

- binant soluble P-selectin glycoprotein ligand [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(7): 1937-1945
- [7] Kotsch K, Francuski M, Pascher A, et al. Improved long-term graft survival after HO-1 introduction in brain dead donors [J]. *Am J Transplant*, 2006, 6(3): 477-486
- [8] 张水军, 马廷午, 马秀现, 等. 乙酰半胱氨酸对脑死亡大鼠肝脏的保护作用 [J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(7): 818-820
- [9] 欧明娥, 唐利文, 邓常清. 补阳还五汤有效组分对血管内皮细胞抗血栓功能及蛋白激酶 C 的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1514-1520
- [10] 刘柏炎, 蔡光先, 刘 维, 等. 补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血后血管内皮生长因子及其受体 Flk1 的影响 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 394-397.
- [11] 张淑萍, 梁 燕, 邓常青. 补阳还五汤和其有效部位对大鼠脑缺血再灌注后 IL-1 β 及相关因子表达的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(2): 24-27
- [12] 邓中甲. 方剂学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003
- [13] Pratschke J, Wilhelm M J, Kusaka M, et al. A model of gradual onset brain death for transplant-associated studies in rats [J]. *Transplantation*, 2000, 69(3): 427-430
- [14] 陈 洁, 苏泽轩, Maja F, 等. 无脑电图监测下渐进式大鼠脑死亡模型的建立 [J]. 广东医学, 2005, 26(6): 768-770
- [15] 施新猷. 现代医学实验动物学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2000
- [16] 朱明光, 谢淑丽, 张 华. p38MAPK 抑制剂对缺血/再灌注大鼠肾脏功能损伤的保护作用 [J]. 西北国防医学杂志, 2003, 24(5): 361-363
- [17] 陈 洁, 曾耀英, 曾慧兰, 等. 阻断 p38MAPK 信号通路降低脑死亡肾脏免疫原性 [J]. 中华实验外科杂志, 2009, 26(11): 1509-1511.

葎草酮对人胃癌细胞 SGC-7901 N-乙酰基转移酶 1 活性及基因表达的抑制作用

高世勇^{1,2}, 郎 朗^{1,2}, 邹 翔^{1,2}, 汲晨锋^{1,2}, 季宇彬^{1,2}, 马 强^{1,2}, 岳 磊^{1,2}, 曲中原^{1,2}, 尚 明^{1,2}
 (1 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心 药物研究所博士后科研流动站, 黑龙江 哈尔滨 150076;
 2 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 探讨葎草酮抗肿瘤作用以及其与 N-乙酰基转移酶 1 (NAT1 酶) 之间的关系。方法 采用 HPLC 法, 以对氨基苯甲酸 (PABA) 为底物, 测定 PABA 被 NAT1 乙酰化为乙酰化对氨基苯甲酸 (Ac PABA) 的量, 间接反映 NAT1 酶的活性。采用 RT-PCR 法, 测定葎草酮对 NAT1 mRNA 表达的影响。结果 葎草酮能够显著降低 SGC-7901 完整细胞和细胞质中 Ac PABA 的生成量; 随着作用时间的增加, Ac PABA 的生成量逐渐增加, 但与其相同时间点的阴性对照组比较, 葎草酮组 Ac PABA 的生成量明显减少; 葎草酮能够降低 SGC-7901 细胞中 NAT1 mRNA 的表达。结论 葎草酮通过抑制 NAT1 的活性和基因表达两个方面减少芳香胺类化合物代谢为乙酰化的芳香胺类致癌物的量, 从而预防癌症的发生, 防止癌症的进一步恶化。

关键词: 葎草酮; 人胃癌细胞 SGC-7901; N-乙酰基转移酶 1 (NAT1); NAT1 mRNA 表达
 中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)05-0761-06

Inhibition of humulon on arylamine N-acetyltransferase 1 activity and gene expression in SGC-7901 cells

GAO Shi yong^{1,2}, LANG Lang^{1,2}, ZOU Xiang^{1,2}, JI Chen feng^{1,2}, JI Yu bin^{1,2},
 MA Qiang^{1,2}, YUE Lei^{1,2}, QU Zhong-yuan^{1,2}, SHANG Ming^{1,2}

