

· 药理与临床 ·

宝藜苣 对人食管癌细胞 Eca-109 增殖及细胞周期的影响

刘晓霞¹, 刘红珍¹, 陈剑华¹, 陈育民¹, 单保恩^{2*}

(1. 河北工程大学医学院, 河北 邯郸 056002; 2. 河北医科大学第四医院 科研中心, 河北 石家庄 050011)

摘要:目的 研究香加皮中宝藜苣 对人食管癌细胞 Eca-109 细胞周期的影响及其作用机制。方法 采用 MTT 法分析不同质量浓度宝藜苣 (12.5、25、50 μg/mL) 分别作用 24、48、72 h 后,对 Eca-109 细胞增殖的影响;流式细胞术分析宝藜苣 对 Eca-109 细胞周期的影响;RT-PCR 技术检测宝藜苣 对 Eca-109 细胞 Cyclin B1 mRNA 表达的影响;Western blotting 方法检测宝藜苣 对 Eca-109 细胞 Cyclin B1 蛋白表达的影响。结果 25、50 μg/mL 宝藜苣 均可明显抑制 Eca-109 细胞的增殖 (P<0.05),作用 48 h 的 IC₅₀为 24.8 μg/mL。25、50 μg/mL 宝藜苣 作用 48 h 后,随宝藜苣 质量浓度的增加,Eca-109 细胞的 G₀/G₁期细胞比例明显下降,G₂/M 期细胞比例明显提高,细胞的 Cyclin B1 蛋白及 mRNA 表达水平降低,与对照组相比均有显著性差异 (P<0.01)。结论 香加皮宝藜苣 可抑制 Eca-109 细胞增殖,使细胞周期阻滞,该作用可能与下调细胞 Cyclin B1 表达有关。

关键词:香加皮; 宝藜苣; 食管癌; 细胞周期; Cyclin B1

中图分类号:R286.91 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2009)10-1590-04

Effect of baohuoside on proliferation and cell cycle of human esophageal carcinoma cell Eca-109

LIU Xiao-xia¹, LIU Hong-zhen¹, CHEN Jian-hua¹, CHEN Yu-min¹, SHAN Bao-en²

(1. Medical College of Hebei University of Engineering, Handan 056002, China; 2. Research Center, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract : Objective Effect of baohuoside from *Cortex Periplocae* on cell cycle of human esophageal carcinoma cell Eca-109 and its mechanism were studied. **Methods** After treatment with baohuoside at different concentration (12.5, 25, and 50 μg/mL) for 24, 48, and 72 h, the inhibitory effect on proliferation of Eca-109 cells was analyzed by MTT method. After treatment with baohuoside under different concentration (12.5, 25, and 50 μg/mL) for 48 h, cell cycle of Eca-109 cells were measured with flow cytometry (FCM); The expression of Cyclin B1 mRNA was detected by RT-PCR technique. The expression of Cyclin B1 protein was detected by Western blotting. **Results** Baohuoside of 25 and 50 μg/mL inhibited the proliferation of Eca-109 cells significantly in an effect-concentration manner (P<0.05), the IC₅₀ was 24.8 μg/mL. After treatment with Baohuoside of 25 and 50 μg/mL for 48 h, with the concentration increased, the cell cycles of Eca-109 cells were changed that G₀/G₁ phase were reduced and G₂/M phase were increased, the expression level of Cyclin B1 protein and mRNA were decreased and both of them were significant (P<0.01), compared with the control group. **Conclusion** Baohuoside of *Cortex Periplocae* could inhibit the proliferation and arrest the cell cycles, which may associate with the down-regulation of Cyclin B1 mRNA expression.

Key words: baohuoside; human esophageal carcinoma; cell cycles; Cyclin B1

随着调控细胞周期分子机制的阐明,越来越多的研究表明,肿瘤是一类细胞周期疾病。细胞周期异常,最终导致细胞生长失控,表现出恶性生物学行为。而细胞周期蛋白 Cyclin B1 的异常表达对细胞周期产生重要影响。

中药香加皮 (*Cortex Periplocae*) 为萝藦科植物杠柳 *Periploca sepium* Bunge 的干燥根皮^[1],含有强心苷类、萜类等多种化学成分,具有抗炎、强心、促进神经生长、兴奋神经系统抗肿瘤等药理作用^[2-4]。本课题组前期研究结果显示,香加皮水提

