

DOI:10.19296/j.cnki.1008-2409.2024-02-010

· 论 著 ·

· ORIGINAL ARTICLE ·

走马胎提取物对胰腺癌的影响及作用机制

黄志强, 顾生玖, 金家民, 杨苗, 刘昊, 朱开梅

(桂林医学院药学院, 桂林 541199)

摘要 目的 探究走马胎提取物对胰腺癌细胞 PANC-1 增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响及作用机制。方法 采用 MTT 法检测走马胎提取物对 PANC-1 细胞增殖的影响, 观察其对 PANC-1 细胞形态的影响; 设计划痕及 Transwell 迁移/侵袭实验检测其对 PANC-1 细胞迁移和侵袭能力的影响; 采用 Western blot 法检测其对癌细胞中相关蛋白 p65、P-p65、Caspase-3、Caspase-9、Cleaved-Caspase-3、Cleaved-Caspase-9、Bcl-2 及 Bax 表达水平的影响。结果 走马胎提取物对 PANC-1 细胞的增殖、迁移和侵袭具有抑制作用, 能下调 P-p65、Caspase-3、Caspase-9 及 Bcl-2 的蛋白表达水平, 上调 Cleaved-Caspase-3、Cleaved-Caspase-9、Bax 的蛋白表达水平。结论 走马胎提取物能抑制 PANC-1 细胞活性, 其机制是通过抑制 PANC-1 细胞的增殖、迁移与侵袭, 上调 Bax, 下调 Bcl-2, 抑制 p65 的磷酸化, 促进 Caspase-3、Caspase-9 的激活以诱导 PANC-1 细胞凋亡, 而发挥抗胰腺癌作用。

关键词: 走马胎提取物; 胰腺癌; 增殖; 迁移与侵袭; 凋亡

中图分类号: R735.9

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2024)02-0068-07

Effects and mechanism of *Ardisia gigantifolia* extract on pancreatic cancer

HUANG Zhiqiang, GU Shengjiu, JIN Jiamin, YANG Miao, LIU Hao, ZHU Kaimei

(College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541199, China)

Abstract Objective To observe the effect of *Ardisia gigantifolia* extract on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of pancreatic cancer cell line PANC-1 cells and explore its mechanism. **Methods** The MTT assay was used to test the proliferation of PANC-1 cells. The morphological change of PANC-1 cells was observed. Scratch and Transwell migration/invasion assays were performed to test the migration and invasion abilities of PANC-1 cells. Western blot analysis was conducted to examine the levels of protein expressions of p65, P-p65, Caspase-3, Caspase-9, Cleaved-Caspase-3, Cleaved-Caspase-9, Bcl-2, and Bax in PANC-1 cells. **Results** The proliferation, migration, and invasion of PANC-1 cells were inhibited by *Ardisia gigantifolia* extract. The protein expression levels of P-p65,

基金项目: 中央引导地方科技发展资金项目 (ZY20230102); 广西科技重大专项 (桂科 AA22096020); 桂林市科学研究与技术开发计划项目 (20210202-1, 2020011203-1, 2020011203-2); 广西肿瘤免疫与微环境调控重点实验室开放课题资助项目 (2022KF005)。

第一作者: 黄志强, 硕士研究生, 研究方向为天然产物活性成分分析。

通信作者: 朱开梅, 370489448@qq.com。

Caspase-3, Caspase-9 and Bcl-2 in PANC-1 cells were down-regulated by *Ardisia gigantifolia* extract. The protein expressions of Cleaved-Caspase-3, Cleaved-Caspase-9 and Bax in PANC-1 cells were up-regulated by *Ardisia gigantifolia* extract. **Conclusion** *Ardisia gigantifolia* extract inhibits the proliferation, migration and invasion of PANC-1 cells, which the mechanism may be related to the upregulation of Bax, downregulation of Bcl-2, inhibition of p65 phosphorylation, promotion of Caspase-3 and Caspase-9 activation, and induction of apoptosis in PANC-1 cells induced by *Ardisia gigantifolia* extract.

