

# 和厚朴酚联合青蒿素对 CNE-2 细胞周期阻滞的作用

王春玲<sup>1, 3\*</sup>, 岳红<sup>2</sup>, 文晓东<sup>3\*</sup>

(1. 广西中医药大学, 南宁 530001; 2. 广东清远市妇女儿童医院, 广东 清远 511500;  
3. 广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011)

**[摘要]** 目的: 观察和厚朴酚(HNK)联合青蒿素(ART)对人鼻咽癌细胞(CNE-2)细胞周期的调控作用, 探讨其可能的机制。方法: CNE-2 细胞经胸腺嘧啶核苷(TdR, 终浓度为  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )处理 16 h, 2 次 PBS 洗脱后用 RPMI-1640 培养基 10 h, 再次加入终浓度为  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 TdR 处理 16 h, PBS 洗脱后收集细胞用于下一步的实验研究。HNK( $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), ART( $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )单独及联合作用于已同步化的 CNE-2 细胞 24 h, 同时设立对照组, 流式细胞仪检测细胞周期分布的改变; RT-PCR 检测 cyclin D<sub>1</sub>, cyclin E<sub>1</sub>, p27 mRNA 表达。结果: CNE-2 细胞经胸腺嘧啶核苷 2 次处理后, 流式细胞仪检测显示, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> 期细胞比例分别为  $(72.64 \pm 5.01)\%$ ,  $(24.60 \pm 4.35)\%$ ,  $(0.00)\%$ , 表明细胞处于 G<sub>1</sub>/S 交界处。HNK + ART 组、HNK 组、ART 组的 G<sub>1</sub> 期细胞比例分别为  $(90.78 \pm 9.49)\%$ ,  $(67.86 \pm 1.59)\%$ ,  $(66.77 \pm 2.25)\%$ , 提示 HNK + ART 组较 HNK 组或 ART 组显著地将 CNE-2 细胞阻滞在 G<sub>1</sub> 期 ( $P < 0.05$ )。RT-PCR 检测显示 HNK + ART 组、HNK 组、ART 组的 cyclin D<sub>1</sub> mRNA 表达分别为  $(0.237 \pm 0.014)$ ,  $(0.328 \pm 0.002)$  及  $(0.368 \pm 0.007)$ ; cyclin E<sub>1</sub> mRNA 的表达各组依次是  $(0.445 \pm 0.027)$ ,  $(0.572 \pm 0.005)$  及  $(0.542 \pm 0.006)$ ; p27 mRNA 的表达各组分别是  $(1.069 \pm 0.046)$ ,  $(0.543 \pm 0.022)$  及  $(0.388 \pm 0.004)$ , 与单药组比较, HNK + ART 组显著下调 cyclin D<sub>1</sub>, cyclin E<sub>1</sub> mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ ), 显著上调 p27 mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ )。结论: HNK + ART 应用以协同方式诱导 CNE-2 细胞阻滞于 G<sub>1</sub> 期, 这可能与通过下调 cyclin D<sub>1</sub> 及 cyclin E<sub>1</sub> 的 mRNA 表达及上调 p27 mRNA 表达有关。

**[关键词]** 和厚朴酚; 青蒿素; 细胞周期; 协同作用

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0168-05

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121011.1704.003.html>

**[网络出版时间]** 2012-10-11 17:04

## Effect of Honokiol Combined with Artemisinin on Cell Cycle Arrest in CNE-2 Cells

WANG Chun-ling<sup>1</sup>, YUE Hong<sup>2</sup>, WEN Xiao-dong<sup>3\*</sup>

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

2. Qingyuan Women and Children Hospital, Qingyuan 511500, China;

3. Ruikang Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medicine University, Nanning 530011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of honokiol combined with artemisinin on cell cycle in nasopharyngeal carcinoma cell lines (CNE-2) cells and to explore its possible mechanism. **Method:** After treating with thymidine deoxyribonucleoside (TdR, the final concentration was  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) for 16 h, the CNE-2 cells were washed with PBS twice then cultured in RPMI-1640 medium for 10 h and then treated with TdR at same final concentration for 16 h. After the thymidine released, the CNE-2 cells were collected for further experimental studies. The CNE-2 cells were treated with honokiol  $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  or/and artemisinin  $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  for 24 h, at the same time, the control group was established. Flow cytometric analysis was performed to analyze the change of the