* 收稿日期:2009-02-24

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30772752)

作者简介:刘晓霞(1976—),女,河北省永年县人,讲师,硕士,研究方向为肿瘤免疫学。

Tel: (0310) 3115952 E-mail: givesunny@163.com

*通讯作者 单保恩 E-mail: baoenshan@yahoo.com.cn

取物和杠柳苷等成分对多种肿瘤细胞都有较强的抑制作用^[5,6]。同时,研究也发现香加皮中也含有黄酮类成分,经鉴定为宝藜苷^[7],而茶多酚^[7]、槲皮素^[8]、葛根素^[9]、黄芩素^[10]等多种黄酮类化合物均已证实对肿瘤细胞有抑制作用。但是关于宝藜苷对肿瘤细胞的作用,还未见报道。因此,本实验研究香加皮宝藜苷对人食管癌细胞 Eca-109 的增殖、细胞周期及细胞周期蛋白 Cyclin B1 表达的影响,同时也为香加皮的进一步开发提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 受试物与试剂:香加皮购买于河北省中医院中药房,经河北医科大学药学院药理室聂凤禔教授鉴定。香加皮正丁醇相提取物宝藜苷由华北制药集团新药研究开发中心提取(黄色粉末,质量分数 > 96%),用 DMSO 溶解,RPMI 1640 培养基稀释(DMSO 终体积分数小于 0.1%)。RPMI 1640、Trizol 及 RT-PCR 酶混合物为美国 Gibco 公司产品。MTT、碘化丙啶(PI)、DMSO 及兔抗人 Cyclin B1 单克隆抗体、羊抗兔 IgG PE 二抗为美国 Sigma 公司产品,Cyclin B1 及 β -actin 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成,顺铂为山东齐鲁制药厂产品(批号 7120191DB)。

1.2 细胞株及其培养:人食管癌细胞 Eca-109 由河北医科大学第四医院科研中心提供。用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI 1640 完全培养基,置于 37℃、5% CO₂ 和饱和湿度条件下培养。

1.3 MTT 法检测宝藜苷对 Eca-109 细胞增殖的影响:取对数生长期 Eca-109 细胞,调整细胞浓度为 1 × 10⁵/mL,接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL (含细胞数为 1 × 10⁴)。实验组加入含不同质量浓度宝藜苷(12.5、25、50 μg/mL)的培养基 100 μL,阴性对照组加入 RPMI 1640 培养基 99.6 μL 和 DMSO 0.4 μL,阳性对照组加入含顺铂(30 μg/mL)的培养基 100 μL,每组均设 3 个复孔,置饱和湿度、37℃、5% CO₂ 培养箱中分别培养 24、48、72 h,每天用倒置显微镜观察细胞形态学变化,实验终止前每孔加入 MTT (5 mg/mL) 20 μL,继续培养 4 h,弃上清液,每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min,待结晶溶解后,用酶标仪于 570 nm 波长测定吸光度(A)值。并按下式计算细胞生长抑制率(inhibitory rate, IR),用 POMS 软件计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

$$IR = (1 - \text{实验组平均 } A \text{ 值} / \text{对照组平均 } A \text{ 值}) \times 100\%$$

1.4 流式细胞术测定细胞周期:收集经不同质量浓度宝藜苷(12.5、25、50 μg/mL)作用 48 h 后的 Eca-109 细胞,1 000 r/min,离心 5 min,PBS 洗涤 3 次,1 000 r/min,每次离心 5 min,然后将细胞于 70% 乙醇中,4℃ 固定 2 h,37℃ RNA 酶处理 1 h,与 PI 室温反应 10 min,行 PI 染色,流式细胞仪分析细胞周期,每个质量浓度样本均重复 3 次。

1.5 RT-PCR 检测 Cyclin B1 mRNA 表达:收集经不同质量浓度宝藜苷(12.5、25、50 μg/mL)作用 48 h 后的 Eca-109 细胞,按 Trizol 试剂说明常规提取各组细胞总 RNA,进行 RT-PCR 扩增,扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中,恒压 80 V 电泳 30 min 后,用凝胶成像系统观察电泳结果,扩增的 Cyclin B1 基因产物的量与内参照基因(β -actin)应用 gel-pro 凝胶分析软件对电泳谱带进行分析,用校正值(Cyclin B1/ β -actin)表示 mRNA 水平。重复 3 次。引物序列及扩增条件见表 1。

