

南蛇藤提取物通过破坏线粒体结构促进胃癌 AGS 细胞 凋亡的机制

王海波, 罗园园, 冯心怡, 倪腾洋, 褚泽文, 朱森, 刘延庆*
(扬州大学医学院, 国家中医药管理局胃癌毒邪论治重点研究室,
扬州大学-扬州市肿瘤研究所, 江苏扬州 225001)

[摘要] 目的:观察南蛇藤提取物(COE)对胃癌细胞的抑制作用,探讨COE通过影响线粒体结构和功能促进胃癌凋亡的一种全新的作用机制,为南蛇藤的进一步开发和临床应用提供实验依据。方法:5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)染色联合流式细胞实验用来检测不同质量浓度COE(20、40、80 mg·L⁻¹)对胃癌细胞增殖的影响。通过膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(AnnexinV-FITC)染色实验联合流式细胞术检测COE对胃癌细胞凋亡的影响,用JC-1线粒体膜电位检测试剂盒检测线粒体膜电位的变化,通过蛋白免疫印迹法(Western blot)检测COE对胃癌细胞凋亡相关蛋白B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、B细胞淋巴瘤-xL(Bcl-xL)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)和胱天蛋白酶-3(Caspase-3)表达的影响,用透射电镜检测COE处理后的胃癌细胞线粒体微观结构的变化,包括线粒体膜完整性和内部嵴的变化。COE处理后,Western blot检测胃癌细胞线粒体标志蛋白超氧化物歧化酶1(SOD1)、电压依赖性阴离子通道蛋白(VDAC)、抗增殖蛋白1(PHB1)和热休克蛋白60(HSP60)水平的变化。结果:BrdU染色显示,与空白组比较,COE组(40、80 mg·L⁻¹)胃癌细胞的增殖比例明显下降($P<0.05$)。AnnexinV-FITC染色显示,与空白组比较,COE组(40、80 mg·L⁻¹)胃癌细胞的凋亡数量明显增加($P<0.05$)。JC-1线粒体膜电位检测显示,COE处理后组胃癌细胞的线粒体膜电位水平明显降低。Western blot结果显示,与空白组比较,COE组(20、40、80 mg·L⁻¹)促进胃癌凋亡的相关蛋白Bax和Caspase-3表达明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),COE组(40、80 mg·L⁻¹)胃癌细胞凋亡抵抗相关蛋白Bcl-2和Bcl-xL表达显著降低($P<0.01$)。透射电镜结果显示,与空白组比较,COE组胃癌细胞的微观结构发生了明显变化,细胞膜内出现了很多空泡,线粒体结构出现破坏,线粒体内出现空泡。Western blot结果显示,与空白组比较,COE组(20、40、80 mg·L⁻¹)胃癌细胞中与应激反应有关的蛋白SOD1表达增高($P<0.05$, $P<0.01$),COE组(80 mg·L⁻¹)与线粒体稳定和通透性相关的蛋白VDAC、PHB1和HSP60表达均显著下降($P<0.01$)。结论:COE能够显著抑制胃癌细胞的增殖,促进胃癌细胞的凋亡,其机制可能与COE破坏胃癌细胞线粒体结构和功能从而激活细胞线粒体凋亡途径有关。

[关键词] 南蛇藤提取物; 线粒体; 胃癌; 凋亡

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)18-0046-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221823

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220630.1126.001.html>

[网络出版日期] 2022-06-30 20:48

Celastrus orbiculatus Extract Promotes Apoptosis of Gastric Cancer Cells by Destroying Mitochondrial Structure

WANG Haibo, LUO Yuanyuan, FENG Xinyi, NI Tengyang,
CHU Zewen, ZHU Miao, LIU Yanqing*

(Medical College, The Key Laboratory of Syndrome Differentiation and Treatment of Gastric Cancer of the
State Administration of Traditional Chinese Medicine, Yangzhou University-Yangzhou Cancer Research
Institute, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

[收稿日期] 2022-04-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82104946,81773944);江苏省自然科学基金项目(BK20210817);江苏省中医药科技发展计划项目(QN202008);扬州市重点研发计划(社会发展)项目(YZ2019063)

