

骆驼刺中的紫柳素诱导 SiHa 细胞凋亡及其作用机制研究

马晓玲¹, 刘雪松^{1,2}, 石磊岭¹, 陈刚¹, 李宁³, 魏鸿雁¹(1. 新疆维吾尔自治区中药民族药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002; 2. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046; 3. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: **目的** 分析骆驼刺中分离富集的紫柳素对人宫颈癌 SiHa 细胞增殖和凋亡的影响及机制。**方法** 以 CCK-8 法检测紫柳素对 SiHa 细胞增殖的抑制作用, 流式细胞术检测紫柳素对细胞凋亡水平和细胞周期影响, RT-PCR 法检测紫柳素对细胞凋亡相关基因表达的影响, Western Blot 法检测凋亡相关蛋白的表达。**结果** 与空白对照组比较, 紫柳素可明显诱导 SiHa 细胞发生凋亡($P < 0.01$), 紫柳素干预 SiHa 细胞可使克隆形成数量明显减少($P < 0.05$), 细胞凋亡率明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 线粒体膜电位明显下降($P < 0.01$), G0/G1 期细胞所占的百分比增加($P < 0.01$), 胱天蛋白酶 3(Caspase-3)和胱天蛋白酶 7(Caspase-7)的基因和蛋白表达增加($P < 0.05$, $P < 0.01$), 同时 Caspase-3 的底物 PARP 蛋白被剪切活化($P < 0.05$), 亦明显降低 Bcl-2 的基因和蛋白表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 紫柳素对 SiHa 细胞的增殖具有抑制作用, 其抑制作用可能与促进细胞凋亡有关。

关键词: 骆驼刺; 紫柳素; SiHa 细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)09-1284-09

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783.2021.09.008

Effects and Mechanism of Butin From *Alhagi Sparsifolia* on Apoptosis of Human Cervical Cancer SiHa Cells

MA Xiaoling¹, LIU Xuesong^{1,2}, SHI Leiling¹, CHEN Gang¹, LI Ning³, WEI Hongyan¹(1. Xinjiang Institute of Chinese Medicine and National Medicine, Urumqi 830002 Xinjiang, China; 2. College of Life Sciences and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046 Xinjiang, China; 3. School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016 Liaoning, China)

Abstract: Objective To analyze the effect and mechanism of butin (BUN) from *Alhagi sparsifolia* on proliferation and apoptosis of human cervical cancer SiHa cells. **Methods** The CCK-8 method was used to detect the inhibitory effect of BUN on the proliferation of human cervical cancer SiHa cells, the apoptosis level and cell cycle of cervical cancer cells were detected by flow cytometry. The effect of BUN on apoptosis-related mRNA of SiHa cells was detected by RT-PCR; Western Blot was used to detect the expression of apoptosis-related proteins. **Results** Compared with the control group, BUN could significantly reduce apoptosis of SiHa cells ($P < 0.01$), the number of clones was significantly decreased ($P < 0.05$), and the apoptosis rate was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The mitochondrial membrane potential decreased significantly ($P < 0.01$), the percentage of G0/G1 phase cells increased ($P < 0.01$), the expression of Caspase 3 and Caspase 7 increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the substrate of Caspase-3 (PARP) was activated ($P < 0.05$), and the expression of Bcl-2 was significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** BUN has an inhibitory effect on the proliferation of cervical cancer SiHa cells, and its inhibitory effect may be related to the promotion of cell apoptosis.

Keywords: *Alhagi sparsifolia* shap. ex Keller & Shap.; butin; SiHa cells; proliferation; apoptosis

收稿日期: 2021-04-06

作者简介: 马晓玲, 女, 副研究员, 硕士, 研究方向: 中药药理学研究。Email: ma-xl@qq.com。通信作者: 魏鸿雁, 女, 研究员, 研究方向: 天然产物研究与开发。Email: whywlmq@sina.com。

基金项目: 乌鲁木齐市天山区科学技术计划项目(2018006)。

骆驼刺 *Alhagi sparsifolia shap. ex Keller & Shap.* 为豆科骆驼刺属植物, 是新疆干旱沙漠地区特有的一种植物, 落叶灌木, 耐旱、耐高温、抗风沙是它的特性^[1-3]。本课题组前期已对骆驼刺进行了初步研究^[4-8], 证实骆驼刺提取物具有抗肿瘤和调节免疫等药理活性, 对小鼠实体瘤模型具有一定的敏感性, 抑瘤率达到 24.8%, 其进一步作用机理有待深入研究。经过系统分离有效化学成分, 发现其中紫柳素(butin, BUN)的含量较高, 且在对骆驼刺中分离得到的单体化合物抗肿瘤谱筛查时发现紫柳素对多个肿瘤细胞具有较好的活性, 却不损伤正常细胞^[9], 我们推测紫柳素可能是骆驼刺的主要有效成分之一。

为了深入探讨骆驼刺中分离得到的紫柳素对肿瘤细胞的影响, 本研究通过体外培养人宫颈癌 SiHa 细胞, 采用流式细胞术及多种分子生物学技术观察紫柳素对宫颈癌 SiHa 细胞增殖、凋亡的影响, 并探讨其发生机制, 为未来开发利用骆驼刺资源提供实验依据, 同时这对寻找新的抗癌药物和充分挖掘利用新疆维吾尔药资源也是一项非常有意义的工作。

1 材料与方法

1.1 细胞及培养 人宫颈癌 SiHa 细胞株由江苏凯基生物技术股份有限公司提供。培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养液中, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中孵育, 每 2~3 d 传代。

1.2 药品及试剂 紫柳素按课题组之前报道过的方法^[9]自骆驼刺中提取分离制备: 干燥的吐鲁番骆驼刺地上部分经乙醇回流提取浓缩后的水分散物依次经石油醚萃取、二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 采用硅胶吸附色谱、Sephadex LH-20 凝胶色谱、ODS 柱色谱等分离手段并结合制备型高效液相色谱, 得到单体化合物紫柳素(经 HPLC 面积归一法纯度约为 98.1%)。紫柳素用二甲基亚砜(DMSO)溶解, -20 °C 保存备用。

胎牛血清(FBS), 依科赛生物科技有限公司, 批号: FND500; DMEM(高糖)培养基, 美国 GIBCO 公司, 批号: C11965500BT; DMSO(批号: 175943)、顺铂(批号: P4394-25MG), 美国 Sigma-Aldrich 公司; CCK-8 细胞增殖/毒性检测试剂盒(批号: FC101-03)、TransZol Up(批号: ET111), 全式金生物技术有限公司; Giemsa 染液, 南京建成科技有限公司, 批号: D010; Hoechst 染色试剂盒(批号: C0003)、线粒体膜电位检测试剂盒(批号: C2006),