(1 Post doctoral Research Station, Institute of Materia Medica, Center of Research and Development on Life Sciences and Environment Sciences of Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. MOE Engineering Research Center of Natural Anticancer Drugs, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: Objective To study the antitumor effects of humulon on arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1) activity. **Methods** Employing HPLC, using PABA as substrate, in intact SGC-7901 cells and their cytoplasm, making PABA being acetylated to Ac-PABA by NAT1 as the activity of NAT1. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assay was used to study the expression of the NAT1 mRNA. **Results** The results show that humulon could inhibit the production of Ac-PABA in intact SGC-7901 cell and the cytoplasm, the production of Ac-PABA was gradually increased with the interaction time increasing. But comparing with corresponding negative control groups, the production of Ac-PABA was

①收稿日期: 2009-12-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873403); 黑龙江省教育厅重点项目 (11511102)

作者简介: 高世勇 (1975-), 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 哈尔滨商业大学药物研究所所长, 研究方向为肿瘤药理学。

E-mail: sygao2002@163.com

decreased evidently and the humulone could inhibit the expression of NAT1 mRNA. **Conclusion** Humulon could prevent the occurrence and deterioration of cancer. Its mechanisms can be attributed to its effect on decreasing the production of acetylation of carcinogenic aromatic amines, which is acetylated from aromatic amines, and inhibiting the NAT1 activity and expression of NAT1 mRNA.

Key words: humulon; SGC-7901 cell; *N*-acetyltransferase 1 (NAT1); NAT1 mRNA expression

葎草酮为大麻科植物啤酒花 *Humulus lupulus* Linn. 中的一种主要化学成分,在桑科植物葎草的球果中量也较高。啤酒花是一种重要的传统中药,也是酿造啤酒的重要原料,其中 α 酸(α acids)及 β 酸(β acids)是酒花苦味的主要来源,因其独特的药用价值而成为近年研究的热点。美国专利研制出了一种能够抑制多种肿瘤(乳腺癌、淋巴瘤、宫颈癌)生长的产品,此产品中主要的功能成分是啤酒花中的 α 酸和 β 酸。啤酒花在民间用于治疗胃癌以及结核潮热、胃肠炎、痢疾、感冒发烧、小便不利、肾盂肾炎等疾病^[1]。葎草酮作为啤酒花 α 酸的主要成分之一,有研究表明其对化学方法诱导的小鼠皮肤癌有较好疗效^[2],作用机制与影响环氧酶 2 (COX-2) 活性及基因表达有关^[3]。另有研究发现葎草酮能够抑制肿瘤新生血管的生成^[4],从而达到抗肿瘤的作用。Tobe 等^[5]报道葎草酮能够诱导 HL-60 细胞凋亡。

N-乙酰化转移酶 (NAT) 是 II 相药物代谢酶,研究发现 NAT 是一种细胞凋亡抑制酶^[6],与肿瘤的发生和发展密切相关^[7,8]。研究表明,龙葵碱通过抑制 HepG2 细胞 NAT 的活性发挥细胞毒作用^[9]。本实验以啤酒花在民间用于治疗胃癌为依据,以人胃癌细胞株 SGC-7901 为研究模型,在观察葎草酮对 SGC-7901 细胞株细胞毒作用的基础上,以 NAT 酶为研究靶点,揭示葎草酮预防肿瘤发生及抑制肿瘤的作用机制。

1 材料

1.1 细胞株:人胃癌细胞株 SGC-7901,购自美国 ATCC (American Type Culture Collection),由黑龙江省肿瘤医院肿瘤研究所保种提供。

1.2 药品与试剂:葎草酮(质量分数 95%)购自北京豪盛酒花制品厂;阿霉素由山西泰盛制药有限公司生产;RPMI 1640 细胞培养液、胰酶购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;溴化四氮唑蓝 (MTT)、Tris、对氨基苯甲酸 (PABA) 购自 Sigma 公司;乙酰化对氨基苯甲酸 (Ac-PABA)、AcCoA、BSA、乙酰肉毒碱、肉毒碱乙酰转移酶购自美国 FLUKA 公司;DTT 购自国药集团化学试剂有限公司;PMSF、Leupeptin 购自

