

红景天苷及其苷元酪醇对三阴性乳腺癌细胞的抑制作用

王媛媛¹, 郑必胜^{1*}, 徐秋雄¹, 刘瑞海²

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 康奈尔大学食品科学系, 纽约伊萨卡 14853-7201)

摘要: 乳腺癌是当今世界发病率和死亡率极高的癌症之一, 目前, 毒性小、副作用低、多靶点治疗且效果好的天然产物成为乳腺癌药物开发热点。红景天中存在两种具有良好的生物活性单体红景天苷及酪醇, 该研究采用 ORAC 法确定其抗氧化能力, 以三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 为实验模型, 考察其抗增殖效果, 通过细胞划痕实验、流式细胞仪检测细胞凋亡及周期以及 RT-qPCR 进一步探究相关机制。结果表明, 红景天苷及酪醇均能够显著抑制 MDA-MB-231 的增殖, 其 EC₅₀ 值分别为 63.55、127.35 μmol/L; 细胞划痕实验表明它们能显著抑制细胞迁移, 在 36 h 时高浓度组红景天苷和酪醇分别将细胞愈合率从 72.16% 降低至 27.86% 和 32.69%; 细胞周期和凋亡实验表明红景天苷和酪醇将细胞周期绝大部分阻滞在 G2 期并促进细胞凋亡; RT-qPCR 实验发现红景天苷主要通过上调 *p53*、*p21* 基因, 下调 *Bcl-2*、*Bcl-xL*、*CDK6* 基因发挥抗 MDA-MB-231 增殖效果, 酪醇主要通过上调 *p53*、*p21*、*Bax* 基因发挥作用。上述结果为单体红景天苷和酪醇的生物活性研究提供理论支持, 并为将来抗乳腺癌药物的开发提供理论依据。

关键词: 红景天苷; 酪醇; 乳腺癌; 抗增殖活性

文章编号: 1673-9078(2024)06-74-84

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.6.0626

Anti-proliferation Activity of Salidroside and the Aglycone Tyrosol in Triple-negative Breast Cancer Cells

WANG Yuanyuan¹, ZHENG Bisheng^{1*}, XU Qiuxiong¹, LIU Ruihai²

(1. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Department of Food Science, Cornell University, Ithaca NY 14853-7201, USA)

Abstract: The high morbidity and mortality rates that are associated with breast cancer worldwide render the discovery of new drugs critical, and natural products with low toxicity, minimal side effects, multiple targeting, and good efficacy are hot topics in the development of such drugs. Two monomers derived from *Rhodiola rosea* L., salidroside and tyrosol, have shown good bioactivity. Thus, the ORAC method was used to determine the antioxidant capacity of these compounds, with the triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB-231, used as an experimental model to investigate the anti-proliferation effects of the monomers. Cell scratch assay and flow cytometry were performed to detect cell apoptosis and cell cycle stage, and RT-qPCR was employed to further explore related mechanisms. The results showed that salidroside and tyrosol can

引文格式:

王媛媛, 郑必胜, 徐秋雄, 等. 红景天苷及其苷元酪醇对三阴性乳腺癌细胞的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(6): 74-84.

WANG Yuanyuan, ZHENG Bisheng, XU Qiuxiong, et al. Anti-proliferation activity of salidroside and the aglycone tyrosol in triple-negative breast cancer cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(6): 74-84.

收稿日期: 2023-05-26

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (2021A1515012110)

作者简介: 王媛媛 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与健康, E-mail: fewangyuanyuan@mail.scut.edu.cn

通讯作者: 郑必胜 (1966-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 植物活性成分及其功能应用, E-mail: febzhang@scut.edu.cn

significantly inhibit the proliferation of MDA-MB-231, with EC_{50} values of 63.55 and 127.35 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Cell scratch assays showed significantly inhibited cell migration, and after 36 h, salidroside and tyrosol were shown to reduce the cell healing rate from 72.16 % to 27.86 % and 32.69 %, respectively, in the high-concentration groups, while cell cycle and apoptosis assays showed that both salidroside and tyrosol arrest the cell cycle at the G2 phase, promoting apoptosis. RT-qPCR showed that the anti-proliferation effects observed for salidroside are mainly due to up-regulation of the *p53* and *p21* genes and down-regulation of the *Bcl-2*, *Bcl-xL*, and *CDK6* genes, whereas the efficacy of tyrosol is associated with up-regulation of the *p53*, *p21*, and *Bax* genes. These results provide theoretical support for further study into the bioactivity of salidroside and tyrosol and provide a theoretical basis for the development of anti-breast cancer drugs in the future.

Key words: salidroside; tyrosol; breast cancer; anti-proliferation activity

乳腺癌已成为全球最常见的恶性肿瘤之一，也是女性患者致死率最高的癌症^[1]。其中三阴性乳腺癌指雌激素受体阴性、孕激素受体阴性和 HER2neu 阴性，传统的化疗和放疗治疗方法的作用效果较差且副作用明显^[2]。因而，更加安全、经济有效的植物天然活性物质成为抗乳腺癌研究热点。

红景天 (*Rhodiola rosea* L.) 是一种具有极强环境适应能力的多年生景天科草本植物，有着抗抑郁、抗疲劳^[3]、抗癌、保护神经中枢系统^[4]以及心脏等多种生物活性^[5]，其中主要的生物活性标志物红景天苷 (Salidroside, Sal) 及其苷元酪醇 (Tyrosol, Tyr) 几乎存在于所有红景天种类中^[6]，因而对单体化合物红景天苷及酪醇的研究将更有助于针对性认识和开发红景天的健康效用。

红景天苷，2-(4-羟苯基)乙基- β -D-吡喃葡萄糖苷，又名红景天素，是一种酚苷类化合物，分子式为 $C_{14}H_{20}O_7$ ，脱去一分子葡萄糖后即变成酪醇；酪醇，2-(4-羟苯基)乙醇，又名 p-HPEA，分子式为 $C_8H_{10}O_2$ ；图 1 展示了红景天苷和酪醇的化学结构式。目前研究发现，红景天苷具有良好的抗氧化活性及抗癌活性：如红景天苷可减轻 H_2O_2 诱导的视网膜内皮细胞^[7]、HL-7702 细胞^[8]氧化损伤，红景天苷对于膀胱癌系 T24 细胞^[9]、结肠癌 SW1116 细胞^[10]、骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞^[11]、胃癌 AGS 细胞^[12]等均具有良好的抗增殖效果。而酪醇作为一种天然酚类化合物，不仅存在于红景天中，同样也存在于橄榄油中，是一种有效的抗氧化剂^[13]，虽然与槲皮素、姜黄素、小檗碱和儿茶素相比，在清除过氧化氢自由基和羟基自由基能力方面，Tyr 表现出较弱或中等的抗氧化活性^[14]，但在一些细胞模型^[15]和体内氧化应激模型^[16]中，Tyr 对氧化损伤的保护作用较为出色；且在宫颈癌 HeLa 细胞^[17]、胶质母细胞瘤细胞^[18]中发现具有抗肿瘤活性。而对