[第一作者] 王海波,博士,讲师,从事中西医结合抗肿瘤的临床与基础研究,E-mail:whbosy@163.com

[通信作者] *刘延庆,博士,教授,从事中西医结合抗肿瘤的临床与基础研究,E-mail:yzumpi@163.com

[Abstract] Objective: To study the inhibitory effect of *Celastrus orbiculatus* extract (COE) on gastric cancer cells, to clarify the specific mechanism of COE promoting the apoptosis of gastric cancer cells by affecting the mitochondrial structure and function, and to provide an experimental basis for the further development and clinical application of *C. orbiculatus*. **Method:** Brdu staining combined with flow cytometry and Annexin V-fluorescein isothiocyanate (AnnexinV-FITC) staining combined with flow cytometry were employed to detect the effects of COE (20, 40, 80 mg·L⁻¹) on the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells, respectively. The changes in mitochondrial membrane potential were detected with JC-1 mitochondrial membrane potential assay kit. The expression of apoptosis-associated proteins including B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), B-cell lymphoma-xL (Bcl-xL), Bcl-2-associated X (Bax), and cysteine aspartate-specific protease-3 (Caspase-3) in gastric cancer cells was determined by Western blot. Transmission electron microscopy was employed to detect changes in the mitochondrial microstructure of gastric cancer cells exposed to COE. Western blot was employed to measure the expression of mitochondrial marker proteins [superoxide dismutase 1 (SOD1), voltage-dependent anion channel (VDAC), prohibitin 1 (PHB1), and heat shock protein 60 (HSP60)] in gastric cancer cells. **Result:** Compared with the control group, COE (40, 80 mg·L⁻¹) inhibited the proliferation and promoted the apoptosis of gastric cancer cells ($P<0.05$). Furthermore, COE reduced the mitochondrial membrane potential of gastric cancer cells. Compared with the control group, COE (20, 40, 80 mg·L⁻¹) up-regulated the expression of Bax and Caspase-3 which promoted apoptosis of gastric cells ($P<0.05$, $P<0.01$), and COE at 40 and 80 mg·L⁻¹ down-regulated the expression of Bcl-2 and Bcl-xL which inhibited the apoptosis of gastric cancer cells ($P<0.01$). The results of transmission electron microscopy showed that COE changed the microstructure of gastric cancer cells, which led to the appearance of vacuoles in the cell membrane and mitochondria and damaged the mitochondrial structure. Compared with the control group, COE (20, 40, 80 mg·L⁻¹) changed the expression of mitochondrial marker proteins. Specifically, it up-regulated the expression of SOD1 involved in stress response ($P<0.05$, $P<0.01$) and down-regulated that of VDAC, PHB1, and HSP60 associated with mitochondrial stability and permeability ($P<0.01$). **Conclusion:** COE can significantly inhibit the proliferation and promote the apoptosis of gastric cancer cells. It may activate the mitochondrial apoptosis pathway by destroying the mitochondrial structure and function of gastric cancer cells.

[Keywords] *Celastrus orbiculatus* extract; mitochondria; gastric cancer; apoptosis

恶性肿瘤严重威胁着人类的健康,如何改善癌症患者的生存质量是个世界性的难题,胃癌在我国的发病率和死亡率均居高位^[1-3]。中晚期胃癌的预后十分不理想,而临床上尚未有治疗胃癌的特效药物,因此研究和开发新的抗胃癌新药具有非常重要的意义。中医药现在已经成为肿瘤临床治疗中的重要组成部分^[4-5],许多研究已经表明,中医药对胃癌的治疗具有很好的效果^[6-7]。中医药不仅可以显著缓解放化疗带来的副作用,还可以延长患者的生存期限^[8-10]。中药南蛇藤是本题组长期研究的抗肿瘤中药,南蛇藤有效成分的提取和用途已经获得国家发明专利授权(专利号 ZL200710025343.3)。南蛇藤具有抗炎、抗肿瘤、镇痛的作用。前期研究发现,其乙酸乙酯提取物(COE)对胃癌细胞的上皮间质转化(EMT)、侵袭和转移有抑制作用^[11-13],并可抑制多种肿瘤细胞生长和促进肿瘤细胞凋亡^[14-15],其

中的机制尚不完全清楚。近期研究发现,COE可以通过抑制胃癌细胞的肌动蛋白骨架重塑抑制侵袭转移和EMT^[16-17]。肌动蛋白骨架不仅是细胞形态和结构位置的重要物质也是亚细胞结构和功能维持的重要成分^[18-19]。COE处理后的胃癌细胞中线粒体出现了不同程度的变形和结构破坏,而线粒体途径又是细胞凋亡的主要途径之一^[20]。因此,通过影响线粒体结构和功能激活线粒体凋亡途径很可能是COE发挥促凋亡作用的重要机制之一。阐明COE促进肿瘤细胞凋亡的作用机制有助于研究和开发南蛇藤成为新的抗肿瘤中药。因此,本文拟在细胞水平研究COE对胃癌细胞凋亡的影响,阐明COE促进胃癌细胞凋亡的潜在分子机制,为南蛇藤开发成为新的抗肿瘤中药奠定实验基础。

1 材料

1.1 药物 南蛇藤购自广州致信药业有限公司(批

号070510),经中国药科大学中药资源研究所王强教授鉴定为卫矛科植物 *Celastrus orbiculatus* 的茎。南蛇藤提取物的鉴定、提取和纯化由中国药科大学王强教授课题组进行^[21]。将干燥的南蛇藤茎切碎、烘干,打成粉末,95%乙醇回流提取3次,回收溶剂得到浸膏,真空低温抽干,用乙酸乙酯热水浴回流加热,过滤,回收得到乙酸乙酯浸膏,提取物得率约2%,该程序的详细过程已在之前描述^[22-23]。COE粉末溶解在含有0.1%二甲基亚砜(DMSO)的完全培养基中,使用的时候稀释成工作浓度,空白组使用不含COE的0.1% DMSO的完全培养基作为对照。

