

- targeting miR-193a-5p/BRD4 Axis [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2021, 16: 919-931.
- [11] Tian B, Yang J, Zhao Y, et al. BRD4 Couples NF- κ B/RelA with Airway Inflammation and the IRF-RIG-I Amplification Loop in Respiratory Syncytial Virus Infection [J]. J Virol, 2017, 91 (6): e00007-17.
- [12] Wang Y, Xu J, Meng Y, et al. Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2018, 13: 3341-3348.
- [13] Jolly M K, Ward C, Eapen M S, et al. Epithelial-mesenchymal transition, a spectrum of states: Role in lung development, homeostasis, and disease [J]. Dev Dyn, 2018, 247 (3): 346-358.
- [14] Dave J M, Bayless K J. Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting [J]. Microcirculation, 2014, 21 (4): 333-344.
- [15] Tian B, Li X, Kalita M, et al. Analysis of the TGF β -induced program in primary airway epithelial cells shows essential role of NF- κ B/RelA signaling network in type II epithelial mesenchymal transition [J]. BMC Genomics, 2015, 16 (1): 529.

• 基础研究 •

从 Cyclin E1-CDK2- CKIs 通路探讨芪灵扶正清解方抑制肝癌细胞株 Hep1-6 增殖的作用机制

福建中医药大学中西医结合研究院 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室 (福州 350122) 刘海琴
沈冬伟¹ 吕嘉婧² 罗 秀² 陈旭征 林久茂 章尤权³

【摘要】 目的 从周期蛋白 Cyclin E1-细胞周期依赖性蛋白激酶 2 (CDK2)-CDKs 抑制因子 CKIs (Cyclin E1-CDK2-CKIs) 信号通路角度探讨芪灵扶正清解方 (QL) 调控小鼠肝癌 Hep1-6 细胞株增殖的机制。方法 体外培养 Hep1-6 细胞, 分别给予不同剂量的 QL 醇提物 (0、31.25、62.5、125、250、500、1 000 μ g/mL) 干预 Hep1-6 细胞株 24 h、48 h 和 72 h。MTT 法检测细胞活力; 流式细胞术检测细胞周期各个时相的比例; Western blot 检测 CDK2、周期蛋白 Cyclin E1、视网膜母细胞瘤 Rb、磷酸化 Rb (p-Rb) 以及 CDKs 抑制因子 (CKIs) p57^{KIP2} 和 p27^{KIP1} 的蛋白水平。结果 QL 醇提物能显著抑制 Hep1-6 细胞的生长活力, 呈剂量依赖性; Hep1-6 细胞周期被阻滞在 G0/G1 期, S 期的 DNA 合成被抑制; QL 醇提物下调了 CDK2、Cyclin E1、p-Rb 的蛋白水平, 上调了 p57^{KIP2} 和 p27^{KIP1} 的蛋白水平。结论 QL 方通过抑制 CDK2 与 Cyclin E1 的结合, 同时正向调控 CKIs 抑制 Cyclin E1-CDK2 复合物的激酶活性, 从两方面抑制下游 Rb 的磷酸化水平, 进而有效抑制肝癌 Hep1-6 细胞的增殖。

【关键词】 芪灵扶正清解方; Hep1-6 细胞; 细胞周期; CDK2; CKIs

【中图分类号】 R73-3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2022)01-0111-04

Qiling Fuzheng Qingjie decoction inhibit the proliferation of hepatoma cell line Hep1-6 via Cyclin E1-CDK2-CKIs signaling pathway

