

# 大鼠 CB1 基因真核表达载体的构建及其对 CaSki 细胞凋亡的影响

严磊<sup>1</sup>, 李晶<sup>2</sup>, 赵婷婷<sup>1</sup>, 王会娟<sup>1</sup>, 王蕾<sup>1</sup>, 赖国旗<sup>1,3\*</sup>

(1. 重庆医科大学实验动物中心, 重庆 400016; 2. 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 404120;  
3. 重庆市啮齿类实验动物工程技术研究中心, 重庆 400016)

**【摘要】** 目的 构建大鼠 CB1 (rCB1) 基因真核表达载体, 检测 rCB1 基因在细胞中的表达, 研究 rCB1 对人工宫颈癌 CaSki 细胞凋亡的影响。方法 从大鼠脑组织中提取总 RNA, RT-PCR 扩增 rCB1 基因, 通过酶切、纯化、连接 PCR 纯化产物与 pCDNA 3.1 (+) 质粒, 构建 pcDNA3.1 (+)-rCB1。脂质体法将其转染到 HEK293 和 CaSki 细胞, Western blot 及细胞免疫荧光联合激光扫描共聚焦方法检测 rCB1 的表达及定位, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, Western blot 与实时荧光定量 PCR 检测 rCB1、Bcl-2、Bax、Bad 表达。结果 酶切重组质粒获得 5300 bp 的载体片段和 1500 bp 的目的片段, 测序结果和 rCB1 基因序列 (NM\_012784.4) 一致。转染 HEK293 细胞后, rCB1 在 HEK293 细胞细胞膜和细胞质表达。转染 CaSki 细胞后, rCB1 使细胞凋亡率增加 ( $P < 0.05$ ); rCB1 基因上调 Bax、Bad 的表达, 同时抑制 Bcl-2 的表达, 与空白组比较, 其差异具有显著性 ( $P < 0.05$ )。结论 成功构建了 pcDNA3.1 (+)-rCB1 真核表达载体, rCB1 表达于细胞膜和细胞质, rCB1 可以明显促进宫颈癌 CaSki 细胞凋亡, 其机制是上调 Bax、Bad 和抑制 Bcl-2 表达。

**【关键词】** CB1 基因; HEK293 细胞; CaSki 细胞; 细胞凋亡

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 02-0153-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.02.010

## Construction of expression vector containing rat rCB1 gene and its influence on the apoptosis in human cervical cancer CaSki cell line

YAN Lei<sup>1</sup>, LI Jing<sup>2</sup>, ZHAO Ting-ting<sup>1</sup>, WANG Hui-juan<sup>1</sup>, WANG lei<sup>1</sup>, LAI Guo-qi<sup>1</sup>

(1. Laboratory of Animal Center of Chongqing Medical University, Chongqing 400016;

2. Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120;

3. Chongqing Engineering Research Center on Rodent Laboratory Animals, Chongqing 400016)

**【Abstract】** **Objective** To construct rCB1 gene eukaryotic expression vector, detect its expression in the cell, and explore its influence on apoptosis in human cervical cancer CaSki cells. **Methods** The total RNA was extracted from rat brains. The rCB1 gene was amplified by RT-PCR. The pcDNA3.1 (+)-rCB1 was constructed by enzyme digestion, purification, bind the PCR purification products and pcDNA3.1 (+) DNA. The pcDNA3.1 (+)-rCB1 plasmid was transfected into HEK293 and CaSki cells by liposomes. The expression and localization of rCB1 were detected by Western blot and immunofluorescence combined with confocal laser scanning microscopy. The apoptosis rate of CaSki cells was detected by flow cytometry. The expression of rCB1, Bcl-2, Bax and Bad was detected by Western blot and real-time fluorescence quantitative RT-PCR (qRT-PCR). **Results** The 5300 bp pcDNA3.1 (+) and 1500 bp rCB1 were obtained after diges-

**【基金项目】** 重庆市教委自然科学基金项目 (KJ111802); 重庆市卫生局医学科科研项目 (2012-1-096); 重庆市高等教育教学改革研究重点项目 (132128, 133309); 重庆万州区科技计划项目 (201203055); 重庆市应用开发计划项目 (estc2013yykfC10005)。