1.2 细胞和试剂 人胃癌 AGS 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司,货号 CL-0022,传至 12 代。1640 培养基(美国 Hyclone 公司,批号 SH30809.01),胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 10270106),5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)染色试剂盒、联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)凋亡检测试剂盒(美国 Thermo 公司,批号分别为 8811-6600、331200),B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、B 细胞淋巴瘤-xL(Bcl-xL)、Bcl-2 相关 X 的蛋白(Bax)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、超氧化物歧化酶 1(SOD1)、电压依赖性阴离子通道蛋白(VDAC)、抗增殖蛋白 1(PHB1)、热休克蛋白 60(HSP60)和 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 15071、2762、2772、9665、4266、4661、2426、12165、4970),线粒体膜电位试剂盒(上海碧云天公司,批号 C2006)。

1.3 仪器 FACS Aria SORP 型流式细胞仪(美国 BD 公司),mini X25 型垂直电泳仪、Trans-blot SD 型转膜仪、ChemiDoc XRS+型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),IX7 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司),Tecnai 12 型透射电子显微镜(荷兰 Philips 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人胃癌 AGS 细胞培养于 1640 完全培养基中,培养皿放置于含 5%CO₂,37 °C 恒温培养箱中培养,细胞长满后用 0.25% 胰蛋白酶消化液消化并重悬成单细胞悬液待用。

2.2 BrdU 染色检测细胞增殖 将胃癌细胞接种在 6 孔板中,使每孔细胞数量为 1×10^5 个。待细胞贴壁后,用不同浓度的 COE 处理胃癌细胞。将细胞与 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BrdU 一起孵育 14 h。消化收集细胞,洗涤并重悬。在试管中加入染色工作液 1 mL,放置在室温 15 min。随后用染色缓冲液清洗细胞 2 次,上流式细胞仪检测。

2.3 Annexin V-FITC 检测细胞凋亡 将各组胃癌细胞以 1×10^6 个/mL 重悬在 100 μL 磷酸缓冲盐溶液中。然后将 Annexin V-FITC 10 μL 加到含有细胞的指型管中,并将混合物在室温下在避光再培养 15 min。使用流式细胞仪进行分析之前,立即将碘化丙啶(PI)添加到混合物中。

2.4 线粒体膜电位检测实验 JC-1 聚集在线粒体的基质中,形成聚合物,产生红色荧光;在线粒体膜电位较低时,JC-1 不能聚集在线粒体的基质中,此时 JC-1 为单体,产生绿色荧光。通过 JC-1 从红色荧光到绿色荧光的转变可以检测到细胞膜电位的下降,常用红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的比例。这种转变可作为细胞凋亡早期的一个检测指标。用不同浓度的 COE 处理胃癌细胞 24 h,加入 JC-1 工作液继续培养 20 min,然后用 JC-1 缓冲液洗涤 3 次,倒置荧光显微镜拍照分析。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测凋亡和线粒体相关蛋白 将 AGS 细胞接种于 6 孔培养板中,用含不同浓度 COE 的 1640 培养基处理 24 h。提取每组细胞中总蛋白质,凝胶电泳分离。将蛋白质电转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜上,取出 PVDF 膜,置入预先配好的封闭液中,放置脱色摇床上封闭 2 h。将 PVDF 膜置于抗体孵育盒中,稀释一抗(1:1 000)低温孵育过夜。次日,洗涤后再加入二抗稀释液(1:1 000)室温孵育 2 h。用凝胶成像分析系统检测蛋白质条带。

2.6 透射电镜观察线粒体微观结构 正常培养胃癌细胞,用 COE($40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)处理 24 h,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 AGS 细胞,清洗完后,收集细胞,用预冷的 2.5% 戊二醛固定 2 h 以上。随后用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 冲洗样品,在 1% 四氧化锇中固定 2 h,然后在乙醇梯度浓度下依次脱水 15 min。包埋切片在透射电子显微镜下观察。

2.7 统计学分析 所有数据采用 SPSS 19.0 统计软件处理,组间比较采用单因素方差分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 COE 对胃癌细胞增殖的影响 与空白组比较,COE 组($40, 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)处理胃癌细胞 24 h,细胞的增殖出现了明显减少($P < 0.05, P < 0.01$)。说明 COE 对胃癌细胞的增殖,具有显著的抑制作用。见表 1。

3.2 COE 对胃癌细胞凋亡的影响 与空白组比较,不同浓度 COE 处理胃癌细胞 24 h,胃癌细胞的早期

表1 COE对胃癌细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Effect of COE on proliferation of gastric cancer cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	增殖率/%
空白组		29.93±1.16
COE组	20	28.70±1.38
	40	26.03±0.63 ¹⁾
	80	18.13±2.10 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表2-表4同)

凋亡和晚期凋亡数量均增加,COE组(40、80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)显著增加胃癌细胞凋亡作用($P<0.01$)。说明COE能促进胃癌细胞凋亡的发生。见表2。