上海华舜生物工程有限公司;DEPC 购自北京索莱宝科技有限公司;Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;NAT1、 β -actin 引物由上海生工生物技术服务有限公司合成;RT-PCR 试剂盒 [TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0] 购于宝生物工程(大连)有限公司;溴化乙锭 (EB) 购于美国 Amersco 公司;琼脂糖购于北京奥博星生物技术有限责任公司。1.3 仪器:CO-150 型 CO₂ 培养箱 (美国 NBS 公司);SW-CJ-2F 型超净工作台 (苏州净化设备厂);Olympus IX70 型倒置显微镜 (Olympus 公司);680 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司);Waters 2695 型高效液相色谱仪、Symmetry Shield C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) 逆向色谱柱 (美国 Waters 公司);MyClear 型 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司);EC120/CSSU78 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司);6R 型台式冷冻离心机 (美国 Beckmar Coulter 公司)。

1.4 AcCoA 循环混合液 (3 mL) 配制:1 mol/L DTT 6 μ L, 35 mmol/L EDTA 17.535 μ L, 乙酰肉毒碱 10.787 mg, 肉毒碱乙酰转移酶 6 U, 50 mmol/L Tris-HCl 2.976 mL。

2 方法

2.1 MTT 法测定葎草酮对人胃癌细胞 SGC-7901 的细胞毒作用:将对数生长期的人胃癌细胞 SGC-7901 用胰酶消化后配制成浓度为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液,接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L。5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h,然后,实验组加入 100 μ L 不同浓度葎草酮,终浓度分别为 28、56、112、224、448 μ mol/L 阴性对照组加入 100 μ L RPMI 1640 细胞培养液,阳性对照组加入 100 μ L 不同浓度阿霉素,终浓度分别为 0.001、0.01、0.1、1、10 μ mol/L,每个剂量设 6 个平行孔,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 72 h。72 h 后,弃上清液,每孔加 0.5 mg/mL MTT 液 100 μ L,继续培养 4 h 后弃上清液,每孔加 DMSO 200 μ L,置微量振荡器上振荡至溶解后,酶标仪测定吸光度值,检测波长 570 nm。计算药物对肿瘤细胞的抑制率,并计算 IC₅₀。

抑制率 = (对照组平均吸光度值 - 给药组平均吸光度值) / 对照组平均吸光度值 × 100%

2.2 葎草酮对 SGC-7901 细胞 NAT1 活性的影响

2.2.1 标准曲线的绘制: 用蒸馏水配制 Ac-PABA 标准品溶液, 质量浓度分别为 0.015、0.03、0.06、0.12、0.24、0.3 mg/mL, 依次进样, 进样量 1 μ L。色谱条件: SymmetryShield C₁₈ 逆向色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为 50 mmol/L 醋酸乙腈 (86:14), 2487 紫外检测器, 检测波长 266 nm, 柱温 (25 \pm 5) $^{\circ}$ C。峰面积由 Empower 工作站软件自动积分, 用 Excel 软件以标准品质量浓度和峰面积分别为横纵坐标做标准曲线, 计算相关系数, 得回归方程: $Y = 5 \times 10^6 X - 10\,643$, $r = 0.9999$ 。

2.2.2 不同质量浓度葎草酮对 SGC-7901 完整细胞 NAT1 活性的影响: 取处于对数生长期生长良好的 SGC-7901 细胞, 胰酶消化后, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 细胞培养液调整细胞浓度为 5×10^5 个/mL, 将细胞悬液加到 24 孔板中, 每孔 1 mL。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后, 每孔加入底物 PABA, 终浓度 45 μ mol/L, 给药组加入不同浓度的葎草酮, 终浓度分别为 28、56、112、224、448 μ mol/L, 阴性对照组加入相同体积的 RPMI 1640 细胞培养液, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 24 h。24 h 后, 吸出培养液, 3 500 $\times g$ 离心 10 min, 上清液加 0.2 mL 10% 的三氯乙酸沉淀蛋白, 静置 6 h, 高速离心机 12 000 $\times g$ 离心 5 min, 取 20 μ L 上清液按“2.2.1 项”方法 HPLC 自动进样进行检测。由 Ac-PABA 的量来间接反映 NAT1 的活性的变化。NAT1 的活性用 1×10^6 细胞对应的乙酰化底物 (nmol) 表示。

2.2.3 葎草酮作用不同时间对 SGC-7901 完整细胞中 NAT1 活性的影响: 取处于对数生长期的 SGC-7901 细胞, 胰酶消化后, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 细胞培养液调整细胞至 5×10^5 个/mL, 将细胞悬液加到 24 孔板中, 每孔 1 mL, 放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养箱中培养 24 h 后, 每孔加入底物 PABA, 终浓度为 45 μ mol/L, 给药组加入葎草酮, 终浓度为 28 μ mol/L。阴性对照组加入等体积 RPMI 1640 细胞培养液, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下分别培养 24、48、72 h 后, 将细胞及培养基移取离心, 接下来的实验步骤同“2.2.2 项”。

