

木香炔内酯对人乳腺癌SK-BR-3细胞增殖、迁移和凋亡的影响及机制研究[△]

马强^{1,2*},熊书^{1,2},苗加伟¹,陈洁¹,周海英³,罗娇^{1,2},杨贞妮^{1,2},孙厚良¹,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.重庆市抗肿瘤天然药物工程技术研究中心,重庆 404120;3.重庆三峡中心医院肾病学科,重庆 404000)

中图分类号 R737.9;R965.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)11-1342-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.11.10

摘要 目的:研究木香炔内酯对乳腺癌SK-BR-3细胞增殖、迁移和凋亡的影响及机制。方法:取对数生长期的SK-BR-3细胞,分别加入不同浓度(10、20、30、40、50 μmol/L)的木香炔内酯作用24、48、72 h,采用CCK-8法检测细胞的增殖抑制率。将细胞分为空白对照组和木香炔内酯10、20、30 μmol/L浓度组,采用Hoechst 33258荧光染色法观察细胞形态及凋亡情况,并计算细胞凋亡率;采用细胞划痕试验检测细胞的迁移能力,并计算迁移率;采用Western blotting法检测细胞中B淋巴细胞瘤因子2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸蛋白酶3(Caspase-3)和分裂型Caspase-3(Cleaved Caspase-3)蛋白的相对表达水平。结果:木香炔内酯对SK-BR-3细胞具有显著的增殖抑制作用($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且呈现浓度和时间依赖趋势。空白对照组细胞轮廓清晰、形态规则、贴壁较好;与空白对照组比较,木香炔内酯10、20、30 μmol/L浓度组细胞数量明显减少,细胞结构松散、体积缩小、间隙变大,且多数细胞轮廓消失、变圆,贴壁不良;细胞迁移率和Bcl-2蛋白的相对表达水平均显著降低,细胞凋亡率和Bax、Caspase-3及Cleaved Caspase-3蛋白的相对表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:木香炔内酯能抑制人乳腺癌SK-BR-3细胞增殖和迁移,诱导其凋亡,其作用机制可能与上调Bax、Caspase-3和Cleaved Caspase-3表达,下调Bcl-2表达有关。

关键词 木香炔内酯;人乳腺癌SK-BR-3细胞;增殖;迁移;凋亡;机制

Study on the Effects of Costunolide on the Proliferation, Migration and Apoptosis of Human Breast Cancer SK-BR-3 Cells and Its Mechanism

MA Qiang^{1,2}, XIONG Shu^{1,2}, MIAO Jiawei¹, CHEN Jie¹, ZHOU Haiying³, LUO Jiao^{1,2}, YANG Zhenni^{1,2}, SUN Houliang¹, DENG Xuesong^{1,2}(1.Dept. of Basic Medicine, Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China; 2.Chongqing Engineering Research Center of Antitumor Natural Drugs, Chongqing 404120, China; 3.Dept. of Nephrology, Chongqing Three Gorges Center Hospital, Chongqing 404000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of costunolide on the proliferation, migration and apoptosis of breast cancer SK-BR-3 cells and its mechanism. METHODS: SK-BR-3 cells in logarithmic growth period were collected and cultured with different concentrations (10, 20, 30, 40, 50 μmol/L) of costunolide for 24, 48, 72 h. Inhibitory rate of costunolide on cell proliferation was detected with CCK-8. The cells were divided into blank control group and costunolide group (10, 20, 30 μmol/L). Hoechst 33258 fluorescence was used to observe the morphology and apoptosis of cells, and apoptotic rate of cells were calculated. Cell scratch test was used to detect the migration ability of cells and calculate the migration rate. Western blotting was used to detect the relative expression level of Bcl-2, Bax, Caspase-3 and Cleaved Caspase-3 in cells. RESULTS: The proliferation of SK-BR-3 cells were significantly inhibited by costunolide ($P<0.05$ or $P<0.01$), and it shows a trend of concentration and time dependence. In the blank control group, cells possessed clear contour, regular shape and good adherence. Compared with blank control group, the number of cells were decreased significantly in 10, 20, 30 μmol/L costunolide groups, the cell structure was loose, the volume was reduced, and the gap became larger, and most of the cell contour disappeared and became round, the cell adherence was poor; cell migration rate and Bcl-2 protein relative expression level were decreased significantly, while apoptosis rate and the relative expression level of Bax, Caspase-3 and Cleaved Caspase-3 protein were significantly increased ($P<0.05$ or

$P<0.01$). CONCLUSIONS: Costunolide can inhibit the proliferation and migration, and induce apoptosis of human breast cancer SK-BR-3 cells, mechanism of which may be through up-regulating the expression of Bax, Caspase-3 and Cleaved Caspase-3 while down-regulating the expression of Bcl-2.

