

β -脱水淫羊藿素通过ROS介导的线粒体凋亡途径诱导MCF-7细胞凋亡

舒晖¹ 赵岩¹ 刘芳菲¹ 韩佳宏¹ 蔡恩博^{1*} 齐文骞^{2*}

(¹吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; ²吉林大学中日联谊医院消化内科, 长春 130033)

摘要 该文旨在探究 β -脱水淫羊藿素对人非小细胞肺癌细胞A549、人乳腺癌细胞MCF-7、人前列腺癌细胞PC-3M、人子宫颈鳞癌细胞SiHa和人胰腺癌细胞PANC-1的抗肿瘤活性, 并对筛选出抑制活性最佳的细胞株初步探讨其抗肿瘤作用机制。采用MTT法检测不同浓度 β -脱水淫羊藿素对5种肿瘤细胞增殖的影响, 并以IC₅₀作为标准, 筛选出 β -脱水淫羊藿素抑制作用较为突出的乳腺癌MCF-7细胞进行后续实验; DAPI染色和流式细胞术检测细胞凋亡情况; DCFH-DA法检测细胞的活性氧水平; Calcein AM探针检测线粒体通透性转换孔开放情况; JC-1探针检测线粒体膜电位变化; 分子对接技术预测 β -脱水淫羊藿素与活性氧相关蛋白SIRT3之间的结合能力; Western blot检测细胞中线粒体凋亡途径相关蛋白SIRT3、Cytochrome C、Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-9、PARP、Cleaved PARP的表达水平。结果显示: β -脱水淫羊藿素能够通过调控SIRT3蛋白表达水平刺激肿瘤细胞活性氧水平升高, 使得MCF-7细胞线粒体功能发生障碍, 进而刺激线粒体通透性转换孔异常开放, 使得膜电位大幅度降低, 最终诱导MCF-7细胞凋亡, 且这些影响可能是通过活性氧介导的线粒体凋亡途径实现的。

关键词 β -脱水淫羊藿素; 抗肿瘤; MCF-7细胞; 线粒体凋亡途径; 活性氧(ROS); 凋亡

β -anhydroicaritin Induces Apoptosis of MCF-7 Cells through ROS-Mediated Mitochondrial Apoptosis Pathway

SHU Hui¹, ZHAO Yan¹, LIU Fangfei¹, HAN Jiahong¹, CAI Enbo^{1*}, QI Wenqian^{2*}

(¹College of Traditional Chinese Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

²Department of Digestive, China-Japan Union Hospital, Changchun 130033, China)

Abstract The aim of this study is to investigate the anti-tumor effect of β -anhydroicaritin on human non-small cell lung cancer A549, breast cancer MCF-7, prostate cancer PC-3M, cervical squamous cell carcinoma SiHa and pancreatic cancer PANC-1 cells, and to screen out the cell lines with the best inhibitory activity to explore the mechanism of anti-tumor effect. MTT assay was used to detect the effects of different concentrations of β -anhydroicaritin on the proliferation of five kinds of tumor cells, and the breast cancer MCF-7 cells with more prominent inhibitory effect of β -anhydroicaritin were selected for subsequent experiments based on IC₅₀; DAPI staining and flow cytometry were used to detect cell apoptosis; DCFH-DA method was used to detect the level of reactive oxygen species in cells; the opening of mitochondrial permeability transition pore was detected by using Calcein AM probe; JC-1 probe was used to detect mitochondrial membrane potential; molecular docking technol-

收稿日期: 2024-04-30

接受日期: 2024-05-10

吉林省自然科学基金(联合基金)(批准号: YDZJ202401285ZYTS)资助的课题

*通信作者。Tel: 13944816620, E-mail: caienbo126621@126.com; Tel: 13756183502, E-mail: qiwq@jlu.edu.cn

Received: April 30, 2024

Accepted: May 10, 2024

This work was supported by the Jilin Province Natural Science Foundation (Joint Fund) (Grant No. YDZJ202401285ZYTS)

*Corresponding authors. Tel: +86-13944816620, E-mail: caienbo126621@126.com; Tel: +86-13756183502, E-mail: qiwq@jlu.edu.cn

ogy forecasted β -anhydroicaritin element combination ability with proteins SIRT3 associated with reactive oxygen species; Western blot was used to detect the expression levels of SIRT3, Cytochrome C, Cleaved caspase-3, Cleaved caspase-9, PARP, and Cleaved PARP in the cells. The results showed that β -anhydroicaritin could stimulate the level of reactive oxygen species in tumor cells by regulating the expression level of SIRT3 protein, which leads to mitochondrial dysfunction in MCF-7 cells, and then stimulated the abnormal opening of mitochondrial permeability transition pore, greatly reduced the membrane potential, and finally induced apoptosis of MCF-7 cells. These effects may be mediated by ROS (reactive oxygen species)-mediated mitochondrial apoptosis.

Keywords β -anhydroicaritin; anti-tumor; MCF-7 cells; mitochondrial apoptotic pathway; ROS (reactive oxygen species); apoptosis

肿瘤的有效治疗一直是全球性的医学难题,在肿瘤的生长进程中,凋亡逃逸赋予了肿瘤一种近乎“永生”的特性,这一现象也成为了化疗药物在发挥抗肿瘤活性时面临的一大问题。因此,寻求安全有效的药物对肿瘤的治疗以及患者预后效果提高具有重要意义。通过活性氧(reactive oxygen species, ROS)介导的肿瘤细胞凋亡是一种重要的抗癌机制^[1],细胞内ROS水平和氧化还原状态与细胞凋亡之间存在密切关联,而细胞的氧化还原状态则是决定细胞生死的关键因素^[2]。在正常细胞中,过氧化物酶系统和抗超氧化物系统共同构成了一个氧化还原平衡机制。这两种系统协同工作,有效地清除细胞代谢过程中产生的ROS,从而确保细胞内ROS水平保持稳定,这种平衡状态的维持对于细胞的正常功能至关重要,一旦失衡,便可能引发细胞凋亡等^[3]。沉默信息调节蛋白3(Sirtuin 3, SIRT3)主要定位于线粒体内膜,其在细胞进程中发挥着多方面的调节作用,这些作用与细胞能量代谢、细胞凋亡以及细胞周期的调控等密切相关^[4],作为一种氧化还原酶,SIRT3在增强抗氧化系统酶活性方面起到了关键作用,能够提高线粒体中ROS的清除率。相关研究表明,SIRT3与线粒体中转录因子FOXO3a之间相互作用,当SIRT3表达水平升高时,它能够激活FOXO3a,促进超氧化物歧化酶2(superoxide dismutase 2, SOD2)和过氧化氢酶(catalase, CAT)的表达,从而有效减少细胞内ROS的沉积^[5],因此SIRT3作为清除ROS的介导者可以作为肿瘤治疗的一个潜在靶点进行后续的深入研究。