三阴性乳腺癌细胞的研究中，已有研究表明 Sal 对 MDA-MB-231 细胞的侵袭有抑制作用，Sal 可以降低 STAT3 的 DNA 结合活性，通过基质金属蛋白酶 MMPs 抑制乳腺癌细胞的存活、迁移和侵袭^[19]；与 Sal 不同的是，Tyr 被用作抗肿瘤药物的研究较少，但有趣的是，研究表明^[20]使用橄榄油的国家女性乳腺癌发病率要更低，这可能是由于橄榄油中 Tyr 的大量存在，因此考虑 Tyr 是否也能有抗三阴性乳腺癌细胞增殖的能力；同时据目前文献报道来看，也鲜有研究对比分析红景天苷及其苷元酪醇的体外抗氧化能力对三阴性乳腺癌细胞的影响。因此，本研究采用 ORAC 法评价红景天苷及其苷元酪醇的抗氧化活性，并探究它们对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的抗增殖效果，通过细胞划痕实验阐明其抵抗细胞迁移能力，并且通过流式细胞术和实时荧光定量 PCR 进一步探究其发挥抗增殖作用的相关机理，以期红景天苷和酪醇在膳食预防和治疗癌症方面的应用提供数据基础。

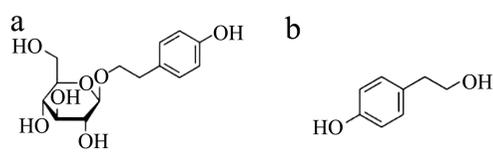


图 1 红景天苷及酪醇的化学结构式

Fig.1 The chemical structures of salidroside and tyrosol

注: (a) Salidroside ; (b) Tyrosol.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

主要实验材料如下：红景天苷 (Sal, $\geq 98.0\%$)、酪醇 (Tyr, $\geq 98.0\%$)、Trolox 标准品，西格玛奥德里奇公司；细胞周期检测试剂盒，碧云天生物技术有限公司；Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡试剂盒，南京建成生物工程研究所；TRIzol RNA 提取试

剂, Thermo Fisher 公司; Evo M-MLV 反转录试剂盒、SYBR Green Premix pro TaqHS qPCR 试剂盒, 艾科瑞生物公司。其余所使用试剂均为分析纯。

主要实验仪器如下: Filter Max F5 型荧光酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; 3111 型细胞 CO₂ 培养箱, 美国 Thermo Fisher 公司; Gallios 型流式细胞仪, 美国 Beckman Coulter 公司; PCR 仪, 美国 BIO-RAD 公司。

1.2 细胞与细胞培养

MDA-MB-231 细胞购于 ATCC 公司, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培养基购于 Corning 公司, 双抗、胰酶购于 Thermo Fisher 公司, 胎牛血清 (FBS) 购自浙江天杭生物科技有限公司。MDA-MB-231 细胞培养在添加 10% (V/V) FBS、1% (V/V) 双抗试剂的 DMEM 中, 培养条件为 37 °C、5% CO₂。

1.3 实验方法

1.3.1 红景天苷及酪醇 ORAC 抗氧化活性分析

使用氧自由基吸收能力 (ORAC) 法测定红景天苷及酪醇的体外抗氧化能力, 参考 Huang 等^[21]发表的方法稍作修改, 具体步骤如下:

用 PBS (75 mmol/L, pH 值 7.4) 配制浓度分别为 6.25、12.5、25、50 μmol/L 的 Trolox 标准溶液, 同样地, 用 PBS 将红景天苷及酪醇稀释到不同梯度的适当浓度。将 20 μL 样品及标准品按照事先孔板设计分别加入 96 孔黑板的不同位置中, 空白孔加入 20 μL 上述 PBS, 37 °C 孵育 10 min 以保持溶液温度一致。接着配制荧光素钠溶液 (0.96 μmol/L), 每孔加入 200 μL, 放入 37 °C 酶标仪中, 避光孵育 20 min。孵育结束后, 迅速向除空白组以外的所有孔加入 20 μL ABAP (119 μmol/L), 空白组孔中加入 20 μL PBS。混合均匀后立即置于荧光酶标仪中进行检测, 检测条件设定为: λ_{ex}=485 nm, λ_{em}=538 nm, 温度 37.0 °C, 每 4.5 min 测定一次, 共计 150 min。绘制 Trolox 标准溶液及样品荧光强度随时间变化曲线, 使用 Sigmaplot 14.0 分析曲线下面积 (AUC), 通过以下公式计算得到净 AUC:

$$S_{\text{净}} = S_{\text{sample}} - S_{\text{blank}} \quad (1)$$

式中:

$S_{\text{净}}$ ——净 AUC, 净曲线下面积;

S_{sample} 、 S_{blank} ——分别为样品和空白的曲线下面积。

通过比较 Trolox 标准品浓度与相应的 AUC 值

标准曲线计算未知样品的 μmol Trolox 当量 (TE), ORAC 值单位表示为 μmol TE/μmol, DW。

1.3.2 细胞毒性测定

样品的细胞毒性测定采用改良后的亚甲基蓝染色法^[22]。经过胰酶消化、平板计数后将其按照每孔 2×10^4 个的密度接种于 96 孔板中。24 h 后, 用 PBS 润洗细胞, 加入 100 μL 用培养基稀释的不同梯度的样品溶液或培养基。继续培养 24 h, 弃孔内液体后 PBS 润洗, 再向每孔加入 50 μL 亚甲基蓝染色液, 将孔板置于 37 °C。1 h 后, 弃染色液, 用清水润洗孔板并拍干剩余水分, 每孔加入 100 μL EB 洗脱液, 震荡均匀以便充分溶解与细胞结合的染料。酶标仪测定 595 nm 处的吸光值, 计算细胞存活率, 公式如下:

$$B = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

B ——细胞存活率 (SR), %;

A_0 ——空白组 OD 值;

A_1 ——给药组 OD 值;

A_2 ——对照组 OD 值。

将细胞半数致死时样品的浓度计为 CC_{50} 。

1.3.3 细胞抗增殖活性测定

样品的细胞抗增殖活性测定参考 Xiong 等^[23]发表的方法稍作修改。根据细胞毒性测定结果, 设置样品的合适浓度梯度。细胞接种密度每孔 1.5×10^4 个。培养 4 h 后, 弃培养基, 加入上述配制的样品培养基继续孵育 72 h 后, 取出孔板进行亚甲基蓝染色, 后续操作同 1.3.2。同样测定 595 nm 处吸光值计算细胞存活率, 将细胞半数致死时样品的浓度计为 EC_{50} 。

1.3.4 细胞划痕实验

细胞划痕实验的浓度设置根据 EC_{50} 选择样品合适的低、中、高浓度组。细胞接种于 6 孔板中, 密度为每孔 1×10^7 个, 待细胞生长至 90% 及以上, 用记号笔在孔板底部划出横向定位线, 再用无菌枪头在孔板内划一道垂直竖线, 划下的细胞碎片加入 PBS 缓冲液轻轻润洗吸净。空白组加入无血清 DMEM 培养基, 实验组加入含有不同浓度红景天苷 (30、60、120 μmol/L) 或酪醇 (40、120、240 μmol/L) 的无血清 DMEM 培养基。在 0、12、24、36 h 时, 用倒置显微镜 (100×) 观察拍照细胞愈合情况。用

ImageJ 处理图片得到划痕面积, 计算划痕愈合率, 公式如下:

$$C = \frac{S_0 - S_1}{S_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

C ——划痕愈合率 (HR), %;

S_0 ——0 h 划痕面积;

