

# 三七总甙对 NB4 细胞核转录因子 B 及组织因子表达的影响

李晓红,董作仁,罗建民,刘泽林,郝洪岭

The Effect of Panax Notoginseng Saponins on Nuclear Factor- $\kappa$ B and Tissue Factor in NB4 Cells

LIXiao-hong, DONGZuo-ren, LUOJian-min, LIUZe-lin, HAOHong-ling

Department of Hematology, The Second Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of Panax notoginseng saponins (PNS) on nuclear factor- $\kappa$ B and tissue factor in NB4 cells. **Methods** The effects of PNS on TF mRNA, p65 and I $\kappa$ B expression were evaluated by RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** PNS down-regulated the expression of TF mRNA. PNS inhibited the expression of I $\kappa$ B and nuclear p65. **Conclusion** PNS could down-regulate the expression of TF mRNA by inhibition of NF- $\kappa$ B pathway.

**Keywords:** Panax notoginseng (PNS); NB4 cell; NF- $\kappa$ B; I $\kappa$ B; Tissue factor

**摘要:**目的 通过核转录因子 NF- $\kappa$ B 及其抑制因子 I $\kappa$ B 的表达探讨三七总甙 (Panax notoginseng saponins, PNS) 对 NB4 细胞组织因子的调控机制。方法 用三七总甙处理 NB4 细胞, 分别于处理后 24h、48h、72h、96h、120h 收获细胞, 半定量逆转录 PCR 检测 TF-mRNA 的表达; Western 蛋白印迹检测细胞内 NF- $\kappa$ B 的亚单位 p65 及 I $\kappa$ B 的蛋白, 以及核蛋白 p65 的表达。结果 三七总甙处理 NB4 细胞 24h, TF-mRNA 表达开始下降, 120h 完全抑制。Western blot 显示三七总甙抑制细胞内 I $\kappa$ B 及核蛋白 p65 的表达。结论 三七总甙抑制组织因子的表达, 可能是通过抑制 NF- $\kappa$ B 的活化起作用。

**关键词:**三七总甙; NB4 细胞; NF- $\kappa$ B; I $\kappa$ B; 组织因子

中图分类号: R73-3 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)04-0195-03

## 0 引言

急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 是一种有严重出血倾向的白血病, APL 细胞表面异常表达组织因子 (Tissue factor, TF), 是导致凝血活性增高, 引起弥散性血管内凝血 (DIC) 的主要因素, 但组织因子表达的调控机制并不清楚, 本研究用三七总甙 (Panax notoginseng saponins, PNS) 处理 APL 细胞株 NB4 细胞, 通过检测核转录因子 NF- $\kappa$ B 及其抑制物 I $\kappa$ B 的表达, 探讨三七总甙降低 NB4 细胞组织因子表达的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 主要药物及试剂** 三七总甙购自云植药业, 用不含血清的 RPMI1640 培养液配成工作液浓度。TRIzol RNA 提取试剂盒购自 Gibco 公司, 组织因子引物由华美生物工程公司合成, 随机引物及 M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司, TaqDNA 聚合酶购自华美生物工程公司。p65 单抗及 I $\kappa$ B 多抗购自 Santa Cruz 公司。

**1.2 细胞培养** NB4 细胞培养于含 10% 灭活胎牛血清 (Gibco BRL), 青霉素 100U/ml 及链霉素 100U/ml 的 RPMI1640 培养液中, 于 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度为 100%, 37℃ 培养箱中悬浮培养, 每 2~3 天传代 1 次。三七总甙 200μg/ml 作用于对数生长期细胞。

**1.3 组织因子 mRNA 测定** 收获经 200μg/ml PNS 作用 0h、24h、48h、72h、96h、120h 的 NB4 细胞, Trizol 一步法提取细胞总 RNA, 电泳鉴定 RNA 质量并用紫外分光光度计 (TU-1800, 北京通用) 定量。逆转录后, PCR 扩增, 引物设计与扩增参照文献 [1]。TF 上游引物 (575-594bp): 5'-GAAGGAACAACA CTTTCCTA-3', 下游引物 (788-765bp): 5'-GG GCTGTCTGTACTCTTCCGGTTA-3', 扩增条件为 94℃, 30s; 60℃, 30s; 72℃, 45s; 35 个循环, 72℃ 延伸 10min, 扩增片段长度 213bp。15g/L 的琼脂糖凝胶电泳 (含 EB 5μg/ml), 90v, 40min, 在紫外线灯下观察结果, 读胶仪 (AlphaImager™ 1220 & documentation Analysis System, AlphaInnotech Corporation, USA) 扫描定量, 以 TF/GAPDH 的比值代表 TF mRNA 的表达丰度。