上海碧云天生物技术公司; FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit, 美国 BD 公司, 批号: 556547; RIPA 裂解液, 武汉博士德生物工程有限公司, 批号: AR0105; 蛋白预染 Marker, 北京聚合美生物科技有限公司, 批号: MF212; 山羊抗兔 IgG H&L(批号: ab205718)、Anti-Caspase-3 抗体(批号: ab184787); Anti-Caspase-7 抗体(E22, 批号: ab32522)、Anti-Cleaved PARP1 抗体(批号: ab32064)、Anti-Bcl-2 抗体(批号: ab32124), 美国 Abcam 公司; Anti-ACTB rabbit polyclonal antibody, 上海生工生物工程有限公司, 批号: D110001。

1.3 仪器 HF12001C 型生物安全柜, 上海力康仪器有限公司; BC-J80S 型 CO₂ 细胞培养箱, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; Eclipse TS100-F 型荧光倒置显微镜, 日本尼康公司; 2500 型凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司; LSR II 型流式细胞仪, 美国 BD 公司; xMark™ 型酶标仪、MyCycler Thermal Cycler 型 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; BI QuantStudio™ 6 Flex 型实时荧光定量 PCR 仪, 美国 Thermo Fisher 公司; Chemiscope 3000 型化学发光成像仪系统, 上海勤翔科学仪器有限公司; DYCZ-24DN 型电泳仪, 北京六一仪器厂。

1.4 CCK-8 法检测细胞存活率 取生长状态良好、汇合率达 90% 的 SiHa 细胞, 用完全培养基制备成每毫升 5×10^4 个的单细胞悬液, 以每孔 100 μ L 接种至 96 孔板中。过夜培养贴壁后, 弃去培养基, 加入 100 μ L 含紫柳素(6.25、12.5、25、50、75 μ g·mL⁻¹) 的完全培养基, 同时设置空白对照组, 每组 5 个复孔, 放入培养箱 37 °C、5% CO₂ 培养。分别干预 24 h 或 48 h 后, 每孔加入培养基总体积 10% 的 CCK8 Solution, 继续在培养箱中孵育。1 h 后用酶标仪测定 450 nm 处的 OD 值, 并根据细胞存活率计算 IC₅₀ 值, 细胞存活率(%) = 紫柳素组 A_{450 nm} 值 / 空白对照组 A_{450 nm} 值 × 100%。实验重复 3 次。

1.5 细胞克隆形成能力的检测 参考有关研究^[10]的实验方法, 收集生长状态良好汇合率达 90% 的 SiHa 细胞, 用完全培养基制成密度为每毫升 100 个的单细胞悬液, 按每孔 200 个接种到 6 孔板中。培养 24 h 后, 以不同浓度(1/2 IC₅₀ 值和 1/4 IC₅₀ 值)紫柳素和顺铂(1.5 μ g·mL⁻¹) 干预, 每组设 3 个复孔。15 d 后, 弃去培养基, 以 PBS 洗 2 次; 再依次以 4% 的甲醛固定 20 min, PBS 复洗; Giemsa A 液染色, Giemsa B 液染色, PBS 洗 3 次; 晾干后拍照并计数。其中, 以

细胞数 ≥ 40 的细胞团作为1个集落,计算克隆形成率。克隆形成率(%)=各组的集落数(均值)/细胞接种数 $\times 100\%$ 。实验重复3次。

1.6 Hoechst 染色观察细胞凋亡 将SiHa细胞用完全培养基制备成每毫升 5×10^4 个的单细胞悬液,接种到6孔板中,37℃、5% CO₂培养24 h贴壁后,弃去培养基。细胞给药方法同“1.5”项。干预48 h后,弃去培养基,PBS洗2次;4%的多聚甲醛固定20 min,PBS洗2次;每孔加入500 μ L的Hoechst染色液,室温染色5 min,弃去染色液,PBS洗2次;在显微镜下激发波长350 nm,发射波长参数为460 nm时,观察细胞凋亡情况。每孔随机选择5个视野拍照,利用图像分析软件进行固缩细胞核数计数,并计算药物作用后的细胞凋亡率。细胞凋亡率(%)=固缩细胞核数/细胞核总数 $\times 100\%$ 。实验重复3次。

1.7 JC-1 测定线粒体膜电位 将SiHa细胞用完全培养基制备成每毫升 5×10^4 个的单细胞悬液,以每孔2 mL接种到6孔板中,37℃、5% CO₂培养24 h后弃去培养基。细胞给药方法同“1.5”项。干预48 h后,胰酶消化各组细胞,以400 $\times g$ 离心5 min弃上清;用1 mL PBS重悬细胞于1.5 mL离心管中,离心弃上清;用0.5 mL JC-1工作液重悬细胞,于37℃、5% CO₂培养箱孵育15 min,离心弃上清;用1 mL PBS洗涤细胞2次后,离心弃上清;用0.5 mL PBS重悬细胞,过200目筛网,30 min内进行流式细胞仪检测分析。实验重复3次。

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡 细胞给药方法同“1.5”项。干预48 h后胰酶消化细胞,用预冷的PBS洗涤2遍,加入400 μ L Annexin V结合液重悬细胞并制成单细胞悬液。加入5 μ L AnnexinV-FITC混匀,4℃避光孵育15 min,加入10 μ L PI染色液混匀,4℃避光放置5 min,在30 min内进行流式细胞仪检测。实验重复3次。

1.9 流式细胞术检测细胞周期 细胞给药方法同“1.5”项。干预48 h后,胰酶消化细胞后,以0.5 mL预冷PBS重悬,加至3.5 mL体积分数为80%的乙醇中,-20℃固定过夜。以600 $\times g$ 离心5 min,再以预冷的PBS洗涤后加入500 μ L PI/RNase Staining Buffer重悬细胞,制成单细胞悬液。于4℃避光染色20 min,以流式细胞仪检测细胞周期。实验重复3次。

1.10 qRT-PCR 法检测凋亡相关 mRNA 的表达 细胞给药方法同“1.5”项。干预细胞48 h后,以Trizol试剂提取细胞内总RNA;按照反转录试剂盒说明书

