参考文献：

[1] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications [J]. *Nature*, 2001, 414: 813-820.

[2] Fernandez A M, Kim J K, Yakar S, *et al*. Functional inactivation of the IGF-1 and insulin receptor in skeletal muscle causes type 2 diabetes [J]. *Genes Dev*, 2001, 15: 1926-1934.

[3] Kim J K, Zisman A, Fillmore J J, *et al*. Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of GLUT4 [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108: 153-160.

[4] LeRoith D L, Kim H, Fernandez A M, *et al*. Inactivation of muscle insulin and IGF-1 receptors and insulin responsiveness [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2002, 5: 371-375.

[5] 喻 嵘，成细华，胡 伟，等. 骨骼肌特异性胰岛素样生长因子 1 及胰岛素双受体功能缺失鼠糖尿病及其相关炎症因子的变化 [J]. 中国组织工程研究与临床康复，2007，11(45)：9075-9078.

[6] 喻 嵘，陈大舜，邓奕辉，等. 左归双降方对葡萄糖、胰岛素、低密度脂蛋白诱导人脐静脉内皮细胞损伤的干预作用 [J]. 中国中医药信息杂志，2005，12(1)：17-19.

[7] 吴勇军，喻 嵘，胡 伟，等. 滋阴益气活血解毒组方对 MKR 转基因 2 型糖尿病小鼠糖代谢的影响 [J]. 湖南中医药大学学报，2007，27(2)：20-23.

[8] Fernandez A M, Dupont J, Farrar R P, *et al*. Muscle-specific inactivation of the IGF-I receptor induces compensatory hyperplasia in skeletal muscle [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109: 347-355.

[9] Toyoshima Y, Gavrilova O, Yakar S, *et al*. Leptin improves insulin resistance and hyperglycemia in a mouse model of type 2 diabetes [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(9): 4024-4035.

[10] Kim H, Pennisi P, Zhao H, *et al*. MKR mice are resistant to the metabolic actions of both insulin and adiponectin: discordance between insulin resistance and adiponectin responsiveness [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 291(2): 298-305.

[11] Bhor V M, Raghuram N, Sivakamis S. Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J Biochem Cel Biol*, 2004, 36: 89-97.

[12] 喻 嵘，陈大舜. 左归丸加减方对实验性糖尿病大鼠降糖作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技，2000，7(3)：157-159.

[13] 喻 嵘，陈大舜，梅志刚，等. 左归双降方对葡萄糖、胰岛素、低密度脂蛋白诱导损伤的血管内皮细胞 ICAM-1、tPA、PAI 的影响 [J]. 中医药学刊，2005，23(1)：61-63.

大黄素对人高转移卵巢癌细胞中癌相关基因表达的影响

何太平[1,2]，莫丽儿[3]，CHEN George-gong[4]，梁念慈[1,3]*

(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. 广东医学院检验学院，广东 湛江 524023；3. 广东天然药物研究与开发重点实验室，广东 湛江 524023；4. 香港中文大学威尔斯亲王医院 外科学系，香港 中国)

摘 要：目的 探讨大黄素对人高转移卵巢癌抗肿瘤的可能作用机制。**方法** 应用肿瘤基因芯片检测大黄素（40 μmol/L）对人高转移卵巢癌 HO-8910PM 细胞中癌相关基因表达的影响，并且实时定量 PCR 和 Western blotting 进行验证。**结果** 共筛选出表达差异基因 69 个，其中 33 个基因表达水平上调，36 个基因表达水平下调，涉及细胞凋亡、细胞周期、细胞生长与分化、细胞运动、信号转导、基因转录和细胞代谢等 7 大类相关基因。**结论** 基因芯片结果提示大黄素抗肿瘤作用可能与转化生长因子-β(TGF-β)信号转导通路密切相关。

关键词：大黄素；卵巢癌；基因芯片

中图分类号：R282.71；R963 **文献标识码：**A **文章编号：**0253-2670(2008)11-1679-06

Effect of emodin on cancer-related gene expression in HO-8910PM cells

HE Tai-ping[1,2], MO Li-er[3], CHEN George-gong[4], LIANG Nian-ci[1,3]