2.2.4 葎草酮对 SGC-7901 细胞细胞质中 NAT1 活性的影响: 取处于对数生长期的 SGC-7901 细胞 1×10^7 个, 胰酶消化后, PBS 洗两遍, 沉淀的细胞悬浮在 2 mL 的裂解液 [20 mmol/L Tris-HCl (4 $^{\circ}$ C 时 pH 7.5), 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, 50 μ mol/L PMSF, 10 μ mol/L leupeptin] 中。悬液

4 $^{\circ}$ C 下超声波破碎 20 min, 然后先以 9 000 $\times g$ 离心 1 min, 上清液 10 000 $\times g$ 离心 60 min, 取上清液置于冰浴中, 备用, 用于测定蛋白的量和 NAT1 活性, 蛋白量测定采用 Bradford 方法, 以 BSA 作为蛋白标准。

活性测定实验中, 通过测定被乙酰辅酶 A 依赖的 NAT1 乙酰化的 PABA 的量, 即 Ac-PABA 生成的量, 来间接反映细胞质中 NAT1 的活性。实验分 7 组, 分别为阴性对照组、空白对照组、葎草酮组 (终浓度为 28、56、112、224、448 μ mol/L)。反应混合液总体积 550 μ L, 包括 250 μ L 的细胞质液、100 μ L 乙酰辅酶 A 循环混合液、终浓度为 45 μ mol/L PABA、不同浓度的葎草酮。37 $^{\circ}$ C 温育 5 min, 最后加入 200 μ L 1 mg/mL 的 AcCoA 开始反应。阴性对照加入相同体积的 RPMI 1640 细胞培养液。空白对照组不加 AcCoA, 而加入等量的双蒸水。将混合液于 37 $^{\circ}$ C 温育 6 h, 取出后加入 200 μ L 20% 三氯乙酸终止反应。混合液经 0.22 μ m 滤膜过滤后, HPLC 测定 Ac-PABA 的量, 色谱条件同“2.2.1 项”, 观察葎草酮对细胞质液中 NAT1 活性的影响。

2.3 RT-PCR 测定葎草酮对 NAT1 mRNA 表达的影响

2.3.1 细胞培养及给药: 取生长状态稳定, 呈对数生长期的 SGC-7901 细胞, 0.25% 胰酶消化细胞, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 细胞培养液调整细胞浓度为 5×10^5 个/mL, 将细胞悬液加入 100 mL 培养瓶中, 细胞分瓶后加入 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱培养 24 h。实验分葎草酮组和阴性对照组, 葎草酮组分别加入不同浓度的葎草酮, 终浓度分别为 28、56、112、224、448 μ mol/L, 阴性对照组加入等体积 RPMI 1640 细胞培养液。细胞加药后, 放入 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱继续培养 48 h。

2.3.2 RNA 的提取: 用 DEPC 水洗细胞 1 次后, 每瓶加 1 mL Trizol, 充分震荡混匀, 15~30 $^{\circ}$ C 静置 30 min。30 min 后吹下细胞放入 1.5 mL Eppendorf 管中, 静置 5 min, 加入 0.2 mL 氯仿, 充分震荡 15 s 混匀, 15~30 $^{\circ}$ C 静置 10 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times g$ 离心 15 min, 抽提 RNA。取 500 μ L 上层水相转移至另一个 Eppendorf 管中, 加等体积异丙醇 15~30 $^{\circ}$ C 静置 1 h 后, 4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times g$ 离心 15 min, 弃上清, 沉淀即为总 RNA。加 0.5 mL、75% 乙醇震荡洗涤 1 次, 4 $^{\circ}$ C、10 000 $\times g$ 离心 10 min, 小心吸干乙醇, 空气干燥。当 RNA 沉淀变澄清透明时, 加 50 μ L DEPC 水, 58 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 溶