KEYWORDS Costunolide; Human breast cancer SK-BR-3 cells; Proliferation; Migration; Apoptosis; Mechanism

[△] 基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(No.cstc2018jcyjAX0469);重庆市教育委员会科学技术研究项目(No.KJ1725385, No.KJQN201902701, No.KJQN201802711);重庆三峡医药高等专科学校校级项目(No.2016xzz03)

* 讲师,硕士。研究方向:抗肿瘤活性药物筛选及应用。电话:023-58556816。E-mail:cjmaqiang@163.com

通信作者:副教授,硕士。研究方向:肿瘤发生与防治。电话:023-58556816。E-mail:71425996@qq.com

乳腺癌是女性癌症病死率最高的疾病,我国乳腺癌的发病率在女性恶性肿瘤中位列第1位^[1-2]。引起乳腺癌的危险因素有很多,包括遗传因素、激素水平异常、吸烟史和饮酒史^[3]。乳腺癌的发病机制仍然是未知的,其治疗一般采用化疗、放疗和生物免疫治疗,但目前尚无明确的治疗靶点^[4]。此外,目前使用的治疗方案也存在着许多副作用^[5]。因此,近年来学者们致力于发现具有治疗乳腺癌潜力的新靶点药物。相关研究发现,从中药中分离提取的天然产物可作为抗癌新药的重要来源,目前已有大量植物化学成分被成功地用于治疗各种癌症和其他疾病^[6-7]。

木香烃内酯是从传统中药木香中提取的一种倍半萜内酯,研究发现,其具有抗炎、抗真菌、抗癌等多种生物活性^[8]。另有相关报道证实,木香烃内酯可通过融合基因介导的信号传导和转录激活因子5(Bcr/Abl-Stat5)途径促进伊马替尼诱导的慢性髓性白血病细胞凋亡^[9];其可通过调节核转录因子(NF- κ B)信号通路诱导肝癌 HepG2 细胞的凋亡^[10];此外,其也被证明可以抑制人肺鳞癌 SK-MES-1 细胞的细胞周期进程^[11]。但目前木香烃内酯是否对乳腺癌细胞具有抗癌活性尚不清楚,基于此,笔者采用 CCK-8 法检测木香烃内酯对人乳腺癌 SK-BR-3 细胞增殖的影响,采用细胞划痕试验检测其对该细胞迁移能力的影响,采用 Hoechst 33258 荧光染色法观察其对该细胞凋亡的影响,采用 Western blotting 法检测其对该细胞中 B 淋巴细胞瘤因子 2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)和分裂型 Caspase-3(Cleaved Caspase-3)蛋白表达的影响,以期研究木香烃内酯对 SK-BR-3 细胞增殖、迁移、凋亡的影响及其作用机制,为治疗乳腺癌的新药开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Allegra -64R 型台式高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司); ELx800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 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); JA2003J 型电子分析天平(宁波凯诺仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

木香烃内酯(成都曼思特生物科技有限公司,批号:A0302,纯度: $\geq 99\%$); DMEM 高糖培养基(批号:C11995500BT)、胰酶(批号:25200-056)、胎牛血清(批号:A3160802)、青霉素-链霉素溶液(批号:15140-122)均购自美国 Gibco 公司; CCK-8 试剂盒(美国 APEX BIO 公司,批号:K1018); 二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司,批号:D2650); Hoechst 33258 染色液(批号:C0021)、4% 多聚甲醛(批号:P1110)均购自北京索莱宝科技有限公司; 蛋白酶抑制剂(PMSF,批号:ST506)、磷酸酶抑制

剂(批号:P1051)、RIPA 细胞裂解液(批号:P0013K)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号:P0012)均购自上海碧云天生物技术有限公司; 彩色预染蛋白 Marker(批号:P9001)、ECL 化学发光显色液(批号:P10100)均购自苏州新赛美生物科技有限公司; 兔抗 Caspase-3 一抗(批号:380189)、兔抗 Cleaved Caspase-3 一抗(批号:341052)、兔抗 Bax 一抗(批号:612259)、兔抗 Bcl-2 一抗(批号:310004)及兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(批号:384404)均购自成都正能生物技术有限责任公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)二抗(英国 Abcam 公司,批号:ab6789); 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(编号:20161202-04)购自上海中乔新舟生物技术有限公司,课题组前期对该细胞系抽提的 DNA 进行 STR 位点及性别基因 Amelogenin 检查,结果显示完全匹配,可进行后续研究。

