

互补的区域调节基因的表达,称为 mRNA 翻译抑制或 mRNA 降解^[5]。研究表明,miR 在不同的生理和病理过程中扮演着重要的角色,包括发育、分化、增殖、凋亡,与肿瘤的发生,其调节包括细胞分化、复制、迁移的不同的细胞过程中,细胞凋亡^[16]。miR - 26a 是新发现的具有血管生成抑制作用的 miR,常作为肿瘤抑制基因存在。PTEN 是 miR - 26a 的直接目标,其通过抑制 PTEN 的表达进而激活 Akt 信号通路^[17]。最近研究发现,在人类及动物心肌梗死模型中,利用 miR - 26a 抑制剂阻断其表达后,在两天内即可迅速诱导强有力的血管生成,新生血管数量增加两倍,梗死面积显著减少^[3]。在肝癌细胞中,miR - 26a 通过 PI₃K/AKT/HIF - 1α/VEGFA 通路调节其血管生成^[18]。

本研究通过构建小鼠全层皮肤缺损创面模型,局部应用 miR - 26a 抑制剂后,创面内细胞增殖加快,新生血管增多,愈合速度提高。PTEN 相关的信号通路可能为其作用机制,但仍需进一步研究。本研究首次发现抑制 miR - 26a 对于创面愈合的促进作用,推测其可作为创面治疗新的研究靶点。

参考文献

- 1 Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Gene therapy and wound healing [J]. Clinics in Dermatology, 2007, 25(1):79–92
- 2 Lin L, Shen Q, Leng H, et al. Synergistic inhibition of endochondral bone formation by silencing Hif1alpha and Runx2 in trauma – induced heterotopic ossification [J]. Molecular Therapy, 2011, 19(8):1426–1432
- 3 Icli B, Wara AK, Moslehi J, et al. MicroRNA - 26a regulates pathological and physiological angiogenesis by targeting BMP/SMAD1 signaling [J]. Circulation Research, 2013, 113(11):1231–1241
- 4 Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing [J]. N Engl J Med, 1999, 341(10):738–746
- 5 Ashcroft GS, Mills SJ, Ashworth JJ. Ageing and wound healing [J]. Biogerontology, 2002, 3(6):337–345

- 6 Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration [J]. European Surgical Research, 2012, 49(1):35–43
- 7 Wang T, Feng Y, Sun H, et al. miR - 21 regulates skin wound healing by targeting multiple aspects of the healing process [J]. Am J Pathol, 2012, 181(6):1911–1920
- 8 Zhao M. PTEN; a promising pharmacological target to enhance epithelial wound healing [J]. Br J Pharmacol, 2007, 152(8):1141–1144
- 9 Matsui T, Nagoshi T, Rosenzweig A. Akt and PI 3 – kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival [J]. Cell Cycle, 2003, 2(3):220–223
- 10 Polak R, Buitenhuis M. The PI3K/PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis: implications for therapeutic strategies in leukemia [J]. Blood, 2012, 119(4):911–923
- 11 Li YM, Zhou BP, Deng J, et al. A hypoxia – independent hypoxia – inducible factor – 1 activation pathway induced by phosphatidylinositol – 3 kinase/Akt in HER2 overexpressing cells [J]. Cancer Res, 2005, 65(8):3257–3263
- 12 Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis [J]. Adv Cancer Res, 2009, 102:19–65
- 13 Kanwar JR, Kamalapuram SK, Kanwar RK. Targeting survivin in cancer: the cell – signalling perspective [J]. Drug Discovery Today, 2011, 16(11–12):485–494
- 14 Jiang BH, Liu LZ. AKT signaling in regulating angiogenesis [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2008, 8(1):19–26
- 15 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2):281–297
- 16 Bushati N, Cohen SM. microRNA functions [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007, 23:175–205
- 17 Liu B, Wu X, Liu B, et al. MiR - 26a enhances metastasis potential of lung cancer cells via AKT pathway by targeting PTEN [J]. Biochimica Biophysica Acta, 2012, 1822(11):1692–1704
- 18 Chai ZT, Kong J, Zhu XD, et al. MicroRNA - 26a inhibits angiogenesis by down – regulating VEGFA through the PIK3C2alpha/Akt/HIF - 1alpha pathway in hepatocellular carcinoma [J]. PLoS One, 2013, 8(10):e77957

(收稿日期:2014–02–22)