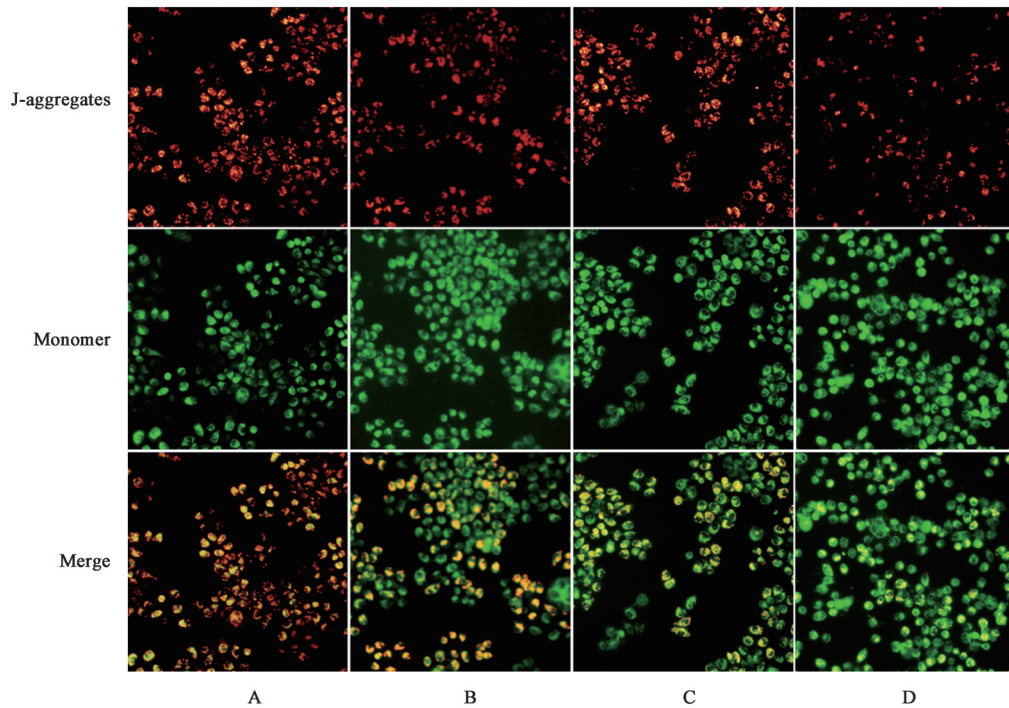
3.3 COE对胃癌细胞线粒体膜电位的影响 与空

表2 COE对胃癌细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of COE on early and late apoptosis of gastric cancer cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	早期凋亡	晚期凋亡
空白组		4.76±0.15	5.70±0.20
COE组	20	5.10±0.10	8.17±0.15 ²⁾
	40	7.17±0.15 ²⁾	8.60±0.10 ²⁾
	80	8.47±0.40 ²⁾	9.70±0.30 ²⁾

白组比较,COE处理后,聚集的JC-1发出的红色荧光明显减少了,单体的JC-1发出的绿色荧光增强了,这说明胃癌细胞的线粒体膜电位出现明显的下降。表明COE可以显著降低线粒体的膜电位水平,从而激活细胞的线粒体凋亡途径。见图1。



注:A. 空白组;B~D. COE组(20、40、80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)(图2、图4同)

图1 COE对胃癌细胞线粒体膜电位的影响 (Annexin V-FITC, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of COE on mitochondrial membrane potential in gastric cancer cells (Annexin V-FITC, $\times 100$)

3.4 COE对胃癌细胞凋亡相关蛋白的影响 与空白组比较,随着COE浓度的增加,促进胃癌凋亡的相关蛋白(Bax和Caspase-3)表达显著增加,与胃癌细胞凋亡抵抗相关的蛋白(Bcl-2和Bcl-xL)表达明显降低,COE组(40、80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)对凋亡相关蛋白表达影响更显著($P<0.01$)。说明COE可以促进胃癌细胞AGS的凋亡,而且与线粒体凋亡途径相关。见图2和表3。

3.5 COE对胃癌细胞线粒体微观结构的影响 为了进一步直观研究COE对胃癌细胞线粒体影响的

具体作用机制,运用透射电子显微镜来观测胃癌细胞内部的亚细胞超微结构。结果显示,与空白组比较,COE组胃癌细胞的胞质中出现许多气泡样的空泡,线粒体也出现了外膜不完整和内部空泡化的现象,线粒体内棘突结构和线粒体的外膜均出现明显结构破损。这可能是COE激活线粒体途径凋亡,促进胃癌细胞凋亡的潜在原因。见图3。

3.6 COE对胃癌细胞线粒体稳定相关蛋白的影响 与空白组比较,COE组胃癌细胞线粒体应激相关蛋白SOD1的表达明显增高($P<0.05$, $P<0.01$);线粒

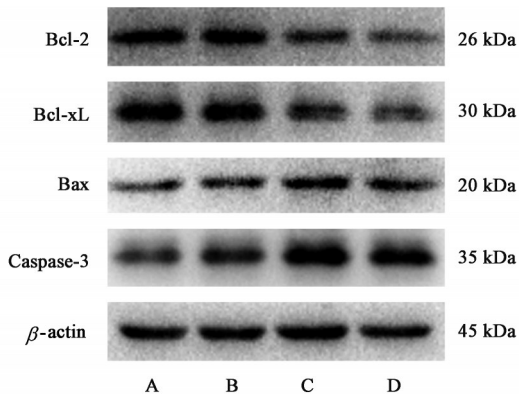


图2 COE对胃癌细胞凋亡相关蛋白电泳

Fig. 2 Electrophoresis of apoptosis-related proteins in gastric cancer cells after COE treatment

