

4 讨论

4.1 用 LC/MSⁿ 方法分析鉴定咖啡酸在大鼠体内代谢产物,并推测其代谢规律已有文献报道^[6,7,10],但根据 LC/MSⁿ 质谱数据只能推测代谢产物的结构,一般要通过与化学合成或生物转化等方法得到的纯物质进行色谱及质谱特征对照确定其结构,或者通过化学分离手段获得代谢产物,并通过光谱学方法确证其结构。本研究从尿样中分离并通过 NMR 法确证了两个葡萄糖醛酸结合物的结构,与文献推测的结果是一致的^[6,7]。

4.2 实验过程中发现代谢物 I ~ IV 室温放置容易变化,须放至冰箱中冷冻保存,否则降解为原形药咖啡酸。

4.3 进行大孔树脂处理时,尿样调节 pH 3 不会对尿样中代谢产物产生影响。

4.4 代谢物 I 和 II 为国内首次分离得到的化合物,国外作者^[11]以咖啡酸甲酯为底物合成了这两个代谢物。

参考文献:

[1] Toshiya M, Kazuki Y, Jun A, *et al.* Antioxidation mechanism studies of caffeic acid: identification of antioxidation products of methyl caffeate from lipid oxidation [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(14): 5947-5952

- [2] Mori H, Iwahashi H. Antioxidant activity of caffeic acid through a novel mechanism under UVA irradiation [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2009, 45(1): 49-55
- [3] Wang G F, Shi L P, Ren Y D, *et al.* Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid *in vivo* and *in vitro* [J]. *Antivir Res*, 2009, 83(2): 186-190
- [4] 王峰,刘敏,杨连春,等.咖啡酸阿魏酸对高血压大鼠的降压作用[J].解放军药学报,1999,15(5):1-4
- [5] Jung U J, Lee M K, Park Y B, *et al.* Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318(2): 476-483
- [6] Zhang Z C, Xu M, Sun S F, *et al.* Metabolic analysis of four phenolic acids in rat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 871: 7-14
- [7] Zhou M J, Zhu Y X, Corredor P. Determination of the phase I and II metabolites of caffeic and chlorogenic acids in rats by LC-MS/MS [J]. *Asian J Pharmacody Pharmacok*, 2008, 8(1): 51-62
- [8] Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, *et al.* Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(11): 5496-5500
- [9] Cui L, Qiu F, Yao X S. Isolation and identification of seven glucuronide conjugates of andrographolide in human urine [J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33(4): 555-562
- [10] 苏美英,周婷婷,周茂金. LC/MSⁿ 鉴定咖啡酸在大鼠体内的代谢产物 [J]. 中国现代应用药理学, 2009, 26(6): 501-505
- [11] Timo S, Roman L, Daniela K, *et al.* Absorption of *N*-phenylpropenyl-L-amino acids in healthy humans by oral administration of cocoa [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52: 1201-1214

土槿乙酸联合 9-顺式维甲酸促进白血病细胞凋亡的机制研究

郭 赟¹, 徐瑞成², 何 滔³

(1 武警医学院附属医院 内分泌血液科, 天津 300162; 2 武警医学院 科研部, 天津 300162;

3 武警医学院附属医院 病理科, 天津 300162)

摘要:目的 观察过氧化物酶体激活物活化受体 γ (PPAR γ) 的配体土槿乙酸 (PLAB) 联合维甲类 X 受体 α (RXR α) 的配体 9-顺式维甲酸 (9-*cis* RA) 促进白血病细胞凋亡的作用, 探讨其作用机制。方法 应用透射电子显微镜、琼脂糖凝胶电泳分析 HL-60 细胞凋亡, RT-PCR 检测 HL-60 细胞 Cyclin D1 和 CDK4 mRNA 表达。结果 HL-60 细胞经配体联合作用后, 电镜下可见明显细胞凋亡的形态学变化, 琼脂糖凝胶电泳出现 DNA Ladder, Cyclin D1 及 CDK4 mRNA 的表达均降低, 且联合用药组下降程度明显较单独作用组大 ($P < 0.05$)。结论 PLAB 联合 9-*cis* RA 抑制 HL-60 细胞生长, 其机制与凋亡诱导效应相关。

