

# 人类 Ago2 蛋白与肿瘤的关系研究

林爱琴, 赵跃华\* (皖南医学院基础医学院医学生物学教研室, 安徽芜湖 241001)

**摘要** Argonaute2(Ago2)蛋白是 RNA 诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)的核心元件, 不仅在 miRNA/siRNA 通路中促使靶 mRNA 降解或抑制其蛋白质翻译, 调节 miRNAs 生物合成和成熟, 对生物生长发育、干细胞分化和肿瘤形成等有密切关系。

**关键词** Argonaute2; RISC; 翻译抑制; 肿瘤

**中图分类号** S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)11-03169-03

## Study on Relationship of Human Ago2 Protein and Tumors

LIN Ai-qin, ZHAO Yue-hua (Department of the Medical Biology, Wannan Medical College, Wuhu, Anhui 241001)

**Abstract** Argonaute2(Ago2) protein, the core of RNA-induced silencing complex(RISC), complexed with the guide strand of a small interfering RNA(siRNA) or a microRNA(miRNA) and ubiquitously expressed and binded to siRNAs or miRNAs to guide post-transcriptional gene silencing either by destabilization of the mRNA or by translational repression. It has important functions in processes as diverse as embryonic development, cell differentiation and tumor biogenesis.

**Key words** Argonaute2; RISC; Translational repression; Tumor

Ago 蛋白最初是从一种黑腹果蝇  $S_2$  细胞中分离出来的, 后来发现在生物体中广泛分布且结构高度保守, 它们都是分子量大约都在 100 kD 的碱性蛋白<sup>[1]</sup>, 又称为 GERP<sup>95</sup> (Golgi ER Protein 95 ku) 即与高尔基体和内质网膜相关的蛋白。多种生物基因组分析表明, 不同种群参与 Ago 编码的基因数量从 1~27 不等<sup>[2]</sup>。哺乳动物有 8 个基因参与编码 Ago, 这个家族成员在结构上典型特征是 Ago 的 N 端含有 130 氨基酸的 PAZ 结构域、Mid 结构域和在 C 末端含有 300 个氨基酸组成的 Piwi 结构域<sup>[3]</sup>, 这 3 个结构域对于 Ago 蛋白的功能发挥着重要作用。虽然 Ago 家族成员都具有类似的结构, 但研究表明只有 Ago2 才是 RISC 中功能组分<sup>[4]</sup>。笔者就人类的 Ago2 结构与功能进行综述。现报道如下。

## 1 人类 Ago2 结构研究

2002 年, Martinez 等在 siRNA 3' 端标记生物素, 在人 HeLa 细胞抽提物中得到了与 siRNA 结合蛋白复合物, 从中鉴定出了 2 个相对分子量为 100 kD 蛋白, 即 Ago1 和 Ago2<sup>[1]</sup>。有 8 个基因参与编码人类 Ago 蛋白, 其中有 4 个基因编码 Ago 亚族的 Ago1、Ago3、Ago4 和 Ago2, Ago1、Ago3、Ago4 定位于 1 号染色体(1p34~35)区带, Ago2 定位在 8 号染色体; 另 4 个基因编码 Piwi 亚族的 HIWI<sub>1</sub>、HIWI<sub>2</sub>、HIWI<sub>3</sub> 和 HIWI<sub>4</sub> 蛋白, 依次定位于 12、11、22 和 8 号染色体。人类 Ago2 由 4 个区域组成, N 端、PAZ 结构域、Mid 结构域和 Piwi 结构域。PAZ 结构域是一个由 6 条链构成的左手  $\beta$  桶, 在桶的一端连接有 2 个螺旋, 另一端连接 1 个  $\alpha\beta$  组件, 在  $\beta$  桶与  $\alpha\beta$  组件之间形成 1 个口袋状结构, 恰好可以插入 RNAs 5' 末端突出的 2 个碱基, 这就是 siRNA 的结合位点。Mid 结构域与小 RNAs 的 5' 端磷酸结构结合将小 RNAs 与 Ago 蛋白锚定(或啮合)。Mid 结构域中还含有 1 个高度保守的 motif 结构, 其与 eIF4E(eukaryotic translational initiation factor 4E) 的 7-甲基鸟嘌呤