我国中药资源丰富,黄酮类化合物作为其中常见的天然多酚类化合物,在抗肿瘤方面具有独特的生物活性。朝鲜淫羊藿(*Epimedium koreanum* Nakai)是一种药食两用的中药,主要分布于中国东北长白

山地区,是吉林省道地药材之一。其主要活性成分为黄酮类物质,其中含有的淫羊藿素是被广泛研究并证实具有丰富药用价值的黄酮类化合物^[6],而 β -脱水淫羊藿素(β -anhydroicaritin, AHI)作为其同分异构体^[7],是一种天然的异戊烯基取代的黄酮类化合物,能够直接从淫羊藿属植物中分离提取获得。有基础研究表明,AHI具有治疗骨质疏松^[8]、心脑血管疾病^[9]和抗炎^[10]等多种药理活性,但目前关于AHI对肿瘤细胞杀伤作用机制的研究较少^[11],AHI的抗肿瘤机制也可能因肿瘤类型的不同而存在差异,因此对于AHI的进一步研究和探索,特别是针对具体的肿瘤细胞作用机制研究还有待深入。本文主要以AHI为研究对象,通过体外细胞实验探讨了AHI对肿瘤细胞凋亡及相关蛋白表达的影响及其可能机制,为AHI在抗肿瘤方面的进一步开发提供了重要数据和参考信息。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

朝鲜淫羊藿采于吉林农业大学药园,实验样品由吉林农业大学中药材学院杨利民教授鉴定为朝鲜淫羊藿。AHI由实验室自制(纯度>98%);人非小细胞肺癌A549、人乳腺癌细胞MCF-7和人前列腺癌细胞PC-3M购自北京北纳创联生物技术研究院;人宫颈鳞癌细胞SiHa、人胰腺癌细胞PANC-1购自大连美仑生物技术有限公司;DMEM、RPMI 1640培养液培养基购自美国Gibco公司;DMSO、噻唑蓝溴化四唑(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)、4%组织细胞固定液和DAPI购自北京索莱宝生物科技有限公司;1%青霉素-链霉素、0.25%胰酶消化液、JC-1、DCFH-DA、Caclein AM和细胞周期试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司;

细胞凋亡试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司; BCA蛋白定量试剂盒购自 ThermoFisher Scientific 公司; 兔多抗蛋白 SIRT3、Cytochrome C、Cleaved caspase-3、PARP 购自 Abcam 公司; Cleaved caspase-9 购自北京博奥森生物科技有限公司; Cleaved PARP 购自武汉三鹰生物科技有限公司; β -actin 购自北京中杉生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 AHI 的制备 称取朝鲜淫羊藿 2.5 kg, 粉碎成粗粉, 加入 20% 乙醇浸泡 12 h, 置于超声提取器中超声提取(功率 100 kHz, 温度 30 °C) 1 h, 过滤, 重复上述实验 3 次, 合并滤液后回收乙醇, 浓缩至浸膏后采用蒸馏水溶解, 上 D101 大孔吸附树脂, 分别用水、40% 乙醇、65% 乙醇进行梯度洗脱, 其中 65% 乙醇部位反复柱层析(JTY-1 型反相树脂), 得 AHI 55 mg。

1.2.2 细胞培养 将 A549、PC-3M、SiHa 细胞分别加入含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 RPMI-1640 培养基培养, PANC-1 和 MCF-7 细胞分别加入含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基培养, 5 种细胞株均置于 5% CO₂、37 °C 条件下的培养箱中培养。

1.2.3 样品溶液的配制 准确称取一定量的 AHI, 加入 DMSO 溶液配制成浓度为 20 mmol/L 的母液, 置于 -20 °C 保存备用。待测试前再用相对应的培养液稀释成浓度为 1.25、2.5、5、10、20、40、80、100 μ mol/L 的样品溶液。

1.2.4 MTT 法检测细胞活性 取对数生长期 A549、PC-3M、SiHa、PANC-1 和 MCF-7 细胞, 以 5×10^4 /mL 的细胞密度接种于 96 孔板中, 培养箱中过夜并充分贴壁后, 给予不同浓度的样品溶液 100 μ L 处理细胞, 每个浓度设置 6 个复孔, 对照组为 0.1% DMSO 和完全培养基。药物作用 48 h 后, 每孔加入 10 μ L 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 于 37 °C 培养箱中孵育 4 h 后弃上清, 加入 150 μ L DMSO, 室温振荡 15 min 后, 490 nm 波长处测定吸光度(*D*)值, 以未加药完全培养基孔作为空白组, 实验重复 3 次。细胞存活率 = [(对照组 *D* 值 - 实验组 *D* 值) / (对照组 *D* 值 - 空白组 *D* 值)] $\times$ 100%。通过 GraphPad Prism 6 计算出药物 IC₅₀ 值, 并以 IC₅₀ 值为标准选择适宜的药物浓度进行后续实验。

1.2.5 DAPI 观察细胞凋亡情况 收集对数生长期的 MCF-7 细胞, 配成浓度为 1.5×10^5 /mL 的细胞悬液, 接种在 12 孔培养板中, 每孔 1 mL, 培养 24 h 后, 分别

加入 10、20、40 μ mol/L 的 AHI, 同时设置对照组, 培养 48 h 后用磷酸盐缓冲液清洗 2 次, 每孔加入 4% 组织细胞固定液室温固定 15 min, 磷酸盐缓冲液清洗 2 次, 每孔加入 500 μ L DAPI 染液, 37 °C 避光染色 20 min 后置于倒置荧光显微镜下进行观察。