**1.4 蛋白提取** 收获经 200μg/ml PNS 作用 0h、24h、48h、72h、96h 的 NB4 细胞 5 × 10<sup>6</sup>, 参照 Andrews<sup>[2]</sup> 方法提取蛋白, 细胞悬于低渗液, 4℃ 孵育

收稿日期: 2003-10-08; 修回日期: 2004-01-12

作者单位: 050000 石家庄, 河北医科大学第二医院血液

科

20min, 2000 ×g 离心 10min, 吸取上清液, 上清液 12000 ×g 再离心后 -20 保存, 测细胞浆蛋白。重悬细胞核于高渗液, 4 孵育 30min, 12000 ×g 离心 10min, 上清液 -70 保存, 检测核蛋白。

1.5 Westernblot 检测(参照《分子克隆》实验指南), 考马斯亮兰法进行蛋白定量, 上样 60μg, 以 10% 分离胶, 5% 浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳, 然后在半干式电转槽转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭液封闭 1h, 分别用 p65 单抗及 I B 多抗(1 500 稀释)反应过夜, 0.05% Tween PBS 洗 3 遍, 辣根过氧化酶标记的二抗(1 500 稀释)室温结合 1h, 再用 DAB 显色试剂盒显色 10min, 结果用扫描仪扫描。

## 2 结果

### 2.1 三七总甙可下调组织因子 TFmRNA 的表达

PCR 产物可见 374bp (GAPDH), 213bp p (TF) 条带。对照组 (PNS 处理 NB4 细胞 0h) TFmRNA 与内参照比值为 40.8%, 经 200μg/ml PNS 处理的 NB4 细胞, 24 小时比值降至 14.9%, 120 小时被完全抑制。PNS 在 mRNA 水平下调组织因子的表达, 见图 1。

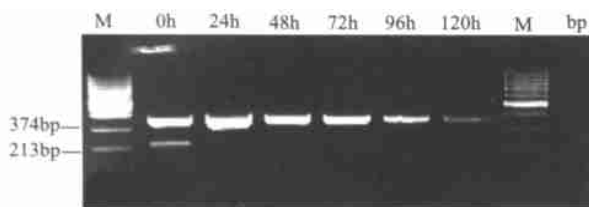


图 1 组织因子 TFmRNA 的表达

M 为 Marker, 213bp p 为 TFmRNA, 374bp 为内参照 GAPDHmRNA

2.2 细胞浆 NF B 及其抑制物 I B 的表达 三七总甙 200μg/ml 处理的 NB4 细胞, 24 小时表达下降, 96 小时后几乎测不出。细胞内的 NF B 的亚单位 p65 表达无显著影响, 见图 2。

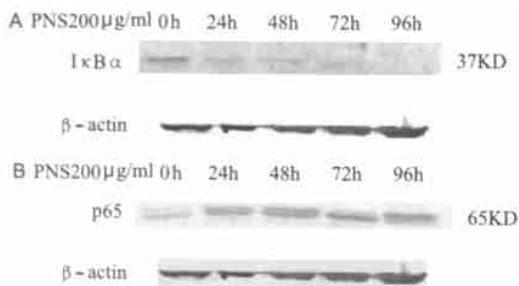


图 2 Westernblot A 图为三七总甙 200μg/ml 处理的 NB4 细胞 I B 蛋白表达, 24 小时表达下降, 96 小时完全抑制。B 图为细胞内 p65 表达, 显示用药后 p65 表达有增加趋势

