

木香炔内酯对乳腺癌 SK-BR-3 细胞周期分布及凋亡的影响[△]

马强^{1,2*}, 陈洁¹, 苗加伟¹, 熊书¹, 庞毅^{1,2}, 邓雪松^{1,2#}(1. 重庆三峡医药高等专科学校基础医学部, 重庆 404120; 2. 三峡库区道地药材开发利用重庆市重点实验室, 重庆 404120)

中图分类号 R737.9; R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)17-2073-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.17.05



摘要 目的: 研究木香炔内酯(COS)对人乳腺癌 SK-BR-3 细胞周期分布及凋亡的影响, 并探讨其机制。方法: 将人乳腺癌 SK-BR-3 细胞分为空白对照组和 COS 10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$ 组, 用 MTT 法检测 COS 对细胞增殖的影响。另将细胞分为空白对照组和 COS 低、中、高浓度组(10、20、30 $\mu\text{mol/L}$), 培养 24 h 后, 采用流式细胞仪检测细胞周期分布情况, 采用 Hoechst 33258 荧光染色检测细胞凋亡情况, 采用 Western blot 法检测抑癌因子 p53、胱天蛋白酶 3(caspase-3)、B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子 1A(p21)、周期蛋白依赖性激酶 2(CDK2)和细胞周期蛋白 E(cyclinE)蛋白的表达情况。结果: 与空白对照组比较, COS 可显著抑制 SK-BR-3 细胞的增殖($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且呈浓度和时间依赖趋势。低、中、高浓度的 COS 均可诱导细胞凋亡并阻滞细胞周期于 G₁/S 期($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 并可显著上调 p53、caspase-3、Bax、p21 蛋白的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 显著下调 Bcl-2、CDK2、cyclinE 蛋白的表达($P < 0.01$)。结论: COS 能抑制人乳腺癌 SK-BR-3 细胞的增殖, 并诱导细胞凋亡和周期阻滞; 其作用机制可能与调控 p53/Bax/Bcl-2/caspase-3 凋亡信号通路有关。

关键词 木香炔内酯; SK-BR-3 细胞; 细胞增殖; 细胞周期; 细胞凋亡

Effects of Costunolide on Cell Cycle Distribution and Apoptosis of Breast Cancer SK-BR-3 Cells

MA Qiang^{1, 2}, CHEN Jie¹, MIAO Jiawei¹, XIONG Shu¹, PANG Yi^{1, 2}, DENG Xuesong^{1, 2} (1. Dept. of Basic Medicine, Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China; 2. Chongqing Key Laboratory of Development and Utilization of Genuine Medicinal Materials in Three Gorges Reservoir Area, Chongqing 404120, China)

- [37] HENGARTNER M O. The biochemistry of apoptosis[J]. Nature, 2000, 407 (6805): 770-776.
- [38] LI H, LI T, FAN J, et al. miR-216a rescues dexamethasone suppression of osteogenesis, promotes osteoblast differentiation and enhances bone formation, by regulating c-Cbl-mediated PI3K/Akt pathway[J]. Cell Death Differ, 2015, 22(12): 1935-1945.
- [39] 史东梅, 董明, 陆颖, 等. PI3K/Akt 信号通路与骨破坏: 问题与机制[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(23): 3716-3722.
- [40] 宗彦红, 霍丽静, 常胜. 熊果酸对人肝癌 HepG2 细胞凋亡及 PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. 医学研究杂志, 2020, 49(9): 107-111, 115.
- [41] 施凤, 何文华, 朱莹, 等. 熊果酸(UA)对大鼠活化型肝星状细胞(HSC)的 NADPH 氧化酶(NOX)亚基及 PI3K/Akt、P38MAPK 信号通路活化的影响[J]. 复旦学报(医学版), 2014, 41(3): 328-334, 339.
- [42] CHEN S J, LIN C S, LIN C L, et al. Osteoporosis is associated with high risk for coronary heart disease: a population-based cohort study[J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(27): e1146- e1152.
- [43] GONZALEZ-CALVIN J L, GALLEGU-ROJO F, FERNANDEZ-PEREZ R, et al. Osteoporosis, mineral metabolism, and serum soluble tumor necrosis factor receptor p55 in viral cirrhosis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(9): 4325-4330.
- [44] CHANG K H, CHANG M Y, MUO C H, et al. Exposure to air pollution increases the risk of osteoporosis: a nationwide longitudinal study[J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(17): e733- e739.
- [45] 黄陈恕, 汤荣睿, 易小翠. 慢性乙型肝炎与骨质疏松相关性初步探讨[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(9): 1136-1139.
- [46] NAKCHBANDI I A. Osteoporosis and fractures in liver disease: relevance, pathogenesis and therapeutic implications[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(28): 9427-9438.