体电压依赖性阴离子通道蛋白VDAC在COE组(80 mg·L⁻¹)出现显著降低($P < 0.01$),线粒体稳定相关蛋白PHB1和HSP60蛋白表达显著降低($P < 0.01$)。表明COE不仅能够破坏线粒体的结构,降低线粒体的稳定,还能增加线粒体的通透性,从而

表3 COE对胃癌细胞凋亡相关蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of COE on apoptosis-related proteins in gastric cancer cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	Bcl-2/ β -actin	Bcl-xL/ β -actin	Bax/ β -actin	Caspase-3/ β -actin
空白组		100.0 \pm 3.00	100.0 \pm 8.67	100.0 \pm 6.93	100.0 \pm 7.00
COE组	20	94.0 \pm 8.54	98.3 \pm 5.51	115.0 \pm 5.00 ¹⁾	115.0 \pm 5.01 ¹⁾
	40	67.3 \pm 9.71 ²⁾	67.7 \pm 1.15 ²⁾	127.7 \pm 2.08 ²⁾	147.0 \pm 7.21 ²⁾
	80	44.0 \pm 9.54 ²⁾	39.7 \pm 5.03 ²⁾	125.3 \pm 4.51 ²⁾	144.7 \pm 4.73 ²⁾

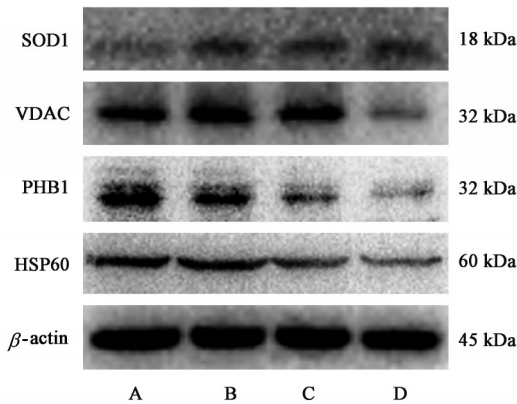
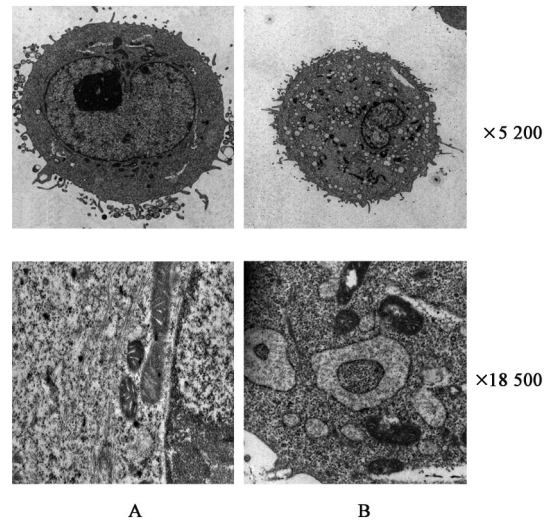


图4 COE处理后胃癌细胞线粒体相关蛋白电泳

Fig. 4 Electrophoresis of mitochondrial-related proteins in gastric cancer cells after COE treatment

4 讨论

中医药由于其确切的疗效和低不良反应,在癌症的临床治疗中发挥着重要的作用^[24]。有临床和基础研究表明,中医药可以显著延长癌症患者的生存期,提高癌症患者的生存质量^[25]。许多中药具有显著的抗肿瘤活性,可以明显抑制肿瘤细胞的增



注:A. 空白组;B. COE组(40 mg·L⁻¹)

图3 COE对胃癌细胞的微观结构变化的影响(透射电镜)

Fig. 3 Microstructural changes of gastric cancer cells after COE treatment (TEM)

诱发胃癌细胞的凋亡。见图4和表4。

殖、促进肿瘤细胞的凋亡、抑制肿瘤细胞的侵袭转移^[26-27]。本课题组研究发现中药南蛇藤及其提取物能够有效抑制胃癌细胞的侵袭转移,促进胃癌细胞的凋亡。但是其促进胃癌细胞凋亡的具体作用机制尚不完全清楚。本研究首先通过2个流式细胞学实验证实了COE抑制胃癌细胞增殖和促凋亡的作用。结果发现COE可以显著抑制胃癌细胞AGS的增殖,促进胃癌细胞AGS的凋亡。肿瘤细胞凋亡主要涉及细胞表面死亡受体介导的凋亡和线粒体凋亡途径^[28-30]。因此,可以推测COE促进胃癌细胞的凋亡作用可能是通过线粒体途径介导的。线粒体膜电位的降低是细胞凋亡早期的标志性事件^[31-32]。线粒体膜电位染色实验结果表明,COE显著改变了线粒体膜的通透性并降低线粒体膜电位。线粒体膜电位的变化主要受Bcl-2家族蛋白的调节^[33-34]。为了进一步阐明COE促进细胞凋亡的潜在分子机制,实验检测了Bcl-2和Caspase家族的细胞凋亡相关蛋白。Bcl-2家族包括Bcl-2和Bcl-xL,他们具有