解 RNA, 并测定其在 260、280 nm 的吸光度值, 计算总 RNA 浓度, 于 -20 °C 储存备用。

2.3.3 RT-PCR: 采用 Rremier 5 引物设计软件设计引物序列。NAT1、 β -actin 引物由上海生工生物技术服务有限公司合成。NAT1: 正向引物为 5'-CA CCCGATCCGGGATCATGGACATTGAGC-3', 反向引物为 5'-GGTCCTCGAGTCAATCACCATGTTTGGGCAG-3', 885 bp。 β -actin: 正向引物为 5'-GCTCGTCTCGACAA CGGCTG-3', 反向引物为 5'-CAAACA TGATCTGGGTCATCTTCTC-3', 331 bp。按照 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3. 试剂盒说明书步骤操作。反应完成后, 取 20 μ L PCR 扩增产物与 5 μ L 上样缓冲液混匀, 加样至 1% 琼脂糖凝胶 (含 EB 1 μ g/mL), 50 V 电泳约 2 h。用凝胶成像系统紫外透射照像, 以 PCR 产物与 β -actin 相对吸光度之比对数据进行分析。

2.4 数据处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验对数据进行处理。

3 结果

3.1 葎草酮对 SGC-7901 细胞毒作用: MTT 法检测葎草酮对体外培养 SGC-7901 细胞生长抑制作用, 结果表明葎草酮对 SGC-7901 细胞的 IC₅₀ 为 363.1 μ mol/L, 阿霉素对 SGC-7901 细胞的 IC₅₀ 为 0.4 μ mol/L, 表明葎草酮对 SGC-7901 细胞具有较好的抑制作用。

3.2 不同浓度葎草酮对 SGC-7901 完整细胞 NAT1 活性的影响: 与阴性对照组比较, 葎草酮能够减少 SGC-7901 完整细胞中 Ac-PABA 生成的量, 并且随着葎草酮浓度的增加, Ac-PABA 生成的量逐渐减少。结果见表 1。

3.3 葎草酮作用不同时间对 SGC-7901 完整细胞 NAT1 活性的影响: 28 μ mol/L 葎草酮分别作用于表 1 不同浓度葎草酮对 SGC 7901 完整细胞 NAT1 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of humulon in different concentration on NAT1 activity in intact SGC 7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	C/(μ mol·L ⁻¹)	Ac-PABA 的生成量/nmol (1×10 ⁶ 细胞)
阴性对照	0	0.364 7±0.009 8
葎草酮	28	0.350 6±0.003 4*
	56	0.298 3±0.006 4*
	112	0.288 6±0.006 8*
	224	0.265 4±0.005 2*
	448	0.221 1±0.009 3*

与阴性对照组比较: ** *P* < 0.01

* * *P* < 0.01 vs negative control group

SGC-7901 细胞 24、48、72 h, 随着作用时间的增加, SGC-7901 细胞中 Ac-PABA 生成的量逐渐增多, 但葎草酮组与同一时间段的阴性对照组比较, 能够显著减少 Ac-PABA 生成的量。结果见表 2。

3.4 葎草酮对 SGC-7901 细胞细胞质 NAT1 活性的影响: 不同剂量的葎草酮作用于 SGC-7901 细胞, 与阴性对照组比较, 能够显著降低细胞质中 Ac-PABA 的生成量, 并且随着葎草酮浓度的增大, Ac-PABA 的生成量逐渐降低。结果见表 3。

表 2 葎草酮作用不同时间对 SGC 7901 完整细胞 NAT1 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of humulon on NAT1 activity in intact SGC 7901 cells at different times following its administration ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	药物浓度/ (μ mol·L ⁻¹)	Ac-PABA 的生成量/nmol (1×10 ⁶ 细胞)		
		24 h	48 h	72 h
阴性对照	0	0.316 1±0.011 5	1.206 4±0.018 7	1.575 2±0.015 4
葎草酮	28	0.276 2±0.015 6**	0.629 4±0.023 2**	0.751 8±0.015 3**

与阴性对照组比较: ** *P* < 0.01

* * *P* < 0.01 vs negative control group

表 3 葎草酮对 SGC 7901 细胞细胞质 NAT1 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of humulon in different concentration on NAT1 activity in cytoplasm of SGC 7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	给药浓度/(μ mol·L ⁻¹)	Ac-PABA 的量/(μ mol·mg ⁻¹)
空白对照	0	0
阴性对照	0	4.040 0±0.039 9
葎草酮	28	3.710 0±0.018 9**
	56	3.590 0±0.024 6**
	112	3.390 0±0.025 1**
	224	3.240 0±0.019 5**
	448	3.080 0±0.041 7**

