

邵玉普,刘斌,李伟明,等. 去氢木香内酯诱导胃癌细胞自噬和凋亡及氧化应激 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(12): 27-34.

Shao YP, Liu B, Li WM, et al. Dehydrocostus lactone induces autophagy, apoptosis, and oxidative stress in gastric cancer cells [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 27-34.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 12. 005

去氢木香内酯诱导胃癌细胞自噬和凋亡及氧化应激

邵玉普¹, 刘斌¹, 李伟明², 邵喜灵³, 陈巧格^{4*}

(1.河南医学高等专科学校 基础医学实验中心,河南 新郑 451191;2.河南中医药大学第三附属医院 肿瘤科, 郑州 450008;3.河南医学高等专科学校 护理系实训中心,河南 新郑 451191;4.河南医学高等专科学校 人体解剖学教研室,河南 新郑 451191)

【摘要】 目的 探索去氢木香内酯(DHCL)对胃癌细胞 SGC-7901 自噬、凋亡及氧化应激的影响。**方法** 将体外培养 SGC-7901 细胞分为 DHCL 0 $\mu\text{mol/L}$ 组、DHCL 10 $\mu\text{mol/L}$ 组、DHCL 20 $\mu\text{mol/L}$ 组和 DHCL 40 $\mu\text{mol/L}$ 组。CCK-8 法检测各组细胞增殖,免疫荧光检测细胞自噬活性,流式细胞仪检测细胞凋亡,ELISA 法检测细胞上清中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平,DCFH-DA 探针检测细胞内活性氧自由基(ROS)水平;Western blot 检测 LC3- I、LC3- II、Beclin 1、自噬相关蛋白 7(ATG7)、p62、B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、BH3 相互作用域死亡激动剂(Bid)、截短型 Bid(tBid)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 8(Caspase-8)、Caspase-9、Caspase-3、裂解的 Caspase-8(cleaved Caspase-8)、cleaved Caspase-9 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达。皮下种植 0.2 mL SGC-7901 细胞悬液($1 \times 10^7/\text{mL}$),经 DHCL(腹腔注射 20 mg/(kg·d),2 周)干预后,进行移植瘤组织称重。**结果** DHCL 40 $\mu\text{mol/L}$ 组和 DHCL 20 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞存活率低于 DHCL 0 $\mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.05$),细胞自噬活性和细胞凋亡率高于 DHCL 0 $\mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.05$),细胞 SOD 和 GSH-Px 水平低于 DHCL 0 $\mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.05$),MDA 和 ROS 水平高于 DHCL 0 $\mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.05$),细胞 p62 蛋白表达低于 DHCL 0 $\mu\text{mol/L}$ 组,Beclin1、LC3 II/LC3 I、ATG7、Bax/Bcl-2、tBid/Bid、cleaved Caspase-8/Caspase-8、cleaved Caspase-9/Caspase-9 和 cleaved Caspase-3/Caspase-3 蛋白表达高于 DHCL 0 $\mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.05$);裸鼠移植瘤结果显示,DHCL 组裸鼠移植瘤质量低于对照组($P < 0.05$)。**结论** DHCL 可以促进 SGC-7901 细胞内 ROS 产生,诱导细胞自噬性死亡和凋亡。

【关键词】 胃癌;去氢木香内酯;自噬;凋亡;氧化应激

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 12-0027-08

Dehydrocostus lactone induces autophagy, apoptosis, and oxidative stress in gastric cancer cells

SHAO Yupu¹, LIU Bin¹, LI Weiming², SHAO Xiling³, CHEN Qiaoge^{4*}

(1. Basic Medical Experimental Center of Henan Medical College, Xinzheng 451191, China. 2. Department of Oncology, the Third Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008. 3. Training Center of Nursing Department of Henan Medical College, Xinzheng 451191. 4. Department of Human Anatomy, Henan Medical College, Xinzheng 451191)

【Abstract】 Objective To explore the effects of dehydrocostus lactone (DHCL) on autophagy, apoptosis, and oxidative stress of gastric cancer cell line SGC-7901. **Methods** SGC-7901 cells cultured *in vitro* were divided into 0, 10,