**[收稿日期]** 20120611(003)

**[基金项目]** 国家科技支撑计划项目(2006BAI1B08-04)

**[第一作者]** 王春玲, 医学博士, 讲师, 从事抗肿瘤药物筛选及机制研究, Tel: 0771-3137562, E-mail: wclingwhqwhm@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 文晓东, 医学博士, E-mail: lingling9699china@yahoo.com.cn

cell cycle distribution and RT-PCR analysis were used to examine the expression level of cyclin D<sub>1</sub>, cyclin E<sub>1</sub> and p27 gene. **Result:** After the CNE-2 cells were released from TdR, the flow cytometric analysis indicated that the cell percentage of G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> phase was (72.64 ± 5.01)%, (24.60 ± 4.35)%, (0.00%) respectively, which meant that the CNE-2 cells were at the G<sub>1</sub>/S boundary. The cells percentage of G<sub>1</sub> phase in the combined group, the honokiol group and the artemisinin group was (90.78 ± 9.49)%, (67.86 ± 1.59)%, (66.77 ± 2.25)% respectively, which showed that compared with either honokiol or artemisinin alone, the combined group could cause the CNE-2 cells arrest at G<sub>1</sub> phase significantly ( $P < 0.05$ ). RT-PCR analysis indicated that the cyclin D<sub>1</sub> mRNA expression in combined group, the honokiol group and the group was (0.237 ± 0.014), (0.328 ± 0.002), (0.368 ± 0.007) respectively, the cyclin E<sub>1</sub> mRNA expression in above groups was (0.445 ± 0.027), (0.572 ± 0.005), (0.542 ± 0.006) respectively, which indicated that the combined group could downregulate the mRNA expression of both cyclin D<sub>1</sub> and cyclin E<sub>1</sub>, compared to either honokiol or artemisinin alone ( $P < 0.05$ ). The RT-PCR showed that the p27 mRNA expression in combined group, the honokiol group and the artemisinin group was (1.069 ± 0.046), (0.543 ± 0.022) and (0.388 ± 0.004) respectively, which showed that the combined group could upregulate the expression of p27 mRNA. **Conclusion:** The combination of the honokiol with the artemisinin yields synergistic effect on induction of G<sub>1</sub> phase arrest in CNE-2 cells. The cooperative effect of honokiol with artemisinin may be associated with the downregulate the expression of both cyclin D<sub>1</sub> mRNA and cyclin E<sub>1</sub> mRNA and upregulate expression of p27 mRNA.

[ **Key words** ] honokiol; artemisinin; cell cycle; synergistic effect

和厚朴酚(honkiol, HNK)是从中药厚朴的主要活性成分,具有抗肿瘤作用。青蒿素(artemisinin, ART)是青蒿叶中分离的抗疟有效成份,近年来发现青蒿素及其衍生物具有明显的抗肿瘤活性。本课题组前期研究表明,和厚朴酚联合青蒿素对鼻咽癌 CNE-2 细胞的增殖具有协同抑制作用<sup>[1]</sup>。肿瘤的发生、发展与细胞周期密切相关,是细胞周期调控异常的结果,各种肿瘤病变中都发现有细胞周期调节蛋白的异常表达<sup>[2-5]</sup>,细胞周期相关基因表达紊乱会导致细胞生长出现异常、停止生长,细胞死亡或者无控制增殖导致致癌。本研究在和厚朴酚联合青蒿素作用 CNE-2 细胞后检测其对细胞周期及相关基因表达的影响以探讨协同抑制细胞增殖的作用机制。

## 1 材料

**1.1 细胞株** CNE-2 细胞购于中国科学院上海细胞库。

**1.2 药物与试剂** 和厚朴酚对照品(honkiol, HNK, 纯度 > 98%, 中国药品生物制品鉴定所, 批号 110729-200311); 青蒿素对照品(artemisinin, ART, 纯度 > 98%, 中国药品生物制品鉴定所, 批号 110729-200310); RPMI-1640 培养基(Gibco 公司); 胎牛血清(Gibco 公司); 青霉素-链霉素双抗液(杭州吉诺公司); 胰蛋白酶(杭州吉诺公司); 无水乙醇(分析纯, 广州化学试剂厂); 胸腺嘧啶核苷

(thymidine deoxyribonucleotide, TdR, 美国 Sigma 公司); Cell cycle PI staining (Biovision 公司, USA); Trizol Reagent (Invitrogen, USA); 96 孔 PCR 平板(美国 ABI 公司); 逆转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒(Takara, Japan)。

