

辣木生物碱抑制宫颈癌Hela细胞增殖和诱导其凋亡的作用

罗凤仙^{1,2}, 解静^{1,2,3}, 钱颖艳^{1,2}, 杨茗茸^{1,2}, 田洋^{1,2,3}

(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650201) (2. 国家辣木加工技术研发专业中心, 云南昆明 650201)
(3. 云南省生物大数据重点实验室, 云南昆明 650201)

摘要: 研究辣木 (*Moringa Oleifera*. Lam) 叶生物碱对宫颈癌 Hela 细胞增殖和凋亡的影响及可能机制。通过采用 MTT 法、克隆形成法、流式细胞术和 western blot 法检测经不同浓度辣木生物碱 (20~320 $\mu\text{g/mL}$) 处理 48 h 后的 Hela 细胞增殖、凋亡情况和蛋白表达水平。研究表明, 随着辣木生物碱浓度的增加, Hela 细胞的存活率逐渐下降, 当辣木生物碱浓度为 160 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞的存活率为 35.87% ($p < 0.001$), 人正常结肠细胞 NCW460 的存活率为 91.91%; 克隆形成实验表明, 辣木生物碱 (40~160 $\mu\text{g/mL}$) 显著抑制 Hela 细胞克隆形成, 抑制率分别为 26.04% ($p < 0.05$)、37.19% ($p < 0.01$) 和 67.77% ($p < 0.001$); 当浓度为 80 $\mu\text{g/mL}$ 时, Hela 细胞形态发生明显变化; 进一步流式细胞术分析得知, Hela 细胞内的凋亡细胞数随着辣木生物碱浓度的增加而增加, 当细胞经 160 $\mu\text{g/mL}$ 辣木生物碱处理 48 h 后, 其细胞内凋亡细胞数为 42.10% ($p < 0.001$), 通过对凋亡蛋白表达水平检测发现, Bax/Bcl-2 比率和 Caspase9 表达水平随着辣木生物碱浓度的增加而增加, 当辣木生物碱浓度达到 80 $\mu\text{g/mL}$ 时, 与对照相比有显著性差异。此外, 辣木生物碱显著降低 Stat3 蛋白磷酸化水平和 CyclinD1 蛋白表达水平, 当辣木生物碱浓度达到 160 $\mu\text{g/mL}$ 时, 与对照相比有显著性差异。以上实验结果表明, 辣木生物碱具有抑制 Hela 细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用, 其机制可能与抑制 Stat3 信号通路活化相关。

关键词: 辣木; 生物碱; 宫颈癌; 细胞凋亡; Stat3

文章编号: 1673-9078(2020)02-18-24

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.2.004

Inhibition of Proliferation and Apoptosis of Cervical Cancer Hela Cells by Treating with *Moringa Oleifera* Lam Alkaloids

LUO Feng-xian^{1,2}, XIE Jing^{1,2,3}, QIAN Ying-yan^{1,2}, YANG Ming-rong^{1,2}, TIAN Yang^{1,2,3}

(1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)
(2. National Research Center for *Moringa* Processing Technology, Kunming 650201, China)
(3. Yunnan Key Laboratory of Biological Big Data institute, Kunming 650201, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of *Moringa Oleifera*. Lam (*M. oleifera*) alkaloids on proliferation and apoptosis of cervical cancer Hela cells and its possible mechanism. Following 48h of treatment with *M. oleifera* alkaloids at various doses (20~320 $\mu\text{g/mL}$), the proliferation, apoptosis and protein expression level of Hela cells were detected by MTT assay, colony formation assay, flow cytometric analysis and western blot. The results showed that the survival rate of Hela cells decreased gradually with the increase of *M. oleifera* alkaloids concentration. When the concentration of *M. oleifera* alkaloids was 160 $\mu\text{g/mL}$, the cell survival rate was 35.87% ($p < 0.001$), the survival rate of human normal colon cell NCW460 is 91.91%. Colony formation experiments showed that *M. oleifera* alkaloids (40~160 $\mu\text{g/mL}$) significantly inhibited the colony formation of Hela cells, and the inhibition rates were 26.04% ($p < 0.05$), 37.19% ($p < 0.01$) and 67.77% ($p < 0.001$), respectively. When the concentration of *M. oleifera* alkaloids was 80 $\mu\text{g/mL}$, the morphology of Hela cells changed significantly. Further flow cytometry analysis showed that the number of apoptotic cells in Hela cells increased with the increase of the concentration of *M. oleifera* alkaloid. When the cells were treated with 160 $\mu\text{g/mL}$ of *M. oleifera* alkaloids for 48 h, the number of apoptotic cells was 42.1%

收稿日期: 2019-08-13

基金项目: 热作技术试验示范与服务支持—云南特色热带作物精深加工产品研发及示范项目 (18190001); 国家木薯产业技术体系项目 (CARS-11-YNSJ); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目 (2018HB040); 云南省农业基础研究联合专项青年项目 (2018FG001-088)

作者简介: 罗凤仙 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能食品

通讯作者: 田洋 (1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能食品

($p < 0.001$). Further experiments showed that at 48 h, *M. oleifera* alkaloid up-regulated the ratio of Bax/Bcl-2 and the expressions of Caspase-9 and down-regulated the expressions of P-Stat3 and CyclinD1 at the protein level in HeLa cells. Our results indicate that *M. oleifera* alkaloids inhibits cell proliferation of HeLa cells through the induction of apoptosis, which is mediated via inhibition of the Stat3-related pathway.

