

# 分心木乙醇提取物对人结肠癌HCT116细胞增殖、凋亡和迁移的影响

刘亚娜 王朴 杨映娟\*

(山西大学生命科学学院, 太原 030006)

**摘要** 为研究分心木对人结肠癌细胞HCT116增殖、凋亡和迁移的影响, 该研究以75%乙醇作为溶剂提取分心木中的活性成分, 利用MTT法检测分心木乙醇提取物对HCT116细胞增殖的影响; 流式细胞术、AO/EB双染、TUNEL法和Western blot检测细胞凋亡; 划痕愈合实验检测细胞迁移; 体外建立肿瘤3D细胞模型(3D培养)检测分心木乙醇提取物对HCT116 3D肿瘤细胞球增殖的影响。结果显示, 分心木乙醇提取物以剂量依赖的方式抑制HCT116细胞活性, 促进细胞凋亡, 同时促进凋亡因子Bax的表达, 降低抗凋亡因子Bcl2的表达, 并促进凋亡的关键执行蛋白PARP的裂解; 划痕愈合实验和3D肿瘤细胞培养表明, 分心木乙醇提取物抑制细胞迁移和3D肿瘤细胞的增殖。该研究表明, 分心木乙醇提取物抑制肿瘤细胞的增殖和迁移, 并通过促进cleaved PARP、Bax蛋白表达和抑制Bcl2蛋白的表达诱导肿瘤细胞凋亡。此外, 分心木乙醇提取物抑制肿瘤3D细胞球的增殖, 这提示结肠癌对分心木乙醇提取物的药物敏感性在体内体外没有显著差异。

**关键词** 分心木; HCT116细胞; 增殖; 凋亡; 迁移

## Effects of Ethanol Extract of *Diaphragma Juglandis Fructus* on the Proliferation, Apoptosis and Migration of Colon Cancer HCT116 Cell

LIU Yana, WANG Pu, YANG Yingjuan\*

(School of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract** The present study aims to explore the effects of EEDJF (ethanol extract of *diaphragma juglandis fructus*) on the proliferation, apoptosis and migration of human colon cancer cell HCT116. The bioactive ingredients of *diaphragma juglandis fructus* were extracted with 75% ethanol. MTT assay was applied to determine the effect of EEDJF on HCT116 cell proliferation. AO/EB double staining, TUNEL assay and Western blot were used to detect cell apoptosis. Scratch wound-healing assay was performed to determine the cell migration ability. Establishment of 3D cell culture model of HCT116 cells was applied to evaluate the anti-proliferation effect of EEDJF *in vitro*. The results showed that EEDJF increased the expression of pro-apoptotic factor Bax and the cleavage of PARP, meanwhile, decreased the expression of anti-apoptotic factor Bcl2. Additionally, the results of Scratch wound-healing assay and 3D cell culture showed that EEDJF inhibited the migration of HCT116 cells and the proliferation of 3D-cultured HCT116 cells. Thus, the present study demonstrates that EEDJF inhibits the proliferation and migration of HCT116 cells, and induces the apoptosis of HCT116 cell by up-regulating the expression of cleaved PARP and

收稿日期: 2020-01-17 接受日期: 2020-05-27

山西省自然科学基金(批准号: 201801D221377)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13753181146, E-mail: yjyang911@sxu.edu.cn

Received: January 17, 2020 Accepted: May 27, 2020

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shanxi Province (Grant No.201801D221377)

\*Corresponding author. Tel: +86-13753181146, E-mail: yjyang911@sxu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5284>

Bax, and decreasing Bcl2. Moreover, EEDJF inhibits the proliferation of 3D-cultured HCT116 cells. Therefore, this study suggests that there is no significant difference between *in vitro* and *in vivo* in the sensitivity of HCT116 cells to EEDJF.

**Keywords** *diaphragma juglandis fructus*; HCT116 cells; proliferation; apoptosis; migration

癌症已成为影响全球健康的主要问题之一,是造成全球死亡的第三大病因<sup>[1]</sup>。2018年世界卫生组织统计的数据显示,全年约有960万人死于癌症,其中,结直肠癌(colorectal cancer)的发生率和死亡率在所有癌症中位居第三,2018年有超过180万例大肠癌新病例和88万例死亡病例,占有癌症发生与死亡率总和的十分之一<sup>[2]</sup>。在中国,结直肠癌已成为恶性肿瘤致死的第四大原因,每年约有14万例确诊病例,这给患者、家庭乃至整个国家带来了巨大的身体和经济负担<sup>[3]</sup>。目前结直肠癌的治疗包括手术、化学疗法、放射疗法和靶标疗法<sup>[4]</sup>。其中,化学疗法是治疗结直肠癌的主要方法之一。然而,当下化学疗法存在肿瘤的耐药性、抗药性以及副作用强等问题,开发新的天然抗肿瘤药物已经成为必然趋势<sup>[5]</sup>。