[基金项目] 河南省医学教育研究项目(Wjlx2020023)。

[作者简介] 邵玉普(1976—),男,实验师,研究方向:基础医学实验教学及管理。E-mail:shaoyupu@126.com

[通信作者] 陈巧格(1980—),女,硕士研究生,研究方向:人体解剖学教学及基础医学研究。E-mail:chenqiaoge1110@163.com

20, and 40 $\mu\text{mol/L}$ DHCL groups. Cell proliferation was analyzed by CCK-8 assays. Autophagic activity was assessed by immunofluorescence. Apoptosis was detected by flow cytometry. The levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and glutathione peroxidase (GSH-Px) in culture supernatants were detected by ELISA. The level of intracellular reactive oxygen species (ROS) was detected by the DCFH-DA probe. Expression of LC3-I, LC3-II, Beclin-1, autophagy-associated protein 7 (ATG7), p62, B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), BH3 interaction domain death agonist (Bid), truncated Bid, Caspase-8, Caspase-9, Caspase-3, cleaved Caspase-8, cleaved Caspase-9, and cleaved Caspase-3 were detected by Western blot. A 0.2 mL suspension of SGC-7901 cells ($1 \times 10^7/\text{mL}$) was implanted subcutaneously. After intraperitoneal injection of 20 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ DHCL for 2 weeks, tumor tissues were weighed. **Results** Cell survival rates in 40 and 20 $\mu\text{mol/L}$ DHCL groups were lower than that in the 0 $\mu\text{mol/L}$ DHCL group ($P < 0.05$). In comparison with the 0 $\mu\text{mol/L}$ DHCL group, autophagy and the apoptosis rate were higher in the 40 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$ DHCL group ($P < 0.05$). SOD and GSH-Px levels were lower than in the 0 $\mu\text{mol/L}$ DHCL group ($P < 0.05$). MDA and ROS levels were higher than in the 0 $\mu\text{mol/L}$ DHCL group ($P < 0.05$). Expression of p62 protein was lower in the 0 $\mu\text{mol/L}$ DHCL group. Expression of Beclin-1, LC3II/LC3I, ATG7, Bax/Bcl-2, tBid/Bid, cleaved Caspase-8/Caspase-8, cleaved Caspase-9/Caspase-9, and cleaved Caspase-3/Caspase-3 was higher in the 0 $\mu\text{mol/L}$ DHCL group ($P < 0.05$). The nude mouse tumorigenicity assay showed that the weight of transplanted tumors in the DHCL group was lower than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** DHCL promotes production of ROS in SGC-7901 cells and induces autophagic death and apoptosis.

【Keywords】 gastric cancer; dehydrocostus lactone; autophagy; apoptosis; oxidative stress

胃癌是一种与环境、饮食生活、基因遗传等多种因素有关的消化道恶性肿瘤, 在我国发病率仅次于肺癌, 死亡率仅次于肝癌和肺癌^[1]。胃癌患者早期通常表现为非特异性的消化道症状, 随病情恶性进展, 可出现上腹疼痛、食欲下降、吞咽困难、消瘦等, 临床主要采用手术联合化疗^[2]。然而, 胃癌患者术后易发生复发和转移, 且长期化疗的毒副作用较多, 部分患者往往因无法耐受化疗而被迫终止治疗, 严重影响了治疗的效果^[3]。寻找新的有效药物, 辅助临床治疗, 受到了研究者的广泛关注。去氢木香内酯 (dehydrocostus lactone, DHCL) 来源于天然植物药物菊科云木香属植物木香 *Aucklandia lappa Decne.* 的干燥根, 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等多种生物学活性^[4]。既往研究显示, DHCL 可以抑制喉癌^[5]、胶质瘤^[6]、肺癌^[7]等多种肿瘤细胞的增殖活性, 诱导肿瘤细胞凋亡, 有望应用于临床抗肿瘤治疗。但 DHCL 对胃癌细胞的作用尚不明确, 且其具体的作用机制尚不清楚。因此, 本研究探讨了 DHCL 对胃癌细胞自噬、凋亡和氧化应激的影响, 以期了解 DHCL 可能的抗胃癌作用机制, 为临床治疗提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

30 只雄性 BALB/C 裸鼠, SPF 级, 鼠龄 4~5 周,

体重 (20 ± 2) g, 均购自河南省实验动物中心 [SCXK (豫) 2017-0001]。饲养于河南中医药大学实验动物中心 [SYXK (豫) 2020-0004]。所有实验动物均遵循 3R 原则, 经动物实验伦理审查通过 (审批号 IACUC-20200703)。

1.1.2 细胞

人胃癌 SGC-7901 购自美国典型物种保藏中心。

1.2 主要试剂与仪器

DHCL 购自南京春秋生物工程有限公司, 质量分数 $\geq 98\%$, 批号 20191206; DCFH-DA 探针购自北京百奥莱博科技有限公司; 胎牛血清、RPMI-1640 培养基均购自上海沪震生物科技有限公司 (批号分别为 20200508 和 20190704); CCK-8 检测试剂盒购自上海经科化学科技有限公司, 批号 20200915; 兔抗人 LC3-I、LC3-II、Beclin 1、自噬相关蛋白 7 (autophagy associated protein 7, ATG7)、p62、B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、BH3 相互作用域死亡激动剂 (BH3 interaction domain death agonist, Bid)、截短型 Bid (truncated Bid, tBid)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 8 (Caspase-8)、Caspase-9、Caspase-3、裂解的 Caspase-8 (cleaved Caspase-8)、cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3、 β -actin 单克隆抗体购自美国 CST 公司 (批号分别为 20200812、20200612、20200615、20191215、20200624、20200815、

20200621、20200704、20200715、20200902、20191118、20191215、20200713、20200714、20200812、20200905);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术公司,批号 101964;二喹啉甲酸(bicinchoninic acid disodium, BCA)蛋白定量试剂盒和 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司(批号分别为 20191116 和 20191205);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)检测试剂盒均购自南京森贝伽生物科技有限公司(批号分别为 20200712、20200916、20200608)。

实验仪器 IX73 型荧光显微镜购自日本 Olympus 公司;多功能酶标检测仪(iMark680)购自美国 Bio-Rad 公司;DXFLEX 流式细胞检测仪购自美国贝克曼库尔特公司。

