

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2008.05.009

## 马鞭草 C 部位单体 4'-甲醚-黄芩素对人绒毛膜癌细胞增殖的抑制作用

冯 播, 徐昌芬\* (南京医科大学 江苏省生殖医学重点实验室, 南京 210029)

[摘要] 目的: 探讨马鞭草有效成分所提取的单体 4'-甲醚-黄芩素(4'-methylether-scutellarein, 4-MS) 对人绒毛膜癌 JAR 细胞的增殖抑制作用及其相关机制。方法: JAR 细胞传代后加入不同浓度 4-MS 作用一定时间, 应用 MTT 法检测对细胞增殖的抑制作用, 流式细胞术测定细胞凋亡率及细胞周期变化, AO/EB 双染法区分早、晚期凋亡细胞和坏死细胞, RT-PCR 技术分析 4-MS 对人绒毛膜癌 JAR 细胞凋亡相关基因 *Caspase 3*、*p38 MAPK* 及 *Survivin* 表达的影响, 并进一步用 Western blotting 测定 *Caspase 3*、*p38 MAPK* 及 *Survivin* 在用药前后蛋白水平的表达差异。结果: 不同质量浓度(10、20、40 mg/L)的 4-MS 对 JAR 细胞均有增殖抑制作用, 并随药物浓度和作用时间的增加而不断增强 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 流式细胞术显示, 随着药物浓度的增加细胞凋亡率亦逐渐升高,  $G_2/M$  期细胞所占比例增大 ( $P < 0.05$ ); AO/EB 双染后发现, 随着 4-MS 剂量的增加, 晚期凋亡细胞逐渐增多; 20 和 40 mg/L 的 4-MS 作用 48 h 后, JAR 细胞中 *p38 MAPK* 及 *Caspase 3* mRNA 表达下降, *Survivin* mRNA 表达上升, 与对照组相比均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); Western blotting 证实, 20 mg/L 和 40 mg/L 4-MS 作用 48 h 后 *Survivin* 蛋白表达量显著下降, *p38* 磷酸化水平升高, *Caspase 3* 被明显激活。结论: 4-MS 能抑制人绒毛膜癌 JAR 细胞的增殖并诱导凋亡, 可能与其阻滞细胞生长于  $G_2/M$  期、抑制 *Survivin* 抗凋亡活性, 直接激活 *p38 MAPK* 信号通路和 *Caspase 3* 活化有关。

[关键词] 4'-甲醚-黄芩素(4-MS); 人绒毛膜癌 JAR 细胞; *Caspase 3*; *Survivin*; *p38 MAPK* 信号通路

[中图分类号] R737.33; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)05-0444-07

## Inhibitory effect of 4'-methylether-scutellarein on human choriocarcinoma JAR cells and the possible mechanism

FENG Bo, XU Chang-fen\* (Key Laboratory of Reproductive Medicine of Jiangsu Province, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of 4'-methylether-scutellarein (4-MS), an extract from *Verbena officinalis*, on human choriocarcinoma JAR cell line and the possible mechanism. **Methods:** JAR cells were exposed to 4'-methylether-scutellarein of different concentrations for 48 h. MTT assay was used to examine the anti-proliferative effect of 4'-methylether-scutellarein. Flow cytometry was used to investigate the apoptosis and the changes of cell cycle. AO/EB double staining was applied to discriminate the apoptotic cells from dead ones. The changes of *Survivin*, *p38-MAPK* and *Caspase 3* mRNA expressions were detected by RT-PCR in JAR cells treated with 4-MS. Furthermore, Western blotting assay was used to determine *Survivin* protein expression, phosphorylation level of *p38* and *Caspase 3* in JAR cells before and after 4-MS treatment. **Results:** 4-MS inhibited the proliferation of JAR cells in a dose- and time-dependent manner ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). 4-MS treatment also induced apoptosis in JAR cells in a concentration-dependent manner, and percentage of cell cycle progression in  $G_2/M$  phase increased dramatically compared with the control group ( $P < 0.05$ ). The result of AO/EB double staining showed that there were more viable apoptotic cells in 4-MS treated groups than in the control group and the number of non-viable apoptotic cells and dead cells increased with dose. Phosphorylated *p38* and *Caspase 3* expressions in 4-MS treated cells were increased at both mRNA and protein levels according to RT-PCR and Western blotting results, while *Survivin* expression was down-regulated; there were significant differences between the 4-MS group and the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** 4-MS can inhibit proliferation of JAR cells and induce their apoptosis, which might be related to cell arrest at  $G_2/M$ , down-regulation of *Survivin* activity, and direct activation of *p38 MAPK* pathway and *Caspase 3*.