**【作者简介】** 严磊 (1985 -), 男, 硕士研究生。研究方向: 实验动物模型。E-mail: 985466685@qq.com。

**【通讯作者】** 赖国旗 (1964 -), 女, 教授, 博士。研究方向: 实验动物学。E-mail: a68895078@21cn.com。

ting the pcDNA3.1(+)-rCB1. The result of sequencing was in agreement with the sequence of rCB1 gene (NM\_012784.4). The rCB1 expressed in the membrane and cytoplasm when pcDNA3.1(+)-rCB1 plasmid was transfected into HEK293 cells. The apoptosis rate of rCB1 group was increased compared with the blank group when pcDNA3.1(+)-rCB1 plasmid was transfected into CaSki cells ( $P < 0.05$ ). Compared with the blank group, rCB1 gene upregulated the expression of Bax and Bad, and suppressed the expression of Bcl-2. The statistical difference was significant ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions** The pcDNA3.1(+)-rCB1 eukaryotic expression vector is constructed successfully. It is found that rCB1 is expressed in membrane and cytoplasm of HEK293 cells. rCB1 can significantly promote the apoptosis in cervical cancer CaSki cells by up-regulating the expression of Bax and Bad, and down-regulating the expression of Bcl-2 as well.

**【Key words】** rCB1; HEK293 cells; CaSki cells; Cell apoptosis

大麻素是从印度大麻(*Cannabis sativa*)里发现的一组萜酚类化合物,存在于动物神经系统和免疫系统里<sup>[1,2]</sup>。大麻类物质发挥生物作用的基础是大麻受体,现今已发现两个亚型:1型大麻受体(cannabinoid receptor 1, CB1)<sup>[3]</sup>和2型大麻受体(cannabinoid receptor 2, CB2)<sup>[4]</sup>,其中CB1受体主要分布于脑、脊髓与外周神经系统中,故又称中枢型大麻素受体。脑内的CB1受体主要分布于基底神经节(包括黑质、苍白球和外侧纹状体)、海马CA锥体细胞层,小脑和大脑皮质。通过激活CB1受体可以降低神经递质(如多巴胺和GABA)的释放,调节、参与记忆、认知、运动等活动的控制<sup>[5]</sup>。大鼠实验表明,大麻素受体在子宫组织中也有广泛分布<sup>[6]</sup>。

研究发现,大麻素对乳腺癌、前列腺癌、神经胶质瘤等具有抑制作用,在肿瘤组织中,增加大麻素受体在组织中的分泌可以选择性抑制细胞的恶性增殖<sup>[7]</sup>。我国宫颈癌的发病率位居女性恶性肿瘤第二,基因对比分析表明,人类CB1基因与大鼠的CB1基因序列存在很高的同源性。鉴于大鼠脑组织获取方便,本研究首先构建大鼠CB1真核表达载体,随后分别转染HEK293细胞与宫颈癌CaSki细胞,研究rCB1的细胞定位和rCB1对宫颈癌CaSki细胞凋亡的影响以及作用机制,其结果对大麻素治疗宫颈癌具有重要的理论意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF级SD大鼠3只,雄性,体重6.5~7.0g,1日龄。购于重庆医科大学动物实验中心[SCXK(渝)2012-0001]。大鼠的组织取材在重庆医科大学实验动物中心动物屏障设施内进行[SYXK(渝)