1.2.6 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率 将对数生长期的 MCF-7 细胞配制成浓度为 5×10^5 /mL 的细胞悬液, 接种在 6 孔培养板中, 每孔 2 mL, 培养 24 h 后分别加入 10、20、40 μ mol/L 的 AHI, 同时设置对照组, 培养 48 h 后将细胞悬液转入离心管, 用预冷的磷酸盐缓冲液清洗 2 次, 根据细胞凋亡试剂盒说明书进行后续操作, 染色完成后, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.7 分子对接 采用 Auto Dock 软件进行分子对接, 对接蛋白 SIRT3(PDB: 4O8Z)来自于蛋白晶体结构库, 通过删除其余不用的配体物结构与水分子制备靶蛋白受体, 将化合物的分子配体与生成的靶蛋白受体结合进行分子模拟对接, 最后将对接结果通过 Pymol 软件进行可视化分析。

1.2.8 DCFH-DA 荧光探针检测活性氧水平 将对数生长期的 MCF-7 细胞配制成浓度为 5×10^5 /mL 的细胞悬液, 接种在 6 孔培养板中, 每孔 2 mL, 培养 24 h 后分别加入 10、20、40 μ mol/L 的 AHI, 同时设置对照组, 培养 48 h 后将细胞悬液转入离心管, 用预冷的磷酸盐缓冲液清洗 2 次, 每孔加入 500 μ L DCFH-DA 探针, 37 °C 避光染色 30 min 后, 弃去染料, 无血清培养基清洗 3 次, 使用流式细胞仪检测 ROS 含量。

1.2.9 Calcein AM 探针检测 MPTP 开放情况^[12] 收集对数生长期的 MCF-7 细胞, 配成浓度为 1.5×10^5 /mL 的细胞悬液, 接种在 12 孔培养板中, 每孔 1 mL, 培养 24 h 后分别加入 10、20、40 μ mol/L 的 AHI, 同时设置对照组, 培养 12 h 后, 磷酸盐缓冲液清洗 2 次, 每孔加入 500 μ L Calcein AM 染色稀释液, 37 °C 避光染色 30 min 后, 弃去染液, 磷酸盐缓冲液清洗 3 次, 置于倒置荧光显微镜下进行观察并拍摄照片。

1.2.10 JC-1 染色法检测线粒体膜电位 收集对数生长期的 MCF-7 细胞, 配成浓度为 1.5×10^5 /mL 的细胞悬液, 接种在 12 孔培养板中, 每孔 1 mL, 培养 24 h 后分别加入 10、20、40 μ mol/L 的 AHI, 同时设置对照组, 培养 48 h 后, 磷酸盐缓冲液清洗 2 次, 每孔加入 500 μ L JC-1 荧光染液, 37 °C 避光染色 30 min 后, 弃去染料, 磷酸盐缓冲液清洗 3 次, 置于倒置荧光显微镜

下进行观察并拍摄照片。

1.2.11 Western blot实验 收集不同浓度药物作用后的各组细胞,采用BCA法测定蛋白浓度,根据目标蛋白的分子量选择相应浓度的SDS-PAGE凝胶体系进行电泳,电泳结束后将处理好的样品进行转膜,转膜结束后室温封闭2 h,加入SIRT3、Cytochrome C、Cleaved caspase-9、Cleaved caspase-3、PARP、Cleaved PARP和 β -actin(1:1 000)于4 °C过夜。取出与一抗结合后的条带,加入HRP标记的二抗(1:3 000)室温下孵育1 h。曝光前,滴入ECL化学发光液,曝光后得到WB蛋白条带,采用ImageJ软件分析各个蛋白表达情况。

1.2.12 统计分析 使用GraphPad Prism 6软件进行统计学分析,所有实验数据结果表示为平均值 $\pm$ 标准差,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AHI体外抗肿瘤增殖作用

为了探究AHI的抗肿瘤活性,采用MTT法检测了AHI的抗增殖作用。结果如图1所示,AHI对不同种类的肿瘤细胞表现出的敏感性不同,具有一定的浓度依赖性,其中AHI对MCF-7细胞的抑制作用效果最好, IC_{50} 为 (27.63 ± 6.00) $\mu\text{mol/L}$,因此,选择MCF-7细胞进行后续研究。

2.2 AHI诱导MCF-7细胞凋亡性死亡

明确AHI能够显著抑制MCF-7细胞活性后,进

一步测定了其对肿瘤细胞凋亡的影响。结果如图2A所示,DAPI染色对照组的细胞形态完整均匀,呈现淡蓝色荧光,无凋亡现象出现;在低剂量组中,亮蓝色荧光点较少,且亮度低,细胞数量偏多;相比于对照组,AHI高剂量组细胞数量大幅减少,出现了不规则的亮蓝色荧光,核染色质凝聚明显,呈现新月形聚集于核膜一边,表明细胞进入凋亡状态。

Annexin V/PI双染检测发现(图2B),与对照组相比,不同浓度的AHI给药均显著促进了细胞发生凋亡,尤其是高剂量组总凋亡率为36.12%($P<0.01$)。该结果表明,AHI通过诱发细胞凋亡的方式抑制MCF-7细胞的进一步增殖。

2.3 分子对接

为了进一步探讨AHI对MCF-7细胞凋亡调控的机制,通过分子对接技术进行了模拟实验。使用Autodock软件对AHI与SIRT3二者进行对接,对接结果显示(图3),氢键相互作用和疏水性相互作用是AHI与SIRT3结合的关键,AHI与氨基酸残基PHE-157、HIS-248、VAL-324、GLU-323和SER-321形成传统氢键,与ALA-146和GLN-228氨基酸残基形成疏水作用力,最终结合能为 -9.71 kcal/mol。显然地,这些作用能够使AHI与结构域产生更高的结合能,形成更稳定的分子构象。