[基金项目] 江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2003104)。Supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province(No. BK2003104)

[作者简介] 冯 播(1983-), 女, 陕西省子长县人, 硕士研究生, 主要从事女性生殖肿瘤的研究

\* Corresponding author. E-mail: cfku@njmu.edu.cn

[ **Key words** ] 4'-methylether-scutellarein ( 4-MS ); Choriocarcinoma JAR cell line; Caspase 3; Survivin; p38 MAPK signal pathway

[ Chin J Cancer Biother, 2008, 15( 5 ): 444-450 ]

马鞭草( *Verbena officinalis* )系马鞭草科, 马鞭草属植物, 为一味传统中药。据《本草纲目》记载, 其苗和叶可用于清热解毒、利尿消肿, 中国药典则将其作为清热、凉血、破血和消肿的良药。近年来, 发现马鞭草还具有镇咳、止痛、抗菌等作用。本实验室于 1992 年开始对马鞭草的抗滋养细胞等药理作用进行了研究, 实验表明: 一定浓度的马鞭草醇提取液对绒毛膜癌 JAR 细胞具有明显的抑制作用, 且该作用随药物浓度和作用时间的增加而增强<sup>[1]</sup>。4'-甲醚-黄芩素( 4'-methylether-scutellarein, 4-MS )为马鞭草有效部位中提取出的单体, 属黄酮类化合物, 能抑制人绒毛膜癌 JAR 细胞的增殖、诱导凋亡, 其机制与提高细胞内  $Ca^{2+}$  浓度、降低 hTERT mRNA 的表达有关<sup>[2]</sup>; 4'-甲醚-黄芩素也可通过降低耐药基因表达、促进细胞凋亡, 对绒毛膜癌耐药细胞产生显著的耐药逆转作用<sup>[3]</sup>。本实验进一步探讨了 4-MS 对 JAR 细胞的生长抑制作用及其可能机制, 为抗肿瘤药物的开发提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要实验材料

人绒毛膜癌 JAR 细胞株购自中科院上海细胞生物学研究所, 4-MS 由江苏省中医药研究所提取分离。RPMI 1640 培养液为美国 GIBCO 公司产品, 小牛血清为杭州四季青生物工程公司产品, MTT 为美国 AMRESCO 公司产品, 胰蛋白酶为美国 SIGMA 公司产品。活细胞/凋亡细胞/坏死细胞鉴别试剂盒( AO/EB 法)为南京凯基科技发展有限公司产品。Trizol 试剂、cDNA 合成试剂盒、PCR 扩增试剂盒及 DNA Marker DL2000 均为日本 TAKARA 公司产品。兔抗人 Survivin 单克隆抗体、鼠抗人 p-p38 单克隆抗体为美国 BioLegend 公司产品, 鼠抗人 Caspase 3 单克隆抗体为美国 NEOMARKERS 公司产品。免疫印迹 PVDF 膜为美国 Bio-Rad 公司产品。细胞裂解蛋白酶抑制剂混合液为瑞士 ROCHE 公司产品。化学发光试剂盒( ECL-Plus )为日本 AMER-SHAM 公司产品。

HERA cell 150 CO<sub>2</sub> 培养箱为德国 HERAEUS 公司产品, 倒置相差显微镜及 Olympus BX-51 荧光显微镜为日本 OLYMPUS 公司产品, SunRise 酶标仪为奥地利 TECAN 公司产品, FACStar 流式细胞仪为

美国 Becton-Dickinson 公司产品, PCR 基因扩增仪为日本 Bioer 公司产品, Gel Doc 凝胶图像分析仪为美国 Bio-Rad 公司产品, 高速低温离心机为日本三洋公司产品。

### 1.2 4'-甲醚-黄芩素( 4-MS )的提取

马鞭草醇提取液按现代植化分离方法, 根据成分极性大小, 利用系统溶剂法萃取, 得出 4 个不同部位, 从中筛出对 JAR 细胞有明显抑制作用的活性部位, 命名为 C 部位。C 部位经反复硅胶柱层析, 得出黄色针晶化合物, 鉴定为黄酮类化合物。经紫外光谱、核磁共振氢谱及碳谱, 并进行文献检索, 数据符合, 确定为 4-MS, 纯度可达 99%。本化合物由江苏省中医药研究所提取。

### 1.3 细胞培养

JAR 细胞置于 1640 培养液、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养, 细胞呈单层贴壁生长, 0.25% 的胰蛋白酶消化, 每 2 ~ 3 d 传代 1 次, 实验时选用对数生长期细胞。

### 1.4 生长抑制试验检测 4-MS 对 JAR 细胞增殖的抑制

选取对数生长期 JAR 细胞, 调整细胞密度至  $1 \times 10^4$ /ml 接种 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ l; 培养 24 h 后吸弃上清, 实验分不加药对照组和 3 个药物浓度梯度组( 4-MS 终质量浓度分别为 10、20、40 mg/L ), 每组 3 复孔, 分别培养 24、48 和 72 h; 在培养终止前 4 h, 每孔加入 5 mg/ml MTT 20  $\mu$ l, 继续培养 4 h 后, 吸除原有培养液, 每孔加 DMSO 150  $\mu$ l, 振荡溶解紫色甲瓞, 选择检测波长 570 nm, 在酶标仪上测定光密度(  $D_{570}$  )值。实验重复 3 次, 计算 4-MS 各浓度在不同时间段对 JAR 细胞的增殖抑制指数( IR )。IR ( % ) = [ ( 对照组  $D$  值 - 加药组  $D$  值 ) / 对照组  $D$  值 ]  $\times 100\%$ 。

### 1.5 流式细胞术测定细胞周期分布及凋亡率

选取对数生长期的 JAR 细胞, 按  $1 \times 10^4$ /ml 细胞密度接种于 50 ml 培养瓶内, 待细胞生长至 60% 以上, 更换含 4-MS 的培养液, 药物终质量浓度分别为 10、20、40 mg/L; 继续培养 48 h, 调整细胞密度为  $1 \times 10^6$ /ml, 各组细胞制成悬液,  $1\ 000 \times g$  离心 5 min, 冷却 PBS 冲洗,  $1\ 000 \times g$  离心 5 min, 弃上清加入 2 ml 75% 的酒精固定, 流式细胞术测定细胞周期分布及凋亡率。