合成cDNA,利用上述合成的引物,进行PCR扩增。反应条件:95℃预变性2 min,95℃变性30 s,60℃延伸30 s,共40循环。反应完毕,将样品于2%琼脂糖凝胶电泳检测。成像系统下拍照并采集分析图像,对目的条带和内参条带的灰度(gray value, GV)值进行分析,以目的条带GV与内参条带GV比值表示目的基因相对表达水平^[11]。引物由通用生物系统有限公司合成,各待测基因引物序列见表1。

表1 RT-PCR 实验引物一览表

Table 1 Primers of RT-PCR used in the study

| 基因(Gene) | 引物(Primer)序列 |
|----------------|------------------------------|
| Caspase-3 | 5'-AGCGAATCAATGGACTCTGGA-3' |
| | 5'-CGACATCTGTACCAGACCCGAG-3' |
| Caspase-7 | 5'-GGGGGATAGATGCAAAACCCT-3' |
| | 5'-ACCGTGGAATAGCGGAAGAG-3' |
| PARP | 5'-TGTTTCTAGGTCGTGGCGTC-3' |
| | 5'-GGATGCTCTCGCTGCATTTC-3' |
| Bcl-2 | 5'-CTTTGAGTTCGGTGGGGTCA-3' |
| | 5'-GGCCGTACAGTTCACAAAA-3' |
| β -Actin | 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3' |
| | 5'-CTCCTTAATGTCACGCACCGAT-3' |

1.11 Western Blot 蛋白印迹法检测凋亡蛋白的表达

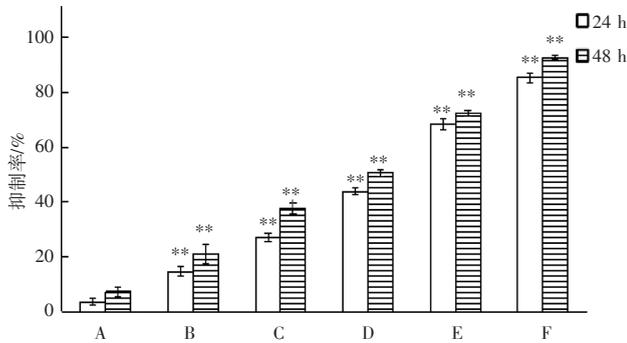
参考Lin等^[12]的试验方法。用不同浓度的紫柳素处理细胞24 h,使用RIPA裂解液和PMSF(RIPA:PMSF=100:1)提取总蛋白。用BCA蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。通过10%SDS-聚丙烯酰胺电泳分离蛋白质,并转到PVDF膜上,用5%脱脂奶粉在室温下封闭1 h。然后在4℃条件下进行加入Caspase-3(1:800)、Caspase-7(1:800)、Bcl-2(1:800)、PARP(1:1000)一抗孵育过夜,TBST清洗3次,膜与相应二抗在室温调节下孵育1 h。再用TBST清洗3次,最后用ChemiScope mini化学发光仪检测、拍照。以ImageJ软件测定条带积分吸光度值,以目的蛋白与 β -actin积分吸光度比值表示目的蛋白相对表达水平。

1.12 统计学处理方法 实验结果数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 19.0统计软件进行分析,多组间比较应用单因素方差分析,两两比较用LSD检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 紫柳素对细胞增殖抑制率的影响 由图1可知,随着紫柳素浓度增加,其对SiHa细胞的增殖抑制率随之升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。在时间

依赖关系上,紫柳素干预 SiHa 细胞 48 h 比 24 h 的 IC₅₀ 值更低。以抑制率计算,紫柳素干预 SiHa 细胞 24 h 时 IC₅₀ 值为 56.488 μg·mL⁻¹,48 h 时 IC₅₀ 值为 47.068 μg·mL⁻¹。为捕捉细胞的凋亡信号,避免非凋亡性杀伤细胞过多,故在接下来的试验中将药物干预的高、低剂量分别设置为 48 h 时的 1/2 IC₅₀ 值和 1/4 IC₅₀ 值,即 23.54 μg·mL⁻¹ 和 11.77 μg·mL⁻¹。



注: A. 空白对照组; B. 紫柳素 6.25 μg·mL⁻¹组; C. 紫柳素 12.5 μg·mL⁻¹组; D. 紫柳素 25 μg·mL⁻¹组; E. 紫柳素 50 μg·mL⁻¹组; F. 紫柳素 75 μg·mL⁻¹组。与空白对照组比较, **P<0.01

图 1 紫柳素对 SiHa 细胞抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

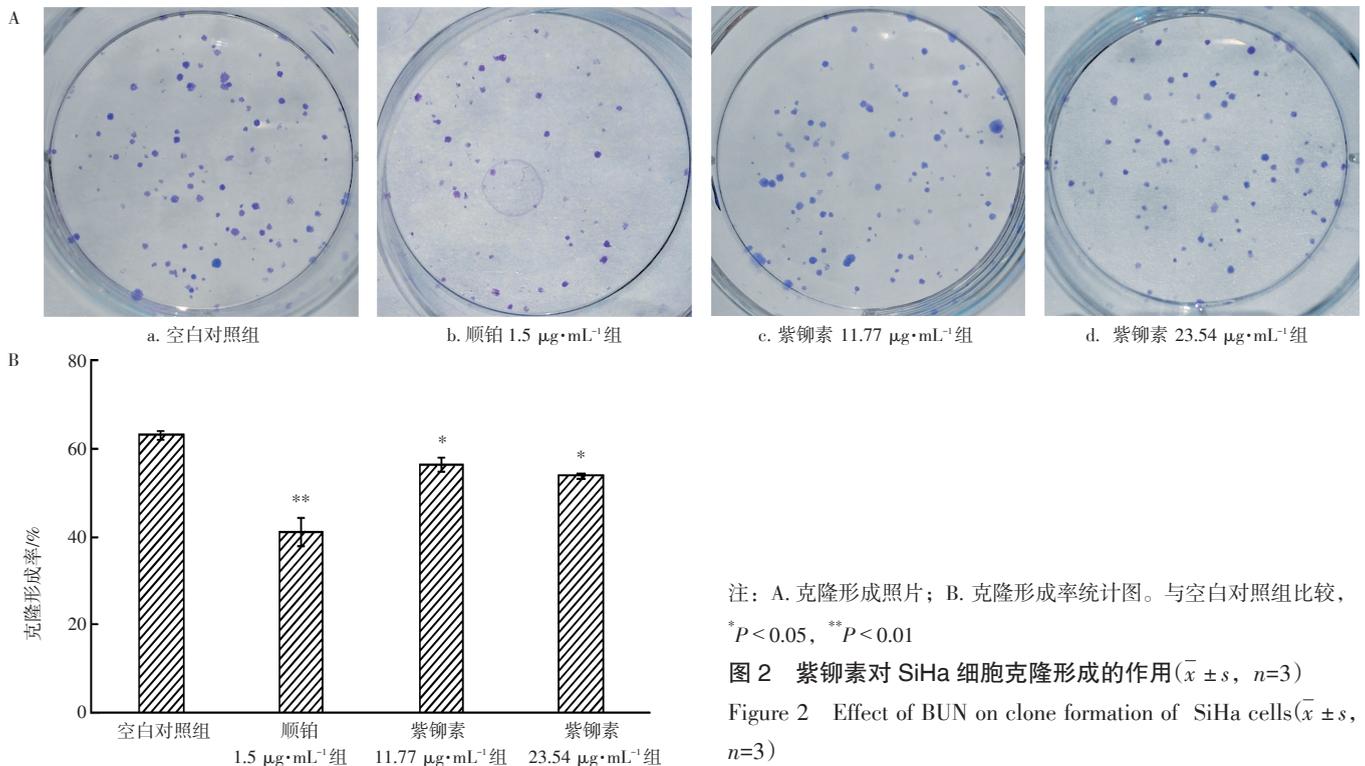
Figure 1 Effect of BUN on the inhibition rate of SiHa cells($\bar{x} \pm s, n=5$)