2.4 AHI引发ROS水平变化

为了验证分子对接结果,采用DCFH-DA探针检测胞内ROS水平变化。由图4A结果可知,经AHI处理细胞48 h后,与对照组相比,不同浓度AHI处理后

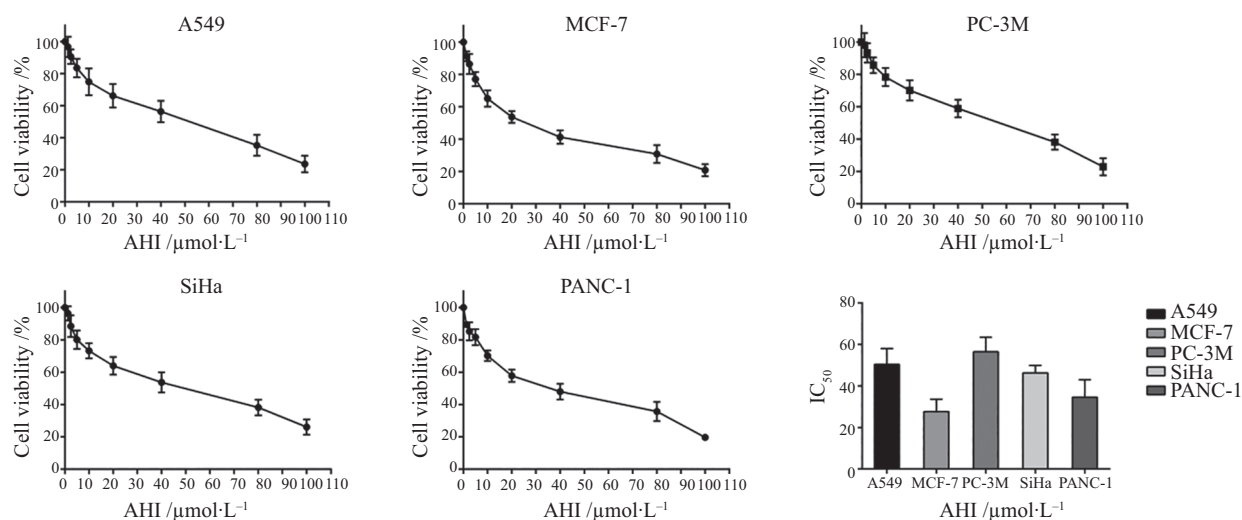
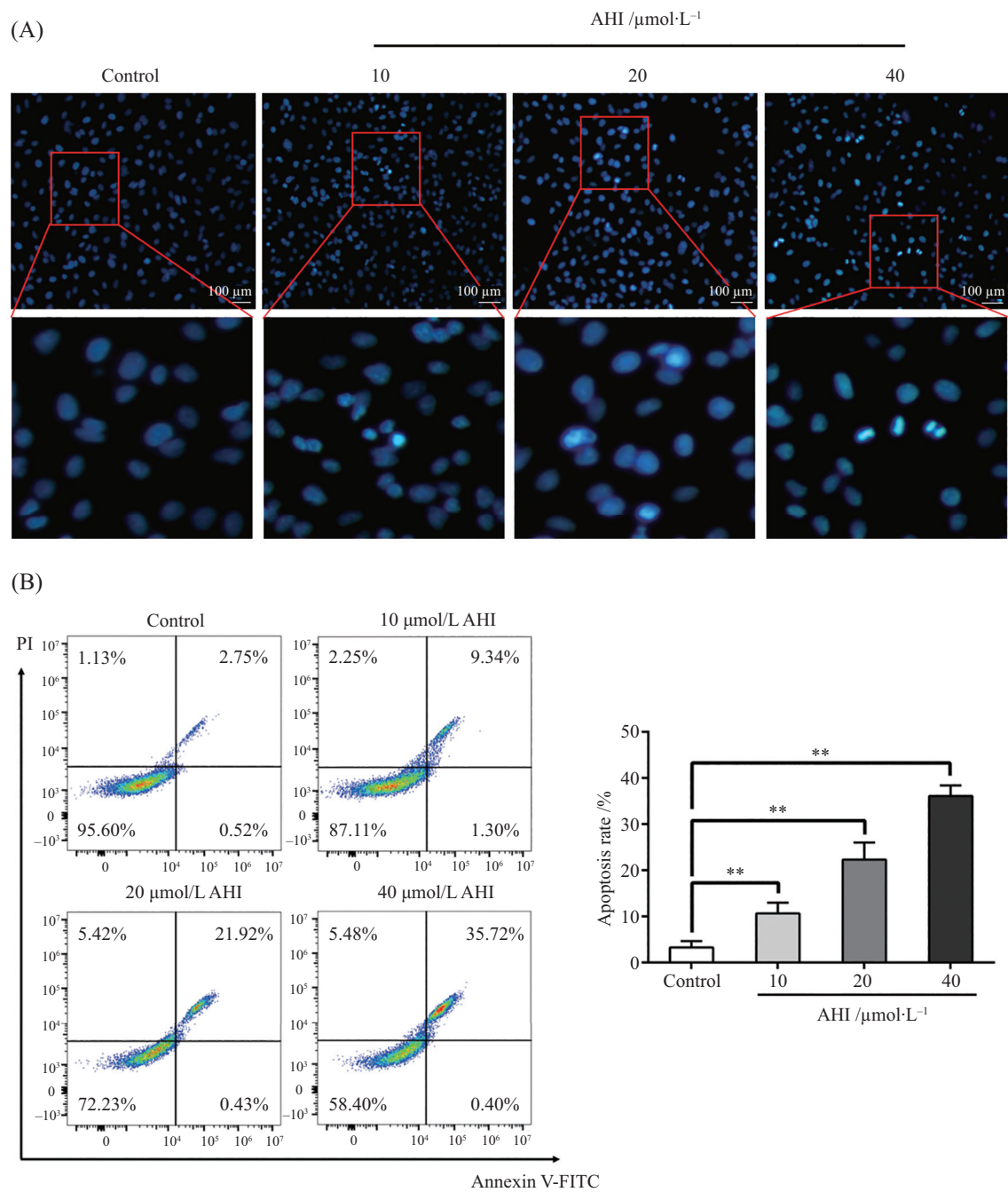


图1 AHI对5种肿瘤细胞活性的影响
Fig.1 Effect of AHI on the activity of five tumor cells



A: DAPI染色法检测AHI对MCF-7细胞凋亡的影响; B: 通过流式细胞仪分析得到的细胞凋亡示意图。 ** $P<0.01$ 。
A: DAPI staining was used to detect the effect of AHI on MCF-7 cell apoptosis; B: schematic representation of apoptosis obtained by flow cytometry analysis. ** $P<0.01$.

