

# 重楼皂苷 I 诱导 G<sub>2</sub>/M 期阻滞及干扰微管结构 抗结肠癌 HCT116 细胞作用机制

于思<sup>1,2</sup>, 曹治兴<sup>1,2</sup>, 杨雨婷<sup>1,2</sup>, 白姣姣<sup>1</sup>, 彭成<sup>1,2\*</sup>, 李玉芝<sup>1,2\*</sup>

(1. 成都中医药大学, 成都 611137;

2. 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室, 成都 611137)

**[摘要]** 目的:探讨重楼皂苷 I (PPI) 对人结肠癌 HCT116 细胞周期的影响,并研究其作用机制。方法:采用四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT) 检测 PPI 对 HCT116 细胞的体外抑制活性;采用 Hoechst33258 染色法观察 PPI 对 HCT116 细胞核数量的影响;采用流式细胞仪检测 PPI 对 HCT116 细胞周期的影响;采用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测细胞中细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDC2) 和细胞分裂周期蛋白 25 同源蛋白 C (CDC25C) 蛋白的表达和活性,利用细胞免疫荧光和激光扫描共聚焦显微镜检测 PPI 对 HCT116 细胞微管的影响。结果:PPI 以剂量-时间依赖的方式抑制 HCT116 的体外增殖,Hoechst 33258 染色发现 PPI 处理组双核细胞数量明显增加 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );将其细胞周期阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期;PPI 未能抑制 G<sub>2</sub>/M 期相关蛋白 CDC2, CDC25C 的表达和活性,却有促进作用;PPI 可导致细胞微管结构紊乱。结论:PPI 会导致 HCT116 细胞阻滞在 G<sub>2</sub>/M 期,其作用机制与干扰细胞内微管结构有关。

**[关键词]** 重楼皂苷 I; HCT116 细胞; G<sub>2</sub>/M 期阻滞; 微管

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)06-0149-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2017060149

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161228.1152.048.html>

**[网络出版时间]** 2016-12-28 11:52

## Mechanism of Polyphyllin I in Inhibiting HCT116 Cells Based on Inducing G<sub>2</sub>/M Arrest and Interfering Microtubule Structure

YU Si<sup>1,2</sup>, CAO Zhi-xing<sup>1,2</sup>, YANG Yu-ting<sup>1,2</sup>, BAI Jiao-jiao<sup>1</sup>, PENG Cheng<sup>1,2\*</sup>, LI Yu-zhi<sup>1,2\*</sup>

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China;

2. State Key Laboratory of Systematic Research and Exploitation of TCM, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of polyphyllin I (PPI) on the cell cycle of human colon cancer cell line HCT 116, and investigate the mechanism. **Method:** 3- (4, 5-dimethyl-2 thiazolyl) -2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) assay was used to detect the inhibitory activity of PPI on HCT116 cells *in vitro*, then effect of PPI on the number of HCT116 cellular nuclear was observed by Hoechst 33258 staining; flow cytometry was used to detect the cell cycle changes of HCT116 cells. Western blot assay was used to detect the expression and activity of cell division cyclin2 (CDC2), cell division cyclin25 homolog C (cdc25c) protein in cells; and immunofluorescence and confocal laser scanning microscope were used to detect the effect of PPI on cell microtubules of HCT116 cells. **Result:** MTT assay showed that PPI inhibited the proliferation of HCT116 in a dose-

**[收稿日期]** 20160706(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81300437,81403149);四川省中医药管理局青年基金项目(2016Q054);成都中医药大学基金项目(ZRQN1450,CGPY140)

**[第一作者]** 于思, 硕士, 从事中药药理学研究, Tel:18282960850, E-mail:515098851@qq.com

**[通讯作者]** \* 彭成, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事中药药理与毒理研究, Tel:028-61800005, E-mail:pengchengchengdu@126.com;

\* 李玉芝, 博士, 讲师, 从事生药学和中药药理学研究, Tel:028-61800234, E-mail:liyuzhi5654@163.com

time dependent manner. Hoechst 33258 nuclear staining showed that there the number of dual-core cells in PPI group was significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); flow cytometry showed that the cell cycle was arrested in  $G_2/M$  phase. Western blot assay indicated that PPI could not inhibit but could promote the expression and activity of the  $G_2/M$  phase related proteins CDC2 and CDC25C. In addition, in confocal laser scanning microscope detection, we found that PPI could lead to cell microtubules disorder. **Conclusion:** PPI could make the HCT116 cells arrested in  $G_2/M$  phase, and the action mechanism is related to interference with microtubule structure.