关键词: 土槿乙酸; 9-顺式维甲酸; 白血病; 细胞凋亡; Cyclin D1; CDK4

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)06-0952-04

土槿乙酸 (pseudolaric acid B, PLAB) 是从土槿皮中分离出的主要成分之一, 是过氧化物酶体激活物活化受体 γ (peroxisome proliferators activated

receptor gamma, PPAR γ) 激动剂, 可介导肿瘤细胞生长抑制和凋亡^[1-3]。9-顺式维甲酸 (9-*cis* RA) 是改变多烯侧链结构合成的第 3 代维甲酸, 是维甲

①收稿日期: 2009-10-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30901985)

作者简介: 郭 赟 (1982-), 女, 硕士, 医师, 主要从事恶性血液病的防治研究。E-mail: 1982guoyun@163.com

*通讯作者 徐瑞成 E-mail: xu_rc@sohu.com

类 X 受体 α (retinoid X receptor α , RXR α) 的配体,可诱导多种肿瘤细胞分化^[4-8]。本实验在前期研究^[9]的基础上,探讨 PLAB 联合 9-*cis* RA 促进白血病 HL-60 细胞凋亡及相关的作用机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂:PLAB (质量分数>98%)为武警医学院生药教研室陈虹教授提供,用无水乙醇溶解成保存液,浓度为 0.01 mol/L, -20℃ 避光保存,实验时用无血清培养基稀释(乙醇终体积分数控制在<0.1%);9-*cis* RA、琼脂糖、溴化乙锭(EB)、Proteinase K、RNaseA、DEPC 水为 Sigma 公司产品;RPMI 1640 培养基为 Gibco 公司产品;Trizol 为美国 Promega 公司产品。引物由大连宝生物公司合成,RT-PCR 试剂盒为大连宝生物公司产品。

1.2 细胞培养:HL-60 细胞系购自中国医学科学院血液学研究所,自行传代培养,常规培养于 RPMI 1640 培养基,补充 10% 胎牛血清,置于 37℃、5% CO₂混合气体的孵箱中培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 透射电子显微镜观察细胞超微结构的变化:将 HL-60 细胞常规传代、分为实验组及对照组。0.1 μ mol/L PLAB 联合 10 μ mol/L 9-*cis* RA 作用 96 h 后(实验组)常规收集细胞 2×10^6 个,1 000 $\times g$ 离心 10 min,弃上清,立即小心地加入 PBS 配制的 2.5% 戊二醛 1 mL 固定细胞团,用滴管轻吹,使细胞团浮起,前固定 30 min 后,1% 锇酸后固定 2 h,乙醇逐级脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,铀铅染色。在透射电镜下观察并摄影记录。对照组细胞不加药物处理,其余操作同实验组。

1.4 PLAB 联合 9-*cis* RA 对 HL-60 细胞染色体 DNA 断裂的影响:取对数生长期细胞,按上述方法传代分组。药物作用 96 h 后分别收集 2×10^6 个细胞,将待测细胞用 PBS 洗一次后移入 1.5 mL 离心管中,再用 PBS 洗涤一次,离心去除上清。向细胞沉淀中加入细胞裂解液 50 μ L 悬浮细胞,混匀后于 37℃ 水浴保温 24 h,细胞充分裂解。在台式高速离心机中,以室温 12 000 $\times g$ 离心 10 min,去除细胞碎片,吸上清至另一离心管中。在上清中加 1/10 体积的醋酸钠,混匀,加入 2.5 倍体积的冷无水乙醇,混匀, -20℃ 沉淀 DNA 4 h 以上。4℃ 12 000 $\times g$ 离心 10 min,收集沉淀。TE 缓冲液 20 μ L 悬浮 DNA,加 RNase A 5 μ L (终质量浓度 0.6 mg/mL),37℃ 水浴保温 1 h,灭活 RNA。吸取溶解的 DNA 溶液 40 μ L,加入样品缓冲液 5 μ L,混匀,加

入 2% 琼脂糖凝胶样品孔中,室温恒流 75 mA,于 0.5 $\times$ TBE 电泳缓冲液中电泳,50 V 电泳 4 h,紫外灯下观察并于凝胶自动成像系统摄影记录实验结果。