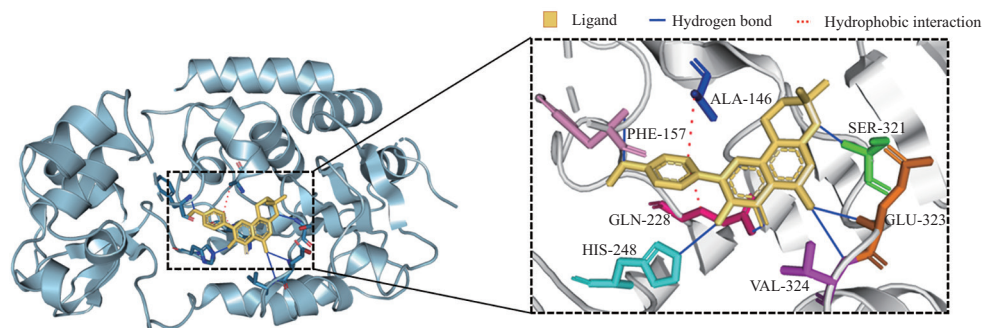
图2 AHI对MCF-7细胞凋亡的影响
Fig.2 Effect of AHI on the apoptosis of MCF-7 cells

细胞内 ROS 荧光强度均显著增加 ($P<0.01$), 且具有剂量依赖性; Western blot 实验结果 (图 4B) 显示, AHI 处理的细胞中, 与对照组相比, 低浓度组 SIRT3 蛋白表达的水平轻微降低, 但并无显著差异性, 而高浓度组 SIRT3 蛋白水平的表达水平显著降低 ($P<0.01$), 这一结果同分子对接结果相符, 表明 AHI 可能是通过调控 SIRT3

水平引发 ROS 变化从而引起 MCF-7 细胞凋亡的。

2.5 AHI 对线粒体功能的影响

为探究 AHI 对 MCF-7 细胞线粒体的影响, 采用 Calcein AM 探针法检测了 MPTP 的开放情况。实验结果如图 5A 所示, 对照组绿色荧光强烈, 在 AHI 处理组中, 随着药物浓度增加荧光信号逐渐减弱,

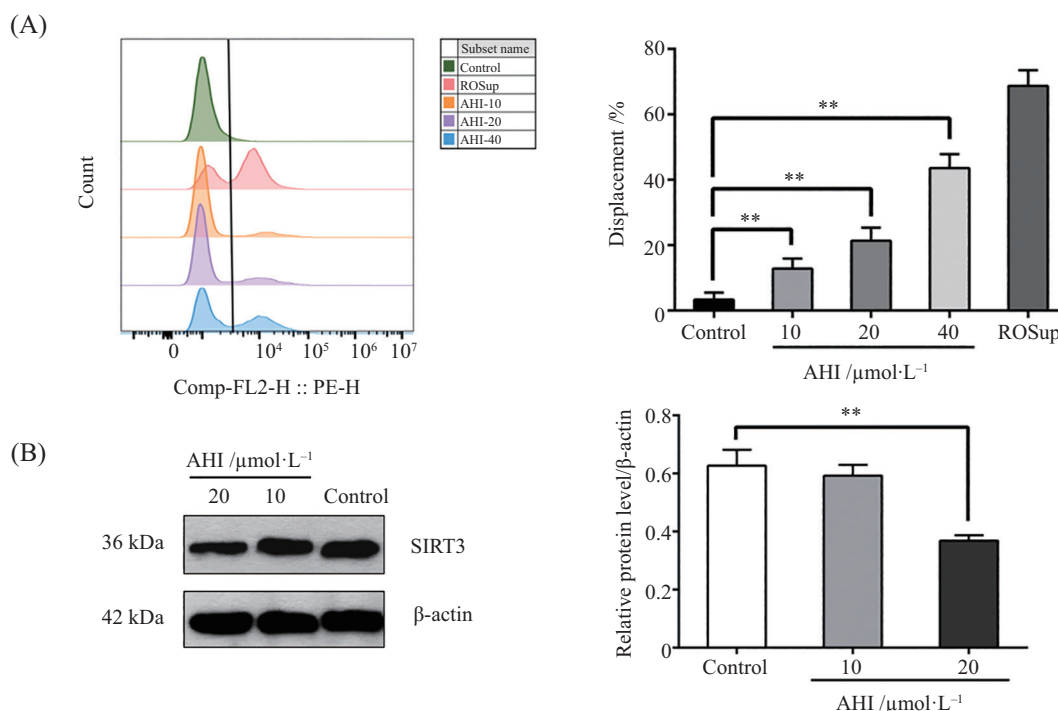


红色虚线表示为疏水作用力, 蓝色实线表示氢键。

Dotted red lines represent hydrophobic interaction, and solid blue lines represent hydrogen bonds.

图3 AHI与SIRT3(PDB: 4O8Z)的对接结果图

Fig.3 Docking results of AHI and SIRT3 (PDB: 4O8Z)



A: 流式细胞仪检测AHI对MCF-7细胞中ROS含量的影响, ROSup为阳性对照组; B: AHI对SIRT3水平的影响。*** $P<0.01$ 。

A: the effect of AHI on ROS content in MCF-7 cells was detected by flow cytometry, in which ROSup was the positive control group; B: the effect of AHI on SIRT3 levels. *** $P<0.01$.