Keywords: *Ardisia gigantifolia* extract; pancreatic cancer; proliferation; migration and invasion; apoptosis

胰腺癌是消化系统恶性程度最高的恶性肿瘤之一,是人胰腺导管上皮及腺泡细胞癌变而产生的癌症,多为胰腺导管癌^[1]。胰腺癌发病隐匿,所以早期的诊断相对困难。而胰腺癌发展迅速,恶性化程度高,转移性强,且发病原因目前尚不完全明确,多数患者确诊时已处于癌症的中晚期,因此治愈的可能性低。国家癌症中心 2022 年数据显示,2016 年,我国胰腺癌发病率占世界第 11 位,病死率占第 7 位^[2]。胰腺癌的治疗主要包括手术治疗、放射治疗、化学治疗及介入治疗等^[3]。化学治疗是胰腺癌的主要治疗方法,但随着治疗时间的增长,耐药性及药物的副作用使治疗效果严重降低。因此,寻找一种低毒、有效的治疗药物来应对逐年高发的胰腺癌迫在眉睫。

走马胎作为一种药食两用的少数民族药用植物,是紫金牛科紫金牛属植物(*Ardisia gigantifolia*)的干燥根及根茎,主要分布于我国广西壮族自治区、云南省、广东省、江西省等地。走马胎中含有三萜、黄酮、香豆素及醌类等化合物,常用于祛风湿、壮筋骨、活血祛瘀等^[4-6]。现代药理学研究表明,走马胎中的提取物在抗肿瘤、抗炎及抗氧化等方面有较好活性,对包括胃癌、宫颈癌、肺癌、肝癌及乳腺癌等多种癌细胞的活性具有一定的抑制作用^[7-9]。本研究通过提取走马胎中活性成分,探究其对胰腺癌细胞 PANC-1 增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响及作用机制,以期胰腺癌的治疗提供新的选择。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 胰腺癌细胞 PANC-1,购自中国科学院上海细胞库,目录号:TCHu 98。

1.1.2 药物与试剂 药材走马胎,由中国科学院广西植物研究所提供,并由研究所的唐辉研究员鉴定为紫金牛科紫金牛属植物 *Ardisia gigantifolia* 的根茎。无水乙醇(购自天津市富宇精细化工有限公司);二甲基亚砜(DMSO)、磷酸盐缓冲液干粉(PBS)、RIPA 强裂解液、0.1% 结晶紫染液、噻唑蓝(MTT)、DMEM 培养基(均购自北京索莱宝公司);胎牛血清、 β -actin、Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9、Cleaved-Caspase-3、Cleaved-Caspase-9、NF- κ B p65、P-p65 抗体、Goat anti-Rabbit IgG、Goat anti-Mouse IgG [购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司];BCA 蛋白定量试剂盒(购自北京普利莱基因技术有限公司)。

1.1.3 主要仪器 1900 全波长 Epoch 酶标仪(购自上海闪谱生物科技有限公司), Heidol-pH 旋转蒸发器(购自北京斯坦森科技有限公司), 750A 多功能粉碎机(购自永康市红太阳机电有限公司), ME204E 电子天平(购自上海瑶新电子科技有限公司), DMIL-LED 倒置相差显微镜[购自德国徕卡显微系统(上海)贸易有限公司], Universal Hood II 型凝胶成像发光系统(购自美国 Bio-Rad 公司), 5810R 型冷冻高速离心机(购自德国 Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 药物提取及配制 将新鲜的走马胎根茎干燥、粉碎后过 40 目筛,取 100 g 走马胎干燥粉末,按料液比 1 : 10 加入 95% 乙醇,60 °C 水浴回流提取 2 h,提取 3 次,合并滤液过滤后,60 °C 减压浓缩获得走马胎提取物浸膏。将走马胎提取物溶解于 DMSO 中配制成母液,给药时,利用培养基稀释药物,设置对照组、低浓度(2.5 μ g/mL)组、中浓度(5 μ g/mL)组及高浓度(10 μ g/mL)组进行实验。