2 方法

2.1 细胞培养

将冻存的 SK-BR-3 细胞接种于含 12% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养基(即完全培养基)中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养(培养条件下同),每 2~3 d 更换培养液 1 次,待细胞长满培养瓶底部 80%~90% 时进行传代,取对数生长期细胞进行相关试验。

2.2 木香烃内酯对 SK-BR-3 细胞增殖的影响考察

取对数生长期的 SK-BR-3 细胞,加入完全培养基制成细胞悬液,按 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μ L。将细胞在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h 后,分为空白对照组(含细胞但不含药物)和木香烃内酯 10、20、30、40、50 μ mol/L 浓度组(浓度设置参考相关文献^[12-14])。空白对照组加入完全培养基 100 μ L,木香烃内酯给药组分别加入终浓度为 10、20、30、40、50 μ mol/L 的木香烃内酯培养液,每孔总体积为 200 μ L,每组设 5 个复孔。药物分别作用 24、48、72 h 后,每孔加 10 μ L CCK-8 溶液,继续孵育 4 h 后,采用酶标仪于 450 nm 波长下测定各孔吸光度(OD)值,计算细胞增殖抑制率[细胞增殖抑制率(%)=(空白对照组 OD 值-试验组 OD 值)/空白对照组 OD 值 $\times 100\%$]。

2.3 木香烃内酯对 SK-BR-3 细胞凋亡的影响考察

取对数生长期的 SK-BR-3 细胞,以 1×10^4 个/孔的密度接种于 12 孔板中,每孔加入 1 mL 完全培养基,于细胞培养箱中培养 24 h 后弃去培养基,将细胞分为空白对照组和木香烃内酯 10、20、30 μ mol/L 浓度组[前期试验发现木香烃内酯高浓度下(40~50 μ mol/L)细胞大量死亡漂浮,贴壁细胞较少,故选择 10、20、30 μ mol/L 进行试验]。空白对照组加入完全培养基 1 mL,试验组分别加

入终浓度为10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 的木香烃内酯培养液,每组设5个复孔,然后培养48 h后,弃去培养基,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下用4%多聚甲醛溶液固定30 min;用PBS洗涤细胞2次,每次3~5 min;加入500 μL Hoechst 33258染色液,室温避光染色10 min,吸除染色液,用PBS洗涤2次,每次3~5 min;然后置于倒置荧光显微镜下观察,每孔随机选择5个视野拍照。镜下可见,凋亡细胞的荧光强度比正常细胞要高,且细胞核会出现致密的浓染或呈碎块状致密浓染。利用图像分析软件Image-Pro Plus 6.0计数凋亡细胞数和细胞总数,并计算细胞凋亡率[细胞凋亡率(%)=凋亡细胞数/细胞总数 \times 100%]。

2.4 木香烃内酯对SK-BR-3细胞迁移的影响考察

取对数生长期的SK-BR-3细胞,以 5×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中,每孔加入2 mL完全培养基,于细胞培养箱中培养至细胞完全铺满,然后用200 μL 移液枪枪头在单层细胞上作“一”字划痕。随后用PBS洗涤2次,对漂浮细胞和损伤细胞进行清洗和去除,之后将细胞分为空白对照组和木香烃内酯10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组。空白对照组加入无血清培养液2 mL,木香烃内酯给药组分别加入终浓度为10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 的木香烃内酯培养液,每组设3个复孔。细胞在培养0、24、48 h后用倒置显微镜观察其愈合情况并拍照。利用Image J V1.8.0软件分析并计算细胞的迁移率[细胞迁移率(%)=(0 h划痕面积-培养后划痕面积)/0 h划痕面积 \times 100%]。

2.5 木香烃内酯对SK-BR-3细胞中Bcl-2、Bax、Caspase-3、Cleaved Caspase-3蛋白表达的影响考察

采用Western blotting法进行检测。取对数生长期的SK-BR-3细胞,以 1×10^7 个/瓶的密度接种于细胞培养瓶中,待细胞贴壁后,将细胞分为空白对照组和木香烃内酯10、20、30、40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组(增加40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组以反映凋亡相关蛋白表达水平的变化趋势)。空白对照组加入3 mL完全培养基,试验组分别加入终浓度为10、20、30、40 $\mu\text{mol/L}$ 的木香烃内酯培养液,每组设3个复瓶,分别培养48 h。收集各组细胞,加入预先配制的RIPA细胞裂解液(内含1%的PMSF及1%磷酸酶抑制剂)100 μL ,于冰上裂解30 min后,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下以13 500 r/min离心10 min,提取总蛋白,用BCA蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。取蛋白变性后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳,然后转膜,以5%脱脂奶粉在4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭12 h;TBST缓冲液清洗,然后加入兔抗Caspase-3、Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3、GAPDH一抗(1:1 000),于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;TBST缓冲液清洗,加入HRP标记的羊抗兔IgG二抗(1:2 000),室温孵育3 h;TBST缓冲液清洗,用ECL显色剂显色,利用化学发光成像系统曝光并拍照。运用Quantity One V4.6.6图像分析软件检测条带的灰度值,以GAPDH为内参,计算各目的蛋白相对表达水平。

