

六神丸和雄黄诱导子宫内膜癌细胞凋亡和DNA损伤的机制

刘正芸, 勾英, 姜念, 王欢, 刘杰*
(遵义医科大学, 贵州遵义 563000)

[摘要] 目的:比较经典名药六神丸和雄黄(As_4S_4)对子宫内膜癌细胞JEC的抗肿瘤作用及其机制。方法:原子吸收法测定六神丸与 As_4S_4 中砷(As)的溶解度;噻唑蓝(MTT)比色法比较六神丸与 As_4S_4 对细胞增殖的抑制作用,细胞迁移实验比较六神丸与 As_4S_4 对细胞迁移的抑制作用;磷脂酰丝氨酸蛋白抗体/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)双染结合流式细胞术比较六神丸与 As_4S_4 对细胞凋亡的影响,蛋白免疫印迹法(Western blot)比较六神丸与 As_4S_4 对凋亡和DNA损伤相关蛋白的影响。结果:原子吸收法测定结果显示六神丸的As溶出量为17.4%, As_4S_4 的As溶出量仅为1.6%。但在相同As含量的情况下,与 As_4S_4 组比较,六神丸3, 10 $mg \cdot L^{-1}$ 组的细胞存活率明显降低($P < 0.05$),六神丸0.25, 0.5, 1 $mg \cdot L^{-1}$ 组早期凋亡率明显增高($P < 0.05$),六神丸1 $mg \cdot L^{-1}$ 组细胞迁移率明显下降($P < 0.05$),六神丸1 $mg \cdot L^{-1}$ 组剪切的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved Caspase-3),剪切的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-7(cleaved Caspase-7),剪切的聚ADP核糖聚合酶(cleaved PARP)以及磷酸化的组蛋白(p-H₂AX),磷酸化的检测点激酶2(p-CHK2),人共济失调毛细血管扩张症突变激酶(ATM)蛋白表达水平升高($P < 0.05$),人共济失调毛细血管扩张症Rad3相关激酶(ATR)蛋白表达水平降低($P < 0.05$),而Caspase-3和Caspase-7蛋白表达水平无明显改变。结论:在等As剂量下,六神丸与 As_4S_4 均能抑制JEC细胞的增殖和迁移,诱导细胞凋亡和DNA损伤,但六神丸的效果优于 As_4S_4 ,提示中药复方六神丸中还有其他成分协同As共同参与抗肿瘤作用。

[关键词] 六神丸; 雄黄; 砷; 子宫内膜癌; 细胞凋亡; DNA损伤

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)14-0099-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201421

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20200502.1322.001.html>

[网络出版日期] 2020-5-6 12:27

Mechanism of Liushenwan and Realgar in Inducing Apoptosis and DNA Damage in Human Endometrial Cancer JEC Cells

LIU Zheng-yun, GOU Ying, JIANG Nian, WANG Huan, LIU Jie*
(Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

[Abstract] **Objective:** Compare the anti-tumor effect and mechanism of Liushenwan and realgar (As_4S_4) on human endometrial cancer cells JEC. **Method:** The release of As in Liushenwan and As_4S_4 was measured by atomic absorption spectrometry. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used for cell proliferation, and cell migration was measured by Transwell assay. Flow cytometry and Western Blot were used to determine apoptosis and DNA damage. **Result:** The dissolution of As in Liushenwan was 17.4%, and that of As_4S_4 was only 1.6% according to atomic absorption assay. With the same content of As, compared with the As_4S_4 group, the cell viability in the 3, 10 $mg \cdot L^{-1}$ Liushenwan groups was decreased ($P < 0.05$), the early apoptosis rate was significantly increased in 0.25, 0.5, 1 $mg \cdot L^{-1}$ Liushenwan groups ($P < 0.05$), the rate of cell migration was decreased in 1 $mg \cdot L^{-1}$ Liushenwan group ($P <$

[收稿日期] 20200401(004)

[基金项目] 贵州省普通高等学校特色重点实验室建设项目[黔教合KY(2015)331];贵州省普通高等学校特色药物肿瘤防治特色重点实验室开放基金项目(TSYW-2016003);遵义医学院硕士科研启动基金项目(F-902)