### 1.6 AO/EB 染色荧光显微镜观察凋亡细胞的形态改变

实验分组及细胞处理同流式细胞术, 收集细胞后, PBS 洗涤 1 次, 调整细胞密度为  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ; 吸出 25  $\mu\text{l}$  细胞悬液于载玻片上, 加入 1  $\mu\text{l}$  混合荧光染色液(100 g/ml AO 和 100 g/ml EB), 混匀, 压上盖玻片, 用 543 nm 的激发波长, 荧光显微镜下观察凋亡细胞形态。

### 1.7 RT-PCR 检测 4-MS 作用前后 JAR 细胞 p38 MAPK、Survivin 及 Caspase 3 mRNA 的表达

总 RNA 提取与合成: JAR 细胞接种 24 h 后, 加入 4-MS 使其终质量浓度分别为 10、20、40 mg/L, 另设不加药对照组, 继续培养 48 h, 按一步法分别提取 4 组细胞总 RNA; 经琼脂糖凝胶电泳、染色、紫外灯下观察, 紫外分光光度计测定  $D_{260}$ 、 $D_{280}$ , 计算总 RNA 浓度。逆转录酶 MMLV 催化合成的 cDNA 加入灭菌超纯水,  $-20^\circ\text{C}$  保存。

引物设计与合成: 基因序列检索自 Genbank, 用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计  $\beta$ -actin、Caspase 3、Survivin 及 p38 MAPK 引物, 使用确认其特异性。 $\beta$ -actin: sense- 5' GGCATCCTCACCT-GAAGTA 3', antisense- 5' GGGGTGTTGAAGTCT-CAAA 3', 预扩增片段 203 bp; Caspase 3: sense- 5' GCTATTGTGAGGCGGTTGT 3', antisense-5' TGTTTCCCTGAGGTTTGC 3', 预扩增片段 270 bp; Survivin: sense-5' TTGGCAGGTGCCTGTTGAAT 3', antisense-5' AGCCAGTCCCCACAGCAT 3', 预扩增片段 467 bp; p38 MAPK: sense-5' TGCCGAGCCAGTCCAAAA 3', antisense-5' TGCCCGAGCGTTACCAGA 3', 预扩增片段 463 bp。

反应: 扩增反应体系 ddH<sub>2</sub>O 19.1  $\mu\text{l}$ 、10  $\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu\text{l}$ 、dNTP Mixture 0.7  $\mu\text{l}$ 、Taq DNA Polymerase 0.2  $\mu\text{l}$ 、上下游引物(10 pmol/l)各 0.75  $\mu\text{l}$  及模板 cDNA 1  $\mu\text{l}$ , 体系共 25  $\mu\text{l}$ 。各目的基因扩增条件:  $\beta$ -actin 预变性  $95^\circ\text{C} \times 5 \text{ min}$ , 变性  $94^\circ\text{C} \times 30 \text{ s}$ , 退火  $59^\circ\text{C} \times 30 \text{ s}$ , 延伸  $72^\circ\text{C} \times 40 \text{ s}$ , 终末延伸  $72^\circ\text{C} \times 7 \text{ min}$ , 共 35 个循环; Caspase 3 预变性  $95^\circ\text{C} \times 5 \text{ min}$ , 变性  $94^\circ\text{C} \times 30 \text{ s}$ , 退火  $48^\circ\text{C} \times 30 \text{ s}$ , 延伸  $72^\circ\text{C} \times 40 \text{ s}$ , 终末延伸  $72^\circ\text{C} \times 7 \text{ min}$ , 共 35 个循环; p38 MAPK 预变性  $95^\circ\text{C} \times 5 \text{ min}$ , 变性  $94^\circ\text{C} \times 30 \text{ s}$ , 退火  $60^\circ\text{C} \times 30 \text{ s}$ , 延伸  $72^\circ\text{C} \times 40 \text{ s}$ , 终末延伸  $72^\circ\text{C} \times 7 \text{ min}$ , 共 32 个循环; Survivin 预变性  $95^\circ\text{C} \times 5 \text{ min}$ , 变性  $94^\circ\text{C} \times 3 \text{ min}$ , 退火  $57.8^\circ\text{C} \times 30 \text{ s}$ , 延伸  $72^\circ\text{C} \times 40 \text{ s}$ , 终末延伸  $72^\circ\text{C} \times 7 \text{ min}$ , 共 30 个循环。

取 7  $\mu\text{l}$  产物, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳(100 V, 30 min), 紫外透射仪下拍照, Quantity One 软件分析各基因的表达强度。

### 1.8 Western Blotting 检测 4-MS 作用前后 JAR 细胞 Survivin、p-p38 MAPK 及 Caspase 3 蛋白的表达

取对数生长期 JAR 细胞消化成单细胞悬液, 以  $1 \times 10^5/\text{ml}$  接种于培养皿, 培养 24 h 后加入 4-MS 使其终质量浓度分别为 10、20、40 mg/L, 另设不加药对照组, 继续培养 48 h。细胞瓶中加入预冷的含抑制剂的蛋白质抽提试剂, 冰浴下进行裂解。裂解液于预冷的离心机中  $12\ 000 \times g$  离心 15 min。弃去沉淀, 上清液立刻转移入新的离心管中,  $-70^\circ\text{C}$  保存待用。

