View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Xiamen University Institutional Repository

高，血液流变学发生异常。调脂方中、高剂量组均可明显降低不同切变率下的全血黏度和血浆黏度（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），表明调脂方能改善饮食性高脂血症模型大鼠血液流变学的变化。结果见表 2。

表 1 调脂方对饮食性高脂血症大鼠血脂的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	剂量 /g·kg^{-1}	TC /mmol·L^{-1}	TG /mmol·L^{-1}	HDL－C /mmol·L^{-1}	LDL－C /mmol·L^{-1}
正常对照	－	1.48±0.31	0.76±0.24	0.49±0.06	0.61±0.35
模型	－	15.57±6.23**	1.83±0.73**	0.38±0.04**	12.39±6.18**
血脂康	0.25	7.92±2.45##	0.97±0.36##	0.52±0.02##	5.83±3.49#
调脂方高剂量	0.32	8.59±2.25##	0.89±0.31##	0.55±0.15#	5.56±4.17#
调脂方中剂量	0.16	9.56±1.91#	1.05±0.22##	0.46±0.17	6.18±3.42#
调脂方低剂量	0.08	12.43±2.37	1.18±0.41#	0.41±0.12	7.51±3.79

与正常对照组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$；与模型组比较，# $P<0.05$，## $P<0.01$

表 2 调脂方对饮食性高脂血症大鼠血液流变学的影响（$\bar{x}\pm s$）

分组	剂量 /g·kg^{-1}	全血黏度/mPa·s 高切	中切	低切	血浆黏度 /mPa·s
正常对照	－	4.62±0.41	4.89±0.48	6.11±0.56	1.52±0.07
模型	－	5.35±0.47**	5.61±0.51**	7.01±0.45**	1.67±0.08*
血脂康	0.25	4.81±0.39#	5.17±0.46#	6.35±0.47##	1.61±0.05#
调脂方高剂量	0.32	4.58±0.43##	5.01±0.44##	6.17±0.43##	1.55±0.06##
调脂方中剂量	0.16	4.92±0.25#	5.5±0.23#	6.52±0.35#	1.60±0.05#
调脂方低剂量	0.08	5.12±0.31	5.43±0.35	6.59±0.55	1.62±0.06#

与正常对照组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$；与模型组比较，# $P<0.05$，## $P<0.01$

4 讨论

中医认为高脂血症的病机为肝肾亏虚或脾虚导致痰湿内聚，阻遏气机，引起血瘀而造成痰瘀互结的局面，故治疗以痰瘀同治为主，活血通脉为辅。调脂方由肉桂、三七、葛根等组成，具有健脾益肾、疏肝理气、活血化瘀之功效。

大量的实验研究已证实，TC、TG 的升高及 HDL－C 的降低会使红细胞膜的流动性降低，红细胞变形能力下降，从而微循环瘀血，血流变慢，血液黏稠度增大。由于全血黏度值增高，血浆黏度变大，红细胞变形能力降低，使红细胞出现棘刺，表面积增大，导致脂质沉积[2]。本实验结果表明，与正常对照组相比，高脂模型组 TC、TG 升高，HDL－C 降低，全血黏度、血浆黏度增高，而调脂方各个剂量组，特别是高、中剂量组均能明显降低饮食性高脂血症大鼠血清中 TC、TG、LDL－C 的含量，并能显著提高 HLD－C 的含量。同时调脂方还可以降低大鼠全血的高、中、低切黏度，表明它能通过提高红细胞的变形性、降低聚集性的方式来改变血液的黏、稠状态，减少脂质沉积。

综上所述，调脂方具有良好的调节高脂血症大鼠脂质代谢的作用，而且能够改善高脂血症引起的血液流变学的异常状态。研究结果提示该药对高脂血症及其相关疾病具有很好的预防作用，为临床防治高脂血症提供了进一步的实验依据。

参考文献：

[1] 沈 涛. 黄连吴茱萸配伍预防高脂饮食大鼠高脂血症形成的实验研究[J]. 成都中医药大学学报，2010，33(3)：40.
[2] 戴万荣，郭金星. 检验医学临床应用[M]. 上海：上海科学普及出版社，2001：83.