(m<sup>7</sup>G) 帽结构相似。正是这个类似 m<sup>7</sup>G 帽结构阻止人 Ago2 与 eIF4E 的结合, 从而对靶 mRNA 的转录起始起到阻遏作用。Piwi 结构域是 1 种属于 RNase. III 家族结构域, 均含有螺旋包围的 5 个片层结构, Piwi 与 RNase. III 一样催化切割 siRNA 与 RNA 形成的 dsRNA 中的单链 RNA, 因而具有核酸内切酶的活性<sup>[1]</sup>, 切割产物具有 3'-OH 和 5' 磷酸结构, Piwi 结构域中的 Piwi-box 区(盒)可以直接与 Dicer 酶结合<sup>[2]</sup>。Liu 等<sup>[5]</sup>在 293-T 细胞中证明 Ago1-4 都能与 siRNA 结合, 但只有 Ago2 具有“切割”活性, 在小鼠中敲除 Ago2 基因出现一些异常的发育从而导致胚胎死亡。进一步研究发现人类 Ago2“切割”(即核酸内切酶)活性中心由 Asp597、Asp669、和 His807 3 个氨基酸组成, 若 Ago2 的 D669 位点突变, Ago2 功能丧失<sup>[6]</sup>。

## 2 Ago2 的装配研究

Ago2 具有抑制蛋白质翻译和促进 miRNA、piRNAs 生物合成和成熟的 miRNA 表达的功能, Ago2 是 RISC 的核心成分, 与 miRNA 与 siRNA 结合构成 RISC 通过碱基互补原理与靶 miRNA 完全或不完全互补结合产生效应的。Ago2 的装配过程也就是 RISC 的形成过程, 可分为起始阶段和效应阶段。

**2.1 起始阶段** 主要是内源性或外源性长链 RNA(dsRNA) 在 Ago2 介导下生物合成成熟的 miRNA、siRNA 或 piRNA 的过程。首先 DNA 重复序列编码长链 miRNA, 由 Diosha 对细胞核里 miRNA 前体进行剪切, 核膜蛋白主动运输于细胞质中, 再被 Dicer 酶剪切掉茎环部成为成熟的长约 18~24 核苷酸的双链 miRNA。Dicer 酶还能对外源性 dsRNA 分子加工成小的双链 siRNA<sup>[3]</sup>。

**2.2 效应阶段** 与以往观点不同最新研究认为, 目前认为双链 RNA(dsRNA) 在 Ago2 介导下结合 RISC 并生成 2 条单链(即正义链和反义链)是不依赖 ATP 的<sup>[7]</sup>, 其中反义链与 Ago2 的 PAZ 结构域结合, 形成 Ago2 的核糖核蛋白(RNP)复合物。siRNA 与靶 mRNA 序列之间是完全或接近完全互补的。Ago2 介导对转录本剪切在距离单链 siRNA 5'10nt 的位点进行。miRNA 与靶 mRNA 5' 端 UTR 位点不完全互补产生翻译抑制, 其反应关键特征是: miRNA 和靶 mRNA 之间存在

**作者简介** 林爱琴(1982-), 女, 安徽巢湖人, 助理实验师, 从事生物学与遗传学研究。\* 通讯作者, 高级实验师, 从事生物学与遗传学研究。

**收稿日期** 2014-03-04

序列错配<sup>[4]</sup>。RISC 在形成过程中还需要其他蛋白的参与,如 TRBP 和 PACT。

**2.3 Ago2 装配过程几个关键问题的探讨** Ago2 装配中的 dsRNA “不对称”的选择:RISC/ Ago2 是如何判定降解 dsRNA 正义链的? Khvorova 等<sup>[8]</sup>分析了 siRNA 链两端的热力学稳定性,发现反义链 5'端的热力学稳定性差,因而被保留进入 RISC 复合物成为向导链,有人将这一现象称为“不对称原理(asymmetry rule)”。