[**Key words**] polyphyllin I; HCT 116;  $G_2/M$  phase arrest; microtubule

结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,全球发病率居肿瘤类疾病第 3 位,且死亡率高,严重危害人们的健康与生命<sup>[1]</sup>。早期结肠癌以手术为主要治疗手段,中晚期以放疗、化疗、联合治疗、分子靶向疗法为主要手段。虽然结肠癌的诊断和治疗已经取得很大发展,但目前仍面临巨大挑战,大多数患者确诊时已进入中晚期,预后较差,容易出现耐药,并且传统化疗药物具有明显的细胞毒性<sup>[2]</sup>。所以开发新的有效的结肠癌化疗药物具有重要意义。

中医及中药在治疗肿瘤方面具有独特的优势,从中药中提取的许多活性成分对肿瘤细胞都有一定的抑制作用。中药重楼具有清热解毒,消肿止痛,凉肝定惊等功效。重楼皂苷 I (PPI) 是重楼的主要活性成分之一<sup>[3]</sup>,具有抗肿瘤、抗感染、止血、抗血管生成、抗骨质疏松、抗氧化等多种药理作用<sup>[4]</sup>。研究表明 PPI 抗肿瘤活性最为突出,主要是通过抑制细胞增殖,促进凋亡,影响细胞周期来达到抗肿瘤的作用。对宫颈癌<sup>[5]</sup>、卵巢癌<sup>[6]</sup>、胰腺癌<sup>[7]</sup>、人乳腺癌<sup>[8]</sup>、人骨肉瘤<sup>[9]</sup>等多种肿瘤细胞具有抑制作用,但尚未有 PPI 对结肠癌细胞 HCT116 抑制作用的相关报道,为了进一步开发利用 PPI,同时寻找抑制结肠癌的药物,本研究以 HCT116 细胞作为研究对象,观察 PPI 对人结肠癌细胞的体外抑制作用,并探讨其作用机制。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人结肠癌细胞株 HCT116 购自于美国模式培养物收藏中心(ATCC)。

**1.2 药物** PPI(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-15061611)。将 PPI 溶解于二甲基亚砜(DMSO, Sigma 公司,批号 D5879),配制成  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的母液备用。

**1.3 试剂及仪器** 噻唑蓝(MTT),胰酶(Sigma 公司,批号分别为 # MKBR6576V, SLBM5252V); Hoechst33258 试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号 C1011); RPMI1640 培养基(Hyclone 公司,批号 AAK208935);胎牛血清(草原绿野生物工程材料有

限公司,批号 151201);总蛋白(TP)测定试剂盒(考马斯亮蓝法,南京建成生物工程研究所,批号 20160118);细胞 DNA 含量检测试剂盒(凯基生物科技发展有限公司,批号 20160307);抗体细胞周期蛋白依赖性激酶(CDC25C),细胞分裂周期蛋白 25 同源蛋白 C (Phospho-CDC25C), Alpha/Beta-散管(tublin)(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 4688T,9529S,2148S);CDC2(成都正能生物技术有限责任公司,批号 EE0903);FITC 荧光二抗(美国 Proteintech 公司,批号 20000033); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin),辣根酶标记的山羊抗鼠,山羊抗兔(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 141205,120646,109525)。

DMI300B 型倒置荧光显微镜(美国 Leica 公司);PowerPac™ Basic 型电泳仪,PowerPac™ Basic 型转膜仪(新加坡 Bio-Rad 公司);AJ37097 型流式细胞仪,X30R 型高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司);MCV13161FT 型超净台(日本 Sanyo 公司);Multiskan Mk3 型酶标仪[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司];FV1000 型激光扫描共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 人结肠癌 HCT116 细胞培养在含 10% 胎牛血清,  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素,  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  链霉素的 RPMI 1640 培养液中,并置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中孵育,每 2 ~ 3 d 用 0.25% 的胰酶消化传代,进行实验时选用对数生长期的细胞。