S_1 ——12、24、36 h 划痕面积。

1.3.5 细胞周期分析

按照碧云天细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒指示, 进行细胞周期分析操作。具体步骤如下: 细胞接种密度每孔 2×10^4 个。培养 24 h, 分别加入含有不同浓度红景天苷和酪醇的培养基, 浓度设置同 1.3.4, 接着培养 24 h。孵育结束后, 弃培养基, 用无 EDTA、无酚红的胰酶消化细胞 1.5 min, 培养基中和胰酶后, 收集细胞沉淀。随后进行细胞固定: 边吹打边缓慢加入 70% (V/V) 冰乙醇, 4 °C 过夜后离心去上清。为更彻底除去固定剂, 加入冰 PBS 润洗细胞, 尽量避免细胞损失。将制备好的碘化丙啶 (PI) 染液加入离心管中, 用枪头轻轻吹打重悬细胞, 避免吹打过猛导致细胞破裂。37 °C 避光温浴 30 min。孵育结束, 流式细胞仪检测后, 用 ModFit LT 5.0 软件对数据进行分析。

1.3.6 细胞凋亡分析

根据南京建成 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒指示, 进行细胞凋亡分析操作。具体步骤如下: 细胞铺板、加样以及样品浓度设置同 1.3.5。收集各组细胞, 离心去上清。按要求加入结合液、Annexin V-FITC 和 PI 染液, 混匀后室温避光孵育 10 min, 流式细胞仪检测。

1.3.7 细胞抗增殖相关基因表达分析

样品的抗增殖基因表达分析采用实时定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 分析。细胞铺板密度设置每孔 1.5×10^4 个, 铺板、加样操作以及样品浓度设置同 1.3.5。孵育结束后, 加入预冷 PBS, 用刮刀刮下细胞并收集至离心管中。

1.3.7.1 细胞总 RNA 提取

细胞总 RNA 的提取采用 TRIzol RNA 提取试剂, 参考 Joy 等^[24]发表的方法稍作修改。全程操作过程注意使用异丙醇擦拭实验台面及移液枪, 并使用无 RNA 酶离心管, 防止 RNA 降解。RNA 为提取得到的白色沉淀, 用适量 DEPC 水溶解。为确保 RNA 的完整性, 测定其纯度和浓度后进行下步实验。

1.3.7.2 反转录合成 cDNA

根据 AG 反转录试剂盒指示, 将细胞总 RNA 逆转录获取 cDNA, 包含基因组 DNA 的去除与逆转录两个步骤。反应条件如下: 42 °C, 2 min; 4 °C, 10 min; 37 °C, 15 min; 85 °C, 5 s; 4 °C, forever。

1.3.7.3 Real-time PCR

以 cDNA 为模板, 参照 SYBR Green 试剂盒指示进行 PCR 实验。引物序列如表 1, 内参基因为 *GADPH*。后续根据实验所测的循环阈值 (Ct 值) 处理得到相对基因表达值, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 (mean \pm SD, $n=3$)。

表 1 基因引物序列

Table 1 Gene primer sequence

基因		基因序列 (5'-3')
<i>GADPH</i>	F	AATCCCATCACCATCTTCCAGG
	R	TGATGACCCTTTGGCTCCC
<i>p53</i>	F	CCACCATCCACTACAACACTACAT
	R	AGGACAGGCACAAACACG
<i>p21</i>	F	GCTTGCCCCGAGTTCTACTACAG
	R	ACCAAATGCGTGTCTCTCA
<i>Bax</i>	F	TCTGACGGCAACTTCAACTG
	R	AGTCTCACCCAACCACCCT
<i>Bcl2</i>	F	GTGGCCTTCTTTGAGTTCCG
	R	TACCCAGCCTCCGTTATCC
<i>Bcl-xl</i>	F	CACTGTGCGTGGAAGCGT
	R	CTCTAGGTGGTCATTGAGGTAAGTG
<i>CDK-6</i>	F	GTGCCCACTGAAACCATAAA
	R	GACCACTGAGGTTAGAGCCAT

1.3.8 数据分析

每个实验均有三组平行重复, 所得结果均以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD, $n=3$) 形式表示。其中 SigmaPlot 14.0 用来计算曲线下面积; CalcuSyn (Biosoft) 用来计算 EC_{50} 与 CC_{50} 数值; 通过 IBM SPSS Statistics 23 中单因素 ANOVA 检验分析组内与组间相关性, 其中有显著差异性用 $P < 0.05$ 来表示; Image J 用来处理划痕图片并计算面积; ModFit LT 5.0 用来分析细胞周期; 图表的绘制采用 GraphPad Prism 9。

2 结果与讨论

2.1 红景天苷和酪醇的体外抗氧化活性分析

ORAC 法 (氧自由基吸收能力) 可以用来评价红景天苷和酪醇体外抗氧化能力。ORAC 法可以模

拟食物和生理系统中抗氧化剂与脂质的反应, 更具生物学相关性, 因此这种体外抗氧化能力可能更能反映体内作用^[25]。

表2中展示了红景天苷和酪醇的ORAC分析测量值。酪醇的ORAC值为 $3.81 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol DW}$, 这与 Marcos 等^[26]所测得的ORAC值有所差距, 可能是由于改进方法中条件不一致。Sal的ORAC值为 $2.80 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol DW}$, 通过独立样本 *t* 检验得出两者具有显著差异性, 即可知 Tyr 的体外氧自由基吸收能力强于 Sal。有文献报道称^[27], Tyr 在体外清除羟自由基能力也要略高于 Sal; 同时, 与其他酚酸如没食子酸、阿魏酸相比, Tyr 的抗氧化活性也略强^[28]。文献报道在 DPPH 自由基清除实验中, 红景天苷的 EC_{50} 为 $81.54 \mu\text{g/mL}$, 在桂花果肉提取物成分中抗氧化能力最强^[29]。由此可见, Sal 和 Tyr 均具有良好的体外抗氧化活性。

表2 红景天苷及酪醇ORAC活性分析

Table 2 The ORAC values of salidroside and tyrosol (mean±SD, n=3)

	ORAC value/($\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol DW}$)
Salidroside	2.80 ± 0.21^b
Tyrosol	3.81 ± 0.34^a

注: 右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

2.2 红景天苷和酪醇对细胞毒性与抗增殖活性的影响

红景天苷与酪醇对 MDA-MB-231 细胞的毒性与抗增殖活性结果如下图2和表3所示。在抗增殖实验中, Sal 和 Tyr 的 EC_{50} (半数有效浓度) 分别为 $63.55 \mu\text{mol/L}$ 和 $127.35 \mu\text{mol/L}$; 在毒性实验中, Sal 和 Tyr 的 CC_{50} (半数有效浓度) 分别为 $764.10 \mu\text{mol/L}$ 和 $7\ 057.63 \mu\text{mol/L}$ 。从图2中可得出 Sal 和 Tyr 对 MDA-MB-231 细胞的毒性与抗增殖效果都呈现出一定的剂量依赖效果, 即随着样品浓度的增加, 样品毒性增加, 样品的抗增殖效果增加。

从 EC_{50} 值的结果上看, Sal 的 EC_{50} 值仅为 Tyr 的二分之一, 表现出更好的抗增殖效果 ($P < 0.05$)。这与上述体外氧自由基吸收能力不相符, 可能是由于体外条件与体内细胞条件的差异所致, 也有可能说明不能简单用体外抗氧化作用来解释其 Sal 和 Tyr 的抗增殖作用, 如 Kaisoon 等^[30]研究得出 *A. leptopus* 提取物表现出最高的氧自由基吸收能力, 但对结肠直肠癌 HT-29 细胞, *T. erecta* 提取物却有着更强的抗增殖活性。不可否认的是, 与一些天然植物