Ago2 在 RNAs 沉默途径中的“脱靶”效应:在 RNAs 沉默途径中,Ago2 因其没有序列特异性,可与各种不同序列小 RNAs 结合,形成 RISC。为确保 Ago2 与小 RNAs 精确结合而不是降解这些效应分子,导致“脱靶”效应。这条沉默途径还需要 1 个特定的结构构成监视系统,这种监视系统可能是小 RNAs 的 5'末端突出的 2 个碱基恰好插入 Ago2 的 PAZ 结构域的口袋状结构<sup>[2]</sup>。另外,小 RNAs 与 RISC 结合诱导靶 mRNA 降解,需要小 RNAs 的 5'端磷酸化结构与 Ago2 的 Mid 结构域锚定<sup>[9]</sup>。

Ago2 在装配中的筛选和修饰作用:人体内 Dicer 只发现 1 种,而人的 miRNA 已报道 1 800 多种(miRBase),外源性 siRNA 种类更多。尽管 Dicer 含有多种功能的结构域,但对众多的 siRNA/miRNA 结合与切割是否存在筛选,未见报道。人类 Ago 亚族有 4 种蛋白即 hAgo1~4,目前只发现 Ago2 具有核酸内切酶活性,Dicer 募集哪一种 Ago 组装 RISC,其筛选机制,有报道认为可能与靶 mRNA 碱基互补精确度及互补链末端结构相关<sup>[10]</sup>。

miRNA 的 5'端的 2~7 个碱基是 miRNA 识别的关键,siRNA 的 5'端的磷酸化是 siRNA 识别关键。Filipowicz<sup>[11]</sup>认为当 miRNA 的碱基配对核心区与靶 mRNA 形成完全互补双链时,这种双链可形成 A 型螺旋与 Ago2 的 DDH 氨基酸结构区结合,miRNA 可以对转录体切割降解,当不完全配对影响 A 型螺旋的形成时则表现出对转录体翻译抑制。Ago2 具有的核酸内切酶活性还可以对靶 mRNA 碱基错配或环状突起碱基异常结构进行切割修饰。

Ago2 在 RNAs 沉默途径中的抑制蛋白合成机制:Ago2 在与 miRNAs 结合形成 RISC 后,靶向 mRNA 进入胞质处理小体(p-bodies),进而通过 3 种方式抑制蛋白质合成:①诱导 mRNA 脱腺苷酸化和脱帽,启动 mRNA 降解;②通过 Ago2 和翻译起始因子竞争与 mRNA M<sup>7</sup>G 帽子的结合,阻碍功能性核糖体的装配,造成翻译起始抑制;③通过募集多肽链降解(翻译延伸)相关的细胞因子(肽酶、翻译后修饰酶)使核糖体脱离肽链或新合成的肽链迅速降解,这一过程发生在翻译起始后<sup>[12]</sup>。免疫荧光定位证明,Ago2 大多定位于细胞质中,并在 P 小体中富集,参与上述的转录后水平的基因沉默。但仍有一小部分 Ago2 定位于细胞核中,它们作用于 DNA 启动子区域,使靶基因和组蛋白甲基化,从而抑制基因表达。最近发现 Ago2 介导的 miRNA 在无血清细胞的 AU 富集区域,可以增强转录本的翻译。有人估计,在人类基因组中大于 30% 的基因的表达都受与 Ago 相关的 RNAi 现象的调控<sup>[13]</sup>。