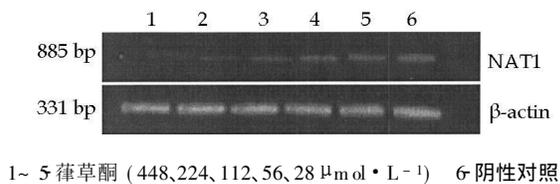
与阴性对照组比较: ** *P* < 0.01

* * *P* < 0.01 vs negative control group

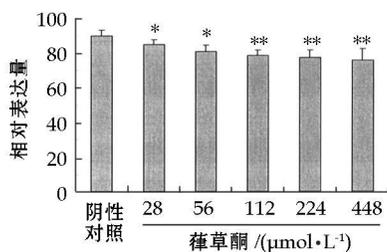
3.5 葎草酮对 SGC-7901 细胞 NAT mRNA 表达的影响: RT-PCR 实验结果表明, 不同剂量的葎草酮作用于 SGC-7901 细胞, 与阴性对照组比较, 葎草酮能够显著降低 SGC-7901 细胞 NAT1 mRNA 的表达, 并且随着葎草酮浓度的增大, NAT1 mRNA 表达的量逐渐降低。结果见图 1。

4 讨论

据调查发现, 肿瘤大约有 90% 是由外源性因素引起的, 而这些外源性因素中 70% 是由化学致癌物引起的^[10,11]。目前发现具有致癌或促癌作用的化学物种类繁多, 以芳香烃、芳香胺硝基化合物和偶氮化合物为主。芳香胺类化合物其本身无致癌性, 但是经过体内药物代谢酶代谢之后能转变为活性很强的终极致癌物。此外, 还包括胺类代谢产物, 如



1~ 5 葎草酮 (448, 224, 112, 56, 28 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 6 阴性对照



与阴性对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

图 1 葎草酮对 SGC 7901 人胃癌细胞 NAT1 mRNA 表达的影响

Fig. 1 Effect of humulon on expression of NAT1 mRNA in SGC 7901 cells by RT-PCR assay

羟胺、酰胺等化合物, 其中一些具有很强的致癌性。

通常参与芳香胺类化合物的代谢活化的酶有 3 种: P450、乙酰基转移酶与硫转移酶。其中 *N*-乙酰基转移酶 (NAT) 是大多数哺乳动物体内参与二相乙酰化反应的代谢酶。NAT 在人体中具有两种亚型 NAT1 和 NAT2^[12], 两者在结构上有一定相似性, 但在组织分布和生物学作用方面相差较大。NAT1 表达于人体大多数组织, 催化对氨基水杨酸和 PABA 等物质的乙酰化代谢。NAT2 又称芳香胺 *N*-乙酰化转移酶, 主要催化芳香胺进行乙酰化转移反应。NAT2 表达于肝脏和肠道, 在体内参与 20 多种胍类化合物及致癌性芳香胺和杂环胺类化合物的生物激活或灭活代谢。目前国内对 NAT 的研究主要集中在临床对肝癌、肺癌多态性的报道, 而关于其实验方面的研究较少。而国外文献有发现通过影响 NAT 的活性来达到抗肿瘤的作用的报道^[13~17]。

由于细胞质中酶蛋白的量甚微, 很难直接测定其蛋白质的量。所以, 酶的活性通常是指酶催化反应的能力, 其衡量的标准是酶促反应速度的大小。酶促的反应速度可在适宜的反应条件下, 用单位时间内底物的消耗或产物的生成量来表示。HPLC 法较比色法与分光光度法更为精确, 数据重现性较好。PABA 是 NAT1 特异性底物, 其经 NAT1 代谢后生成较为稳定的乙酰化 *A_c*-PABA, *A_c*-PABA 在紫外 266 nm 处吸收最大, HPLC 能准确检测出其量。所以本实验采用 HPLC 方法, 以 PABA 为底物, 测定葎草酮对 SGC-7901 细胞 NAT1 活性的

影响。

MTT 法结果表明葎草酮对人胃癌细胞 SGC-7901 具有较好的抑制作用, 进一步对其作用机制进行研究, 葎草酮对 SGC-7901 细胞 NAT1 活性影响实验结果显示: (1) 葎草酮能够显著降低 SGC-7901 完整细胞和细胞质中 *A_c*-PABA 的生成量, 并且随着葎草酮作用剂量增大, *A_c*-PABA 的生成量逐渐减少, 呈现良好的线性关系。(2) 随着作用时间的增加, *A_c*-PABA 的生成量逐渐增加, 但是与其相同时间点的阴性对照组比较, 葎草酮组 *A_c*-PABA 的生成量明显减少。结果表明葎草酮能显著抑制 NAT1 的活性, 并且这种抑制作用和剂量、时间正向成依赖关系。在相同的酶活性下, 酶表达的量也与酶的催化能力密切相关, 酶的量越多, 催化的能力越强, 即酶的活性和酶的量是影响酶催化能力的两个因素。因此, 进一步观察葎草酮对 NAT1 酶的表达是否有影响。