1.3 实验方法

1.3.1 CCK8 实验筛选 DHCL 剂量

将胃癌细胞 SGC-7901 接种于含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,培养过夜。取培养至对数生长期的细胞制成单细胞悬液,调整细胞密度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$,继续培养,加入 100 μL 不同浓度的 DHCL (终浓度分别为 0、0.6、1.25、2.5、5、10、20、40、80、160、320 $\mu\text{mol/L}$),孵育 24 h 后,严格按照试剂盒说明采用 CCK-8 法检测细胞的增殖活性,检测 450 nm 波长下的吸光度值,计算细胞的存活率。根据细胞的增殖曲线,设置 DHCL 0 $\mu\text{mol/L}$ 组、DHCL 10 $\mu\text{mol/L}$ 组、DHCL 20 $\mu\text{mol/L}$ 组和 DHCL 40 $\mu\text{mol/L}$ 组。

1.3.2 Western blot 检测细胞自噬相关蛋白表达的影响

取各组与相应浓度药物孵育 24 h 的细胞,提取总蛋白并且进行蛋白定量,经电泳、转膜、室温封闭 2 h,加一抗 p62 (1:1000)、Beclin1 (1:1000)、LC3 II (1:1000)、LC3 I (1:1000)、ATG7 (1:1000)、 β -actin (1:500) 为内参,4℃ 孵育过夜,洗膜加二抗 (1:5000) 室温孵育 2 h,显影,分析各蛋白相对内参的表达量。

1.3.3 免疫荧光检测细胞自噬活性

取各组与相应浓度药物孵育 48 h 的细胞,弃培养基,采用质量分数为 4% 的甲醛固定 10 min,加入 200 μL 的 Triton-X 作用 30 min,采用 3% 牛血清蛋

白封闭,加入 LC3 一抗孵育过夜,加入荧光耦联二抗,37℃ 孵育 1 h 后封片,荧光显微镜下观察 LC3 荧光斑点数。

1.3.4 流式细胞仪分析细胞凋亡

取各组与相应浓度药物孵育 48 h 的细胞,调整细胞浓度约为 1×10^5 个/孔,预冷 PBS 洗涤 2 次,严格按照凋亡试剂盒说明采用 Annexin V-FITC/PI 双染法进行染色,上流式细胞仪分析细胞的凋亡率。

1.3.5 Western blot 检测 Bax、Bcl-2、Bid、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-3 蛋白表达

取各组与相应浓度药物孵育 24 h 的细胞,检测 Bax (1:1000)、Bcl-2 (1:1000)、Bid (1:1000)、tBid (1:1000)、Caspase-8 (1:1000)、cleaved Caspase-8 (1:1000)、Caspase-9 (1:1000)、cleaved Caspase-9 (1:1000)、Caspase-3 (1:1000) 和 cleaved Caspase-3 (1:1000) 蛋白表达,具体方法同 1.3.2。

1.3.6 ELISA 法检测细胞上清液中氧化应激因子水平

取各组与相应浓度药物孵育 24 h 的细胞,离心 (2000 r/min, 2 min),取上清,采用 ELISA 法检测细胞上清液中 SOD、GSH-Px 和 MDA 水平,严格按试剂盒说明操作。

1.3.7 DCFH-DA 探针检测细胞内 ROS 水平

取各组与相应浓度药物孵育 24 h 的细胞,以 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板, PBS 洗 3 次,加入 DCFH-DA 探针,37℃ 孵育 1 h, PBS 洗 3 次,加入新鲜培养基,荧光显微镜下观察 ROS 水平。

1.3.8 裸鼠移植瘤模型建立

30 只裸鼠预饲养 7 d,随机分为对照组和 DHCL 组,每组 15 只。所有裸鼠均采用背部尾侧皮下种植 0.2 mL 对数生长期 SGC-7901 细胞悬液每毫升 1×10^7 个复制移植瘤模型,肉眼可见皮下成瘤,即为造模成功。造模第 2 天, DHCL 组腹腔注射 20 mg/(kg · d) DHCL,连续注射 2 周,对照组腹腔注射等体积生理盐水。末次给药后第 2 天,迅速处死大鼠,剥离移植瘤组织并称重。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 进行统计学数据处理,满足正态分布且方差齐的计量资料均以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用两样本独立 t 检验比较两组间差异,单因素方差分析比较多组间差异性, SNK- q 比较多组内两两间差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DHCL 抑制 SGC-7901 细胞增殖

CCK-8 结果显示(图 1), DHCL 对胃癌细胞的抑制作用呈药物浓度依赖性,随着 DHCL 浓度增加, DHCL 浓度 $\geq 20 \mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率下降($P < 0.05$)。因此设置 DHCL 低剂量、中剂量、高剂量组的浓度分别为 $10 \mu\text{mol/L}$ 、 $20 \mu\text{mol/L}$ 、 $40 \mu\text{mol/L}$ 。DHCL $40 \mu\text{mol/L}$ 组和 DHCL $20 \mu\text{mol/L}$ 组细胞存活率低于 DHCL $0 \mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.05$)。