探索 Ago2 在人类细胞,尤其是肿瘤细胞相关性研究已成为肿瘤的基因诊断和治疗的新亮点。

### 3 Ago2 与肿瘤的关系

**3.1 Ago2 过表达与肿瘤的关系** Ago 家族蛋白与多种肿瘤密切相关,hAgo1、hAgo3 和 hAgo4 基因前后排列在人 1 号染色体 p34~35,在 wilms 肾癌中经常缺失,还与神经外胚层瘤相关<sup>[14]</sup>。hAgo1 在肺和肾的发育过程中高表达,在缺少 wilms 肿瘤抑制基因 WT1 的肾癌中过表达<sup>[15]</sup>。在对人类乳腺癌 MCF<sup>7</sup>、宫颈癌 Hela、肺腺癌 A549 和胚肾细胞 HEK293 这 4 种细胞系中 Ago1~4 的转录图谱显示,其细胞系普遍存在稳定表达,其中 Ago2 和 Ago3 转录水平较高且相对稳定。Zhang 等<sup>[16]</sup>研究 227 例卵巢癌、乳腺癌及黑素瘤标本的 miRNA 表达谱,同时分析 miRNA 靶基因的 DNA 拷贝数,结果发现在 3 种肿瘤中 Ago2 的 DNA 拷贝数的变异率均明显增加。对乳腺癌的进一步研究显示:Ago2 在侵袭性较高的乳腺癌、basal-like、HER<sub>2</sub> 过表达和 luminal B 型的表达增高,且在 ER<sup>-</sup>乳腺癌表达高于 ER<sup>+</sup>乳腺癌患者,说明 Ago2 过表达与乳腺癌的侵袭程度密切相关<sup>[17]</sup>。Li 等用 microarray 的方法对 150 例结肠癌标本和癌旁组织标本 Ago 家族进行检测,发现 Ago2 在结肠癌中表达高于癌旁组织,提示 Ago2 的表达与肿瘤进展及侵犯有关<sup>[18]</sup>。

Cheng 等在肝癌组织与相邻非肿瘤肝组织的对比研究中发现 Ago2 在肝癌组织中表达频繁上调<sup>[19]</sup>,有趣的是,Ago2 的过度表达可以促进体内肝癌细胞的细胞增殖、克隆形成、迁移、致瘤性以及转移等;与此相反,Ago2 的敲低可以限制非依赖性集落形成,迁移和肿瘤转移。Shaughnessy 等用基因芯片技术研究了高危多发性骨髓瘤(MM)患者基因表达谱改变,确定了 70 个疾病早期死亡相关的基因,Ago2 是其中一个,这证明 Ago2 的表达与 MM 早期死亡有关<sup>[20]</sup>。Parsi<sup>[21]</sup>等研究表明 Ago1 和 Ago2 在 SH-SY5Y 神经母细胞瘤组织中过度表达且影响细胞的增殖,迁移和凋亡。国内研究证明:Ago2 在结肠癌<sup>[22]</sup>、胃癌<sup>[23]</sup>、膀胱尿路上皮癌<sup>[24]</sup>等组织中的表达高于正常组织。

**3.2 Ago2 介导的 RNA 沉默途径与肿瘤的关系** 在人类的 RNA 干扰中,Ago2 是目前唯一具有 RNA 酶切活性的蛋白,控制 miRNA 和 siRNA 对靶 mRNA 的剪切分解,从这个角度说 Ago2 应该是惟一可能与肿瘤相关的蛋白。有人在 MM 患者 miRNAs 的表达谱中发现 Ago2 的表达增高与其 DNA 拷贝数增加密切相关,在高危组 Ago2 和大部分 miRNAs 表达均显著上调,与 MM 高危因素呈正相关性。Zhou 发现,Ago2 功能沉默后的骨髓瘤细胞株活性明显降低,用 qPCR 检测 Ago2 有活性和失活的骨髓瘤细胞株中 miRNA 的表达,发现 Ago2 失活后的细胞株 miRNA 功能下调<sup>[25]</sup>。但在骨髓瘤病例标本中,Ago2 与 miRNA 的表达量没有显著的正相关,说明 Ago2 在骨髓瘤细胞中可能存在其他调节通路。进一步研究发现,Ago2 介导的骨髓瘤细胞凋亡还可以通过 caspasa-3、caspasa-8 和 caspasa-9 信号通路。Karanti 对 60 例弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)标本和 27 种 DLBCL 细胞株,对与人类疾病相关