Key words: *Moringa Oleifera*. Lam; alkaloids; cervical cancer; apoptosis; Stat3

恶性宫颈肿瘤是女性人群中最常见的恶性肿瘤之一。根据国家和地区的不同,发病率也不同。据报道,全球每年每10万妇女新发病例为8~30例,死亡人数超23万^[1]。其中大多数发生在发展中国家相对年轻的妇女上,并且在晚期阶段。目前手术及放疗仍是恶性宫颈肿瘤的主要治疗方式,但放疗带来的副作用不容忽视。因此,如何有效的控制以至于治愈恶性宫颈肿瘤仍是当今医学领域中亟待解决的首要问题之一。

生物碱是一类有机含氮化合物,现已被证明具有镇痛、缓解痉挛、抗菌、消除炎症、降血压、平喘、抗肿瘤的功効^[2]。中国现阶段已进行了千余种天然药用植物抗肿瘤药理筛选,发现近百种中草药具有抗肿瘤药理作用,其中,具有主要抗肿瘤活性的成分为生物碱类成分。目前,一些生物碱已经被广泛应用于癌症治疗,如长春碱和长春新碱用于治疗绒毛癌、淋巴肉瘤等。由于生物碱的抗肿瘤活性具有高效、低毒的特点,已成为国内外学者关注的热点。

辣木(*Moringa Oleifera*. Lam)又称鼓槌树,是一种神奇的热带、亚热带植物。科学界誉之为“奇迹之树”。大量研究表明,辣木具有抗癌活性,如辣木对人肝癌细胞HCC^[3]、宫颈癌细胞Hela^[4]、人口腔表皮样癌细胞(KB细胞系)^[5]、乳腺癌MDA-MB-231和结肠癌HCT-8癌细胞系^[6]具有较强的抗增殖作用和有效的诱导细胞凋亡的能力。但是目前有关辣木抗癌活性的研究,物质基础大多停留在粗提物,关于辣木生物碱抗癌活性的研究还未见报道。因此,本实验探讨辣木生物碱对Hela细胞增殖和凋亡的作用,并通过检测凋亡蛋白和Stat3通路相关蛋白的表达,初步明确辣木生物碱抑制Hela细胞增殖和诱导凋亡的机制,为辣木生物碱抗肿瘤研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

低速离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;多功能酶标仪, Molecular Devices; 电泳仪,北京六一; 曝光机,科锐; 倒置显微镜,上海蔡康光学仪器有限公司; 细胞计数器, count star; CO₂培养箱,德国宾德; 流式细胞仪, BD C6; DMEM 高糖培养基, Hyclone 公司; 胎牛血清, BI 公司; Bax、Bcl-2 一抗,

Abcam 公司; CyclinD1、Stat3、P-Stat3、Caspase-9 一抗, 万类生物科技有限公司; DMSO, Amresco 公司; 噻唑蓝 MTT, sigma 公司; RIPA 及 PMSF, 索莱宝生物技术公司; 细胞凋亡检测试剂盒, 翊圣生物有限公司; BCA 测定试剂盒, 碧云天试剂公司; 辣木叶粉, 云南天佑科技开发有限公司。

1.2 方法

1.2.1 辣木生物碱制备

辣木叶粉(10 kg)用 50%乙醇浸泡提取三次,每次浸泡 24 h, 过滤, 合并提取液, 浓缩, 回收乙醇。浓缩后得到的水液, 10% HCl 调节 pH 值到 2, 用乙酸乙酯萃取 3 次。酸水液用氢氧化钠溶液调节 pH 值到 10, 用氯仿萃取 3 次, 合并氯仿液, 回收氯仿, 得到生物碱浸膏 30 g。实验中所用到的辣木生物碱用 DMSO 配制成 100 mg/mL 的母液, 置于-20 °C 冰箱储存。

1.2.2 细胞培养

人宫颈癌细胞 HeLa、人非小细胞肺癌细胞 A549、人结肠癌细胞 HCT116、人肝癌细胞 HepG2、人乳腺癌细胞 MCF-7、人正常结肠细胞 NCW460 均购买于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。人结肠癌细胞 HCT116 在含有 10%胎牛血清和 1%双抗的 F12 培养基中培养。除 HCT116 细胞外, 其余细胞在含有 10%胎牛血清和含有 1%双抗(含有青霉素和链霉素)的 DMEM 培养基中培养, 并置于 37 °C, 5%的 CO₂ 培养箱中, 每隔两到三天传一次代。

