

· 药理与临床 ·

半边旗提取物 5F 诱导 HepG2 细胞凋亡与 p53 活化
及血管内皮生长因子抑制有关李 立¹, 吕应年¹, 刘 义¹, 吴科锋¹, 陈 功², 梁念慈^{1,3,*}(1. 广东医学院 广东天然药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524023; 2. 香港中文大学韦尔斯亲王医院
外科学系, 中国 香港; 3. 广东医学院 生物化学与分子生物学研究所, 广东 湛江 524023)

摘要:目的 观察半边旗提取物 ent-11 α -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid (5F) 对人肝癌细胞 HepG2 增殖的影响, 并探讨 p53、血管内皮生长因子 (VEGF) 及 Caspase-3 在 5F 诱导的 HepG2 细胞凋亡中的作用。方法 采用 MTT 分析检测 5F 对 HepG2 细胞增殖的影响, 并通过细胞凋亡检测 ELISA 试剂盒分析经 5F 处理的 HepG2 细胞胞浆核小体片段, 以确定 5F 能否诱导细胞凋亡, 采用 Hoechst/PI 分析鉴定凋亡细胞核形态。通过免疫印迹 (Western blotting) 分析测定 p53 及 VEGF 蛋白表达水平, 并通过 Caspase-3 分光光度法检测试剂盒检测 Caspase-3 活性。结果 通过细胞活性分析证实, 5F 对 HepG2 的细胞毒作用随着 5F 质量浓度的升高而增强。5F 诱导 HepG2 产生胞浆核小体片段, 并且该诱导作用具有剂量依赖性。5F 处理后, 凋亡变化, 如染色质浓缩, 被 Hoechst/PI 染色所确定。5F 处理后 HepG2 细胞核内 p53 表达水平显著提高, 而胞浆 VEGF 表达水平却下降, 同时, Caspase-3 活性通过浓度依赖方式增强。结论 5F 所诱导的 HepG2 细胞凋亡与 p53 及 Caspase-3 活化、VEGF 负调控有关。5F 可能具有抗癌尤其是抗肝细胞癌价值。

关键词:半边旗; 5F; 肝癌; 细胞凋亡**中图分类号:**R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2010)02-0241-05Apoptosis in HepG2 cells induced by *Pteris semipinnata* extract 5F
involves p53 activation and VEGF inhibitionLI Li¹, LÜ Ying-nian¹, LIU Yi¹, WU Ke-feng¹, CHEN George G², LIANG Nian-ci^{1,3}

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

Abstract : Objective To observe the effect of *Pteris semipinnata* extract, ent-11 α -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid (5F), on human hepatoma HepG2 cells about the proliferation and to investigate the role of p53, VEGF, and Caspase-3 in 5F-induced HepG2 cell apoptosis. **Methods** MTT Assay was used to determine the effect of 5F on proliferation of HepG2 cells, and cytoplasmic mono- and oligonucleosomes of HepG2 cells treated with 5F was assessed with Cell Death Detection ELISA Kit for determining whether 5F can induce apoptosis. Apoptotic nuclear morphology was assessed using Hoechst/PI assay. The effect on the expression levels of p53 and VEGF protein in HepG2 cells was detected by Western blotting analysis, and Caspase-3 activity was measured by a Caspase-3 Colorimetric Assay Kit. **Results** The cytotoxicity of 5F on HepG2 cells was elevated with 5F concentration increasing. Cytoplasmic mono- and oligonucleosomes were induced by 5F in HepG2 cells, and the induction was in a concentration-dependent manner. After treatment with 5F, the apoptotic change such as chromatin condensation was confirmed by Hoechst/PI staining. The level of p53 in nucleus was significantly elevated in HepG2 cells after 5F treatment, but the level of VEGF in cytosol was decreased. Moreover, the activity of Caspase-3 increased in a concentration-dependent manner. **Conclusion** 5F mediated apoptosis involves p53 and Caspase-3 activation, VEGF down regulation in HepG2 cells. 5F might have a therapeutic value against human cancer cell lines and es-

* 收稿日期: 2009-05-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (3987099); 香港特别行政区政府创新科技基金资助项目 (GHP/022/06)

作者简介: 李 立 (1969-), 男, 江苏盐城人, 助理研究员, 博士, 主要从事肿瘤分子病理及天然药物研究。

Tel: (0759) 2388405 E-mail: LL524@yahoo.cn

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

pecially on hepatocellular carcinoma (HCC) cells.