2.2 DHCL 促进 SGC-7901 细胞自噬相关蛋白表达

Western blot 结果显示(图 2), DHCL $40 \mu\text{mol/L}$ 组和 DHCL $20 \mu\text{mol/L}$ 组细胞 p62 蛋白表达低于 DHCL $0 \mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.05$), Beclin1、LC3 II/LC3 I 和 ATG7 蛋白表达高于 DHCL $0 \mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.05$)。

2.3 DHCL 增强 SGC-7901 细胞自噬活性

免疫荧光实验检测结果显示(图 3), DHCL $40 \mu\text{mol/L}$ 组和 DHCL $20 \mu\text{mol/L}$ 组细胞 LC3 荧光斑点数高于 DHCL $0 \mu\text{mol/L}$ 组。

2.4 DHCL 促进 SGC-7901 细胞凋亡

流式细胞仪检测结果显示(图 4), DHCL $40 \mu\text{mol/L}$ 组和 DHCL $20 \mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡率高于 DHCL $0 \mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.05$)。

2.5 DHCL 促进 SGC-7901 细胞凋亡相关蛋白表达

Western blot 检测结果显示(图 5), DHCL $40 \mu\text{mol/L}$

$\mu\text{mol/L}$ 组和 DHCL $20 \mu\text{mol/L}$ 组细胞 Bax/Bcl-2、tBid/Bid、cleaved Caspase-8/Caspase-8、cleaved Caspase-9/Caspase-9 和 cleaved Caspase-3/Caspase-3 蛋白表达高于 DHCL $0 \mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.05$)。

2.6 DHCL 抑制 SGC-7901 细胞抗氧化酶表达

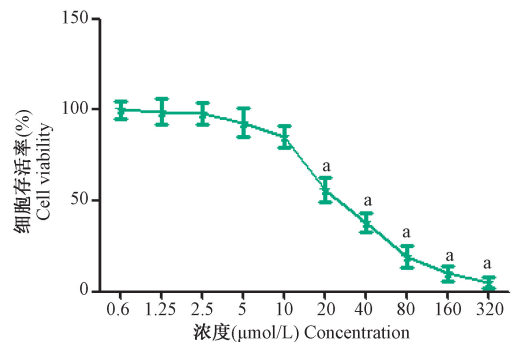
ELISA 检测结果显示(图 6), DHCL $40 \mu\text{mol/L}$ 组和 DHCL $20 \mu\text{mol/L}$ 组细胞 SOD 和 GSH-Px 水平低于 DHCL $0 \mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.05$), MDA 水平高于 DHCL $0 \mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.05$)。

2.7 DHCL 促进 SGC-7901 细胞内 ROS 生成

DCFH-DA 探针检测结果显示(图 7), DHCL $40 \mu\text{mol/L}$ 组和 DHCL $20 \mu\text{mol/L}$ 组细胞内 ROS 水平高于 DHCL $0 \mu\text{mol/L}$ 组。

2.8 DHCL 抑制裸鼠移植瘤生长

裸鼠移植瘤结果显示(图 8), DHCL 组裸鼠移植瘤的质量低于对照组($P < 0.05$)。

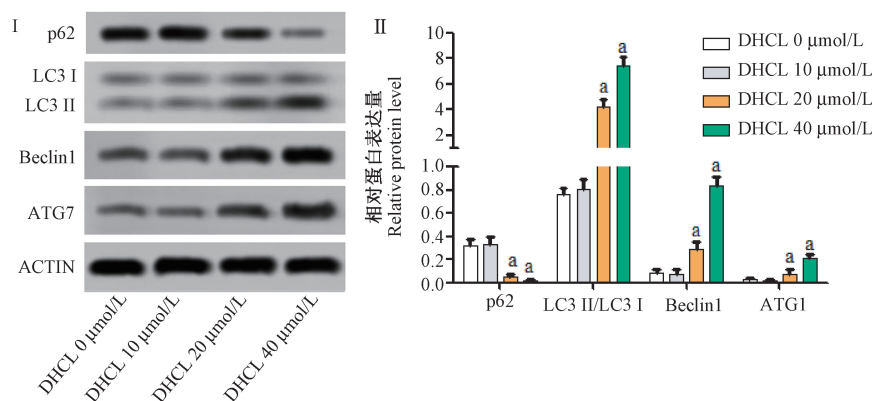


注:与 $0 \mu\text{mol/L}$ DHCL 作用比, $^a P < 0.05$ 。

图 1 DHCL 抑制 SGC-7901 细胞增殖

Note. Compared with $0 \mu\text{mol/L}$ DHCL, $^a P < 0.05$.

Figure 1 DHCL inhibited the proliferation of SGC-7901 cells



注: I: 各组细胞自噬相关蛋白表达情况; II: 各组细胞自噬相关蛋白相对表达量。与 DHCL $0 \mu\text{mol/L}$ 组比, $^a P < 0.05$ 。

图 2 DHCL 促进 SGC-7901 细胞自噬相关蛋白表达

Note. I, Expression of autophagy-related proteins in each group. II, Relative protein level of autophagy-related proteins. Compared with DHCL $0 \mu\text{mol/L}$ group, $^a P < 0.05$.