2.2 紫柳素对细胞克隆形成的影响 细胞克隆实验可定量分析单个细胞的增殖潜力,清楚细胞的增殖和独立生存能力。分别以 11.77 μg·mL⁻¹ 和 23.54 μg·mL⁻¹

的紫柳素干预 SiHa 细胞后,检测细胞的克隆形成能力。从图 2-A 中,我们可以看出,药物干预后细胞克隆形成较少。如图 2-B 所示,与空白对照组比,11.77 μg·mL⁻¹、23.54 μg·mL⁻¹的紫柳素和 1.5 μg·mL⁻¹的顺铂干预细胞后,形成的克隆数量明显减少(P<0.05, P<0.01)。

2.3 紫柳素对细胞 Hoechst 染色的影响 实验结果如图 3 所示,荧光显微镜下观察,空白对照组细胞大多呈弱蓝色染色;顺铂和紫柳素 23.54 μg·mL⁻¹组可见细胞荧光明显增强,部分出现高染,呈典型的凋亡特征,细胞核出现致密浓染,同时能观察到不同程度的核固缩及碎裂等凋亡现象,各给药组细胞凋亡率明显升高,差异均有统计学意义(P<0.05, P<0.01)。由此可见紫柳素能明显促进 SiHa 细胞凋亡。

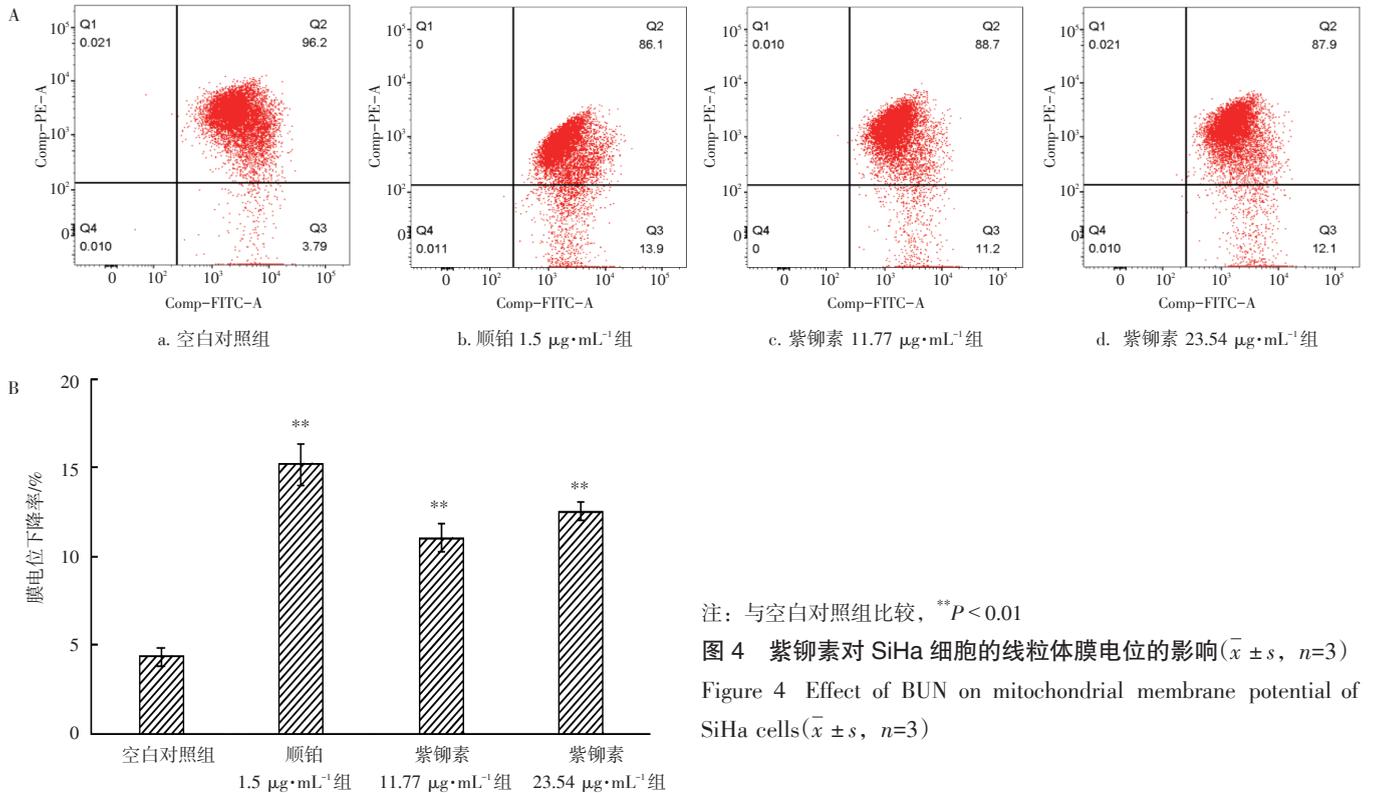
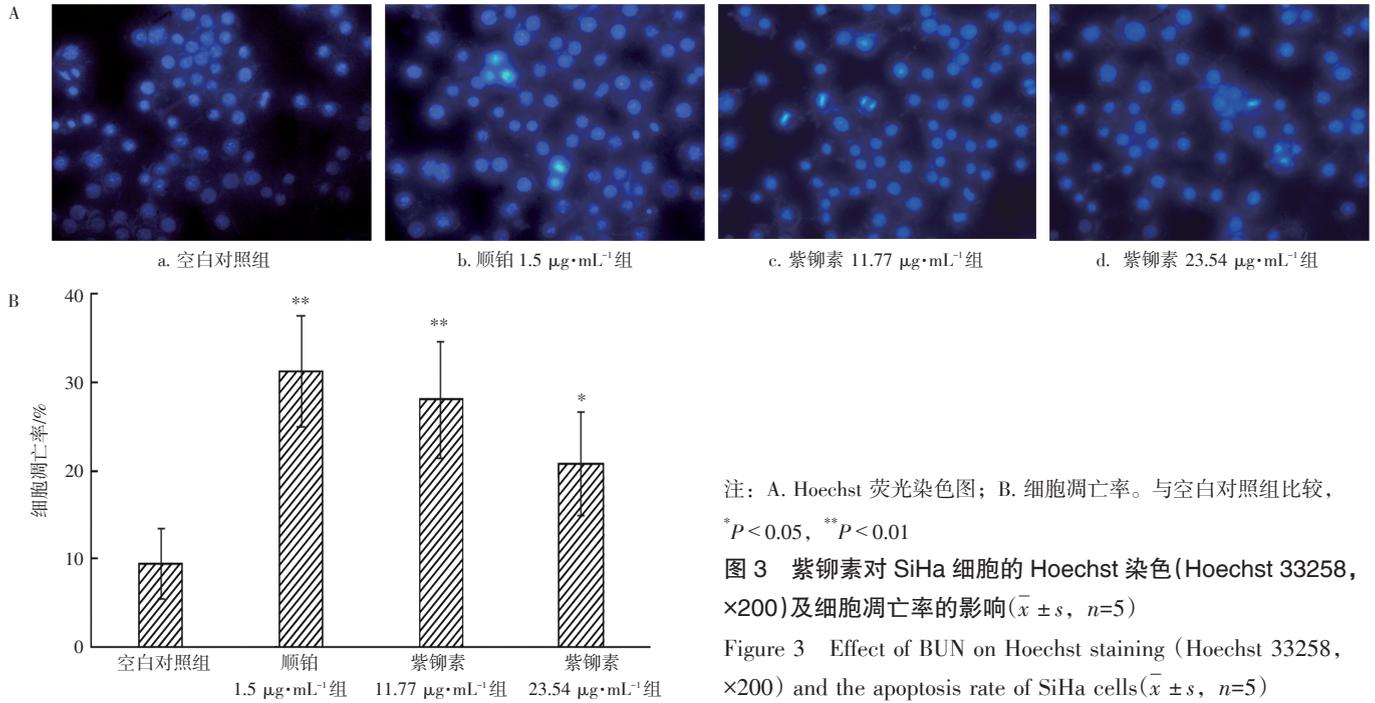
2.4 紫柳素对细胞线粒体膜电位的影响 肿瘤细胞线粒体膜电位的降低是肿瘤细胞早期凋亡的特征之一,故本试验采用 JC-1 染色,以流式细胞仪检测经紫柳素处理后的 SiHa 细胞的线粒体膜电位^[13]。如图 4-B 所示,与空白对照组比,紫柳素处理 SiHa 细胞 48 h 后,其线粒体膜电位下降比率分别达到(11.027±0.799)%和(12.533±0.493)%,差异均有统计学意义(P<0.01)。在图 4-A 的象限中同样观察到膜电位降低的变化,故证明紫柳素可诱导 SiHa 细胞凋亡。