和厚朴酚调控 P38 信号通路诱导人宫颈癌 Hela 细胞凋亡的实验研究

谢 雷[1]，秦 斌[1]，张晓坤[1]，陈全成[2*]，曾锦章[1*]
（1. 厦门大学药学院 癌症中心，福建 厦门 361005；2. 厦门大学药学院 天然产物中心，福建 厦门 361005）

摘要：目的 探讨和厚朴酚诱导人宫颈癌 Hela 细胞的凋亡及激活 P38 信号通路之间的关系。**方法** 采用细胞培养技术，用一定浓度的药物处理细胞。应用蛋白印迹技术检测聚腺苷二磷酸核糖聚合酶（PARP）及其切割蛋白水平，聚腺苷二磷酸核糖聚合酶切割蛋白的出现代表细胞起始凋亡；应用蛋白印迹技术检测 P38 蛋白的磷酸化水平，P38 蛋白的磷酸化水平的上调表示 P38 信号通路的激活。利用抑制剂 SB203580 阻断 P38 信号通路，通过这个方法检测和厚朴酚诱导细胞凋亡的变化情况。**结果** 和厚朴酚激活 P38 信号通路与诱导细胞凋亡之间有一定联系。**结论** 和厚朴酚通过调控 P38 信号通路诱导 Hela 细胞的凋亡。

关键词： 和厚朴酚；宫颈癌；信号通路；细胞凋亡
DOI **标识：** doi：10.3969/j.issn.1008-0805.2012.12.005
中图分类号： R285.5 **文献标识码：** A **文章编号：** 1008-0805(2012)12-2958-03

Honokiol Mediates the Apoptosis of Human Cervical Carcinoma Hela Cells by Regulating P38 Signal Pathway

XIE Lei[1], QIN Bin[1], ZHANG Xiao-kun[1], CHEN Quan-cheng[2*], ZENG Jin-zhang[1*]
(1. *Cancer Center, School of Pharmacology, Xiamen University, Xiamen* 361005; 2. *Natural Product Center, School of Pharmacology, Xiamen University, Xiamen* 361005)

Abstract: **Objective** To research the relationship between honokilo inducing the apoptosis of human cervical carcinoma Hela

收稿日期： 2012-05-14； **修订日期：** 2012-08-16
基金项目： 国家自然科学基金（No. 81102332）；福建省自然科学基金（No. 2010J05085）
作者简介： 谢 雷（1985-），男（汉族），辽宁营口人，现为厦门大学硕士研究生，主要从事核受体与癌症研究工作.
* **通讯作者简介：** 陈全成（1977-），男（汉族），福建漳州人，现任厦门大学药学院助理教授，博士学位，主要从事天然产物研究工作.
* **通讯作者简介：** 曾锦章（1965-），男（汉族），福建泉州人，现任厦门大学药学院教授，博士学位，主要从事核受体与癌症研究工作.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

cells and activating P38 signal pathway. **Methods** The cells, which were cultured by cell culture technique, were treated with the drug. The protein level of the poly ADP – ribose polymerase protein and its cleaved fragment were detected by Western – Blotting assays. The appearance of its cleaved fragment indicated the starting of the apoptosis. The phosphorylation of the protein P38 was detected by Western – Blotting assays, the level of its phosphorylation indicates the activation of P38 signal pathway. The P38 signal pathway was blocked by the inhibitor SB203580, the change of honokiol inducing cell apoptosisi was detected with the approach. **Results** Honokiol activated P38 signal pathway and induced cell apoptosis. **Conclusion** Honokiol induces the apoptosis of Hela cells by regulating P38 signal pathway.

Key words: Honokilo;　Cervical Carcinoma;　Signal Pathway;　Apoptosis

宫颈癌是威胁女性健康的主要癌症之一，我国是宫颈癌高发病率地区，在我国宫颈癌的死亡人数在所有癌症中居第四位，仅次于胃癌、食管癌和肝癌，而在世界范围内女性患宫颈癌的死亡率在所有癌症中排名第四位[1]。因此，人们积极地寻找治疗宫颈癌的新型药物，探索药物发挥抗宫颈癌作用的具体机制就显得尤为重要，并且研究药物治疗宫颈癌的具体机制也能为指导病人准确用药提供重要的分子生物学、细胞生物学理论依据。

现今，肿瘤分子生物学的研究热点之一是细胞凋亡与肿瘤发生、发展相关性的研究。传统抗肿瘤药物抗肿瘤效应是通过有效调控细胞凋亡途径中关键蛋白实现的[2]，包括抑制促增殖信号通路关键蛋白的功能，激活抗凋亡通路的关键蛋白的作用[3]，研究药物诱导细胞凋亡的具体机制有利于更好地开发药物，降低传统化疗药物治疗癌症的盲目性[4]。