表4 COE对胃癌细胞线粒体相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of COE on mitochondrial-related proteins in gastric cancer cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	SOD1/ β -actin	VDAC/ β -actin	PHB1/ β -actin	HSP60/ β -actin
空白组		100.0±2.64	100.0±8.88	100.0±7.00	100.0±3.46
COE组	20	116.0±7.81 ¹⁾	106.7±8.51	70.7±4.04 ²⁾	104.7±2.52
	40	115.1±3.00 ¹⁾	103.3±6.11	40.67±3.79 ²⁾	85.6±4.16 ²⁾
	80	122.0±5.29 ²⁾	31.3±7.09 ²⁾	17.3±4.93 ²⁾	49.67±5.03 ²⁾

抑制细胞凋亡的作用,而 Bax 是细胞凋亡诱导蛋白。Bcl-2 和 Bcl-xL 水平的降低会导致线粒体膜通透性的变化和细胞色素 C 的释放,从而形成凋亡小体复合物并激活 Caspase 蛋白家族^[35]。Caspase-3 是细胞凋亡关键蛋白 Caspase 家族蛋白的一种,是细胞凋亡的執行者^[36]。Caspase-3 的高表达,说明 COE 激活触发了细胞凋亡的最终过程。通过 Western blot 研究发现 COE 可以抑制 Bcl-2 和 Bcl-xL 蛋白的表达水平并上调 Bax 和 Caspase-3 的表达以促进细胞凋亡。这些结果共同表明 COE 触发了线粒体介导的细胞凋亡途径和 Caspase-3 的激活,该结论与上述流式细胞检测 results 和线粒体膜电位检测结果完全一致。

为了进一步研究 COE 触发线粒体途径促进胃癌细胞凋亡的具体机制,实验中用透射电镜观察了 COE 处理胃癌细胞线粒体微观结构的变化。结果显示,COE 处理后胃癌细胞的线粒体结构发生了显著变化,线粒体包膜出现了破损,线粒体内出现空包,线粒体棘突消失等。通过对线粒体相关蛋白的检测发现,COE 处理后,部分线粒体相关的蛋白发生显著变化。与应激反应有关的 SOD1 表达明显增高了,与线粒体膜通透性相关蛋白 VDAC 和与线粒体稳定相关的蛋白 PHB1 和 HSP60 表达均下降。这说明,线粒体结构的破坏直接导致了线粒体稳定性和通透性发生变化。线粒体是细胞能量来源的主要场所,线粒体功能障碍可能直接影响细胞的正常生物学行为,包括细胞分裂和增殖^[37-38]。不完整的线粒体膜结构也会加速细胞色素 C 的释放,促进细胞凋亡。这可能是 COE 促进胃癌细胞凋亡的另一种潜在的分子机制。这是一个新发现,COE 可以直接破坏细胞的能量产生过程促进细胞的凋亡。但是 COE 改变线粒体微观结构的具体分子机制还不清楚,需要更进一步的研究。

总之,本研究发现并初步阐明了 COE 促进胃癌细胞凋亡的新的生物学机制,即 COE 可以通过改变线粒体的结构和功能,激活线粒体凋亡途径诱导胃

癌细胞凋亡,这可能是 COE 抑制胃癌的另一个潜在途径。这些研究将为南蛇藤进一步开发临床应用奠定实验基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOMERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] FENG R M, ZONG Y N, CAO S, et al. Current cancer situation in China: Good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? [J]. Cancer Commun (Lond), 2019, 39(1):22-33.
- [3] CAO W, CHEN H, YU Y, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: A secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(7):783-791.
- [4] LI Z, FEI Z, GAOFENG L. Traditional Chinese medicine and lung cancer from theory to practice[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 137:111381-111384.
- [5] LUO H, VONG C T, CHEN H, et al. Naturally occurring anti-cancer compounds: Shining from Chinese herbal medicine [J]. Chin Med, 2019, 6(14):48-97.
- [6] SU X, WANG J, CHE H, et al. Clinical application and mechanism of traditional Chinese medicine in treatment of lung cancer [J]. Chin Med J (Engl), 2020, 133(24):2987-2997.
- [7] PAN X, TAO H, NIE M, et al. A clinical study of traditional Chinese medicine prolonging the survival of advanced gastric cancer patients by regulating the immunosuppressive cell population: A study protocol for a multicenter, randomized controlled trail [J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(16):e19757-e19761.
- [8] QI F, ZHAO L, ZHOU A, et al. The advantages of using traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy in the whole course of cancer treatment instead

