

去氢木香内酯诱导乳腺癌 SK-BR-3 细胞凋亡的机制研究

马强, 陈洁, 熊书, 李国利, 罗娇, 杨贞妮, 孙厚良, 邓雪松, 苗加伟(重庆三峡医药高等专科学校基础医学部, 重庆市抗肿瘤天然药物工程技术研究中心, 重庆 404120)

摘要: **目的** 观察去氢木香内酯(Dehydrocostuslactone, Dehy)对乳腺癌 SK-BR-3 细胞增殖和凋亡的影响, 并探讨其分子机制。**方法** 体外培养乳腺癌 SK-BR-3 细胞, 分别加入不同浓度 Dehy(5、10、20、30、40、50、60、80、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用 24、48、72 h, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率。将 SK-BR-3 细胞分为空白对照组(0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 Dehy 10、20、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组, 干预 48 h 后, 利用倒置显微镜观察乳腺癌 SK-BR-3 细胞的形态; 采用流式细胞术检测细胞周期; Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率; Hoechst 33258 荧光染色法检测细胞凋亡的形态学变化; Western Blot 法检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3 和 Cleaved Caspase-3 蛋白的表达。**结果** Dehy 干预 SK-BR-3 细胞 24、48、72 h 后的 IC_{50} 值分别为 24.84、19.39、11.45 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 且呈现浓度和时间依赖性。与空白对照组比较, Dehy 10、20、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组的 SK-BR-3 细胞数量明显减少, 细胞结构松散、轮廓消失、变圆, 贴壁不良; Dehy 10、20、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组的 G₂/M 期细胞比例及细胞凋亡率均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 呈明显的浓度依赖性; Dehy 10、20、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组的 SK-BR-3 细胞出现不同程度的细胞核浓染、固缩及碎裂等凋亡现象, 且细胞核致密浓染的比例显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); Dehy 10、20、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组的 Bax、Caspase-3 和 Cleaved Caspase-3 蛋白表达显著上调($P < 0.05$, $P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达明显下调($P < 0.05$, $P < 0.01$), Bax/Bcl-2 比值明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** Dehy 能够抑制乳腺癌 SK-BR-3 细胞的增殖及诱导其凋亡, 可能与其调控 Bax/Bcl-2/Caspase-3 凋亡信号通路来抑制乳腺癌细胞的抗凋亡能力有关。

关键词: 去氢木香内酯; 人乳腺癌 SK-BR-3 细胞; 增殖; 细胞周期; 凋亡; 机制; Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)02-0200-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.02.007

Effects of Dehydrocostuslactone on the Apoptosis of Human Breast Cancer SK-BR-3 Cells and Its Mechanism

MA Qiang, CHEN Jie, XIONG Shu, LI Guoli, LUO Jiao, YANG Zhenni, SUN Houliang, DENG Xuesong, MIAO Jiawei(Chongqing Engineering Research Center of Antitumor Natural Drugs, Department of Basic Medicine, Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of dehydrocostuslactone on the proliferation and apoptosis of human breast cancer SK-BR-3 cells and explore the molecular mechanism. **Methods** Human breast cancer cells were cultured *in vitro* and treated with different concentrations (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of dehydrocostuslactone for 24, 48 and 72 h. Inhibitory rate of dehydrocostuslactone on cell proliferation was detected with CCK-8. The cells were divided into blank control group (0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and dehydrocostuslactone groups (10, 20, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The cell morphology was observed under inverted microscope. Flow cytometry was adopted to

收稿日期: 2020-07-19

作者简介: 马强, 男, 硕士, 讲师, 研究方向: 抗肿瘤活性药物筛选及其应用研究。Email: cjqmang@163.com。通信作者: 邓雪松, 男, 副教授, 研究方向: 肿瘤发生与防治。Email: 71425996@qq.com。苗加伟, 男, 硕士, 讲师, 研究方向: 天然药物成分及其活性研究。Email: 1127645735@qq.com。

基金项目: 重庆市教育委员会科学技术研究项目(KJ1725385, KJQN201802712, KJQN201902701, KJQN201802711); 重庆市自然科学基金项目(cstc2018jcyjAX0469); 重庆三峡医药高等专科学校自然科学基金重点项目(2016xzz03)。

detect proliferation cycles of cells and apoptosis was analyzed by Annexin V-FITC/propidium iodide (PI) double staining. The morphological changes of cells were observed by Hoechst 33258 staining. Western Blot was used to detect the expression levels of Bax, Bcl-2, Caspase-3 and cleaved Caspase-3 proteins in SK-BR-3 cells. **Results** IC_{50} values were $24.84 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $19.39 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $11.45 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ after cells were treated with Dehy for 24 h, 48 h and 72 h, which showed a concentration and time dependent manner. Compared with blank control group, the number of cells were decreased significantly in 10, 20, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dehydrocostuslactone groups, the cell structure was loose, the volume was reduced, and the gap became larger; most of the cell contour disappeared and became round, the cell adherence was poor. The percentages of cells at G₂/M phase and apoptosis in Dehy 10, 20, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ groups cells were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), also with a concentration-dependent manner. Hoechst 33258 staining showed apoptotic morphology such as nuclear staining, pyknosis and fragmentation appeared in Dehy 10, 20, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ groups SK-BR-3 cells, and the proportion of nuclear dense staining was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The protein expression levels of Bax, Caspase-3 and cleaved Caspase-3 were up-regulated significantly in Dehy 10, 20, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the expression levels of Bcl-2 protein were down-regulated significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Dehydrocostuslactone can induce apoptosis and cell cycle arrest of human breast cancer SK-BR-3 cells, and its mechanism may be through regulating Bax/Bcl-2/Caspase-3 apoptosis signal pathway to inhibit the anti apoptosis ability of breast cancer cells.