2.6 统计学分析

采用GraphPad Prism 6.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 木香烃内酯对SK-BR-3细胞增殖的影响

与空白对照组比较,木香烃内酯作用24、48、72 h时,各药物浓度组细胞的增殖抑制率均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且呈明显的浓度和时间依赖趋势。木香烃内酯在10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下作用48 h后,表现出较为明显的细胞增殖抑制作用,故选择10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 作用48 h进行后续试验。各组细胞增殖抑制率测定结果见表1。

表1 各组细胞增殖抑制率测定结果($\bar{x}\pm s, n=5$)

Tab 1 Inhibitory rate of proliferation of cells in each group($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	细胞增殖抑制率, %		
	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0	0	0
木香烃内酯10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组	10.228 \pm 4.357*	16.219 \pm 3.262*	36.046 \pm 5.605**
木香烃内酯20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组	54.543 \pm 3.190**	65.205 \pm 3.171**	86.416 \pm 4.085**
木香烃内酯30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组	65.146 \pm 3.051**	81.473 \pm 3.725**	88.903 \pm 2.707**
木香烃内酯40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组	71.685 \pm 5.012**	86.975 \pm 1.912**	90.995 \pm 2.677**
木香烃内酯50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组	87.579 \pm 2.487**	92.409 \pm 1.989**	93.650 \pm 2.710**

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 木香烃内酯对SK-BR-3细胞凋亡的影响

空白对照组细胞轮廓清晰、形态规则、细胞质饱满、贴壁较好。与空白对照组比较,木香烃内酯10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组细胞数量明显减少、结构松散、体积缩小、间隙变大,且多数细胞轮廓消失、皱缩变圆,贴壁不良;随木香烃内酯浓度的增加,细胞凋亡率显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组细胞形态学显微图见图1,细胞凋亡率测定结果见图2。

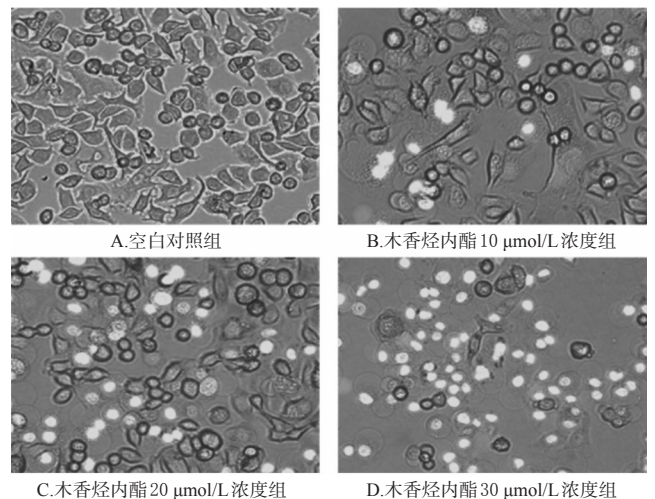
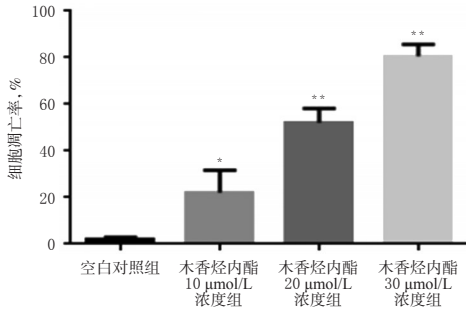


图1 各组细胞形态学显微图(Hoechst 33258染色, $\times 200$)
Fig 1 Morphological micrographs of cells in each group(Hoechst 33258 staining, $\times 200$)



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

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

图2 各组细胞凋亡率测定结果($n=5$)

Fig 2 Apoptotic rate of cells in each group ($n=5$)