Key words: *Pteris semipinnata* L.; ent-11 α -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic-acid (5F); hepatocellular carcinoma (HCC); apoptosis

半边旗 *Pteris semipinnata* L. 又名半边莲、半边菊,属凤尾蕨科植物,广泛分布于中国南方各省,作为中草药曾用于肝炎、肠炎及毒蛇咬伤等疾病的治疗。本课题组经多年研究发现,半边旗的一些乙醇提取物对多种细胞具有细胞毒作用,其中,二萜类化合物 ent-11 α -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic-acid (5F) 显示了较强抗肿瘤活性^[1,2]。为了进一步探讨 5F 的抗肿瘤活性及其作用机制,本研究首次检测了半边旗提取物 5F 对人肝癌细胞株 Hep G2 增殖活性的影响,测定了由 5F 所诱导的肿瘤细胞内 p53 蛋白、血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白及 Caspase-3 蛋白活性的表达变化,并初步探讨了 5F 诱导 Hep G2 发生凋亡的可能机制,以期为进一步研究 5F 治疗肝癌的可行性奠定基础。

1 材料

1.1 药品:半边旗乙醇提取物二萜类化合物 5F 干粉由本实验室 (广东天然药物研究与开发重点实验室) 提供 (质量分数为 92%),经丙二醇溶解,蒸馏水稀释,制成丙二醇体积分数为 15%、5F 质量浓度为 1 000 mg/L 的储备液,除菌滤过后冷藏保存,实验时再以培养基稀释至所需浓度 (丙二醇最终体积分数 $\leq 1.2\%$)。

1.2 肿瘤细胞系: Hep G2,具有野生型 p53 的人肝癌细胞癌细胞系,由本实验室冷冻保存。

1.3 主要试剂: RPMI 1640 培养基干粉 (Sigma 公司);新生牛血清 (Hyclone 公司);青霉素及链霉素、胰蛋白酶 (Amresco 公司);丙二醇、二甲基亚砜 (DMSO)、MTT (Sigma 公司);Cell Death Detection ELISA 试剂盒 (Roche 公司);Hoechst 33258 (Sigma 公司);溴化丙啶 (PI, Sigma 公司);蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒 (凯基公司);p53 单克隆抗体 (博士德公司);VEGF 多克隆抗体 (博奥森公司);GAPDH 单克隆抗体 (凯基公司);辣根过氧化物酶标记抗鼠抗体 (santa 公司);辣根过氧化物酶标记抗兔抗体 (santa 公司);ECL 化学发光试剂盒、PVDF 膜、Caspase-3 分光光度法检测试剂盒 (凯基公司)。

1.4 主要仪器: YJ-875 医用净化工作台 (苏州净化设备公司);CO₂ 恒温培养箱 (Precision 公司);ELx800 酶标仪 (BIO-TEK 公司);EPTCSXL-31240 流式细胞仪 (Coulter 公司);荧光显微镜及成像系统 (Lecia

公司);垂直电泳仪 (Bio-rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养:人肝癌细胞株 Hep G2 于含 10% 新生牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液内,在 37 °C、含 5% CO₂ 的饱和湿度空气中培养。