Keywords: Dehydrocostuslactone; human breast cancer SK-BR-3 cells; proliferation; cell cycle; apoptosis; mechanism; Bax/Bcl-2/Caspase-3 signal pathway

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤疾病,其发病率和致死率呈逐年上升的趋势^[1]。目前使用的治疗方案多存在耐药性及副作用大等问题^[2],因此寻找和开发新型、有效且副作用小的抗乳腺癌药物具有积极意义。从药用植物中分离出的天然产物是有效治疗癌症的重要途径之一,与传统的以单分子为靶点的肿瘤化疗药物相比,植物化学成分能够靶向同一途径或多条肿瘤发生途径的多个分子,具有更好的治疗效果和较低的毒副作用。目前,已有大量植物化学成分被成功地应用于治疗各种癌症和其他疾病^[3]。

去氢木香内酯(Dehydrocostuslactone, Dehy)是从我国传统中药材——木香根中提取的一种倍半萜内酯化合物,化学结构式见图 1。研究发现,Dehy 具有抗炎、抗病毒、抗氧化等多方面的药理活性^[4-5],并在肝癌、白血病、卵巢癌等多种人类癌细胞系中表现出较为显著的抗癌特性^[6-8]。提示 Dehy 可能是一种潜在的癌症治疗药物。Choi J 等^[9]报道了云木香中提取的 Dehy 可抑制乳腺癌细胞的增殖及诱导其凋亡,但未阐明确切的分子机制。总体来说,目前关于 Dehy 对乳腺癌细胞增殖、凋亡的影响及其分子机制的研究报道较少。故本研究拟观察 Dehy 对人乳腺癌 SK-BR-3 细胞增殖、凋亡的影响,并以凋亡信号通路 Bax/Bcl-2/Caspase-3 为靶点,探究其诱导凋亡

的分子机制。

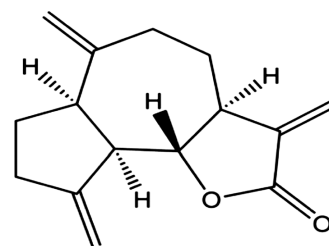


图 1 去氢木香内酯的化学结构式

Figure 1 Chemical structure of Dehy

1 材料与方法

1.1 细胞株 人乳腺癌 SK-BR-3 细胞,购自上海中乔新舟生物技术有限公司,批号:20161202-04;对该细胞系抽提的 DNA 进行 STR 位点及性别基因 Amelogenin 检查,结果显示完全匹配,可用于开展后续研究。

1.2 药物及试剂 去氢木香内酯(Dehy,纯度 $\geq 98\%$),成都曼思特生物科技有限公司,批号:A0301;用 DMSO 配制成 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液,分装, -20°C 保存备用。DMEM 高糖培养基(批号:C11995500BT)、胰酶(批号:25200-056)、胎牛血清(批号:A3160802)、青霉素及链霉素溶液(批号:15140-122),均购自美国 Gibco 公司;CKK-8 试剂

盒, 美国 APEX BIO 公司, 批号: K1018; 细胞周期检测试剂盒(批号: WLA010a)、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(批号: WLA001b), 均购自沈阳万类生物科技有限公司; Hoechst 33258 染色液(批号: C0021)、4%多聚甲醛(批号: P1110), 均购自北京索莱宝科技有限公司; 蛋白酶抑制剂(PMSF, 批号: ST506)、磷酸酶抑制剂(批号: P1051)、RIPA 细胞裂解液(批号: P0013K)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号: P0012), 均购自上海碧云天生物技术有限公司; 彩色预染蛋白 Marker(批号: P9001)、ECL 化学发光显色液(批号: P10100), 均购自苏州新赛美生物科技有限公司; 兔抗 Caspase-3(批号: 380189)、Cleaved Caspase-3(批号: 341052)、Bax(批号: 612259)、Bcl-2(批号: 310004)及 β -actin(批号: 340042)一抗, 均购自成都正能生物科技有限责任公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG(H+L)二抗, 英国 Abcam 公司, 批号: ab6789。

1.3 主要仪器 Allegra-64R 型台式高速冷冻离心机, 美国 Beckman 公司; ELx800 型酶标仪, 美国 Bio-Tek 公司; MCO-15AC 型细胞培养箱, 日本 SANYO 公司; CytoFLEX 流式细胞仪, 美国 Beckman 公司; ChemiDoc Touch 化学发光成像系统, 美国 Bio-Rad 公司; DMi8A 型荧光倒置显微成像系统, 德国 Leica 公司。

1.4 细胞培养 将冻存的 SK-BR-3 细胞接种于含 12%胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素及 100 μ g·mL⁻¹链霉素的 DMEM 高糖培养基中; 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 每 2~3 d 换培养液 1 次, 待细胞长满培养瓶底部 80%~90%时进行传代, 取对数生长期细胞进行相关实验。