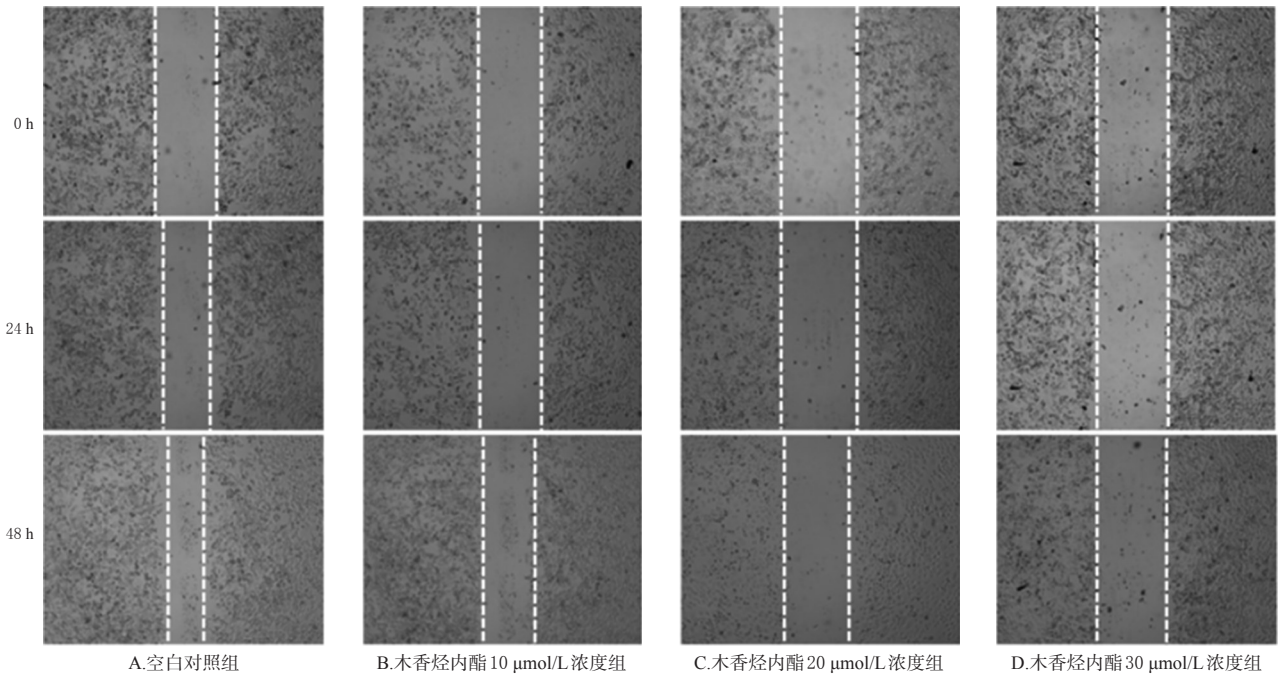
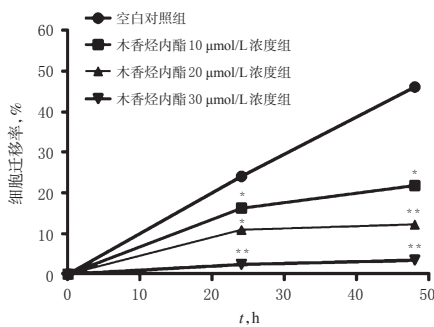


图3 各组细胞迁移情况显微图($\times 200$)

Fig 3 Micrographs of the migration of cells in each group ($\times 200$)



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

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

图4 各组细胞迁移率测定结果($n=3$)

Fig 4 Migration rate of cells in each group ($n=3$)

果见图6。

4 讨论

木香烃内酯是一种含有 α -亚甲基- γ -内酯环结构的

3.3 木香烃内酯对SK-BR-3细胞迁移的影响

与空白对照组比较,木香烃内酯10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组细胞迁移率显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且呈现浓度和时间依赖趋势。各组细胞迁移情况显微图见图3,细胞迁移率测定结果见图4。

3.4 木香烃内酯对SK-BR-3细胞中凋亡相关蛋白表达的影响

与空白对照组比较,木香烃内酯10、20、30、40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组细胞中Caspase-3、Bax及Cleaved Caspase-3蛋白的相对表达水平均显著升高,Bcl-2蛋白的相对表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组细胞中凋亡相关蛋白表达电泳图见图5,蛋白相对表达水平测定结