△ 基金项目: 重庆市基础研究与前沿探索项目(重庆市自然科学基金)(No.cstc2018jcyjAX0469); 重庆市教育委员会科学技术研究项目(No.KJQN201902701, No.KJQN202002701)

* 讲师, 硕士。研究方向: 抗肿瘤活性药物筛选及其应用。电话: 023-58556819。E-mail: cjmaqiang@163.com

通信作者: 副教授, 硕士。研究方向: 肿瘤的发生与防治。电话: 023-58556819。E-mail: 71425996@qq.com

(收稿日期: 2021-04-13 修回日期: 2021-07-26)

(编辑: 林 静)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of costunolide (COS) on the cell cycle distribution and apoptosis of human breast cancer SK-BR-3 cells and its mechanism. METHODS: Human breast cancer SK-BR-3 cells were divided into blank control group, and COS groups of 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol/L}$. MTT assay was used to detect the effects of COS on cell proliferation. SK-BR-3 cells were divided into blank control group, COS low, medium and high concentration groups (10, 20, 30 $\mu\text{mol/L}$). After cultured for 24 h, flow cytometry was used to detect the distribution of cell cycle. Hoechst 33258 fluorescence staining was used to detect cell apoptosis. Western blot assay was used to detect the expression of p53, caspase-3, Bcl-2, Bax, p21, CDK2 and cyclinE. RESULTS: Compared with blank control group, COS could significantly inhibit the proliferation of SK-BR-3 cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and in a dose and time-dependent manner. Low, medium and high concentrations of COS could induce cell apoptosis and arrest cell at G_1/S phase ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), could significantly up-regulate the protein expression of p53, caspase-3, Bax and p21 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and could significantly down-regulate the protein expression of Bcl-2, CDK2 and cyclinE ($P < 0.01$). CONCLUSIONS: COS can inhibit the proliferation of human breast cancer SK-BR-3 cells and induce cell apoptosis and cell cycle arrest. The mechanism may be related to the regulation of p53/Bax/Bcl-2/caspase-3 apoptosis signal pathway. **KEYWORDS** Costunolide; SK-BR-3 cells; Cell proliferation; Cell cycle; Cell apoptosis

乳腺癌(breast cancer)是女性病死率最高的恶性肿瘤,且发病率呈逐年上升的趋势,其预防和治疗已成为一个重要的公共卫生问题^[1]。尽管临床上有多种乳腺癌的治疗手段可选择,如化疗、放疗和激素治疗等,但上述治疗手段存在着导致患者免疫功能下降、消化障碍、炎症反应等诸多副作用,故乳腺癌的治疗仍需要更安全、更有效的临床策略^[2]。由此可见,寻找副作用小且效果显著的抗癌药物显得尤为重要。

从药用植物中提取分离的天然化合物是抗癌药物的重要来源,这些天然化合物在各种癌症及其他相关疾病的治疗中已显现出明显的优势^[3]。与以单分子为靶点的传统化疗药物相比,天然化合物能够靶向同一途径或多条相关途径的多个因子,具有更好的治疗效果和较低的毒副作用^[3]。木香炔内酯(costunolide, COS)就是其中之一。该化合物是从菊科植物木香 *Aucklandia lappa* Decne.中分离提取到的,属于倍半萜内酯类化合物,具有抗炎、抗真菌感染、抗氧化等多种药理学活性^[4],并对肝癌、白血病、结肠癌等多种肿瘤细胞表现出较为明显的抑制活性^[5-7]。因此,本课题组推测该化合物可能是一种潜在的抗癌治疗药物。尽管目前已有学者在多种人类肿瘤细胞上对COS的抑制作用进行了探索^[5-8],但该化合物对人乳腺癌细胞的影响尚未得到证实。基于此,本研究拟初步探讨COS对人乳腺癌SK-BR-3细胞周期分布和凋亡的影响,并初步探讨其潜在机制,以期探索乳腺癌的治疗方案提供研究基础和理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括ELx800型酶标仪(美国BioTek公司),CytoFLEX型流式细胞仪、Allegra-64R型台式高速冷冻离心机(美国Beckman公司),MCO-15AC型细胞培养箱(日本SANYO公司),Chemi-Doc Touch型化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司),DMi8A型荧光倒置显微成像系统(德国Leica公司)等。