1.5 RT-PCR 检测 Cyclin D1 和 CDK4 mRNA 表达:RNA 提取和逆转录,用 Trizol 法提取细胞总 RNA。以 1×10^4 /mL 接种于培养瓶中,设溶剂对照组和给药组(终浓度分别为 9-*cis* RA 10 μ mol/L, PLAB 0.1 μ mol/L, 9-*cis* RA 10 μ mol/L+PLAB 0.1 μ mol/L),于加药 96 h 后分别收集细胞,根据 RNA 在 260 nm 和 280 nm 的吸光度比值(≥ 2.0)鉴定 RNA 纯度和完整性。取 1 μ g 总 RNA 为模板逆转录为 cDNA。

应用 Omiga 2.0 设计 Cyclin D1、CDK4 和 GAPDH 引物序列。CDK4 5'-CATGTAGACCAGGACCTAAGG-3', 5'-AACTGGCGCATCAGATCCTAG-3', 片段长度 206 bp; Cyclin D1 5'-CTGTCGCTGGAGCCCGTGAAAAAG-3', 5'-GAAGTTGTTGGG-GCTCCTCAGGTT-3', 片段长度 405 bp; GAPDH 5'-CTTTGGTATCGTGGAA-GGAC-3', 5'-GAAATGAGCTTGACAAAGTG-3', 片段长度 434 bp。按 RT-PCR 试剂盒操作说明,设循环条件:预变性 94℃、5 min,变性 94℃、1 min,退火 55℃、1 min,延伸 72℃、1 min,35 个循环后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,结果用凝胶自动成像 2000 系统扫描,并以内参对照 GAPDH 校正进行相对量分析,以 3 次实验结果的均值进行统计学分析。

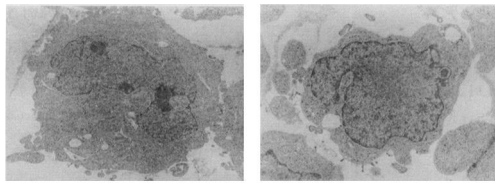
1.6 统计学处理:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的比较用 *t* 检验,用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学分析处理。

2 结果

2.1 透射电子显微镜观察细胞超微结构的变化:对照组 HL-60 细胞细胞核大,呈异型核,多位于细胞一侧。核/质比大,核基质电子密度均匀一致,线粒体多分布于核周区,高尔基体和溶酶体较少,内质网不甚发达,核糖体遍布整个胞浆。0.1 μ mol/L PLAB 联合 10 μ mol/L 9-*cis* RA 组胞浆电子密度增高,基质密度增加,细胞体积缩小,胞膜完整,细胞浆浓缩,核固缩,染色质致密聚集于细胞核核膜,呈境界分明的环形或新月形小体。见图 1。

2.2 PLAB 联合 9-*cis* RA 对 LH-60 细胞染色体 DNA 断裂的影响:0.1 μ mol/L PLAB 联合 10 μ mol/L 9-*cis* RA 作用 96 h,HL-60 细胞 DNA 广泛断裂,形成大小不一的 DNA 片段,甚至单聚或寡聚核小体,从而在琼脂糖凝胶电泳上呈现规则的、间

隔 180~200 bp 的阶梯状条带 (DNA Ladder)。而对照组只可见基因组 DNA。见图 2。



对照组
0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PLAB 联合
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 9-*cis* RA 组

图 1 透射电子显微镜观察 PLAB 联合 9-*cis* RA 作用 96 h HL-60 细胞超微结构的变化

Fig. 1 Microstructure changes of HL-60 cells treated by combining PLAB and 9-*cis* RA for 96 h by transmission electron microscopy detection

实验组 对照组 DNA Marker



图 2 PLAB 联合 9-*cis* RA 对 HL-60 细胞染色体 DNA 断裂的影响

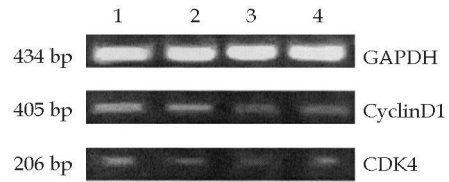
Fig. 2 Confirmation of DNA fragmentation in HL-60 cells treated by combining PLAB and 9-*cis* RA

2.3 PLAB 和 9-*cis* RA 对 HL-60 细胞 Cyclin D1 和 CDK4 mRNA 表达的影响: HL-60 细胞有 Cyclin D1 及 CDK4 mRNA 表达, 药物作用 96 h 后, 其表达强度下调, 联合用药组与对照组、单独使用 9-*cis* RA 组、单独使用 PLAB 组比较, Cyclin D1 及 CDK4 在 mRNA 水平表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