**2.2 MTT 法检测细胞活力** 取对数生长期 HCT116 细胞,调整细胞密度为  $4 \times 10^4$  个/mL,接种于 96 孔板内,每孔  $100 \mu\text{L}$ 。待细胞完全贴壁后,分别加入含梯度质量浓度(10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )PPI 的 RPMI 1640 培养基,同时设置不含药物和细胞的空白组和仅含溶剂的溶剂组,每个浓度设 3 个复孔。分别培养 24, 48, 72 h 后,加入  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 溶液  $20 \mu\text{L}$ 。培养箱内孵化 4 h 后,弃各孔内上清,加入 DMSO  $150 \mu\text{L}$  终止反应,振荡

10 min,待各孔结晶完全溶解后,用酶标仪在 490 nm 处测定各孔吸光度  $A$ 。按照公式:细胞增殖抑制率 =  $[(1 - (A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白组}})) / (A_{\text{溶剂组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$ ,统计计算各浓度药物的抑制率。实验重复 3 次。

**2.3** Hoechst 33258 荧光染色检测细胞核及细胞形态变化 取对数生长期的 HCT116 细胞,以  $3 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板。培养过夜,移除原培养液加入含梯度质量浓度(0.5, 1, 2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) PPI 的完全培养基,并设置溶剂孔。培养 12, 24, 36 h 后,弃培养液,并用磷酸缓冲液(PBS)洗 3 次,每次 3 min,再加入终质量浓度为 10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Hoechst 33258 避光染色 15 min,弃染色液,用 PBS 洗去细胞外的 Hoechst 33258 染液,置于倒置荧光显微镜(激发波长 350 nm,发射波长 460 nm)下观察并拍摄细胞和荧光细胞核图片。实验重复 3 次。

**2.4** 流式细胞仪检测细胞周期 取对数生长期的 HCT116 细胞,以  $2 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板,继续培养 24 h 后,分别加入含 PPI 终质量浓度为 0.5, 1, 2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的完全培养基,并设置溶剂组。20 h 后,弃去上层培养液,用 PBS 洗 1 次,加入胰酶消化,收集细胞,用预冷 70% 乙醇 4  $^{\circ}\text{C}$  固定过夜,经离心去乙醇, PBS 洗涤后加入核糖核酸酶(RNase) 100  $\mu\text{L}$  重悬细胞,并室温孵育 30 min 后,再加入碘化丙啶(PI) 400  $\mu\text{L}$  避光染色 15 min 后,利用流式细胞仪检测各组细胞内 DNA 的含量并分析细胞周期。实验重复 3 次。

**2.5** 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达

取对数生长期的 HCT116 细胞以  $3 \times 10^6$  个/皿接种至培养皿中。培养过夜,待细胞完全贴壁后分别加入终质量浓度为 0.25, 0.5, 1, 2, 4  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 PPI, 并设置溶剂组。作用 12 h 后,弃培养液,并用预冷 PBS 洗 1 次,加入细胞裂解液反应 10 min,用细胞刮收集裂解物,经超声破损和低温离心后提取蛋白。按照总蛋白(TP)测定试剂盒说明书,采用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,并调整各组蛋白浓度,使最终各组蛋白上样量为 30  $\mu\text{g}$ 。采用凝胶电泳分离蛋白质,经转膜,脱脂奶粉封闭 2 h 后,加入一抗(1: 1 000)孵育液于 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。次日,用洗脱液漂洗 3 次,每次 10 min,再加入二抗(1: 1 000)于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次,每次 10 min。采用增强化学发光法显色成像。蛋白相对表达水平采用 Image J 软件统计分析。实验重复 3 次。

**2.6** 细胞免疫荧光检测蛋白表达 取对数生长期

的 HCT116 细胞,以  $3 \times 10^5$  个/皿接种于 0.17 mm 厚玻璃底细胞培养皿中,培养过夜,待细胞贴壁后,分别加入含溶剂培养基和含 2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 PPI 含血清培养基继续培养 20 h。20 h 后,用 PBS 洗 3 次,4% 多聚甲醛室温固定 20 min,经 PBS 洗去多聚甲醛后,用 0.2% Triton-X-100 室温通透 15 min,再经 PBS 洗涤后,由 5% 牛血清白蛋白室温封闭 30 min,随后加入 Alpha/Beta-tubulin 一抗(1: 100)孵育液,置于 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。次日,取出并用 PBS 洗 3 次,每次 5 min,避光条件孵育 FITC 标记的荧光二抗(1: 100)于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h,最后经 PBS 洗涤后,利用激光扫描共聚焦显微镜在 488 nm 激发波长条件下观察细胞内微管的分布。实验重复 3 次。