2012-0001]。

#### 1.1.2 材料和主要试剂

pcDNA3.1(+)-真核表达载体、HEK293细胞、宫颈癌CaSki细胞由本实验室保存;总RNA提取试剂盒购自Promega公司;RT-PCR试剂盒、T载体连接试剂盒、T<sub>4</sub>DNA连接酶试剂盒、DH5 $\alpha$ 感受态细菌、DL2000 DNA maker、DL5000 DNA maker、DL1000 DNA maker、Taq DNA多聚酶、凝胶回收试剂盒、实时荧光定量PCR试剂盒购自Takara公司;限制性内切酶(*EcoRI*, *BamHI*)购自美国NEB公司;质粒提取试剂盒购自Qiagen公司;Lipofectamine™2000购自Invitrogen公司产品;兔抗大鼠CB1抗体购自武汉博士德生物技术公司;HRP标记的羊抗兔IgG购自北京中杉金桥公司;兔抗人Bcl-2多克隆抗体、兔抗人Bax多克隆抗体、兔抗人Bad多克隆抗体购自美国Abgent;DyLight 549标记的羊抗兔IgG购自美国Abbkine公司;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、藻红蛋白标记的膜联素(phycoerythrin conjugated annexin V, annexin V-PE)/7-氨基放线菌素D(7-aminoactinomycin D, 7-AAD)细胞凋亡检测试剂盒、ECL化学发光试剂盒、防荧光淬灭剂购自碧云天公司;流式细胞仪购自美国Coulter;GeneGnome5化学发光成像仪购自美国Syngene;iQ5型荧光定量PCR仪购自美国Bio-Rad。

#### 1.1.3 引物设计

根据GenBank数据库中大鼠CB1基因NM\_012784.4序列设计引物。其上游引物:5'-CGGGATCCGCCACCATGAAGTCGATCCTAGATG-3';下游引物:5'-GGAATTCCTTTTCTGTGCAGCCACAA-3'。其中,分别在上游和下游引物的5'端加上了*EcoRI*, *BamHI*酶切位点,引物由上海Invitrogen公司合成(见表1)。

表 1 qRT-PCR 相关引物

Tab. 1 Primers applied in the quantitative RT-PCR analysis

基因 Genes	上游引物(5' - 3') Sense primer	下游引物(3' - 5') Antisense primer
rCB1	CTACTGGTCTGTCTGTCATC	GCTGTCTTTACGGTGAATAC
Bcl-2	ATG TGT GTG GAG AGC GTC AAC C	GCA TCC CAG CCT CCG TTA TC
Bax	GCTGTTGGGCTGGATCCAAG	TCAGCCCATCTTCTCCAGA
Bad	CC ACTGAGCAGGAAGACTC	GGTAGGAGCTGTGGCGACT
GAPDH	GCCTCAAGATCATCAGCAATGC	CATGGACTGTGGTCATGACTCCT

## 1.2 方法

### 1.2.1 rCB1 克隆和 pcDNA3.1(+)-rCB1 真核表达载体构建及鉴定

按试剂盒操作说明书从 1 日龄 SD 大鼠脑组织中提取大鼠总 RNA。按 RT-PCR 试剂盒说明书逆转录为 SD 大鼠脑组织 cDNA 文库,以 cDNA 为模板,PCR 扩增 rCB1 基因,条件为:50  $\mu$ L 体系;94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C,30 s;56 $^{\circ}$ C,30 s;72 $^{\circ}$ C 45 s,循环 30 次后 72 $^{\circ}$ C,7 min。PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳,按凝胶回收试剂盒说明书进行 PCR 产物回收纯化。

用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *BamH* I 酶切 rCB1 片段和 pcDNA3.1(+) 质粒,凝胶电泳后按凝胶回收试剂盒说明书进行回收纯化。按  $T_4$  DNA 连接酶试剂盒将含 rCB1 片段连接到 pcDNA3.1(+) 酶切片段上,将连接产物转化 *DH5 $\alpha$*  感受态细菌,用含 Amp 的 LB 平板筛选阳性克隆,用含 Amp 的 LB 液体培养基,200 r/min,37 $^{\circ}$ C,摇菌培养 16 h。菌液按质粒提取试剂盒说明书提取质粒,酶切鉴定;同时,质粒 DNA 送上海 Invitrogen 公司测序。

### 1.2.2 HEK293 细胞的 pcDNA3.1(+)-rCB1 转染

将 HEK293 细胞接种于 35 mm 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基的培养皿,在 37 $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$  环境下培养,待细胞的汇合率在 50% ~ 70% 时,按 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 转染说明书操作。转染时将质粒与转染试剂混合,室温下静止 30 min 后滴加在用无血清 RPMI 1640 培养基培养的细胞上,6 h 后更换含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基。转染 48 h 后吸去培养基,收获细胞。以未转染的细胞为对照组。