1.5 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率 取对数生长期的 SK-BR-3 细胞, 制成细胞悬液, 按每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μ L。37 °C 培养箱中培养 24 h 待细胞贴壁, 分别加入含终浓度为 5、10、20、30、40、50、60、80、100 μ mol·L⁻¹ (浓度设置参考相关研究^[10-11])的 Dehy 培养基干预, 空白对照组加入含 0.1% DMSO 的培养基。每孔的总体积为 200 μ L, 每组设 5 个复孔。药物分别干预 24、48、72 h 后, 避光条件下每孔加 10 μ L CCK-8 溶液, 继续孵育 4 h, 置于酶标仪中在 450 nm 波长下测定各孔光密度(OD)值。计算: 细胞增殖抑制率(%)=(对照组 OD 值 - 实验组 OD 值)/对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。

1.6 Hoechst 33258 荧光染色法检测细胞凋亡 将对数生长期的 SK-BR-3 细胞以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种于 12 孔板中, 每孔加入 1 mL 培养基, 于细胞培养箱中培养 24 h; 然后, 弃去旧培养基, 将细胞用含 10、20、30 μ mol·L⁻¹ Dehy 的培养基进行干预, 空白对照组加入含 0.1% DMSO 的培养基; 药物干预 48 h 后, 弃去培养基, 用 4%多聚甲醛溶液于 4 °C下固定 30 min; 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 每次 3~5 min; 加入 500 μ L Hoechst 33258 稀释工作液, 室温下避光染色 10 min; 吸除染色液, 用 PBS 洗涤 2 次, 每次 3~5 min; 然后, 置于倒置荧光显微镜下观察, 每孔随机选择 5 个视野拍照。镜下可见, 凋亡细胞的荧光强度比正常细胞要高, 且细胞核会出现致密的浓染或呈碎块状致密浓染。利用图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 进行计数并计算各浓度 Dehy 作用后的细胞核浓染率。细胞核浓染率(%)=细胞核浓染数/细胞核总数 $\times 100\%$ 。

1.7 流式细胞术检测细胞周期及细胞凋亡率 将对数生长期的 SK-BR-3 细胞以每皿 5×10^5 个细胞的密度接种于 60 mm 培养皿中, 每皿加入 3 mL 完全培养基, 于细胞培养箱中培养 24 h; 然后, 弃去旧培养基, 将细胞用含 10、20、30 μ mol·L⁻¹ Dehy 的培养基干预, 空白对照组加入含 0.1% DMSO 的培养基。①药物干预 48 h 后, 收集细胞, 用 70%乙醇 4 °C固定过夜。然后, 用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 加入 100 μ L RNase A 重悬细胞, 37 °C水浴 30 min; 随后加入 500 μ L Propidium Iodide (PI) 染色液, 混匀, 4 °C避光孵育 30 min; 然后, 利用流式细胞仪配置的 CellQuest 软件测定细胞周期相位分布的 DNA 含量。②药物干预 48 h 后收集细胞, PBS 清洗细胞 2 次, 加入 500 μ L Binding Buffer、5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L PI 溶液, 混匀, 于室温下暗处孵育 5 min, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.8 Western Blot 法检测 Caspase-3、Cleaved Caspase-3、Bax 及 Bcl-2 蛋白的表达 取对数生长期的 SK-BR-3 细胞, 以每瓶 1×10^7 个细胞的密度接种于细胞培养瓶中; 待细胞贴壁后, 弃去旧培养基, 然后将细胞用含 10、20、30 μ mol·L⁻¹ Dehy 的培养基干预, 空白对照组加入含 0.1% DMSO 的培养基; 药物干预 48 h 后, 收集各处理组细胞。向各组细胞加入预先配制的 RIPA 细胞裂解液(内含 1% PMSF 及 1%磷酸酶抑制剂)100 μ L, 于冰上裂解 30 min; 然后, 4 °C下以 $13\ 500\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,

提取总蛋白；采用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。然后，按照 Western Blot 实验步骤进行 SDS-PAGE 电泳，电转到 PDVF 膜；5% 脱脂奶粉 4 ℃ 封闭 12 h，TBST 缓冲液清洗 PDVF 膜；分别加入对应一抗 (1 : 1 000)，4 ℃ 下孵育过夜，TBST 缓冲液漂洗 3 次，每次 5 min；加入 HRP 标记的二抗 (1 : 5 000)，室温下孵育 2 h，TBST 缓冲液漂洗 3 次，每次 5 min；采用 ECL 发光试剂盒显色；利用 BIO-RAD ChemiDoc™ Touch Imaging System 曝光、扫描、拍照；运用 Quantity One V4.6.6 图像分析软件检测条带灰度值，将各组目的蛋白灰度值与内参蛋白 (β -actin) 灰度值的比值作为目的蛋白相对表达量，比较各组间的差异。

1.9 统计学处理方法 采用 SPSS 16.0 和 GraphPad Prism 6.0 统计软件进行数据分析，计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示；多组间比较采用单因素方差分析