LIU Haiqin, SHEN Dongyi, LV Jiajing, LUO Xiu, CHEN Xuzheng, LIN Jiumao, ZHANG Youquan. Fujian Provincial Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine geriatric Diseases, Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of Qiling Fuzheng Qingjie decoction (QL) on the proliferation of hepatoma cell line Hep1-6 via Cyclin E1-CDK2-CKIs signaling pathway. **Methods** Hep1-6 cells were cultured in vitro and treated with different doses of QL ethanol extract (0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1 000 μ g/mL) for 24 h, 48 h and 72 h. Cell viability was detected by MTT method; Flow cytometry was used to detect the ratio of each phase of the cell cycle; Western blot was used to detect cycle-dependent protein kinases CDK2, Cyclin E1, retinoblastoma Rb, phosphorylated Rb (p-Rb) and CDKs inhibitor (CKIs) p57^{KIP2} and p27^{KIP1}. **Results** QL ethanol extract could significantly inhibit the growth activity of Hep1-6 cells in a dose-dependent manner. Cell cycle was blocked in G0/G1 phase, and DNA synthesis in S phase was inhibited. The QL ethanol extract down-regulated the protein levels of CDK2, Cyclin E1 and p-Rb, and up-regulated the protein levels of p57^{KIP2} and p27^{KIP1}. **Conclusion** QL decoction could inhibit the proliferation of hepatoma Hep1-6 cells by inhibiting the binding of CDK2 and Cyclin E1 and positively regulating CKIs to inhibit the kinase activity of Cyclin E1-CDK2 complex, then inhibiting the phosphorylation of Rb.

基金项目: 福建省自然科学基金 (2019J01479), 福建省大学生创新创业训练计划 (S202110393010)

1 福建中医药大学中西医结合学院; 2 福建中医药大学药学院; 3 福建中医药大学附属第二人民医院, 通信作者, Email: cxz5000@sina.com

【Key words】Qi Ling Fuzheng Qingjie decoction; Hep1-6 cells; cell cycle; CDK2; CKIs

据 GLOBOCAN 发布的 2020 年全球癌症死亡率的数据显示,肝癌的死亡率达到 8.3%,仅次于肺癌和结直肠癌^[1]。起病隐匿、肿瘤生长迅速、多药耐药和高复发转移率是目前肝癌患者难以提高生存率的主要原因。芪灵扶正清解方(qiling fuzheng qingjie decoction, QL)是福建中医药大学附属第二人民医院杜建教授经验方、院内制剂,是消化道肿瘤患者围手术期和围放化疗期的辅助用药,具有很好地控制肿瘤复发转移的功效^[2]。然而 QL 方抗肿瘤的作用机制尚未完全阐明。我们前期利用分子对接计算机模拟技术发现 QL 方中黄芪、女贞子、白花蛇舌草和夏枯草的分子成分与细胞周期依赖性蛋白激酶 2(Cyclin dependent kinase 2, CDK2)有较强的结合作用,CDK2 可能是 QL 方抗肿瘤的作用靶标之一^[3]。为进一步探讨 QL 方抗肿瘤的作用机制,我们基于与细胞周期调控关系密切的 Cyclin E1-CDK2-CKIs 调控网络,探讨 QL 方调控肝癌细胞周期的作用机制,为指导 QL 方的临床用药提供宝贵的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料:芪灵扶正清解方(购自福建中医药大学附属第二人民医院,批号:Z20120004),小鼠肝癌细胞株 Hep1-6(由福州孟超肝胆医院馈赠),MTT(中国 Solarbio 公司),Cyclin E1、CDK2、p27^{KIP1}、p53^{KIP2}、GAPDH 等一抗及二抗(中国 Proteintech 公司),视网膜母细胞瘤 Rb、磷酸化 Rb(p-Rb)(美国 Cell signaling technology 公司),细胞周期检测试剂盒(南京凯基生物科技有限公司),倒置显微镜(德国 Leica 公司),流式细胞仪(美国 BD 有限公司)。

1.2 QL 乙醇提取物的制备:将 QL 药材(黄芪 30 g、女贞子 15 g、灵芝 30 g、山药 15 g、白花蛇舌草 30 g 和夏枯草 15 g)粉碎后称重,进行两次回流提取。第 1 次料液比(药材质量:酒精体积)=1:3(单位:kg/L),将称量好的酒精浸泡药材 2 h,于水浴锅 85℃回流提取 1 h,于液体稍微沸腾时开始计时,收集滤液;第 2 次药液比(药材质量:酒精体积)=1:3(单位:kg/L),提取方法如上。后合并两

次滤液,于 60℃,30 rpm 旋转蒸发仪上旋蒸,挥干备用。

1.3 细胞培养:按照实验需求将 Hep1-6 细胞培养在 37℃、含 5% CO₂ 培养箱中,胰酶消化 1~2 min,离心重悬后传代。待细胞长至对数期,开始展开后续实验。