### 1.2.3 Western blot 检测 rCB1 在 HEK293 细胞中的表达

取转染 48 h 后的 HEK293 细胞,裂解,提取蛋白。蛋白样品在 100 $^{\circ}$ C 变性 10 min,取 5  $\mu$ L 蛋白样本上样,10% SDS-PAGE 电泳分离后转膜,在含 5% 脱脂牛奶的 TBST 中封闭 2 h,兔抗大鼠 CB1 抗体(1:300)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,与 HRP 标记的羊抗兔 IgG 室温孵育 2 h,化学发光。以未转染的细胞为对照组。

### 1.2.4 细胞免疫荧光激光扫描共聚焦检测 rCB1 在 293 细胞中的定位

取转染 48 h 后的 HEK293 细胞爬片,冰甲醇处理 15 min,加 3%  $H_2O_2$ ,20 min;5% 胎牛血清封闭 1 h,兔抗大鼠 CB1 抗体(1:100)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,荧光标记的羊抗兔 IgG (1:50) 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,DAPI 染色 5 min,防荧光淬灭剂封片,激光扫描。

### 1.2.5 CaSki 细胞凋亡的检测

pcDNA3.1(+)-rCB1 质粒按 1.2.2 方法转染 CaSki 细胞,转染 48 h 后,经胰酶消化,PBS 清洗,离心,PBS 重悬后,按细胞凋亡检测试剂盒操作,流式细胞仪检测细胞凋亡。以未转染的细胞为对照组。

### 1.2.6 rCB1 及凋亡相关因子在 CaSki 细胞中表达的检测

pcDNA3.1(+)-rCB1 质粒按 1.2.2 方法转染 CaSki 细胞,转染 48 h 后收取细胞。

(1) Western blot: 经超生裂解,100 $^{\circ}$ C 变性后于 10% SDS-PAGE 电泳 90 min,转膜 1 h,在 5% BSA 封闭液中封闭 2 h。以兔抗大鼠 CB1 抗体(1:500)、兔抗人 Bcl-2 抗体(1:1000)、兔抗人 Bax 抗体(1:1000)、兔抗人 Bad 抗体(1:1000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加辣根酶过氧化物标记的羊抗兔 IgG 室温孵育 2 h,ECL 法显影。

(2) RT-PCR: 按 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,按 RNA 逆转录试剂盒说明书操作将 RNA 逆转录为 cDNA。以所获 cDNA 为模板,按照实时荧光定量 PCR 试剂盒说明操作,PCR 反应条件:25  $\mu$ L 体系,95 $^{\circ}$ C,10 min;94 $^{\circ}$ C 20 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 cycles。实验数据采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  分析, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{内参})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{内参})_{空白组}$ ,相对定量(relative quantification, RQ),以 RQ 实验组 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,RQ 对照组 = 1 计算。以未转染的细胞为对照组。实验重复三次。

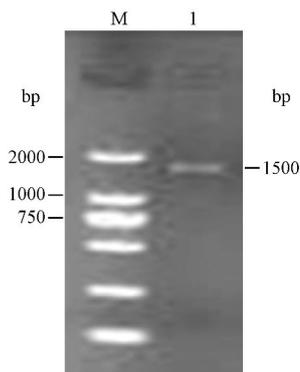
### 1.2.7 统计学方法

使用 SPSS 17.0 对数据进行统计学分析,数据采用均数  $\pm$  标准差表示,组间比较采用 *t* 检验或方差分析。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增 rCB1 及载体构建

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 1 所示,条带大小在 1.5 kb。用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切 pcDNA3.1(+)-rCB1 重组质粒,切出 1.5 kb 的 rCB1 片段和 5.3 kb 的载体片段。结果如图 2 所示,结果与预期一致。

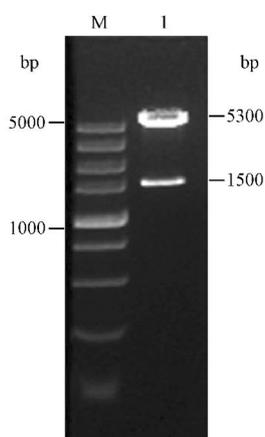


注:M;D2000;1;rCB1 PCR 结果。

图 1 rCB1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测结果

Note. M;D2000;1;The results of rCB1 by PCR.