为保证样品加样量的一致, 加样以前用考马斯亮蓝比色法(Bradford 法)测定样品的蛋白浓度。SDS-PAGE(聚丙烯酰胺凝胶)电泳; 电泳完毕后, 按预染蛋白分子量标志物标记切取凝胶, 用湿转法将蛋白条带转移至 PVDF 膜上; 将 PVDF 膜浸泡于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中室温封闭 1 h, 一抗孵育过夜; 取出 PVDF 膜至室温, TBST 洗膜 5 次, 加入 HRP 标记的二抗(1:1 000 稀释), 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 5 次; 用 ECL-plus 发光显示液检测, 室温孵育 5 min 后于暗盒中曝光 ECL 胶片。用 Quantity One 软件对 Western blotting 结果进行光密度扫描, 定量分析。

### 1.9 统计学处理

应用 SPSS 11.0 for Windows 软件进行统计学分析, 各组计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 单因素方差分析进行各组间比较。

## 2 结果

### 2.1 4-MS 对 JAR 细胞增殖的抑制

MTT 结果显示, 当 4-MS 达 20 mg/L 后, 对 JAR 细胞有显著的增殖抑制作用, 并随作用时间的延长及药物浓度的增加, 其抑制作用有加强趋势(表 1)。

### 2.2 4-MS 对 JAR 细胞周期分布及凋亡的影响

经流式细胞术分析显示, 各剂量组 4-MS 作用 48 h 均可见亚二倍体峰, 各组亚二倍体的凋亡峰面积随药物浓度提高而增加, 各组细胞凋亡率单因素方差分析差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。20、40 mg/L 4-MS 作用 48 h 后 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例分别是对照组的 4.50 倍和 5.78 倍, G<sub>2</sub>/M 期细胞比例单因素方差分析差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 1, 表 2)。

表 1 4-MS 对人绒毛膜癌 JAR 细胞增殖的抑制作用  
Tab.1 Inhibitory effect of 4-MS on proliferation of JAR cells (  $n=9, \bar{x} \pm s$  )

4-MS ( $\rho_B/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$D_{570}$			Inhibitory index( % )		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
0	0.85 ± 0.01	1.47 ± 0.02	1.10 ± 0.01	-	-	-
10	0.75 ± 0.02 *	1.29 ± 0.02 *	0.93 ± 0.03 *	11.45 ± 2.23	12.16 ± 1.48	15.38 ± 3.32
20	0.68 ± 0.02 *	1.01 ± 0.02 *	0.65 ± 0.02 **	19.79 ± 2.61	31.21 ± 1.43	40.83 ± 1.80
40	0.53 ± 0.01 **	0.60 ± 0.02 **	0.24 ± 0.03 **	36.23 ± 1.53	59.25 ± 1.38	77.91 ± 2.60

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 0 mg/L

表 2 4-MS 对 JAR 细胞细胞周期和凋亡的影响  
Tab.2 Effect of 4-MS on cell cycle and apoptosis of JAR cells (  $n=3, \bar{x} \pm s$  )

4-MS ( $\rho_B/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Apoptosis rate ( % )	$G_0/G_1$ ( % )	S ( % )	$G_2/M$ ( % )
0	0.47 ± 0.10	53.38 ± 17.40	37.85 ± 9.42	8.33 ± 2.73
10	1.32 ± 0.02 *	50.37 ± 19.95	36.76 ± 9.26	9.72 ± 3.93
20	1.44 ± 0.02 *	25.27 ± 7.74 *	34.47 ± 9.36	37.46 ± 8.66 **
40	7.06 ± 0.13 **	19.06 ± 9.29 **	31.00 ± 7.82	48.11 ± 15.76 **

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 0 mg/L

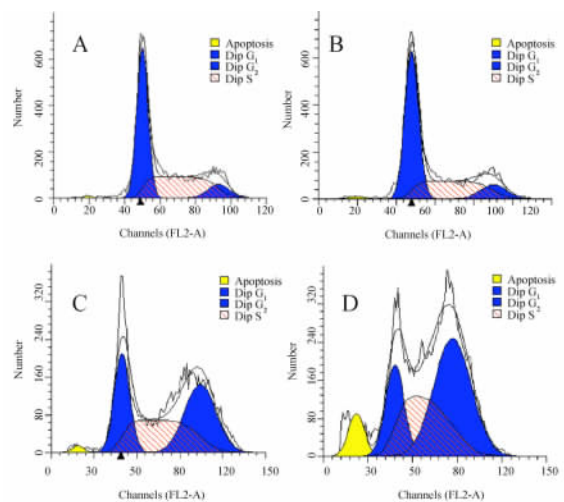


图 1 流式细胞术分析 4-MS 对人绒毛膜癌 JAR 细胞凋亡及细胞周期的影响

Fig.1 Flow cytometry analysis of 4-MS effect on apoptosis and cell cycle of JAR cells

A: Control group; B: 10 mg/L 4-MS group;  
C: 20 mg/L 4-MS group; D: 40 mg/L 4-MS group