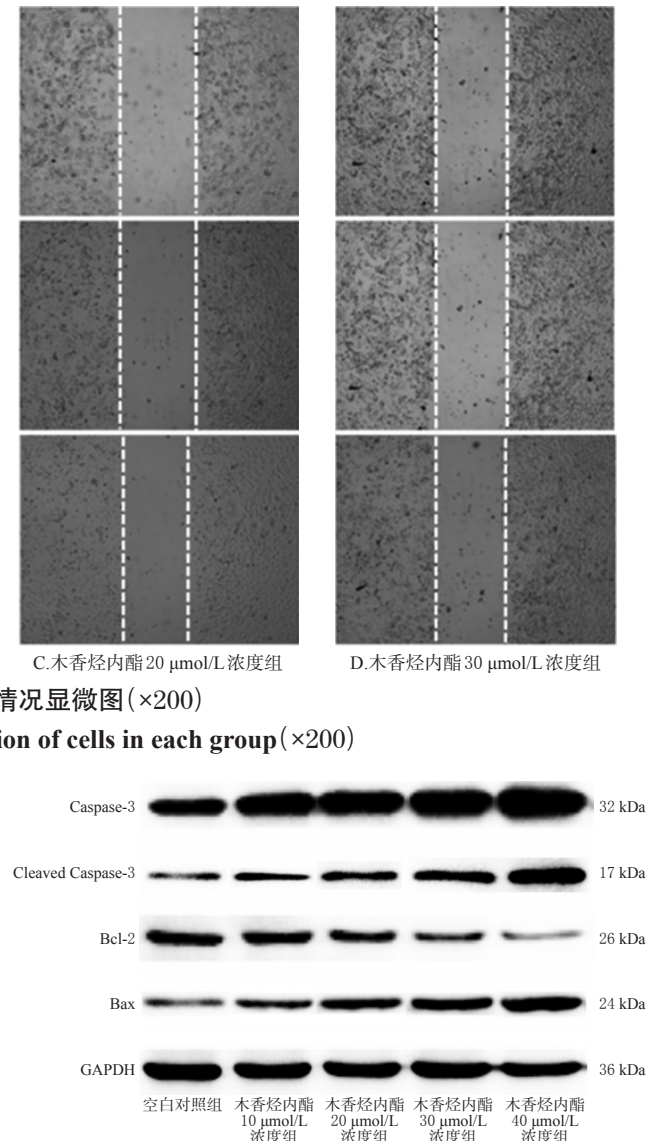
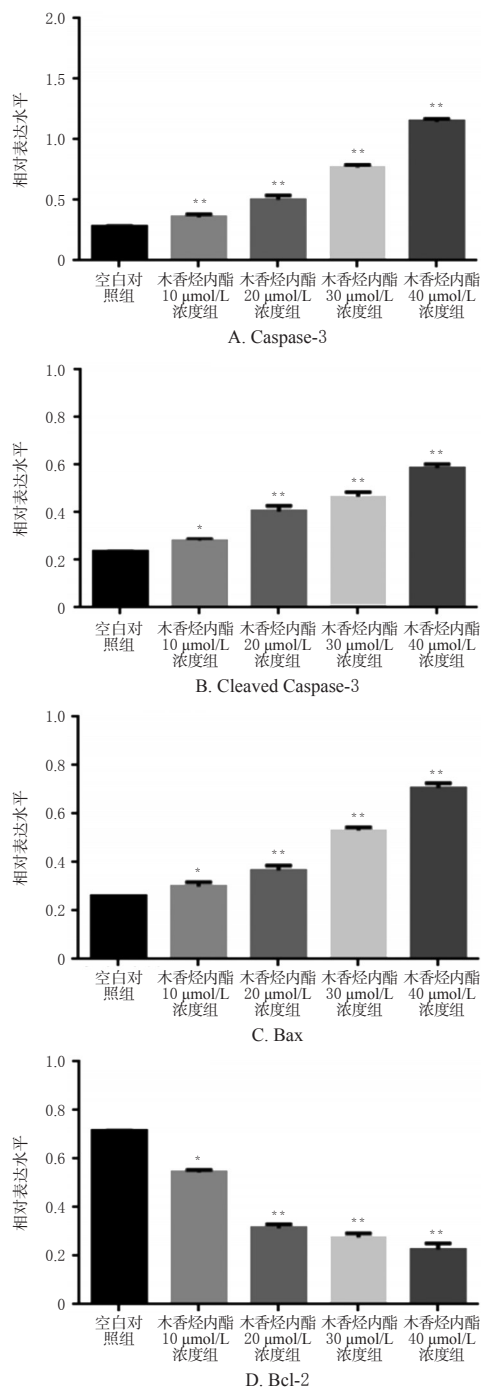


图5 各组细胞中凋亡相关蛋白表达电泳图

Fig 5 Electrophoretogram of the expression of protein related to apoptosis in cells of each group