1.4 MTT 进行细胞活力检测:细胞接板后,加不同浓度(0、31.25、62.5、125、250、500、1 000 μg/mL)的 QL 分别干预 24、48、72 h 后,每孔加入 0.5 mg/mL MTT 溶液,孵育 4 h 后,再加入 DMSO 溶液。在酶标仪 570 nm 处进行吸光度(A)检测。计算 Hep1-6 细胞活力(%)=给药组的 A/(0 μg/mL)组的 A×100%。

1.5 细胞形态的观察:在 6 孔板中接种 Hep1-6 细胞,密度为 1×10⁵ 个/mL。按照上述分组(0、62.5、125、250、500 μg/mL)加药,24 h 后在倒置显微镜下进行细胞形态观察。

1.6 细胞周期检测:将分组(0、62.5、125、250、500 μg/mL)加药干预 24 h 后的单细胞悬液按照细胞周期检测试剂盒说明书进行染色。用流式细胞仪检测 Hep1-6 细胞周期分布,并采用 ModFit 软件分析细胞 G0/G1、S、G2/M 期的百分比情况。

1.7 Western blot 检测相关蛋白:分组(0、62.5、125、250、500 μg/mL)加药干预 24 h 后提取总蛋白,变性、电泳、转膜、封闭、洗涤、一抗、洗涤、二抗、洗涤、ECL 显影观察并进行条带的检测和分析。

1.8 数据处理与统计:数据结果采用 SPSS 22.0 软件进行分析统计,多组数据符合正态分布的,采用单因素方差分析进行比较。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 QL 醇提物对 Hep1-6 细胞活力的影响:Hep1-6 细胞在给予不同浓度(0、31.25、62.5、125、250、500、1 000 μg/mL) QL 处理 24、48、72 h 后活力被显著抑制,并且呈现一定剂量依赖性,见表 1。镜下观察可见到伴随着 QL 浓度的增加, Hep1-6 细胞的生长密度明显减少(图 1)。

表 1 不同浓度 QL 醇提物对 Hep1-6 细胞生长活力的影响

时间	浓度						
	0	31.25 μg/mL	62.5 μg/mL	125 μg/mL	250 μg/mL	500 μg/mL	1 000 μg/mL
24 h	0.25±0.02	0.24±0.02	0.24±0.03	0.21±0.02 [*]	0.17±0.01 [#]	0.12±0.00 [#]	0.11±0.01 [#]
48 h	0.29±0.01	0.28±0.01	0.25±0.01 [*]	0.23±0.01 [#]	0.13±0.02 [#]	0.08±0.00 [#]	0.08±0.00 [#]
72 h	0.75±0.04	0.57±0.06 [#]	0.54±0.03 [#]	0.49±0.05 [#]	0.24±0.09 [#]	0.09±0.00 [#]	0.09±0.00 [#]

注:与 0 g/mL 组比较, * $P<0.05$, # $P<0.01$ 。

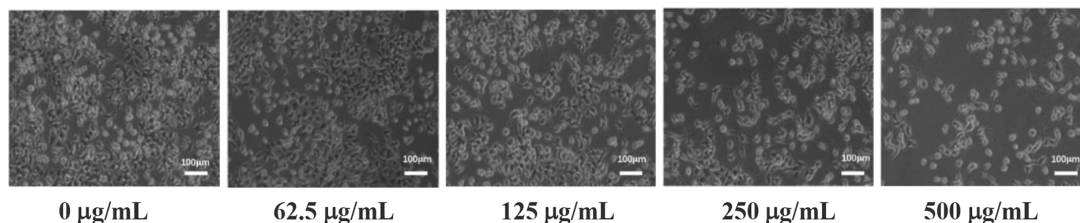


图 1 倒置显微镜观察不同浓度 QL 对 Hep1-6 细胞生长密度的影响(×200)