- of only terminal stage of cancer [J]. *Biosci Trends*, 2015, 9(1):16-34.
- [9] 许博文, 吴静远, 李杰, 等. 肿瘤中成药上市后生存获益评价的探索与实践[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(8):1980-1987.
- [10] XU X, DENG W, WANG D, et al. Chinese medicine treatment prolonged survival in small cell lung cancer patients: A clinical observation [J]. *Chin J Integr Med*, 2021, 27(7):496-501.
- [11] ZHU Y, LIU Y, QIAN Y, et al. Antimetastatic effects of *Celastrus orbiculatus* on human gastric adenocarcinoma by inhibiting epithelial-mesenchymal transition and NF- κ B/Snail signaling pathway [J]. *Integr Cancer Ther*, 2015, 14(3):271-281.
- [12] ZHU Y, LIU Y, QIAN Y, et al. Research on the efficacy of *Celastrus orbiculatus* in suppressing TGF- β_1 -induced epithelial-mesenchymal transition by inhibiting HSP27 and TNF- α -induced NF- κ B/Snail signaling pathway in human gastric adenocarcinoma [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14:433-444.
- [13] 王海波, 顾昊, 赵雪煜, 等. 南蛇藤提取物通过调控基质金属蛋白酶组及其抑制因子抑制人胃癌 SGC-7901 细胞侵袭转移的研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(08):1345-1350.
- [14] WANG W, ZHOU Y, YAO Q, et al. *Celastrus orbiculatus* extract potentiates the sensitivity of cisplatin via Caspase-dependent apoptosis in gastric cancer [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2018, 18(15):2206-2211.
- [15] JIN F, ZHU G, LI D, et al. *Celastrus orbiculatus* extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human esophageal squamous carcinoma ECA-109 cells in vitro via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(2):1591-1599.
- [16] WANG H, GU H, FENG J, et al. *Celastrus orbiculatus* extract suppresses the epithelial-mesenchymal transition by mediating cytoskeleton rearrangement via inhibition of the Cofilin 1 signaling pathway in human gastric cancer [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3):2926-2932.
- [17] 王海波, 钱亚云, 朱耀东, 等. 南蛇藤提取物通过 Cofilin 1 调控细胞骨架重组抑制人胃癌细胞上皮间质转化(EMT)的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(2):303-307.
- [18] 刘瑞姣, AMER A, 高兴华, 等. 肌动蛋白结构与生物学功能的研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42(10):1870-1875.
- [19] POLLARD T, COOPER J. Actin, a central player in cell shape and movement [J]. *Science*, 2009, 326(5957):1208-1212.
- [20] ABATE M, FESTA A, FALCO M, et al. Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 98:139-153.
- [21] 管珂, 陈筱清, 王强, 等. 南蛇藤茎的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2007(10):1455-1457.
- [22] 张舰, 许运明, 刘延庆. 南蛇藤提取物体外抑瘤作用研究 [J]. *中药药理与临床*, 2006(Z1):99-101.
- [23] ZHANG H, QIAN Y, LIU Y, et al. *Celastrus orbiculatus* extract induces mitochondrial-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Tradit Chin Med*, 2012, 32(4):621-626.
- [24] XIANG Y, GUO Z, ZHU P, et al. Traditional Chinese medicine as a cancer treatment: Modern perspectives of ancient but advanced science [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(5):1958-1975.
- [25] HE X, HAN S, LI P. Recent highlights of Chinese medicine for advanced lung cancer [J]. *Chin J Integr Med*, 2017, 23(5):323-330.
- [26] WANG K, CHEN Q, SHAO Y, et al. Anticancer activities of TCM and their active components against tumor metastasis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133:111044-111061.
- [27] HE J, YIN P, XU K. Effect and molecular mechanisms of traditional Chinese medicine on tumor targeting tumor-associated macrophages [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14:907-919.
- [28] BURKE P. Mitochondria, bioenergetics and apoptosis in cancer [J]. *Trends Cancer*, 2017, 3(12):857-870.
- [29] BOCK F, TAIT S. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(2):85-100.
- [30] CHENG A, LEE M, TSAI M, et al. Rosmanol potently induces apoptosis through both the mitochondrial apoptotic pathway and death receptor pathway in human colon adenocarcinoma COLO 205 cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(2):485-493.
- [31] LA P, FRANSVEA E, MARZULLI D, et al. Mitochondrial membrane potential supported by exogenous cytochrome c oxidation mimics the early stages of apoptosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 246(2):556-561.
- [32] HU D, KIPPS T. Reduction in mitochondrial membrane potential is an early event in Fas-independent CTL-mediated apoptosis [J]. *Cell*

- Immunol, 1999, 195(1):43-52.
- [33] LIU M, LI S, XIN Y, et al. Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)-induced reactive oxidative species protects human hepatic stellate cells from apoptosis by regulating Bcl-2 family proteins and mitochondrial membrane potential[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(10):18074-18081.
- [34] WU J, LIN T, WU K. Rosiglitazone and PPAR-gamma overexpression protect mitochondrial membrane potential and prevent apoptosis by upregulating anti-apoptotic Bcl-2 family proteins[J]. J Cell Physiol, 2009, 220(1):58-71.
- [35] PORTER A, JÄNICKE R U. Emerging roles of Caspase-3 in apoptosis[J]. Cell Death Differ, 1999, 6(2):99-104.
- [36] RADOVIĆ N, CUCIĆ S, ALTARAC S. Molekularni aspekti apoptoze [J]. Acta Med Croatica, 2008, 62(3):249-256.
- [37] MISHRA P, CHAN D. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(10):634-646.
- [38] VAN D, SEDENSKY M, MORGAN P. Cell Biology of the mitochondrion[J]. Genetics, 2017, 207(3):843-871.
- [责任编辑 张丰丰]