图4 AHI对MCF-7细胞内ROS水平的影响

Fig.4 Effect of AHI on intracellular ROS levels in MCF-7 cells

形态由完整的椭圆形过渡到半圆形最终荧光逐渐弥散减弱; Western blot实验结果显示(图5B), AHI处理的细胞中, 与对照组相比, 高浓度组线粒体内Cytochrome C水平随药物浓度的增加而显著降低($P<0.01$), 而与此相反, 细胞质中Cytochrome C含量则相应增加($P<0.01$), 表明细胞中MPTP的完整性被破坏, Cytochrome C由线粒体内膜释放至细胞质中。

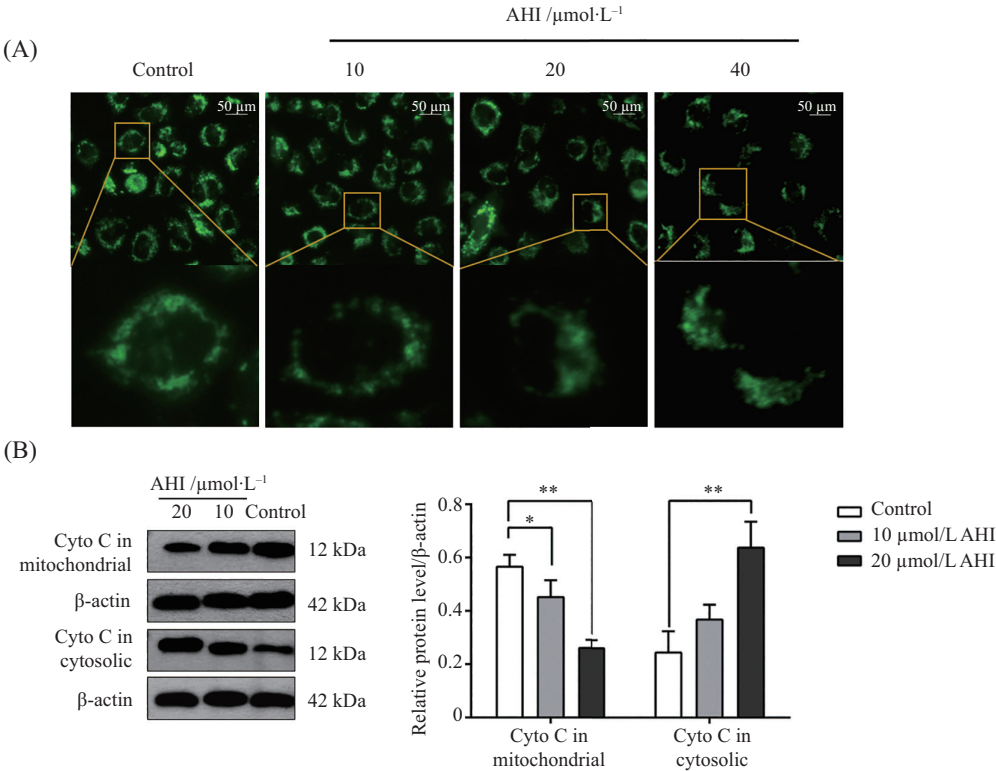
2.6 AHI对MCF-7细胞线粒体膜电位的影响

为探究AHI对MCF-7细胞线粒体的影响, 采用

JC-1法检测了线粒体膜电位的情况。由图6结果可知, 经AHI处理MCF-7细胞48 h后, 随着药物处理浓度的增加, 绿色荧光强度逐渐升高, 红色荧光逐渐减弱, 特别在高浓度时, 与对照组相比, 细胞形态出现皱缩, 红色荧光强度明显降低, 膜完整性丢失, 膜电位崩溃。

2.7 AHI对线粒体凋亡途径相关蛋白表达的影响

为了验证AHI是否真正引发线粒体途径的凋亡, 采用Western blot方法对相关蛋白进行检测。实



A: AHI对MCF-7细胞MPTP开放程度的影响; B: AHI对MCF-7细胞中Cytochrome C水平的影响。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
A: the effect of AHI on mitochondrial MPTP pore opening in MCF-7 cells; B: the effect of AHI on Cytochrome C levels. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图5 AHI对MCF-7细胞线粒体功能的影响
Fig.5 Effect of AHI on mitochondrial function of MCF-7 cells

验结果由图7可知,与对照组相比,不同浓度AHI处理MCF-7细胞后,Cleaved caspase-9、Cleaved caspase-3和Cleaved PARP蛋白的表达水平随药物浓度的增加而逐渐上升($P<0.05$),而PARP水平随药物作用浓度的升高显著下降($P<0.05$)。

3 讨论

细胞凋亡作为细胞的一种主动、程序性死亡过程,在维护细胞平衡和防治衰老等方面发挥着不可或缺的作用^[13],另外,细胞凋亡亦成为研究癌症治疗的重要途径,当机体内的细胞受到损伤时,细胞会启动程序性死亡机制,以清除这些异常细胞,从而维持机体的健康状态。近年来,药物诱导细胞凋亡作为治疗肿瘤的新策略^[14],已经受到了广泛的研究和关注,为肿瘤治疗领域带来了新的发展契机。在探索抗癌领域的过程中,淫羊藿的活性成分因其独特的抗癌作用而备受关注^[15],研究证实,这种作用与激活线粒体信号通路密切相关^[16]。为了验证AHI是否能够诱导MCF-7细胞凋亡,本研究采用DAPI染色和细胞凋亡试剂盒,结果显示,AHI处理组细胞DAPI染色

呈现不均匀的亮蓝色荧光,核染色质凝聚明显,呈现新月形聚集于核膜一边,表明细胞进入凋亡状态;流式结果表明,不同浓度AHI处理细胞后,细胞存活率明显降低,凋亡率明显升高,这与DAPI实验结果相符,该结果表明AHI通过诱发细胞凋亡的方式抑制MCF-7细胞的进一步增殖。

ROS稳态失调是细胞凋亡的一个不可逆转的信号,细胞内ROS水平和氧化还原状态与细胞凋亡之间存在密切关联,而细胞的氧化还原状态则是决定细胞生死的关键因素^[2],在正常情况下,线粒体产生的ROS水平被细胞内的抗氧化系统所严格调控,维持在一个相对较低的水平,从而避免对细胞造成损伤;SIRT3是线粒体中重要的氧化还原酶^[17],能够靶向调节线粒体代谢并参与ROS的调控。为了进一步探讨AHI是否通过ROS介导凋亡调控机制,通过分子对接技术进行了模拟实验,预测了AHI与SIRT3的潜在靶点。研究结果表明,AHI能够通过下调SIRT3表达水平,破坏细胞内的氧化还原体系,进而导致ROS水平上升。