2.2 QL 醇提取物对 Hep1-6 细胞周期分布的影响: 与 0 g/mL G₀/G₁ 期百分比逐渐升高, 而 S 期百分比逐渐降低。见表 2。

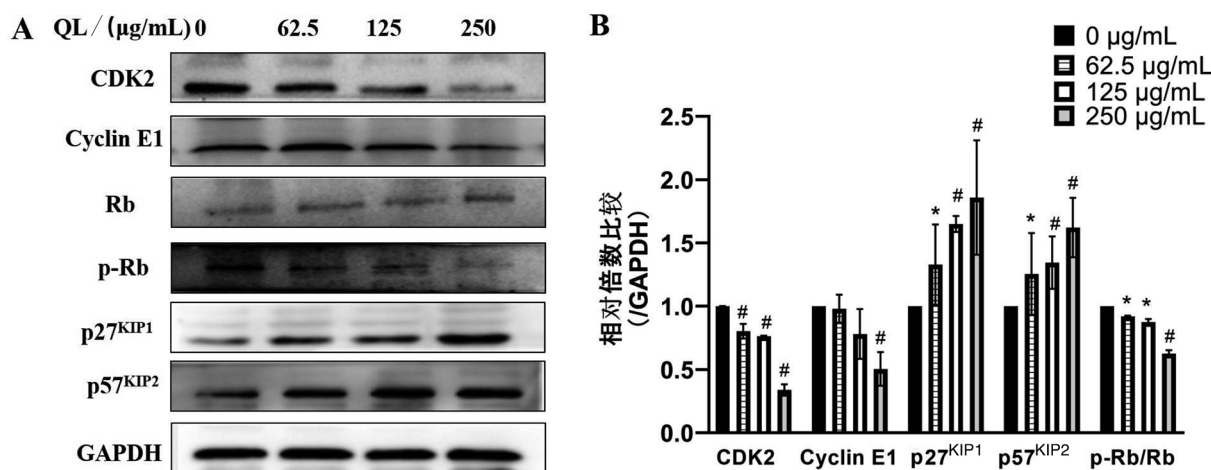
表 2 PI 染色检测 QL 浓度对 Hep1-6 细胞周期的影响 (%)

周期	浓度				
	0 $\mu\text{g/mL}$	62.5 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$
G ₀ /G ₁	37.02 \pm 0.88	44.59 \pm 0.82 *	54.22 \pm 1.32 *	58.19 \pm 1.32 *	79.04 \pm 1.20 *
S	54.29 \pm 1.29	46.4 \pm 2.07 *	38.39 \pm 1.14 *	28.5 \pm 2.15 *	14.96 \pm 0.93 *
G ₂ /M	8.69 \pm 0.61	9.01 \pm 0.31	7.38 \pm 0.57	13.30 \pm 0.87 *	6.00 \pm 0.31

注: 与 0 g/mL 组比较, * $P < 0.01$ 。

2.3 QL 醇提取物对 Hep1-6 细胞 CDK2、Cyclin E1、Rb、p-Rb、P27^{KIP1}、p57^{KIP2} 表达的影响: 如图 2 所示, 随着浓度的逐渐升高, QL 醇提取物可引起 Cyclin E1、CDK2、p-Rb 蛋白

水平的降低, 上调了 p27^{KIP1} 和 p57^{KIP2} 的表达水平, 对 Rb 蛋白的影响不大, p-Rb/Rb 比值下降。



注: A 为 Western blot 代表图; B 为各组蛋白灰度值比较的统计图; 与 0 g/mL 组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$ 。

图 2 QL 对 Hep1-6 细胞 CDK2、CyclinE1、Rb、p-Rb、p27^{KIP1}、p57^{KIP2} 蛋白水平的影响

3 讨论

QL 方由黄芪、女贞子、灵芝、山药、白花蛇舌草和夏枯草组成。方中黄芪、女贞子益气养阴, 为君药; 灵芝、山药为臣, 取其扶正培本之功; 夏枯草、白花蛇舌草清热解毒、消痞散结, 合为佐使。诸药合用, 达到益气养阴、清热解毒之功。前期的研究我们发现 QL 方能够通过线粒体通路诱导肿瘤细胞凋亡、抑制增殖, 显著提高肿瘤机体的细胞免疫功能, 减少化疗的毒副反应^[4-5], 是值得研究和开发的抗癌辅助用药。