**2.7** 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组内比较采用  $t$  检验,组间比较采用方差分析,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1** PPI 对细胞增殖的影响 不同浓度的 PPI 作用于 HCT116 细胞 24, 48, 72 h 后,其半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )分别为(3.671  $\pm$  0.382), (1.19  $\pm$  0.250), (0.712  $\pm$  0.199)  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。PPI 对细胞的抑制作用随着浓度的升高和时间的延长而增强,表明 PPI 以剂量-时间依赖的方式抑制 HCT116 的增殖。见图 1。

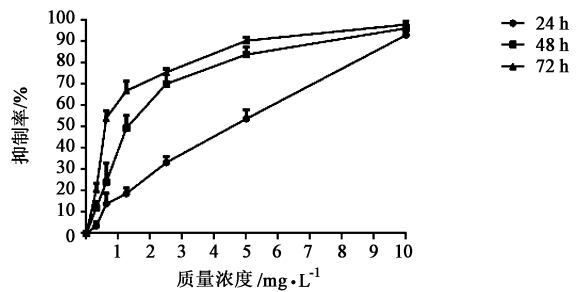
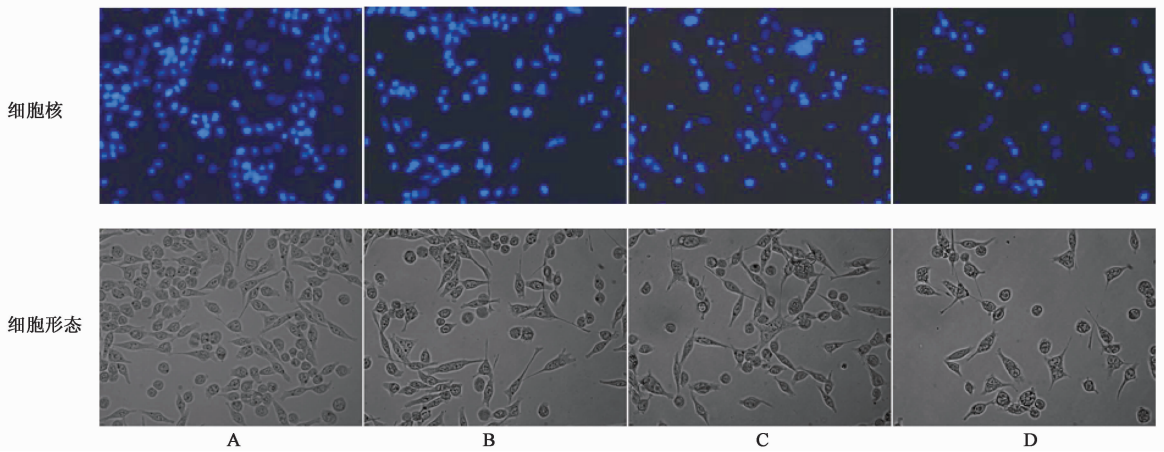


图 1 PPI 作用 24, 48, 72 h 对 HCT116 细胞的增殖抑制影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 1 Effect of PPI on inhibition rate of HCT116 cells after 24, 48 and 72 h ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

**3.2** PPI 对细胞核及细胞形态变化的影响 经 Hoechst33258 染色后,溶剂组细胞核形态完整、大小均匀;与溶剂组比较,经 1, 2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PPI 处理 12, 24, 36 h 后,双核细胞数量明显增多,且随剂量增加及作用时间的延长,双核细胞所占百分比明显增高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 2,表 1。

**3.3** PPI 对 HCT116 细胞  $G_2/M$  期的影响 不同浓度 PPI 作用于 HCT116 细胞 20 h 后,与溶剂组比较, PPI 组能够明显将细胞周期阻滞在  $G_2/M$  期,其中溶剂组, PPI(0.5, 1, 2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组作用细胞后,其  $G_2/M$



A. 溶剂组; B~D. PPI(0.5, 1, 2 mg·L<sup>-1</sup>)组

图 2 PPI 作用 24 h 对 HCT116 细胞核及细胞形态的影响 (Hoechst 33258, ×400)

