

表 2 葛根素对 H446 细胞周期和 PI 的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=5)

Table 2 Effect of puerarin on cell cycles and PI of H446 cells ($\bar{x} \pm s$, n=5)

组别	剂量/(μg · mL ⁻¹)	细胞周期分布/%			PI/%
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
对照	—	58.9 ± 1.48	16.8 ± 1.39	24.3 ± 1.47	41.1 ± 1.53
葛根素	160	71.5 ± 2.41**	13.2 ± 2.73*	15.3 ± 2.64**	28.5 ± 2.67**
	320	77.6 ± 2.89**	11.5 ± 1.58**	10.9 ± 1.79**	22.4 ± 1.59**
	640	83.6 ± 3.17**	9.7 ± 1.42**	6.7 ± 1.07**	17.4 ± 2.08**

与对照组比较: *P < 0.05 **P < 0.01

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

表 3 葛根素对 H446 细胞周期蛋白 cyclin D₁、CDK₄ 和 P27 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=5)

Table 3 Effect of puerarin on expression of cyclin D₁, CDK₄, and P27 protein in H446 cells ($\bar{x} \pm s$, n=5)

组别	剂量/(μg · mL ⁻¹)	FI		
		cyclin D ₁	CDK ₄	P27
对照	—	1.00	1.00	1.00
葛根素	320	0.8 ± 0.02**	0.9 ± 0.03**	1.3 ± 0.03**

与对照组比较: **P < 0.01

**P < 0.01 vs control group

4 讨论

癌症是全球范围内死亡率最高的疾病之一, 在寻找疗效好, 副作用少的理想抗癌药物过程中, 植物来源的抗肿瘤药越来越受到人们的重视^[4]。葛根是药食同源的山地植物, 在我国长期作为食用和药用植物。本研究采用人小细胞肺癌 H446 细胞株作为代表细胞株, 用葛根素进行体外抑瘤实验。结果表明, 葛根素对 H446 细胞具有增殖抑制作用, 且此作用呈现良好的剂量依赖关系。

肿瘤共有的生物学特性是失控性生长, 其主要分子机制是细胞周期紊乱导致细胞增殖过多和/或凋亡减少^[5]。本研究通过流式细胞仪检测药物作用

后 H446 细胞周期的改变,发现细胞周期的阻断时相发生变化,S 期与 G₂ 期比例下降,G₁ 期细胞不能通过细胞周期检测点进入 S 期而发生 G₀/G₁ 期阻滞,阻断 DNA 合成,干扰人小细胞肺癌 H446 细胞周期正常进行,细胞增殖活力下降,从而抑制 H446 细胞的分裂和增殖。

细胞周期主要由细胞周期蛋白 (cyclin)、细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 以及细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白 (cyclin-dependent kinase inhibitors, CKI) 所构成的网络系统调节。CDK₄ 与 cyclin D₁ 结合形成复合物通过磷酸化激活相应底物,推动细胞周期前进^[6]。p27 蛋白是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白 (CKI) 家族的一个重要成员^[7],其通过与 cyclin D₁ 竞争性结合 CDK₄ 以及抑制 cyclin D₁-CDK₄ 复合物的活性而发挥限制细胞周期进程的作用。cyclin D₁ 与 p27 分别是调节 G₁/S 期检查点重要的正性和负性调节因子。本研究中流式细胞仪测定结果显示,经葛根素作用后,H446 细胞中 cyclin D₁、CDK₄ 蛋白

表达下降,而 p27 蛋白表达升高。以上结果提示,葛根素抑制 H446 细胞生长是通过调节细胞周期蛋白 cyclin D₁、CDK₄ 和 p27 之间的表达比例,使 H446 细胞不能通过 G₁/S 期检查点,从而阻滞细胞周期进程来实现的。

参考文献:

- [1] Collins L G, Haines C, Perkel R, et al. Lung cancer: diagnosis and management [J]. *Am Fam Physician*, 2007, 75(1): 56-63.
- [2] 曹莉,顾振纶,茅彩萍. 葛根素对糖尿病小鼠胰岛素抵抗的影响 [J]. *中草药*, 2006, 37(6): 901-904.
- [3] 罗音久,杜德敏. 葛根提取物抗肿瘤作用的试验研究 [J]. *四川畜牧兽医医学院学报*, 2000, 14(4): 6-11.
- [4] 谢峻,谈锋. 植物来源抗肿瘤药物研究进展 [J]. *中草药*, 2007, 38(2): 285-289.
- [5] Karunakaran D, Joseph J, Kumar T R. Cell growth regulation [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 595: 245-268.
- [6] Liu Y, Xi L, Liao G, et al. Inhibition of PC cell-derived growth factor (PCDGF)/granulin-epithelin precursor (GEP) decreased cell proliferation and invasion through down-regulation of cyclin D and CDK₄ and inactivation of MMP-2 [J]. *BMC Cancer*, 2007, 29(7): 22-26.
- [7] le Saque C, Naqel R, Egan D A, et al. Regulation of the p27 (Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation [J]. *EMBO J*, 2007, 12: 1-5.

淫羊藿提取物对急性心肌缺血模型犬血气的影响

王景祥¹,于静¹,吕文伟²,祁功才³,陈震^{2*}

(1. 吉林省柳河医院,吉林 柳河 135300; 2. 吉林大学白求恩医学院 药理学教研室,吉林 长春 130021;

3. 吉林大学中日联谊医院 血管外科,吉林 长春 130031)

摘要:目的 观察淫羊藿提取物对急性心肌缺血模型犬血气的影响。方法 将实验犬 24 只,随机分为 4 组 (每组 6 只):模型组、阳性对照药地奥心血康胶囊组及淫羊藿提取物(生药 52.0、104.0 mg/kg)组。采用结扎麻醉开胸犬左冠状动脉前降支制备急性心肌缺血模型,经十二指肠 1 次性给药。观察 240 min 内对冠脉流量 (CBF) 动、静脉血氧饱和度,动、静脉氧分压,心肌耗氧量,心肌氧摄取率的影响。结果 淫羊藿提取物增加 CBF、静脉血氧饱和度、静脉氧分压,降低心肌氧摄取率。结论 淫羊藿提取物对实验性心肌缺血犬的心肌有保护作用。

关键词:淫羊藿提取物;心肌缺血;血氧饱和度;氧分压;心肌氧摄取率

中图分类号:R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2008)10-1537-04

淫羊藿 *Herba Epimedii* 为小檗科淫羊藿属植物,始载于《神农本草经》。本品辛、甘、温,归肝、肾经。具有补肾阳、强筋骨、祛风湿之功效。淫羊藿提取物中主要成分是淫羊藿苷。现代药理学研究表明,淫羊藿提取物减少急性心肌缺血犬心肌缺血程度和范围,缩小缺血心肌的梗死面积,降低血清中磷酸肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH) 的活性,降低血

清中游离脂肪酸、过氧化脂质的量,提高超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性^[1],对异丙肾上腺素所致的大鼠急性心肌缺血有保护作用^[2]。为全面研究淫羊藿提取物抗心肌缺血作用,本实验采用结扎犬左冠状动脉前降支造成的心肌缺血模型,从氧代谢方面来探讨淫羊藿提取物对犬急性心肌缺血的保护作用。

收稿日期:2008-01-18

作者简介:王景祥(1962—),男,吉林省九台市人,主治医师,主要从事心功能检测工作。

*通讯作者 陈震 Tel: (0431) 85619799

葛根素对人小细胞肺癌H446细胞周期和相关周期蛋白表达的影响

作者: [李娟](#), [胡永华](#)
作者单位: [北京大学医学部公共卫生学院, 北京, 100083](#)
刊名: [中草药](#) [ISTIC](#) [PKU](#)
英文刊名: [CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年, 卷(期): 2008, 39(10)
被引用次数: 6次