表 1 Cyclin B1 及 β -actin PCR 引物序列及扩增条件

Table 1 Primer sequences and amplification conditions of PCR for Cyclin B1 and β -actin

基因名称	引物序列	退火温 度/	产物长 度/bp
Cyclin B1	5'-AAGGCCGAAAGTCAACATGGC-3'	55	687
	5'-AGTCACCAATTTCTGGAGGG-3'		
β -actin	5'-ATCTGGCACCACCTTCTACAATGAGCTGCG-3'	55	838
	5'-CGTCATACTCTGCTGTGATCCACA TCTGC-3'		

1.6 Western blotting 方法检测 Cyclin B1 蛋白表达:收集经不同质量浓度宝藜苷(12.5、25、50 μg/mL)作用 48 h 后的 Eca-109 细胞,常规提取细胞蛋白,Lowry 法蛋白定量。取蛋白 50 μg 与 SDS-PAGE 凝胶电泳加样缓冲液均匀混合,100℃ 水浴 5 min,1 000 r/min 离心,取上清液进行 SDS-PAGE 电泳,电泳完毕后电转法印 PVDF 膜,丽春红染色 10 min,以确定目的蛋白转膜情况。加入 2 mL 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后,加兔抗人 Cyclin B1 和 β -actin 单克隆抗体,4℃ 静置过夜,加辣根过氧化物酶(HRP)-羊抗兔 IgG,37℃ 孵育 1 h,PBST 漂洗,DAB 显色,分析蛋白条带,结果以测定蛋白条带与 β -actin 的积分吸光度比值表示 Cyclin B1 蛋白的相对表达水平。每个质量浓度均重复 3 次。

1.7 统计学处理:应用 SPSS 11.5 软件对所有数据进行统计学处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较用 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 宝藜苷对 Eca-109 细胞增殖的抑制作用:

12.5、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的宝藜苣苔- 均可抑制 Eca-109 细胞增殖,且随宝藜苣苔- 质量浓度的增加和作用时间的延长抑制作用增强,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 宝藜苣苔- 作用 48 h 时抑制率最高达 96.86%,25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与阴性对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。宝藜苣苔- 作用 Eca-109 细胞 48 h 的 IC_{50} 为 24.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 1)。

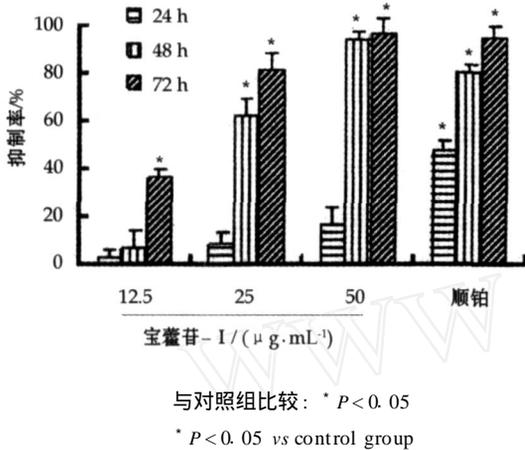


图 1 宝藜苣苔- 对 Eca-109 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of baohuoside- on proliferation of Eca-109 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.2 宝藜苣苔- 对 Eca-109 细胞周期的影响:经不同质量浓度 (12.5、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 宝藜苣苔- 处理 48 h 后, Eca-109 细胞的 G_0/G_1 期细胞分别为 56.51%、38.11%、29.33%, 对照组细胞为 57.62%。实验组 G_2/M 期的细胞分别为 16.63%、20.53%、27.55%, 对照组细胞为 12.87%。随宝藜苣苔- 质量浓度增加, G_0/G_1 期的细胞比例明显降低, G_2/M 期的比例明显增高, 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组细胞与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组与对照组相比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。实验组和对照组 S 期细胞的比例未见显著差异 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 宝藜苣苔- 对 Eca-109 细胞 Cyclin B1 mRNA

表 2 宝藜苣苔- 对 Eca-109 细胞细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of baohuoside- on cell cycle of Eca-109 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