Fig. 2 Effect of PPI on nucleus and cell morphology of HCT116 cells after 24 h (Hoechst 33258, ×400)

表 1 PPI 不同质量浓度及时间点对双核细胞所占比例的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of different concentrations and time points of PPI on proportion of dual-core cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度 / mg·L <sup>-1</sup>	12 h	24 h	36 h
溶剂	-	0.31 ± 0.005 3	2.17 ± 0.007 3	2.67 ± 0.005 7
PPI	0.5	2.34 ± 0.003 9 <sup>1)</sup>	2.47 ± 0.002 7	3.56 ± 0.005 0
	1	5.85 ± 0.008 3 <sup>1)</sup>	7.26 ± 0.004 0 <sup>1)</sup>	8.12 ± 0.006 9 <sup>1)</sup>
	2	9.55 ± 0.004 4 <sup>1)</sup>	13.63 ± 0.008 8 <sup>2)</sup>	18.67 ± 0.005 8 <sup>2)</sup>

注:与溶剂组比较<sup>1)</sup>P < 0.05, <sup>2)</sup>P < 0.01(表 2 同)。

期细胞的比例分别是 (23.07 ± 1.65)%, (30.7 ± 2.05)%, (46.5 ± 2.9)%, (51.6 ± 3.45)%, 与溶剂

组比较,随着药物浓度的增加,PPI 对细胞 G<sub>2</sub>/M 期阻滞作用明显增强 (P < 0.05, P < 0.01)。见表 2。

表 2 PPI 作用 HCT116 细胞后对细胞周期分布的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of PPI on cell cycle distribution of HCT116 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度 / mg·L <sup>-1</sup>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> /M	S
溶剂	-	31.96 ± 1.30	23.07 ± 1.65	45.20 ± 1.50
PPI	0.5	36.80 ± 3.06	30.70 ± 2.05 <sup>1)</sup>	32.50 ± 1.04 <sup>2)</sup>
	1	22.46 ± 2.65 <sup>2)</sup>	46.50 ± 2.90 <sup>2)</sup>	31.03 ± 0.25 <sup>2)</sup>
	2	22.80 ± 1.74 <sup>2)</sup>	51.60 ± 3.45 <sup>2)</sup>	24.56 ± 5.59 <sup>2)</sup>

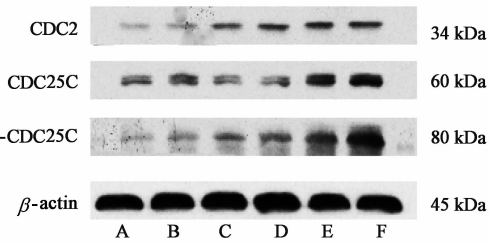
**3.4 PPI 对细胞相关蛋白表达的影响** PPI 作用 HCT116 细胞 12 h 后,与溶剂组比较,随着药物浓度的升高,PPI 能够上调 CDC2, CDC25C 等 G<sub>2</sub>/M 期相关调控蛋白的表达量,促进 CDC25C 的激活 (Phospho-CDC25C 含量增高) (P < 0.05)。见图 3,4。

**3.5 PPI 对 HCT116 细胞微管结构的影响** 经抗 Alpha/Beta-Tubulin 抗体和 FITC 标记的荧光二抗对 HCT116 细胞进行免疫荧光后,溶剂组微管结构分布均匀,微管结构未见明显异常。与溶剂组比较,PPI 组微管的分布及结构发生改变,微管分布不均