### 2.3 核转录因子 NF B 在细胞核内的变化见图

western 蛋白印迹显示, 三七总甙 200μg/ml 处理的 NB4 细胞, 随用药时间延长, p65 蛋白表达减少。

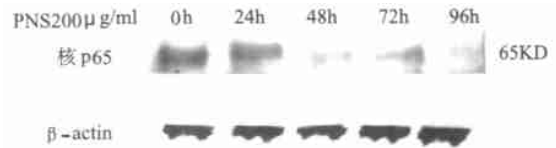


图 3 Westernblot 三七总甙 200μg/ml 处理的 NB4 细胞, 细胞核内 p65 表达

## 3 讨论

以往的研究证实<sup>[3,4]</sup>, NB4 细胞的促凝活性是由细胞表面组织因子决定的, 组织因子与血浆中的 FVII 结合, 共同激活 FX, 由此进入外源性凝血途径, 促进血液凝固。本实验用三七总甙作用于 NB4 细胞, 检测其对组织因子 mRNA 的影响, 显示三七总甙显著抑制 TFmRNA 的表达。表明三七总甙通过抑制 TFmRNA 的转录, 减少了组织因子的合成释放。

NF B 是一种核转录因子, 存在于多种细胞, 参与炎症、免疫、细胞增殖和凋亡等多种基因调控及早期反应基因的表达<sup>[5]</sup>。在静止细胞内, NF B 与其抑制物 I B 相结合存在于细胞浆中, 当细胞受到外界因素刺激时, I B 磷酸化, 进一步降解, NF B 就被释放, 激活, 从胞浆进入核内, 与基因启动子上的 B 序列特异性结合, 启动有关基因的表达与调控。研究证实<sup>[6]</sup> 组织因子 TF 基因的 5' 上游调控区中存在 NF B 的结合位点, 血管内皮细胞及单核细胞的 TF 基因受 NF B 启动和调控。

本实验用 Westernblot 方法检测 NF B 的亚单位 p65 及抑制物 I B 的表达, 结果显示 NB4 细胞在未经处理时, 细胞核内 NF B 的表达较高, 三七总甙作用 NB4 细胞 24 小时后, I B 的表达即明显下降, 在 96 小时几乎检测不到。细胞核内 p65 的表达也有显著变化, 随作用时间延长, 表达逐渐下降, 但细胞浆内的 p65 蛋白则有增加趋势。结果显示, 三七总甙并不是通过减少细胞内 NF B 而起作用, 而是通过抑制 I B 的降解, 抑制了 NF B 的核易位, 减少了核转录因子 B 的活化, 作为组织因子的上游调控因子, 进而阻止了组织因子基因表达的启动, 降低 TFmRNA 的水平, 减少组织因子的合成释放, 发挥抗凝作用。

三七是活血止血的代表药, 三七总甙是从中药三七中提取的有效成分, 本实验从信号转导途径探讨其抗凝机制, 有助于寻找新的抗凝药物及控制

DIC 的方法。

参考文献:

[1] PeterBHVanDeursen,AdrieWGunther,CarolineC,etal.A novel quantitativemulti plexNASBAmethod:a pplication to mea - suringtissuefactorandCD14mRNAlevelsinhumanmonoc ytes [J].NucleicAcidsResearch.1999,27 (17):e15 - .

[2] AndrewsNC,FallerDV,Ara pidmicro preparationontechni quefor extractionofDNA -binding proteinsfromlimitin gnumbersof mammaliancells[J].NucleicAcidsRes,1991,19 (9):2499.

[3] KayamaT,HirosawaS,KawamataN,etal.All -transretinoic acidu pregulatesthrombomodulinanddownre gulatestissuefactor

expressioninacute promyelocyticleukemiacells:distinctex pression ofthrombomodulinandtissuefactorinhumanleukemiccells[J]. Blood,1994,84:3001 -3009.

[4] 赵维莅,王鸿利,郭为民,等.急性早幼粒细胞白血病维甲酸和 砷剂治疗期间组织因子改变的研究[J].中华血液学杂志, 1998,19 (9):473.

[5] ChenF,CastranovaV,ShiXL.NewInsi ghtsintotheoleofnu - clearfactor - Bincell growthre gulation[J].AmericanJournalof Pathology,2001,2 (8):387-397.