**1.3 仪器** CO<sub>2</sub> 培养箱(日本三洋公司); 紫外-可见光分光光度计(UV-2450, Beckman Coulter); 7500 实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, USA); 台式冷冻离心机(Allegra X-22, Beckman Coulter, USA); 流式细胞仪(Faesealibur; Beckman Dickinson, USA)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** CNE-2 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U · mL<sup>-1</sup> 青霉素和 100 mg · L<sup>-1</sup> 链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 在 37 °C、饱和湿度 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

**2.2 药物的制备** 和厚朴酚、青蒿素用无水乙醇溶解配制成 10 g · L<sup>-1</sup> 的储备液, 0.22 μm 滤膜过滤, 置 -20 °C 备用, 临用前用含血清的培养基配制所需浓度, 乙醇在培养液中的终浓度均 ≤ 0.2%。

**2.3 流式细胞仪(FCM)检测细胞周期**

**2.3.1 胸腺嘧啶核苷双阻断法同步化细胞模型的复制<sup>[6]</sup>** 将 CNE-2 细胞以 5 × 10<sup>5</sup> 个/mL 接种 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养, 在细胞处于对数生长期早期加入 TdR,

使其终浓度为  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 细胞培养孵育 16 h 后, 吸弃上清, 用新鲜培养基清洗 2 次, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基继续培养 10 h 后, 再次加入 TdR 使其终浓度为  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 继续培养 16 h, 获取的细胞用于进行以下研究。

**2.3.2 FCM 检测 HNK, ART 及二者联合应用对 CNE-2 细胞周期分布的影响** 将 2 次经 TdR 处理的 CNE-2 细胞消化, 一部分细胞释放 0 h 取样, 即按  $1 \times 10^6$  个/mL 用 PBS 洗 2 次, 用 75% 乙醇 1 mL 固定,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存。另一部分细胞按  $8 \times 10^5$  个/mL 接种于 6 孔培养板置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  条件培养箱中, 细胞贴壁后  $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  HNK 与  $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ART 单独及联合应用处理 24 h, 同时设空白组。分别消化收集各组细胞, 调整细胞密度至  $1 \times 10^6$  个/mL 各取 1 mL,  $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 吸弃上清, PBS 洗 1 次, 加入 75% 乙醇, 置  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  固定过夜。用 PBS 洗细胞 2 次, PI 复合染液  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  暗处染色 30 min 后上流式细胞仪检测。CellQuest 软件获取单个细胞 10 000 个, 用 ModFit 3.0 软件分析细胞周期。

**2.4 RT-PCR 法检测 HNK, ART 及二者联合应用对 cyclin D<sub>1</sub>, cyclin E<sub>1</sub> 及 p27 mRNA 表达的影响** 将 2 次经 TdR 处理的 CNE-2 细胞消化, 按  $1 \times 10^6$  个/mL 将细胞接种于 6 孔板, 药物处理 24 h 后, 在冰上用 Trizol 提取细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 参照文献并从 Gene Bank 查找 cyclin D<sub>1</sub>, cyclin E<sub>1</sub>, p27 及内参 GAPDH 基因的全序列, 再根据荧光定量 PCR 引物设计的基本原则, 用 Primer 5.0 软件设计, 并委托上海英骏生物技术公司合成, 目的引物序列见表 1。

PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$  (上游引物 0.8  $\mu\text{L}$ , 下游引物 0.8  $\mu\text{L}$ , cDNA 2  $\mu\text{L}$ , YBR<sup>®</sup> Green qPCR Mix 10  $\mu\text{L}$ , ROX 0.4  $\mu\text{L}$ , Rnase-Free ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu\text{L}$ ), 条件为:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 s;  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5 s;  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , 34 s;  $40 \times$  循环, 在  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  反应时间收集荧光信号。反应完成后用 7500 Real Time System 随机软件处理结果, 计算 cyclin D<sub>1</sub>, cyclin E<sub>1</sub>, p27 相对 GAPDH 的表达量。

**2.5 数据分析** 数据结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 数据均采用 SPSS 13.0 统计软件包统计, 组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  时具有统计学差异。

### 3 结果

**3.1 HNK, ART 单用及二者联合应用对 CNE-2 细胞周期分布的影响** 细胞经胸腺嘧啶核苷双阻断法同步化结束 0 h 时取样, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> 期细胞比例分别