匀,且具有局部聚集的现象。见图 5。

#### 4 讨论

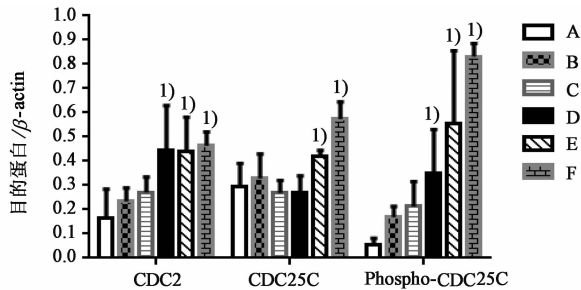
细胞周期 G<sub>2</sub>/M 期转换在肿瘤细胞生长和增殖过程中起着重要的作用,已成为抗肿瘤药物研究的重点领域<sup>[10]</sup>。CDC2 和 CDC25C 是细胞从 G<sub>2</sub> 期进入 M 期重要调控蛋白。CDC2 与 cyclinB<sub>1</sub> 形成的有丝分裂因子 (MPF),可以促进细胞从 G<sub>2</sub> 期进入 M 期<sup>[11-12]</sup>。在细胞进入 G<sub>2</sub>/M 期时,CDC25C 从胞浆转移至细胞核,磷酸化的 CDC25C 在细胞核内与 MPF 相互作用,增加 MPF 的稳定性,使有丝分裂的其他时相有序进行<sup>[13]</sup>。抑制细胞内有丝分裂因子



A. 溶剂组; B~F. PPI (0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg·L<sup>-1</sup>) 组 (图 5 同)

图 3 PPI 对 HCT116 细胞中 CDC2, CDC25C, Phospho-CDC25C 蛋白表达的影响

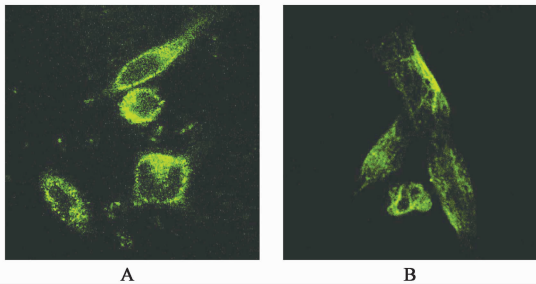
Fig. 3 Effect of PPI on expressions of CDC2, CDC25C, Phospho-CDC25C proteins in HCT116 cells



与溶剂组比较<sup>1)</sup> P < 0.05

图 4 PPI 对 HCT116 细胞中 CDC2, CDC25C, Phospho-CDC25C 蛋白相对表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of PPI on relative expressions of CDC2, CDC25C, Phospho-CDC25C proteins in HCT116 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



A. 溶剂组; B. PPI (2 mg·L<sup>-1</sup>) 组

图 5 PPI 对 HCT116 细胞微管的影响 (细胞免疫荧光, ×1 000)

Fig. 5 Effect of PPI on cell microtubules in HCT116 cells (immunofluorescence, ×1 000)

及相关蛋白的表达将引起 G<sub>2</sub>/M 期阻滞,影响有丝分裂过程的进行。

微管是细胞骨架的主要成分之一,由 αβ 两种微管蛋白聚合而成。微管的解聚及微管蛋白的聚合在细胞有丝分裂期间发挥重要的作用。肿瘤细胞具有异常增殖的能力,如果破坏微管解聚或者微管蛋白聚合会影响到纺锤体的形成,引起有丝分裂过程的阻断,使肿瘤细胞发生 G<sub>2</sub>/M 期阻滞。微管蛋白在细胞 G<sub>2</sub>/M 期发挥着关键作用,是细胞有丝分裂

过程的关键性作用蛋白<sup>[14]</sup>。微管干扰剂,如紫杉醇能够促进微管的聚合<sup>[15]</sup>,长春新碱能够抑制微管蛋白的聚合,从而不能形成微管<sup>[16]</sup>,使肿瘤细胞有丝分裂不能正常进行,最终将细胞阻滞在 M 期<sup>[17]</sup>,产生显著的抗肿瘤活性。另外,微管干扰剂在抗真菌、驱虫<sup>[18]</sup>等方面也具有较好前景。因此,微管干扰剂的研究与开发已成为抗肿瘤药物研究与开发的重要领域。

PPI 是中药重楼的主要活性成分之一,多项研究证明其在体内外均具有显著的抗肿瘤作用。有研究表明,PPI 通过调节 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax), 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3 (Caspase-3) 促进凋亡抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 体外生长<sup>[8]</sup>;通过影响 DNA 合成前期 (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) 引起 HO-8910PM 细胞的生长抑制及凋亡<sup>[19]</sup>;通过促进凋亡,引起细胞 G<sub>2</sub>/M 期阻滞,增强胰腺癌 PANC-1 细胞的放射敏感性<sup>[20]</sup>。本研究发现 PPI 能明显抑制结肠癌 HCT116 细胞的增殖,明显将 HCT116 细胞阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期,对 G<sub>2</sub>/M 期关键性调控蛋白 CDC2 和 CDC25C 的表达和活性未产生抑制作用,却增加了这些蛋白的表达和活性。进一步通过微管蛋白免疫荧光染色,利用激光扫描共聚焦显微镜观察细胞的微管结构,发现 PPI 会影响 HCT116 细胞内微管的结构,导致细胞不能进行正常的有丝分裂。因此,PPI 将 HCT116 细胞阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期源于对细胞内微管结构的影响,CDC2 和 CDC25C 表达和活性的升高可能是一种反馈作用。具体作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (2): 87-108.