单体相比 (如大豆中所含单体染料木素、甘糖苷和 β -谷甾醇), 它们对 MDA-MB-231 细胞抗增殖 EC_{50} 值分别为 93.75 、 142.67 和 $196.28 \mu\text{mol/L}$ ^[31], 红景天苷和酪醇都具有比较优良的抗乳腺癌细胞增殖效果。

选择指数 SI (CC_{50} 值 / EC_{50} 值) 是综合判断样品毒性和抗增殖有效性的指标, 从数据中可看出, Sal 和 Tyr 的选择指数均远大于 2, 说明这两种样品对人乳腺癌细胞的抗增殖效果并不归因于其毒性作用, 且安全性非常高, 这将有助于未来对于 Sal 和 Tyr 抗乳腺癌药物的开发。

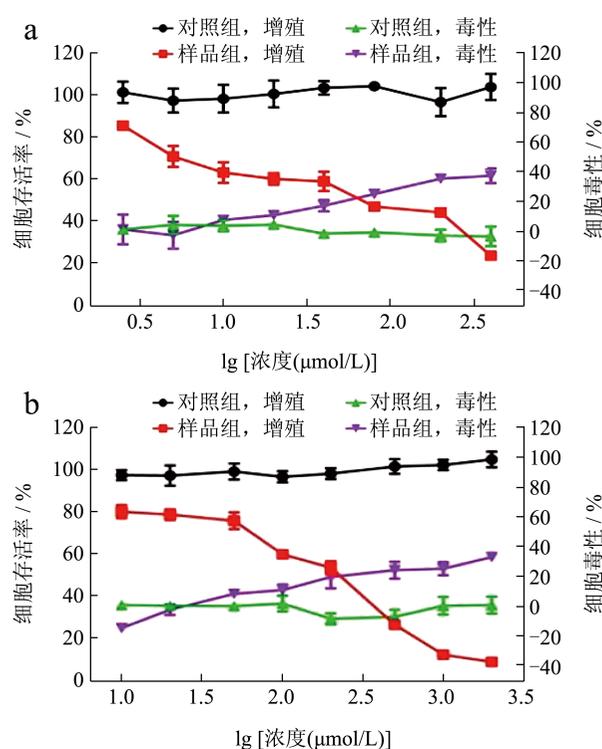


图2 红景天苷及酪醇对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的毒性和抗增殖活性

Fig.2 The cytotoxicity and antiproliferative activity of salidroside and tyrosol on breast cancer cell MDA-MB-231

注: (a) 红景天苷; (b) 酪醇。图中左侧纵坐标表示样品抗细胞增殖活性 (即细胞存活率), 右侧纵坐标表示样品对细胞的毒性大小。

表3 红景天苷及酪醇对MDA-MB-231细胞的 EC_{50} 值、 CC_{50} 值和SI值

Table 3 The EC_{50} , CC_{50} and SI values of salidroside and tyrosol on MDA-MB-231 cells

	$\text{EC}_{50}/(\mu\text{mol/L})$	$\text{CC}_{50}/(\mu\text{mol/L})$	选择指数 SI
Salidroside	63.55 ± 6.88^b	764.10 ± 80.55^b	12.02
Tyrosol	127.35 ± 17.65^a	$7\ 057.63 \pm 800.86^a$	55.42

注: 同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

表 4 不同浓度红景天苷作用12、24、36 h后对MDA-MB-231细胞的愈合率影响

Table 4 Effects of different concentrations of salidroside on the healing rate of MDA-MB-231 cells after treatment for 12, 24 and 36 hours (mean±SD, n=3)

样品	时间	愈合率/%			
		对照组	30 μmol/L	60 μmol/L	120 μmol/L
Salidroside	12 h	31.92 ± 2.90 ^a	7.26 ± 2.32 ^b	6.58 ± 2.22 ^b	4.87 ± 0.99 ^b
	24 h	52.94 ± 7.62 ^a	20.09 ± 2.03 ^b	13.38 ± 1.82 ^b	16.00 ± 2.61 ^b
	36 h	72.16 ± 4.58 ^a	38.17 ± 3.50 ^b	35.00 ± 1.44 ^b	27.86 ± 2.25 ^c

样品	时间	愈合率/%			
		对照组	40 μmol/L	120 μmol/L	240 μmol/L
Tyrosol	12 h	31.92 ± 2.90 ^a	7.12 ± 1.19 ^b	7.89 ± 2.47 ^b	8.05 ± 0.93 ^b
	24 h	52.94 ± 7.62 ^a	23.78 ± 0.98 ^b	16.19 ± 1.22 ^c	16.36 ± 0.77 ^c
	36 h	72.16 ± 4.58 ^a	44.72 ± 3.26 ^b	36.89 ± 3.34 ^c	32.69 ± 3.22 ^c

注: 同行右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

2.3 红景天苷和酪醇抑制细胞迁移

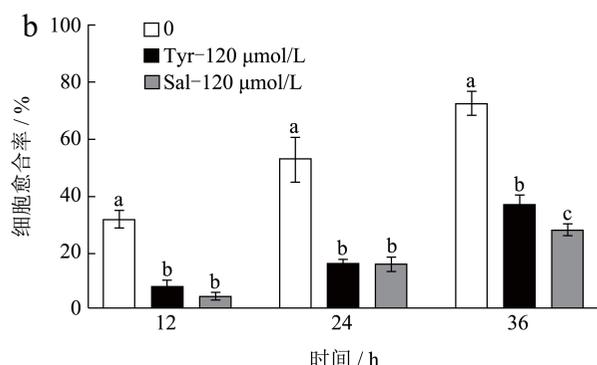
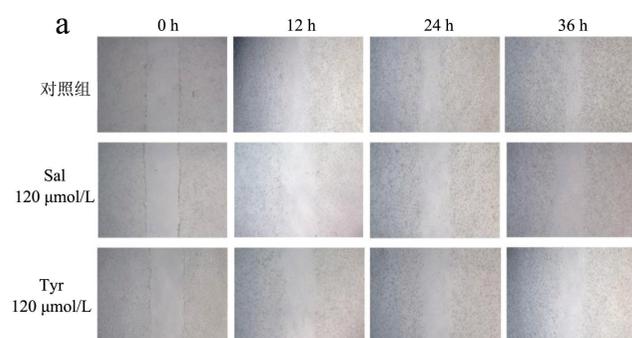


图 3 相同浓度红景天苷及酪醇对细胞划痕 (a) 和愈合率 (b) 的影响

Fig.3 Effect of the same concentration of salidroside and tyrosol on cell scratches (a) and cell healing rate (b)

注: 组内不同的小写字母代表具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

由于癌细胞均具有较强的迁移能力, 从而可以进一步浸染正常细胞形成肿瘤组织。因而本研究通过细胞划痕实验对于红景天苷和酪醇抵抗 MDA-MB-231 细胞的迁移能力进行相关评价。本实验中以 2.2 中抗增殖活性测得的 EC_{50} 作为参考依据, 将用于细胞划痕实验的 Sal 低、中、高浓度组分别设

定为 30、60、120 μmol/L; Tyr 低、中、高浓度组分别设定为 40、120、240 μmol/L。

经过 0、12、24、36 h 的拍照记录, 计算得出空白组与样品组的细胞愈合率如下表 4 所示。从表 4 可知, 细胞的愈合率随着时间延长而增加, 在 12、24、36 h, 样品组的细胞愈合率与对照组相比均有显著降低 ($P < 0.05$)。在 36 h, 空白组愈合率达到了 72.16%, 而 120 μmol/L Sal 实验组和 240 μmol/L Tyr 实验组愈合率仅为 27.86% 和 32.69%, 说明 Sal 和 Tyr 均对细胞迁移有着较强的抑制能力。在之前的研究中同样也证实了 Sal 能剂量依赖性地抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移, 并且表明 Sal 通过抑制 STAT3 磷酸化和 MMP2 表达发挥抑制作用^[19]。