1.2 主要药品与试剂

COS对照品(批号HY-N0036,纯度99.84%)购自美国MCE公司,用二甲基亚砜(DMSO)溶解配制成浓度为100 mmol/L的贮备液,分装后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存,备用。

DMEM高糖培养基、0.25%胰酶(批号分别为C11995500BT、25200-056)均购自美国Gibco公司;4%多聚甲醛(批号P1110)购自北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清(FBS)、青霉素及链霉素双抗溶液(批号分别为SH30084.03、J130071)均购自美国Hyclone公司;细胞周期检测试剂盒(批号WLA010a)购自沈阳万类生物科技有限公司;MTT试剂、DMSO(批号分别为1334MG250、BS087)均购自合肥志宏生物技术有限公司;Hoechst 33258荧光染色试剂盒(批号A3466)购自美国APEX BIO公司;ECL化学发光显色液(批号P10100)购自苏州新赛美生物科技有限公司;RIPA细胞裂解液、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(批号分别为P0013K、P0012)均购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗人抑癌因子p53多克隆抗体、兔抗人胱天蛋白酶3(caspase-3)多克隆抗体、兔抗人B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)多克隆抗体、兔抗人Bcl-2相关X蛋白(Bax)多克隆抗体、兔抗人细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子1A(p21)多克隆抗体、兔抗人周期蛋白依赖性激酶2(CDK2)多克隆抗体、兔抗人细胞周期蛋白E(cyclinE)多克隆抗体、兔抗人 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(批号分别为ab32389、ab32351、ab32124、ab32503、ab109520、ab32147、ab33911、ab8227)均购自英国Abcam公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(批号TJ271921)购自美国Invitrogen公司;其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 细胞

人乳腺癌SK-BR-3细胞系由中国科学院上海细胞库提供。

2 方法

2.1 细胞的培养及分组

将SK-BR-3细胞接种于含10%FBS、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的DMEM高糖培养基(以下简称“完全培养基”)中,置于37℃、5%CO₂、97%湿度的培养箱中培养(培养条件下同),待细胞融合至85%时用0.25%胰酶消化,再进行传代培养并用于后续实验。取对数增殖期的SK-BR-3细胞,随机分为空白对照组和COS 10、20、30、40、50 μmol/L组。空白对照组仅加入完全培养基(下同),COS组分别加入含COS终浓度为10、20、30、40、50 μmol/L的完全培养基。上述COS的给药浓度参考文献[9-10]和本课题组前期预实验结果设置。

2.2 细胞增殖活性检测

采用MTT法进行检测。取对数增殖期的SK-BR-3细胞,用完全培养基重悬,制成密度为6×10⁴ mL⁻¹的悬液,按每孔100 μL接种至96孔板中,培养24 h。按“2.1”项下方法将细胞分组,每组设9个复孔。空白对照组加入完全培养基100 μL,各药物组加入含相应药物的完全培养基100 μL;分别于培养24、48、72 h时,加入终质量浓度为0.5 mg/mL的MTT试剂50 μL,继续培养4 h;吸弃培养基,加入DMSO 150 μL,于摇床上振摇1~2 min后,使用酶标仪于490 nm波长处检测各孔的光密度(OD)值并计算细胞生长抑制率:细胞生长抑制率=(OD_{空白对照组}-OD_{检测组})/OD_{空白对照组}×100%。

2.3 细胞凋亡率检测

采用Hoechst 33258荧光染色法进行检测。取对数增殖期的SK-BR-3细胞,用完全培养基重悬,制成密度为5×10⁴ mL⁻¹的悬液,按每孔2 mL接种至含无菌盖玻片的6孔板中,培养24 h。将细胞随机分为空白对照组和COS低、中、高浓度组(10、20、30 μmol/L,剂量参考“2.2”项下结果设置),每组设3个复孔。空白对照组加入完全培养基2 mL,各药物组加入含相应药物的完全培养基2 mL;培养48 h后,按Hoechst 33258荧光染色试剂盒说明书方法进行固定、染色,并置于倒置荧光显微镜下观察并拍照,并参考文献[11]方法计算细胞凋亡率:细胞凋亡率=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