Figure 2 DHCL promoted the expression of autophagy-related proteins in SGC-7901 cells

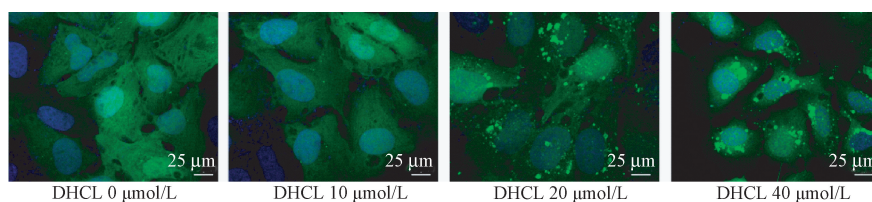
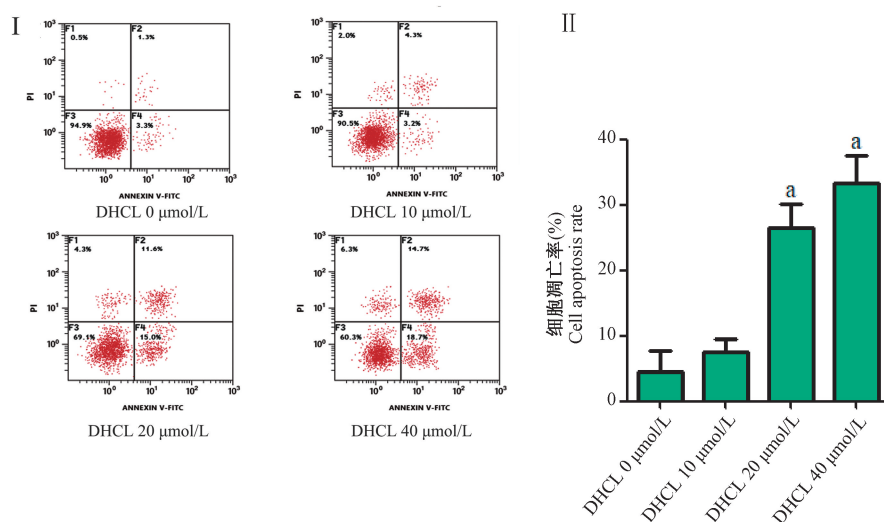


图3 DHCL 增强 SGC-7901 细胞自噬活性

Figure 3 DHCL enhanced autophagy activity of SGC-7901 cells

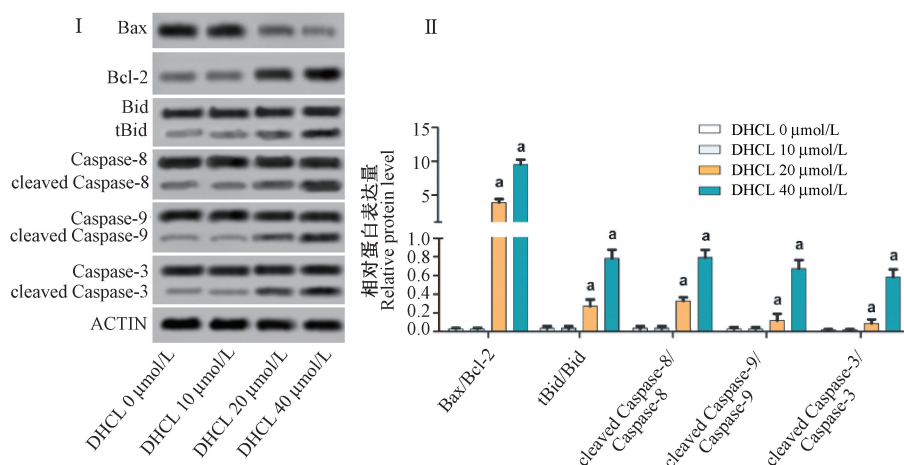


注: I: 流式细胞仪检测细胞凋亡情况; II: 细胞凋亡率。与 DHCL 0 μmol/L 组比, ^a $P < 0.05$ 。

图4 DHCL 促进 SGC-7901 细胞凋亡

Note. I, Cell apoptosis detected by flow cytometry instrument. II, Cell apoptosis rate. Compared with DHCL 0 μmol/L group, ^a $P < 0.05$.

Figure 4 DHCL promotes apoptosis of SGC-7901 cells

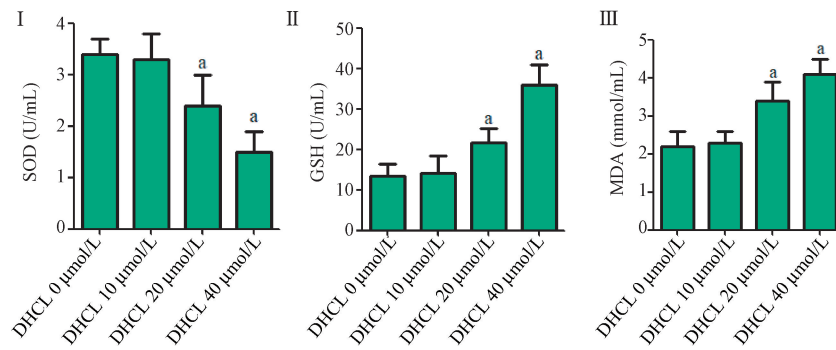


注: I: Western blot 检测细胞蛋白表达; II: 各组细胞蛋白相对表达量。与 DHCL 0 μmol/L 组比, ^a $P < 0.05$ 。

图5 DHCL 促进 SGC-7901 细胞凋亡相关蛋白表达

Note. I, Protein expression detected by Western blot. II, Relative protein level. Compared with DHCL 0 μmol/L group, ^a $P < 0.05$.