由图 3 可知, 对比相同浓度的 Sal 和 Tyr 实验组, 可以看到在 12 h 和 24 h, 细胞愈合率差异不大; 在 36 h, Sal 实验组的细胞愈合率显著小于 Tyr 实验组, 说明在 24 h 和 36 h 之间, Sal 表现出更好的抑制乳腺癌细胞迁移效果; 总体比较细胞愈合率来说, 这与 Sal 比 Tyr 在相同浓度下的抗增殖效果更强的结果也相符。

2.4 红景天苷和酪醇对细胞周期的影响

阻滞细胞周期是天然产物抗癌活性的重要机制之一, 因此分析 Sal 和 Tyr 对细胞周期的调控情况将有助于了解其发挥抗增殖作用的机制。细胞周期主要分为分裂间期和分裂期 (M 期), 其中分裂间期又分为 G1 期、S 期、G2 期。由于每个时期 DNA 含量不同, 可通过染料与 DNA 的特异性结合可区分不同时期。如 Lee 等^[32]发现木犀草素可将细胞周期阻滞在 G2/M 和 S 期对 MDA-MB-231 细胞发挥抗增殖作用。

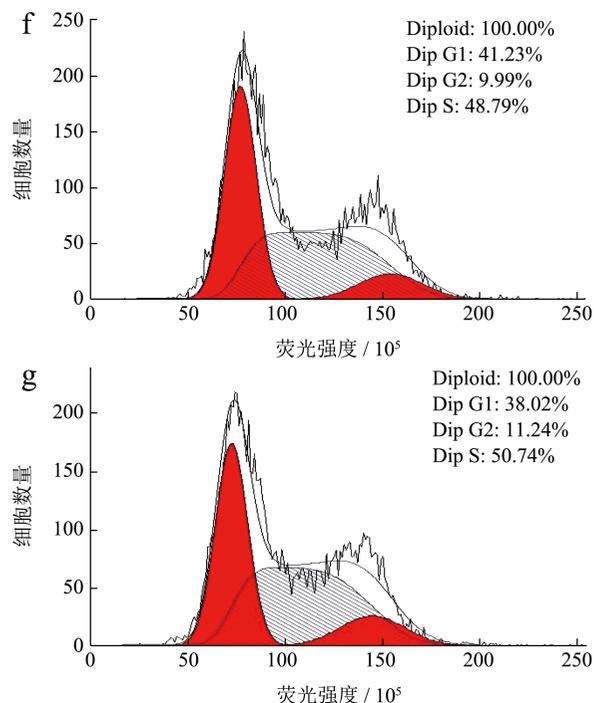
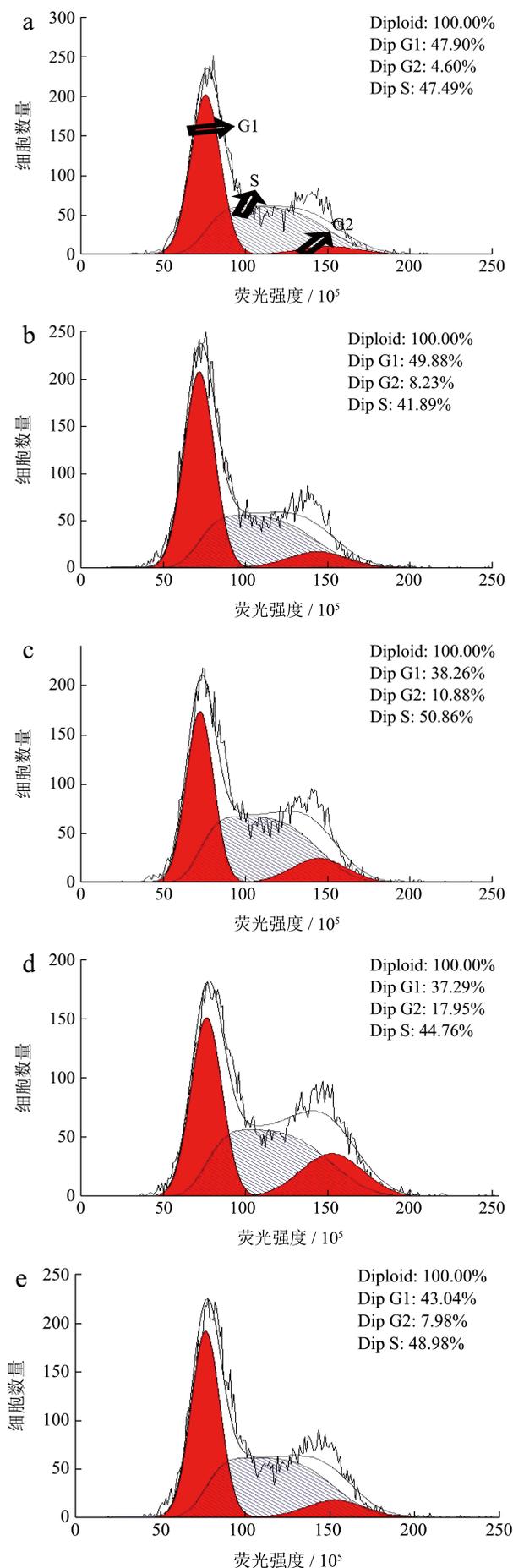


图4 红景天苷及酪醇处理后的细胞直方图

Fig.4 The cell cycle histogram after intervention with salidroside and tyrosol

注: a: 对照组; b: Sal, 30 μmol/L; c: Sal, 60 μmol/L; d: Sal, 120 μmol/L; e: Tyr, 40 μmol/L; f: Tyr, 120 μmol/L; g: Tyr, 240 μmol/L.

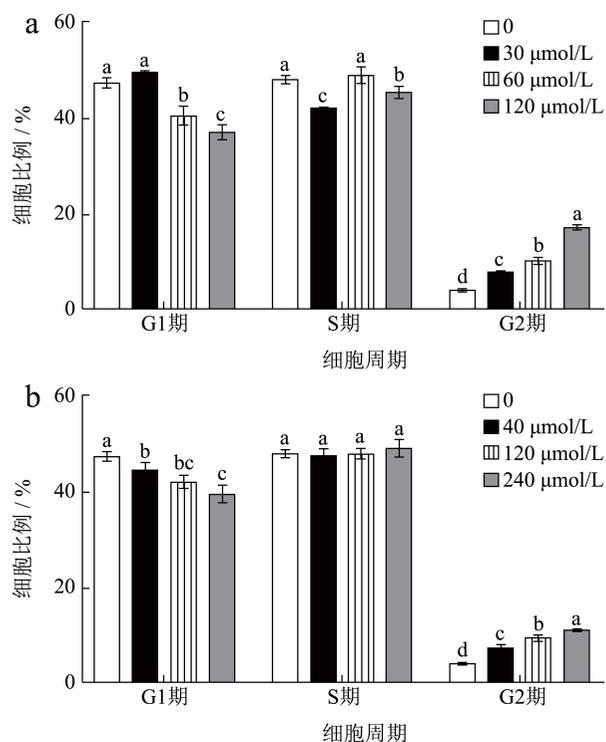


图5 红景天苷及酪醇对MDA-MB-231细胞周期的影响
Fig.5 The effects of salidroside and tyrosol on cell cycle of MDA-MB-231