在21世纪初期,已经有23种源自天然产物的新药被引入并用于治疗包括癌症等在内的多种疾病。中国使用天然产物治疗疾病的历史悠久<sup>[6-7]</sup>。索拉菲尼、白介素2和阿霉素等中药提取物早已被作为抗肿瘤药物应用于肿瘤治疗<sup>[8]</sup>。核桃属于胡桃科的落叶乔木,又被称为胡桃。核桃营养价值极高,内含褪黑素、维生素和多酚等营养成分<sup>[9]</sup>。因其易栽培、经济价值高等原因,已成为我国种植历史悠久的经济型树种。分心木是核桃果核内的木质隔膜,呈现浅棕色,质地轻薄。分心木中包含许多生物活性物质,如酚酸、黄酮类、皂甙类和生物碱等,具有抗菌、抗炎、免疫调节和抗肿瘤等生物学功能<sup>[10-12]</sup>。MENG等<sup>[13]</sup>研究发现,分心木中的多糖物质(polysaccharides from *diaphragma juglandis*, DJPs)能以剂量依赖的方式有效抑制HepG2和BGC-82细胞系的增殖,并通过丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)和核转录因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)信号通路激活RAW264.7巨噬细胞,增强细胞自噬作用。令狐晨等<sup>[14]</sup>研究发现,石油醚、氯仿、乙酸乙酯等分心木有机提取物能不同程度地抑制人肝癌细胞BEL-7404、人非小细胞肺癌细胞A549、人结肠癌细胞HCT116与Caco-2的增殖,且醋酸乙酯和正丁醇提取物表现出更强的抗

肿瘤效果。此外,有研究报道分心木的水提物能促进人结肠癌细胞HCT116的凋亡<sup>[15]</sup>。但是,目前关于分心木乙醇提取物对肿瘤细胞凋亡与迁移的影响尚无报道。

因此,本研究拟以人结肠癌细胞HCT116为材料,研究分心木乙醇提取物对肿瘤细胞增殖、凋亡和迁移的影响。通过揭示分心木乙醇提取物对肿瘤细胞的抑制作用,为分心木作为天然抗肿瘤药物来源的开发和利用提供理论基础,奠定理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

人结肠癌HCT116细胞由约翰霍普金斯大学医学院的B.VOGELSTEIN教授提供。高糖DMEM细胞培养基、胎牛血清(货号:11011-8611)购自浙江天杭生物科技有限公司。青/链霉素混合液(货号:S01417)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(货号:D8371)购自北京索莱宝科技有限公司。凋亡检测试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司。吖啶橙(acridine orange, AO)、溴乙锭(ethidium bromide, EB)购自美国Ameresco公司。细胞裂解液(货号:P0013B)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(货号:P1045)、BCA蛋白测定试剂盒(货号:P0010S)、BeyoECL Star发光液(货号:P0018AFT)、TUNEL试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。噻唑蓝(货号M2128-10G)购自Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司。0.45  $\mu$ m PVDF膜购自美国Millipore公司。PARP(货号:9542S)、GAPDH(货号:2118S)抗体购自Cell Signaling Technology公司。B细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl2)(货号:D160116)和Bcl2-associated x的蛋白质(Bcl2-associated x, Bax)(货号:D120073)抗体购自生工生物工程(上海)股份有限公司。羊抗兔IgG-HRP(货号:BA1054)购自武汉博士德生物有限公司。VitroGel™3D即用型3D细胞培养水凝胶购自上海道鹏生物科技有限公司。分心木购自太原药材市场。恒温培养箱购自Eppendorf公司。超净工作台购自上海博讯医疗生物仪器股份有限公司。

## 1.2 药物制备

将分心木充分研磨粉碎,称取适量的粉末置于玻璃瓶中,加入75%乙醇溶液,避光轻轻振荡溶解2天。待其充分溶解后,收集上清液用滤纸过滤后置于真空干燥机中烘干。烘干后称取其重量,加入1 mL的DMSO充分溶解后,于-20 °C保存备用。

## 1.3 细胞培养

将人结肠癌HCT116细胞培养于高糖DMEM培养基,其中添加100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素和10%(V/V)热灭活的胎牛血清,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的加湿培养箱中培养。待细胞生长至70%~90%汇合度时即可进行相关实验。以含有5% DMSO的完全培养基处理细胞作为空白对照。

## 1.4 噻唑蓝MTT检测分心木乙醇提取物对人结肠癌细胞HCT116增殖的影响

将对数生长期的细胞消化重悬,调整细胞密度为 $1 \times 10^5$ 个/mL,接种到96孔板中,每孔加100  $\mu$ L细胞悬液,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的加湿培养箱中过夜培养。将分心木乙醇提取物浓度调整为10、20、40、80、160、320  $\mu$ g/mL,依次添加到细胞中,继续培养24 h和48 h后,加入10  $\mu$ L的MTT(工作浓度为5 mg/mL),培养箱中继续孵育4 h。弃去培养基,添加150  $\mu$ L的DMSO,放在摇床上振荡10 min,用酶标仪测定570 nm波长处的D值。实验设置6个复孔,重复3次。