ROS是激活线粒体途径细胞凋亡的强效诱导

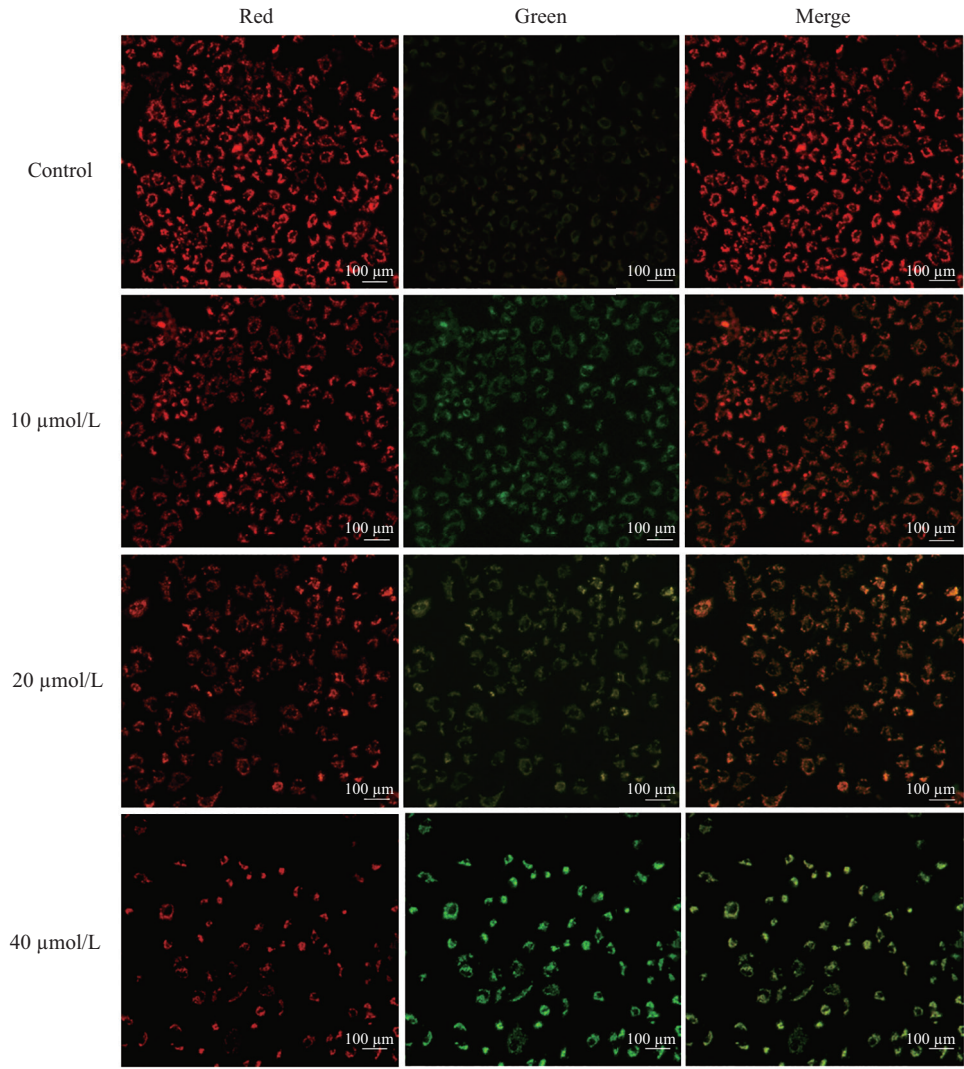
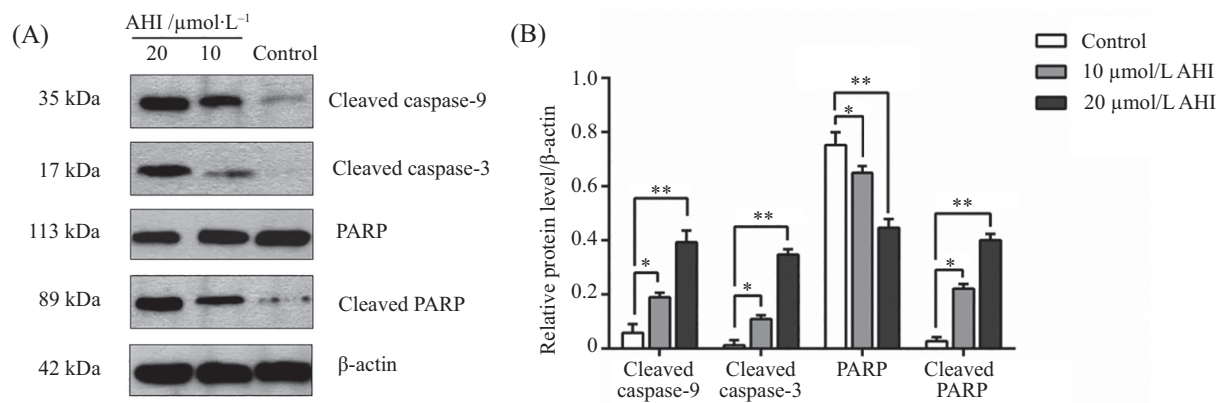


图6 AHI对MCF-7细胞线粒体膜电位的影响

Fig.6 Effect of AHI on the mitochondrial membrane potential of MCF-7 cells



A: AHI对线粒体凋亡途径相关蛋白表达水平的影响; B: 统计学分析蛋白表达水平。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
A: the effect of AHI on the expression levels of proteins related to mitochondrial apoptosis pathway; B: statistical analysis of protein expression level.
* $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图7 Western blot检测AHI对线粒体凋亡途径相关蛋白的影响

Fig.7 Western blot was used to detect the effect of AHI on mitochondrial pathway-related proteins

剂,细胞凋亡是由线粒体调控的重要死亡进程^[18],当线粒体受到高水平ROS的刺激时,MPTP会异常开放,进而导致线粒体肿胀、膜电位下降以及线粒体膜通透性的增加,激活一系列细胞凋亡信号^[19]。研究表明,高浓度的ROS水平明显促进MPTP的异常开放,线粒体膜电位下降,同时释放储存在线粒体内膜中的Cytochrome C等相关凋亡因子进入细胞质中,引发后续凋亡进程。