3 讨论

本研究结合多种细胞检测方法, 均证明 PLAB 联合 9-*cis* RA 可促进 HL-60 细胞凋亡, 且联合用药作用远大于单独用药, 这也再次证明本课题组的前期实验的科学性^[10, 11]。

细胞增殖是通过细胞周期来实现的, 准确、有序地出入各个周期时相成为细胞正常生长、代谢的关键; 细胞周期的不同时相存在着关键的调控点, 其中



1-对照组 2-10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 9-*cis* RA 组
3-0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PLAB 联合 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 9-*cis* RA 组
4-0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PLAB 组
1-control group 2-10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 9-*cis* RA group
3-0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PLAB combined 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 9-*cis* RA group
4-0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PLAB group

图 3 9-*cis* RA 和 PLAB 对 HL-60 细胞 Cyclin D1 和 CDK4 mRNA 表达的影响

Fig. 3 Effects of 9-*cis* RA and PLAB on Cyclin D1 and CDK4 mRNA expression in HL-60 cells

以 $G_1 \rightarrow S$ 期调控点最为重要, Cyclin D1 和 CDK4 被认为在细胞 $G_1 \rightarrow S$ 期的转换过程中发挥重要作用。细胞生长和分化的调节与细胞周期中的诸多因素密切相关, 随着对细胞周期调控认识的不断深入, 出现了“癌症可能是一类细胞周期疾病”的观点^[12]。研究显示, 对细胞周期调控的核心机制是 CDKs 的时相性激活, 它主要依赖于 Cyclins 的细胞周期特异性或时相性表达、累积与分解。这一系统中的调节基因及蛋白的改变和肿瘤发生、发展、治疗及预后的关系是目前国内外肿瘤研究的热点。本课题组前期研究发现, 9-*cis* RA 可促使胃癌细胞株 MGC80-3 细胞凋亡且细胞周期调控因子 Cyclin D1 和 CDK4 表达明显下降^[8]。本研究显示, HL-60 细胞 Cyclin D1 和 CDK4 有较高水平表达, PLAB、9-*cis* RA 作用 96 h, 发现 Cyclin D1 和 CDK4 表达强度下调, 其中联合用药组下调程度大于单独用药组, 这与本课题组前期研究中发现联合用药组细胞抑制率远大于单独用药组^[9]的结论相互呼应。本研究对 PLAB、9-*cis* RA 联合用药抑制 HL-60 生长的作用机制进行了进一步的研究, 为今后的实验和临床研究提供了初步依据。

参考文献:

- [1] Yang S P, Wu Y, Yue J M. Five new diterpenoids from *Pseudolaric Kaempferi* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65 (7): 1041
- [2] 徐瑞成, 刘燕青, 买霞, 等. 土槿乙酸诱导 HL-60 细胞凋亡及其与半胱氨酸蛋白酶 3 活化的关系 [J]. *实用癌症杂志*, 2004, 19(4): 503-505
- [3] 姜孟臣, 陈虹, 张敏, 等. 土槿乙酸对人黑素瘤细胞增殖抑制作用研究 [J]. *中草药*, 2003, 34(6): 532-534
- [4] Choi E J, Whang Y M, Kim S J. Combinational treatment with retinoic acid derivatives in non-small cell lung carcinoma *in vitro* [J]. *Korean Med Sci*, 2007, 22(Suppl): S52-S60