(1. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; 2. College of Laboratory Medicine, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; 3. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Zhanjiang 524023, China; 4. Department of Surgery, Prince of Wales Hospital, The Chinese University of HongKong, HongKong China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of antitumor effect of emodin on highly metastatic ovarian carcinoma HO-8910PM cells. **Methods** The cancer-related gene expression profiles of HO-8910PM cells with and without emodin-treatment were analyzed using genechip technology. To validate the gene chip data, some differential expression genes, including BRCA1, GDF15, and NR1D1 were analyzed by fluorescent quantitative real-time PCR and Western blotting assay. **Results** Sixty-nine

收稿日期：2008-02-17

基金项目：粤港科技合作项目 (GHP/022/06)；广东省中医药局课题 (1050047)；广东省科技计划项目 (2007B030702003)

作者简介：何太平(1970—)，男，湖南祁东人，副研究员，硕士生导师，从事中草药活性成分的生化药理学教学及科研工作，发表论文 20 余篇，获省、市厅级科研课题共 5 项。Tel：(0759) 2388634-5 E-mial：taipinghe@163.com

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

differently expressed genes were screened out, of which up- and down-regulated genes were 33 and 36, respectively. These genes were related to apoptosis, cell cycle, cell growth and differentiation, cell motility, signal transduction, transcription, and metabolism. **Conclusion** The results indicats that the antitumor effect of emodin on HO-8910PM cells is involved in TGF-beta signaling pathway.

Key words: emodin; ovarian carcinoma; gene chip

大黄素（3-甲基-1,6,8-三羟蒽醌）是从大黄、虎杖和何首乌等中药中分离出的有效成分之一。研究表明大黄素在体外对多种肿瘤细胞如食道癌细胞[1]、肺腺癌细胞[2]和肝癌细胞[3]具有明显的抗肿瘤作用。本课题组前期研究结果表明大黄素还能抑制高转移卵巢癌细胞转移相关能力[4]，但大黄素抗肿瘤的作用机制还不完全清楚。因此本实验应用肿瘤基因芯片检测大黄素对人高转移卵巢癌细胞中癌相关基因表达的影响，探讨大黄素抗肿瘤的可能作用机制。

1 材料

人肿瘤基因芯片（OHS-802）购自 Super Array 公司，芯片上含有 440 个癌相关基因、3 个空白点和一系列看家基因的寡核苷酸探针。人高转移卵巢癌 HO-8910PM 细胞购自上海细胞生物所，由浙江省肿瘤研究所许沈华等[5]建立。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×上样缓冲液（125 mmol/L Tris-HCl，pH6.8，4% SDS，10% β-巯基乙醇，20% 甘油，0.04% 溴酚蓝）；GDF15 兔多克隆抗体购自 Abgent 公司；NR1D1 兔多克隆抗体购自 Cell Signaling 公司；BRCA1 兔多克隆抗体、β-actin 兔多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司；辣根过氧化物酶标记抗兔 IgG 购自北京中山公司。大黄素（质量分数 95%）购自 Sigma 公司，实验前用 DMSO 溶解，培养基稀释，DMSO 终体积分数为 0.1%（实验证明该体积分数 DMSO 对细胞无影响）。

2 方法

2.1 用肿瘤基因芯片检测大黄素对 HO-8910PM 细胞中基因表达的影响：按常规方法培养 HO-8910PM 细胞，用 0.1% DMSO 和 40 μmol/L 大黄素[4]分别处理 HO-8910PM 细胞 24 h，用 Trizol 试剂抽提总 RNA，变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 纯度及完整性。反转录酶合成 cDNA，线性 RNA 扩增试剂盒扩增，并用 Biotin-16-dUTP 标记，cRNA 纯化试剂盒纯化 cRNA。将芯片装于杂交管中预杂交 2 h，弃去预杂交液，加入含有标记的 cRNA 的样品杂交液杂交过夜。洗膜后，加入封闭液孵育 40 min，弃去封闭液，加入结合缓冲液孵育 10 min，再次洗膜后，用化学发光底物孵育 2 min，用 X 胶片曝光。运用 GEArray 表达分析配套软件分析芯片数据。每一个点的灰度值跟芯片所有看家基因的平均灰度值进行标准化处理，得出每一个点的标准值，再与对照组相应点的标准值进行比较，以差异为两倍（即比值≥2.0 或≤0.5）的标准来确定差异表达基因。