1.2.2 细胞培养 无菌条件下,将胰腺癌细胞 PANC-1 接种于 DMEM 完全培养基中,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,定期观察细胞形态和数量,选择状态良好的 PANC-1 细胞进行实验。

1.2.3 MTT 实验 取适量状态良好的 PANC-1 细胞,通过细胞计数将细胞数目调整至 5×10^4 个/mL,接种于 96 孔板中,每孔加入 5 000 个细胞。设置浓度为 0、2、4、6、8、10 μg/mL 给药梯度,每个梯度设置 5 个复孔,培育 48 h 后,弃去废液。每孔加入 10 μL 5 mg/mL 的 MTT 和 90 μL 的 DMEM 完全培养基,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h,弃去废液,每孔加入 150 μL DMSO,慢摇 10 min,于 490 nm 测吸光度值,并计算出细胞的 IC₅₀。

1.2.4 走马胎提取物对 PANC-1 细胞形态的影响 设置高浓度组、中浓度组、低浓度组和对照组,分别于给药后 0 h、24 h、48 h、72 h 观察细胞形态,并采集照片。

1.2.5 划痕实验 设置高浓度组、中浓度组、低浓度组和对照组,分别取适量 PANC-1 细胞接种于 6 孔板中培养,待细胞汇合率达 80% 以上时,利用 10 μL 的枪头制造划痕,用 PBS 将脱落的细胞洗去后给药,给药后 0 h、24 h、48 h 拍照,计算细胞迁移率。

1.2.6 Transwell 迁移与侵袭实验 迁移实验:设置低浓度组、中浓度组、高浓度组和对照组,取适量 PANC-1 细胞,调整细胞数目为 5×10^5 个/mL,分别取 200 μL 接种于细胞小室中,下室中加入 600 μL 完全培养基,48 h 后,取出细胞小室,固定、染色、清洗后拍照,计算细胞的迁移率^[6]。侵袭实验:在 Transwell 小室中铺入基质胶后,参照迁移实验方法进行检测,并计算细胞的侵袭率^[6]。

1.2.7 Western blot 实验 设置低浓度组、中浓度组、高浓度组和对照组,分别接种适量状态良好的 PANC-1 细胞于 6 孔板中培养,待细胞融合率达 70% 以上时给药,给药后培养 48 h,收集细胞,裂解、离心,取上清液备用。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋

白浓度,调整蛋白浓度后,在 100 ℃ 加热变性 10 min, -20 ℃ 条件下储存。检测时不同药物浓度处理的样品蛋白各取 10 μL,按顺序上样,并进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭及清洗等。根据目的蛋白 (β-actin、Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9、Cleaved-Caspase-3、Cleaved-Caspase-9、p65 及 P-p65) 加入对应的抗体孵育后,用化学发光法分析系统采集图像,并对条带进行分析。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad prism 8.0 统计软件分析数据,多组间均数比较,采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 走马胎提取物抑制 PANC-1 细胞的增殖

走马胎提取物作用 PANC-1 细胞 48 h 后,半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 5.56 μg/mL。结果表明,走马胎提取物对胰腺癌细胞 PANC-1 增殖具有抑制作用,且药物对胰腺癌细胞 PANC-1 增殖的抑制作用具有一定的剂量依赖性,如图 1 所示。