## 1.5 AO/EB染色检测分心木乙醇提取物对HCT116细胞凋亡的影响

HCT116细胞以 $1 \times 10^5$ 个/mL的密度接种于6孔板中,待细胞生长至50%~60%汇合后,用分心木乙醇提取物(50、100、150  $\mu$ g/mL)处理24 h。用适量PBS轻轻清洗细胞2~3次后,每孔加入1 mL AO/EB染色工作液,室温避光孵育15 min,用PBS清洗后加入2 mL PBS,置于倒置荧光显微镜下观察并拍照。

## 1.6 流式细胞术(Annexin V-FITC/PI)检测细胞凋亡

将HCT116细胞按照 $1 \times 10^6$ 个/mL的密度接种于6孔板中过夜培养。用分心木乙醇提取物(50、100、150  $\mu$ g/mL)处理HCT116细胞24 h后,收集细胞,用PBS清洗后重悬于1 $\times$ 结合缓冲液中。每组细胞中加入5  $\mu$ L Annexin V-FITC和10  $\mu$ L PI在室温下避光孵育30 min,利用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。用荧光显微镜(日本OLYMPUS U-RFLT50)在100 $\times$ 放大倍率下捕捉荧光图像,激发波长为470~490 nm,发射波长为510~550 nm。

## 1.7 TUNEL法检测分心木乙醇提取物对HCT116细胞凋亡的影响

6孔板每孔放置2个载玻片,加入2 mL的细胞悬液,待细胞生长至50%~60%汇合后,用分心木乙醇提取物(50、100、150  $\mu$ g/mL)处理24 h。将6孔板移出无菌室,弃去培养基,用37 °C预热的PBS轻轻洗涤3次。在室温下用4%多聚甲醛固定20 min后,用PBS清洗3次,每次5 min;随后用0.1% PBS稀释的Triton X-100通透20 min,用PBS洗3次,每次1 min;每个载玻片中加入20  $\mu$ L TUNEL反应液,于37 °C染色1 h。用PBS清洗后加DAPI密封,在倒置荧光显微镜下观察染色情况并拍照保存。

## 1.8 蛋白免疫印迹检测细胞中凋亡相关蛋白cleaved PARP、Bcl2和Bax表达量

待分心木乙醇提取物处理HCT116细胞24 h后,收集蛋白。简而言之,用预冷的PBS清洗2次后,加入含有磷酸酶和蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液,于冰上裂解15 min,将全细胞裂解液于4 °C、12 000 r/min离心15 min,收集上清液,并使用BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,并将其转移到PVDF膜上。在室温下用脱脂牛奶封闭1 h后,一抗4 °C孵育过夜。然后用TBST洗脱液清洗5 min,共3次。将膜与二抗在室温下孵育1.5 h。使用ECL发光液检测目的蛋白的表达情况。

## 1.9 细胞划痕实验检测分心木乙醇提取物对HCT116细胞迁移的影响

将HCT116细胞接种至6孔板中,待细胞生长至对数期,弃去培养基,用微量移液器枪头水平划线,加入混含分心木乙醇提取物(6.25、12.5、25、50  $\mu$ g/mL)的培养基,继续培养24 h。于倒置荧光显微镜下观察细胞伤口愈合情况,计算伤口愈合率。

伤口愈合率=1-24 h细胞间距离/0 h细胞间距离

## 1.10 3D细胞培养技术检测分心木乙醇提取物对HCT116 3D肿瘤细胞球增殖的影响

将VitreGel置于室温,并将细胞培养基温热至37 °C。用VitreGel稀释液调整VitreGel的浓度。将稀释的VitreGel与细胞悬液充分混合后转移到96孔板上。轻轻倾斜96孔板,以确保每个孔的底部都有均匀的涂层。在室温下等待10~20 min,形成软凝胶。用完全培养基小心覆盖水凝胶,将96孔板置于培养箱中培养,每48 h更换一次培养基,待细胞球的直径约为500  $\mu$ m时,加入混合分心木乙醇提取物的培养基,继

续培养 24 h 后, 于显微镜下观察细胞球的生长情况, 收集细胞, MTT 法检测分心木乙醇提取物对肿瘤球生长的影响。

### 1.11 统计分析

应用 SPSS 统计软件进行统计学分析, 组间采用 *t* 检验分析数据显著性, 实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 每个独立的实验重复 3 次。  $P < 0.05$  表示具有显著性差异,  $P < 0.01$  表示具有极显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 分心木乙醇提取物对 HCT116 细胞增殖的影响

分别用氯仿、丙酮、正丁醇和 75% 乙醇提取分心木中的活性成分, MTT 法检测分心木不同有机溶剂提取物对 HCT116 细胞活性的影响, 结果如图 1A 所示, 分心木不同有机提取物均可抑制 HCT116 细胞活性, 其中 HCT116 细胞对分心木乙醇提取物最为敏感。为进一步明确分心木乙醇提取物对 HCT116 细胞增殖的影响, 分心木乙醇提取物处理 HCT116 细胞 24 h 和 48 h 后, MTT 检测结果如图 1B 所示, 与空白对照组相比, 分心木乙醇提取物以浓度和时间依赖性方式抑制 HCT116 细胞的活性, 且差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。通过 CompuSyn 软件计算得到, 分心木乙醇提取物处理 HCT116 细胞 24 h 和 48 h 时, 其半抑制浓度  $IC_{50}$  分别为  $(115.74 \pm 8.63) \mu\text{g/mL}$  和  $(60.42 \pm 12.15) \mu\text{g/mL}$ 。