考察葎草酮对 NAT1 mRNA 表达的影响, 发现葎草酮可以明显减少 SGC-7901 细胞中 NAT1 mRNA 的表达量。NAT1 mRNA 的表达量减少, 相应的 NAT1 蛋白表达的量也相应减少, 这可能是葎草酮降低机体将芳香胺类化合物催化为乙酰化芳香胺的另一个机制。

综上所述, 葎草酮通过抑制 NAT1 的活性和减少 NAT1 酶的表达两个方面减少细胞将芳香胺类化合物代谢为乙酰化的芳香胺类致癌物的量, 从而预防癌症的发生, 防止癌症的进一步恶化。

参考文献:

- [1] 李 隼, 崔承彬, 蔡 兵, 等. 啤酒花黄酮的研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(7): 1110-1114
- [2] Lee J C, Kundu J K, Hwang D M, et al. Humulone inhibits phorbol ester-induced COX-2 expression in mouse skin by blocking activation of NF- κ B and AP-1: I κ B kinase and c-Jun N-terminal kinase as respective potential upstream targets [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(7): 1491-1498
- [3] Yamamoto K, Wang J, Yamamoto S, et al. Suppression of cyclooxygenase 2 gene transcription by humulone [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2002, 507: 73-77.
- [4] Shimamura M, Hazato T, Ashino H, et al. Inhibition of angiogenesis by humulone, a bitter acid from beer hop [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(1): 220-224
- [5] Tobe H, Kubota M, Yamaguchi M, et al. Apoptosis to HLE-60 by humulone [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61(6): 1027-1029
- [6] Ji Y B, Gao S Y. Arylamine *N*-acetyltransferases: a new inhibitor of apoptosis in HepG2 cells [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008, 9(9): 701-706.
- [7] 高世勇, 李宇彬. 芳香胺 *N*-乙酰化转移酶的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(1): 1-4
- [8] Walraven J M, Trent J O, Hein D W. Structure-function analyses of single nucleotide polymorphisms in human *N*-acetyl

- transferase 1 [J]. *Drug Metab Rev*, 2008, 40(1): 169-184
- [9] 高世勇, 李宇彬. 龙葵碱对人肝癌 HepG2 细胞 *N*-乙酰基转移酶活性的影响 [J]. *中草药*, 2008, 39(11): 1688-1691.
- [10] Blagosklonny M V, Pardee A B. Exploiting cancer cell cycling for selective protection of normal cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 4301-4305
- [11] Mushtaq A, Payton M, Sim E. The COOH terminus of arylamine *N*-acetyltransferase from *Salmonella typhimurium* controls enzymic activity [J]. *Biol Chem*, 2002, 277(14): 12175-12181.
- [12] Yang C C, Yang J H, Lu H F, et al. *N*-acetyltransferase activity is involved in paclitaxel induced *N*-acetylation of 2-aminofluorene in human bladder cancer cells (T24) [J]. *Anticancer Res*, 2007, 24(3a): 1501-1506
- [13] Lu K H, Wang D Y, Lue K H, et al. PCR and flow cytometric analysis of paclitaxel inhibited arylamine *N*-acetyltransferase activity and gene expression in human osteogenic sarcoma cells (U-2 OS) [J]. *Anticancer Res*, 2007, 24(1): 83-90
- [14] Dairou J, Atmane N, Rodrigues Lima F, et al. Peroxynitrite irreversibly inactivates the human xenobiotic metabolizing enzyme arylamine *N*-acetyltransferase 1 (NAT1) in human breast cancer cells: a cellular and mechanistic study [J]. *J Biol Chem*, 2007, 279(9): 7708-7714
- [15] Chung J G, Lu H F, Yeh C C, et al. Inhibition of *N*-acetyltransferase activity and gene expression in human colon cancer cell lines by diallyl sulfide [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 42(2): 195-202
- [16] Chiu T H, Chen J C, Chung J G. *N*-acetyltransferase is involved in genotoxins-induced *N*-acetylation of 2-aminofluorene and DNA adduct formation in human cervix epidermoid carcinoma cells (Ca Ski) [J]. *In Vivo*, 2006, 18(3): 281-288
- [17] Tomomura M, Furuichi T. Apoptosis-associated tyrosine kinase (AATYK) has differential Ca²⁺-dependent phosphorylation states in response to survival and apoptotic conditions in cerebellar granule cells [J]. *Biol Chem*, 2007, 280(42): 35157-35163