注: A. 克隆形成照片; B. 克隆形成率统计图。与空白对照组比较, *P<0.05, **P<0.01

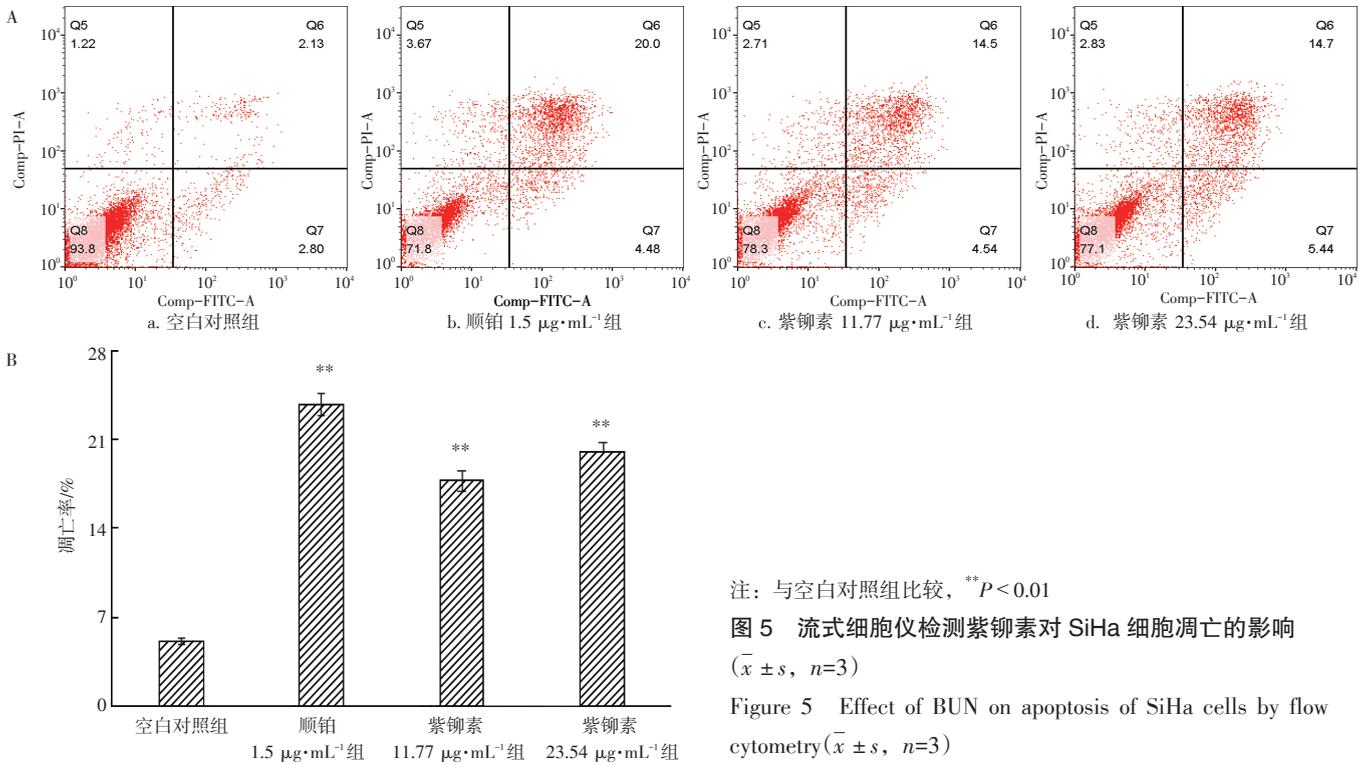
图 2 紫柳素对 SiHa 细胞克隆形成的作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 2 Effect of BUN on clone formation of SiHa cells($\bar{x} \pm s, n=3$)