2.2 实时定量 RT-PCR 验证部分基因的表达：设计引物，β-actin：正向引物 5′-CCTGTACGCCAACACAGTGC-3′，反向引物 5′-ATACTCCTGCTTGCTGATCC-3′；BRCA1：正向引物 5′-AGGTCCAAAGCGAGCAAGAG-3′，反向引物 5′-TGCCAAGGGTGAATGATGAA-3′；FBN2：正向引物 5′-ATCCAGTAGTCGCAATCTCGT-3′；反向引物 5′-TTGGCATTACCTTACATTCATC-3′；FOSL1：正向引物 5′-CACCCTCCCTAACTCCTTTCA-3′，反向引物 5′-TGCTGCTACTCTTGCGATGA-3′；GDF15：正向引物 5′-TGACTTGTTAGCCAAAGACTGCC-3′，反向引物 5′-GAACCTTGAGCCCATTCCACA-3′；NR1D1：正向引物 5′-GGGCTTCTCCCAGTTTCCA-3′，反向引物 5′-AGACCATTTAGGGCCTCGTTAT-3′。取 2.5 μg 总 RNA 反转录形成 cDNA，使用 Rotor-Gene 3000 Real-time PCR 仪进行扩增。扩增条件为 β-actin：95 ℃、5 min；35 个循环（95 ℃、10 s；57 ℃、15 s；72 ℃、20 s；85.5 ℃、5 s）。BRCA1：95 ℃、5 min；35 个循环（95 ℃、10 s；59 ℃、15 s；72 ℃、20 s；82.7 ℃、5 s）。FBN2：95 ℃、5 min；35 个循环（95 ℃、10 s；60 ℃、15 s；72 ℃、20 s；84 ℃、5 s）。FOSL1：95 ℃、5 min；35 个循环（95 ℃、10 s；60 ℃、15 s；72 ℃、20 s；83 ℃、5 s）。GDF15：95 ℃、5 min；35 个循环（95 ℃、10 s；60 ℃、15 s；72 ℃、20 s；85 ℃、5 s）。NR1D1：95 ℃、5 min；35 个循环（95 ℃、10 s；60 ℃、15 s；72 ℃、20 s；85 ℃、5 s）。72～99 ℃ 绘制溶解曲线，然后采用比较阈值法进行定量分析。

2.3 Western blotting 分析：取对数生长期的 HO-8910PM 细胞，稀释成 1×10^6/mL，接种于 50 mm

的培养皿中培养，每皿 5 mL。细胞贴壁后，分别用 0.1% DMSO 和 40 μmol/L 的大黄素处理 HO-8910PM 细胞 24 h。收集并裂解细胞，冰浴 20 min 后，于 4 ℃，12 000×g 离心 15 min。BCA 法测定上清液蛋白质的量。蛋白样品和 4×上样缓冲液按 3∶1的比例混合，100 ℃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 2 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，以 β-actin 作内参，用图像分析软件 Scion Image 进行吸光度积分值分析。

2.4 统计方法：采用 t 检验，用软件 SPSS 11.0 处理。

3 结果

3.1 大黄素对 HO-8910PM 细胞基因表达的影响：40 μmol/L 的大黄素处理 HO-8910PM 细胞 24 h 后，芯片检测图片见图 1。芯片数据分析结果显示大黄素对 69 个基因的表达有差异，其中表达下调≥2 倍基因有 36 个（表 1），表达上调≥2 倍基因有 33 个（表 2），并将差异表达基因按照生物学功能进行分类（表 3）。

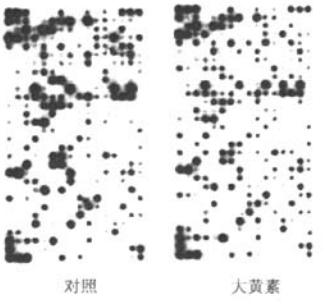


图 1 基因芯片检测结果

Fig. 1 Testing result of gene chip

表 1 大黄素处理组中下调基因（与对照组比较）

Table 1 Down-regulated genes in emodin-treated group (compared with control group)