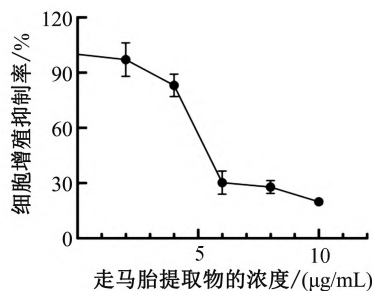


图 1 走马胎提取物对 PANC-1 细胞增殖的影响

2.2 走马胎提取物影响 PANC-1 细胞形态

不同浓度的走马胎提取物均能诱使 PANC-1 细胞形态发生皱缩,且随着给药浓度的增加,对 PANC-1 细胞形态的影响越显著,如图 2 所示。

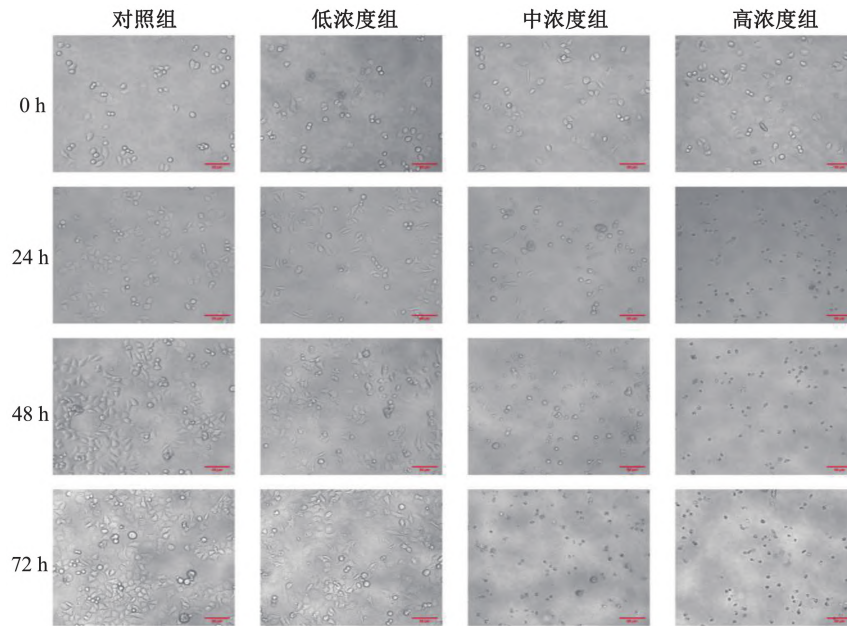
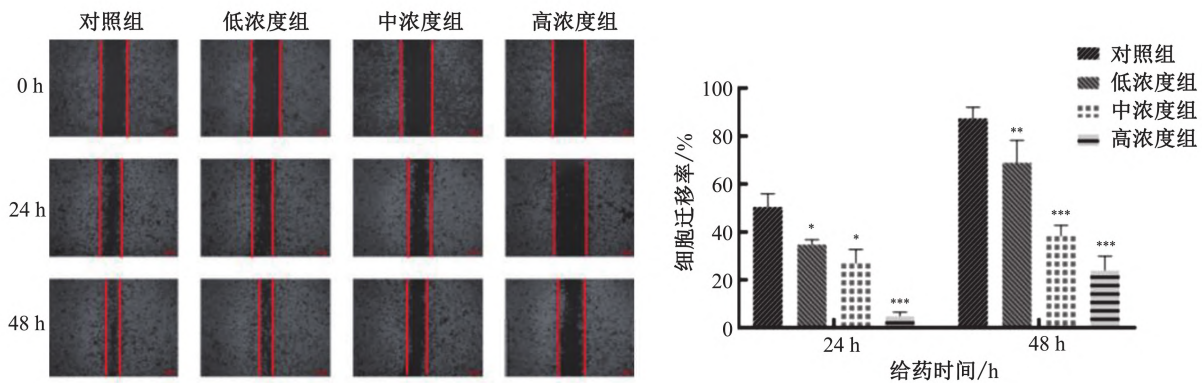


图 2 走马胎提取物对 PANC-1 细胞形态的影响(×100)