宝藜苣苔- ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞周期/ %		
	G_0/G_1	S	G_2/M
0(对照)	57.60 \pm 5.41	35.93 \pm 0.94	12.87 \pm 1.51
12.5	56.50 \pm 3.99	29.53 \pm 4.67	16.63 \pm 1.81
25	38.10 \pm 1.46 **	25.60 \pm 5.20	20.53 \pm 1.66 **
50	29.33 \pm 0.75 **	23.83 \pm 0.95	27.55 \pm 3.24 **

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

表达的影响:经不同质量浓度宝藜苣苔- 处理 48 h 后, 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组 Eca-109 细胞 Cyclin B1 mRNA 表达水平[校正值 (Cyclin B1/ β -actin)]分别为 0.473 \pm 0.02、0.280 \pm 0.04]显著低于对照组[校正值 (0.508 \pm 0.03)] ($P < 0.01, n=3$), 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组[校正值 (0.175 \pm 0.03, $n=3$)]与对照组间差异无统计学意义 ($P > 0.05, n=3$), 见图 2。

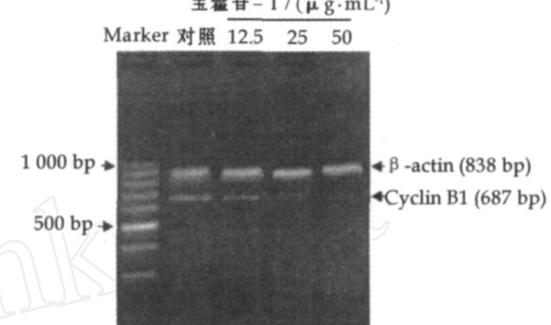


图 2 宝藜苣苔- 对 Eca-109 细胞 Cyclin B1 mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effect of baohuoside- on expression of Cyclin B1 mRNA in Eca-109 cells

2.4 宝藜苣苔- 对 Eca-109 细胞 Cyclin B1 蛋白表达的影响:经不同质量浓度的宝藜苣苔- 处理 48 h 后, 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组 Eca-109 细胞 Cyclin B1 蛋白表达水平分别为 0.163 \pm 0.021、0.042 \pm 0.005, 显著低于对照组 (0.362 \pm 0.014) ($P < 0.01, n=3$), 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组 (0.329 \pm 0.009) 与对照组间差异无统计学意义 ($P > 0.05, n=3$)。随着宝藜苣苔- 质量浓度的增加, Eca-109 细胞 Cyclin B1 蛋白表达逐渐降低 ($P < 0.01, n=3$), 见图 3。

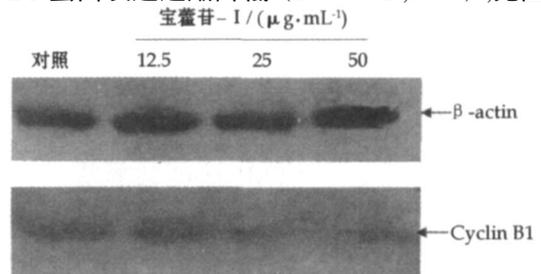


图 3 宝藜苣苔- 对 Eca-109 细胞 Cyclin B1 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of baohuoside- on expression of Cyclin B1 protein in Eca-109 cells

3 讨论

中药香加皮又名北五加皮、杠柳皮,主产于河北、河南、山东、山西等地^[1,2],性温,味辛、苦,本课题组对其水提取物及其杠柳成分的抗肿瘤活性已有报道^[4,5],但尚未见不同香加皮提取物对食管癌作

用及其机制的研究报道。本实验研究了香加皮正丁醇相提取物宝藜苷-成分对人食管癌细胞 Eca-109 细胞周期及周期蛋白 Cyclin B1 表达的影响。

实验结果显示,25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 宝藜苷-可明显抑制 Eca-109 细胞的增殖,作用 48 h 的 IC_{50} 为 24.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Eca-109 细胞经 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 宝藜苷-处理 48 h 后, G_0/G_1 期细胞比例明显减少, G_2/M 期细胞逐渐增多,S 期细胞减少(但变化不明显,可能与宝藜苷-抑制 Eca-109 细胞增殖无关),细胞周期被阻滞在 G_2/M 期。这可能是其抑制 Eca-109 细胞增殖的原因之一。另外,经 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 宝藜苷-处理 48 h 后,Eca-109 细胞中 Cyclin B1 mRNA 表达随宝藜苷-质量浓度的增加而降低,同样,Cyclin B1 蛋白表达水平也随宝藜苷-质量浓度的增加而降低。提示宝藜苷-可能是通过降低 Cyclin B1 表达,减少 Cyclin B1-CDK1 复合物的形成,阻止细胞从 G_0 期进入 M 期,同时也阻止 M 期过程,从而将细胞周期阻滞在 G_2/M 期。