基因序列	基因名称	信号比
NM_001354	Aldo-keto reductase family 1, member C2 (AKR1C2)	0.475
NM_000038	Adenomatosis polyposis coli (APC)	0.499
NM_000465	BRCA1 associated RING domain 1 (BARD1)	0.467
NM_000386	Bleomycin hydrolase (BLMH)	0.404
NM_004333	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF)	0.200
NM_007294	Breast cancer 1, early onset (BRCA1)	0.394
NM_001753	Caveolin 1 (CAV1)	0.495
NM_001238	Cyclin E1 (CCNE1)	0.340
NM_013230	CD24 antigen (CD24)	0.260
NM_000611	CD59 antigen p18-20 (CD59)	0.232
NM_004936	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (CDKN2B)	0.368
NM_004859	Clathrin, heavy polypeptide (CLTC)	0.311
NM_004374	Cytochrome coxidase subunit Vic (COX6C)	0.356
NM_001905	CTP synthase (CTPS)	0.200
NM_001814	Cathepsin C (CTSC)	0.219
NM_001920	Decorin (DCN)	0.155
NM_004398	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 10 (DDX10)	0.437
NM_001949	E2F transcription factor 3 (E2F3)	0.306
NM_006712	FAST kinase (FASTK)	0.348
NM_001999	Fibrillin 2 (FBN2)	0.315
NM_002005	Feline sarcoma oncogene (FES)	0.220
NM_005252	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS)	0.360
NM_003468	Frizzled homolog 5 (FZD5)	0.361
NM_003508	Frizzled homolog 9 (FZD9)	0.247
NM_000820	Growth arrest-specific 6 (GAS6)	0.339
NM_000182	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, alpha subunit (HADHA)	0.384
NM_012484	Hyaluronan-mediated motility receptor (HMMR)	0.338
NM_000599	Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5)	0.394
NM_048825	KIAA1026 protein (KIAA1026)	0.472
NM_002266	Karyopherin alpha 2 (KPNA2)	0.500
NM_033018	PCTAIRE protein kinase 1 (PCTK1)	0.280
NM_002649	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypetide (PIK3CG)	0.389
NM_002648	Pim-1 oncogene (PIM1)	0.372
NM_005611	Retinoblastoma-like 2 (RBL2)	0.488
NM_005066	Splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated) (SFPQ)	0.157
NM_003243	Transforming growth factor, beta receptor Ⅲ (TGFBR3)	0.377

表 2 大黄素处理组中上调基因(与对照组比较)

Table 2 Up-regulated genes in emodin-treated group (compared with control group)

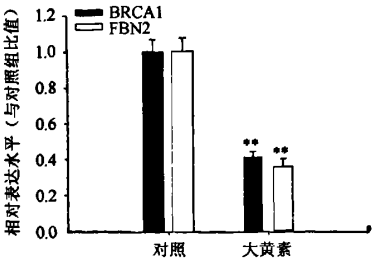
基因序列	基因名称	信号比
NM_000927	ATP-binding cassette, sub-family B, member 1 (ABCB1)	2.37
NM_001261	Cyclin-dependent kinase 9 (CDK9)	2.94
NM_001806	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma (CEBPG)	3.67
NM_001319	Casein kinase 1, gamma 2 (CSNK1G2)	2.10
NM_001554	Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61 (CYR61)	2.25
NM_182908	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2 (DHRS2)	18.97
NM_012181	FK506 binding protein 8 (FKBP8)	3.29
NM_005438	FOS-like antigen 1 (FOSL1)	3.52
NM_004864	Growth differentiation factor 15 (GDF15)	8.86
NM_006389	Hypoxia up-regulated 1 (HYOU1)	2.24
NM_003897	Immediate early response 3 (IER3)	2.86
NM_000598	Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	2.14
NM_001571	Interferon regulatory factor 3 (IRF3)	2.72
NM_002204	Integrin, alpha 3 (ITGA3)	2.04
NM_030662	Mitogen-activated protein kinase kinase 2 (MAP2K2)	5.90
NM_004990	Methionine-tRNA synthetase (MARS)	2.55
NM_004148	Ninjurin 1 (NINJ1)	3.47
NM_021724	Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1 (NR1D1)	22.70
NM_002607	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide (PDGFA)	3.84
NM_003768	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15 (PEA15)	2.90
NM_002734	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type Ⅰ, alpha (PRKAR1A)	2.20
NM_004162	RAB5A, member RAS oncogene family (RAB5A)	2.25
NM_006908	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1)	2.00
NM_006513	Seryl-tRNA synthetase (SARS)	3.67
NM_005067	Seven in absentia homolog 2 (SIAH2)	4.27
NM_004749	Transforming growth factor beta regulator 4 (TBRG4)	4.21
NM_003254	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1)	2.16
NM_003258	Thymidine kinase 1, soluble (TK1)	2.48
NM_000546	Tumor protein p53 (TP53)	2.44
NM_003496	Transformation/transcription domain-associated protein (TRRAP)	3.69
NM_004223	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6 (UBE2L6)	2.17
NM_003404	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide (YWHAB)	2.39
NM_001079	Zeta-chain (TCR) associated protein kinase (ZAP70)	4.40