天然产物中抗癌成分为开发抗癌药物提供丰富的来源，是当今抗肿瘤药物发展的重要方向之一[5]。和厚朴酚是从中药厚朴中分离的，带有烯丙基的连苯二酚类化合物（见图 1），具有一定的抗肿瘤特性。已有文献报道，和厚朴酚具有多种生物学活性，包括抗炎症[6]、抗氧化、抗抑郁、抗肿瘤等生物学活性。和厚朴酚能够诱导肿瘤细胞的凋亡[7]，并且通过抑制血管内皮生长因子受体 2（VEGF2）的磷酸化阻止血管新生。随着对和厚朴酚药物活性的深入研究其治疗疾病的作用机制有待进一步研究。

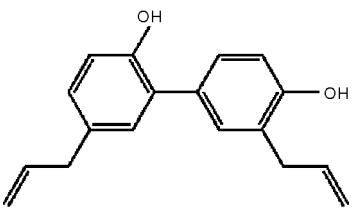

图 1　和厚朴酚的化学结构

丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，存在于大多数细胞中，能够将细胞外信号转导至细胞及其核内。P38 信号通路属于三条 MAPK 家族信号通路中的一条，P38 信号通路能够调控多种生理功能，这些生理功能涉及到炎症、细胞生长和分化、细胞周期及死亡的调控[8]。化合物 CD437 在卵巢癌细胞中通过 P38 信号通路介导的凋亡作用已被证明[9]。P38 信号通路介导的细胞凋亡作用虽然有很多报道。本实验的结果进一步证实在和厚朴酚诱导 Hela 细胞凋亡中 P38 信号通路发挥重要作用。

1　材料

1.1　细胞株　人宫颈癌细胞株 Hela 来源于美国 ATCC（American Type Culture Collection）。

1.2　药品与试剂　和厚朴酚为厦门大学药学院天然产物中心陈全成老师分离和鉴定；Z – VAD – FMK、SB203580 购自 sigma 公司；聚腺苷二磷酸核糖聚合酶（PARP）抗体和 GAPDH 抗体购自 Santa Cruz 公司；P38 和 P38 磷酸化抗体购自 CST 公司；RPMI Medium 1640 培养基、胎牛血清购自 GIBCO 公司；山羊抗鼠、山羊抗兔二抗购自 Thermo 公司；ECL 购自 Pirece 公司。

1.3　仪器设备　CO_2 培养箱（Thermo）；冷冻及常温离心机（Beckman）；Model3550 酶标仪（Thermo）；PowerPac200 电泳仪（BIORAD）；荧光显微镜（Zeiss）。

2　方法

2.1　细胞培养　人宫颈癌 Hela 细胞采用含 10%（体积比）胎牛血清 1640 培养基，含 100 U/ml 链霉素和青霉素，置于 37℃ 含 5%（体积比）CO_2 的细胞培养箱中培养。

2.2　Western blotting 分析　Hela 细胞用蛋白裂解液（50 mmol/L Tris – HCl，pH7.4；150 mmol/L NaCl；5 mmol/L EDTA；1%（体积比）NP – 40；0.005 g/ml 脱氧胆酸钠；0.001 g/ml SDS）冰上裂解 30 min，12 000 r/min 离心 15 min，取上清液，酶标仪 560 nm 进行蛋白浓度定量后置 – 20℃ 备用。配制 8% SDS – 聚丙烯酰胺凝胶，蛋白质 100℃ 变性 10 min，常规变性电泳分离蛋白质，然后利用电转设备在 100V 电压下进行 70 min 的电转后，聚丙烯酰胺凝胶中的蛋白质转移到 PVDF 膜上，用 TBST 配制的 5%（质量 – 体积比）脱脂牛奶封闭 1 h，将一抗以 1∶1 000 用 5%（质量 – 体积比）TBST 配制的脱脂牛奶稀释到工作浓度，用稀释过的一抗 4℃ 孵育过夜，TBST 洗涤 3 次，二抗室温孵育 1 h，TBST 洗涤 3 次，底物 ECL 液与二抗相连的辣根过氧化物酶反应发出荧光，2 min 后在暗室中用 X 线片在显影暗盒中压片，30 min 后将 X 线片进行显影和定影。