注: a为Salidroside, b为Tyrosol. 柱上组内不同的小写字母代表具有显著性差异 ($P < 0.05$). 图7、8同。

如图 4 和图 5 所示, control 组有 47.47% 的细胞处于 G1 期, 48.00% 的细胞处于 S 期, 4.53% 的细胞处于 G2 期。对于 24 h 处理后的 Sal 和 Tyr 实验组, G2 期的细胞含量均随着浓度的增加逐渐增加, 表明样品的处理使细胞周期绝大部分阻滞在 G2 期即 DNA 合成后期。其中 Sal 高浓度组将 G2 期细胞含量显著提升至 17.39%, 而 Tyr 高浓度组将其提升至 11.21%, 从效果上看, Sal 展现出比 Tyr 更好的细胞周期阻滞能力 ($P < 0.05$)。

2.5 红景天苷和酪醇对细胞凋亡的影响

细胞凋亡的概念最早由 Kerr 等^[33]提出, 是一种可以被各种生理或病理环境刺激抑制或启动的主动的、内在的程序性现象。细胞凋亡主要分为两个阶段, 包括细胞内部物质凝结并分解成超微碎片以及被摄取细胞的溶酶体降解过程。因此诱导细胞凋亡是控制乳腺癌细胞过度增殖的一个重要策略。通过 Annexin V-FITC/PI 双染细胞, 并通过流式细胞仪检测, 不仅可以直接测得细胞总凋亡率, 还可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开。

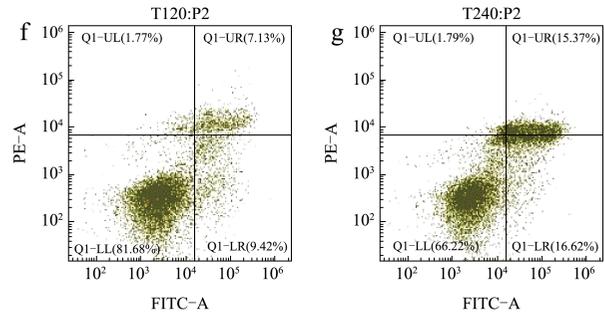
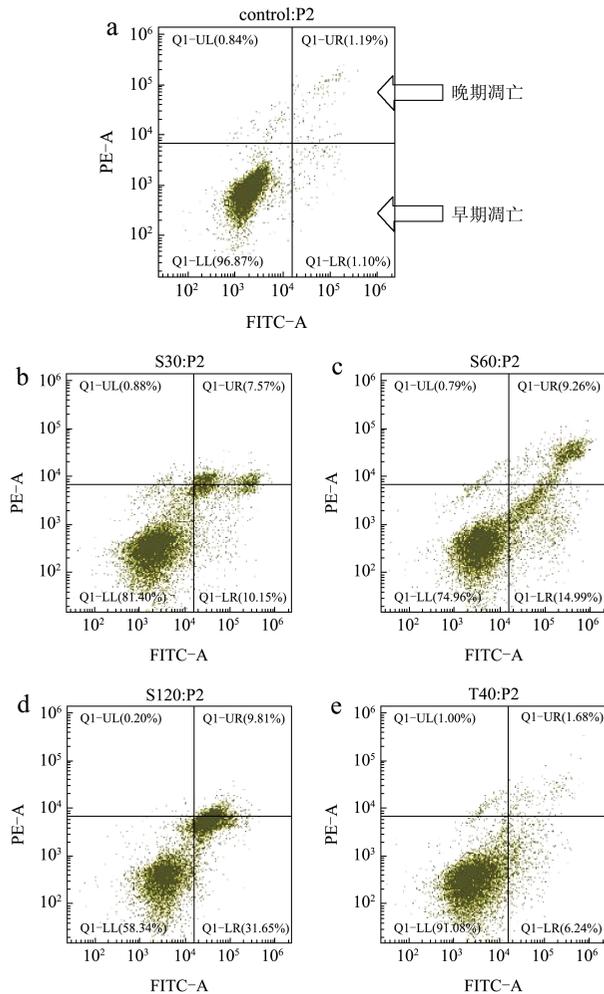


图 6 红景天苷及酪醇处理后的细胞凋亡散点图

Fig.6 The cell apoptosis scatter plot after intervention with salidroside and tyrosol

注: a: 对照组; b: Sal, 30 $\mu\text{mol/L}$; c: Sal, 60 $\mu\text{mol/L}$; d: Sal, 120 $\mu\text{mol/L}$; e: Tyr, 40 $\mu\text{mol/L}$; f: Tyr, 120 $\mu\text{mol/L}$; g: Tyr, 240 $\mu\text{mol/L}$ 。

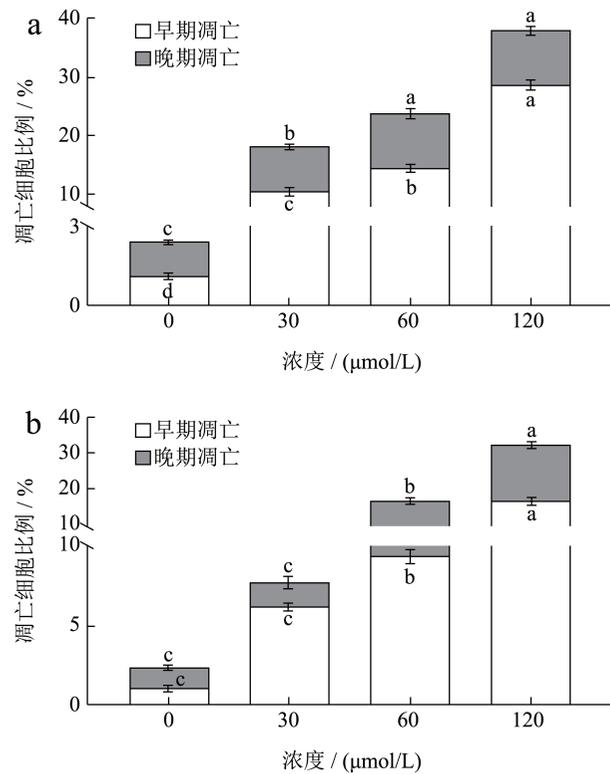


图 7 红景天苷及酪醇对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

Fig.7 The effects of salidroside and tyrosol on the cell apoptosis of MDA-MB-231

如图 6 和图 7 所示, 经过 Sal 和 Tyr 处理后, 细胞总凋亡率均有了剂量依赖性的显著提升: 对照组的总凋亡率为 2.45%, Sal 低、中、高浓度组分别将总凋亡率提升至 18.02%、23.88%、38.03%, Tyr 低、中、高浓度组分别将总凋亡率提升至 7.77%、16.53%、32.11%。同时对比抗增殖试验结果, 可以发现随着样品浓度增加, 细胞凋亡率的上升与抗增殖的效果也吻合, 表明 Sal 和 Tyr 均可通过诱导细胞凋亡抑制 MDA-MB-231 细胞增殖。多数天然产

物单体均可通过诱导细胞凋亡来抑制细胞增殖,如 40 $\mu\text{g/mL}$ 的半边旗提取物 5F 对 MDA-MB-231 的总凋亡率为 40.13%^[34]。此外,对比样品处理组的早期凋亡率与晚期凋亡率:对于 Sal 样品组,其高浓度组将细胞的早调率从 1.21% 提升至 28.75%,晚调率随着样品浓度增加也均有所增加,但增加幅度不如早调率明显,说明 Sal 主要是通过提升细胞的早期凋亡率为总凋亡率上升做出贡献;而对于 Tyr 样品组,其高浓度组将细胞的早期凋亡率从 1.21% 提升至 16.68%,晚期凋亡率从 1.24% 提升至 15.43%,说明 Tyr 可以通过同时诱导早调和晚调对细胞凋亡起作用。