表 1 RT-PCR 引物序列

引物	引物序列 (5', -3')	基因库 编码	片段长度 /bp
cyclin D <sub>1</sub> -Forward	TGACCCGGACTGCCTCCGG	053056.2	150
Reverse	TCGGTGGGTGCGAAGCCAG		
cyclin E <sub>1</sub> -Forward	GCAGGGAGCGGGATCGGAAG	001238.1	150
Reverse	CCCTCGCCGTCCTGTGATT		
p27-Forward	GCCCCGCGCGCCTTTAATT	004064.3	120
Reverse	TAGAAGAATCGTCGTTGC- AGGTCC		
GAPDH-Forward	TCTTTGCGTCGCCAGCCGA	002046.3	112
Reverse	AGTTAAAGCAGCCCTGGTGACCA		

为  $(72.64 \pm 5.01)\%$ ,  $(24.60 \pm 4.35)\%$ ,  $(0.00)\%$ , 表明细胞同步化于 G<sub>1</sub>/S 交界处。药物作用 24 h 时取样, 空白对照组 G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> 期细胞比例分别为  $(66.59 \pm 3.34)\%$ ,  $(32.80 \pm 3.28)\%$ ,  $(0.00)\%$ , 表明细胞经胸腺嘧啶核苷双阻断后及在药物作用 24 h 的这段时间里, 细胞处于 G<sub>1</sub>/S 期交界处, 仍处于同步化中。HNK + ART 组与单药组比, G<sub>1</sub> 期细胞比例显著增高 ( $P < 0.05$ ), S 期细胞比例下降 ( $P < 0.05$ )。提示 HNK + ART 可以协同诱导细胞停滞在 G<sub>1</sub> 期。HNK + ART 使 G<sub>1</sub> 期细胞明显增多, S 期细胞减少, G<sub>2</sub>/M 期细胞增多, 表明二者联合应用使细胞受到了损伤, 抑制了细胞增殖, 结果见表 2。

**3.2 HNK, ART 单用及二者联合应用对 CNE-2 细胞周期相关基因表达的影响** HNK ( $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、ART ( $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 单用及二者联合作用 CNE-2 细胞 24 h 后, 采用 RT-PCR 分析对 CNE-2 细胞周期相关基因表达的影响, 结果如表 3 所示, 与空白组比较, HNK, ART 单用及合用均能下调的 cyclin D<sub>1</sub> 和 cyclin E<sub>1</sub> 表达, 上调 p27 的表达。与单药组比较, HNK + ART 组能显著下调的 cyclin D<sub>1</sub> 和 cyclin E<sub>1</sub> 表达 ( $P < 0.05$ ), 上调 p27 的表达 ( $P < 0.05$ )。

### 4 讨论

本研究采用流式细胞仪检测细胞经 TDR 双阻断后释放 0 h 时对细胞周期分布的影响, 结果表明细胞处于 G<sub>1</sub>/S 交界处, 说明 CNE-2 细胞已被成功同步化。和厚朴酚组、青蒿素及二者联合应用处理细胞 24h 再应用流式细胞术检测对 CNE-2 细胞周期分布的影响, 结果表明, 对照组细胞处于 G<sub>1</sub>, S 期比例分别为  $(66.59 \pm 3.34)\%$ ,  $(32.80 \pm 3.28)\%$ , 表明细胞处于 G<sub>1</sub>/S 交界处, 仍处于同步化中。联合用药组与厚朴酚组、青蒿素组相比, G<sub>1</sub> 期细胞分

表 2 HNK,ART 单用及二者联合用药 24 h 对 CNE-2 细胞周期分布的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

时间/h	HNK/mg·L <sup>-1</sup>	ART/mg·L <sup>-1</sup>	G <sub>1</sub> /%	S/%	G <sub>2</sub> /%
0	0	0	72.64 ± 5.01	24.60 ± 4.35	0.00
24 h	0	0	66.59 ± 3.34	32.80 ± 3.28	0.00
	7.5	0	67.86 ± 1.59	30.39 ± 1.37	0.00
	0	7.5	66.77 ± 2.25	33.23 ± 2.26	0.00
	7.5	7.5	90.78 ± 9.49 <sup>1,2)</sup>	2.38 ± 0.24 <sup>1,2)</sup>	6.70 ± 9.46

注:联合用药组与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,与单药组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ (表 3 同)。