参考文献(7条)

1. [Collins L G;Haines C;Perkel R Lung cancer:diagnosis and management](#)[外文期刊] 2007(01)
2. [曹莉;顾振纶;茅彩萍 葛根素对糖尿病小鼠胰岛素抵抗的影响](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2006(06)
3. [罗音久;杜德极 葛根提取物抗肿瘤作用的试验研究](#) 2000(04)
4. [谢峻;谈锋 植物来源抗肿瘤药物研究进展](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2007(02)
5. [Karunakaran D;Joseph J;Kumar T R Cell growth regulation](#)[外文期刊] 2007(0)
6. [Liu Y;Xi L;Liao G Inhibition of PC cell-derived growth factor\(PCDGF\)/granulin-epithelin precursor\(GEP\) decreased cell proliferation and invasion through down-regulation of cyclin D and CDK4 and inactivation of MMP-2](#)[外文期刊] 2007(07)
7. [le Saqe C;Naqel R;Eqan D A Regulation of the p27 \(Kip1\) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation](#) 2007

本文读者也读过(6条)

1. [谢军. 何云. XIE Jun. HE Yun 非小细胞肺癌中Cyclin D1表达及其临床意义](#)[期刊论文]-[临床肺科杂志](#)2010, 15(4)
2. [p16、cyclin D1在原发性肺癌的表达及其临床意义](#)[期刊论文]-[中国医科大学学报](#)2005, 34(5)
3. [孙纪元. 朱妙章. 王四旺. 谢艳华. 缪珊. 朱肖星. 施新猷. SUN Ji-yuan. ZHU Miao-zhang. WANG Si-wang. XIE Yan-hua. MIAO Shan. ZHU Xiao-xing. SHI Xin-you 苦马豆素诱导人胃癌细胞SGC-7901凋亡作用机制的实验研究](#)[期刊论文]-[中国新药杂志](#)2006, 15(3)
4. [王明明. 司原. 陶新全. 张伍魁. 谢强. 谢吉奎. WANG Ming-ming. SI Yuan. TAO Xin-quan. ZHANG Wu-kui. XIE Qiang. Xie Ji-kui 18氟-氟代脱氧葡萄糖对Lewis肺癌细胞增殖的影响](#)[期刊论文]-[中华放射医学与防护杂志](#)2010, 30(5)
5. [韩敏敏. 陈宏勃. 张卓 雷公藤内酯醇对Tca 8113细胞增殖周期进程的影响](#)[期刊论文]-[中国老年学杂志](#) 2010, 30(10)
6. [陈晓莉. 王骊骊. 薛克昌 葛根提取物对肝癌细胞增殖及细胞周期的作用](#)[期刊论文]-[广东药学院学报](#)2001, 17(3)

引证文献(6条)

1. [李林. 张琼. 杨志建. 陆阳 改善葛根素肠道吸收的体外研究](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2011(11)
2. [廖正根. 赖珺. 梁新丽. 赵国巍. 张萍 复合吸收促进剂对葛根素肠吸收及毒性的影响](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2009(7)
3. [刘新义. 李建荣. 张陆勇. 杜丰. 王乃婕. 叶祖光 多指标正交试验优选葛根素聚乙二醇衍生化合成工艺](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2011(8)
4. [刘新义. 李健和. 向大雄. 易利丹. 胡雄彬. 叶祖光 聚乙二醇化葛根素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2013(3)
5. [刘晓霞. 刘红珍. 陈剑华. 陈育民. 单保恩 宝藜苷-I 对人食管癌细胞Eca-109增殖及细胞周期的影响](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2009(10)

6. 陈剑华, 刘晓霞, 姚艳冰, 王雪玲, 霍忠超 姜黄素对人食管癌细胞Eca-109增殖及细胞周期的影响 [期刊论文]-现代中西医结合杂志 2011(21)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200810029.aspx