(修回日期:2014–02–27)

青藤碱对人结肠癌细胞株 SW480 增殖和细胞周期的影响

杨海波 施展 马艳春 倪振华 赵成根 高家治

摘要 目的 研究青藤碱对人结肠癌 SW480 细胞增殖和细胞周期的影响。**方法** 用不同浓度的青藤碱处理体外培养的

基金项目:上海市教委基金资助项目(2012JW66);上海市普陀区卫生系统自主创新科研基金资助项目(2012PTKW008)

作者单位:200062 上海中医药大学附属普陀医院

人结肠癌 SW480 细胞 24、48、72h 后,采用 CCK 法检测细胞的增殖活性,采用流式细胞术检测细胞的细胞周期分布,并用光镜和透射电镜观察 SW480 细胞的形态学变化。结果 青藤碱在体外可抑制 SW480 细胞的增殖,并呈时间和剂量依赖性。干预 48h 后,中、低浓度的青藤碱(8mmol/L,4mmol/L)可诱导 SW480 细胞 G₁ 期细胞比例增加,而高浓度的 SIN(16mmol/L,10mmol/L)可诱导 G₁ 期、G₂ 期细胞比例增加。光镜与电镜下均见凋亡细胞增多。结论 青藤碱在体外能抑制人结肠癌 SW480 细胞增殖和诱导该细胞系的凋亡,其机制可能与其阻滞细胞周期进程有关。

关键词 青藤碱 抗肿瘤 细胞周期 细胞凋亡

[中图分类号] R282

[文献标识码] A

Effect of Sinomenine on Cell Proliferation and Cell Cycle in Human Colon Cancer SW480 Cells. Yang Haibo, Shi Zhan, Ma Yanchun, et al. Department of Colorectal Surgery, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

Abstract Objective To investigate the effect of sinomenine on cell proliferation and cell cycle progression in human colon cancer SW480 cells. **Methods** By technique of cell culture in vitro, SW480 cells were treated with sinomenine in different concentrations for 24, 48 and 72h, then cell viability of each group was measured by cell counting Kit - 8. Cell cycle was analyzed by flow cytometry. The morphological features of cell apoptosis were observed under light and transmission electron microscope. **Results** Sinomenine could inhibit proliferation of SW480 cells in a time - and dose - dependent manner in vitro. Flow cytometric analysis showed a G₁ arrest at medium and low concentration(8mmol/L,4mmol/L), but both G₁ and G₂ arrest at high concentration (16mmol/L,10mmol/L) after 48h exposure. The occurrence of cell apoptosis can be detected under light and transmission electron microscope. **Conclusion** Sinomenine could inhibit proliferation and induce apoptosis of SW480 cells in vitro. Its mechanism may be relevant to cell cycle arrest.

Key words Sinomenine; Antitumor activity; Cell cycle; Cell apoptosis

结肠癌是我国常见的消化道恶性肿瘤,其发生率呈逐年上升趋势。化学药物治疗是结肠癌治疗的重要方法之一。青藤碱(sinomenine, SIN)为防己科植物青风藤中提取的生物碱单体,长期应用于临床,具有很好的安全性。近年来的研究表明青藤碱在体外对多种肿瘤具有抑制作用,但其对结肠癌作用的研究不多^[1,2]。本实验以体外培养人结肠癌 SW480 细胞为研究对象,观察盐酸青藤碱对 SW480 细胞增殖和细胞周期的影响,为结肠癌的防治提供新策略。

材料与方法

1. 材料:盐酸青藤碱纯品由湖南正清制药集团有限公司惠赠。人结肠癌 SW480 细胞由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供。L-15 培养液、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司。小牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司。CCK-8、细胞周期与凋亡试剂盒购自碧云天生物技术研究所。

2. 方法:(1)细胞培养与传代:SW480 细胞常规培养于含 10% 热灭活新生小牛血清、青霉素 100U/ml 和链霉素 100U/ml 的 L-15 培养液中,置于 37℃ 的细胞培养箱。细胞呈单层贴壁生长,实验和传代均取对数生长期细胞。(2)盐酸青藤碱工作液配制:盐酸青藤碱,分子式:C₁₉H₂₄ClNO₄,分子质量 365.85,为白色针状结晶粉末。将 3.66g 盐酸青藤碱溶于 100ml PBS 液中,配成 100mmol/L 的贮存液,保存备用。使用时以细胞培养液稀释成工作浓度。(3)细胞增殖抑制试验(CCK-8 法):取对数生长期细胞,用 0.25% 的胰酶消化,调