表 3 RT-PCR 检测 HNK,ART 及二者联合用药对相关基因表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	cyclin D <sub>1</sub>	cyclin E <sub>1</sub>	p27
Control	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	
HNK	7.5	0.328 ± 0.002	0.572 ± 0.004	0.543 ± 0.022
ART	7.5	0.368 ± 0.007	0.542 ± 0.006	0.388 ± 0.004
HNK + ART	7.5 + 7.5	0.237 ± 0.014 <sup>1,2)</sup>	0.432 ± 0.027 <sup>1,2)</sup>	1.025 ± 0.046 <sup>1,2)</sup>

别上升了 23.91%,23.01%;S 期细胞比例分别下降了 29.01%,30.81%,提示和厚朴酚联合青蒿素应用产生了将 CNE-2 细胞阻滞于 G<sub>1</sub> 期的协同效应,即使进入 S 周期的细胞明显减少。

细胞周期在不同时相的多个调控点上受到调节,其中有 3 个调控点最为重要,它们就是 G<sub>1</sub>/S, G<sub>2</sub>/M 及有丝分裂中期/后期的交界处,其中较为关键是 G<sub>1</sub>/S 和 G<sub>2</sub>/M 两个检查限速点,其中尤以 G<sub>1</sub>/S 最为重要。

Cyclin D 被认为是限制 G<sub>1</sub> 到 S 期转化进程中最重要的调控因子<sup>[7-8]</sup>,分为 3 个亚型, cyclin D<sub>1</sub>, cyclin D<sub>2</sub> 和 cyclin D<sub>3</sub><sup>[9]</sup>,其中 cyclin D<sub>1</sub> 在 G<sub>1</sub> 期含量最高、活性最强,对细胞周期起正性调控作用。cyclin D<sub>1</sub> 是 G<sub>1</sub>/S 期转换的重要调节蛋白,抑制 cyclin D<sub>1</sub> 的表达,使进入 S 期的细胞减少,发生 G<sub>1</sub> 期阻滞。Cyclin E 是最直接涉及 DNA 复制的一种,当细胞周期由 G<sub>1</sub>→S 期时 cyclin D 及 cyclin E 均降解<sup>[10]</sup>。本研究应用和厚朴酚(7.5 mg·L<sup>-1</sup>)、青蒿素(7.5 mg·L<sup>-1</sup>)及和厚朴酚(7.5 mg·L<sup>-1</sup>) + 青蒿素(7.5 mg·L<sup>-1</sup>)处理已同步化的细胞,采用 RT-PCR 检测 CNE-2 细胞中 cyclin D<sub>1</sub>, cyclin E<sub>1</sub> 表达,结果表明联合用药组中 cyclin D<sub>1</sub>, cyclin E<sub>1</sub> 表达较单药组显著减少,提示和厚朴酚联合青蒿素能有效地通过下调 cyclin D<sub>1</sub>, cyclin E<sub>1</sub> 的表达,减少进入 S 期的比例,抑制 DNA 的复制合成,从而抑制 CNE-2 胞增殖。

P27 是细胞周期抑制因子,主要通过抑制 cyclin E-CDK2 和 cyclin D-CDK4 等复合物活性,使细胞周

期停留在 G<sub>1</sub> 期,起着负性调节作用,抑制细胞进入 S 期。当其表达增高时可以抑制细胞增生<sup>[11]</sup>。本研究的 RT-PCR 结果发现,联合用药组 p27 表达较单药组显著,表明和厚朴酚与青蒿素联合应用能以协同作用方式增加 p27 的表达,从而抑制 CNE-2 细胞增生。

综上所述,和厚朴酚联合青蒿素作用 CNE-2 细胞使其阻滞在 G<sub>1</sub> 期,其机制可能与下调 cyclin D<sub>1</sub> mRNA, cyclin E<sub>1</sub> mRNA 的表达及下调 P27 mRNA 的表达有关,其确切的分子机制仍有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 王春玲,赖小平,吴安国. 和厚朴酚与青蒿素联合应用对 CNE-2 细胞增殖和凋亡的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(20):157.
- [2] Yasmeeen A, Berdel W E, Serve H, et al. E-and A-type cyclins as markers for cancer diagnosis and prognosis [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2003,3(5):617.
- [3] Sezps M, Erickson S, Gruber A, et al. Effects of interferon-alpha on cell cycle regulatory proteins in leukemic cells [J]. Leuk Lymphoma, 2003, 44(6):1019.
- [4] Moroy T, Geisen C. Cyclin E [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(8):1424.
- [5] Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis [J]. Nature, 2005, 434(7035):864.
- [6] 鄂征. 组织培养技术及其在医学研究中的应用[M]. 北京:北京医科大学协和医科大学出版社,2004:358.