1.2.3 辣木生物碱抗癌活性筛选

参考 Zhao^[7]等人的实验方法进行实验, 对 5 种癌细胞系(A549、HCT116、Hela、HepG2、MCF-7)进行抗癌药物筛选。收集对数生长期的细胞, 以 10000 个细胞/孔的密度接种在 96 孔板(200 μL/孔)中, 在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 12~24 h。然后用不同浓度的辣木生物碱(0、100、200 μg/mL)处理细胞。在 48 h 后, 甩出孔内培养液, 在每孔中加入 100 μL 浓度为 0.25 mg/mL 的 MTT 溶液。继续培养 4 h, 终止培养, 甩出孔内培养液, 并向每孔中加入 100 μL DMSO, 置酶标仪中振荡 10 min, 使紫色结晶物充分溶解。在酶标仪 OD 492 nm 处测量各孔的吸光值。

其中, 细胞活率计算公式: 细胞存活率=(给药-空白)/(阴性对照-空白)×100%

1.2.4 MTT 测定细胞活力

收集对数生长期的 HeLa 细胞和人正常结肠细胞 NCW460, 以 10000 个细胞/孔的密度接种在 96 孔板 (200 μL /孔)中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 12~24 h。然后用不同浓度的辣木生物碱 (0、20、40、80、160、320 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理细胞。在 48 h 后, 甩出孔内培养液, 在每孔中加入 100 μL 浓度为 0.25 mg/mL 的 MTT 溶液。继续培养 4 h, 终止培养, 甩出孔内培养液, 并向每孔中加入 100 μL DMSO, 置酶标仪中振荡 10 min, 使紫色结晶物充分溶解。在酶标仪 OD_{492 nm} 处测量各孔的吸光值。

1.2.5 克隆形成实验

参考 Lin^[8]等人的实验方法, 收集对数生长期 HeLa 细胞, 以 500 个细胞/孔的密度接种在 6 孔板中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 24 h。然后用不同浓度的辣木生物碱 (0、40、80、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理细胞 48 h。培养 15 d 后, 将细胞固定在甲醇中并用 0.1% 结晶紫染色 15~30 min, 多次洗涤后, 把板放在板空气中干燥, 进行拍照, 并用 10% 的冰乙酸溶解结晶紫, 在酶标仪 OD_{560 nm} 处测量吸光值, 进行统计分析。

1.2.6 电子显微镜观察细胞形态变化

将适当浓度的 HeLa 细胞接种于 60 mm 培养皿, 12~24 h 之后用不同浓度的辣木生物碱 (分别设置空白对照组、40、80、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 实验组) 处理 HeLa 细胞, 48 h 后置光学显微镜下观察辣木生物碱对 HeLa 细胞形态的影响, 并拍照。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡

参考 Jung^[9]等人的实验方法, 取对数生长期的细胞, 将 HeLa 细胞接种于 6 孔板中, 每孔接种 20 万个细胞, 每个浓度设置三个复孔, 待细胞贴壁生长后, 用不同浓度的辣木生物碱 (0、40、80、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 HeLa 细胞 48 h 后, 细胞先用 PBS 清洗, 再用胰蛋白酶消化, 之后离心 (3 min, 1500 r/min)。再次用 PBS 清洗, 之后加 Annexin-V 和 PI 染色 10~15 min, 在一个小时之内上机检测。

1.2.8 Western blot 检测凋亡蛋白的表达

参考 Xie^[10]等人的实验方法进行实验, 用不同浓度的辣木生物碱 (0、40、80、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 HeLa 细胞 48 h。使用 RIPA 裂解液和 PMSF (RIPA:PMSF=100:1) 从 HeLa 细胞中提取总蛋白。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。通过 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 并转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上, 并用 5% 脱脂奶粉在室温下封闭 1 h, 然后与一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜, TBST 清洗三次, 膜与兔抗/鼠抗在室温下孵育 1 h 后, 再用 TBST 清洗三次,

最后用曝光仪 (科锐曝光机) 曝光拍照, 并用 Image J 进行定量分析。

1.3 统计学分析

使用 Graphpad Prism 5 统计软件进行实验数据分析, 组间的比较用 t-test, $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.001$ 表示有统计学差异。

2 结果与讨论

2.1 辣木生物碱对 HeLa 细胞存活率的影响

首先用辣木生物碱对 5 种癌细胞系 (A549、HCT116、HeLa、HepG2、MCF-7) 进行抗癌活性筛选, 发现辣木生物碱可以显著抑制 HeLa 细胞增殖, 当剂量为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, A549 的细胞存活率为 95.91%, HCT116 的细胞存活率为 64.20%, HepG2 的细胞存活率为 73.55%, MCF-7 的细胞存活率为 76.39%, HeLa 细胞的存活率最低, 仅为 23.25%, 如表 1 所示。因此在后续的实验中, 以 HeLa 细胞为实验对象, 来探究辣木生物碱抑制 HeLa 细胞增殖的作用机制。

表 1 辣木生物碱对 5 种癌细胞系存活率的影响

Table 1 Effect of *M. oleifera* alkaloids on the survival rate of five cancer cell lines

细胞系	细胞存活率/%	
	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$
A549	100.00 \pm 2.50	95.91 \pm 6.98
HCT116	100.00 \pm 3.04	64.20 \pm 3.03***
HepG2	100.00 \pm 3.8	73.55 \pm 5.14**
MCF-7	100.00 \pm 7.15	76.39 \pm 7.11**
HeLa	100.00 \pm 3.28	23.25 \pm 2.55***