的 471 种 miRNA 和涉及 miRNA 生成的 17 种基因进行研究<sup>[26]</sup>。结果发现,95% 的淋巴瘤标本和 100% 的淋巴瘤细胞株 miRNA 基因异常,包括基因的增多和丢失。对 17 种参与 miRNA 合成的基因研究中发现,Ago2 基因异常超过 10%。

Chiyomaru 等发现 Ago2 通过 miR-141 介导 HOTAIR 基因沉默,他们通过转染 Ago2 的 siRNA 至 786-O 细胞中的观察到 Ago2 的 siRNA 下调 Ago2 的表达和 miR-141 减少内源性 HOTAIR 表达至 20%,但是没有观察到 Ago2 敲低时 HOTAIR 的显著下降,表明 HOTAIR 基因沉默在很大程度上是 Ago2 通过 miR-141 介导的<sup>[27]</sup>。

Zhang 等发现在 293T 和 H1299 细胞系中稳定的 Ago2 的过度表达能引起 miRNA 和 mRNA 的表达特异性改变,但研究同时发现 Ago2 的表达在人肺腺癌组织中低于配对非癌组织<sup>[28]</sup>。可见变化的 Ago2 表达可能在体内引起显著的生理和病理变化。Naoghare 等研究表明敲低 Ago2 能诱导骨髓性白血病细胞的凋亡和抑制在 HEK-293 细胞系中癌基因转染的 siRNA 介导的基因沉默<sup>[29]</sup>。Ago2 是 miRNA 从 RNA 靶分子上形成的一个关键因子,在恶性肿瘤的形成过程中,miRNA 和 Ago2 的相互作用可能是复杂的,其可能机制是:作为 RISC 活性中心,Ago2 的增多选择性保护了 miRNA,防止其被降解,从而抑制抑癌基因的作用,促进肿瘤的生长。还有一种可能是:Ago2 的表达除了促进肿瘤的生长外,还可引起表型的改变。

**3.3 Ago2 与肿瘤细胞周期的关系** 人类肿瘤细胞中 Ago2 蛋白可直接或间接地参与细胞周期进程的调控。在人类基因组中大于 30% 的基因的表达都受与 Ago 相关的 RNAi 现象所调控。许多有 RNAi 通路控制的基因编码转录因子相关蛋白,从而调节信号通路和细胞周期进程。试验证明,Ago 蛋白表达沉默会导致细胞增殖活性显著下降,生长受抑。Ago1 ~ Ago4 基因沉默所致的细胞增殖活性随 Ago 下调时间的延长而持续下降。其中 Ago2 沉默所致的细胞生长抑制程度最大,可能与细胞周期进程的调控关系更为紧密。进一步研究揭示,Ago 蛋白的表达缺失导致其细胞周期在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期发生停滞,细胞不能正常进入 S 期完成 DNA 复制,从而抑制增殖。Ago2 蛋白也可通过 miRNA 途径间接的影响细胞正常生长增殖。最新发现,miRNA 不仅可以靶向 mRNA 3'UTR 对蛋白质表达进行负控制<sup>[30-31]</sup>,还可以激活 mRNA 翻译<sup>[32]</sup>,而两种控制机制的转换则依赖于细胞周期的状态。如 miR369-3 在 G<sub>1</sub> 期阻滞时激活转录,当细胞正常生长时则抑制转录。而无论正负调控都需要 Ago2 蛋白的参与,那么 Ago2 蛋白的缺失就可能会对 miRNAs 调控通路造成影响,进而影响细胞增殖。在人类肿瘤细胞中 Ago2 蛋白对其细胞生长和增殖起着至关重要的调控作用。Ago2 蛋白表达沉默导致细胞增殖活性显著下降,细胞周期在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期发生阻滞,生长受抑。揭示 Ago2 蛋白可能直接或间接地参与细胞周期进程的调控。