(One-way ANOVA)，两两比较用 LSD 检验；以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Dehy 对乳腺癌 SK-BR-3 细胞形态及增殖的影响 结果见图 2。倒置显微镜下观察显示，空白对照组细胞轮廓清晰、形态规则、细胞质饱满，贴壁较好。与空白对照组比较，Dehy 10、20、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组的细胞数量明显减少，结构松散、体积缩小、间隙变大，且多数细胞轮廓消失、皱缩变圆，贴壁不良；Dehy 对 SK-BR-3 细胞增殖有明显的抑制作用，Dehy 干预 24、48、72 h 后的 IC_{50} 值分别为 24.84、19.39、11.45 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，且呈现浓度和时间依赖性。据此结果，选取浓度 10、20、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Dehy 作用 48 h 进行后续试验。

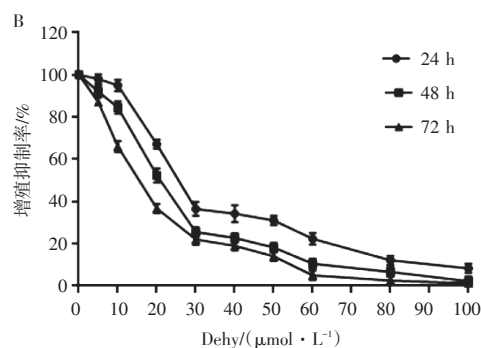
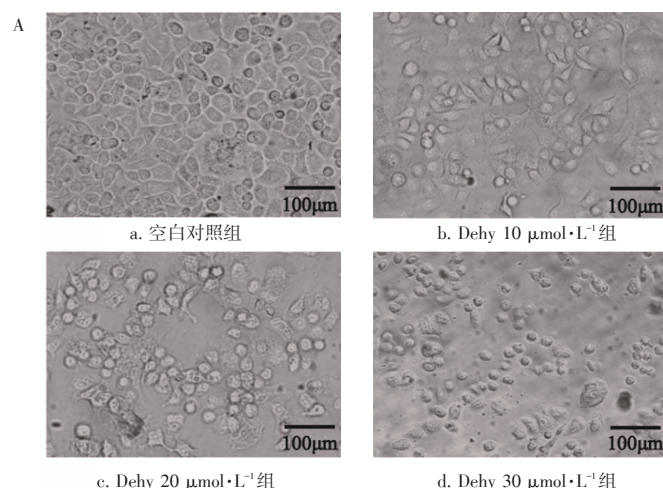


图 2 去氢木香内酯(Dehy)对 SK-BR-3 细胞形态(A)和增殖(B)的影响($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n=5$)

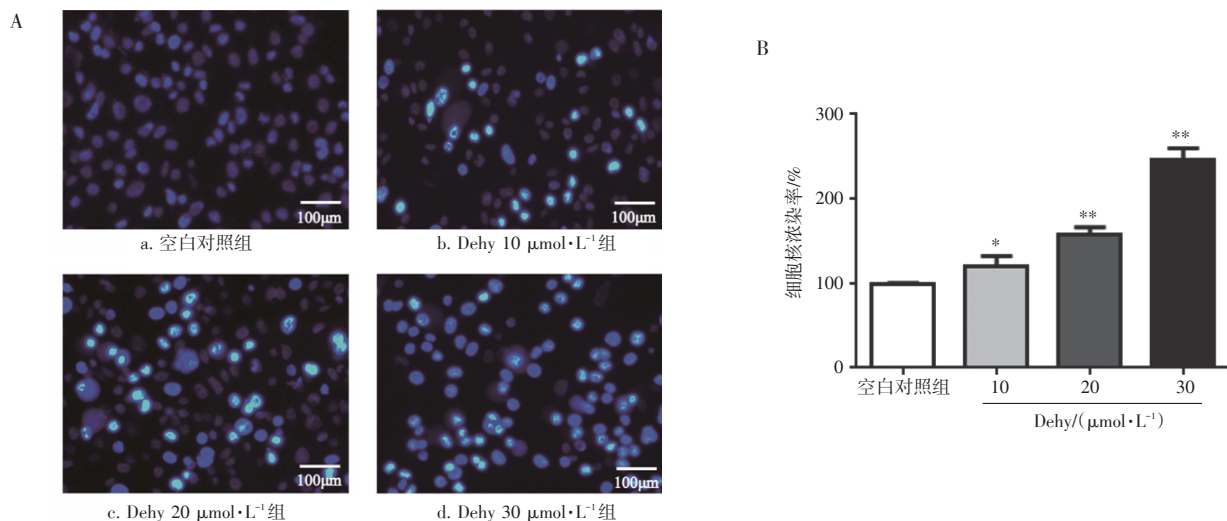
Figure 2 Effect of Dehy on the morphology(A) and proliferation inhibition rate(B) of SK-BR-3 cells($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n=5$)

2.2 Dehy 对 SK-BR-3 细胞凋亡形态的影响 结果见图 3。Hoechst 33258 荧光染色结果显示，空白对照组的 SK-BR-3 细胞核染色较浅，呈现均匀弥散的蓝色荧光；与空白对照组比较，Dehy 10、20、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组的细胞核均出现致密浓染的蓝色荧光，且随着 Dehy 浓度的增加，细胞核出现致密浓染的数量显著升高，同时能观察到不同程度的核固缩及碎裂等凋亡现象，细胞核浓染率明显升高，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明，Dehy 可诱导乳腺癌 SK-BR-3 细胞凋亡。