整细胞悬液浓度至 2×10^5 个/毫升,每孔加入 100μl 接种至 96 孔板,置于密封盒,37℃ 细胞培养箱培养。细胞贴壁后,吸弃上清,换上各浓度组盐酸青藤碱(1,2,4,8,12,16,20mmol/L)处理细胞,每组设 5 个复孔,同时设不含细胞仅有培养基的调零组和 0mmol/L 盐酸青藤碱的阴性对照组,继续培养 24、48 和 72h 后用酶标仪在波长 450~600nm 处测定吸光度 A 值。取平均值计算药物作用后肿瘤细胞生长抑制率,公式如下:细胞生长抑制率(%) = (1 - 干预组吸光度平均值/对照组吸光度平均值) × 100%。以药物浓度为横坐标,细胞生长抑制率为纵坐标,绘制生长抑制曲线,根据曲线获得 IC₅₀。(4)流式细胞术检测盐酸青藤碱对 SW480 细胞周期的影响:收集实验组和对照组细胞,用 PBS 洗涤后离心 3 次,用 70% 乙醇在 -20℃ 冰箱固定 24h,离心去乙醇,PBS 洗涤 2 次,1000r/min 离心,弃上清液。加入 RNaseA(50μg/ml)37℃ 温育 30min 后,加 10μl PI(50μg/ml)置 4℃ 避光作用 20min。用流式细胞仪计数 10000 个细胞,在激发波长 488nm 波长处检测红色荧光,同时检测光散射情况。采用 Cell Quest Pro 软件进行细胞 DNA 含量分析和光散射分析。(5)光镜、电镜观察细胞形态:倒置显微镜下观察各浓度组盐酸青藤碱(1,2,4,8,12,16,20mmol/L)处理 SW480 细胞 24、48 和 72h 后的细胞形态学变化。透射电镜(型号,CM 120, Philips)观察细胞超微结构变化:收集 0 和 10mmol/L 盐酸青藤碱处理 SW480 细胞 48h 后的细胞,2.5% 戊二醛 4℃ 前固定,1% 银酸后固定,梯度乙醇、丙酮脱水,618 环氧树脂浸透包埋,超薄切片,醋酸铀及枸橼酸铅染色,透射电镜下观察。

3. 统计学方法:应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量

资料结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析,两两比较采用LSD检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. CCK-8法检测盐酸青藤碱对SW480增殖的影响:不同浓度盐酸青藤碱作用于人结肠癌SW480细胞后,随着时间的延长和浓度的增加,盐酸青藤碱对其增殖的抑制作用也随之增强,见图1。SIN对于人结肠癌SW480细胞的24、48、72h的半数抑制浓度(IC_{50})分别为11.38、10.04、8.53mmol/L。

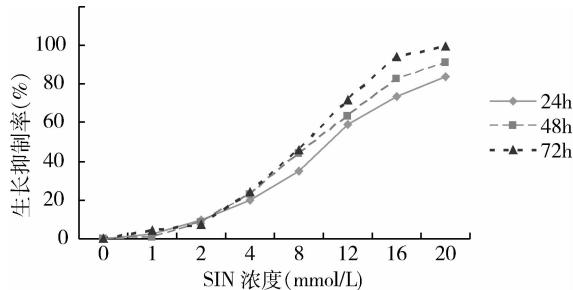


图1 不同浓度 SIN 对结肠癌细胞 SW480 的生长抑制作用

2. SIN 对 SW480 细胞周期的影响:以0、4、8、10、16mmol/L的SIN干预48h后,SW480细胞呈浓度依赖性细胞周期分布。在4和8mmol/L时, G_1 期百分比与阴性对照组(0mmol/L)相比明显增加,S期及 G_2 期的细胞比例较阴性对照组降低。在10和16mmol/L时, G_1 期和 G_2 期的细胞百分比与阴性对照组相比均明显增加,说明高浓度的SIN可同时诱导SW480细胞 G_1 和 G_2 期阻滞,详见图2。同时,用10mmol/L的SIN作用SW480细胞24、48、72h,随着干预时间的延长, G_1 期比例亦逐渐增加,S期及 G_2 期的细胞比例较24h明显降低,再次说明SIN可诱导SW480细胞的 G_1 期阻滞,并呈时间依赖性,详见图3。