#### 4 小结与展望

siRNA/miRNA 可通过抑制肿瘤发生、发展、侵袭、转移、

细胞周期控制、信号转导和凋亡等过程中的特定和关键靶基因而发挥抗癌的作用,目前已在多种肿瘤治疗方面取得成效。但是,从已知的超过 2 000 个与肿瘤相关的编码基因中寻找肿瘤生物治疗特异而有效地靶基因有较大的难度。在人类的 miRNA 和 siRNA 的形成过程中,Ago2 蛋白的结合是其关键步骤,因而 Ago2 应该是惟一可能与肿瘤相关的蛋白。诸多研究数据亦证明 Ago2 基因在肿瘤中的复制时增强的。Ago2 介导的 siRNA/miRNA 调控通路为肿瘤的基因治疗提供了一种新的具有高效性和高度特异性的研究策略,其干扰治疗肿瘤的主要原理为在特定的组织细胞中引入双链 RNA,诱导序列特异的靶基因的沉默,从而迅速阻断基因活性。然而,到目前为止,Ago2 基因和蛋白仍有许多功能不为人所知,需要我们继续探索、发现。

#### 参考文献

- [1] MARTINEZ J, PATKANIOWSKA A, URLAUB H, et al. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi[J]. Cell, 2002, 110(5): 563-574.
- [2] HOCK J, MEISTER G. The Argonaute protein family[J]. Genome Biology, 2008, 9(2): 210.
- [3] KIDNER C A, MARTIENSSEN R A. Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through Argonaute[J]. Nature, 2004, 428(6978): 81-84.
- [4] MEISTER G, LANDTHALER M, PATKANIOWSKA A, et al. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNA and siRNA[J]. Mol Cell, 2004, 15(2): 185-197.
- [5] LIU J D, CARMELL M A, RIVAS F V, et al. Argonaute 2 is the catalytic engine of mammalian RNAi[J]. Science, 2004, 305: 1437-1441.
- [6] O'CARROLL D, MECKLENBRAUKER I, PRATIM DAS P, et al. A slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway[J]. Gene & Dev, 2007, 21: 1999-2004.
- [7] LIMA W F, WU H J, NICHOLS J G, et al. Binding and cleavage specificities of human Argonaute[J]. J Biol Chem, 2009, 284(38): 26017-26028.
- [8] KHVOROVA A, REYNOLDS A, JAYASENA S D. Functional siRNAs and miRNA exhibit strand bias[J]. Cell, 2003, 115: 199-208.
- [9] HUTVAGNER G, SIMARD M J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(1): 22-32.
- [10] MONTGOMERY T A, HOWELL M D, CUPERUS J T, et al. Specificity of Argonaute7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation[J]. Cell, 2008, 133(1): 128-141.
- [11] FILIPOWICZ W. RNAi the nuts and bolts of the RISC machine[J]. Cell, 2005, 122(1): 17-20.
- [12] SONG J J, SMITH S K, HANNON G J, et al. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity[J]. Science, 2004, 305: 1434-1437.
- [13] LEWIS B P, BURGE C B, BARTEL D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005, 120(1): 15-20.
- [14] KOESTERS R, ADAMS V, BETTS D, et al. Human eukaryotic initiation factor EIF2C1 gene: cDNA sequence, genomic organization, localization to chromosomal bands 1p34-p35, and expression [J]. Genomics, 1999, 61(2): 210-218.
- [15] DOME J S, COPPES M J. Recent advances in Wilms tumor genetics[J]. Curr Opin Pediatr, 2002, 14(1): 5-11.
- [16] ZHANG L, HUANG J, YANG N, et al. MiRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 9136-9141.
- [17] ADAMS B D, CLAFFEY K P, WHITE B A. Argonaute-2 expression is regulated by epidermal growth factor receptor and mitogen-activate protein kinase signaling and correlates with a transformed phenotype in breast cancer cells[J]. Endocrinology, 2009, 150: 14-23.
- [18] LI L, YU C H, GAO H J, et al. Argonaute proteins: potential biomarkers for human colon cancer[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 38.
- [19] CHENG N, LI Y, HAN Z G, et al. Argonaute2 promotes tumor metastasis by way of up-regulating focal adhesion kinase expression in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2013, 57(5): 1906-1918.