Fig. 1 The results of rCB1 PCR products detected by agarose gel electrophoresis



注:M;D5000;1;pcDNA3.1(+)-rCB1 *Bam*HI、*Eco*RI 酶切产物。

图 2 pcDNA3.1(+)-rCB1 双酶切鉴定结果

M;D5000;1;The products of pcDNA3.1(+)-rCB1 detected by double enzyme digestion with *Bam*H I and *Eco*R I.

Fig. 2 The results of pCDNA3.1(+)-rCB1 by double enzyme digestion

### 2.2 rCB1 在 HEK293 细胞中的表达与定位

pcDNA3.1(+)-rCB1 转染 HEK293 细胞后,Western blot 检测 rCB1 在 HEK293 细胞中的表达,结果如图 3 示,rCB1 转染组在  $50 \times 10^3$  处出现一条

蛋白带。细胞免疫荧光联合激光扫描共聚焦(549 nm 波段)检测 rCB1 在 HEK293 细胞中的表达。如图 4 示,红色为 rCB1 蛋白表达且分布于细胞膜与细胞质。结果与预期一致。

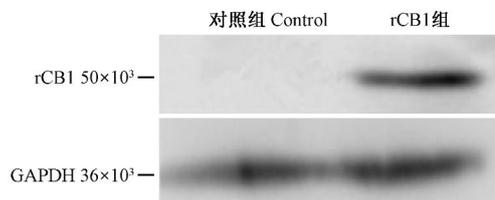


图 3 rCB1 Western blot 结果

Fig. 3 The results of rCB1 detected by Western blot

### 2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率

pcDNA3.1(+)-rCB1 转染 CaSki 细胞后,流式细胞仪检测 rCB1 转染组和对照组的细胞凋亡率。结果如图 5 所示,与未转染组比较,rCB1 转染组的细胞凋亡率( $32.99 \pm 3.25$ )% 大于对照组的细胞凋亡率( $13.11 \pm 0.32$ )%,两组之间差异有显著性( $P < 0.05$ )。

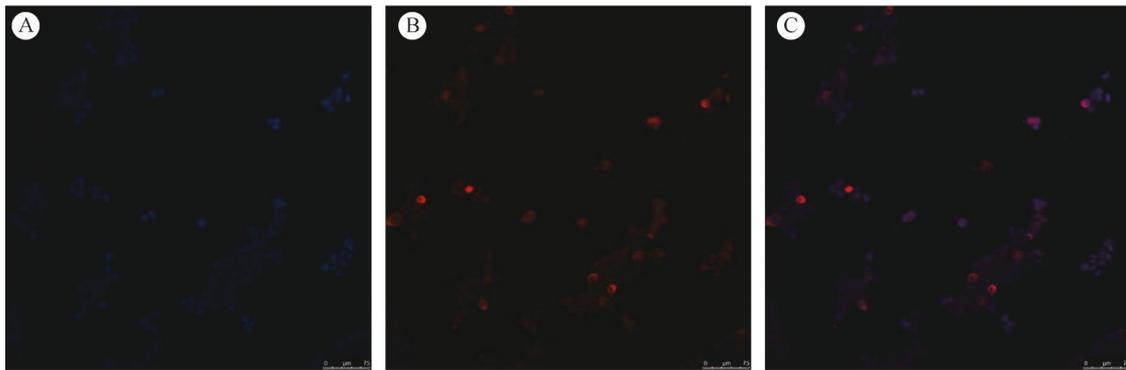
### 2.4 rCB1、Bcl-2、Bax、Bad 在 CaSki 细胞的表达

pcDNA3.1(+)-rCB1 转染 CaSki 细胞后,Western blot 结果如图 6 所示,与对照组比较,rCB1 组的 Bax、Bad 表达高于对照组( $P < 0.05$ ),Bcl-2 的表达低于对照组( $P < 0.05$ )。荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测结果如图 7 所示,与对照组比较,rCB1 组中的 Bax、Bad 的 mRNA 表达高于空白组( $P < 0.05$ ),Bcl-2 mRNA 的表达低于空白组( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