·书讯·

代谢综合征患者服用瑞舒伐他汀的临床作用 ——评《代谢综合征社区宣教及家庭防治》

随着我国老龄化社会的到来,急性心肌梗死,心力衰竭等严重心血管病患者显著增加。发挥社区和家庭在心脏康复中的作用,早期的心脏康复训练,有利于延缓患者疾病的改善。代谢综合征(MS)是一组复杂的代谢紊乱症候群。肥胖是其主要的病理基础,胰岛素抵抗(IR)是其发病的核心机制,炎症反应和氧化应激带来的影响也不容忽视,常导致动脉粥样硬化性心血管病是2型糖尿病(T2DM)患者致死和致残的主要原因。近年来随着人们生活方式和饮食结构的改变,代谢综合征的发病率逐渐升高。代谢综合征的临床治疗包括通过合理饮食、适量运动来减轻体重,通过二甲双胍降糖药物来增加胰岛素敏感性,减轻胰岛素抵抗,改善血脂紊乱。

《代谢综合征社区宣教及家庭防治》由郭航远主编,浙江大学出版社2020年12月出版。该书以问答的形式全面介绍了代谢综合征的基本概念和常识、危险因素、临床表现和诊断、药物治疗、介入治疗和外科治疗、中医治疗、运动和饮食处方、日常生活和家庭调养等,其中在“药物治疗”章节中,详细介绍了利尿剂等降压药、双胍类降糖或噻唑烷二酮类等药物,对代谢综合征的治疗提供了充分可靠的依据。全书内容逻辑清楚,层次分明,作者注重写作的科学性、趣味性与实用性,力求内容丰富、通俗易懂,深入浅出的介绍代谢综合征的防治问题,从饮食、运动、心理、日常生活等方面提高患者的生活质量。他汀类药物在治疗高胆固醇血症、心脑血管病方面发挥了重要作用,在改善内皮功能、胰岛素抵抗方面抗炎、抗氧化、降血压、降尿酸等也有突出作用。本文根据书中介绍的瑞舒伐他汀在代谢综合征治疗中的应用。其是一种选择性HMG-CoA还原酶抑制剂,主要作用部位是肝—降低胆固醇的靶器官,可以增加肝胆固醇细胞表面的受体数目,这就使得胆固醇的吸收和分解代谢加速,同时抑制了肝脏中极低密度脂蛋白的合成,由此降低低密度脂蛋白和胆固醇微粒的总数。在临床中,血管内皮功能障碍是高血压、高脂血症及II型糖尿病等代谢综合征的病理学基础。当患者体内存在不同程度的内皮功能受损时,可导致内皮细胞源性的舒血管物质NO生成减少、缩血管物质ET-1增多,使血管内皮依赖性舒张功能受损,引起内皮功能障碍,导致动脉粥样硬化和心血管疾病的发生率明显增加。瑞舒伐他汀具有抗氧化作用,可以通过阻断Rho家族中小GTP结合蛋白活性,同时通过mRNA和蛋白质表达水平提高抗氧化酶活性。瑞舒伐他汀能够抑制血管平滑肌细胞的增生,类异戊二烯在此过程中起到重要作用,可抑制类异戊二烯参与的细胞增殖过程。瑞舒伐他汀可以抑制炎症因子的表达,他汀类药物可减少细胞核的相关核转录因子的释放,进一步使黏附分子、炎症因子的数量减低,促炎症因子的水平下降。瑞舒伐他汀可以通过抑制血栓素A₂的生成来抗血小板聚集,以此减少其对血管内皮的损害。患者总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),内皮素(ET),高敏C反应蛋白(hs-CRP)等指标均显著降低,说明其降脂作用良好。瑞舒伐他汀分子的其余结构却与其他同类药物有较大差异,药代动力学中表明瑞舒伐他汀具有两个最强的亲水性他汀类药物,他不仅具有他汀类药物共有的有效基团二羟基庚酸部分,还存在极性的甲磺氨基,呈现出较低的亲脂性。可以通过选择性有机阴离子转运过程而为肝细胞大量摄入,具有选择性分布并作用于肝中HMG-CoA还原酶的特点,与其他的药物相互作用机率大幅度低。瑞舒伐他汀与其他药物之间的相互作用较多,所以要注意多种药物联用的相互影响。

《代谢综合征社区宣教及家庭防治》一书较全面反应代谢综合征诊疗、社区宣教和家庭防治方面的保健书,适用于基层医院的医务人员和社区保健医师,也可以作为高等院校学生、研究生的参考用书。

[基金项目] 邢台市重点研发计划自筹项目(2020ZC194)

(作者赵亚楠¹,高少科¹,李思²,1.华北医疗健康集团邢台总医院,河北邢台054000,2.河北省退役军人总医院,河北邢台054000)