众所周知, 恶性肿瘤主要是由于机体多基因突变, 癌基因与抑癌基因平衡失调, 导致细胞周期紊乱、细胞呈现失控性生长引起的。有丝分裂 3 个重要的检查点: G₁/S 转折、G₂/M 转折和 M/G₁ 关卡的失活, 是细胞周期调控机制紊乱的重要原因^[6]。为探讨 QL 方抑制肿瘤细胞增殖的机制是否与调控细胞周期检查点有关, 本研究首先应用 CCK8 方法观察不同浓度 QL 醇提取物分别作用肝癌 Hep1-6 细胞 24 h、48 h 和 72 h 后对 Hep1-6 细胞生长的影响, 结果发现, 随着浓度剂量的升高和作用时间的延长, QL 方能够明显抑制 Hep1-6 的生长。倒置显微镜也观察到细胞生长密度随着 QL

剂量的升高而减少。流式细胞术检测细胞周期的结果显示, 随着 QL 方剂量的升高, Hep1-6 细胞 S 期明显受到抑制, G₀/G₁ 期百分比逐渐升高, 具有剂量依赖性, 提示 QL 方可以明显阻滞 Hep1-6 细胞在 G₀/G₁ 期, 抑制细胞从 G₁ 期向 S 期转变, 通过调控 G₁/S 检查点抑制 Hep1-6 细胞的增殖。

细胞周期检查点的调控主要是由周期蛋白 (Cyclin) 与细胞周期依赖的蛋白酶 (Cyclin dependent kinases, CDKs) 结合, 激活特异性的 CDKs 分子, 触发下游靶分子的激活, 最终导致 DNA 的复制和有丝分裂, 启动 G₁-S-G₂-M 的周期循环。在目前发现的 CDKs 家族成员中, CDK2 是研究最为深入的 CDKs 之一。它是 G₁/S 转折点非常关键的蛋白激酶^[7]。当 CDK2 与 Cyclin E 结合活化后, CDK2 分子通过其丝氨酸/苏氨酸激酶活性, 磷酸化底物 Rb, 磷酸化的 Rb 与转录因子 E2F 的功能区分离, E2F 转录功能活化, 启动靶基因 DNA 复制, 细胞因此由 G₁ 期进入 S 期。沉默 CDK2 基因或使用 CDK2 拮抗剂选择性地抑制 CDK2 后, 肿瘤细胞表现出明显的 G₀/G₁ 期周期阻滞现象^[8-9]。CDKs 的活性除受到 Cyclin 的正向调节外, 还受到 CDKs 抑制因子 (Cyclin dependent kinase inhibitors, CKIs) 的负向调控。p27^{KIP1}、

p57^{KIP2}属于 CKIs 家族成员,它们的 N 末端含有与 CDKs 结合的区域,被发现可以抑制几乎所有的 cyclin-CDKs 复合物的激酶活性,进而抑制细胞周期 G1/S 的转变。为探讨 QL 方将 Hep1-6 细胞周期阻断在 G1/S 关卡的分子机制,我们检测了 QL 方对 CDK2、Cyclin E1、Rb 以及 p27^{KIP1}、p57^{KIP2}蛋白水平的影响。结果发现,QL 方显著下调了 CDK2 的蛋白水平,且呈现剂量依赖性。这与我们前期利用分子对接技术,筛选出 QL 方中黄芪、女贞子、白花蛇舌草和夏枯草的分子成分可以与 CDK2 有较强的结合作用相符^[3]。此外我们还发现,QL 方也下调了 Cyclin E1 的蛋白水平和 Rb 的磷酸化水平,上调了 p27^{KIP1}、p57^{KIP2}的蛋白水平,这说明 QL 方不仅抑制了 Cyclin E-CDK2 复合物的生成,还通过正向调控 CKIs 抑制 Cyclin E-CDK2 复合物的激酶活性,进而抑制 Rb 的磷酸化,使得 E2F 不能发挥转录功能,细胞周期阻滞在 G0/G1 期。