2.4 细胞周期分布情况检测

采用流式细胞仪进行检测。取对数增殖期的SK-BR-3细胞,用完全培养基重悬,制成密度为5×10⁴ mL⁻¹的悬液,按每皿3 mL接种至直径60 mm的培养皿中,培养24 h。按“2.3”项下方法将细胞分组,每组设3个平行皿。空白对照组加入完全培养基3 mL,各药物组加入含相应药物的完全培养基3 mL;培养48 h后,收集细胞,加入70%乙醇于4℃下固定过夜,随后用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)洗涤2次,加入RNase A试剂100 μL重悬,于37℃水浴中孵育30 min;加入PI染色液500 μL,混匀,于4℃避光条件下孵育30 min后,使用

流式细胞仪检测。使用ModFit LT 4.1细胞周期分析软件处理,记录各周期的细胞分布情况。

2.5 细胞凋亡和周期相关蛋白表达情况检测

采用Western blot法进行检测。取对数增殖期的SK-BR-3细胞,用完全培养基重悬,制成密度为5×10⁶ mL⁻¹的悬液,按每皿3 mL接种至直径60 mm的培养皿中,培养24 h。按“2.3”项下方法将细胞分组,每组设3个平行皿。空白对照组加入完全培养基3 mL,各药物组加入含相应药物的完全培养基3 mL;培养48 h后,加入RIPA裂解液裂解细胞,并收集蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度。蛋白经煮沸变性后,取适量行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,随后转移至PVDF膜上;以5%脱脂奶粉于室温下封闭2 h,用TBST缓冲液洗涤3次;加入p53、caspase-3、Bcl-2、Bax、p21、CDK2、cyclinE、β-actin一抗(稀释度均为1:1 000),4℃孵育过夜;用TBST缓冲液洗涤3次,加入相应二抗(稀释度为1:3 000),室温孵育2 h;加入ECL化学发光显色液显色后,置于化学发光成像系统下成像。使用Quantity One V4.6.6图像分析软件对蛋白条带灰度值进行分析,以目标蛋白与内参蛋白(β-actin)的灰度值比值表示目标蛋白的相对表达量。

2.6 统计学方法

使用SPSS 18.0软件进行统计分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 COS对SK-BR-3细胞增殖的影响

与空白对照组比较,不同浓度的COS均能显著抑制SK-BR-3细胞的增殖($P<0.05$ 或 $P<0.01$),并呈浓度、时间依赖趋势,详见表1。同时,在研究过程中笔者发现,当COS浓度较高(40、50 μmol/L)、作用时间较长(72 h)时,细胞大量死亡、漂浮,而贴壁细胞较少,故最终选择10、20、30 μmol/L的COS作用48 h作为后续实验的条件。

表1 COS不同浓度和时间作用下SK-BR-3细胞的生长抑制率检测结果($\bar{x} \pm s, n=9, \%$)

Tab 1 Inhibitory rates of the proliferation of SK-BR-3 cells after treated with different concentrations of COS for different time ($\bar{x} \pm s, n=9, \%$)

组别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0	0	0
COS 10 μmol/L组	10.324±4.808*	15.176±3.289*	34.538±5.453**
COS 20 μmol/L组	53.161±2.747**	64.530±3.672**	85.497±4.063**
COS 30 μmol/L组	63.793±2.740**	79.829±3.295**	88.740±3.512**
COS 40 μmol/L组	72.124±4.061**	86.231±3.506**	90.717±2.645**
COS 50 μmol/L组	88.380±3.849**	92.129±1.579**	93.969±2.713**

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note:vs. blank control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

3.2 COS对SK-BR-3细胞凋亡的影响

与空白对照组比较,经过低、中、高浓度的COS处理后,细胞的核染色质出现了不同程度的浓染、固缩、边集等凋亡现象,其凋亡率均较空白对照组显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且呈浓度依赖趋势,详见图1、表2。