20 世纪 90 年代初,人类发现大麻素 CB1 受体并对其结构进行了研究分析,发现 CB1 受体由 473 个氨基酸/7 个跨膜结构域构成,属于 G 蛋白偶联受体。同时发现,CB1 受体主要来源于神经细胞,CB1 受体几乎都能与所有的大麻类物质结合,作为大麻素的作用受体,其生物作用是调节化学递质的释放<sup>[3]</sup>。

目前关于人 CB1 受体生理功能和药物活性的研究已有大量报道,CB1 受体在神经退行性疾病、镇痛、精神性疾病、心血管疾病、糖尿病、眼科疾病、调节胃肠道系统等治疗中具有重要的作用<sup>[9-11]</sup>。大麻素与 CB1 受体结合后通过诱导细胞凋亡、影响细胞增殖、抑制细胞侵袭转移和抑制肿瘤血管生成等作用对包括乳腺癌、前列腺癌、神经胶质瘤、白血病、皮肤癌、甲状腺癌和胰腺癌等肿瘤产生明显的抑制作用<sup>[7]</sup>。



注:A: DAPI B: 红色荧光 D: 复合图。

图 4 转染 pcDNA3.1(+)-rCB1 后 HEK293 细胞的免疫荧光联合激光扫描共聚焦观察

Note. A: DAPI; B: Red fluorescence; D: Composite diagram.

Fig. 4 Immunofluorescence and laser scanning confocal microscopic observation on HEK293 cells transfected with pcDNA3.1(+)-rCB1

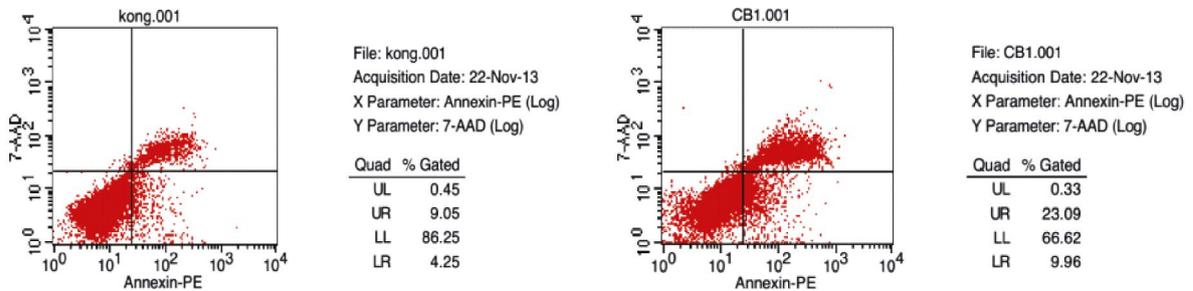
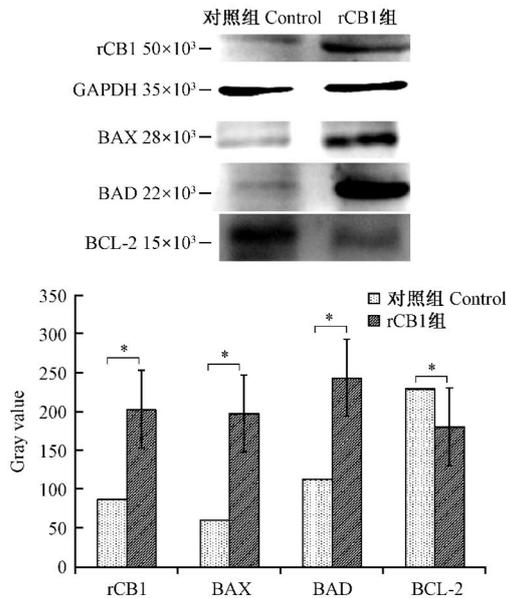


图 5 流式细胞仪检测结果

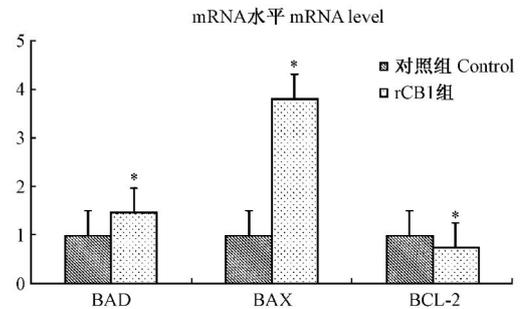
Fig. 5 Apoptosis in CaSki cells determined by flow cytometry



注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ 。 Note. \*  $P < 0.05$ , compared with the control group.