2.3 Dehy 对 SK-BR-3 细胞周期的影响 结果见

图 4。与空白对照组比较，Dehy 10、20、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度干预 SK-BR-3 细胞 48 h 后， G_2/M 期细胞百分率显著升高，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明，Dehy 能够将 SK-BR-3 细胞周期阻滞于 G_2/M 期，且呈明显的浓度依赖性。

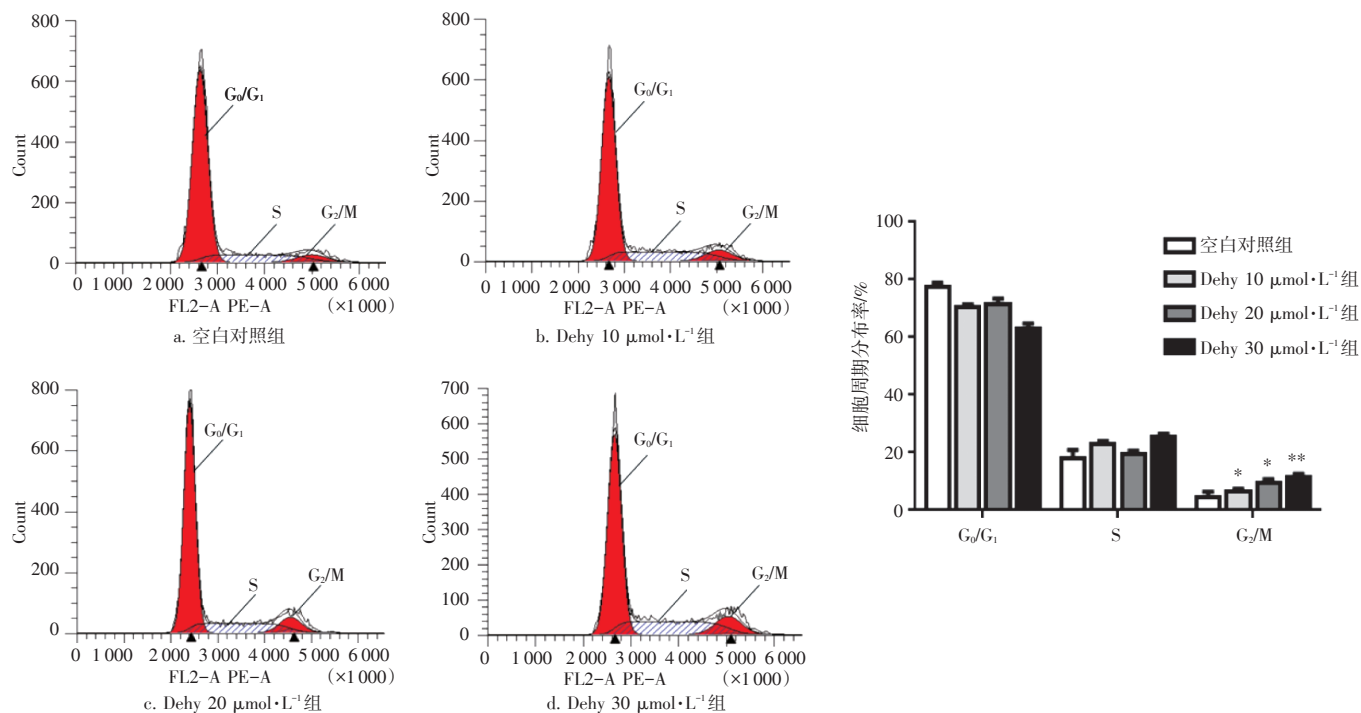
2.4 Dehy 对 SK-BR-3 细胞凋亡率的影响 结果见图 5。与空白对照组比较，Dehy 10、20、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度干预 SK-BR-3 细胞 48 h 后，细胞凋亡率均显著升高，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，且呈明显的浓度依赖性。结果表明，Dehy 可浓度依赖性地诱导乳腺癌 SK-BR-3 细胞凋亡。



注: A.Hoechst 33258 荧光染色图; B. 染核细胞计数。与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图3 去氢木香内酯(Dehy)对 SK-BR-3 细胞凋亡形态的影响(Hoechst 33258 染色, $\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 3 Effect of Dehy on apoptotic morphology of SK-BR-3 cells(Hoechst 33258 staining, $\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n=5$)