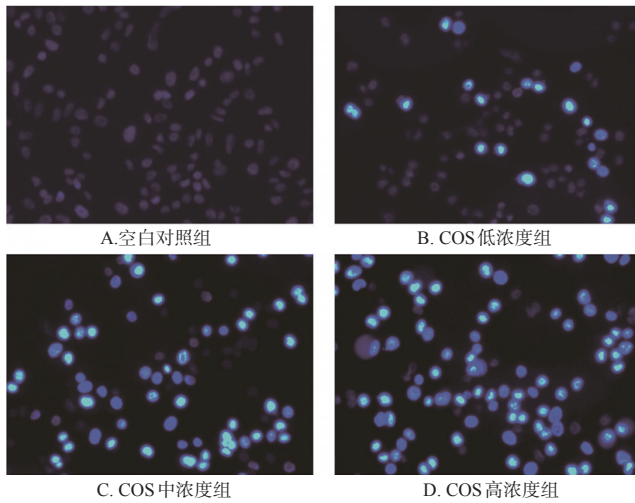


图1 COS对SK-BR-3细胞凋亡形态学影响的荧光染色显微图(Hoechst 33258染色, $\times 200$)

Fig 1 Fluorescence staining micrographs of the effects of COS on the apoptosis morphology of SK-BR-3 cells (Hoechst 33258 staining, $\times 200$)

表2 各组SK-BR-3细胞凋亡率的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 2 Results of apoptotic rates of SK-BR-3 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	凋亡率	组别	凋亡率
空白对照组	2.557 \pm 0.830	COS中浓度组	54.497 \pm 7.502**
COS低浓度组	22.498 \pm 9.779*	COS高浓度组	79.566 \pm 11.102**

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

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.3 COS对SK-BR-3细胞周期分布的影响

与空白对照组比较,经过低、中、高浓度的COS处理后, G_0/G_1 期细胞百分比均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), S期细胞百分比均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),均呈浓度依赖趋势;而 G_2/M 期的细胞百分比组间比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见图2、表3。

3.4 COS对SK-BR-3细胞凋亡及周期相关蛋白表达水平的影响

与空白对照组比较,经过低、中、高浓度的COS处理后,细胞中p53、caspase-3、Bax、p21蛋白的相对表达量均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而Bcl-2、CDK2、cyclinE蛋白的相对表达量均显著降低($P < 0.01$),均呈浓度依赖趋势,详见图3、表4。

4 讨论

癌症的发生发展通常由细胞增殖与凋亡之间所处

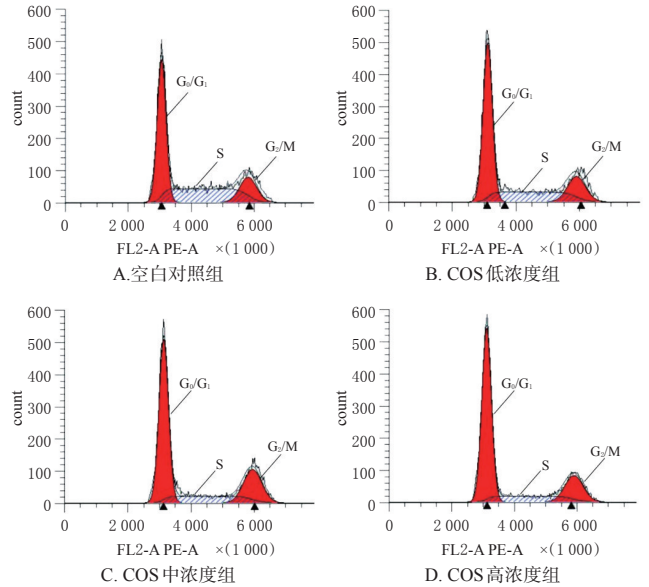


图2 COS对SK-BR-3细胞周期分布影响的流式细胞图

Fig 2 Flow cytometries of the effects of COS on cell cycle distribution of SK-BR-3 cells

表3 各组SK-BR-3细胞不同周期细胞百分比的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 3 Results of percentage of different cycles of SK-BR-3 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	G_0/G_1 期	S期	G_2/M 期
空白对照组	48.503 \pm 0.781	35.060 \pm 0.532	16.437 \pm 0.446
COS低浓度组	57.737 \pm 0.923*	26.080 \pm 0.688*	16.183 \pm 1.039
COS中浓度组	67.063 \pm 0.391**	16.147 \pm 0.181**	16.790 \pm 0.275
COS高浓度组	71.887 \pm 1.195**	14.997 \pm 0.176**	13.116 \pm 0.170