Figure 5 DHCL promoted the expression of apoptosis-related proteins in SGC-7901 cells



注: I: SOD; II: GSH-Px; III: MDA。与 DHCL 0 μmol/L 组比, ^a $P < 0.05$ 。

图 6 DHCL 抑制 SGC-7901 细胞抗氧化酶表达

Note. I, SOD. II, GSH-Px. III, MDA. Compared with DHCL 0 μmol/L group, ^a $P < 0.05$.

Figure 6 DHCL inhibits the expression of antioxidant enzymes in SGC-7901 cells

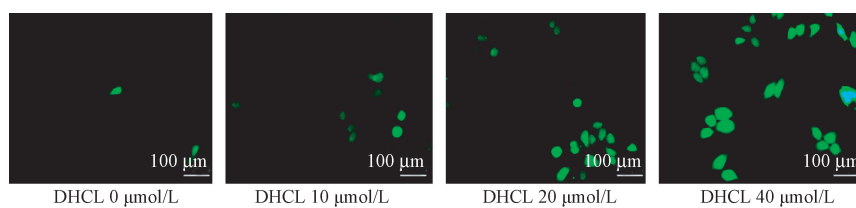
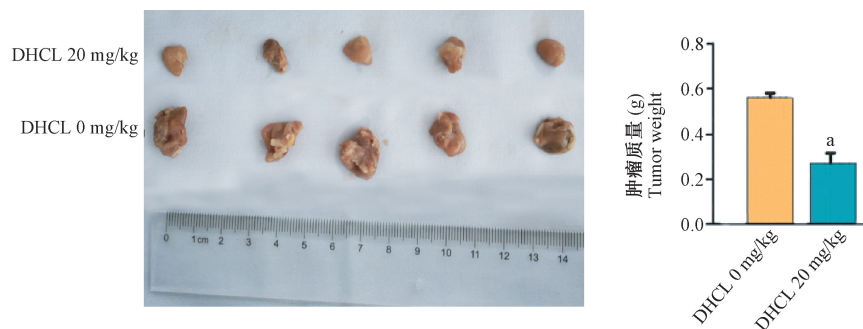


图 7 DHCL 促进 SGC-7901 细胞内 ROS 生成

Figure 7 DHCL promotes ROS production in SGC-7901 cells



注:与 DHCL 0 mg/kg 组比, ^a $P < 0.05$ 。

图 8 DHCL 抑制裸鼠移植瘤生长

Note. Compared with DHCL 0 mg/kg group, ^a $P < 0.05$.

Figure 8 DHCL inhibited the growth of xenograft tumor in nude mice

3 讨论

木香是一种草本植物药材,味苦,性温,归脾及胃,常用于治疗腹胀、消化不良、呕吐腹泻等消化道疾病^[8]。DHCL 是从云木香根中分离的一种天然倍半萜类化合物,具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、改善胃肠道功能等多种生物学作用,可以抑制多种肿瘤细胞的生长,发挥抗肿瘤作用^[9]。本研究探讨了 DHCL 对胃癌细胞生长的影响,发现 DHCL 对 SGC-7901 细胞的抑制作用呈药物浓度依赖性,且当 DHCL 浓度 $\geq 20 \mu\text{mol/L}$ 时,SGC-7901 细胞存活率

明显下降,提示 DHCL 可以以浓度依赖性的方式抑制 SGC-7901 细胞增殖。本研究中,DHCL 40 $\mu\text{mol/L}$ 组和 DHCL 20 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞 p62 蛋白表达低于 DHCL 0 $\mu\text{mol/L}$ 组,Beclin1、LC3 II/LC3 I 和 ATG7 蛋白表达和 LC3 荧光斑点数高于 DHCL 0 $\mu\text{mol/L}$ 组。Beclin1 是一种自噬相关的抑癌基因,在自噬启动阶段发挥重要作用,在 Bcl-2 等多种细胞因子作用下,可以与磷脂酰肌醇 3 激酶结合,促进初期自噬吞噬小泡的形成^[10]。ATG7 具有泛素 E1 样酶活性,可以参与形成前自噬体结构,还可以活化 LC3-I,并将其转运至 ATG3,催化形成 LC3-II^[11]。LC3

是一种自噬体标志蛋白,当细胞自噬发生时,LC3-I 经过细胞内经泛素样加工修饰,再与磷脂酰乙醇胺结合,可以形成 LC3-II,其 LC3-II/LC3-I 比值可以敏感反映细胞的自噬活性^[12],提示 DHCL 可以呈剂量依赖性的增强 SGC-7901 细胞自噬活性。p62 是自噬过程的特异性降解底物,当细胞发生自噬时,p62 可以结合泛素化蛋白,再与膜 LC3-II 蛋白结合形成复合物,最终通过自噬溶酶体途径降解,其表达水平与自噬活性呈反比^[13]。已有多项研究显示^[14-15],自噬参与了肿瘤形成和死亡的各个阶段,早期自噬可以通过降解细胞内蛋白质和细胞器为肿瘤细胞提供能量资源,但持续增强的自噬可以抑制肿瘤细胞增殖,诱导细胞死亡,提示 DHCL 可能通过增强 SGC-7901 细胞自噬活性,发挥抗肿瘤作用。