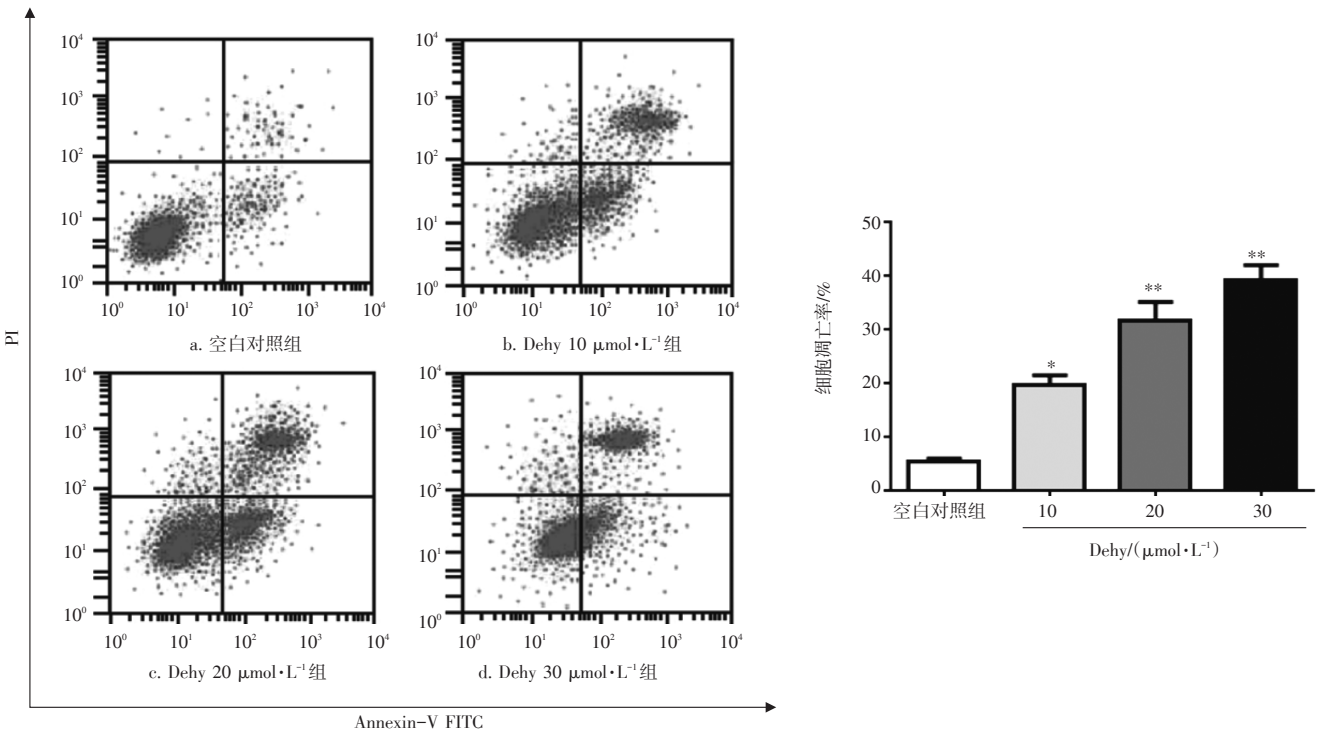
注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图4 去氢木香内酯(Dehy)对 SK-BR-3 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 4 Effect of dehydrocostuslactone on cell cycle distribution of SK-BR-3 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.5 Dehy 对 SK-BR-3 细胞 Caspase-3、Cleaved Caspase-3、Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响 结果见图 6、表 1。与空白对照组比较, Dehy 10、20、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组 SK-BR-3 细胞的凋亡蛋白 Bax 和凋亡关键蛋白酶 Caspase-3、Cleaved Caspase-3 的表达量明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而抗凋亡蛋白

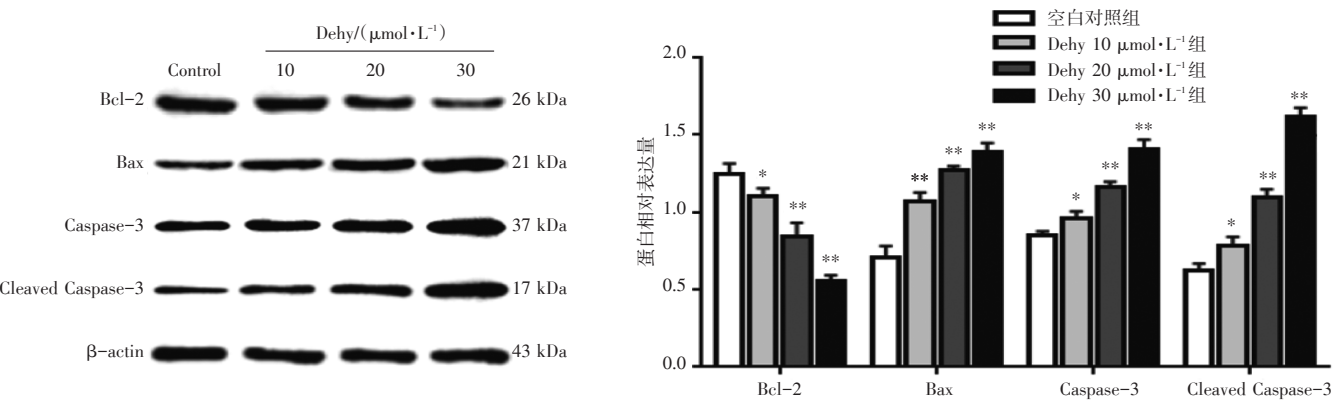
Bcl-2 的表达量则显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。此外, Dehy 10、20、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组的 Bax/Bcl-2 蛋白表达比值比空白对照组分别升高了 1.9、3.8、6.7 倍, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明, Dehy 可能通过 Bax/Bcl-2/Caspase-3 凋亡信号通路促进 SK-BR-3 细胞凋亡。



注：与空白对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$

图 5 去氢木香内酯(Dehy)对 SK-BR-3 细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 5 Effect of Dehy on apoptosis rate of SK-BR-3 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注：与空白对照组(Control 组)比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$