图 6 Western blot 检测 rCB1、Bcl-2、Bax、Bad 蛋白表达结果

Fig. 6 Expressions of rCB1, Bcl-2, Bax, and Bad proteins detected by Western blot



注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ 。

图 7 荧光定量 PCR 检测 Bcl-2、Bax、Bad 的 mRNA 表达结果

Note. \*  $P < 0.05$ , compared with the control group.

Fig. 7 Expression levels of CB1, Bcl-2, Bax, and Bad mRNA measured by qRT-PCR

通过分析人类 CB1 基因和大鼠 rCB1 基因的核酸序列,发现基因序列相似性达 99%。Sordelli 等<sup>[6]</sup>发现, CB1 受体和 CB2 受体在大鼠子宫内有分布,影响胚胎的植入。Fonseca 等<sup>[12]</sup>研究发现,给予药物激动 CB1 受体, CB1 可诱导大鼠子宫蜕膜细胞的凋亡, Sanchez<sup>[13]</sup>和 Gentilini<sup>[14]</sup>的研究也发现 CB1 受体与人、小鼠子宫内异位及细胞凋亡存在关联。

冯睿等<sup>[15]</sup>构建了 rCB1-EGFP 融合蛋白真核表达载体。然而,有关 rCB1 的生物活性报导还是很少。

宫颈癌是妇女最常见的恶性肿瘤之一,其发病率及死亡率仅次于乳腺癌,严重威胁着全球女性的健康,每年全世界约有 51 万新发病例。在中国每年有 10 万新发病例,约占世界宫颈癌新发病例的 1/5<sup>[16-18]</sup>。宫颈癌按病理学分为三种:鳞癌、腺癌和腺鳞癌。对宫颈癌组织标本的研究发现,99% 以上的宫颈癌有人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染,HPV-16 感染引起的宫颈鳞癌占 50 - 60%<sup>[19-21]</sup>。在现有的宫颈癌细胞株中,CaSki 细胞是 HPV-16 阳性宫颈癌细胞株,以 CaSki 细胞为模型,探索治疗宫颈癌的新基因药物,对临床应用具有重要意义。

本研究首先根据大鼠 CB1 受体的分布,取大鼠脑组织后剥离脑膜与脑血管,分离大鼠脑组织海马区,从海马区获取 RNA 可保障 rCB1 高拷贝,并构建鼠源 CB1 基因构建真核表达载体。将构建成功的 rCB1 真核表达载体转染宫颈癌 CaSki 细胞,研究 rCB1 对宫颈癌细胞凋亡的影响及其作用机制。

本研究发现,rCB1 能够表达于 HEK293 细胞中且表达于细胞膜与细胞质中,这与 Geiger 等<sup>[22]</sup>研究人 CB1 在 HEK293 细胞中的表达位置一致。利用构建成功的 rCB1 真核表达载体转染宫颈癌 CaSki 细胞后结果发现,rCB1 可以诱导宫颈癌 CaSki 细胞凋亡,同时发现 CaSki 细胞中 bcl-2、bax、bad 的表达发生变化,进而表明 rCB1 通过上调细胞凋亡因子 bcl-2 家族中 bax、bad 的表达和下调了 bcl-2 的表达,从而诱导宫颈癌细胞凋亡。