2.3 走马胎提取物抑制 PANC-1 细胞的迁移和侵袭

2.3.1 划痕实验 实验中设置高浓度组、中浓度组、低浓度组及对照组,分组给药,分别于给药 0 h、24 h、48 h 进行拍照,并计算癌细胞的迁移率。与对

照组比较,低浓度组、中浓度组、高浓度组能不同程度地抑制 PANC-1 细胞的迁移,随着给药浓度的增加,抑制作用越显著,如图 3 所示。

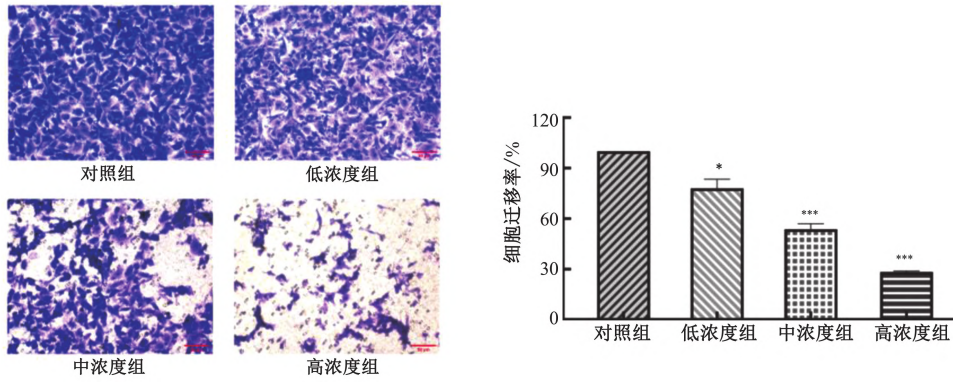


注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图 3 走马胎提取物对 PANC-1 细胞迁移能力的影响(×40)

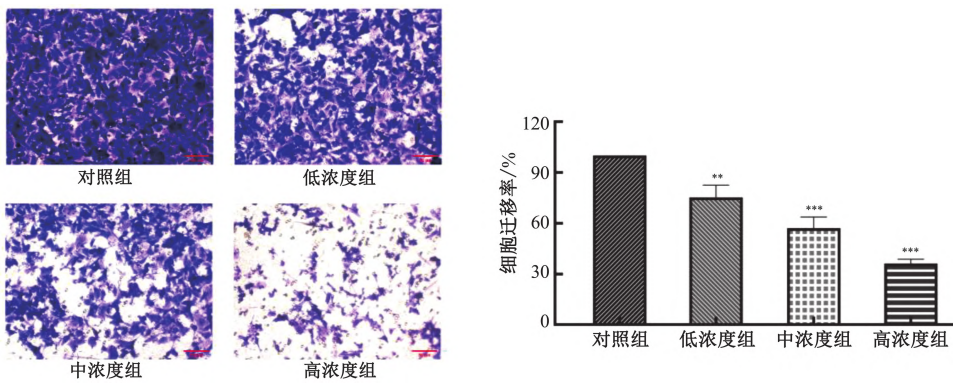
2.3.2 Transwell 迁移与侵袭实验 实验中设置高浓度组、中浓度组、低浓度组及对照组,各组药物作用于 PANC-1 细胞 48 h 后,利用 0.01% 结晶紫染色检

测其穿过小室的数目,与对照组比较,不同浓度给药组 PANC-1 细胞的迁移和侵袭能力均被抑制,如图 4、图 5 所示。



注:与对照组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

图 4 走马胎提取物对 PANC-1 细胞迁移能力的影响(结晶紫, $\times 200$)