图 6 去氢木香内酯(Dehy)对 SK-BR-3 细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3 及 Cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 6 Effect of Dehy on expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3 and Cleaved Caspase-3 protein in SK-BR-3 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

表 1 去氢木香内酯(Dehy)对 SK-BR-3 细胞 Bax/Bcl-2 比值的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effect of dehy on the ratio of Bax and Bcl-2 in SK-BR-3 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度/(μmol·L ⁻¹)	Bax/Bcl-2
空白对照组	—	0.341 ± 0.019
Dehy 组	10	0.639 ± 0.037*
	20	1.281 ± 0.085**
	30	2.294 ± 0.049**

注：与空白对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$

3 讨论

肿瘤形成是一个十分复杂的生物学过程，其生长取决于细胞增殖和凋亡之间的平衡，而抗肿瘤药物主要通过抑制肿瘤细胞增殖和促进凋亡发挥抗肿瘤作用^[12]。去氢木香内酯(Dehy)是从云木香(*Saussurea lappa*)的干燥根中提取的一种含有 α-亚甲基-γ-内酯环结构的倍半萜类化合物，该结构能与含有巯基的酶及其功能性蛋白酶发生反应，进而干扰细胞的代谢过程，是具有多种药理活性的化合物^[5, 13]。已有研

究^[6]表明, Dehy 对不同来源的人癌细胞株具有广谱的细胞毒性。本研究以体外培养的人乳腺癌 SK-BR-3 细胞为研究对象, 探讨了 Dehy 对其增殖的抑制作用。CCK-8 法检测结果显示, Dehy 能以时间和浓度依赖的方式降低 SK-BR-3 细胞活力。Hoechst 33258 荧光染色可见, 经 10、20、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Dehy 干预后, SK-BR-3 细胞出现明显的致密浓染、核固缩及碎裂等凋亡现象。以上研究结果提示, Dehy 具有抑制 SK-BR-3 细胞增殖, 诱导其凋亡的作用。

细胞周期阻滞和凋亡是诱导细胞死亡的 2 种机制^[14]。细胞周期是细胞从第 1 次分裂完成产生新细胞到第 2 次分裂结束所经历的全过程^[15], 该过程受 G₁、S、G₂、M 等检查点的严格控制, 而细胞周期检查点的改变会导致异常的细胞增殖和癌症的发生发展, 肿瘤细胞经常在检查点出现缺陷而导致其无限制地增殖^[16]。许多抗肿瘤药物能够在特定的检测点诱导细胞周期阻滞, 从而诱导细胞凋亡^[17]。Choi J 等^[8] 研究显示, Dehy 可将卵巢癌 SK-OV-3 细胞周期阻滞于 G₂/M 期, 抑制卵巢癌细胞的增殖。细胞凋亡是细胞程序性死亡方式之一, 也是由多种因子或蛋白参与的复杂病理生理过程^[18]。多项研究^[8,11,19]采用流式细胞术发现, Dehy 可诱导卵巢癌细胞、非小细胞肺癌细胞株 A549、乳腺癌 MCF-7 的凋亡。本研究结果显示, Dehy 10、20、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组的 G₂/M 期细胞所占比例均显著增加, 且与浓度呈正相关, 提示 Dehy 呈浓度依赖性地阻滞 SK-BR-3 细胞于 G₂/M 期以抑制细胞的增殖。此外, Dehy 10、20、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组细胞的凋亡率均显著升高, 且与浓度呈正相关, 提示 Dehy 呈浓度依赖性地诱导 SK-BR-3 细胞凋亡。

诱导凋亡是对癌症防御的一种重要手段。对于目前临床上大多数常用抗癌药物而言, 主要的抗癌机制仍是激活凋亡途径以杀死癌细胞^[20]。研究^[21]表明, 细胞凋亡是通过哺乳动物细胞的内源或外源途径发生的, 而线粒体途径在内源性凋亡过程中起着重要作用, 被认为与植物化学物质诱导的癌细胞凋亡有关。众所周知, 线粒体凋亡途径受 Bcl-2 家族蛋白控制, 该家族蛋白包括抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax, 它们分别具有抑制或促进细胞凋亡的作用, 尤其是促凋亡蛋白 Bax 与抗凋亡蛋白 Bcl-2 的比值对线粒体凋亡途径起重要调控作用^[22-23]。Bax/Bcl-2 比值的升高能够诱导线粒体功能障碍, 从而释放一些凋

亡相关因子, 激活下游细胞凋亡过程中的关键蛋白酶之一 Caspase-3 的表达, 进而促进 Caspase-3 的剪切, 启动 Caspase 级联反应, 诱发细胞凋亡^[24-25]。本研究结果表明, 随着 Dehy 干预浓度的增加, SK-BR-3 细胞的 Bax/Bcl-2 比值显著升高, Caspase-3 及 Cleaved Caspase-3 蛋白表达量也显著增加, 表明 Dehy 促进 SK-BR-3 细胞凋亡的分子机制与上述相关研究结论一致。