[2] 吕强,邢沈阳,赵志辉,等. 结肠癌的研究现状及展望 [J]. 中国实验诊断学杂志, 2009, 13 (8): 1134-1137.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 260.

[4] 蔡鸽,刘洁. 重楼皂苷药理作用及其机制研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2015, 36 (12): 85-86.

[5] 程卉,苏婧婧,候会洁,等. 重楼皂苷 I 抗宫颈癌 HeLa 细胞作用及机制研究 [J]. 中药材, 2013, 36 (11): 1815-1819.

[6] GU L H, FENG J G, XU H Y, et al. Polyphyllin I inhibits proliferation and metastasis of ovarian cancer cell line HO-8910PM *in vitro* [J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33 (3): 325-333.

- [ 7 ] 江皓,赵鹏军,马胜林. 重楼皂苷 I 通过 PI3K/Akt 途径诱导胰腺癌 PANC-1 细胞凋亡的研究[J]. 肿瘤学杂志,2014,20(2):127-130.
- [ 8 ] 胡炜彦,李菊,贺智勇,等. 重楼皂苷 I 对人乳腺癌细胞 MCF-7 体内外生长的抑制作用[J]. 中成药,2015,37(7):1582-1585.
- [ 9 ] CHANG J L, WANG H S, WANG X Y, et al. Molecular mechanisms of Polyphyllin I-induced apoptosis and reversal of the epithelial-mesenchymal transition in human osteosarcoma cells [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 170:117-127.
- [ 10 ] XU J W, ZUO D Y, QI H, et al. 2-Methoxy-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl) seleninyl phenol (SQ0814061), a novel microtubule inhibitor, evokes G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 78:308-321.
- [ 11 ] Atherton-Fessler S, LIU F, Gabrielli B, et al. Cell cycle regulation of the p34cdc2 inhibitory kinases [J]. Mol Biol Cell, 1994, 5(9):989-1001.
- [ 12 ] Chow J P, Siu W Y, Ho H T, et al. Differential contribution of inhibitory phosphorylation of CDC2 and CDK2 for unperturbed cell cycle control and DNA integrity checkpoints [J]. Biol Chem, 2003, 278(42):40815-40828.
- [ 13 ] Toyoshima-morimoto F, Taiguchi E, Nishida E. Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase [J]. EMBO Rep, 2002, 3(4):341-348.
- [ 14 ] YIN P, Kawamura T, HE M, et al. Phenethyl isothiocyanate induces cell cycle arrest and reduction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin isotypes in human prostate cancer cells [J]. Cell Biol Int, 2009, 33(1):57-64.
- [ 15 ] Nogales E, Wolf S G, Khan I A, et al. Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site [J]. Nature, 1995, 375(6530):424-427.
- [ 16 ] Jordan M A. Mechanism of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin [J]. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2002, 2(1):1-17.
- [ 17 ] WU X, Sooman L, Lennartsson J, et al. Microtubule inhibition causes epidermal growth factor receptor inactivation in esophageal cancer cells [J]. Int J Oncol, 2013, 42(1):297-304.
- [ 18 ] Davidse L C. Antimiotic activity of methyl benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) in *Aspergillus nidulans* [J]. Pestic Biochem Physiol, 1973, 3(3):317-325.
- [ 19 ] 顾慧琳,冯建国,钱丽娟,等. 重楼皂苷对高转移人卵巢癌细胞体外生长抑制功能的研究[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(10):2212-2215.
- [ 20 ] 江皓,赵鹏军,冯建国,等. 重楼皂苷 I 对胰腺癌 PANC-1 细胞体外放射敏感性的影响[J]. 肿瘤学杂志, 2014, 20(6):483-487.

[责任编辑 张丰丰]