2.5 紫柳素对细胞凋亡的影响 Annexin V-FITC/PI 染色后, 可标示正常细胞、早期凋亡细胞、晚期凋亡和坏死细胞等不同细胞群^[13]。如图 5 所示, 顺铂与紫柳素作用 48 h 后, 可明显诱导 SiHa 细胞发生凋亡 ($P < 0.01$), 随着紫柳素浓度的增加, 细胞凋亡率也有所增加。

2.6 紫柳素对细胞周期的影响 实验结果如图 6 和表 2 显示, 作用 48 h 后, 紫柳素可使 SiHa 细胞 G0/G1 期细胞所占的百分比明显增加 ($P < 0.01$)。结果提示紫柳素可使细胞阻滞于 G0/G1 期, 所以我们认为紫柳素对于细胞的阻滞是发生在 G0/G1 期的。



注：与空白对照组比较，**P < 0.01

图 5 流式细胞仪检测紫柳素对 SiHa 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 5 Effect of BUN on apoptosis of SiHa cells by flow cytometry ($\bar{x} \pm s, n=3$)

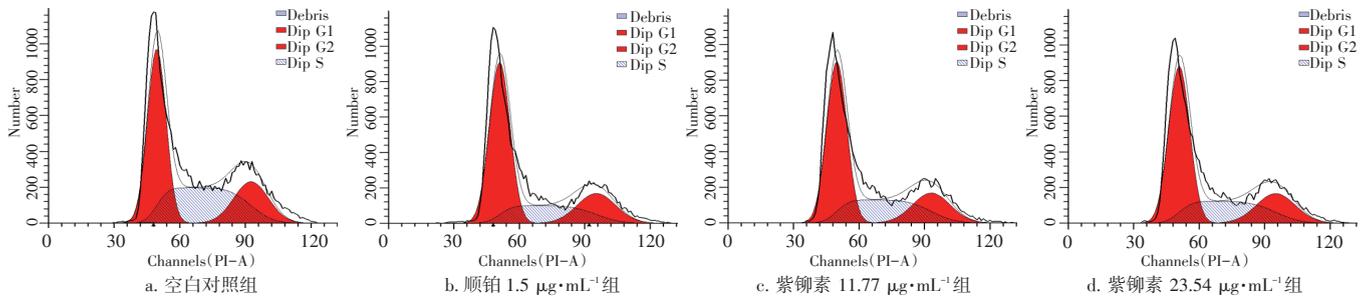


图 6 紫柳素对 SiHa 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 6 The flow chart of SiHa cells cycle detected by butin intervention ($\bar{x} \pm s, n=3$)

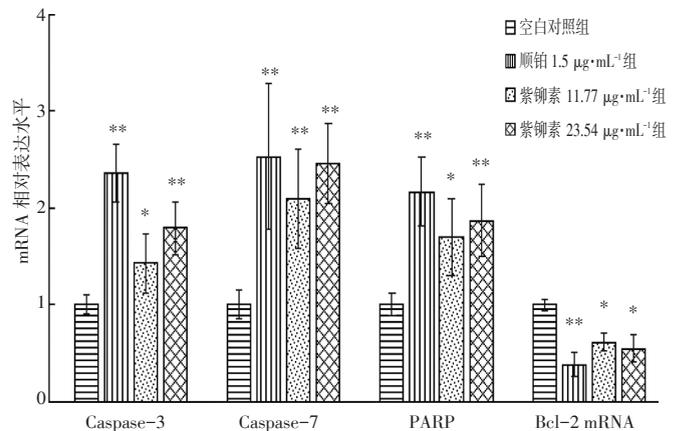
表 2 紫柳素干预对 SiHa 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect on cell cycle of SiHa cells of butin intervention ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 分组 | 细胞周期 | | |
|---------------------------------|------------------|------------------|----------------|
| | (G0/G1 期)/% | S 期/% | (G2/M 期)/% |
| 空白对照组 | 44.777 ± 0.563 | 35.323 ± 0.937 | 19.883 ± 0.859 |
| 顺铂 1.5 μg·mL ⁻¹ 组 | 57.157 ± 0.723** | 22.707 ± 1.621** | 20.140 ± 1.516 |
| 紫柳素 11.77 μg·mL ⁻¹ 组 | 51.005 ± 1.895** | 31.960 ± 2.118 | 18.104 ± 1.928 |
| 紫柳素 23.54 μg·mL ⁻¹ 组 | 53.627 ± 1.371** | 30.993 ± 1.585* | 19.377 ± 1.561 |

注：与空白对照组比较，*P < 0.05，**P < 0.01。

2.7 紫柳素对 Caspase-3、Caspase-7、PARP 和 Bcl-2 mRNA 相对表达量的影响 结果如图 7 所示，与空白对照组比较，随着药物浓度的增加，Caspase-3、Caspase-7 和 PARP 的基因表达水平明显上调 (P < 0.05, P < 0.01)，而 Bcl-2 mRNA 表达量降