注: 与空白对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 比较, 组间差异用*表示 ($*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$)。

为了进一步检测 HeLa 细胞的存活率与辣木生物碱之间是否存在剂量依赖性, 用不同浓度辣木生物碱 (0、20、40、80、160、320 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 HeLa 细胞, 48 h 后, 采用 MTT 法检测细胞存活率。如图 1 所示, 与对照 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 相比, 辣木生物碱能显著降低 HeLa 细胞存活率, 细胞活率与药物剂量呈依赖性, 抑制率分别为 10.95%、15.40%、28.78%、64.13% 和 99.51% ($p<0.001$), 其中, 半数致死剂量为 100.633 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。为了检测辣木生物碱对正常细胞是否具有毒性, 用相同剂量的辣木生物碱 (0、20、40、80、160、320 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理人正常结肠细胞 NCW460 48 h, 发现当辣木生物碱的剂量为 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, NCW460 细胞的细胞活率为 91.91%, 当剂量为 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, NCW460 细胞的

存活率为 41.45%。实验结果表明, 在 160 $\mu\text{g/mL}$ 剂量下, 辣木生物碱可以显著抑制 HeLa 增殖, 并且对人正常结肠细胞 NCW460 没有明显毒性, 在 320 $\mu\text{g/mL}$ 剂量下对细胞具有一定毒性。

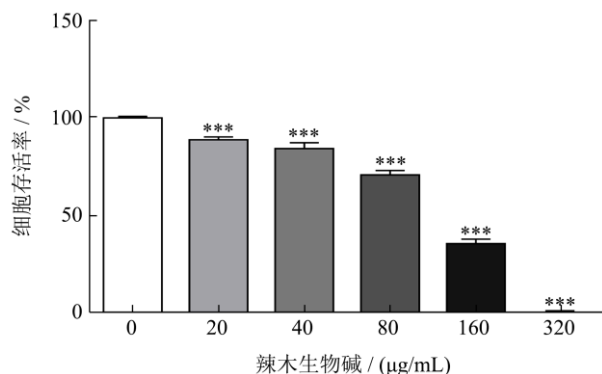


图 1 辣木生物碱对 HeLa 细胞存活率的影响

Fig.1 Effect of *M. oleifera* alkaloids on the cells viability of HeLa cells

注: 与空白对照组 (0 $\mu\text{g/mL}$) 比较, 组间差异用*表示 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), 下同。

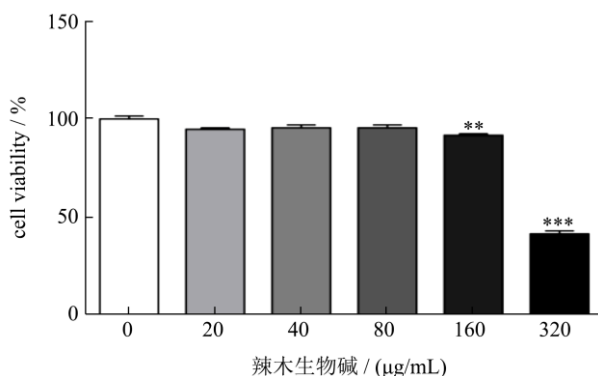


图 2 辣木生物碱对 NCW460 细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of *M. oleifera* alkaloids on the cells viability of NCW460 cells

2.2 辣木生物碱对 HeLa 细胞克隆形成的影响

细胞克隆形成实验是用来检测肿瘤细胞增殖能力、侵袭性、对杀伤因素敏感性等的重要方法。因此, 采用克隆形成实验来检测辣木生物碱对细胞增殖能力的影响。如图 3 所示, 与对照 (0 $\mu\text{g/mL}$) 相比, 辣木生物碱 (40~160 $\mu\text{g/mL}$) 显著降低 HeLa 细胞克隆形成, 细胞相对克隆数分别降低 26.04% ($p < 0.05$)、37.19% ($p < 0.01$)、67.77% ($p < 0.001$)。结果表明辣木生物碱具有抑制 HeLa 细胞增殖的作用。

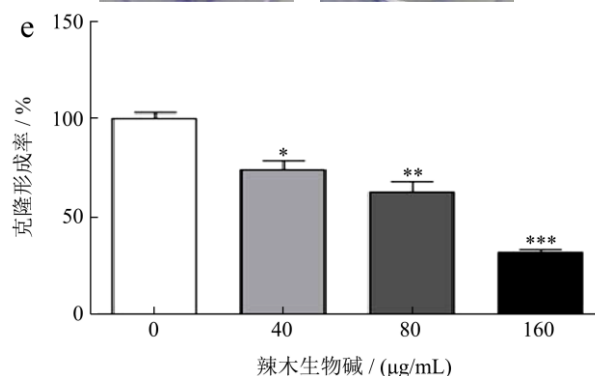
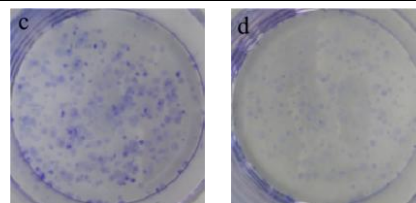
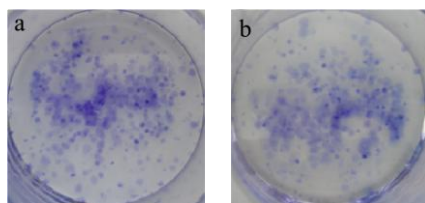