综上所述,本研究成功构建了 rCB1 真核表达载体,并在国内首次发现 rCB1 能够诱导宫颈癌 CaSki 细胞凋亡,其作用机制是上调 bax、bad 和下调 bcl-2 的表达。研究结果提示 rCB1 对宫颈癌具有治疗作用,有望取代人的 CB1 功能。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Woelkart K, Salo-Ahen OM, Bauer R. CB receptor ligands from plants [J]. *Curr Top Med Chem*, 2008, 8: 173 - 186.
- [ 2 ] Selley DE, Welch SP, Sim-Selley LJ. Sphingosine lysolipids in the CNS: endogenous cannabinoid antagonists or a parallel pain modulatory system [J]. *Life Sci*, 2013, 93(5 - 6): 187 - 193.
- [ 3 ] Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA [J]. *Nature*, 1990, 346(6284): 561 - 564.
- [ 4 ] Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M, et al. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids [J]. *Nature*, 1993, 365(6441): 61 - 65.
- [ 5 ] 吴永涛,刘宏亮,姚忠祥,等. 大麻素 CB1、CB2 受体在脑组织中分布及其表达特性的研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2009, 24(3): 197 - 199.
- [ 6 ] Sordelli MS, Beltrame JS, Burdet J, et al. The effect of anandamide on uterine nitric oxide synthase activity depends on the presence of the blastocyst [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(4): e18368.
- [ 7 ] 吴敏,任瑞宝. 大麻素类化合物抗肿瘤研究新进展 [J]. *肿瘤*, 2013, 33(5): 478 - 482.
- [ 8 ] Schneider P, Hannusch C, Schmahl C, et al. Adolescent peer-rejection persistently alters pain perception and CB1 receptor expression in female rats [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2013, 24(2): 290 - 300.
- [ 9 ] 于海玲,张凤,全哲山. 内源性大麻素系统与抑郁症 [J]. *生理科学进展*, 2012, 43(4): 257 - 262.
- [ 10 ] Guabiraba R, Russo RC, Coelho AM, et al. Blockade of cannabinoid receptors reduces inflammation, leukocyte accumulation and neovascularization in a model of sponge-induced inflammatory angiogenesis [J]. *Inflamm Res*, 2013, 62(8): 811 - 821.
- [ 11 ] 王鹏飞,何奔. 内源性大麻素系统与心肌缺血再灌注损伤 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(8): 669 - 672.
- [ 12 ] Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Teixeira NA, et al. The endocannabinoid anandamide induces apoptosis of rat decidual cells through a mechanism involving ceramide synthesis and p38 MAPK activation [J]. *Apoptosis*, 2013, 18(12): 1526 - 1535.
- [ 13 ] Sanchez AM, Vigano P, Mugione A, et al. The molecular connections between the cannabinoid system and endometriosis [J]. *Mol Human Reprod*, 2012, 18(12): 563 - 571.
- [ 14 ] Gentilini D, Besana A, Vigano P, et al. Endocannabinoid system regulates migration of endometrial stromal cells via cannabinoid receptor 1 through the activation of PI3K and ERK1/2 pathways [J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(8): 2588 - 2593.
- [ 15 ] 冯睿,范娟,刘一辉,等. 大鼠大麻素 1 型受体绿色荧光融合蛋白真核表达载体的构建与鉴定 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(26): 5034 - 5037.
- [ 16 ] 梁东霞. 宫颈癌与 HPV 关系的研究进展 [J]. *实用癌症杂志*, 2010, 25(2): 202 - 205.
- [ 17 ] 刘昱,曹来英,张蔚,等. 槲皮素抗宫颈癌的机制研究 [J]. *微循环杂志*, 2010, 20(3): 27 - 29.
- [ 18 ] 梁东霞. 宫颈癌与 hpv 关系的研究进展 [J]. *实用癌症杂志*, 2010, 25(2): 202 - 205.
- [ 19 ] Kim MS, Bak Y, Park YS, et al. Wogonin induces apoptosis by suppressing E6 and E7 expressions and activating intrinsic signaling pathways in HPV-16 cervical cancer cells [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2013, 29(4): 259 - 272.
- [ 20 ] 李华. HPV 与宫颈癌的研究进展 [J]. *实用癌症杂志*, 2007, 22(4): 202 - 205.
- [ 21 ] Sankaranarayanan R. Overview of cervical cancer in the developing world. FIGO 26<sup>th</sup> Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2006, 95(1): S205 - 210.
- [ 22 ] Geiger S, Nickl K, Schneider EH, et al. Establishment of recombinant cannabinoid receptor assays and characterization of several natural and synthetic ligands [J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2010, 382(2): 177 - 191.