### 2.2 分心木乙醇提取物对 HCT116 细胞凋亡的影响

不同浓度的分心木乙醇提取物处理 HCT116 细胞 24 h 后, 流式细胞术检测细胞凋亡, 如图 2A 所示, 分

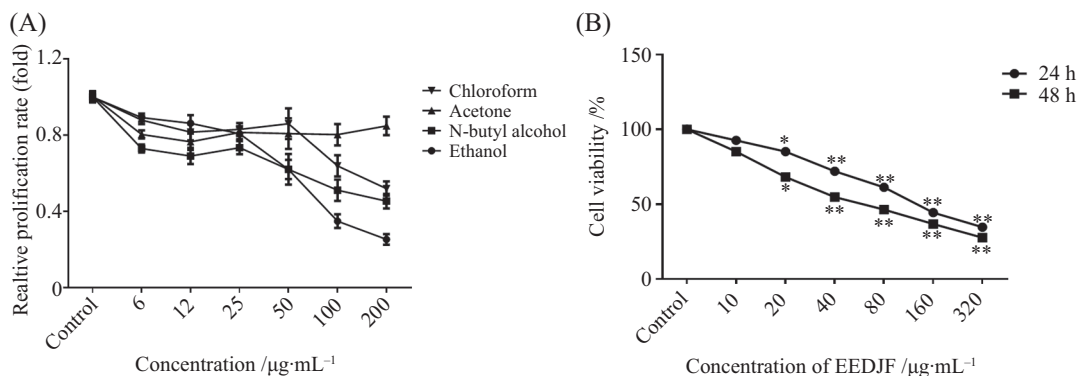
心木乙醇提取物以浓度依赖的方式促进 HCT116 细胞凋亡, 当浓度为  $150 \mu\text{g/mL}$  时, 细胞凋亡率为 60.8% (图 2B)。进一步通过 AO/EB 染色和 TUNEL 法观察分心木乙醇提取物对 HCT116 细胞形态的影响。如图 2C 和图 2D 所示, 对照组的细胞核均被 AO 染为绿色; 随着分心木乙醇提取物浓度的增加, 细胞数量逐渐减少, 细胞出现不同程度的固缩, 细胞核内出现空泡化, 且被 AO 和 EB 共同染为橘红色, 表明细胞发生死亡。TUNEL 结果进一步表明, 分心木乙醇提取物具有促凋亡效应 (图 2E), 且 TUNEL 的阳性细胞数显著增加 (图 2F)。蛋白免疫印迹结果表明, 随着分心木乙醇提取物浓度的增加, 凋亡相关蛋白 cleaved PARP、Bax 的表达水平升高, 同时 Bcl2 蛋白表达水平降低 (图 2G)。

### 2.3 分心木乙醇提取物对 HCT116 细胞迁移的影响

分心木乙醇提取物处理 HCT116 细胞 24 h 后, 划痕实验检测肿瘤细胞迁移率的变化情况。结果 (图 3) 所示, 划痕 24 h 后, 随着分心木乙醇提取物浓度的增加, HCT116 细胞的迁移率逐渐降低, 当浓度为  $50 \mu\text{g/mL}$  时, 细胞由于发生凋亡, 迁移出现负值。提示分心木乙醇提取物能显著抑制肿瘤细胞的迁移能力。

### 2.4 分心木乙醇提取物对肿瘤 3D 细胞增殖的影响

3D 细胞培养技术目前被用来评估肿瘤细胞的增殖能力, 检测肿瘤细胞对药物的敏感性。如图 4A 所示, 分心木乙醇提取物在形态上抑制肿瘤细胞球的生长。随着分心木乙醇提取物浓度的增加, 肿瘤细胞球的活性逐渐降低,  $IC_{50}$  为  $85.5 \mu\text{g/mL}$ 。这表明分心木乙醇提取物能有效抑制肿瘤 3D 细胞的增殖。