表 3 差异表达基因的生物学功能分类

Table 3 Biological function classification of differential expression genes

功 能	上调基因	下调基因
细胞凋亡	IER3,PEA15,SIVA,TP53	BRAF,BRCA1,FASTK
细胞周期	CDK9,PDGFA,TBRG4,TP53	APC,BRCA1,CCNE1,CDKN2B,E2F3,FES,KPNA2,PCTK1,RBL2
细胞生长与分化	CDK9, CYR61, FOSL1, GDF15, IER3, IGFBP3, PDGFA, TBRG4,TIMP1,WNT1	BRAF,FOS,GAS6,IGFBP5,PIM1,FES,IGFBP5,PCTK1
细胞运动	CYR61,ITGA3,TIMP1	DCN,FBN2,GAS6,APC,HMMR
信号转导	CSNK1G2,FKBP8,PDGFA,PPKAR1A,RAB5A,RAC1,SIAH2,WNT1,ZAP70	APC,BRAF,CD59,FZD5,FZD9,PIK3CG
基因转录	CDK9,CEBPG,FOSL1,IRF3,NR1D1,PRKAR1A,SIAH2,TP53,TRRAP,DHRS2,TK1	BRCA1,E2F3,FOS,RBL2
细胞代谢	DHRS2,TK1	CTP3,HADHA,KPNA2,AKR1C2
其他	ABCB1,CEBPG,HYOU1,MAP2K2,MARS,NINJ1,SARS,UBE2L6,YWHAB,YWHAZ	BRAD1,BLMH,CAV1,CD24,CLTC,COX6C,CTSC,DDX10,KIAA1026,SFPQ,TGFBR3

3.2 实时定量 RT-PCR 验证分析:从表 1 和 2 中选出差异表达较明显 5 个基因 (BRCA1、FBN2、FOSL1、GDF15 和 NR1D1) 进行实时定量 RT-PCR 验证。大黄素处理中 BRCA1、FBN2、FOSL1、GDF15 和 NR1D1mRNA 表达水平分别是对照组的 (0.41±0.03)、(0.36±0.05)、(6.32±0.54)、(10.10±0.47)、(32.90±0.68) 倍 (图 2 和 3),与芯片分析数据 (0.394、0.315、3.52、8.86、22.70) 基本吻合。

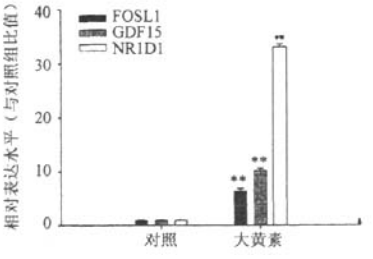


与对照组比较：**$P<0.01$

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

图 2 实时定量 PCR 验证大黄素对 BRCA1、FBNA mRNA 表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig. 2 Verification of emodin effect on expression of BRCA1 and FBN2 mRNA by Real-time PCR（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）



与对照组比较：**$P<0.01$

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

图 3 实时定量 PCR 验证大黄素对 FOSL1、GDF15 和 NR1D1 mRNA 表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig. 3 Verification of emodin effect on expression of FOSL1, GDF15, and NR1D1 mRNA by Real-time PCR（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