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

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

的动态平衡关系来决定,而抗癌药物所显现出的抗癌效果也往往是通过抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡等途径来实现的^[12]。COS是一种具有多种生物学活性的倍半萜内酯化合物,已有研究表明其对皮肤癌、卵巢癌、食管癌等不同来源的人肿瘤细胞株具有广谱的细胞毒性^[13-15]。本研究以体外培养的人乳腺癌SK-BR-3细胞为对象,初步探讨了COS对其增殖的抑制作用。MTT法检测结果显示,不同浓度的COS均能显著减弱细胞活性,且这种作用呈时间、浓度依赖趋势。Hoechst 33258荧光染色结果显示,经不同浓度的COS干预后,SK-BR-3细胞的核染色质出现明显的固缩、边集等凋亡现象。以上结果提示,COS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两种机制。有关细胞周期调控的研究显示,正常细胞的周期进展受到 G_1 、S、 G_2 、M期检查点的严格控制,而细胞周期进展检查点的改变会导致异常的细胞增殖和肿瘤的发生

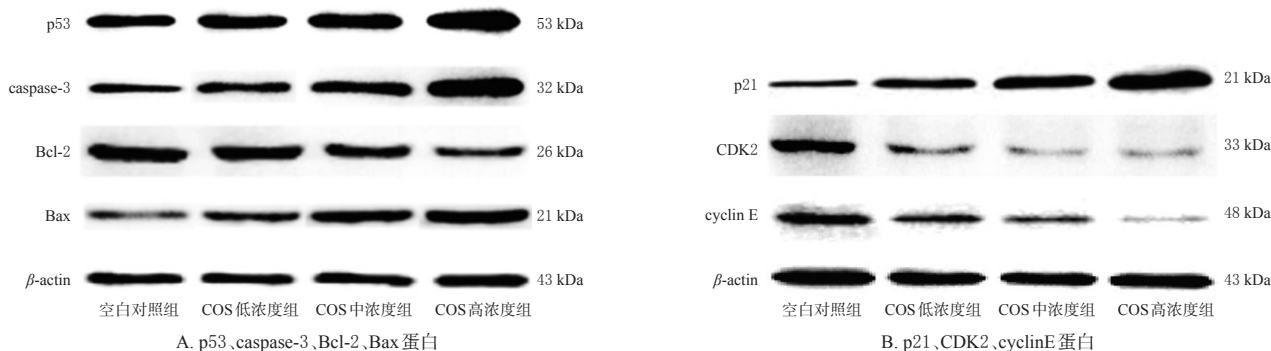


图3 COS对SK-BR-3细胞凋亡及周期相关蛋白表达影响的电泳图

Fig 3 Electrophoretograms of the effects of COS on the expression apoptosis and cycle related proteins in SK-BR-3 cells

表4 各组SK-BR-3细胞中凋亡及周期相关蛋白相对表达量的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 4 Results of relative expression of apoptosis and cycle related proteins in SK-BR-3 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	p53/ β -actin	caspase-3/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	Bax/ β -actin	p21/ β -actin	CDK2/ β -actin	cyclinE/ β -actin
空白对照组	0.544 ± 0.040	0.619 ± 0.048	1.244 ± 0.071	0.424 ± 0.056	0.294 ± 0.016	0.866 ± 0.014	0.838 ± 0.040
COS低浓度组	0.957 ± 0.049*	0.785 ± 0.056*	1.106 ± 0.048**	0.706 ± 0.076*	0.647 ± 0.025**	0.391 ± 0.015**	0.581 ± 0.027**
COS中浓度组	1.164 ± 0.032**	1.094 ± 0.054**	0.838 ± 0.093**	1.073 ± 0.054**	0.848 ± 0.056**	0.199 ± 0.026**	0.413 ± 0.055**
COS高浓度组	1.408 ± 0.061**	1.614 ± 0.061**	0.554 ± 0.037**	1.270 ± 0.028**	0.999 ± 0.057**	0.175 ± 0.035**	0.074 ± 0.035**