- [5] Brodeur H, Parisot M, Chagnon S. Isomer-specific retinoic acid biosynthesis in HeLa cells expressing recombinant class I aldehyde dehydrogenases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1770(11): 1548-1556
- [6] Hansen N J, Wylie R C, Phipps S M. The low-toxicity 9-*cis* UAB30 novel retinoid down-regulates the DNA methyltransferases and has anti-telomerase activity in human breast cancer cells [J]. *Oncol*, 2007, 30(3): 641-650
- [7] Singh R R, Gunraj A E, Vadlamudi R K. 9-*cis* retinoic acid up-regulates expression of transcriptional coregulator PELP1, a novel coactivator of the retinoid X receptor alpha pathway [J]. *Biol Chem*, 2006, 281(22): 15394-15404
- [8] 徐瑞成, 周艳红, 呼文亮. 9-顺式维甲酸诱导胃癌 MGC80-3 细胞周期阻滞和凋亡的作用机制 [J]. *癌症*, 2006, 25(12): 1483-1487
- [9] 郭 赟, 徐瑞成, 何 滔. 土槿乙酸增强 9-顺式维甲酸对白血病细胞生长的抑制作用 [J]. *肿瘤防治研究*, 2009, 36(9): 726-729
- [10] 孟爱国, 徐瑞成, 呼文亮. 比格列酮对胃癌细胞生长的影响及机制 [J]. *肿瘤防治研究*, 2006, 33(5): 334-336
- [11] 徐瑞成, 孟爱国, 呼文亮. PPAR 和 RXR 表达上调增强了对肿瘤生长的抑制作用 [J]. *基础医学与临床*, 2007, 27(3): 255-258
- [12] Garber K. Beyond the Nobel Prize: cell cycle research offers new view on cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(23): 1766-1768

黄芪苷 IV 通过 PI3K/Akt 信号通路抗 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤

张 琦, 彭 洋, 宋君秋, 吴艳娜, 刘艳霞

(天津医科大学基础医学院 药理学教研室, 天津 300070)

摘 要: 目的 研究黄芪苷 IV 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤的保护作用及其作用机制。方法 建立 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤模型, MTT 法检测细胞存活率, DNA 抽提及琼脂糖凝胶电泳、Hoechst 33258 染色、caspase-3 活性检测细胞凋亡, Western blotting 检测 t-Akt 和 p-Akt 蛋白的表达。结果 与 H₂O₂ 组比较, 10、20 mg/L 的黄芪苷 IV 均显著提高细胞存活率, 降低 caspase-3 活性, 减轻细胞凋亡; 且均显著上调 p-Akt 蛋白的表达; PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 部分阻断 10、20 mg/L 黄芪苷 IV 的保护作用。结论 黄芪苷 IV 部分通过 PI3K/Akt 通路发挥对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤的保护作用。

关键词: 黄芪苷 IV; H₂O₂; H9c2; 细胞凋亡; PI3K/Akt; LY294002

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)06-0955-05

氧化应激是机体在遭受各种有害刺激时, 体内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生过多, 氧化程度超出抗氧化物的清除能力, 氧化系统和抗氧化系统失衡而导致组织损伤的过程。近年来大量研究表明, 氧化应激与多种心血管疾病如高血压、动脉粥样硬化、心肌肥大、心力衰竭等密切相关^[1]。黄芪苷 IV (Astragaloside IV, AST) 是黄芪总苷中的主要有效成分, 研究发现 AST 可以有效改善心功能, 对心肌受抑制大鼠的心肌收缩及舒张功能都有改善作用^[2-4], 具有明显的抗氧化损伤作用^[5]。有研究发现黄芪提取物能够促进缺氧/复氧损伤的神经元细胞磷酸化 Akt 蛋白表达增加^[6]。现已证实, PI3K/Akt 信号通路在心肌保护作用中具有重要作用^[7], 活化的 PI3K 可激活下游信号蛋白 Akt, 进而

发挥抗凋亡作用, 促进 DNA 损伤修复。本研究以 H₂O₂ 诱导 H9c2 细胞氧化损伤为模型, 在研究 AST 细胞保护作用的同时探讨其保护作用与 PI3K/Akt 信号通路的关系。

1 材料

1.1 细胞株: H9c2 细胞, 购于中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。

1.2 药物与试剂: 黄芪苷 IV (AST, 上海医科大学天然药物化学教研室提供, 质量分数 > 98 %); 高糖 DMEM (Gibco 公司); 胎牛血清 (Hyclone 公司); 30% H₂O₂、DMSO (分析纯); MTT (Amresco 公司); PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 (Sigma 公司); 考马斯亮蓝蛋白质定量试剂盒 (南京建成生物工程研究所); DNA Ladder 抽提试剂盒 (碧云天生物技

①收稿日期: 2009-11-23

作者简介: 张 琦 (1985—), 女, 天津人, 硕士生, 研究方向: 心血管药理学及分子药理学。

Tel: (022) 23542523 E-mail: zhangqi8501@126.com

*通讯作者 刘艳霞 Tel: (022) 23542523 E-mail: liu_yanxia@yahoo.com