以上实验结果表明,香加皮宝藜苷-可显著抑制 Eca-109 细胞增殖。该作用可能与下调细胞周期蛋白 Cyclin B1 的表达,从而引起细胞周期阻滞有

关。这些作用的进一步研究,可为香加皮抗肿瘤作用的开发和利用奠定基础。

参考文献:

- [1] 《中国药典》[S]. 一部. 2005.
- [2] 沈映君. 中药药理学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2000.
- [3] 张援虎,王锋鹏. 杠柳属植物化学成分研究进展 [J]. 天然产物研究与开发,2003,15(2):157-161.
- [4] 单保恩,赵连梅,艾军,等. 香加皮羽扇豆烷乙酸酯对外周血淋巴细胞免疫调节功能的影响 [J]. 中草药,2008,39(7):1035-1039.
- [5] 单保恩,李俊新,张静. 香加皮水提取物诱导人胃癌细胞 BGC-823 凋亡及其作用机制 [J]. 中草药,2005,36(8):1184-1188.
- [6] 张静,单保恩,刘刚. 香加皮乙酸乙酯提取物诱导人乳腺癌 MCF27 细胞凋亡的研究 [J]. 肿瘤,2006,26(5):418-421.
- [7] 朱月蓉,邱红,刘军权,等. 茶多酚对人 T 淋巴细胞和结肠癌细胞株 SW-480 的影响 [J]. 江苏大学学报(医学版),2008,18(4):351-355.
- [8] 李润青,单保恩. 槲皮素对结肠癌细胞 SW480 增殖、细胞周期和 cyclin B1 蛋白表达的影响 [J]. 癌变·畸变·突变,2007,19(5):384-387.
- [9] 李娟,胡永华. 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 [J]. 中草药,2008,39(10):1535-1537.
- [10] 潘卫东. 黄芩素对人白血病细胞 K562 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 安徽中医学院学报,2007,26(5):18-20.

白果内酯对谷氨酸兴奋毒性致神经损害的保护作用

徐静¹,孙长凯^{2*},王冬梅¹,徐红¹,张健²,张玉梅²,马辉²,王禄²,吴兰香²

(1. 大连医科大学机能学实验室,辽宁大连 116044; 2. 大连医科大学脑疾病研究所,辽宁大连 116044)

摘要:目的 观察不同剂量白果内酯对谷氨酸致海马神经元损害的影响,以探讨白果内酯在抗兴奋毒性神经损害中的应用价值。方法 原代培养新生 SD 大鼠海马神经元,建立谷氨酸诱导的兴奋毒性模型;采用台盼蓝染色、TUNEL 染色凋亡神经元测定及乳酸脱氢酶 (LDH) 活性测定的方法观察不同剂量白果内酯的神经保护作用,并与谷氨酸 NMDA (*N*-甲基-*D*-天门冬氨酸盐)受体非竞争性拮抗剂 MK-801 的神经保护作用相比较。结果 在一定剂量范围内,白果内酯可提高谷氨酸损伤的海马神经元细胞的存活率,降低细胞凋亡率,减少细胞中 LDH 的漏出,具有剂量依赖性,于 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 剂量下呈现最佳神经保护效果,但弱于 MK-801 (浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)。结论 白果内酯对谷氨酸诱导的兴奋毒性神经损害具有保护作用。

关键词:白果内酯;谷氨酸;海马神经元

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)10-1593-05

Neuroprotective effect of bilobalide against neuronal damage by glutamate-induced excitotoxicity

XU Jing¹, SUN Chang-kai^{2*}, WANG Dong-mei¹, XU Hong¹, ZHANG Jian²,
ZHANG Yu-mei², MA Hui², WANG Lu², WU Lan-xiang²

(1. Functional Laboratory, Dalian Medical University, Dalian 116044, China; 2. Institute for Brain Disorders, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

* 收稿日期:2008-12-05

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400143)

作者简介:徐静(1977—),女,辽宁省大连市人,硕士,于大连医科大学机能学实验室从事教学、科研工作,研究方向为神经生理。

Tel: 13940950516 E-mail: jingjingflash@163.com