2.2 MTT 法测定肿瘤细胞存活率:当 Hep G2 生长面积达细胞培养瓶底面积 80% 时,以 0.25% 胰酶剥离细胞,细胞计数后以培养液调整细胞浓度,接种细胞于 96 孔培养板,并确保每孔含细胞 2 000 个。细胞贴壁后换液,各实验组添加 5F 并使其终质量浓度分别为 5、10、20、40、80 mg/L,阴性对照组则加相同体积培养液,各组设 8 个平行孔。培养 24 h 后,加 MTT 染液 (MTT 终质量浓度为 0.5 mg/mL),并继续培养 4 h,弃上清,每孔加 DMSO 100 μ L,震荡 5 min 后以酶标仪测定波长 570 nm 处的吸光度 (A) 值,计算肿瘤细胞存活率 (药物组 A 值/对照组 A 值 $\times 100\%$)。

2.3 ELISA 法检测肿瘤细胞凋亡情况:同上述测定肿瘤细胞存活率方法,接种 Hep G2 细胞于 96 孔培养板,5F 处理 24 h,同时设阴性对照。采用 Cell Detection ELISA 试剂盒,根据试剂所附操作程序,在波长 405 nm 处,通过酶标仪测定胞浆内核小体片段水平,从而分析细胞凋亡发生情况。

2.4 Hoechst/PI 染色观察细胞形态变化:接种细胞于玻片,细胞贴壁以 5F 处理 24 h。弃去培养液, PBS 洗涤,10 μ g/mL Hoechst 37 °C 孵化 15 min; PBS 洗涤,20 μ g/mL PI 低温孵化 15 min。PBS 洗涤,荧光显微镜观察细胞形态变化。

2.5 Western blotting 检测:接种细胞于 6 孔细胞培养板,细胞贴壁后以 40 mg/L 5F 处理,于处理 0、3、6、12、24 h 后的不同时间点收集细胞,并按照蛋白提取试剂盒所附操作程序提取细胞核蛋白 (p53)、胞浆蛋白 (VEGF) 及细胞全蛋白 (GAPDH),以检测细胞核 p53、胞浆 VEGF 及内参 GAPDH 的表达水平。以蛋白定量试剂盒测定所提蛋白浓度,分装后冷冻保存。SDS-PAGE 电泳,转膜;封闭 1 h 后加一抗,4 °C 孵育过夜;洗膜后加二抗,室温孵育 1 h;洗膜、曝光显影,采用 Quantity One 软件分析目标蛋白表达水平。实验重复 3 次。

2.6 分光光度法检测 Caspase-3 活性: 接种 Hep G2 于 6 孔细胞培养板, 细胞贴壁后再分别以 0、5、10、20、40、80 mg/L 的 5F 处理, 于处理后 3、6 h 的时间点, 采用试剂盒所附操作步骤检测肿瘤细胞内 Caspase-3 活化程度。实验重复 3 次。

2.7 统计学处理: 采用 SPSS 13.0 软件系统的均数比较分析及单因素方差分析对实验数据进行统计学处理。

3 结果

3.1 5F 抑制 Hep G2 细胞增殖活性: MTT 实验结果显示 5F 明显抑制肿瘤细胞增殖, 并且 5F 的细胞毒作用随质量浓度的提高而增强, 结果见表 1。

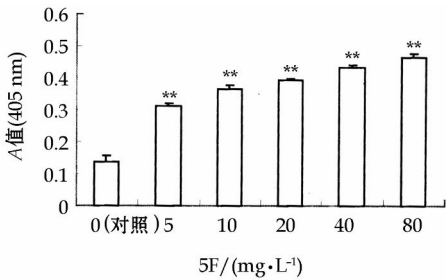
表 1 5F 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, n=8)
Table 1 Inhibition of 5F on proliferation in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	剂量/(mg · L ⁻¹)	A 值	存活率/%
对照	0	0.370 ± 0.026	100.000
5F	5	0.312 ± 0.029	84.288 **
	10	0.305 ± 0.021	82.530 **
	20	0.282 ± 0.030	76.140 **
	40	0.213 ± 0.013	57.477 **
	80	0.185 ± 0.010	50.039 **