### 2.3 AO/EB 染色荧光显微镜观察 JAR 细胞凋亡形态的改变

4-MS 作用 JAR 细胞 48 h 后, 细胞经 AO、EB 双重染色, 在荧光显微镜下可见 4 种细胞。活细胞: 核染色质呈均匀黄绿色; 早期凋亡细胞: 细胞膜完整,

但核染色质固缩, 呈较强黄绿色荧光; 晚期凋亡细胞: 核染色质固缩, 呈桔红色; 坏死细胞: 细胞染成均一桔红色。检测结果可见, 对照组无明显凋亡细胞, 细胞核成均匀黄绿色; 20 mg/L 组早期凋亡细胞多于阴性对照组, 表现为核浓缩成团块状位于细胞一侧, 呈亮黄绿色荧光, 并可见明显的凋亡小体形成; 随着剂量的增加, 40 mg/L 组晚期凋亡细胞和死亡细胞逐渐增多, 晚期凋亡细胞核浓聚、偏位、被染成桔红色, 而死亡细胞被染成均一的桔红色(图 2)。

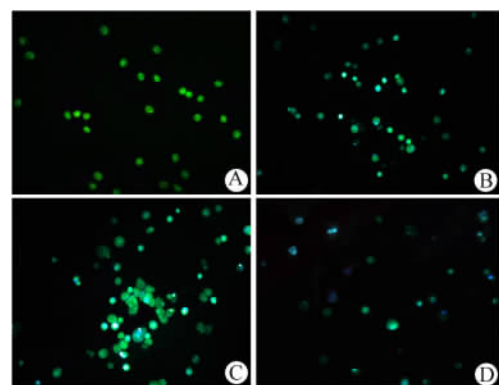


图 2 AO/EB 双染荧光显微镜观察细胞凋亡形态变化( ×200 )

Fig.2 Morphology of apoptotic cells in different dose groups by AO/EB double staining( ×200 )

A: Control group; B: 10 mg/L 4-MS group;  
C: 20 mg/L 4-MS group; D: 40 mg/L 4-MS group

2.4 RT-PCR 检测 4-MS 作用前后 JAR 细胞 *Caspase 3*、*Survivin* 及 *p38 MAPK mRNA* 的表达

4-MS 作用 JAR 细胞 48 h 后, *Caspase 3* 及 *p38 MAPK mRNA* 表达水平逐渐升高, *Survivin mRNA* 表达水平则逐渐降低 (图 3, 表 3)。结果表明, 4-MS 对 *Caspase 3* 及 *p38 MAPK mRNA* 表达量均具有一定的上调作用, 对 *Survivin mRNA* 表达量则有下调作用。

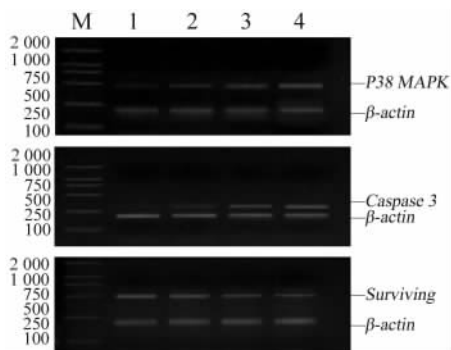


图 3 4-MS 对人绒毛膜癌 JAR 细胞中相关基因 mRNA 表达的影响

Fig. 3 Related genes expression in JAR cells in different groups by RT-PCR

M: DNA marker; 1: Control group; 2: 10 mg/L 4-MS group; 3: 20 mg/L 4-MS group; 4: 40 mg/L 4-MS group

表 3 4-MS 对人绒毛膜癌 JAR 细胞中相关基因 mRNA 表达的影响

Tab. 3 Effect of 4-MS on expressions of related genes in JAR cells (n = 3,  $\bar{x} \pm s$ )

4-MS ( $\rho_B/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	<i>Caspase 3</i>	<i>Survivin</i>	<i>p38MAPK</i>
0	0.36 ± 0.03	0.97 ± 0.02	0.34 ± 0.04
10	0.38 ± 0.02	0.93 ± 0.05	0.41 ± 0.07
20	0.75 ± 0.07*	0.68 ± 0.07*	0.74 ± 0.03*
40	0.89 ± 0.06**	0.39 ± 0.05**	0.92 ± 0.06**

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs 0 mg/L

2.5 Western Blotting 检测 4-MS 作用前后 JAR 细胞 *Caspase 3*、*Survivin* 及 *p-p38 MAPK* 蛋白的表达

Western blotting 结果显示, 对照组 JAR 细胞中 *Survivin*、*p-p38* 及 *Caspase 3* 的相对表达量分别为 0.94 ± 0.02、0.75 ± 0.02、1.06 ± 0.08; 10 mg/L 的 4-MS 不影响 *Survivin*、*p38* 及 *Caspase 3* 蛋白的表达; 当 4-MS 浓度达 20 mg/L 后, *Survivin* 的表达随 4-MS 浓度的增加而逐渐下降, 40 mg/L 时其相对表达量降至 0.73 ± 0.02, 较对照组差异具有统计学意义

(P < 0.05); 在 20 mg/L 和 40 mg/L 4-MS 诱导细胞凋亡的过程中, *p38* 磷酸化水平明显上升, 达未处理组的 1.11 倍和 1.32 倍; *Caspase 3* 被明显激活, 其相对表达量分别为 1.02 ± 0.03、1.27 ± 0.03 (图 4, 表 4)。