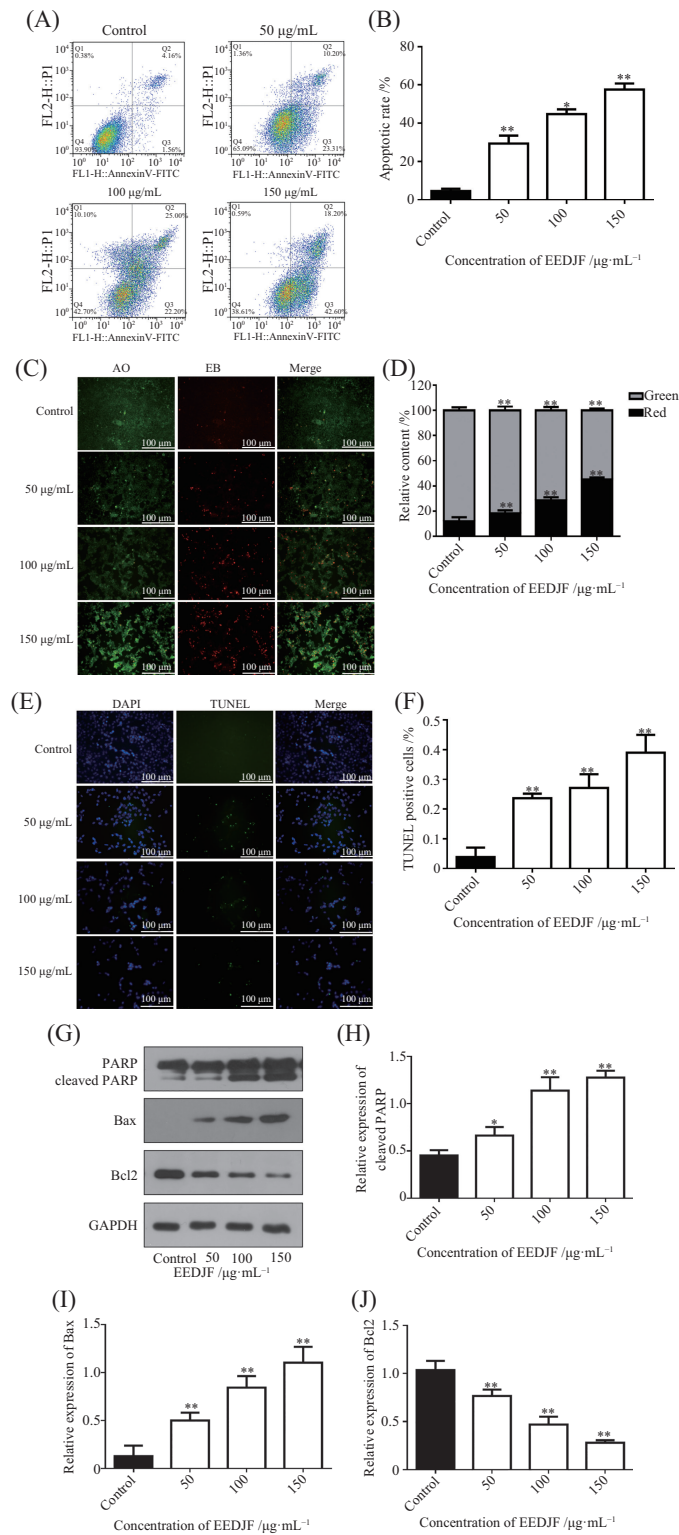


A: 不同有机溶剂分心木提取物处理 HCT116 细胞 24 h 的细胞存活率; B: 不同浓度分心木乙醇提取物分别处理 HCT116 细胞 24 h 和 48 h 的细胞存活率; control: 对照组; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组相比。

A: cell viability of HCT116 cells treated with different organic solvents for 24 h; B: cell viability of HCT116 cells treated with different concentrations of EEDJF for 24 h and 48 h, respectively; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with the control group.

图 1 分心木乙醇提取物对 HCT116 细胞活性的影响

Fig.1 Effects of EEDJF on the cell viability of HCT116 cells

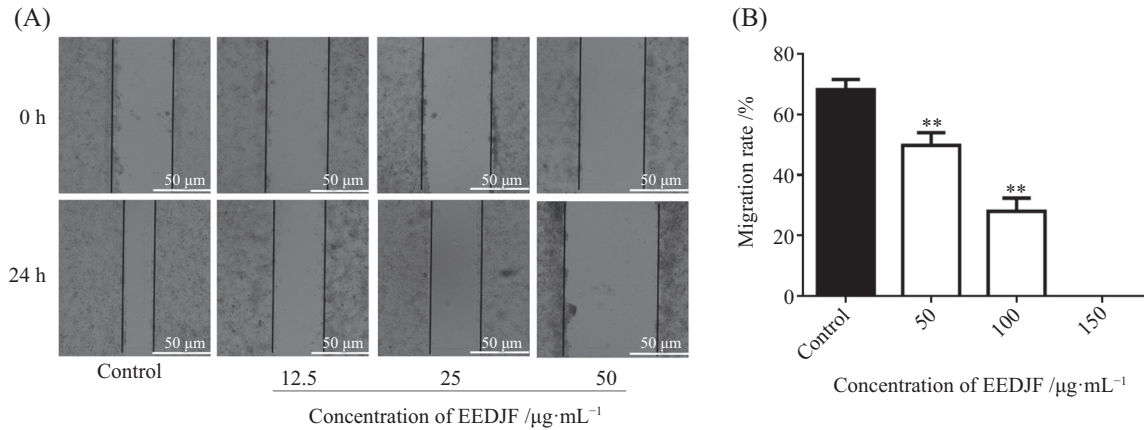


A: 流式细胞术结果; B: 流式细胞术结果统计学分析; C: 不同浓度的分心木乙醇提取物处理HCT116细胞后AO/EB染色观察细胞凋亡现象; D: 对细胞染色情况的统计分析结果; E: TUNEL染色结果; F: 对TUNEL染色结果的统计学分析; G: Western blot检测分心木乙醇提取物对HCT116细胞中cleaved PARP、Bax、Bcl2蛋白表达的影响; H~J: 蛋白灰度值分析; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组相比。