6)。以上波谱数据与文献报道的槲皮素基本一致,故鉴定该化合物为槲皮素<sup>[6]</sup>。

化合物 4, 黄色粉末。<sup>1</sup>H-NMR(500 MHz, [D<sub>6</sub>] DMSO) δ: 12.62(1H, br-s, 5-OH), 7.66(1H, dd, J = 2.0, 8.0 Hz, H-2'), 7.53(1H, d, J = 2.0 Hz, H-6'), 6.80(1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 6.39(1H, d, J = 1.5 Hz, H-8), 6.18(1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 5.36(1H, d, J = 7.5 Hz, H-1'), 3.21 - 3.80(m, 糖质子信号)。<sup>13</sup>C-NMR(125 MHz, [D<sub>6</sub>] DMSO) δ: 177.8(C-4), 164.9(C-7), 161.6(C-5), 156.6(C-9), 156.5(C-2), 148.9(C-4'), 145.3(C-3'), 133.9(C-3), 122.4(C-1'), 121.5(C-6'), 116.3(C-5'), 115.6(C-2'), 104.3(C-10), 102.3(C-1''), 99.2(C-6), 93.9(C-8), 76.3(C-5''), 73.6(C-3''), 71.6(C-2''), 68.3(C-4''), 60.3(C-6'')。以上波谱数据与文献报道的槲皮素 3-O-β-D-半乳糖苷基本一致,故鉴定该化合物为槲皮素 3-O-β-D-半乳糖苷<sup>[7]</sup>。

## 2.2 肿瘤细胞活性测试分析

**2.2.1 天胡荽萃取物活性测试结果。**由表 1 可知,天胡荽的各萃取部位对 LA795 细胞株有一定的抑制作用,其中以高浓度 800 μg/ml 正丁醇层萃取物的抑制作用较强,而在 400 μg/ml 时对 LA795 细胞株抑制明显减弱,抑制率仅为 18.7%;石油醚和乙酸乙酯萃取物的抑制作用都相对较弱,石油醚萃取物在浓度 800 μg/ml 时的抑制率为 21.7%,乙酸乙酯萃取物在浓度 800 μg/ml 时的抑制率为 28.4%。

表 1 天胡荽各萃取部位对 LA795 细胞生长的抑制作用

萃取物	细胞生长抑制率/%			
	800 μg/ml	400 μg/ml	200 μg/ml	100 μg/ml
石油醚萃取物	21.7	20.4	13.7	2.8
乙酸乙酯萃取物	28.4	16.8	16.7	15.2
正丁醇萃取物	66.3	18.7	10.7	9.6

**2.2.2 天胡荽单体化合物活性测试结果。**由表 2 可知,天胡荽单体化合物对 LA795 细胞株的抑制作用均较弱,化合物

2 在浓度 100 μg/ml 时的抑制率为 23.3%;化合物 2、3、4 都是黄酮类化合物,在浓度 100 μg/ml 时的抑制率均超过 30%。

表 2 天胡荽中化合物对 LA795 细胞生长的抑制作用

化合物	细胞生长抑制率/%			
	100 μg/ml	10 μg/ml	1 μg/ml	0.1 μg/ml
1	23.3	-	-	-
2	45.0	26.6	-	-
3	44.2	29.0	-	-
4	33.4	31.1	16.0	11.2

## 3 结论

天胡荽的各萃取部位对 LA795 细胞株有一定的抑制作用,其中以正丁醇层萃取物在高浓度 800 μg/ml 时的抑制作用较强,而石油醚和乙酸乙酯萃取物的抑制作用相对较弱。单体化合物对 LA795 细胞株的抑制作用均较弱。