注：与空白对照组比较，*P < 0.05，**P < 0.01

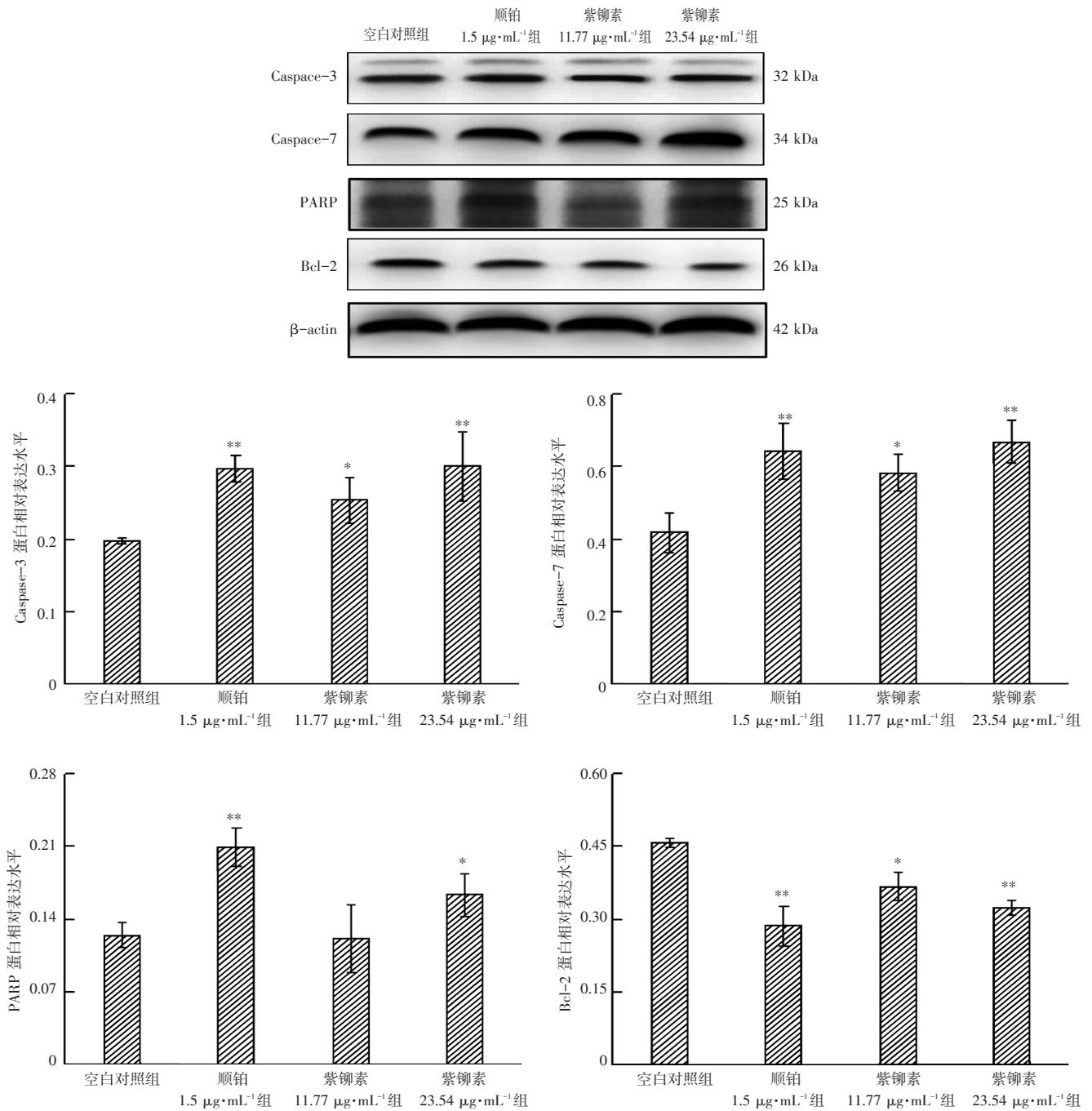
图 7 紫柳素对 SiHa 细胞中 Caspase-3、Caspase-7、PARP 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 7 Effect of butin on Caspase-3、Caspase-7、PARP and Bcl-2 mRNA expression in SiHa cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

低, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.8 紫柳素对 Caspase-3、Caspase-7、PARP 和 Bcl-2 蛋白相对表达量的影响 如图 8 所示, 顺铂、紫柳素作用于 SiHa 细胞后, 与空白对照组比, Caspase-3 和 Caspase-7 表达明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$), Bcl-2 的表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),

同时紫柳素 $23.54 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组可使 Caspase-3 的底物 PARP 蛋白表达升高($P < 0.05$)。说明紫柳素激活了凋亡关键蛋白 Caspase-3 和 Caspase-7, 使抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调, 使促凋亡蛋白 PARP 的表达上调, 诱导细胞发生凋亡。



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

图 8 柳素对 SiHa 细胞中 Caspase-3、Caspase-7、PARP 和 Bcl-2 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 8 Effect of butin on Caspase-3, Caspase-7, PARP and Bcl-2 protein expression in SiHa cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3 讨论

骆驼刺 *Alhagi sparsifolia* shap. 为豆科骆驼刺属植物, 紫柳素作为自该植物中分离得到的很有代表性的黄酮类化合物, 具有羟基黄酮的结构母环, 此类结构的抗肿瘤活性一直是科研工作者们关注的热点^[14-16]。

肿瘤的发生发展不仅与细胞的无限增殖及分化异常有关, 亦与细胞凋亡障碍密切相关。细胞凋亡是细胞为适应内外环境变化而发生的一种主动性死亡形式, 生理情况下凋亡有助于机体清除衰老或异常细胞, 对维持机体内部环境的平衡和稳定至关重要。但如果凋亡被抑制, 则细胞增殖就会相对或绝对占优势, 从而诱发或促进肿瘤的发生^[17-18]。因此, 诱导肿瘤细胞凋亡已成为防治肿瘤的重要策略, 也是筛选和评价抗癌药物药效的关键指标之一^[19]。在本研究中, 我们首先考察了紫柳素对人宫颈癌细胞 SiHa 的增殖抑制作用。结果显示, 紫柳素对细胞的增殖抑制作用较强。分别用不同浓度紫柳素处理 SiHa 细胞后, 检测细胞的克隆形成能力, 继而通过流式细胞术检测细胞凋亡率, 结果显示紫柳素能够诱导 SiHa 细胞发生凋亡。

细胞凋亡是由多种因子或蛋白参与的复杂的病理生理过程, 其中抗凋亡蛋白(Bcl-2、Survivin 等)与促凋亡蛋白(如 Bax、Caspase-3、Caspase-7 等)相互作用失衡尤为重要。当细胞发生凋亡时, 死亡信号通过细胞表面的信号分子传递到 Caspase-7 并将其激活, 继而引起 Caspase-3 的激活, 诱导凋亡^[20-21]。我们的结果显示, 紫柳素作用后能使 SiHa 中 Caspase-7 和 Caspase-3 基因表达水平上调, 同时使细胞中 Bcl-2 表达水平下调。推测紫柳素诱导宫颈癌细胞的凋亡可能与 Caspase、Bcl 家族有关。此外, 紫柳素能降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 而细胞的凋亡往往与其周期变化有关^[22-24]。细胞周期阻滞和凋亡是诱导细胞死亡的 2 种机制^[25]。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^[26], 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^[27]。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。细胞周期控制着细胞从静止期(G0)向增殖期