本研究中,DHCL 40 $\mu\text{mol/L}$ 组和 DHCL 20 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡率高于 DHCL 0 $\mu\text{mol/L}$ 组,Bax/Bcl-2、tBid/Bid、cleaved Caspase-8/Caspase-8、cleaved Caspase-9/Caspase-9 和 cleaved Caspase-3/Caspase-3 蛋白表达高于 DHCL 0 $\mu\text{mol/L}$ 组,且高剂量 DHCL 诱导的细胞凋亡率略高于低剂量。Bax/Bcl-2 是一组调控线粒体凋亡途径的蛋白,生理状态下,Bcl-2 位于线粒体膜表面,一旦细胞接收到凋亡信号刺激,细胞内的 Bax 会转位至膜上与 Bcl-2 结合,破坏线粒体结构,导致线粒体细胞色素 C 释放入胞浆,激活 Caspase 凋亡级联反应^[16]。tBid/Bid 是一组连接内源性和外源性凋亡途径的凋亡蛋白。Caspase-8 主要调节外源性细胞凋亡途径,Caspase-9 主要介导内源性细胞凋亡途径,均可以激活细胞凋亡效应蛋白 Caspase-3 入核,降解细胞内的关键蛋白,诱导细胞凋亡^[17]。Huang 等^[18]研究显示,外源性凋亡途径激活 Caspase-8 后,活化的 Caspase-8 可以促进 Bid 剪切裂解为 tBid,tBid 可以移位到线粒体中调节细胞色素 C 释放,参与线粒体途径促进细胞凋亡,提示 DHCL 可以以剂量依赖性的方式,调节细胞凋亡相关蛋白的表达,诱导胃癌细胞凋亡。

本研究中,DHCL 40 $\mu\text{mol/L}$ 组和 DHCL 20 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞 SOD 和 GSH-Px 水平低于 DHCL 0 $\mu\text{mol/L}$ 组,MDA 和 ROS 水平高于 DHCL 0 $\mu\text{mol/L}$ 组。SOD 和 GSH-Px 是细胞内重要的抗氧化酶,可以清除过多的 ROS,维持细胞内氧化/抗氧化系统平衡^[19]。MDA 是脂质过氧化的中间产物,可以反映细胞内 ROS 水平^[20]。ROS 是细胞内的一类具有高度氧化作用的小分子量物质,具有细胞毒性,可

以破坏线粒体膜结构,激活 Bax/Bcl-2 介导的线粒体凋亡途径,诱导肿瘤细胞凋亡^[21]。已有大量研究显示^[22-23],线粒体内大量的 ROS 还可以激活自噬,促进自噬活性,诱导 Beclin1 表达,此外细胞内大量的 ROS 还可以通过调节 mTOR、MAPK 等信号通路表达,调节自噬过程,诱导肿瘤细胞的自噬性死亡。Cai 等^[24]研究显示,DHCL 可以增加 ROS 的产生,破坏线粒体膜结构,诱导人慢性髓系白血病细胞凋亡和自噬,提示 DHCL 可能通过促进 SGC-7901 细胞氧化应激活性,诱导胃癌细胞自噬和凋亡。本研究中,DHCL 组裸鼠移植瘤的质量低于对照组,提示 DHCL 可以抑制胃癌移植瘤的生长,发挥抗肿瘤作用。Chen 等^[25]研究显示,天然的生物活性化合物 Celastrol 可以在体内外增加 ROS 水平,导致癌细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用。Zhang 等^[26]研究发现,DHCL 可以诱导喉癌细胞凋亡,对人正常喉上皮细胞 HBE 的毒性作用较小,且在裸鼠体内器官未见明显毒性迹象。结合本研究结果说明,DHCL 可能通过抗氧化作用,降低胃癌细胞 ROS 水平,诱导胃癌细胞的凋亡,有望应用于临床治疗。

综上所述,DHCL 可以呈剂量依赖性的抑制 SGC-7901 细胞增殖,促进细胞内 ROS 产生,诱导细胞自噬性死亡和凋亡,抑制胃癌移植瘤的生长,有望应用于临床胃癌患者的治疗。然而本研究尚处于基础研究阶段,尚需大量的临床试验来验证。

参考文献:

- [1] 曾倩,崔芳芳,宇传华,等.中国癌症发病、死亡现状与趋势分析[J].中国卫生统计,2016,33(2):321-323.
- [2] Izuishi K, Mori H. Recent strategies for treating stage iv gastric cancer: roles of palliative gastrectomy, chemotherapy, and radiotherapy [J]. J Gastrointest Liver Dis, 2016, 25(1): 87-94.
- [3] Tokunaga M, Sato Y, Nakagawa M, et al. Perioperative chemotherapy for locally advanced gastric cancer in Japan: current and future perspectives [J]. Surg Today, 2020, 50(1): 30-37.
- [4] Long HY, Huang QX, Yu YY, et al. Dehydrocostus lactone inhibits in vitro gastrinoma cancer cell growth through apoptosis induction, sub-G1 cell cycle arrest, DNA damage and loss of mitochondrial membrane potential [J]. Arch Med Sci, 2019, 15(3): 765-773.
- [5] Zhang R, Hao J, Wu Q, et al. Dehydrocostus lactone inhibits cell proliferation and induces apoptosis by PI3K/Akt/Bad and ERS signalling pathway in human laryngeal carcinoma [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(11): 6028-6042.
- [6] Wang J, Yu Z, Wang C, et al. Dehydrocostus lactone, a natural