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

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

发展,例如肿瘤细胞常因上述检查点出现缺陷而导致其无限制增殖^[16]。许多抗肿瘤药物在特定的检测点诱导细胞周期阻滞,从而诱导细胞凋亡^[17]。Hua等^[18]的研究显示,COS可将人肺鳞癌SK-MES-1细胞周期阻滞于G₁/S期,从而抑制该细胞的增殖。本研究结果显示,COS低、中、高浓度组G₀/G₁期细胞百分比均显著升高,S期细胞百分比均显著降低,提示COS可阻滞SK-BR-3细胞于G₁/S期,从而抑制细胞的增殖,且这种作用呈浓度依赖趋势。由此推测,细胞周期G₁/S期阻滞可能是COS抑制肿瘤细胞增殖的机制之一。

p53是一种肿瘤抑制蛋白,在调节细胞周期进程、激活检查点和促进细胞凋亡中起关键作用;p21是Clp家族成员之一,位于p53因子下游,也是p53最重要的下游因子之一^[19]。p21基因编码的p21蛋白是目前已知的具有最广泛激酶抑制活性的细胞周期抑制蛋白,能抑制cyclinE-CDK2复合体的活性;后者会使视网膜母细胞瘤蛋白不能发生磷酸化、转录因子E2F不能被释放,从而使细胞周期停滞在G₁期^[19-20]。本研究结果显示,低、中、高浓度的COS均可使p21蛋白(p53的下游靶标)表达上调,同时使CDK2和cyclinE蛋白表达下调;而cyclinE-CDK2复合体的正常表达在细胞G₁/S期的转折中起着重要作用,这些数据进一步解释了COS导致人乳腺癌细胞G₁/S期阻滞的潜在机制。

细胞凋亡是细胞程序性死亡引起组织损伤的一种生理反馈^[21]。对于目前癌症治疗常用的绝大多数药物

而言,其发挥抗癌作用的机制主要是通过激活并启动细胞凋亡途径以达到杀死肿瘤细胞的目的^[22-23]。研究表明,p53是一种肿瘤抑制蛋白,可通过调节凋亡介导蛋白的表达来改变线粒体膜的通透性,从而触发细胞凋亡^[24]。Bcl-2蛋白家族是一个调节线粒体途径的凋亡调节蛋白大家族,其主要以Bax(促凋亡蛋白)和Bcl-2(抗凋亡蛋白)为代表。其中,Bcl-2蛋白是由控制线粒体的相关凋亡因子所释放的主要调节因子,可通过调节膜电位而控制线粒体外膜通透性^[25-26];Bax一般存在于细胞质中,当接收到凋亡信号时,Bax会重新定位于线粒体表面,在其表面构成跨线粒体膜的孔,导致膜电位降低、膜通透性增加,从而释放凋亡因子、活化下游caspase,进而激活caspase-3、启动caspase级联反应,最终诱发细胞凋亡^[27]。因此,为进一步探讨COS诱导SK-BR-3细胞凋亡的分子机制,本研究检测了COS对其凋亡途径关键调控因子p53、Bax、Bcl-2、caspase-3表达的影响。结果显示,低、中、高浓度的COS均可使p53、Bax、caspase-3蛋白的表达上调,同时使Bcl-2蛋白的表达下调。上述结果表明,p53及线粒体介导的caspase激活途径在COS诱导的SK-BR-3细胞凋亡中起了关键作用。

综上,COS可有效抑制人乳腺癌SK-BR-3细胞活性,加速细胞凋亡,并使细胞周期阻滞在G₁/S期;其作用机制可能与调控p53/Bax/Bcl-2/caspase-3凋亡信号通路有关。