倍半萜内酯,该结构能与含有巯基的酶及其功能性蛋白酶发生反应,进而干扰细胞的代谢过程,从而发挥多种药理活性^[15-16]。据报道,木香烃内酯在10~50 $\mu\text{mol/L}$ 浓



注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

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

图6 各组细胞中凋亡相关蛋白相对表达水平测定结果 ($n=3$)

Fig 6 Relative expression levels of protein related to apoptosis in cells of each group ($n=3$)

度范围内对多种肿瘤细胞的增殖有较强的抑制作用^[12-14]。因此,在本研究中,选择终浓度为10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$ 的木香桉内酯进行细胞增殖试验,考察其对人乳腺癌SK-BR-3细胞的增殖抑制作用。结果显示,木香桉内酯对SK-BR-3细胞具有明显的增殖抑制作用,且呈浓度和时间依赖趋势。此外,利用细胞划痕试验分析木香桉内

酯对SK-BR-3细胞迁移能力的影响,结果显示,木香桉内酯能有效抑制细胞迁移,并亦呈浓度和时间依赖趋势。

致癌作用在人体内的过程比较复杂,目前认为可能是通过癌基因和转录活性的改变影响细胞增殖和细胞凋亡^[17]。在许多肿瘤疾病中,细胞增殖和细胞凋亡之间的平衡变化发挥着重要的作用^[18]。细胞死亡包括自噬、凋亡和坏死3种类型^[19]。其中,细胞凋亡在生物体的进化、内环境的稳定以及多个系统的发育中起着至关重要的作用,尤其在癌症的发展上^[20-21]。因此,诱导细胞凋亡也成为了许多抗癌治疗的共同目标^[22]。据研究报道,木香桉内酯可诱导多种肿瘤细胞凋亡^[23]。本研究采用Hoechst 33258染色法观察细胞凋亡并计算凋亡率,结果显示,不同浓度木香桉内酯作用后,细胞均出现明显的核固缩及碎裂等凋亡现象,且随着木香桉内酯浓度的增加,细胞的凋亡率显著升高,提示木香桉内酯可诱导SK-BR-3细胞凋亡。

目前,临床上大多数常用抗癌药物的主要抗癌机制为激活凋亡途径以杀死癌细胞^[24]。研究表明,细胞凋亡是通过哺乳动物细胞的内源或外源性凋亡途径发生的^[25],其中,线粒体途径在内源性凋亡过程中起着重要作用,被认为与癌细胞凋亡有关^[26]。其中,线粒体凋亡途径受Bcl-2家族蛋白控制,该家族蛋白包括抗凋亡蛋白Bcl-2和促凋亡蛋白Bax,两者分别具有抑制或促进细胞凋亡的作用^[27];此外,这些蛋白也是线粒体凋亡途径的关键调节因子,通过调节线粒体膜通透性以控制线粒体凋亡^[28]。Caspase家族蛋白在诱导细胞凋亡中也起着关键作用,并参与细胞凋亡的最终途径,其中Caspase-3是细胞凋亡的关键蛋白酶,当其被激活时,可促进Caspase-3的剪切,进而触发下游细胞凋亡的级联反应,诱发细胞凋亡^[29]。因此,本研究检测了木香桉内酯对SK-BR-3细胞凋亡途径关键调控因子Bax、Bcl-2、Caspase-3及Cleaved Caspase-3表达的影响,结果显示,木香桉内酯可上调Bax、Caspase-3和Cleaved Caspase-3的表达,下调Bcl-2的表达。

综上所述,木香桉内酯能抑制SK-BR-3细胞的增殖和迁移,诱导其凋亡,且这种作用随着木香桉内酯浓度的增加而增强;其机制与上调Bax、Caspase-3和Cleaved Caspase-3的表达,下调Bcl-2的表达有关。在后续研究中,可对木香桉内酯的药理作用及分子机制进行深入挖掘,以期为其临床应用提供参考。

参考文献

- [1] GUO R, SI J, XUE JY, et al. Changing patterns and survival improvements of young breast cancer in China and SEER database, 1999-2017[J]. *Chin J Cancer Res*, 2019, 31(4):653-662.
- [2] JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, et al. Global cancer-statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 6(2):169-190.
- [3] ELUMALA P, GUNADHARIN DN, SENTHILKUMAR