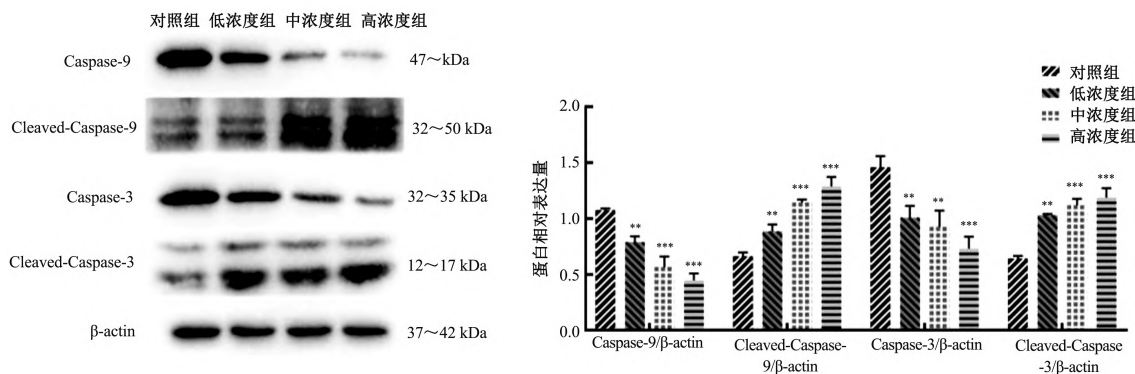
注:与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 5 走马胎提取物对 PANC-1 细胞侵袭能力的影响(结晶紫, $\times 200$)

2.4 走马胎提取物对 PANC-1 细胞相关蛋白表达的影响

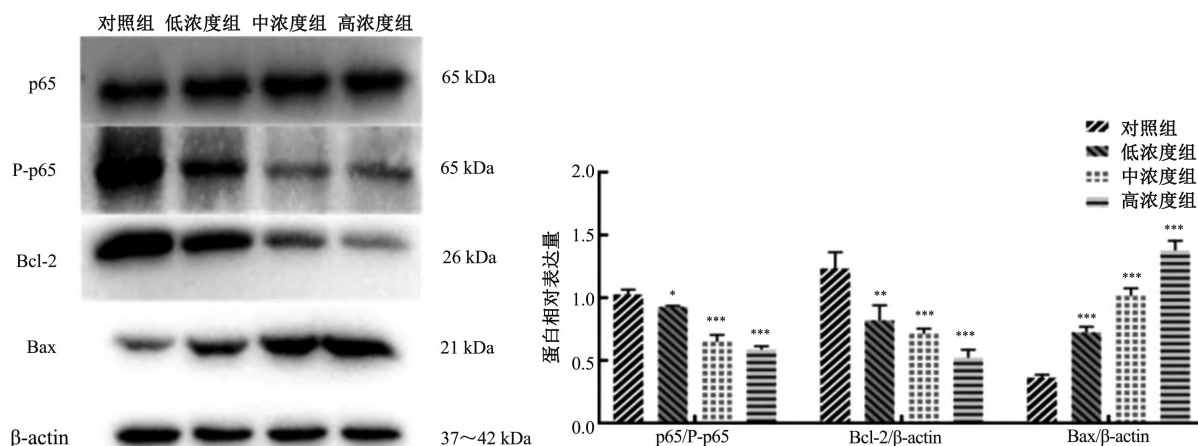
与对照组比较,不同浓度给药组 PANC-1 细胞中 p65 蛋白磷酸化水平及 Caspase-3, Caspase-9、

Bcl-2 蛋白表达水平明显下调, Cleaved-Caspase-3、Cleaved-Caspase-9、Bax 蛋白表达水平明显上调,且随着给药浓度的增大,影响效果越显著,如图 6、图 7 所示。



注:与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 6 走马胎提取物对 PANC-1 细胞 Caspase-3、Caspase-9、Cleaved-Caspase-3、Cleaved-Caspase-9 蛋白表达水平的影响



注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图 7 走马胎提取物对 PANC-1 细胞 p65、P-p65、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平的影响