2.6 红景天苷和酪醇对细胞抗增殖相关基因表达的影响

选取调控细胞周期以及凋亡进程中的一些关键基因进行实时荧光 PCR 实验来进一步探究 Sal 和 Tyr 发挥其抗增殖作用的内在机制。细胞凋亡途径包括内源性凋亡途径、外源性凋亡途径以及内质网通路。内源性凋亡途径即线粒体途径,其介导的细胞凋亡的机制与线粒体膜电位 (MMP) 发生变化相关,并促使细胞色素 c (CytoC) 的释放,激活启动器 caspase-9,引起下游胱天蛋白酶的级联反应。

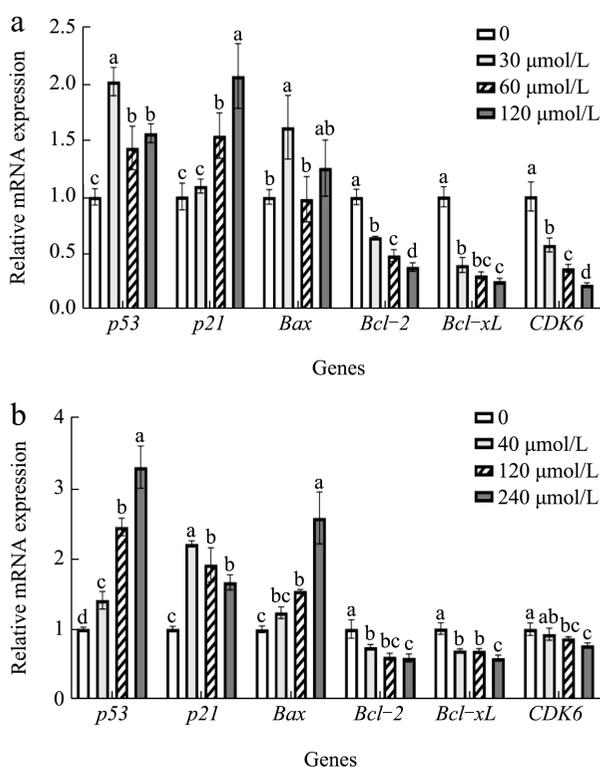


图 8 红景天苷及酪醇对抗增殖相关基因表达的影响

Fig.8 The effects of salidroside and tyrosol on the expression levels of anti-proliferation related genes

由图 8 可知,在 Sal 的作用下,*p53* 和 *p21* 的表达相较于空白组均有所增加,高浓度组的 *p21* 表达水平上调了 2.07 倍 ($P < 0.05$)。P53 是一个核转录因子,分别受 MDM2 和 ATM 的负向和正向调控,也可以调节凋亡相关的基因表达,如 *Bax* 和 *Bcl-xL*。P53 还可以改变 MMP,引发 CytoC 释放,最终通过线粒体途径诱导细胞凋亡。同时,也可以促进 p21-Cip1 表达,抑制下游周期蛋白 CDKs 的活性,引起细胞抗增殖效果^[35]。所以相应的,*p21* 的下游基因 *CDK6* 呈现出显著的剂量依赖性降低,低、中、高浓度组的表达水平只有空白组的 0.58、0.36、0.22 倍 ($P < 0.05$)。另一方面,细胞色素 c 受进化保守的 B 细胞淋巴瘤 -2 (*Bcl-2*) 家族的调节,该家族包括促凋亡和抗凋亡成员^[36]。抗凋亡成员 *Bcl-2*、*Bcl2-like* (*Bcl2L*) 和 *Bcl-2* 相关蛋白长异构体 (*Bcl-xL*) 位于线粒体的外膜,可以阻止 CytoC 的释放。促凋亡成员,如 *Bcl-2* 相关的 X-蛋白 (*Bax*),必须转移到线粒体内才能诱导凋亡。如 Fernando 等^[37]发现 (-)-表儿茶素增加 ROS 产生和上调促凋亡蛋白 (*Bad* 和 *Bax*),激活内源性凋亡途径促使 MDA-MB-231 细胞凋亡。在 Sal 的作用下,促凋亡基因 *Bax* 的表达水平得到提升,而抗凋亡基因 *Bcl-2* 和 *Bcl-xL* 的水平呈现显著的剂量依赖性下降,其中 *Bcl-2* 被下调至对照组的 0.64、0.48、0.38 倍,*Bcl-xL* 被下调至对照组的 0.40、0.30、0.25 倍。

在 Tyr 实验组中,可以很明显地看到 *p53* 的剂量依赖性上调,低、中、高浓度组的表达水平分别提升了 1.41、2.46、3.31 倍 ($P < 0.05$)。*p21* 表达水平也得到一定提升,但浓度间差别不是很大,因而,其下游基因 *CDK6* 的表达水平虽有降低,但幅度不大,高浓度组被下调至对照组的 0.77 倍 ($P < 0.05$)。同时,*Bax* 表达水平有较大提升,高浓度组的表达水平提升了 2.58 倍 ($P < 0.05$);而抗凋亡基因 *Bcl-2* 和 *Bcl-xL* 的表达水平也能看到下降趋势。尽管 Tyr 的 *p53* 基因相较于 Sal 有着更大幅度的上调,但相应下游调控基因如 *CDK6* 等的调控效果并没有 Sal 显著。因而,我们推测这是 Sal 的细胞凋亡诱导效果优于 Tyr 的原因。

综上所述,Sal 和 Tyr 可能通过 *p53* 介导的线粒体途径诱导细胞凋亡。

3 结论

本研究选取了红景天中标志性活性单体物质红

景天苷和酪醇为研究对象,发现 Tyr 的氧自由基吸收能力强于 Sal,而在三阴性乳腺癌细胞抗增殖实验中 Sal 的抗 MDA-MB-231 细胞增殖能力更强,同时 Sal 抑制细胞迁移能力也要显著强于 Tyr;通过进一步研究 Sal 和 Tyr 的抗增殖活性机制发现:Sal 和 Tyr 通过阻滞细胞周期于 G2 期抑制癌细胞生长;且 Sal 更多是通过提升早期凋亡率来促进细胞凋亡,Tyr 则是同时影响早调率和晚调率来促进细胞凋亡;并且两者都可能通过 *p53* 基因介导的线粒体通路诱导细胞凋亡从而控制癌细胞生长,其中 Sal 主要通过上调 *p53*、*p21* 基因,下调 *Bcl-2*、*Bcl-xL*、*CDK6* 基因发挥抗 MDA-MB-231 增殖效果,Tyr 主要通过上调 *p53*、*p21*、*Bax* 基因发挥抗 MDA-MB-231 增殖效果。本研究结果探索了新型的抗肿瘤方法,现有的三阴性乳腺癌治疗方法较为单一,临床疗效也较为局限,因此,通过研究 Sal 和 Tyr 对三阴性乳腺癌细胞的抑制作用,不仅为天然产物单体红景天苷和酪醇的抗乳腺癌活性研究提供了一定的理论基础,也为研制新型高效的天然抗癌药物提供思路和依据。