与对照组比较: ** P<0.01

** P<0.01 vs control group

3.2 5F 诱导肿瘤细胞凋亡发生: ELISA 分析证实肿瘤细胞经 5F 处理后, 其胞浆溶解物吸光度值显著升高, 并且随 5F 质量浓度的提高而增强, 提示 5F 诱导细胞凋亡并产生核小体片段, 结果见图 1。



与对照组比较: ** P<0.01

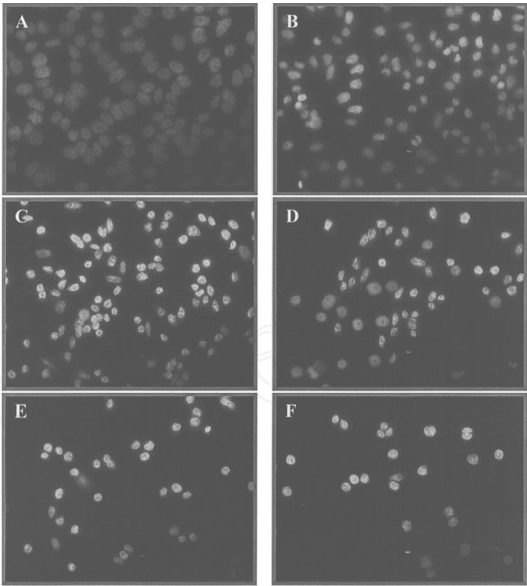
** P<0.01 vs control group

图 1 5F 对细胞溶解物胞浆核小体片段的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)
Fig. 1 Effect of 5F on mono- and oligonucleosomes in cytoplasmic fraction of cell lysates ($\bar{x} \pm s$, n=3)

3.3 5F 诱导肿瘤细胞凋亡所产生的形态变化: 与对照组细胞核呈淡蓝着色相比, 5F 处理后的肿瘤细胞发生核浓缩, 呈亮蓝着色, 可呈分叶状或碎片状等形态学变化, 结果见图 2。

3.4 5F 上调细胞核 p53 表达、下调胞浆 VEGF 表达: 随着 5F 处理时间延长, 肿瘤细胞核 p53 蛋白表达存在提高趋势 (P<0.001), 而胞浆 VEGF 蛋白

则存在下降趋势 (P<0.001), 结果见图 3。
3.5 5F 激活 Caspase-3 蛋白: 无论是 5F 处理 3 h 还是 6 h, Caspase-3 活化度均随着 5F 质量浓度的提高而存在上升趋势 (P<0.001), 结果见图 4。

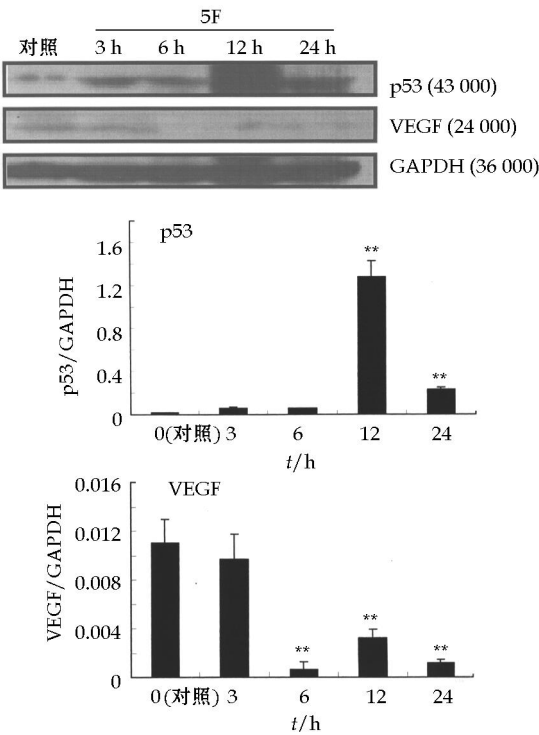


A-对照组 B~F-5、10、20、40、80 mg · L⁻¹ 5F 组

A-control group B~F-0, 5, 10, 20, 40, and 80 mg · L⁻¹ 5F group

图 2 5F 对 HepG2 细胞形态的影响

Fig. 2 Effect of 5F on morphologic changes of HepG2 cells



与对照组比较: ** P<0.01

** P<0.01 vs control group

图 3 5F 对 HepG2 细胞 p53 及 VEGF 蛋白表达水平的影响
Fig. 3 Effect of 5F on protein expression level of p53 and VEGF in HepG2 cells