- sesquiterpene lactone, suppresses the biological characteristics of glioma, through inhibition of the NF- κ B/COX-2 signaling pathway by targeting IKK β [J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(6): 1270–1284.
- [7] 刘韵, 黄文菁, 吴孟华, 等. 去氢木香内酯调控肺癌干细胞干性分子的研究 [J]. *中药材*, 2018, 41(6): 1471–1474.
- [8] 蔡威, 陈文莉, 付会玲. 木香顺气丸对尿毒症前期患者消化功能紊乱的影响及机制研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(1): 34–38.
- [9] 程剑, 林彬, 沈晓洁, 等. 去氢木香内酯对人肝星状细胞增殖及凋亡的影响研究 [J]. *重庆医学*, 2017, 46(28): 3906–3908, 3911.
- [10] Wu CL, Liu JF, Liu Y, et al. Beclin1 inhibition enhances paclitaxel-mediated cytotoxicity in breast cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(4): 1866–1878.
- [11] You Z, Xu Y, Wan W, et al. TP53INP2 contributes to autophagosome formation by promoting LC3 – ATG7 interaction [J]. *Autophagy*, 2019, 15(8): 1309–1321.
- [12] Muller DC, Hodge AM, Fanidi A, et al. No association between circulating concentrations of vitamin D and risk of lung cancer: an analysis in 20 prospective studies in the lung cancer cohort consortium (LC3) [J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(6): 1468–1475.
- [13] He JP, Hou PP, Chen QT, et al. Flightless-i blocks p62 – mediated recognition of lc3 to impede selective autophagy and promote breast cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(17): 4853–4864.
- [14] Mowers EE, Sharifi MN, Macleod KF. Functions of autophagy in the tumor microenvironment and cancer metastasis [J]. *FEBS J*, 2018, 285(10): 1751–1766.
- [15] Nazio F, Bordini M, Cianfanelli V, et al. Autophagy and cancer stem cells: molecular mechanisms and therapeutic applications [J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(4): 690–702.
- [16] Melincovici CS, Miha CM, Mărginean M, et al. The prognostic significance of p53, Bax, Bcl-2 and cyclin E protein overexpression in colon cancer – an immunohistochemical study using the tissue microarray technique [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2016, 57(1): 81–89.
- [17] Liu H, Zhou Y, Tang L. Caffeine induces sustained apoptosis of human gastric cancer cells by activating the caspase-9/caspase-3 signalling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 2445–2454.
- [18] Huang K, Zhang J, O'Neill KL, et al. Cleavage by Caspase 8 and mitochondrial membrane association activate the BH3 – only protein Bid during TRAIL-induced apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(22): 11843–11851.
- [19] Zhao Y, Kong GY, Pei WM, et al. Dexmedetomidine alleviates hepatic injury via the inhibition of oxidative stress and activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2019, 30(3): 88–97.
- [20] Zohaib M, Ansari SH, Hashim Z, et al. Serum paraoxonase activity and malondialdehyde serum concentrations remain unaffected in response to hydroxyurea therapy in β -thalassemia patients [J]. *J Clin Pharmacol*, 2016, 56(7): 869–874.
- [21] Li J, Wu DD, Zhang JX, et al. Mitochondrial pathway mediated by reactive oxygen species involvement in α -hederin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(17): 1901–1910.
- [22] Zou J, Zhang Y, Sun J, et al. Deoxyelephantopin induces reactive oxygen species-mediated apoptosis and autophagy in human osteosarcoma cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(5): 1812–1821.
- [23] Liu T, Wu L, Wang D, et al. Role of reactive oxygen species-mediated MAPK and NF- κ B activation in polygonatum cyrtoneura lectin-induced apoptosis and autophagy in human lung adenocarcinoma A549 cells [J]. *J Biochem*, 2016, 160(6): 315–324.
- [24] Cai H, Qin X, Yang C. Dehydrocostus lactone suppresses proliferation of human chronic myeloid leukemia cells through Bcr/Abl-JAK/STAT signaling pathways [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(10): 3381–3390.
- [25] Chen X, Zhao Y, Luo W, et al. Celastrol induces ROS-mediated apoptosis via directly targeting peroxiredoxin-2 in gastric cancer cells [J]. *Theranostics*, 2020, 10(22): 10290–10308.
- [26] Zhang R, Hao J, Wu Q, et al. Dehydrocostus lactone inhibits cell proliferation and induces apoptosis by PI3K/Akt/Bad and ERS signalling pathway in human laryngeal carcinoma [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(11): 6028–6042.

[收稿日期] 2021-02-18