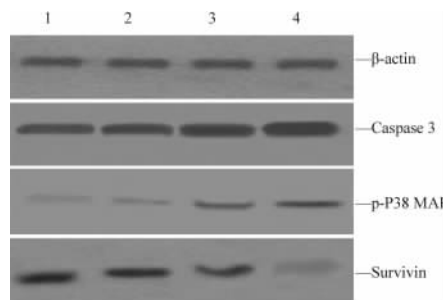


图 4 4-MS 对人绒毛膜癌 JAR 细胞中相关蛋白表达的影响

Fig. 4 Related proteins expressions in JAR cells treated or untreated with 4-MS by Western blotting

1: Control group; 2: 10 mg/L 4-MS group; 3: 20 mg/L 4-MS group; 4: 40 mg/L 4-MS group

表 4 4-MS 对人绒毛膜癌 JAR 细胞中相关蛋白表达的影响

Tab. 4 Effect of 4-MS on expressions of related proteins (n = 3,  $\bar{x} \pm s$ )

4-MS ( $\rho_B/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	<i>Caspase 3</i>	<i>p38</i>	<i>Survivin</i>
0	0.94 ± 0.02	0.75 ± 0.02	1.06 ± 0.08
10	0.95 ± 0.02	0.77 ± 0.03	1.03 ± 0.09
20	1.02 ± 0.03*	0.83 ± 0.04*	0.95 ± 0.05*
40	1.27 ± 0.03*	0.99 ± 0.06*	0.73 ± 0.02*

\* P < 0.05, \*\* vs 0 mg/L

3 讨论

绒毛膜癌是一种起源于滋养细胞的恶性肿瘤, 原发于子宫, 早期即可通过血行转移至全身, 特别是肺转移及颅内转移, 对妇女的健康及生命危害极大, 绝大多数患者为 20 ~ 34 岁的生育年龄妇女, 并且大多患者因行子宫切除而丧失生育能力。

马鞭草系马鞭草科马鞭草属植物, 马鞭草有效 C 部位能抑制 JAR 细胞增殖, 阻滞细胞在 G<sub>2</sub>/M 期, 诱导凋亡, 其机制可能与 *FasI* 的表达下调、*Bax* 表达水平增加及 *Bcl-2* 表达水平下降有关<sup>[46]</sup>。本实验室从有效 C 部位中提取出了单体化合物 4-MS, MTT 法检测表明该单体对 JAR 细胞具有明显的增

殖抑制作用,并与药物浓度有剂量效应关系。

本实验采用了流式细胞术检测 4-MS 对 JAR 细胞周期和凋亡的影响,结果显示,20 mg/L 4-MS 有促进 JAR 细胞凋亡作用,且凋亡率随其浓度的增加而逐渐升高。与对照组相比,40mg/L 4-MS 作用后使 JAR 细胞 G<sub>2</sub>/M 期比例增多 5 倍以上,提示 4-MS 可能对 JAR 细胞周期产生了影响,使细胞阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期,抑制了细胞增殖。G<sub>2</sub>/M 期是细胞周期进程中关键检查点,这个检查点是由 Cdc2( CDK1 )和 cyclin B 组成,细胞从 G<sub>2</sub> 期进入 M 期,去磷酸化酶 Cdc25 激活, Cdc2 去磷酸化而活化,细胞顺利进入 M 期。当出现 DNA 损伤或错配<sup>[7-8]</sup>, 细胞启动两条平行的信号通路抑制 Cdc2 活化,一条通路是 CHK 激酶使 Cdc25 磷酸化失活,进而抑制 Cdc2 活化;另一条通路是通过磷酸化 P53 启动转录 14-3-3、GADD45 和 P21,它们通过不同途径使 Cdc2 失活,使细胞不能进入 M 期,而是进行细胞修复或细胞凋亡。4-MS 可能引起绒毛膜 JAR 细胞 DNA 损伤,通过磷酸化 Cdc25 或上调 P53 转录活性使细胞阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期,进而导致细胞凋亡。

应用 AO、EB 两种荧光染料双重染色观察到,对照组无明显凋亡细胞,细胞核成均匀黄绿色;20 mg/L 4-MS 作用后早期凋亡细胞增多,可见明显的凋亡小体形成;40 mg/L 4-MS 作用后晚期凋亡细胞和死亡细胞显著增多,晚期凋亡细胞核浓聚、偏位、被染成桔红色,而死亡细胞被染成均一的桔红色。

近年来,随着对 p38 MAPK 信号通路研究的深入,它在凋亡中所起的调控作用被越来越清楚地阐述。研究<sup>[9]</sup>发现,转染质粒后的 HeLa 细胞,通过激活 MKK6 来活化下游的 p38 MAPK,从而提高 c-myc 翻译水平表达,诱导细胞凋亡;p38 MAPK 还可通过对 p53 的第 15 位丝氨酸残基进行磷酸化,激活和调节 p53 相关信号通路对癌细胞产生抑制作用<sup>[10]</sup>; Fas/FasL 介导的细胞凋亡中亦有 p38 MAPK 的参与;此外, p38 MAPK 通路诱导细胞凋亡还可能由 Bax 线粒体易位介导<sup>[11]</sup>。Kikkawa 等<sup>[12]</sup>报道,促性腺激素释放激素通过 p38 MAPK 信号转导通路上调中性肽链内切酶的表达水平,从而对绒毛膜癌细胞产生生长抑制作用。本实验发现,当 4-MS 浓度达 20 mg/L 后,JAR 细胞中 p38 磷酸化水平明显上升,与对照组及 10 mg/L 4-MS 组有显著差异。这表明,4-MS 诱导人绒毛膜癌 JAR 细胞凋亡可能是通过激活 p38 MAPK 信号通路来实现的。