在线粒体凋亡途径中,Cytochrome C作为核心调控分子主要定位于线粒体内膜中,当MPTP异常开放时,Cytochrome C从线粒体内部释放^[20],并与凋亡相关因子1(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)相结合,形成复合多聚体形式,该多聚体结构能够与Caspase-9前体结合,进而促使Caspase-9前体发生自我剪切和激活,形成具有活性的Cleaved caspase-9,然后Cleaved caspase-9作为启动因子进一步催化Caspase-3剪切和激活,从而触发一系列Caspase联级反应,最终诱导细胞发生线粒体介导的凋亡过程^[21]。研究表明,线粒体内Cytochrome C的释放明显影响了下游凋亡信号通路转导,导致了下游Caspase-9的剪切,进而引发了Caspase-3的剪切,最终,作为信号通路终端的PARP也被剪切,这些蛋白是线粒体凋亡过程的关键执行者,它们的表达发生变化进一步证实了细胞凋亡的发生。因此,该实验结果证明了AHI能够通过线粒体凋亡途径诱导MCF-7细胞凋亡的假设,且这一过程呈现出明显的剂量依赖性。

综上所述,AHI能够抑制乳腺癌MCF-7细胞增殖,诱导细胞凋亡,该作用机制可能是通过下调SIRT3蛋白表达水平,破坏细胞内的氧化还原平衡体系,促使ROS水平显著上升,进一步触发了MPTP的开放和线粒体膜电位的去极化,造成线粒体结构受损,最终,受损的线粒体促使Cytochrome C释放进入胞质中,从而激活线粒体凋亡途径相关蛋白,实现诱导MCF-7细胞的凋亡。本实验初步为AHI促进乳腺癌细胞凋亡提供了基础的理论依据,为进一步开发AHI相关药物的深入研究奠定了基础。

参考文献 (References)

[1] PENG X, GANDHI, V. ROS-activated anticancer prodrugs: a new strategy for tumor-specific damage [J]. Ther Deliv, 2012, 3(7): 823-33.

[2] BHATTACHARYYA S, PAL P B, SIL P C. A 35 kD *Phyllanthus niruri* protein modulates iron mediated oxidative impairment to hepatocytes via the inhibition of ERKs, p38 MAPKs and activation of PI3k/Akt pathway [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 56: 119-30.

[3] SATAPATHY S R, MOHAPATRA P, DAS D, et al. The apoptotic effect of plant based nanosilver in colon cancer cells is a p53 dependent process involving ROS and JNK cascade [J]. Pathol Oncol Res, 2015, 21(2): 405-11.

[4] ZHANG J, YE J, ZHU S, et al. Context-dependent role of SIRT3 in cancer [J]. Trends Pharmacol Sci, 2024, 45(2): 173-90.

[5] YANG W, WANG Y, HAO Y, et al. Piceatannol alleviate ROS-mediated PC-12 cells damage and mitochondrial dysfunction through SIRT3/FOXO3a signaling pathway [J]. J Food Biochem, 2022, 46(3): e13820.

[6] ZHUO Y, GUO J F, HU M Y, et al. Icaritin exacerbates mitophagy and synergizes with doxorubicin to induce immunogenic cell death in hepatocellular carcinoma [J]. ACS nano, 2020, 14(4): 4816-28.

[7] KANG Y J, LEE M W. Flavonoids from epimedium koreanum [J]. J Nat Prod, 1991(54): 542-6.

[8] JIANG J, LI J, JIA X B. The antiosteoporotic activity of central-icaritin (CIT) on bone metabolism of ovariectomized rats [J]. Molecules, 2014, (19): 18690-704.

[9] 周亚伟. β -脱水淫羊藿素在制备防治心脑血管疾病药物中的应用[P]. CN200810094122.6. (ZHOU Y W. Application of β -anhydroicaritin in the preparation of drugs for prevention and treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases [P]. CN200810094122.6.)

[10] WU Y T, WANG W C, LIU L. Effect of β -anhydroicaritin on the expression levels of tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase-3 in periodontal tissue of diabetic rats [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2): 1829-37.

[11] NGUYEN V S, SHI L, WANG S C, et al. Synthesis of icaritin and β -anhydroicaritin mannich base derivatives and their cytotoxic activities on three human cancer cell lines [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2017, (17): 137-42.

[12] SHI X J, ZHANG T, LOU H X, et al. Anticancer effects of honokiol via mitochondrial dysfunction are strongly enhanced by the mitochondria-targeting carrier berberine [J]. J Med Chem, 2020, 63(20): 11786-800.

[13] SINGH P, LIM B. Targeting apoptosis in cancer [J]. Curr Oncol Rep, 2022, 24(3): 273-84.

[14] CHAUDHRY G E, MD AKIM A, SUNG Y Y, et al. Cancer and apoptosis: the apoptotic activity of plant and marine natural products and their potential as targeted cancer therapeutics [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 842376.

[15] SUN L, ZHANG J. Icaritin inhibits oral squamous cell carcinoma cell proliferation and induces apoptosis via inhibiting the NF- κ B and PI3K/AKT pathways [J]. Exp Ther Med, 2021, 22(3): 942.

[16] WU X, KONG W, QI X, et al. Icaritin induces apoptosis of human lung adenocarcinoma cells by activating the mitochondrial apoptotic pathway [J]. Life Sci, 2019, 239: 116879.

[17] MARGALIDA T M, JORDI O, PILAR R, et al. SIRT3: oncogene and tumor suppressor in cancer [J]. Cancers, 2017, 9(7): 90.

[18] ZHANG L, FU R, DUAN D, et al. Cyclovirobuxine D induces apoptosis and mitochondrial damage in glioblastoma cells

- through ROS-mediated mitochondrial translocation of cofilin [J]. *Front Oncol*, 2021, (11): 656184.
- [19] LUIS-GARCIA E R, BECERRIL C, SALGADO-AGUAYO A, et al. Mitochondrial dysfunction and alterations in mitochondrial permeability transition pore (mPTP) contribute to apoptosis resistance in idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 7870.
- [20] XU D, LI L, LIU L, et al. Polychlorinated biphenyl quinone induces mitochondrial-mediated and caspase-dependent apoptosis in HepG2 cells [J]. *Environ Toxicol*, 2015, 30(9): 1063-72.
- [21] KAPLAN P, TATARKOVA Z, SIVONOVA M K, et al. Homocysteine and mitochondria in cardiovascular and cerebrovascular systems [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7698.