[6] H lschemannH,lschemannH,D ürfeldF,MausU.C yclosporine Ainhibitstissuefactorex pressioninmonoc ytes/macrophages[J]. Blood,1996,88 (10):3837-3845.

[编辑:刘红武;校对:周永红]

短篇 个案

扬中市 1991 ~ 2000 年肺癌发病情况分析

周 琴,王建明,李茂生,华召来

关键词:肺癌;发病率;流行病学

中图分类号:R734.2 文献标识码:D

文章编号:1000-8578(2004)04-0197-01

0 引言

肺癌是严重危害人们身体健康的常见恶性肿瘤,目前在国内外许多城市已成为居民死亡的首要原因,为探讨农村地区肺癌发病状况,我们对江苏省扬中市 1991 ~ 2000 年肺癌发病资料进行了分析。

1 资料与方法

1.1 资料来源 资料来源于扬中市肿瘤防治研究所发病登记报告系统。全部病例按 ICD-9 分类,经核实后采用,错报、漏报率 <5%,死亡报告补发病登记数 <10%。人口资料由统计局提供,按 1982 年全国人口构成进行标化。

1.2 统计分析 应用 EPI6、EXCEL 等软件建库、分析,数据均经两次录入,核对无误后采用。地区聚集性检验采用 Poisson 分布配合适度  $\chi^2$  检验,  $\chi^2 = (O-T)^2/T$ 。

2 结果

2.1 基本情况 10 年间全市新发恶性

肿瘤 9925 人,其中肺癌 474 例,占 4.93%,标化发病率为 17.16/10 万,位居恶性肿瘤发病谱第 4 位。

2.2 性别分布 男性发病率高于女性,前 5 年男女性标化发病率为 18.30/10 万、3.36/10 万,男女性别比 5.45 :1。后 5 年男女性标化发病率为 18.43/10 万,女性 6.55/10 万,男女性别比 2.81 :1。

2.3 年龄分布 扬中市 1991 ~ 2000 年肺癌发病年龄呈明显的偏态分布,平均发病年龄 63.5 岁,70 ~ 75 岁达其峰值。

2.4 时间趋势 1991 ~ 1995 肺癌标化发病率为 10.20/10 万,1996 ~ 2000 年标化发病率为 13.49/10 万。前后 5 年发病率比较,发病率上升明显。

2.5 地区聚集性 据资料分析 10 年发病率数据,以平均发病率为理论标准,进行 Poisson 分布配合适度  $\chi^2$  检验,  $\chi^2 = 18.66$ ,自由度 = 11-2=9,  $P < 0.05$ ,实际分布与理论分布间差异具有统计学意义,说明扬中市肺癌还呈现明显的地区聚集性,油坊镇、三跃镇发病率较高,而新坝、三茅镇较低。

3 讨论

肺癌是一种发病率与死亡率都很高的恶性肿瘤,与其它地区相比,扬中市肺癌发病特点为男性发病率相对较高,女性发病率上升明显,后 5 年较前 5 年增长了约 1 倍,提示女性是扬中市肺癌防治工作中一个不容忽视的重要群体。

扬中是我国恶性肿瘤高发地区之一。近年来,该市经济发展迅速,为全国农村综合实力百强县(市)之一。但环境污染治理滞后,人群吸烟率及被动吸烟率上升,这可能是该地区居民肺癌发病率增加的一个主要原因。同时扬中市农村妇女仍是家务劳动的主力,做饭以柴草灶、煤炉为主。居民烹调用油量显著增加,油烟污染较重。这也可能是女性肺癌发病率上升的另一原因。此外,扬中市居民肺癌发病率存在地区聚集性,各镇发病率存在差异,可能与不同地区存在的环境污染种类、污染程度不一致,或者是居民遗传易感性存在差异有关,发病原因尚待进一步研究。

总之,肺癌已成为扬中市一个重要的公共卫生问题,特别是女性肺癌值得引起重视。积极开展其病因学研究,制定有针对性的高危人群预防策略和措施,对指导人群预防实践,降低发病率和死亡率具有重大的现实意义。

[编辑:李奇明;校对:贺文]

收稿日期:2003-04-08;修回日期:2003-07-23  
作者单位:212200 江苏省扬中市肿瘤防治研究所