A: flow cytometry analysis outcome; B: statistical analysis of flow cytometry; C: HCT116 cells treated with different concentrations of EEDJF and apoptosis analysis by AO/EB staining; D: statistical analysis of cell staining results; E: TUNEL assay outcome; F: statistical analysis of TUNEL staining results; G: Western blot analysis of the changes in cleaved PARP, Bax, Bcl2 protein levels in HCT116 cells after EEDJF treatment; H~J: gray-value of cleaved PARP, Bax and Bcl2 protein levels. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with the control group.

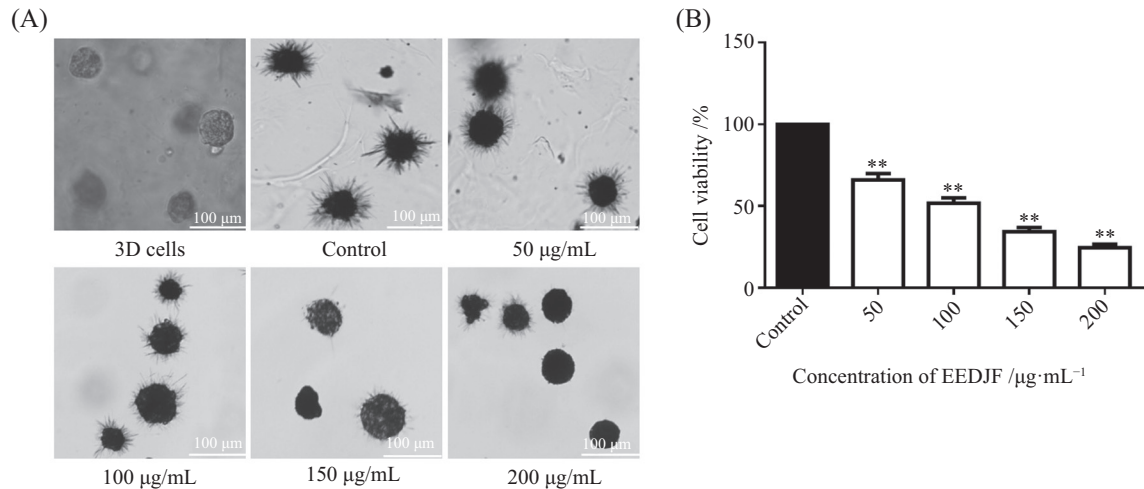
图2 分心木乙醇提取物对HCT116细胞凋亡的影响

Fig.2 Effects of EEDJF on apoptosis of HCT116 cells



A: 细胞划痕实验检测不同浓度的分心木乙醇提取物处理HCT116细胞后细胞迁移的情况; B: 统计学分析细胞迁移率; \*\* $P < 0.01$ , 与对照组相比。  
A: the cell migration ability of HCT116 cells was determined by scratch wound-healing assay after different concentrations of EEDJF treatment; B: statistical analysis of cell migration rate; \*\* $P < 0.01$  compared with control group.

图3 分心木乙醇提取物对HCT116细胞迁移的影响  
Fig.3 Effects of EEDJF on migration of HCT116 cells



A: 倒置荧光显微镜下观察分心木乙醇提取物对HCT116 3D细胞形态的影响; B: 分心木乙醇提取物对HCT116 3D细胞活性的影响; \*\* $P < 0.01$ , 与对照组相比。

A: observation of the morphological changes of HCT116 3D cells after EEDJF treated on an inverted fluorescence microscope; B: effects of EEDJF on HCT116 3D cells proliferation; \*\* $P < 0.01$  compared with control group.

图4 分心木乙醇提取物对HCT116 3D细胞增殖的影响  
Fig.4 Effects of EEDJF on the proliferation of HCT116 3D cells

### 3 讨论

核桃是全世界公认的高营养食物, 包含多种不饱和脂肪酸、褪黑激素、维生素以及多酚等成分。目前, 核桃果仁等部分已经被加工成多种食品, 如蛋糕、饼干等。然而, 分心木, 核桃中的一种干燥木质隔膜, 通常在核桃制品的加工过程中被废弃。分心木中包含200多种化合物, 包括酚类、黄酮类、生物碱和多糖等, 这些化合物均具有一定的抗肿瘤作用<sup>[12]</sup>。据研究, 分心木中的多糖可显著抑制HepG2和BGC-823细胞的增殖,  $\text{IC}_{50}$ 值分别为172.08和209.97  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[13]</sup>。李平等<sup>[15]</sup>