图 3 辣木生物碱对 HeLa 细胞克隆形成的影响

Fig.3 Effect of *M. oleifera* alkaloids on the clones of HeLa cells

注: a: 对照组 (0 $\mu\text{g/mL}$); b: 实验组 (40 $\mu\text{g/mL}$); c: 实验组 (80 $\mu\text{g/mL}$); d: 实验组 (160 $\mu\text{g/mL}$); e: 克隆形成率。

2.3 辣木生物碱对 HeLa 细胞形态的影响

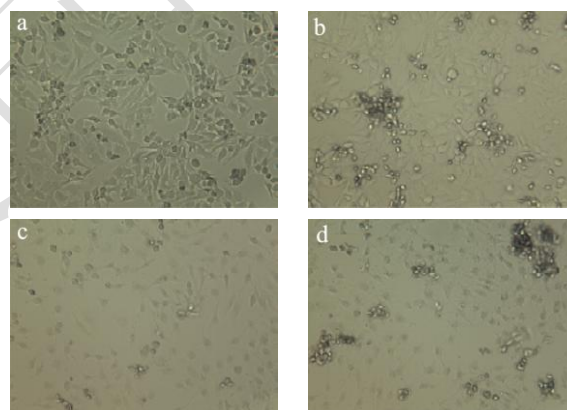


图 4 辣木生物碱对 HeLa 细胞形态的影响

Fig.4 Effect of *M. oleifera* alkaloids on the morphology of HeLa cells

注: a: 对照组 (0 $\mu\text{g/mL}$); b: 实验组 (40 $\mu\text{g/mL}$); c: 实验组 (80 $\mu\text{g/mL}$); d: 实验组 (160 $\mu\text{g/mL}$)。

细胞发生凋亡时, 细胞形态会发生变化, 如细胞皱缩, 细胞间接触的消失, 与周围的细胞脱离, 凋亡小体出现等。采用不同浓度辣木生物碱 (0、40、80、160 $\mu\text{g/mL}$) 处理 HeLa 细胞 48 h 后, 在显微镜下观察细胞形态。通过观察发现, 对照组 HeLa 细胞呈多角形, 细胞紧密排列, 背景干净; 40 $\mu\text{g/mL}$ 生物碱处理组的细胞形态无明显变化; 80 $\mu\text{g/mL}$ 生物碱处理组的细胞排列松散, 细胞间隙增大, 可见部分细胞出现固缩、溶解, 160 $\mu\text{g/mL}$ 生物碱处理组的细胞排列更松散, 细胞间隙明显增大, 贴壁细胞明显减少, 圆形漂浮细

胞增多, 细胞碎片多见, 发现细胞数量减少, 体积缩小, 大部分细胞变圆并漂浮。结果表明经辣木生物碱处理后 *Hela* 细胞形态发生显著变化 (如图 4 所示), 且出现凋亡现象。

2.4 辣木生物碱诱导细胞凋亡

为了进一步说明辣木生物碱可以诱导细胞凋亡, 用流式细胞术来检测细胞的凋亡率。细胞被划分在四个区域, 活细胞位于左下 (LL) 区域 (Annexin-V 和 PI 均为阴性), 早期凋亡细胞位于右下 (LR) 区域 (Annexin-V-FITC 阳性), 表现出细胞和核膜损伤的晚期凋亡细胞位于右上 (UR) 区域 (双阳性), 坏死细胞位于左上 (UL) 区域 (PI 阳性)。如图 5 所示, 与对照相比 (0 $\mu\text{g/mL}$), 辣木生物碱 (40~160 $\mu\text{g/mL}$) 显著增加 *Hela* 细胞凋亡百分比, 细胞凋亡百分比分别是 13.3% ($p<0.01$)、19.9% ($p<0.001$)、42.1% ($p<0.001$), 随着剂量的增加, 细胞的凋亡率逐渐上升。结果表明辣木生物碱具有诱导 *Hela* 细胞凋亡的作用。