# 清热化痰中药复方对急性肝衰竭大鼠 肝组织 HMGB1 表达的干预研究

扈晓宇\*, 张扬

(成都中医药大学附属医院感染科, 成都 610075)

**[摘要]** 目的: 观察清热化痰中药复方——清肝方对急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)大鼠高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)表达的影响, 从 mRNA 水平探讨其抗 ALF 的机制。方法: 采用 D-氨基半乳糖(D-GalN)单次腹腔注射构建 ALF 大鼠模型, 125 只 SD 大鼠以是否接受造模和药物干预随机分为空白组、模型组、复方甘草酸苷组和清肝方组, 每组再以 36, 96 h 2 个时间点继续随机分为 1, 2 两个亚组, 共 8 组, 其中亚组 1 用于造模后 36 h 取血及肝组织标本, 亚组 2 用于 96 h 后观察大鼠的生存率。用全自动生化分析法检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)和总胆红素(TBiL); 全自动凝血分析法检测血浆凝血酶原时间(PT); 常规 HE 染色作肝组织病理学观察。实时荧光定量(RT-PCR)检测 HMGB1 mRNA 的表达变化, 以管家基因  $\beta$ -actin 为对照,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因相对表达量。结果: 模型组、复方甘草酸苷组及清肝方组估计平均生存时间分别为 64.6, 71.9, 83.3 h; log-rank 检验提示清肝方组累积生存率高于模型组( $P < 0.05$ )。空白组、清肝方组和复方甘草酸苷组肝组织 HMGB1 RNA/ $\beta$ -actin 值均显著降低( $0.006 \pm 0.003, 0.067 \pm 0.033, 0.112 \pm 0.027$  vs  $0.245 \pm 0.153$ , 均  $P < 0.01$ ), 清肝方组低于复方甘草酸苷组( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 空白组、清肝方组和复方甘草酸苷组在血清 ALT, AST, TBiL 和血浆 PT 水平方面与模型组相比均明显下降( $P < 0.01$ ), 清肝方组低于复方甘草酸苷组( $P < 0.01$ )。清肝方组和复方甘草酸苷组肝组织损害程度积分与模型组相比明显下降( $1.84 \pm 0.13, 2.85 \pm 0.20$  vs  $3.56 \pm 0.24$ , 均  $P < 0.01$ ), 清热化痰复方组低于复方甘草酸苷组( $P < 0.01$ )。结论: 清肝方可有效改善 D-GalN 诱导的大鼠的肝功能、凝血功能及肝脏病理, 降低死亡率, 其发挥作用的分子机制与抑制 HMGB1 的表达有关。

**[关键词]** 清肝方; 急性肝衰竭; 清热化痰; 生存率; 高迁移率族蛋白 B1

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0172-06

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121107.1343.012.html>

**[网络出版时间]** 2012-11-7 13:43

**[收稿日期]** 20120901(006)

**[基金项目]** 国家“十一五”科技重大专项课题项目(2008ZX10005, 2009ZX10005); 国家自然科学基金项目(81273748); 四川省科技厅重大科技招标基金项目(310312); 四川省中医药管理局中医药科学技术研究专项(2012-A-097)

**[通讯作者]** \* 扈晓宇, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 从事中医药防治感染性疾病及中晚期恶性肿瘤的临床及实验研究, Tel: 028-87765459, E-mail: meddmail@yahoo.com.cn

[7] Brewer J W, Hendershot L M, Sherr C J, et al. Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D<sub>1</sub> translation and cell-cycle progression[J]. Proc Natl Sci U S A. 1999, 96(15):8505.

[8] Ajehnum F, Ando K, Decpario J A, et al. Independent regulation of human D-type cyclin gene expression during G<sub>1</sub> phase in primary human T lymphocytes[J]. J Biol Chem, 1993, 268(6):4113.

[9] Fukada T, Ohtani T, Yoshida Y, et al. STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G<sub>1</sub>

to Scell-cycletransition [J]. EMBO J, 1998, 17(22):6670.

[10] Akama Y, Yasui W, Yokozkai H, et al. Frequent amplification of the cyclin E gene in human gastric carcinomas[J]. JPN J Cancer Res, 1995, 86(7):617.

[11] Khool M L, Freeman J L, Witterick I J, et al. Underexpression of p27/Kip in thyroid papillary microcarinoma with gross metastasis disease [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2002, 128(3):253.

[责任编辑 聂淑琴]