研究表明, 分心木水提取物(浓度为50~400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )可抑制人结肠癌细胞活性。令狐晨等<sup>[14]</sup>的研究表明, 当分心木乙酸乙酯和正丁醇提取物浓度达到400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞凋亡率仍低于50%。这提示提取物的作用是复杂的, 本研究中的MTT结果表明, 分心木乙醇提取物显著抑制肿瘤细胞活性, 当浓度为150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 肿瘤细胞凋亡率高达60.8%, 这提示分心木乙醇提取物的抗肿瘤作用优于目前从中分离的任何单类成分, 表明植物提取物可作为肿瘤治疗药物进行进一步的开发和研究。

当药物刺激肿瘤细胞时,细胞主要通过外在/死亡受体途径和内在/线粒体途径诱发凋亡<sup>[16]</sup>。在线粒体途径中,线粒体中细胞色素C的释放是凋亡小体形成和caspase-3激活的基础<sup>[17]</sup>。Bcl2家族的成员是在细胞凋亡刺激下细胞色素C释放的重要介质<sup>[18]</sup>。在Bcl2家族中,Bax是促凋亡蛋白,而Bcl2是抗凋亡蛋白。Bax或Bcl2可能控制线粒体通透性并促进细胞色素C的通过<sup>[19]</sup>。因此,Bax/Bcl2比值决定了肿瘤细胞发生凋亡与否<sup>[20]</sup>。Bax和Bcl2蛋白的失衡可能导致基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)丢失和细胞色素C的释放,从而触发caspase-3活化并导致细胞凋亡<sup>[21]</sup>。Caspase-3的活化是通过Asp28-Ser29和Asp175-Ser176的剪切实现的<sup>[22]</sup>。Caspase-3最关键的底物是聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP),它参与修复和基因完整性监测过程。在凋亡开始时,116 kDa的PARP可被半胱天冬酶剪切成89 kDa的大片段,这种剪切使PARP失去与损伤DNA片段结合的功能,导致PARP酶对其修复功能的丧失,最终引起细胞凋亡<sup>[23]</sup>。DING等<sup>[24]</sup>指出,阿司匹林通过调节Bcl2和Bax并抑制血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)来抑制多发性骨髓瘤细胞增殖并诱导其凋亡。已有研究表明,植物抗癌活性提取物能够诱导多种肿瘤细胞凋亡,比如荔枝果皮提取物抑制体内外人乳腺癌的细胞活性,苜蓿提取物通过线粒体诱导肝癌细胞的凋亡<sup>[25-26]</sup>。我们通过研究发现,分心木乙醇提取物上调了Bax蛋白水平,下调了Bcl2蛋白水平,同时促进了PARP蛋白的裂解,这表明分心木乙醇提取物通过线粒体途径诱导结肠癌细胞凋亡。

3D细胞培养技术的出现,实现了在体外模拟肿瘤体内生长微环境,满足了人们对肿瘤细胞代谢、血管生成、肿瘤侵袭力、药物毒性及耐药性等的研究<sup>[27-29]</sup>。一项研究证明,与2D细胞相比,小鼠乳腺肿瘤细胞的3D细胞聚集体对马法兰和5-FU表现出更高的耐药性<sup>[30]</sup>。KARLSSON等<sup>[31]</sup>研究发现,氟尿嘧啶、奥沙利铂和伊立替康等药物能够显著抑制人体结肠癌细胞HCT116 3D细胞球的生长和增殖,且HCT116细胞球对这些药物表现出更强的抵抗力。本研究表明,分心木乙醇提取物显著抑制了HCT116肿瘤细胞球的增殖,提示分心木乙醇提取物对结肠癌增殖的抑制作用在体内体外没有显著差异。

我们的结果证实,分心木乙醇提取物以剂量-

时间依赖的方式抑制肿瘤细胞的增殖,同时表明,分心木乙醇提取物通过上调凋亡因子Bax的表达,下调抗凋亡因子Bcl2的表达,并促进凋亡的关键执行蛋白PARP的裂解来促进细胞凋亡;此外,该提取物可抑制肿瘤细胞的迁移和HCT116 3D肿瘤细胞球的增殖,提示分心木乙醇提取物对肿瘤细胞活性的抑制作用在体内外差别不大。本研究支持了分心木在民族医学上的应用,提示分心木可作为癌症的替代疗法或补充疗法,具有新型抗肿瘤药物的开发潜能。