综上所述, Dehy 在体外可明显抑制人乳腺癌 SK-BR-3 细胞增殖及诱导其凋亡, 且呈浓度依赖性, 其作用机制可能与调控 Bax/Bcl-2/Caspase-3 凋亡信号通路有关。本课题组后续研究将继续对 Dehy 的药理作用及其对乳腺癌细胞迁移侵袭、成瘤性等其他相关分子机制进行深入探讨, 以期 Dehy 的临床应用提供更多的参考资料。

参考文献:

- [1] EBRAHIMI S, GHORBANI E, SHAFIEE M, et al. Therapeutic potency of oncolytic virotherapy in breast cancer targeting, current status and perspective[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(3): 2801-2809.
- [2] 罗焱, 尤朋涛, 杨敏, 等. 高良姜素诱导人乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(3): 151-154.
- [3] WU T, GENG J, GUO W, et al. Asiatic acid inhibits lung cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* by destroying mitochondria[J]. Acta Pharm Sin B, 2017, 7(1): 65-72.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 35-36.
- [5] HSU Y L, WU L Y, KUO P L. Dehydrocostuslactone, a medicinal plant-derived sesquiterpene lactone, induces apoptosis coupled to endoplasmic reticulum stress in liver cancer cells[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2009, 329(2): 808-819.
- [6] LIN X J, PENG Z X, SU C Q. Potential anti-cancer activities and mechanisms of costunolide and dehydrocostuslactone[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(5): 10888-10906.
- [7] 蔡虹, 杨春辉. 去氢木香内酯对慢性粒细胞白血病 K562 细胞增殖的影响及其机制[J]. 白血病(淋巴瘤), 2019, 28(3): 145-149.
- [8] CHOI E J, AHN W S. Antiproliferative effects of dehydrocostuslactone through cell cycle arrest and apoptosis in human ovarian cancer SK-OV-3 cells[J]. Int J Mol Med, 2009, 23(2): 211-216.
- [9] CHOI E J, KIM G H. Evaluation of anticancer activity of dehydrocostuslactone *in vitro*[J]. Mol Med Rep, 2010, 3(1): 185-188.
- [10] ALVES, JOSE C F. A review on the chemistry of eremanthine: a sesquiterpene lactone with relevant biological activity[J]. J Cheminformatics, 2011, 42(36): 1-35.
- [11] HUNG J Y, HSU Y L, NI W C, et al. Oxidative and endoplasmic

- reticulum stress signaling are involved in dehydrocostuslactone-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells[J]. Lung Cancer, 2010, 68(3): 355-365.
- [12] 张相强, 张鹏, 黄茂葵, 等. 木犀草素对胃癌细胞MGC803增殖的抑制作用及其机制[J]. 第二军医大学学报, 2016, 37(3): 302-308.
- [13] LI Q J, WANG Z G, XIE Y, et al. Antitumor activity and mechanism of costunolide and dehydrocostus lactone: two natural sesquiterpene lactones from the Asteraceae family[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 125-138.
- [14] SUN J M, XU H T, ZHAO L, et al. Induction of cell-cycle arrest and apoptosis in human cholangiocarcinoma cells by pristimerin[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(2): 1-9.
- [15] WU L, GUO H, SUN H, et al. UNC119 mediates gambogic acid-induced cell-cycle dysregulation through the Gsk3 β / β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma cells[J]. Anti-cancer Drug, 2016, 27(10): 988-1000.
- [16] WANG W, ZHAO Y, YAO S, et al. Nigericin inhibits epithelial ovarian cancer metastasis by suppressing the cell cycle and epithelialmesenchymal transition[J]. Biochemistry, 2017, 82(8): 933-941.
- [17] PAL D, SUR S, MANDAL S, et al. Prevention of liver carcinogenesis by amarogentin through modulation of G1/S cell cycle check point and induction of apoptosis[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(12): 2424-2431.
- [18] OUYANG L, SHI Z, ZHAO S, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis[J]. Cell Proliferat, 2012, 45(6): 487-498.
- [19] PENG Z, WANG Y, FAN J, et al. Costunolide and dehydrocostuslactone combination treatment inhibit breast cancer by inducing cell cycle arrest and apoptosis through c-Myc/p53 and AKT/14-3-3 pathway[J]. Sci Rep, 2017, 7: e41254.
- [20] LAU A, WANG Y, CHIU J F. Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic[J]. J Cell Biochem, 2008, 104(2): 657-667.
- [21] LANG L H, ZHU S, HANG H, et al. A natural phenylpropionate derivative from *Mirabilis himalaica* inhibits cell proliferation and induces apoptosis in HepG2 cells[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24(23): 5484-5488.
- [22] 王春景, 盛月, 周强, 等. 香叶木素通过线粒体凋亡途径对人乳腺癌MCF-7细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(2): 149-155.
- [23] GROSS A. Bcl-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism[J]. BBA-Bioenergetics, 2016, 1857(8): 1243-1246.
- [24] 裴岩岩, 李雅, 闫春生, 等. 黄芪甲苷通过Bax/Bcl-2/Caspase-3信号通路诱导人乳腺癌MCF-7细胞凋亡的机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(9): 1077-1082.
- [25] KO H M, JOO S H, JO J H, et al. Liver-wrapping, nitric Oxide-releasing nanofiber downregulates cleaved caspase-3 and bax expression on rat hepatic Ischemia-reperfusioninjury[J]. Transpl P, 2017, 49(5): 1170-1174.

(编辑: 邹元平)