的过度, 同时确保基因转录的高保真性。DNA 合成期(S 期)和有丝分裂期(M 期)分隔开 G1 期和 G2 期^[28]。G1 期是启动细胞周期循环的关键, 其运转状态是多种疾病的发病基础, 也是药物发挥治疗作用的切入点^[29]。本实验显示, 紫柳素可以使宫颈癌细胞停滞于 G1 期, 阻止其向 S 期及 M 期转化, 降低肿瘤细胞的增殖活性。此外, 在本研究中所选取的 2 个剂量的紫柳素的诱导凋亡活性没有表现得比顺铂更强或者更有优势, 所以我们今后将更关注于其量效关系, 以及对其结构做修饰和优化, 以期得到更有前景的化合物。

参考文献:

- [1] XIANG Y L, LIU X F, ZHANG J X, et al. Camellia oleifera dregs protein and modified Zn-Ca-Fe-LDH for enhancing enzymatic saccharification and ethanol production of *Alhagi sparsifolia* Shap[J]. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, 2020, 42(10): 1217-1224.
- [2] XIANG Y L, XIANG Y X, WANG L P, et al. Effects of sewage sludge modified by coal gasification slag and electron beam irradiation on the growth of *Alhagi sparsifolia* Shap. and transfer of heavy metals[J]. Environmental science and pollution research international, 2018, 25(12): 11636-11645.
- [3] 刘瑛心. 中国沙漠植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 182.
- [4] 马晓玲, 徐建国, 夏提古丽·阿不利孜, 等. 骆驼刺提取物对免疫抑制小鼠迟发型超敏反应的作用[J]. 新疆医学, 2017, 47(10): 1103-1105.
- [5] 马晓玲, 魏鸿雁, 徐晓琴, 等. 骆驼刺提取物体内抗肿瘤作用及机制初探[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(3): 517-520.
- [6] 刘雪松, 马晓玲, 石磊岭, 等. 骆驼刺正丁醇萃取部位中单体化合物的分离纯化及其对人宫颈癌 HeLa 细胞的影响研究[J]. 中国药房, 2019, 30(4): 506-512.
- [7] 刘雪松, 魏鸿雁, 石磊岭, 等. 骆驼刺提取物对腹泻型肠易激综合征模型大鼠水液代谢和胃肠激素水平的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2019, 38(3): 169-173.
- [8] 马晓玲, 石磊岭, 刘雪松, 等. 骆驼刺提取物对腹泻型肠易激综合征(IBS-D)模型大鼠腹壁肌电活动及血清 NO 水平的调节作用研究[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(5): 78-80.
- [9] 马晓玲, 石磊岭, 刘雪松, 等. 骆驼刺单体化合物的制备及其体外抗肿瘤作用的筛选[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(4): 58-61.
- [10] 马立威, 陈哲, 陈晓婷, 等. 线粒体通路在大戟大枣汤对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖抑制及凋亡诱导中的调控作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2020, 34(4): 289-296.
- [11] 齐锦生, 王辉, 牛涛, 等. 丹皮酚拮抗过氧化亚硝基阴离子致大鼠成骨细胞凋亡的作用[J]. 中草药, 2006, 37(5): 731-734
- [12] LOU L, CHEN G, ZHONG B, et al. Lycium barbarum polysaccharide

- induced apoptosis and inhibited proliferation in infantile hemangioma endothelial cells via down regulation of PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(8): 1-11.
- [13] 刘春华, 王俊轶, 银春, 等. 非小细胞肺癌细胞中上皮特异性黏附分子的表达及其对细胞增殖和侵袭能力的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2019, 54(1): 59-63.
- [14] 华洁, 魏祥, 王丽娜, 等. 7,8-二羟基黄酮对过氧化氢诱导PC12细胞损伤的保护作用[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2021, 42(2): 117-121.
- [15] 王学军, 刘建利. 7(6)-羟基黄酮衍生物的合成及初步抗肿瘤活性研究[J]. *有机化学*, 2014, 34(8): 1609-1615.
- [16] 杨扬, 郭举. 具有抗肿瘤活性的槲皮素衍生物研究进展[J]. *中草药*, 2018, 49(6): 1468-1475.
- [17] 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.
- [18] 李容, 王新文, 杨晓辉, 等. 细胞命运之终点——细胞死亡[J]. *科学通报*, 2016, 61(18): 1983-1987.
- [19] FINLAY D, TERIETE P, VAMOS M, et al. Inducing death in tumor cells: roles of the inhibitor of apoptosis proteins[J]. *F1000Research*, 2017, 6: 587-605.
- [20] 朱晗清, 高丰厚. 冬凌草甲素上调 p53 转录活性促进胶质瘤细胞凋亡的作用与分子机制探讨[J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(7): 1140-1144.
- [21] 杜江洋, 徐元, 王楠, 等. 白花蛇舌草-半枝莲药对组分诱导三阴性乳腺癌细胞凋亡的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(17): 99-107.
- [22] 张丽静, 张蕾蕾, 黄文华, 等. 雷酚萜甲醚抑制人胃癌细胞 AGS 增殖及诱导凋亡作用研究[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(8): 1066-1072.
- [23] DANIAL N N. Bcl-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(24): 7254-7263.
- [24] 朱桥华, 罗美华, 周成宇, 等. 抑制极光激酶活性对肝癌HepG2细胞周期、凋亡和自噬的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(12): 1476-1484.
- [25] SUN J M, XU H T, ZHAO L, et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human adenocarcinoma cells by pristimerin[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120(7): 1-9.
- [26] WANG W, ZHAO Y, YAO S J, et al. Nigericin inhibits epithelial ovarian cancer metastasis by suppressing the cell cycle and epithelial-mesenchymal transition[J]. *Biochemistry. Biokhimiia*, 2017, 82(8): 933-941.
- [27] LOWE S W, LIN A W. Apoptosis in cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(3): 485-495.
- [28] 马强, 陈洁, 熊书, 等. 去氢木香内酯诱导乳腺癌SK-BR-3细胞凋亡的机制研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(2): 200-207.
- [29] 付文锋, 刘天初. 细胞周期抑制剂治疗肿瘤的进展[J]. *实用临床医学*, 2015, 16(10): 97-101.
- [30] LOWE S W, LIN A W. Apoptosis in cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(3): 485-495.

(编辑: 修春)