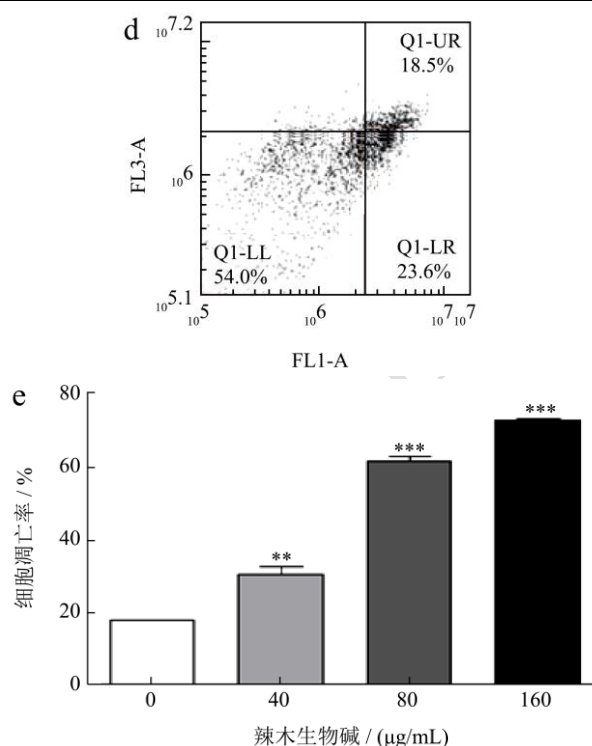
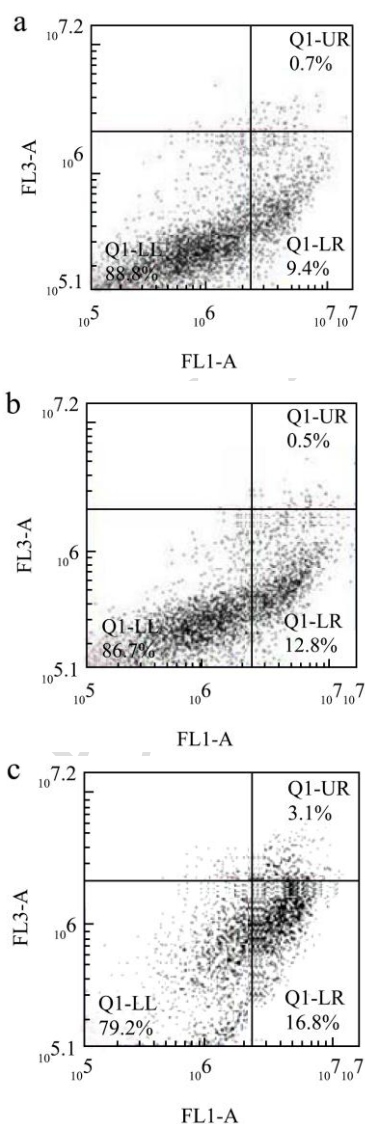


图 5 辣木生物碱显著诱导 *Hela* 细胞凋亡

Fig.5 *M. oleifera* alkaloids significantly induces *Hela* cells apoptosis

注: a: 对照组 (0 $\mu\text{g/mL}$); b: 实验组 (40 $\mu\text{g/mL}$); c: 实验组 (80 $\mu\text{g/mL}$); d: 实验组 (160 $\mu\text{g/mL}$); e: 细胞凋亡率 ($p<0.01$, $p<0.001$)。

2.5 辣木生物碱对凋亡蛋白表达的影响

抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax, 两个蛋白水平表达的高低与凋亡调控直接相关。有研究表明, Bax/Bcl-2 的比值增加有利于肿瘤细胞凋亡和增强抗肿瘤药物的敏感性^[11]。线粒体在细胞凋亡的调节中起了重要的作用。细胞色素 C 从线粒体释放是细胞凋亡的关键步骤。上调的 Bax 和下调的 Bcl-2 会调节细胞色素 C, 从而激活参与细胞凋亡的 Caspase-9, 并进一步激活 Caspase-9 的下游蛋白, 导致细胞凋亡的发生^[12,13]。为了证明辣木生物碱可以抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 用 western blot 来检测和细胞凋亡相关的蛋白。用不同剂量辣木生物碱 (0、40、80、160 $\mu\text{g/mL}$) 处理 *Hela* 细胞 48 h 后, 用 Image J 和 Graphpad Prism 5 进行分析, 发现与对照组相比, 辣木生物碱 (80 和 160 $\mu\text{g/mL}$) 显著增加 Bax/Bcl-2 比率和 Caspase-9 蛋白表达水平, 且 Bax/Bcl-2 比率在 160 $\mu\text{g/mL}$ 时有显著性差异 ($p<0.001$)。结果表明, 辣木生物碱通过增加凋亡蛋白表达进而促进细胞凋亡 (结果见图 6 当中所示)。