参考文献

[1] TZIKAS A K, NEMES S, LINDERHOLM B K. A compa-

- rison between young and old patients with triple-negative breast cancer: biology, survival and metastatic patterns[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2020, 182(10):643-654.
- [2] LEE J E, KWON Y J, BAEK H S, et al. Synergistic induction of apoptosis by combination treatment with mesupron and auranofin in human breast cancer cells[J]. *Arch Pharm Res*, 2017, 40(6):746-759.
- [3] GUPTA A K, RATHER M A, JHA A K, et al. *Artocarpus lakoocha* Roxb. and *Artocarpus heterophyllus* Lam. flowers: new sources of bioactive compounds[J]. *Plants (Basel)*, 2020, 9(10):1329-1345.
- [4] KIM D Y, CHOI B Y. Costunolide: a bioactive sesquiterpene lactone with diverse therapeutic potential[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12):2926-2946.
- [5] LIN X, PENG Z, SU C. Potential anti-cancer activities and mechanisms of costunolide and dehydrocostuslactone[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(5):10888-10906.
- [6] CAI H, LI L, JIANG J, et al. Costunolide enhances sensitivity of K562/ADR chronic myeloid leukemia cells to doxorubicin through PI3K/Akt pathway[J]. *Phytother Res*, 2019, 33(6):1683-1688.
- [7] HU M, LIU L, YAO W. Activation of p53 by costunolide blocks glutaminolysis and inhibits proliferation in human colorectal cancer cells[J]. *Gene*, 2018, 678:261-269.
- [8] CHEN J, CHEN B, ZOU Z, et al. Costunolide enhances doxorubicin-induced apoptosis in prostate cancer cells via activated mitogen-activated protein kinases and generation of reactive oxygen species[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(64):107701-107715.
- [9] ZHANG C, LU T, WANG G D, et al. Costunolide, an active sesquiterpene lactone, induced apoptosis via ROS-mediated ER stress and JNK pathway in human U2OS cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 80:253-259.
- [10] WANG Z, ZHAO X, GONG X G. Costunolide induces lung adenocarcinoma cell line A549 cells apoptosis through ROS (reactive oxygen species)-mediated endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell Biol Int*, 2016, 40(3):289-297.
- [11] 苗加伟, 陈洁, 邓雪松, 等. 去氢木香内酯抑制人肝癌细胞系 HepG2 增殖及促凋亡[J]. *基础医学与临床*, 2020, 40(10):1369-1373.
- [12] LI X. The inducers of immunogenic cell death for tumor immunotherapy[J]. *Tumori*, 2017, 104(1):1-8.
- [13] LEE S H, CHO Y C, Lim J S. Costunolide, a sesquiterpene lactone, suppresses skin cancer via induction of apoptosis and blockage of cell proliferation[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4):2075-2091.
- [14] YANG Y I, KIM J H, CHOI J H, et al. Costunolide induces apoptosis in platinum-resistant human ovarian cancer cells by generating reactive oxygen species[J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 123(3):588-596.
- [15] HUA P, SUN M, ZHANG G, et al. Costunolide induces apoptosis through generation of ROS and activation of p53 in human esophageal cancer ECA-109 cells[J]. *J Biochem Mol Toxic*, 2016, 30(9):462-469.
- [16] 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(7):12002-12009.
- [17] XIA L, WEN H, HAN X, et al. Luteinizing hormone inhibits cisplatin-induced apoptosis in human epithelial ovarian cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(3):1943-1947.
- [18] HUA P, ZHANG G, ZHANG Y, et al. Costunolide induces G₁/S phase arrest and activates mitochondrial-mediated apoptotic pathways in SK-MES-1 human lung squamous carcinoma cells[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(4):2780-2786.
- [19] LI G, ZHANG R, ZHANG X, et al. Human colorectal cancer derived-MSCs promote tumor cells escape from senescence via p53/p21 pathway[J]. *Clin Transt Oncol*, 2020, 22(4):503-511.
- [20] LIN C P, LIN C S, LIN H H, et al. Bergapten induces G₁ arrest and pro-apoptotic cascade in colorectal cancer cells associating with p53/p21/PTEN axis[J]. *Environ Toxicol*, 2019, 34(3):303-311.
- [21] YU K, YANG X, LI Y, et al. Synthesis of cucurbitacin II derivatives with apoptosis-inducing capabilities in human cancer cells[J]. *RSC Advances*, 2020, 10(7):3872-3881.
- [22] HENGARTNER M O. The biochemistry of apoptosis[J]. *Nature*, 2000, 407(6805):770-776.
- [23] 邵鑫, 蒋先虹, 王瑞, 等. 紫草素对人结肠癌细胞 HCT116 自噬和凋亡的影响[J]. *中国药房*, 2021, 32(1):51-55.
- [24] CORDANI M, BUTERA G, PACCHIANA R, et al. Molecular interplay between mutant p53 proteins and autophagy in cancer cells[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2017, 1867(1):19-28.
- [25] CAMPBELL K J, TAIT S W G. Targeting Bcl-2 regulated apoptosis in cancer[J]. *Open Biol*, 2018, 8(5):180002.
- [26] 赵冀安, 马艳荣, 聂文佳, 等. 溴苯基姜黄素对胆管癌细胞凋亡、迁移和侵袭的影响及机制研究[J]. *中国药房*, 2021, 32(4):467-474.
- [27] MOTAMED H R, SHARIATI M, AHMADI R, et al. The apoptotic effects of progesterone on breast cancer (MCF-7) and human osteosarcoma (MG-636) cells[J]. *Physiol Int*, 2020, 107(3):406-418.

(收稿日期:2021-03-04 修回日期:2021-07-27)

(编辑:张元媛)