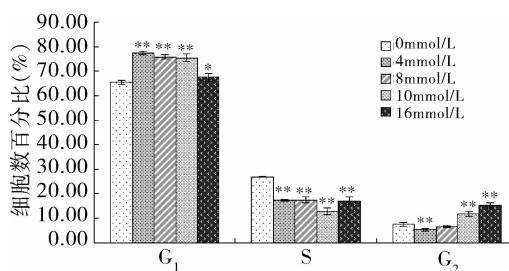


图2 不同浓度 SIN 干预 48h 对 SW480 细胞周期的影响

与阴性对照组(0mmol/L)相比,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3. SIN 对 SW480 细胞形态学的影响:倒置显微镜下观察细胞形态学变化可见不同浓度 SIN 作用

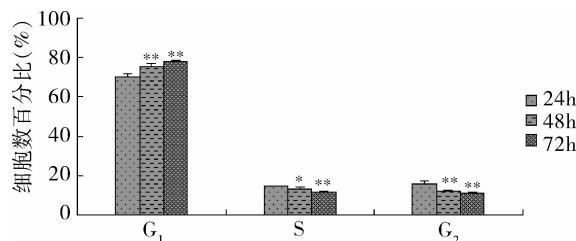


图3 10mmol/L 青藤碱干预 24、48、72h 对 SW480 细胞周期的影响

与干预 24h 相比,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

SW480细胞后,随着浓度和时间递增,细胞数目明显减少,同时细胞形态发生变化,细胞出现凋亡和死亡。透射电镜观察,用10mmol/L的SIN作用SW480细胞48h后有凋亡细胞出现,其特征表现为细胞表面微绒毛消失,胞质浓缩,内见空泡形成,胞膜起泡或“出芽”。核染色质固缩,凝集成块状或边移于核膜下。凋亡早期个别细胞线粒体基质肿胀,颜色变淡。凋亡晚期细胞线粒体嵴减少甚至消失,并见凋亡小体,见图4。

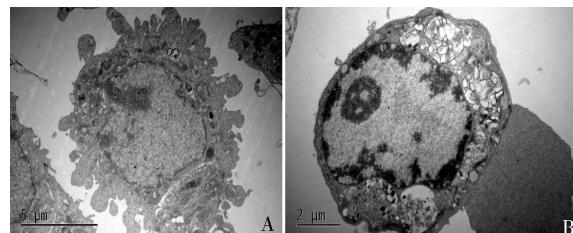


图4 SW480 细胞透射电镜观察结果

A. 对照组;B. 青藤碱 (10mmol/L) 干预 48h

讨 论

青藤碱是中药青风藤提取的生物碱单体,具有抗炎、镇痛、抗风湿、免疫抑制、降压、抗心律失常等作用^[1-4]。已有正清风痛宁片、盐酸青藤碱注射液、毛青藤总碱片等制剂长期应用于临床,用于治疗类风湿性关节炎等各种风湿病以及心律失常取得较好疗效,具有很好的安全性。近年来的研究表明,青藤碱对一些肿瘤(如肺癌、肝癌、前列腺癌、宫颈癌)具有抑制作用,但尚缺乏其对结肠癌作用及机制的研究^[5,6]。本研究通过CCK-8实验证实盐酸青藤碱在体外对人结肠癌SW480细胞具有明显的抑制作用,该作用呈浓度、时间依赖关系。随着SIN干预浓度和时间的递增,SW480细胞数目明显减少,同时细胞形态发生变化,细胞出现凋亡和死亡。