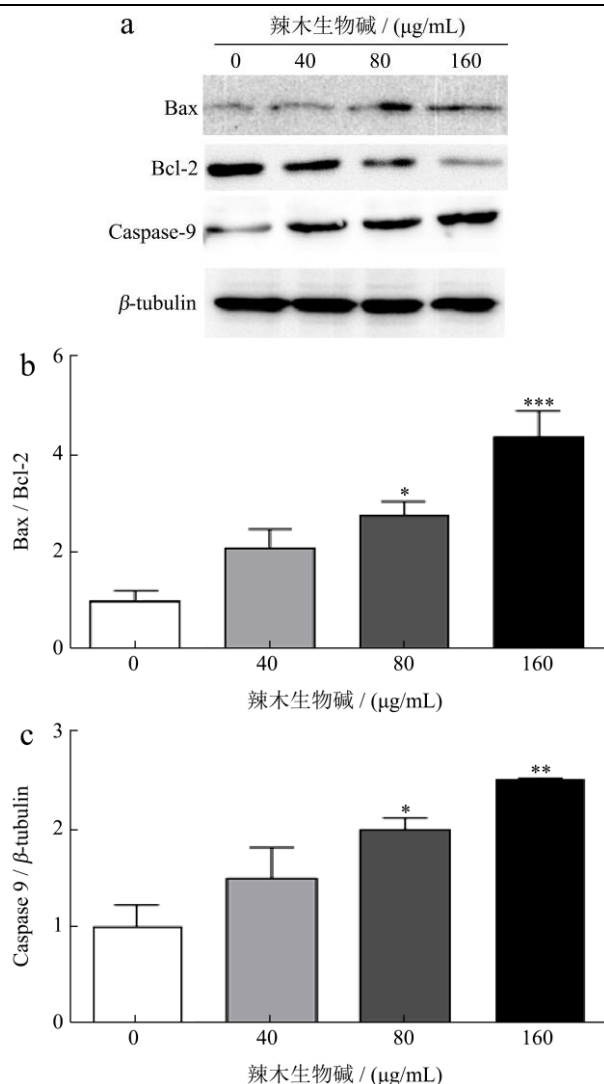


图6 辣木生物碱对凋亡蛋白表达的影响

Fig.6 Effects of *M. oleifera* alkaloids on the expression of apoptotic proteins

注: a: western blot 检测 Bax, Bcl-2, Caspase9 蛋白表达情况; b: Bax, Bcl-2 的比值 ($p < 0.05$, $p < 0.001$); c: Caspase9 蛋白的相对表达量 ($p < 0.05$, $p < 0.01$)。

2.6 辣木生物碱处理对 Stat3、P-Stat3、CyclinD1 蛋白水平表达的影响

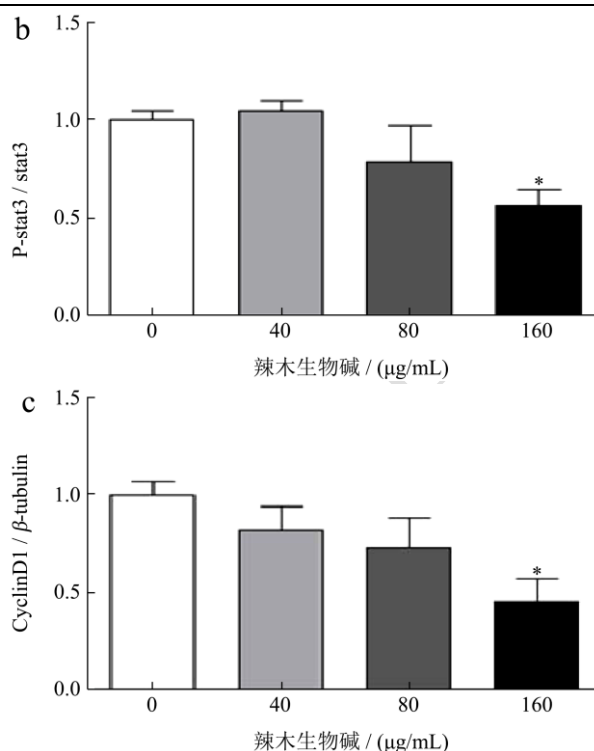
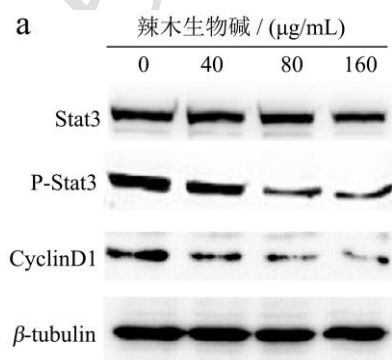


图7 辣木生物碱对 Stat3, P-Stat3, CyclinD1 表达的影响

Fig.7 Effects of *M. oleifera* alkaloids on the expression of Stat3, P-Stat3, CyclinD1

注: a: western blot 检测 Stat3, P-Stat3, CyclinD1 蛋白的表达情况; b: P-Stat3 蛋白的相对表达量 ($p < 0.05$); c: CyclinD1 蛋白的相对表达量 ($p < 0.05$)。

先前的研究结果已经表明,辣木生物碱会诱导 HeLa 细胞凋亡。为了研究其机制通过 Western blot 检测和宫颈癌发生相关的信号通路,并发现辣木生物碱处理 HeLa 细胞后, P-Stat3 表达水平发生显著变化。Stat3 是 Stat 家族的主要成员。大量研究表明 Stat3 在多种人类肿瘤中组成型活化,包括血液系统恶性肿瘤(白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤)以及多种实体瘤(如头颈部、乳腺癌、肺癌、胃癌、肝细胞癌、结肠直肠癌和前列腺癌)。有证据表明, Stat3 信号通过抑制细胞凋亡或诱导细胞增殖,血管生成,侵袭和转移来促进人类癌症的发生和发展^[14]。CyclinD1 是 Stat3 信号传导途径中的重要调节基因。CyclinD1 在细胞周期的早期阶段,在限制点之前表达,超过该阶段,细胞进入 S 期。CyclinD1 是癌症中最常报道的过度表达的细胞周期蛋白,其过表达会加速细胞周期,导致持续的异常增殖^[15]。Stat3 和 CyclinD1 在许多癌症中高表达^[16,17]。有研究发现在 HeLa 细胞增殖过程中 CyclinD1 蛋白表达升高,用 AG490 阻断 Stat3 信号通路后, P-Stat3 及 CyclinD1 蛋白表达下降。其可能机制是 P-Stat3 与 CyclinD1 的基因位点结合,启动转录,促进 HeLa 细胞的增殖而引起宫颈癌的发生,阻断其上