Caspase 3 是细胞凋亡下游的关键执行者,正常情况下,胞质内的 Caspase 3 以无活性的酶原形式存

在,只有当细胞凋亡时才被激活为有活性的 Caspase 3。其主要作用,一是降解 ADP-核糖多聚成酶 ( PARP ),激活核内核酸内切酶,使核小体间 DNA 链水解断裂,产生凋亡所特有的 DNA 片段化;二是剪切组成细胞核纤层的 lamin A 蛋白,使核纤层塌陷,产生染色质浓缩,导致细胞凋亡。有研究<sup>[13]</sup>发现,依托泊苷通过上调 Caspase 3 前体表达水平促进人绒毛膜癌 JAR 细胞发生凋亡。Shin-ichi 等<sup>[14]</sup>报道,缺氧状态下绒毛膜癌 JAR 细胞凋亡的机制之一便是使细胞内已剪切活化的 Caspase 3 表达增多。本实验中,Caspase 3 也参与了 4-MS 所引起的 JAR 细胞凋亡,其活化程度随 4-MS 浓度的增加而升高。

Survivin 是新近分离鉴定的凋亡抑制基因,不仅在肿瘤中的表达明显高于正常组织,并且与肿瘤的分化程度密切相关。其产物可帮助细胞逃避“程序性死亡”,延长细胞生存期,并通过促进有丝分裂、诱导血管再生而导致肿瘤形成。Survivin 的抗细胞凋亡作用可通过以下途径实现:(1)直接或间接干扰 Caspase 3、Caspase 7 的功能;(2)借助辅助因子——肝炎 B 作用蛋白 ( HBXIP ),结合并抑制 pro-Caspase 9 的活性,阻断凋亡进程;(3)与 XIAP 形成复合物,以促进其稳定性及对 Caspase 9 的抑制作用;(4)结合线粒体凋亡途径上游调节蛋白 Smac,阻断其对 IAPs 的抑制作用,游离的 IAPs 可以与 caspase 家族成员相互作用而抑制凋亡<sup>[15]</sup>。研究<sup>[16]</sup>还发现,当细胞接受到死亡信号后,线粒体可直接释放 Survivin 以抑制细胞死亡。已有报道<sup>[17-18]</sup>证实, Survivin 对细胞滋养层、绒毛外滋养细胞及绒毛膜癌细胞的凋亡进程均有抑制作用。本实验结果表明,20 mg/L 以上的 4-MS 能显著下调 Survivin mRNA 和蛋白表达,加速了细胞凋亡过程,从而抑制 JAR 细胞的生长。

有文献<sup>[19]</sup>证实, Survivin 与 Caspase 3 的表达呈负相关;p38 MAPK 对 Caspase 3 也具有上游调节作用,即 p38 MAPK 的磷酸化可导致线粒体释放细胞色素 C,剪切激活 Caspase 3,启动细胞凋亡级联反应<sup>[20]</sup>。本研究后期实验将使用特异性阻断剂分别抑制 Survivin、p38 MAPK 的活性,以进一步探索 p38 MAPK 通路和 Survivin 与 Caspase 3 之间的级联关系,及其在 4-MS 诱导的 JAR 细胞凋亡中的地位。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] 徐 珊,焦中秀,徐昌芬,等. 马鞭草醇提液对人绒毛膜癌 JAR 细胞增殖及 EGFR 表达的影响[ J ]. 中国药科大学学报,2000, 31( 4 ):281-284.