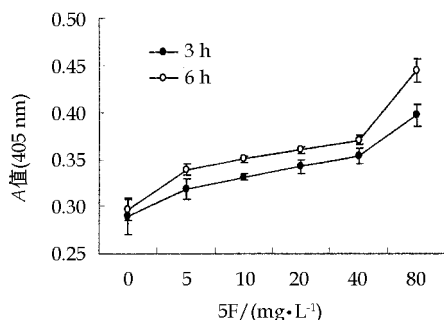


图 4 5F 对 HepG2 细胞 Caspase-3 蛋白活性的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Effect of 5F on Caspase-3 protein activity
in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

MTT 分析显示 5F 可明显抑制 HepG2 增殖,并且在相同时间内,随着 5F 质量浓度提高,抑制率也增加,具有剂量依赖关系。本结果与先前 5F 抑制卵巢癌、甲状腺未分化癌、胃癌及大肠癌等癌细胞株增殖活性的研究结果类似^[2~5],提示 5F 具有较强的肿瘤细胞毒活性。

细胞凋亡是维持发育细胞及成熟细胞处于稳态的关键机制,而细胞凋亡的诱导则是肿瘤对化疗药物作出反应的决定性因素。最近,细胞凋亡在抗癌药物介导的细胞毒作用中所扮演的角色已越来越引起关注。在本研究中,ELISA 结果显示 5F 可诱导 HepG2 发生凋亡,而且在 5F 与细胞凋亡率之间存在质量浓度依赖关系;通过 Hoechst/PI 染色可清楚地观察到经 5F 处理后肿瘤细胞呈凋亡细胞所特有的形态特征,尤其值得注意的是,在 Hoechst/PI 染色分析中,几乎未发现着红色的坏死细胞。综上所述,推测 5F 通过诱导 HepG2 发生凋亡以实现其细胞毒作用。

“基因卫士”p53,一个 DNA 结合转录因子,是过去 20 年里被研究得最为频繁的肿瘤抑制因子之一^[6,7]。癌基因表达、DNA 损伤以及其他形式的压力所致的伤害均可使细胞通过磷酸化或其他修饰方式稳定 p53 蛋白^[6,8],而被稳定的 p53 蛋白则在细胞核内累积并调控众多促凋亡基因表达(如 bax、noxa、PUMA、bid 及 CD95 等)。此外,除了在细胞核内发挥转录因子功能外,p53 蛋白还可在细胞核外直接与抗凋亡 Bcl-2 蛋白(Bcl-2 及 Bcl-xL)结合并活化促凋亡 Bcl-2 蛋白(Bax 及 Bak),从而实现其调控线粒体外膜通透性的功效^[9]。在本研究中,免疫印迹分析结果提示,在经 5F 处理的 HepG2 内,p53 蛋白于细胞核内被激活并累积,从而发挥了