游信号传导后, 基因转录受抑制, 细胞增殖水平下降^[18]。在本研究中, 与对照组相比, 辣木生物碱 (80 $\mu\text{g/mL}$) 可降低 Stat3 蛋白磷酸化和 CyclinD1 蛋白表达, 但无统计学差异。160 $\mu\text{g/mL}$ 辣木生物碱干预组 Stat3 蛋白磷酸化和 CyclinD1 蛋白表达水平显著降低, 与对照组相比具有统计学差异 ($p < 0.05$)。结果表明, 辣木生物碱具有抑制 Stat3 通路活化的作用。

3 结论

本实验通过采用 MTT 法、克隆形成法、流式细胞术和 Western blot 法检测经不同浓度辣木生物碱处理 48 h 后的 HeLa 细胞增殖、凋亡情况和蛋白表达水平。结果表明, 辣木生物碱具有抑制 HeLa 细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用, 其机制可能与抑制 Stat3 信号通路活化相关。本课题旨在研究辣木生物碱对前列腺癌的抑制作用, 并试图阐明其可能的分子机制, 从而为寻找治疗前列腺癌的有效分子作用靶点提供理论基础和实验依据。辣木本身具有多种药理作用, 目前市场上已经有很多辣木的保健品和护肤品等, 本课题也为辣木产业前景发展及前列腺癌的治疗提供参考价值。

参考文献

- [1] Lynette Denny. Cervical cancer prevention: New opportunities for primary and secondary prevention in the 21st century [J]. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2012, 119(1): S80-S84
- [2] Shuang G, Jiaming S, Linlin T, et al. Research progress of the anti-tumor effect of alkaloids of natural medicine [J]. Jilin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2014(9): 927-930
- [3] Jafarain A, Asghari G, Ghassami E. Evaluation of cytotoxicity of *Moringa oleifera* Lam. callus and leaf extracts on HeLa cells [J]. Advanced Biomedical Research, 2014(3): 194
- [4] Xie Zhoufan, Wei Yulu, Xu Jie, et al. Alkaloids from *Piper nigrum* synergistically enhanced the effect of paclitaxel against paclitaxel-resistant cervical cancer cells through the downregulation of Mcl-1 [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67: 5159-5168
- [5] Sreelatha S, Jeyachitra A, Padma P R. Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49: 1270-1275
- [6] Al-Asmari A K, Albalawi S M, Athar M T, et al. *Moringa oleifera* as an anti-cancer agent against breast and colorectal cancer cell lines [J]. PLoS ONE, 2015, 10: e0135814
- [7] Zhao M, Wei W, Liu J, et al. Impact of MTT based tumor chemosensitivity assay *in vitro* [J]. The Chinese-German Journal of Clinical Oncology, 2009, 8(9): 546-548
- [8] Lou Lin, Chen Guo, Zhong Bing, 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)
- [9] Jung Young Yun, Shanmugam Muthu K, Chinnathambi Arunachalam, et al. Fangchinoline, a bisbenzylisoquinoline alkaloid can modulate cytokine-impelled apoptosis via the dual regulation of NF- κ B and AP-1 pathways [J]. Molecules, 2019, 24(17):3127
- [10] Xie Jing, Yu Haishuang, Song Shuang, et al. Pu-erh tea water extract mediates cell cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 190
- [11] 徐加英. 血根碱抗宫颈癌作用及其机制的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2013
XU Jia-ying. Study on anti-cervical cancer effect and mechanism of sanguinarine [D]. Suzhou: Suzhou University, 2013
- [12] Schon E A, Manfredi G. Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction [J]. Journal of Clinical Investigation, 2003
- [13] Voutsadakis, Ioannis A. Apoptosis and the pathogenesis of lymphoma [J]. Acta Oncologica, 2000, 39(2): 151-156
- [14] Siveen Kodappully Sivaraman, Sikka Sakshi, Surana Rohit, et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1845: 136-54
- [15] Yu Xiuyan, Zhang Qun, Zhang Xuehui, et al. Exosomes from macrophages exposed to apoptotic breast cancer cells promote breast cancer proliferation and metastasis [J]. J Cancer, 2019, 10: 2892-2906
- [16] Liu B, Ren Z, Shi Y, et al. Activation of signal transducers and activators of transcription 3 and overexpression of its target gene cyclin D1 in laryngeal carcinomas [J]. 2008, 118(11): 1976-1980
- [17] Yan Shuang, Li Zhijie, Thiele Carol J. Inhibition of STAT3 with orally active JAK inhibitor, AZD1480, decreases tumor growth in neuroblastoma and pediatric sarcomas *in vitro* and *in vivo* [J]. Oncotarget, 2013, 4: 433-445

(下转第 62 页)