参考文献

- [1] XIA C F, DONG X S, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants [J]. Chinese Medical Journal, 2022, 135(5): 584-590.
- [2] DENT R, TRUDEAU M, PRITCHARD K I, et al. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence [J]. Clinical Cancer Research, 2007, 13(15): 4429-4434.
- [3] DARBINYAN V, KTEYAN A, PANOSSIAN A, et al. *Rhodiola rosea* in stress induced fatigue-A double blind cross-over study of a standardized extract SHR-5 with a repeated low-dose regimen on the mental performance of healthy physicians during night duty [J]. Phytomedicine, 2000, 7(5): 365-371.
- [4] HSIU-MEI C, HSIN-CHUN C, CHIN-SHENG W, et al. *Rhodiola* plants: Chemistry and biological activity [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2015, 23(3): 359-369.
- [5] QU Z Q, ZHOU Y, ZENG Y S, et al. Protective effects of a *Rhodiola Crenulata* extract and salidroside on hippocampal neurogenesis against streptozotocin-induced neural injury in the rat [J]. Plos One, 2012, 7(1): e29641.
- [6] NABAVI S F, BRAIDY N, ORHAN I E, et al. *Rhodiola rosea* L. and Alzheimer's disease: From farm to pharmacy [J]. Phytotherapy Research, 2016, 30(4): 532-539.
- [7] SHI K, WANG X L, ZHU J, et al. Salidroside protects retinal endothelial cells against hydrogen peroxide-induced injury via modulating oxidative status and apoptosis [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2015, 79(9): 1406-1413.
- [8] GUAN S, WANG W, LU J, et al. Salidroside attenuates hydrogen peroxide-Induced cell damage through a cAMP-dependent pathway [J]. Molecules, 2011, 16(4): 3371-3379.
- [9] LI T, XU K W, LIU Y F. Anticancer effect of salidroside reduces viability through autophagy/PI3K/Akt and MMP-9 signaling pathways in human bladder cancer cells [J]. Oncology Letters, 2018, 16(3): 3162-3168.
- [10] SUN K X, XIA H W, XIA R L. Anticancer effect of salidroside on colon cancer through inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2015, 8(1): 615-621.
- [11] HUANG L T, HUANG Z X, LIN W J, et al. Salidroside suppresses the growth and invasion of human osteosarcoma cell lines MG63 and U2OS in vitro by inhibiting the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. International Journal of Oncology, 2019, 54(6): 1969-1980.
- [12] RONG L, LI Z D, LENG X, et al. Salidroside induces apoptosis and protective autophagy in human gastric cancer AGS cells through the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 122: 109726.
- [13] OWEN R W, MIER W, GIACOSA A, et al. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene [J]. Food and Chemical Toxicology, 2000, 38(8): 647-659.
- [14] FUSI J, BIANCHI S, DANIELE S, et al. An *in vitro* comparative study of the antioxidant activity and SIRT1 modulation of natural compounds [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 101: 805-819.
- [15] LEE K M, HUR J, LEE Y, et al. Protective effects of tyrosol against oxidative damage in L6 muscle cells [J]. Food Science and Technology Research, 2018, 24(5): 943-947.
- [16] ATOCHIN D N, CHEMYSHEVA G A, SMOLYAKOVA V I, et al. Neuroprotective effects of p-tyrosol after the global cerebral ischemia in rats [J]. Phytomedicine, 2016, 23(7): 784-792.
- [17] CELANO M, MAGGISANO V, LEPORE S M, et al. Secoiridoids of olive and derivatives as potential adjuvant drugs in cancer: A critical analysis of experimental studies [J]. Pharmacological Research, 2019, 142: 77-86.
- [18] EMMA M R, AUGELLO G, DI S V, et al. Potential uses of olive oil secoiridoids for the prevention and treatment

- of cancer: A narrative review of preclinical studies [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(3): 1234.
- [19] KANG D Y, SP N, KIM D H, et al. Salidroside inhibits migration, invasion and angiogenesis of MDA-MB 231 TNBC cells by regulating EGFR/Jak2/STAT3 signaling via MMP2 [J]. *International Journal of Oncology*, 2018, 53(2): 877-885.
- [20] SEALY N, HANKINSON S E, HOUGHTON S C. Olive oil and risk of breast cancer: a systematic review and dose-response meta-analysis of observational studies [J]. *British Journal of Nutrition*, 2021, 125(10): 1148-1156.
- [21] HUANG D J, OU B X, HAMPSCH-WOODILL M, et al. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(16): 4437-4444.
- [22] FELICE D L, SUN J, LIU R H. A modified methylene blue assay for accurate cell counting [J]. *Journal of Functional Foods*, 2009, 1(1): 109-118.
- [23] XIONG L, DENG N, ZHENG B S, et al. Goji berry (*Lycium* spp.) extracts exhibit antiproliferative activity via modulating cell cycle arrest, cell apoptosis, and the p53 signaling pathway [J]. *Food & Function*, 2021, 12(14): 6513-6525.
- [24] JOY A P, AYRE D C, CHUTE I C, et al. Proteome profiling of extracellular vesicles captured with the affinity peptide Vn96: comparison of Laemmli and TRIzol (c) protein-extraction methods [J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2018, 7(1): 1438727.
- [25] PRIOR R L, WU X L, SCHAICH K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(10): 4290-4302.
- [26] GARCIA-PADIAL M, MARTINEZ-OHARRIZ M C, NAVARRO-BLASCO I, et al. The role of cyclodextrins in ORAC-fluorescence assays. Antioxidant capacity of tyrosol and caffeic acid with hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(50): 12260-12264.
- [27] 马天翔,史宁,陈乾,等.红景天中8种成分体外抗氧化作用的比较[J].*中国药理学通报*,2012,28(9):1224-1228.
- [28] FERNANDEZ-PACHON M S, VILLANO D, TRONCOSO A M, et al. Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 563(1-2): 101-108.
- [29] WANG H, GAN D, ZHANG X, et al. Antioxidant capacity of the extracts from pulp of *Osmanthus fragrans* and its components [J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2010, 43(2): 319-325.
- [30] KAISOON O, KONCZAK I, SIRIAMORNUN S. Potential health enhancing properties of edible flowers from Thailand [J]. *Food Research International*, 2012, 46(2): 563-571.
- [31] ZHU Y, YAO Y, SHI Z, et al. Synergistic effect of bioactive anticarcinogens from soybean on anti-proliferative activity in MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cells *in vitro* [J]. *Molecules*, 2018, 23(7): 1557.
- [32] LEE E-J, OH S-Y, SUNG M-K. Luteolin exerts anti-tumor activity through the suppression of epidermal growth factor receptor-mediated pathway in MDA-MB-231 ER-negative breast cancer cells [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50(11): 4136-4143.
- [33] KERR J F, WYLLIE A H, CURRIE A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. *British Journal of Cancer*, 1972, 26(4): 239-257.
- [34] WU J, MENG L, LONG M, et al. Inhibition of breast cancer cell growth by the *Pteris semipinnata* extract ent-11 alpha-hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic-acid [J]. *Oncology Letters*, 2017, 14(6): 6809-6814.
- [35] YAMADA K, YOSHIDA K. Mechanical insights into the regulation of programmed cell death by p53 via mitochondria [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2019, 1866(5): 839-848.
- [36] SURAWEEER C D, HINDS M G, KVANSAKUL M. Poxviral strategies to overcome host cell apoptosis [J]. *Pathogens*, 2021, 10(1): 6.
- [37] PEREYRA-VERGARA F, MARIA O-C I, GUADALUPE P-R A, et al. Apoptosis induced by (-)-Epicatechin in human breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species [J]. *Molecules*, 2020, 25(5): 1020.