可见,QL 方可以通过 Cyclin E1-CDK2-CKIs 通路,有效阻滞 Hep1-6 细胞周期的进程,抑制 Hep1-6 细胞的增殖。这一结论为 QL 方在临床上的运用提供有力的实验依据。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209-249.
- [2] 蔡立业. 扶正清解方加减对气阴两虚型胃癌根治术后化疗的临床疗效观察 [D]. 福建: 福建中医药大学, 2013.
- [3] 陈立武, 郑春松, 杜建. 用分子对接法探讨清热消痰饮的抑瘤作用机制 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12 (3): 324-328.
- [4] Chen X Z, Cao Z Y, Zhang Y Q, et al. Fuzheng Qingjie granules inhibit growth of hepatoma cells via inducing mitochondria-mediated apoptosis and enhancing immune function [J]. Integr Cancer Ther, 2017, 16 (3): 329-338.
- [5] Chen X Z, Li J N, Zhang Y Q, et al. Fuzheng Qingjie recipe induces apoptosis in HepG2 cells via P38 MAPK activation and the mitochondria-dependent apoptotic pathway [J]. Mol Med Rep, 2014, 9 (6): 2381-2387.
- [6] Kawabe T. G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs [J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3 (4): 513-519.
- [7] Lim S, Kaldis P. Cdk, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation [J]. Development, 2013, 140 (15): 3079-3093.
- [8] Štefaníková A, Klacanová K, Pilchová I, et al. Cyclin-dependent kinase2 inhibitor SU9516 increases sensitivity of colorectal carcinoma cells Caco-2 but not HT29 to BH3 mimetic ABT-737 [J]. Gen Physiol Biophys, 2017, 36 (5): 539-547.
- [9] Tang J, Wang F, Cheng G, et al. Wilms' tumor 1-associating protein promotes renal cell carcinoma proliferation by regulating CDK2 mRNA stability [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37 (1): 40.

• 基础研究 •

右美托咪啶预处理对改善谷氨酸诱导神经元活化与小鼠焦虑样行为的研究

厦门大学附属福州第二医院麻醉科 (福州 350007) 陈晓梅 卢晨昕

【摘要】 目的 评价右美托咪啶预先处理改善谷氨酸诱导 HT22 神经元活化与小鼠焦虑样行为。方法 体外培养 HT22 神经元, 予 0、0.5、1、5、10、20 mM L-谷氨酸孵育 3、6、12、24 h, 采用 Calcein AM 染色检测细胞活率; 予 0.05 和 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 右美托咪啶 (Dex)、AMPA 受体拮抗剂 (DNXQ)、抗组胺剂哌罗克生 (Piperoxan) 预先处理 HT22 细胞后, 采用 1 mM 和 5 mM L-谷氨酸孵育 12 h, 检测乳酸脱氢酶 (LDH) 释放和活性氧 (ROS) 产生。基底外侧杏仁核内立体定位注射 L-谷氨酸诱导小鼠抑郁样行为, 予 1 μL (50 $\mu\text{g/mL}$)、1 μL (100 $\mu\text{g/mL}$) Dex、DNXQ、Piperoxan 预先处理, 采用旷场和高架十字迷宫实验检测小鼠焦虑样行为。**结果** L-谷氨酸处理 HT22 细胞呈浓度和时间依赖性诱导细胞死亡; 与 CONT 组相比, Glu 组细胞内游离 Ca^{2+} 含量、LDH 释放率和 ROS+HT22 比例显著增高 ($P<0.05$), 且可被 DNQX 和 Dex 逆转 ($P<0.05$); 与 Glu+Dex 组相比, Piperoxan 预先处理可逆转 Dex 对 HT22 的保护作用 ($P<0.05$)。与 CONT 组相比, Glu 组旷场中央区域活动时间百分比、高架十字迷宫开臂停留时间百分比和开臂进入次数百分比显著降低 ($P<0.05$), 且可被 DNQX 和 Dex 逆转 ($P<0.05$); 与 Glu+Dex 组相比, Piperoxan 预先处理可逆转 Dex 的抗焦虑作用 ($P<0.05$)。**结论** Dex 通过激活 α_2 -肾上腺素受体, 抑制谷氨酸诱导的胞内钙离子浓度升高、神经元过度活化和氧化应激, 并有效改善小鼠焦虑样行为的产生。

【关键词】 焦虑障碍; 谷氨酸; 右美托咪啶

【中图分类号】 R614 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2022)01-0114-04