3 讨论

走马胎作为一种药食两用的少数民族药用植物,常用于祛风湿、壮筋骨、活血祛瘀等。相关研究^[6-9]结果表明,走马胎含有三萜、黄酮、香豆素及醌类等化合物,在抗肿瘤、抗炎及抗氧化等方面有较好活性,包括对胃癌、宫颈癌、肺癌、肝癌及乳腺癌等多种癌细胞的活性具有一定的抑制作用。无限增殖、迁移和侵袭是恶性肿瘤的重要特征,而癌症晚期的患者常发生肿瘤转移。因此,通过抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭是治疗癌症并提高患者预后的有效手段之一^[10]。本研究结果显示,走马胎提取物对胰腺癌 PANC-1 细胞的增殖、迁移及侵袭具有抑制作用。本研究中,通过 MTT 实验测定走马胎提取物对 PANC-1 细胞的 IC_{50} 为 $5.56 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。对 PANC-1 细胞形态影响实验结果显示,不同浓度药物均能诱使癌细胞发生皱缩,随着药物浓度的增高,影响越显著。细胞划痕及 Transwell 迁移和侵袭实验表明,走马胎提取物抑制 PANC-1 细胞的迁移及侵袭能力,且随着给药浓度的增大,抑制作用越显著。

细胞凋亡是细胞自主有序的死亡,受多种基因调控,在肿瘤的发生与发展中发挥重要作用^[10]。Caspase 家族是含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶^[11],在细胞凋亡中有着重要的作用。Caspase 家族中的凋亡,包括 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 等^[12],其中 Caspase-9 参与内源性细胞凋亡途径,通过线粒体介导的细胞内途径传递凋亡信号,并作用于线粒

体蛋白,包括抗凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),促凋亡蛋白 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)^[13-15]。相关研究^[16-17]表明,线粒体外膜的通透性增加,可促进膜间隙蛋白的释放,进而活化 Caspase-9,活化后的 Caspase-9 通过激活下游凋亡效应 Caspase-3,诱导细胞发生凋亡。核转录因子- κB (NF- κB)是一类可与免疫球蛋白 κ 轻链特异性结合,并促进轻链蛋白表达的核蛋白表达因子,由 p65/p50 组成的蛋白二聚体是经典的 NF- κB ,参与多种细胞过程,在细胞增殖、炎症及肿瘤形成中起重要作用^[18-20]。多项研究^[21-22]结果表明,NF- κB 可被炎症因子、肿瘤促进因子、肿瘤微环境和物理化学致癌因子等激活,并参与细胞增殖、侵袭、转移及转化等过程,在许多类型的肿瘤疾病中均可以发挥促癌作用。因此,抑制 NF- κB 活化是预防和治疗癌症的有效手段^[23-25]。Western blot 结果表明,走马胎提取物能抑制 PANC-1 细胞中 p65 蛋白的磷酸化,促进 Caspase-3、Caspase-9 的激活,降低 Bcl-2 蛋白的表达水平,上调 Bax 蛋白表达水平,诱导胰腺癌 PANC-1 细胞发生凋亡,发挥抗胰腺癌作用。

4 结论

走马胎提取物通过抑制胰腺癌 PANC-1 细胞的增殖、迁移与侵袭,并诱导其凋亡发挥抗胰腺癌作用。对走马胎提取物诱导 PANC-1 细胞的凋亡机制表明,可以下调 PANC-1 细胞中 Bcl-2 的蛋白水平,