- K, et al. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by nimbolide through extrinsic and intrinsic pathway [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 215(2):131-142.
- [4] TAN PQ, ZHONG YM, HU ZY, et al. Size distributions, PAHs and inorganic ions of exhaust particles from a heavy duty diesel engine using B20 biodiesel with different exhaust aftertreatments[J]. *Energy*, 2017.DOI: 10.1016/j.energy.2017.09.122.
- [5] PATEL DK, KUMAR R, LALOO D, et al. Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: an overview of its pharmacological aspects[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2012, 2(3):239-250.
- [6] WU T, GENG J, GUO W, et al. Asiatic acid inhibits lung cancer cell growth in vitro and in vivo by destroying mitochondria[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017(1):73-80.
- [7] LUO W, LIU Y, ZHANG J, et al. Andrographolide inhibits the activation of NF- κ B and MMP-9 activity in H3255 lung cancer cells[J]. *Exp Ther Med*, 2013(6):743-746.
- [8] 石小燕, 刘嵘. 木香炔内酯诱导卵巢癌细胞凋亡机制研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(8):27-30.
- [9] HONG C, HE XL, YANG CH. Costunolide promotes imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells via the Bcr/Abl-Stat5 pathway[J]. *Phytother Res*, 2018, 32(9):1764-1769.
- [10] WANG Y, ZHANG X, ZHAO L, et al. Costunolide protects lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver injury in mice by inhibiting NF- κ B signaling pathway [J]. *J Surg Res*, 2017. DOI:10.1016/j.jss.2017.06.083.
- [11] 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.
- [12] ZHANG C, LU T, WANG GD, 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. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.03.031.
- [13] 王桂明, 史栋栋, 彭章晓, 等. 木香炔内酯诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡作用机制的研究[J]. *分析化学*, 2015, 43(5):61-67.
- [14] WANG Z, ZHAO X, GONG XG. 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.
- [15] SARASWATI S, ALHAIDER AA, ABDELGADIR AM. Costunolide suppresses an inflammatory angiogenic response in a subcutaneous murine sponge model[J]. *APMIS*, 2018, 126(3):257-266.
- [16] ALVES, JOSE CF. A review on the chemistry of eremanthine: a sesquiterpene lactone with relevant biological activity[J]. *J Cheminform*, 2011, 42(36):1-35.
- [17] RAMASAMY K, AGRWAL R. Multitargeted therapy of cancer by silymarin[J]. *Cancer Lett*, 2008, 269(2):352-362.
- [18] 陈莉媚, 金彤, 宁春桃, 等. 加味四君子汤对H22肝癌小鼠的抑瘤作用和免疫功能的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(2):121-128.
- [19] DOLKA I, KROL M, SAPIERZYNSKI R. Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: an immunohistochemical and prognostic study[J]. *Res Vet Sci*, 2016.DOI:10.1016/j.rvsc.2016.02.004.
- [20] ZHOU N, ZHANG Y, ZHANG X, et al. Exposure of tumor-associated macrophages to apoptotic MCF-7 cells promotes breast cancer growth and metastasis[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12):11966-11982.
- [21] MEHDI TA, NECDET S, MUSTAFA T. Anti Wnt-1 monoclonal antibody's conjugated with gold nanoparticles, induced apoptosis on MCF-7 breast cancer cell lines[J]. *J Nano Res*, 2019.DOI: 10.4028/www.scientific.net/JNanoR.58.1.
- [22] FOUZ N, AMID A, HASHIM HY. Gene expression analysis in MCF-7 breast cancer cells treated with recombinant bromelain[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 173(7):1618-1639.
- [23] RASUL A, DI J, MILLIMOUNO FM, et al. Reactive oxygen species mediate isoalantolactone-induced apoptosis in human prostate cancer cells[J]. *Molecules*, 2013.DOI: 10.3390/molecules18089382.
- [24] LAU A, WANG Y, CHIU JF. Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic[J]. *J Cell Biochem*, 2008, 104(2):657-667.
- [25] HENGARTNER MO. The biochemistry of apoptosis[J]. *Nature*, 2000, 407(6805):770-776.
- [26] LANG LH, ZHU S, ZHANG H, et al. A natural phenylpropionate derivative from *Mirabilis himalaica* inhibits cell proliferation and induces apoptosis in HepG2 cells[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(23):5484-5488.
- [27] GROSS A. Bcl-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016. DOI:10.1016/j.bbabi.2016.01.017.
- [28] CAMPBELL KJ, TAIT SWG. Targeting Bcl-2 regulated apoptosis in cancer[J]. *Open Biol*, 2018.DOI: 10.1098/rsob.180002.
- [29] KO HM, JOO SH, JO JH, et al. Liver-wrapping, nitric oxide-releasing nanofiber downregulates cleaved caspase-3 and Bax expression on rat hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. *Transplant Proc*, 2017, 49(5):1170-1174.

(收稿日期:2020-03-14 修回日期:2020-04-05)

(编辑:唐晓莲)