3.3 Western blotting 验证：选出 BRCA1、GDF15 和 NR1D1 3 个基因用 Western blotting 分析其蛋白表达变化，结果证实大黄素能升高 GDF15 和 NR1D1 蛋白表达，降低 BRCA1 蛋白表达（图 4 和表 4）。

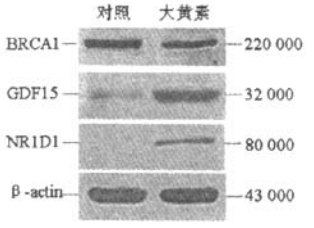


图 4 Western blotting 验证大黄素对 BRCA1、GDF15 和 NR1D1 蛋白表达的影响

Fig. 4 Verification of emodin effect on expression of BRCA1, GDF15, and NR1D1 proteins by Western blotting

4 讨论

基因芯片技术作为一种快速的基因分析平台，可同时对大量基因的表达水平进行量化检测。本实验用肿瘤相关基因芯片分析大黄素对人高转移卵巢癌细胞中癌相关基因表达的影响，探讨其抗肿瘤的作用机制，结果共筛选出表达差异基因 69 个，其中 36 个基因表达水平下调，33 个基因表达上调，并对部分差异表达较明显的基因（如 BRCA1、FBN2、FOSL1、GDF15 和 NR1D1）用实时定量 PCR 和 Western blotting 进行验证，发现其表达与芯片检测结果基本吻合，证明芯片结果可靠。

对表达差异基因按照生物学功能进行分类，大黄素抗高转移卵巢癌细胞作用涉及细胞凋亡、细胞周期、细胞生长与分化、细胞运动、信号转导、基因转录和细胞代谢等 7 大类相关基因的共同作用。研究发现大黄素主要影响转化生长因子-β(TGF-β)信号通路相关基因。早已公认 TGF-β 信号通路与肿瘤细胞的侵袭转移能力密切相关。大黄素明显刺激 TGF-β 家族的成员 GDF15（又称 NAG-1）的表达。大量文献研究表明 GDF15 高表达能在体内外抑制多种癌细胞的生长增殖、并促进肿瘤细胞凋亡[6,7]；在体外能减少肿瘤细胞-细胞外基质和肿瘤细胞-肿瘤细胞之间的黏附能力[8]。本研究还发现大黄素能明显上调 TGF-β 调节蛋白 4（TBRG4）的表达，下调 TGF-β 受体 3（TGFBR3）的表达，这两个基因也与抑癌作用密切相关[9,10]。另外，大黄素影响 TGF-β 信号通路相关基因与以往研究大黄素抑制肿瘤细胞侵袭转移能力的实验结果[4]相吻合，但其具体作用靶点有待更深入研究。

表 4 BRCA1、CDF15 和 NR1D1 蛋白表达半定量结果

Table 4 Semi-quantity analysis of expression of BRCA1, GDF15, and NR1D1 proteins

组别	吸光度积分值				BRCA1/	GDF15/	NR1D1/
	BRCA1	GDF15	NR1D1	β-actin	β-actin	β-actin	β-actin
对照	93 145	10 138	398	128 376	0.73	0.08	0.00
大黄素	58 711	84 259	22 633	131 160	0.44	0.64	0.17

参考文献：

[1] 陈玉英，杨 洁，胡庆沈，等. 大黄素增强砷剂对食道癌细胞的促凋亡作用 [J]. 上海交通大学学报：医学版，2006，26(11)：1227-1233.

[2] 李家宁，吕福祯，肖金玲. 大黄素对人肺腺癌细胞 Anip 973 增殖周期及凋亡基因的影响 [J]. 中国中西医结合杂志，2006，26(11)：1015-1017.

[3] 刘剑波，高学岗，连 涛，等. 大黄素在体外诱导人肝癌细胞 HepG2 发生凋亡的初步研究 [J]. 癌症，2003，22(12)：1280-1283.

[4] 朱 峰，刘新光，梁念慈. 大黄素、芹菜素抑制人卵巢癌细胞侵袭的体外实验研究 [J]. 癌症，2003，22(4)：358-362.