传导细胞凋亡信号的功能。

1971 年,Folkman^[10]提出肿瘤生长依赖于血管生成,以血管为靶向的治疗将成为一种新的肿瘤治疗策略。肝癌为一种具有高度血管浸润倾向的肿瘤,与血管新生密切相关^[11,12]。因此,肿瘤血管生成在肝癌发生、发展过程中发挥了重要作用。目前,已有证据表明:肝癌血管生成活性与肿瘤血管浸润、转移及预后不良有关。肿瘤血管生成起始于肿瘤细胞释放血管生成因子,是一个复杂、多步骤过程。在众多血管生成因子中,VEGF 为最早分离出来的血管生成多肽之一,是目前已知的最强、最重要的血管生成因子。在肝细胞癌发生、发展的整个过程中,VEGF 为肿瘤生长所必需^[13],而通过阻断 VEGF 信号通路治疗肝癌的研究也因此被广泛关注。在本研究中,5F 可显著抑制 VEGF 表达,提示 5F 具有潜在的抗肿瘤血管生成活性;而在另一方面,由于 VEGF 可直接与肝癌细胞膜上相应受体结合并促进肿瘤细胞自身生长^[14],所以 5F 还存在通过抑制 VEGF 表达从而控制肿瘤细胞生长、促进细胞凋亡的可能。

Caspase 家族在细胞凋亡调控过程中发挥了重要作用。Caspase 活化是回应源于细胞表面受体、线粒体及内质网死亡诱导信号所诱发细胞凋亡的标志^[15],尤其是 Caspase 活化,在细胞凋亡起始阶段发挥了关键作用^[16]。在本研究中,5F 所诱导的 Caspase 活化提示 Caspase 参与了 5F 所诱导的肿瘤细胞凋亡过程并可能充当了凋亡执行者的作用。

综上所述,p53、VEGF 及 Caspase 参与了 5F 所诱导的 HepG2 细胞凋亡,提示半边旗提取物 5F 存在治疗肝癌的潜在价值。目前天然植物产物作为抗癌药物已愈来愈受到重视,一些食用植物活性成分及其分子靶点已被鉴定,而能否利用半边旗提取物 5F 活化 p53、阻断 VEGF 这一优势,成为靶向治疗肿瘤、尤其是肝癌药物的有力候选者,仍有待进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] 何太平,覃燕梅,莫丽儿,等. 半边旗二萜类化合物 5F 对高转移卵巢癌 HO-8910PM 细胞中癌相关基因表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(1): 117-122.
- [2] 何太平,陈杰,梁念慈,等. 半边旗二萜类化合物 5F 对高转移卵巢癌细胞系 HO-8910PM NF- κ B (P56)、Smad3 蛋白和 NF- κ B (P65)、ETS-1 mRNA 表达的影响[J]. 中草药, 2005, 36(4): 545-548.
- [3] Liu Z M, Chen G G, Vlantis A C, et al. Cell death induced by ent-11 α -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic-acid in anaplastic thyroid carcinoma cells is via a mitochondrial-mediated pathway[J]. Apoptosis, 2005, 10(6): 1345-1356.

- [4] Liu Z M, Ng E K W, Liang N C, *et al.* Cell death induced by *Pteris semipinnata* L. is associated with p53 and oxidant stress in gastric cancer cells [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(6): 1477-1487.
- [5] Chen G G, Liang N C, Lee J F, *et al.* Over-expression of Bcl-2 against *Pteris semipinnata* L-induced apoptosis of human colon cancer cells via a NF-kappa B-related pathway [J]. *Apoptosis*, 2004, 9(5): 619-627.
- [6] Vogelstein B, Lane D, Levine A J. Surfing the p53 network [J]. *Nature*, 2000, 408(6810): 307-310.
- [7] Vousden K H, Lane D P. p53 in health and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(4): 275-283.
- [8] Xu Y. Regulation of p53 responses by post-translational modifications [J]. *Cell Death Differ*, 2003, 10(4): 400-403.
- [9] Schuler M, Green D R. Transcription, apoptosis and p53: catch-22 [J]. *Trends Genet*, 2005, 21(3): 182-187.
- [10] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications [J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [11] Pang R W, Poon R T. From molecular biology to targeted therapies for hepatocellular carcinoma: the future is now [J]. *Oncology*, 2007, 72(1): 30-44.
- [12] Miura H, Miyazaki T, Ohnishi S, *et al.* Increased expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 1997, 27(5): 854-861.
- [13] Pang R, Poon R T. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2006, 242(2): 151-167.
- [14] 刘乘利, 李 冰. 血管内皮生长因子及其受体在肝癌细胞株中的表达及意义 [J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(6): 770-772.
- [15] Yang L, Wu S, Wu P, *et al.* 23, 24-Dihydrocucurbitacin B induces G2/M cell-cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis in human breast cancer cells (Bcap37) [J]. *Cancer Lett*, 2007, 256(2): 267-278.
- [16] Nicholson D W, Ali A, Lazebnik Y A, *et al.* Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis [J]. *Nature*, 1995, 376(6535): 37-43.