### 参考文献 (References)

- [1] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JERNAL A. Cancer statistics, 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63: 11-30.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: glibocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in china, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-32.
- [4] PU W, LI Y H, JUAN Y Y, et al. Overcome cancer cell drug resistance using natural products [J]. EVID-BASED COMPL ALT, 2015, 2015: 767136.
- [5] LAM K S. New aspects of natural products in drug discovery [J]. TRENDS MICROBIOL, 2007, 15(6): 279-89.
- [6] SAYANTA D, SUSHWETA M, SUKANY S, et al. Natural products: an upcoming therapeutic approach to cancer [J]. Food Chem Toxicol, 2019, 128: 240-55.
- [7] NEWMAN D J, CRAGG G M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014 [J]. J Nat Prod, 2016, 79(3): 629-61.
- [8] NEWMAN D J, CRAGG G M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years [J]. J Nat Prod, 2007, 70(3): 461-77.
- [9] 李俊南, 习学良, 熊新武, 等. 核桃的营养保健功能及功能成分研究进展[J]. 中国食物与营养(LI J N, XI X L, XIONG X W, et al. Nutritional function and functional components of walnut [J]. Food and Nutrition in China), 2018, 24(5): 60-4.
- [10] ALI J E, ALIREZA O, MAHNAZ T, et al. A comprehensive review on the chemical constituents and functional uses of Walnut (*Juglans* spp.) Husk [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(16): 3920.
- [11] MARIU E R, ANA-MARIA G, ANDREI M, et al. Process optimization for improved phenolic compounds recovery from walnut (*juglans regia* L.) septum: phytochemical profile and biological activities [J]. Molecules, 2018, 23(11): 2814.
- [12] LIU R, ZHAO Z, DAI S, et al. Identification and quantification of bioactive compounds in *Diaphragma Juglandis Fructus* by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS and UHPLC-MS/MS [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(13): 3811-25.
- [13] MENG Q, WANG Y, CHEN F, et al. Polysaccharides from *Diaphragma Juglandis Fructus*: extraction optimization, antitumor, and immune-enhancement effects [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 115: 835-45.
- [14] 令狐晨. 新疆分心木体外抗肿瘤作用及其化学成分的研究[D].

- 新疆: 新疆医科大学, 2016.
- [15] 李平. 核桃分心木水提液化学成分及抗肿瘤活性分析[D]. 山西: 山西大学, 2017.
- [16] CAO K, TAIT S W G. Apoptosis and cancer: force awakens, phantom menace, or both [J]? *Int Rev Cell Mol Biol*, 2018, 337: 135-52.
- [17] MOHAN S, ABODELWAHAB S I, KAMALIDEHGHAN B, et al. Involvement of NF- $\kappa$ B and Bcl2/Bax signaling pathways in the apoptosis of MCF7 cells induced by a xanthone compound pyranocycloartobioxanthone A [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(11): 1007-15.
- [18] ISTRITTO G, TRISCIUOGLIO D, CECI C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies [J]. *Aging*, 2016, 8(4): 603-19.
- [19] WANG X, YI Y, LV Q, et al. Novel 1,3,5-triazine derivatives exert potent anti-cervical cancer effects by modulating Bax, Bcl2, and caspases expression [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2018, 91(3): 728-34.
- [20] BIVIK C A, LARSSON P K, KAGEDAL K M, et al. UVA/B-induced apoptosis in human melanocytes involves translocation of cathepsins and Bcl-2 family members [J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126(5): 1119-27.
- [21] PISTRITTO G, TRISCIUOGLIO D, CECI C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies [J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8(4): 603-19.
- [22] JONGES L E, NAGELKERKE J F, ENSINK N G, et al. Caspase-3 activity as a prognostic factor in colorectal carcinoma [J]. *Lab Invest*, 2013, 81(5): 681-8.
- [23] ZHAO Q, LAN T, SU S, et al. Induction of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells by a PARP1-targeting PROTAC small molecule [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2019, 55(3): 369-72.
- [24] DING J H, YUAN L Y, HUANG R B, et al. Aspirin inhibits proliferation and induces apoptosis of multiple myeloma cells through regulation of Bcl-2 and Bax and suppression of VEGF [J]. *Eur J Haematol*, 2014, 93(4): 329-39.
- [25] WANG X, YUAN S, WANG J, et al. Anticancer activity of litchi fruit pericarp extract against human breast cancer in vitro and in vivo [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 215(2): 168-78.
- [26] EL-HAFFEZ A A A, KHALIFA H O, ELGAWISH R A, et al. Melilotus indicus, extract induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells via a mechanism involving mitochondria-mediated pathways [J]. *Cytotechnology*, 2018, 70(2): 831-42.
- [27] IMAMURA Y, MUKOHARA T, SHIMONO Y, et al. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(4): 1837-43.
- [28] RAVI M, RAMESH A, PATTABHI A. Contributions of 3D cell cultures for cancer research [J]. *J Cell Physiol*, 2016, 232(10): 2679-97.
- [29] RAVI M, PARAMESH V, KAVIYA S R, et al. 3D cell culture systems: advantages and applications [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(1): 16-26.
- [30] MILLER B E, MILLER F R, HEPPNER G H. Factors affecting growth and drug sensitivity of mouse mammary tumor lines in collagen gel culture [J]. *Cancer Res*, 1985, 45(9): 4200-5.
- [31] KARLSSON H, FRYKN S M, LARSSON R, et al. Loss of cancer drug activity in colon cancer HCT116 cells during spheroid formation in a new 3D spheroid cell culture system [J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(13): 1577-85.