- [2] 杨最素, 罗莉, 徐昌芬, 等. 4'-甲醚-黄芩素诱导绒毛膜癌 JAR 细胞凋亡的实验研究[J]. 中草药, 2007, 38(8): 1203-1206.
- [3] 徐珊, 罗莉, 朱利群, 等. 4'-甲醚-黄芩素对绒毛膜癌耐药细胞株多药耐药性的逆转作用研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(11): 1061-1073.
- [4] 张立平, 夏邦亮, 徐昌芬, 等. 马鞭草 C 部位诱导人绒毛膜癌 JAR 细胞凋亡分子机制研究[J]. 中国肿瘤临床, 2005, 32(19): 1089-1092.
- [5] 王家俊, 罗莉, 徐昌芬, 等. 马鞭草 C 部位对人绒毛膜癌 JAR 细胞 hCG 分泌的影响和作用机制[J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(6): 569-572.
- [6] 杨隽钧, 向阳, 万希润, 等. 妊娠滋养细胞肿瘤患者的死亡原因及相关因素分析[J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(6): 403-407.
- [7] Brown JW, Prieto LM, Perez-Stable C, et al. Estrogen and progesterone lower cyclin b1 and d1 expression, block cell cycle in G<sub>2</sub>/M, and trigger apoptosis in human adrenal carcinoma cell cultures[J]. Horm Metab Res, 2008, 40(5): 306-310.
- [8] Yang JL, Qu XJ, Yu Y, et al. Selective sensitivity to carboxyamidotriazole by human tumor cell lines with DNA mismatch repair deficiency[J]. Int J Cancer, 2008, 123(2): 258-263.
- [9] Stoneley M, Chapped SA, Jopling CL, et al. C-myc protein synthesis is initiated from the internal ribosome entry segment during apoptosis[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(4): 1162-1169.
- [10] Toit-Kohn JL, Louw L, Engelbrecht AM. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in colorectal carcinoma cells by modulating the PI3 kinase and p38 MAPK pathways[J/OL]. J Nutr Biochem, 2008, [2008-05]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
- [11] Borutaite V. AMPK, MAPK and Bax in the heart: some questions answered[J]. Biochem J, 2008, 412(2): e15-e16.
- [12] Kikkawa F, Shibata K, Suzuki T, et al. Signal pathway involved in increased expression of neutral endopeptidase 24.11 by gonadotropin releasing hormone in choriocarcinoma cells[J]. Placenta, 2004, 25(2-3): 176-183.
- [13] Sun QH, Peng JP, Xia HF. IFN gamma pretreatment sensitizes human choriocarcinoma cells to etoposide-induced apoptosis[J]. Mol Hum Reprod, 2006, 12(2): 99-105.
- [14] Ishioka S, Ezaka Y, Umemura K, et al. Proteomic analysis of mechanisms of hypoxia-induced apoptosis in trophoblastic cells[J]. Int J Med Sci, 2006, 4(1): 36-44.
- [15] Fulda S, Debatin SM. Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review[J]. Cancer Detect Prev, 2006, 30(3): 217-223.
- [16] Dohi T, Beltrami E, Wall NR, et al. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis[J]. J Clin Invest, 2004, 114(8): 1117-1127.
- [17] Shiozaki A, Kataoka K, Fujimura M, et al. Survivin inhibits apoptosis in cytotrophoblasts[J]. Placenta, 2003, 24(1): 65-76.
- [18] Ka H, Hunt JS. Temporal and spatial patterns of expression of inhibitors of apoptosis in human placentas[J]. Am J Pathol, 2003, 163(2): 413-422.
- [19] 张铁锤, 姚志军. Caspase-3 和 Survivin 在食管鳞癌中的表达及其与临床的关系[J]. 医学信息: 手术学分册, 2007, 20(7): 588-591.
- [20] Van LA, Van KS, Lippen S, et al. Activation of p38 MAPK is required for Bax translocation to mitochondria, cytochrome c release and apoptosis induced by UVB irradiation in human keratinocytes[J]. FASEB J, 2004, 18(15): 1946-1948.
- [收稿日期] 2008-07-19 [修回日期] 2008-08-16  
[本文编辑] 韩丹

(上接第 443 页)

- [2] Li L, Luan Y, Wang G, et al. Development and characterization of five cell models for chemoresistance studies of human ovarian carcinoma[J]. Int J Mol Med, 2004, 14(2): 257-264.
- [3] Oda Y, Matsumoto Y, Harimaya K, et al. Establishment of new multidrug-resistant human osteosarcoma cell lines[J]. Oncol Rep, 2000, 7(4): 859-866.
- [4] 张德宝. 人骨肉瘤多药耐药细胞模型的建立及蛋白质组学分析[D]. 长春: 吉林大学, 2008, 14-17.
- [5] 易红, 杨铁轩, 汤参娥, 等. Sorcin 蛋白质高表达与胃癌细胞多药耐药的关系[J]. 中南大学学报: 医学版, 2006, 31(3): 340-344.
- [6] Shiozawa J, Ito M, Nakayama T, et al. Expression of matrix metalloproteinase-1 in human colorectal carcinoma[J]. Mod Pathol, 2000, 13(9): 925-933.
- [7] 王大平, 肖建德, 刘建全, 等. 骨软骨瘤和骨恶性肿瘤 MMP1 和 TIMP1 表达意义[J]. 中国骨肿瘤骨病, 2004, 3(2): 108-111.
- [8] Yuan J, Dutton CM, Scully SP. RNAi mediated MMP-1 silencing inhibits human chondrosarcoma invasion[J]. J Orthop Res, 2005, 23(6): 1467-1474.
- [9] 黄纲, 李佛保, 韩士英, 等. 骨肉瘤组织中多药耐药基因 mdr-1 mRNA 和 p-糖蛋白的表达及其与临床病理特点关系的研究[J]. 中华骨科杂志, 2000, 20(1): 21-25.
- [10] 李国东, 蔡郑东, 张寅权, 等. 基因芯片对骨肉瘤发病相关基因的筛查[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007, 14(5): 428-434.
- [11] Larroy C, Rosario Fernández M, González E, et al. Properties and functional significance of *Saccharomyces cerevisiae* ADHVI[J]. Chem Biol Interact, 2003, 143-144: 229-238.
- [12] Duester G. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(14): 4315-4324.
- [13] Sweetser DA, Peniket AJ, Haaland C, et al. Delineation of the minimal commonly deleted segment and identification of candidate tumor-suppressor genes in del(9q) acute myeloid leukemia[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2005, 44(3): 279-291.
- [收稿日期] 2008-07-14 [修回日期] 2008-08-26  
[本文编辑] 郁晓路