重组天花粉蛋白体外诱导宫颈癌 HeLa 细胞 p27 基因去甲基化的研究

尤程程¹, 黄利鸣^{2*}, 韩 钰¹, 王艳林², 黄益玲²

(1. 三峡大学分子生物研究所, 湖北 宜昌 443002; 2. 三峡大学医学院 病理教研室, 湖北 宜昌 443002)

摘要:目的 研究重组天花粉蛋白 (recombinant trichosanthin, rTCS) 对宫颈癌 HeLa 细胞中 p27 基因甲基化状态和基因表达的影响。方法 应用不同质量浓度的 rTCS (20, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$) 处理体外培养的宫颈癌 HeLa 细胞后, MSP 法检测用药前后细胞中 p27 基因的甲基化状态, Real-Time PCR 法检测用药前后细胞中 p27 和 DNA 甲基转移酶-1 (DNMT1) mRNA 水平的变化, Western-blotting 法检测用药前后细胞中 p27 蛋白表达的变化。结果 HeLa 细胞中 p27 基因为低表达, 基因启动子区 CpG 岛呈部分甲基化状态。40 $\mu\text{g/mL}$ rTCS 处理导致 p27 基因启动子区 CpG 岛去甲基化; 在 20, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$ 的 rTCS 作用 48 h 后, p27 基因 mRNA 相对表达水平分别升高 2.22、4.00、6.03 倍, p27 蛋白水平表达也逐渐增加; 宫颈癌 HeLa 细胞中 DNMT1 mRNA 高表达, 40 $\mu\text{g/mL}$ rTCS 处理 48 h 可至 DNMT1 mRNA 表达水平降低 78%。结论 rTCS 通过抑制 DNMT1, 逆转 p27 基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态, 使宫颈癌 HeLa 细胞中 p27 基因表达活化。rTCS 能逆转宫颈癌 HeLa 细胞 p27 基因甲基化状态, 调控 p27 基因和 DNMT1 的表达。

关键词: 重组天花粉蛋白; p27 基因; 宫颈癌; DNA 甲基化

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)02-0245-05

In vitro introduction of recombinant trichosanthin on demethylation of p27 in HeLa cells

YOU Cheng-cheng¹, HUANG Li-ming², HAN Yu¹, WANG Yan-lin¹, HUANG Yi-ling²

(1. Institute of Molecular Biology, Three Gorges University, Yichang 443002, China; 2. Department of Pathology, Medical College of Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Abstract : Objective To investigate the effects of recombinant trichosanthin (rTCS) on methylation status and expression level of p27 gene in HeLa cells. **Methods** HeLa cells was treated by different concentration (20 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, and 80 $\mu\text{g/mL}$) of rTCS for 48 h and then methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) was used to detect the promoter methylation status of the p27 gene, real-time PCR was used to detect levels of p27 and DNMT1 mRNA, and Western blotting assay was used to detect expression level of p27 protein before and after treatment with rTCS. **Results** Low expression level and promoter methylation status of the p27 gene were detected in HeLa cells. Treatment with 40 $\mu\text{g/mL}$ rTCS

* 收稿日期: 2009-06-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873282); 湖北省自然科学基金资助项目 (2009CDA060)

作者简介: 尤程程 (1984—), 女, 湖北十堰人, 助教, 硕士。Tel: (0717) 6397179 E-mail: yocncn@163.com

* 通讯作者 黄利鸣