## 参考文献

- [1] 国家中医药管理局(中华本草)编委会.中华本草[M],上海:上海科学技术出版社,1998.
- [2] 中国科学院“中国植物志”编辑委员会.中国植物志[M].北京:科学出版社,2004.
- [3] 张兰,张德志.天胡荽的研究进展[J].现代食品与药品杂志,2007,17(1):15-17.
- [4] SHINODA Y, MURATA M, HOMMA S, et al. Browning and decomposed products of model orange juice[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2004, 68(3): 529-536.
- [5] MOHAMED BOUKTAIB, STEPHANE LEBRUN, AZIZ ATMANI, et al. Hemisynthesis of all the O-monomethylated analogues of quercetin including the major metabolites, through selective protection of phenolic functions[J]. Tetrahedron, 2002, 58: 10001-10009.
- [6] 韩伟立,刘利,张晓琦,等.鲁桑叶化学成分研究[J].中国中药杂志,2007,32(8):695-698.
- [7] DESAI H K, GAWAD, D H, GOVINDACHARI T R, et al. Quercetin 3-(6'-caffeoyl)galactoside from *Hydrocotyle sibthorpioides* [J]. Phytochemistry, 1982, 21(8): 2156-2158.
- [8] 王羽,张彦军,高文远,等.滇重楼抗肿瘤活性成分研究[J].中国中药杂志,2007,32(14):1425-1428.
- [9] nome in human DLBCL[J]. Blood, 2007, 110: 563.
- [20] SHUAUGHNESSY J D, ZHAN F H, BURINGTON B E, et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome [J]. Blood, 2007, 109: 2276-2284.
- [21] PARISI C, GIORGI C, BATASSA E M, et al. Ago1 and Ago2 differentially affect cell proliferation, motility and apoptosis when overexpressed in SH-SY5Y neuroblastoma cells [J]. FEBS Lett, 2011, 585(19): 2965-2971.
- [22] WANG Y X, ZHANG X Y, ZHANG B F, et al. Study on the clinical significance of Argonaute2 expression in colonic carcinoma by tissue microarray [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(3): 476-484.
- [22] ZHANG J, FAN X S, WANG C X, et al. Up-regulation of Ago2 expression in gastric carcinoma [J]. Med Oncol, 2013, 30(3): 628.
- [23] YANG F Q, HUANG J H, LIU M, et al. Argonaute 2 is up-regulated in tissues of urothelial carcinoma of bladder [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 7(1): 340-347.
- [25] ZHOU Y, CHEN L, BARLOGIE B, et al. High-risk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2 [J]. PNAS, 2010, 107: 7904-7909.
- [26] KARANTI S, BOLLA A, DILLON C, et al. An atlas of the microRNA ge-
- [27] CHIYOMARU T, FUKUHARA S, SAINI S, et al. Long non-coding RNA HOTAIR is targeted and regulated by miR-141 in human cancer cells [J]. J Biol Chem, 2014, doi: 10.1074/jbc.M113.488593.
- [28] ZHANG X, GRAVES P, ZENG Y. Overexpression of human Argonaute2 inhibits cell and tumor growth [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(3): 2553-2561.
- [29] NAOGHARE P K, TAK Y K, KIM M J, et al. Knock-down of argonaute 2 (AGO2) induces apoptosis in myeloid leukaemia cells and inhibits siRNA-mediated silencing of transfected oncogenes in HEK-293 cells [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2011, 109(4): 274-282.
- [30] KIRIAKIDOU M, TAN G S, LAMPRIKAKI S, et al. An mRNA m(7)G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation [J]. Cell, 2007, 129(6): 1141-1151.
- [31] MARONEY PA, YU Y, FISHER J, et al. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells [J]. Nat Struct Mol Biol, 2006, 13(12): 1102-1107.
- [32] VASUDEVAN S, TONG Y, STEITZ J A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation [J]. Science, 2007, 318: 1931-1934.

(上接第 3171 页)