[5] Xu S H, Qian L J, Mou 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.

[6] Baek S J, Kim K S, Nixon J B, *et al*. Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities [J]. *Mol Pharmacol*, 2001, 59(4): 901-908.

[7] Lim J H, Park J W, Min D S, *et al*. NAG-1 up-regulation mediated by EGR-1 and p53 is critical for quercetin-induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells [J]. *Apoptosis*, 2007, 12(2): 411-421.

[8] Liu T, Bauskin A R, Zaunders J, *et al*. Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(16): 5034-5040.

[9] Turley R S, Finger E C, Hempel N, *et al*. The type Ⅲ transforming growth factor-beta receptor as a novel tumor suppressor gene in prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(3): 1090-1098.

[10] Dong M, How T, Kirkbride K C, *et al*. The type Ⅲ TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(1): 206-217.

当归多糖对脐血造血细胞冷冻损伤的可恢复性研究

杨 慧，吴 宏

（重庆医科大学干细胞与组织工程研究室，组织胚胎学教研室，重庆 400016）

摘 要：目的 探讨当归多糖（APS）是否具有恢复脐血造血细胞冷冻损伤的作用及与造血生长因子（HGFs）联合促进冷冻复苏后脐血单个核细胞（MNC）体外扩增的效应。**方法** 将冷冻 30 d 的脐血 MNC 复苏后，立即在常规培养体系中分别加入 APS 0、50、100、200、400 μg/mL，或同时加入 HGFs 组合，培养 24 h 或 14 d，采用 MNC 计数，台盼蓝拒染实验、MTT 法、CFU-Mix 集落形成实验以及流式细胞术计数 $CD34^+$ 细胞等方法分别观察 APS 促进冷冻损伤的脐血造血细胞恢复的能力以及 APS 联合 HGFs 对脐血造血细胞的扩增能力。**结果** 冷冻复苏后加入一定质量浓度的 APS 可使脐血 MNC 数量与台盼蓝拒染率明显增加，造血细胞的增殖能力显著提高，CFU-Mix 集落产率明显提高（$P<0.05$），且能明显提高冻存脐血 MNC 中 $CD34^+$ 细胞率（$P<0.05$）；一定质量浓度的 APS 联合 HGFs 可显著提高冷冻复苏后的脐血 MNC 扩增倍数及 CFU-Mix 集落产率（$P<0.05$），其作用无明显量效关系。**结论** APS 能提高冷冻复苏后脐血造血细胞的活力、增殖能力以及 $CD34^+$ 细胞率，可促进脐血造血细胞冷冻损伤的恢复；与 HGFs 联合可促进冷冻复苏后的脐血 MNC 体外扩增。

关键词：当归多糖（APS）；脐血；造血细胞；冷冻保存

中图分类号：R285.5 **文献标识码：**A **文章编号：**0253-2670(2008)11-1684-05

Effect of APS on recoverable ability from cryopreservation damage of UCB hematopoietic cells

YANG Hui, WU Hong

(Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Department of Histology and Embryology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the effect of angelica polysaccharides (APS) on recoverable ability from cryopreservation damage of umbilical cord blood (UCB) hematopoietic cells and APS with hematopoietic growth factors (HGFs) on *in vitro* expansion of UCB mononuclear cells (MNC) after thawing. **Methods** Thawed UCB MNC were cultured 24 h or 14 d with various concentration of APS (0, 50, 100, 200, and 400 μg/mL) or with APS and HGFs. The MNC counting assay, typan blue exclusion assay, colorimetric MTT assay for cell proliferation, CFU-Mix colong-forming assay, and flow cytometry for $CD34^+$ cell rate were detected. **Results** After adding certain concentration APS in thawed UCB cells,

收稿日期：2008-01-08

作者简介：吴 宏（1963—），女，浙江义乌人，硕士，教授，主要研究方向为干细胞生物学以及中药有效成分对血细胞发生及调控的影响，发表相关论文 20 余篇，研究成果获重庆市人民政府自然科学三等奖和中国中西医结合学会科学技术三等奖。
Tel：(023) 68485050 E-mail：wuhong6368@126.com