2.3　Hela 细胞的显微镜检测　将 10 cm 盘细胞铺到 6 孔板中培养 24 h，待细胞融汇的达到 80% ～90%，在 5%（体积比）胎牛血清 1640 培养基存在的条件下，加药处理 12 h 后，冰冻 PBS 洗涤 3 次，用荧光显微镜（Zeiss）在可见光下进行拍摄。

3　结果

3.1　和厚朴酚诱导人宫颈癌 Hela 细胞的凋亡作用　为了研究和厚朴酚诱导人宫颈癌 Hela 细胞的凋亡作用，我们通过蛋白印迹实验检测聚腺苷二磷酸核糖聚合酶切割蛋白的表达水平。利用泛半胱天冬酶（caspase）抑制剂 Z – VAD – FMK 提前 1 h 处理 Hela 细胞，再用 15 μmol/L 和厚朴酚处理 12 h。我们发现用 15 μmol/L 和厚朴酚处理的 Hela 细胞与未做任何处理的对照组细胞相比较，聚腺苷二磷酸核糖聚合酶切割蛋白的表达量增加。Z – VAD – FMK 提前 1h 处理 hela 细胞后，和厚朴酚对人宫颈癌 Hela 细胞的促凋亡作用被抑制（如图 2），说明和厚朴酚是通过激活半胱天冬酶家族蛋白促进人宫颈癌 Hela 细胞的凋亡。

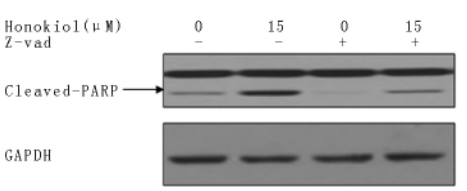

图 2　和厚朴酚诱导 Hela 细胞凋亡

3.2　和厚朴酚对 P38 信号通路的激活与诱导人宫颈癌 Hela 细胞凋亡的同步性　用 15 μmol/L 和 30 μmol/L 两个和厚朴酚浓度梯度处理 Hela 细胞，9 h 后发现凋亡核心蛋白半胱天冬酶切割底物聚腺苷二磷酸核糖聚合酶切割蛋白表达水平逐渐增加。与此同时，P38 蛋白磷酸化水平也逐步增加（如图 3）。这组实验数据说明和厚朴酚激活 P38 信号通路与促进人宫颈癌 Hela 细胞的程

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

序性死亡具有同步性。

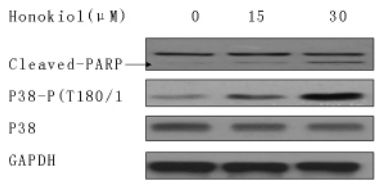

图 3　和厚朴酚激活 P38 信号通路并诱导细胞凋亡

3.3　和厚朴酚通过对 P38 信号通路的激活促进人宫颈癌 Hela 细胞凋亡　在用 p38 抑制剂提前 1h 处理 hela 细胞的情况下，将和厚朴酚和 p38 抑制剂共同处理的 Hela 细胞与单独和厚朴酚处理的 Hela 细胞比较，蛋白质印记结果显示: P38 抑制剂 SB203580 的加入阻止了和厚朴酚诱导 Hela 细胞的凋亡作用，即半胱天冬酶切割底物聚腺苷二磷酸核糖聚合酶切割蛋白增加趋势极大减弱(如图 4) ，利用显微镜在可见光下拍摄 Hela 细胞(如图 5) ，拍摄图片显示单独利用和厚朴酚处理细胞能够产生凋亡作用，Hela 细胞数大大减少，然而加入 P38 抑制剂后，和厚朴酚诱导人宫颈癌 Hela 细胞凋亡途径被抑制，视野中 Hela 细胞的数目没有减少。