抑制 p65 蛋白的磷酸化,促进 Caspase-3、Caspase-9 的激活,并上调 Bax 蛋白表达水平。希望上述结果能为走马胎的开发利用及胰腺癌的治疗提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] 罗美,田劭丹,侯丽,等.319 例胰腺癌中医证候分布规律及影响因素分析[J].北京中医药大学学报,2023,46(4):584-592.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] 国家卫生健康委办公厅.胰腺癌诊疗指南(2022年版)[J].临床肝胆病杂志,2022(5):1006-1030.
- [4] 贺珊,廖长秀,罗莹,等.走马胎抗肝癌活性部位的分离及其抗肝癌活性筛选[J].广东医学,2019,40(12):1689-1693.
- [5] 贺珊,廖长秀,罗莹,等.走马胎活性组分对肝癌 HepG2 细胞 DUSPs/MAPK 信号通路的影响[J].中成药,2021,43(2):344-349.
- [6] 贺珊,廖长秀,黄桂坤,等.走马胎活性组分抗肝癌作用研究[J].中药材,2020,43(10):2543-2547.
- [7] 姚志仁,李豫,曾铁鑫,等.走马胎乙酸乙酯部位对 HepG₂ 细胞凋亡的影响[J].中药材,2020,43(8):2003-2006.
- [8] 谷永杰,穆丽华,刘屏,等.走马胎生物转化产物 S1 的抗肿瘤活性及对 Bel-7402 肝癌细胞凋亡及细胞周期的影响[J].中药药理与临床,2018,34(3):26-29.
- [9] 穆丽华,张静,刘屏.走马胎三萜皂苷衍生物的生物转化制备及其抗肿瘤活性研究[J].中草药,2018,49(6):1266-1271.
- [10] TANIGUCHI K, KARIN M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age[J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18(5): 309-324.
- [11] 杨光,何浩强,周思远,等.Caspase 家族与心血管疾病及中药复方的干预研究[J].中国中医基础医学杂志,2021,27(10):1680-1684.
- [12] VAN OPDENBOSCH N, LAMKANFI M. Caspases in cell death, inflammation, and disease[J]. Immunity, 2019, 50(6): 1352-1364.
- [13] 彭伟,骆泓洁,元小冬.死亡受体介导的细胞凋亡研究进展[J].生命的化学,2016,36(5):629-632.
- [14] WAJANT H. The fas signaling pathway: more than a paradigm[J]. Science, 2002, 296(5573): 1635-1636.
- [15] WANG J, CHUNH J, WONG W, et al. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(24): 13884-13888.
- [16] SINGH R, LETAI A, SAROSIEK K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(3): 175-193.
- [17] DONG Y, CHEN H W, GAO J L, et al. Molecular machinery and interplay of apoptosis and autophagy in coronary heart disease[J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 136: 27-41.
- [18] 朱帅旗,段海潇,汪洋,等.NF- κ B 在非小细胞肺癌中的作用及治疗研究[J].生命科学,2022,34(4):409-419.
- [19] 马岁录,何志军,刘涛,等.中药调控核转录因子 κ B 信号通路减轻皮瓣缺血再灌注损伤[J].中国组织工程研究,2023,27(35):5721-5726.
- [20] LAWRENCE T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6): a001651.
- [21] GAPTULBAROVA K A, TSYGANOV M M, PEVZNER A M, et al. NF- κ B as a potential prognostic marker and a candidate for targeted therapy of cancer[J]. Exp Oncol, 2020, 42(4): 263-269.
- [22] ILCHOVSKA D, BARROW D M. An Overview of the NF- κ B mechanism of pathophysiology in rheumatoid arthritis, investigation of the NF- κ B ligand RANKL and related nutritional interventions[J]. Autoimmun Rev, 2021, 20(2): 102741.
- [23] 纪雨柔,张雯雯,曲芃芃.安罗替尼抗肿瘤机制的研究进展[J].中国新药杂志,2023,32(9):906-910.
- [24] DOLCET X, LLOBET D, PALLARES J, et al. NF- κ B in development and progression of human cancer[J]. Virchows Arch, 2005, 446(5): 475-482.
- [25] AGGARWAL B B. Nuclear factor-kappaB: the enemy within[J]. Cancer Cell, 2004, 6(3): 203-208.

[收稿日期:2023-08-21]

[责任编辑:杨建香 英文编辑:周寿红]