细胞周期是一个复杂有序并受严格调控的过程,

肿瘤的发生与细胞周期的紊乱密切相关。细胞周期紊乱可引起细胞生长失控、分化受阻、凋亡异常,导致细胞的无限增殖。细胞通过细胞周期的两个限制点G₁~S期和G₂~M期保证细胞复制。姜廷枢等^[5]的研究表明,青藤碱体外能有效抑制肺癌细胞生长,其机制与其阻滞细胞周期于G₁期、诱导细胞凋亡有关。龚立等^[6]的研究表明青藤碱对肝癌 HepG2 细胞的生长有明显抑制作用,并诱导肿瘤细胞发生凋亡,使细胞周期阻滞于G₁期和G₂期。目前尚无 SIN 对结肠癌作用的研究报道。本研究结果显示,低、中浓度的 SIN(4、8mmol/L)作用 SW480 细胞 48h 后,可引起人结肠癌 SW480 细胞 G₁ 期百分比增加,而高浓度的 SIN(10、16mmol/L)作用 48h 后,G₁ 期和 G₂ 期细胞百分比均明显增加,说明 SIN 可诱导 SW480 细胞的 G₁ 期阻滞,并呈浓度依赖性,在高浓度时还可诱导 SW480 细胞的 G₂ 期阻滞。另外用 10mmol/L 的 SIN 干预 SW480 细胞 24、48、72h,随着干预时间的延长,同样观察到 SW480 细胞的 G₁ 期百分比增加,再次说明 SIN 可诱导 SW480 细胞的 G₁ 期阻滞,并呈时间依赖性。

综上所述,体外实验表明盐酸青藤碱对人结肠癌 SW480 细胞增殖具有抑制作用,其机制可能与其诱导的细胞周期 G₁ 期和 G₂ 期阻滞有关。本研究为盐酸青藤碱应用于临床治疗结肠癌提供了实验室依据,但尚需进一步研究其体内抗肿瘤作用及机制,评估其抗肿瘤效果。

参考文献

- 涂胜豪,胡永红,陆付耳,等.青藤碱对人淋巴细胞产生 IL-2、IL-2R 和 IL-6 的影响[J].中国实验临床免疫学杂志,1998,10(5):12~14
- 李晓娟,王培培,刘良,等.青藤碱对 T 淋巴细胞活化及 TH1 类细胞内细胞因子表达的影响[J].中医中药与免疫,2004,20(4):249~252
- 张毅,徐小漫,张雁,等.青藤碱对人前列腺癌 DU145 细胞增殖凋亡的影响[J].中国医刊,2013,48(1):31~33
- 孙芳云,郭惠玲,李西宽,等.青藤碱对实验性心律失常的作用[J].西安医科大学学报,1990,11(4):324~326
- 姜廷枢,李胜岐.青藤碱对肺腺癌细胞系 A549 增殖和凋亡的影响[J].中国老年学杂志,2010,30(5):655~657
- 龚立,高永翔.青藤碱诱导肝癌细胞凋亡的实验研究[J].成都中医药大学学报,2007,30(3):38~41

(收稿日期:2014-01-19)

(修回日期:2014-01-28)

丙型肝炎病毒 1b 基因型 C 区氨基酸 70 替代对干扰素刺激应答元件的影响

胡中杰 刘 颖 仇丽霞 范作鹏 聂 巍 梁 珊 于红卫 金荣华

摘要 目的 探讨丙型肝炎病毒(hepatitis C Virus,HCV)1b 基因型(genotype 1b, GT-1b)C 区氨基酸(amino acid, aa)70 替代对干扰素刺激应答元件(interferon-stimulated response element, ISRE)的影响。**方法** 首先构建 HCV GT-1b C 区 aa70 野生型和变异型核心蛋白表达质粒,测序鉴定后瞬时转染肝癌细胞系 Huh7 细胞,Western blot 法鉴定 HCV 核心蛋白的成功表达;然后利用 ISRE 双荧光素酶报告基因实验检测核心蛋白表达对 ISRE 活化的影响,并以 SYBR Green real-time PCR 检测 3 种主要干扰素刺激基因(interferon stimulated genes, ISGs)的表达情况。**结果** 构建了 HCV aa70 野生型和变异型核心蛋白表达质粒,并在体外培养细胞中成功表达。但野生型和变异型核心蛋白表达对 ISRE 活化及 3 种主要 ISGs 表达的影响无明显差异。**结论** 单纯 R70Q/H 变异的核心蛋白似乎并不足以直接导致 IFN α 耐药。

关键词 丙型肝炎病毒 核心蛋白 干扰素刺激应答元件 干扰素刺激基因

[中图分类号] R5 [文献标识码] A

基金项目:北京市优秀人才培养基金资助项目(2010D003034000009);中国初级卫生保健基金会佑安肝病艾滋病基金资助项目(BJYAH-2011-073);首都医科大学基础-临床科研合作基金资助项目(1000172053-11JL61)

作者单位:100069 首都医科大学附属北京佑安医院丙肝与中毒性肝病科

通讯作者:胡中杰,电子信箱:yfcyt@139.com