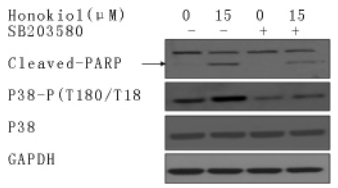

图 4　和厚朴酚调控 P38 信号通路诱导细胞凋亡

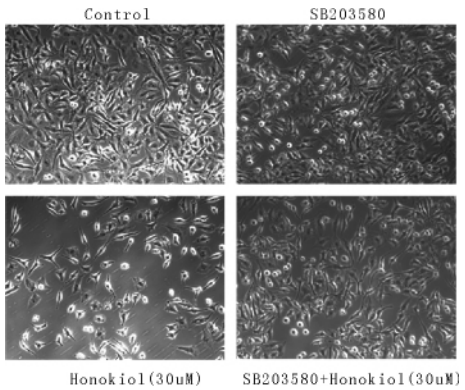

图 5　显微镜检测细胞凋亡

4　讨论

细胞凋亡是细胞程序性死亡的一种方式，是机体保持组织细胞平衡的一种重要机制[10]。癌细胞无限增殖的主要原因之一是: 癌细胞程序性死亡途径被抑制或被阻断。因此，通过重新激活癌细胞程序性死亡途径是抑制癌细胞无限增殖的有效方法。许多抗癌药物诱导癌细胞凋亡的方式就是重新诱导癌细胞的程序性死亡途径激活[2]，但许多抗癌药物具体通过何种途径介导癌细胞的凋亡作用还不是很清楚，为了更好地研究抗癌药物的作用机制，便于抗癌药物的进一步改造和临床应用，研究抗癌药物如何诱导癌细胞凋亡的具体机制就显得尤为重要。

当前，宫颈癌是全世界范围内女性普遍发病率第二高的疾病[11]，极大地威胁着女性的健康状况。迄今，宫颈癌的治疗主要以手术和放疗为主，临床上缺乏有效治疗宫颈癌的化学药物，化学药物抑制宫颈癌的具体作用机制还不是很清楚。因而，利用天然化合物和厚朴酚研究化学药物抑制宫颈癌细胞的具体机制研究是本文的研究重点。在本文中，我们发现和厚朴酚能够诱导体外培养的人宫颈癌 Hela 细胞程序性凋亡作用，同时，和厚朴酚诱导 P38 信号通路的激活。我们进一步研究激活的 P38 信号通路与和厚朴酚促进 Hela 细胞凋亡之间的关系。利用抑制剂 SB203580 抑制 P38 信号通路的激活，在这种情况下和厚朴酚诱导 Hela 细胞的凋亡效应被大大抑制。活体 Hela 细胞的显微镜检测也证明 P38 信号通路在和厚朴酚引起的细胞凋亡中起到重要作用。因此，我们可以得到以下结论: 和厚朴酚调控 P38 信号通路介导宫颈癌 Hela 细胞的凋亡作用。

细胞最终选择走向程序性凋亡是细胞新陈代谢、信号通路等各方面变化的综合结果，我们的研究还发现和厚朴酚对 Hela 细胞的自噬有一定的影响，细胞自噬与细胞凋亡之间存在着复杂的关系，细胞自噬在某种情况下能够抑制细胞凋亡作用，和厚朴酚诱导细胞凋亡和对细胞自噬作用相互关系研究将是我们今后需要进一步研究的课题。

参考文献:

[1] Jemal A，Center M M，De Santis C，et al. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends [J]. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention，2010，19 (8)：1893.

[2] Baselga J，Swain S M. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3 [J]. Nature Reviews Cancer，2009，9 (7)：463.

[3] Los M，Burek C J，Stroh C，et al. ，Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as targets for drug design [J]. Drug Discov Today，2003，8 (2)：67.

[4] Shimizu C，Ando M，Kouno T，et al. ，Current trends and controversies over pre－operative chemotherapy for women with operable breast cancer [J]. Japanese journal of clinical oncology，2007，37 (1)：1.

[5] Cragg G M，Newman D J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads [J]. Pure and applied chemistry 2005，77 (1)：7.

[6] Chao L K，Liao P C，Ho C L，et al. Anti－inflammatory bioactivities of honokiol through inhibition of protein kinase C，mitogen－activated protein kinase，and the NF－κB pathway to reduce LPS－induced TNFα and NO expression [J]. Journal of agricultural and food chemistry，2010，58 (6)：3472.

[7] Xu H，Tang W，Du G，et al. Targeting apoptosis pathways in cancer with magnolol and honokiol，bioactive constituents of the bark of Magnolia officinalis [J]. Drug discoveries & therapeutics，2011，5 (5)：202.

[8] Zarubin T，Jiahuai H. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway [J]. Cell research，2005，15 (1)：11.

[9] Holmes W F，Soprano D R，Soprano K J. Early events in the induction of apoptosis in ovarian carcinoma cells by CD437: activation of the p38 MAP kinase signal pathway [J]. Oncogene，2003，22 (41)：6377.

[10] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death [J]. Toxicologic pathology，2007，35 (4)：495.

[11] Schiffman M，Castle P E，Jeronimo J，et al. Human papillomavirus and cervical cancer [J]. The Lancet，2007，370 (9590)：890.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net