金丝桃苷对离体大鼠腹主动脉的舒张作用及其机制研究

王启海^{1,2}, 陈志武^{1*}

(1. 安徽医科大学 药理学教研室, 安徽 合肥 230032; 2. 安徽中医药高等专科学校 药理学系, 安徽 芜湖 241000)

摘要:目的 研究金丝桃苷对离体大鼠腹主动脉环的舒张作用并探讨其可能的作用机制。方法 在大鼠离体腹主动脉环上, 分别观察累积浓度的金丝桃苷 ($1 \times 10^{-6.5} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L) 对 KCl (30 mmol/L) 和 U46619 (血栓素类似物, 1×10^{-7} mol/L) 预收缩血管环的作用。结果 金丝桃苷能够浓度依赖性舒张由 KCl 和 U46619 预收缩的血管环, 最大舒张率分别为 (52.2 ± 7.2)%、(80.7 ± 4.1)%; 去除血管内皮后, 最大舒张率分别降为 (15.4 ± 1.2)%、(21.6 ± 1.2)%, 与内皮完整组比较有显著差异 ($P < 0.01$)。在 30 mmol/L KCl 和 1×10^{-7} mol/L U46619 预收缩的内皮完整血管环, 用一氧化氮 (NO) 合酶抑制剂 (*L*-NAME, 3×10^{-4} mol/L) 预温育后, 金丝桃苷的最大舒张率分别降为 (23.0 ± 3.0)%、(40.3 ± 3.6)%, 与未加 *L*-NAME 组比较有显著差异 ($P < 0.01$); 用环氧酶抑制剂吲哚美辛 (1×10^{-5} mol/L) 预温育对金丝桃苷的舒张血管作用没有明显的影响; 在 U46619 预收缩的血管环, 合用 *L*-NAME 和吲哚美辛不能完全阻断金丝桃苷引起的血管舒张, 最大舒张率为 (36.6 ± 1.9)%, 与去内皮组比较差异显著 ($P < 0.01$)。结论 金丝桃苷具有内皮依赖性和较弱的非内皮依赖性血管舒张作用, 其内皮依赖性血管舒张可能涉及到内皮 NO 和内皮依赖性超极化因子 (endothelium derived hyperpolarizing factor, EDHF) 的释放。
关键词: 金丝桃苷; 血管舒张; 内皮依赖性超极化因子 (EDHF)

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)05-0766-05

金丝桃苷属于黄酮醇苷类化合物, 化学名称为槲皮素-3-*O*-β-*D*-吡喃半乳糖苷, 广泛存在于锦葵科、藤黄科、豆科、杜鹃花科等多种植物中^[1], 是贯叶连翘、红旱连、黄蜀葵、菟丝子、山楂等植物药中的有效成分^[2]。前期研究表明金丝桃苷对神经细胞^[3]和心肌细胞^[4,5]中钙离子内流有抑制作用, 对心脑血管缺血再灌注性损伤具有明显的保护作用^[4,6]。并且研究还表明金丝桃苷可使狗血压下降, 可抑制去甲肾

上腺素引起的离体家兔主动脉条的收缩^[7], 表明金丝桃苷对家兔血管有舒张作用, 但其血管舒张机制尚未见报道。本研究在离体大鼠腹主动脉血管环上, 观察金丝桃苷的舒张作用, 并探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂: 金丝桃苷由安徽医学研究所提供, 黄色粉末, 质量分数 ≥96.0%, 使用前用二甲基

①收稿日期: 2009-10-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30840104); 教育部博士点基金资助项目 (2007036605)

作者简介: 王启海 (1980-), 男, 安徽霍邱人, 药理学硕士研究生, 研究方向为心脑血管药理学。

Tel: 15156326268 E-mail: wangqihai_1982@yahoo.com.cn

* 通讯作者 陈志武 Tel: 13515669237 E-mail: wzcxiong@mail.hf.ah.cn