[第一作者] 刘正芸, 硕士, 助理实验师, 从事抗肿瘤相关研究, E-mail: 916103898@qq.com

[通信作者] *刘杰, 博士, 研究员, 从事药理和药物代谢研究, E-mail: Jieliu@zmu.edu.cn

0.05), the expressions of cleaved cysteinyl aspartate-specific proteinase-3 (cleaved Caspase-3), cleaved cysteinyl aspartate-specific proteinase-7 (cleaved Caspase-7), cleaved poly ADP-ribose polymerase (cleaved PARP), phosphorylated histone (p-H₂AX), phosphorylation of checkpoint kinase 2 (p-CHK2) and ataxia-telangiectasia mutated (ATM) were increased in 1 mg·L⁻¹ Liushenwan group (*P*<0.05), while the expression of phosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated rad3-related (ATR) was decreased in 1 mg·L⁻¹ Liushenwan group (*P*<0.05), with no significant changes in the expressions of cysteinyl aspartate-specific proteinase-3 (Caspase-3) and cysteinyl aspartate-specific proteinase-7 (Caspase-7). **Conclusion:** With the same content of As, both Liushenwan and As₄S₄ could inhibit JEC cell proliferation and migration, and induce cell apoptosis and DNA damage. Liushenwan has a stronger effect than As₄S₄. It is suggested that there are other components in Liushenwan with an anti-tumor effect in cooperation with As.

[Key words] Liushenwan; realgar (As₄S₄); arsenic (As); endometrial cancer; apoptosis; DNA damage

子宫内膜癌是女性生殖道恶性肿瘤之一,近年来,子宫内膜癌出现发病率增高和发病年轻化的趋向,并且死亡率逐年增加^[1]。子宫内膜癌的治疗以手术治疗为主,术后辅以放疗、化疗、内分泌治疗、介入治疗等^[2]。虽然以上治疗都有一定疗效,但仅限于提高5年生存率,手术预后差及放化疗副作用大都对患者的生存质量有很大影响,故寻求新的抗子宫内膜癌的药物迫在眉睫。六神丸来源于清末姑苏雷氏秘方^[3],由雄黄(As₄S₄)、牛黄、麝香、蟾酥珍珠、冰片6味中药组成,具有清热解毒、消肿止痛等功效,其抗肿瘤作用近年来受到众多研究者的关注^[4]。蔡国琴等^[5]研究发现六神丸对肝癌细胞BEL7402,肺癌细胞A549和白血病细胞HL-60的生长有明显的抑制作用;六神丸的含药血清对人乳腺癌细胞MCF-7的增殖也有明显抑制作用,和顺铂有协同作用^[6]。本课题组前期研究发现,在等砷(As)含量下,As₄S₄和六神丸都能抑制肝癌Hep3B细胞的增殖,但六神丸的效果更好,且六神丸能诱导细胞凋亡的发生^[7]。雄黄量子点[经特殊方法研制,粒径为(6.11±1.19) nm^[8]]作为纳米级的As₄S₄,对肝癌HepG2细胞和子宫内膜癌JEC细胞的增殖有抑制作用,并能诱导细胞凋亡或氧化应激的发生^[9-10]。六神丸的处方遵循君臣佐使的角色配置,主药如君,辅药如臣,臣药所不及,佐药便有了用武之地,使药的功用就是引领君、臣、佐诸药药力到达病变部位或与之相关的经脉^[11]。在六神丸中,雄黄(As₄S₄)为君药,占13%^[12],但单独的As₄S₄是否也具有和六神丸相似的抗肿瘤作用,六神丸发挥抗肿瘤作用是否遵循了君臣佐使的原则?鉴于此,本课题组在前期研究的基础上对六神丸与As₄S₄的抗子宫内膜癌作用及机制进行了比较,以期拓展中药复方六神丸

的使用领域提供理论支撑。

1 材料

1.1 药品与试剂 六神丸,As₄S₄(雷允上药业有限公司,批号均为IA1003);DMEM培养基(美国Hyclone公司,批号SH30243.01);胎牛血清(美国Gibco公司,批号1414426);噻唑蓝(MTT),二喹啉甲酸(BCA)试剂盒,彩色预染蛋白质分子量标准(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为M8180,P0010S,P0068);磷脂酰丝氨酸蛋白抗体/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术有限公司,批号KGA106);聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒,结晶紫染液,中性树胶,蛋白免疫印迹法超敏发光液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为P1200,G1062,G8590,PE0010);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国Millipore公司,批号ISEQ00010);抗体半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),剪切的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved Caspase-3),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-7(Caspase-7),剪切的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-7(cleaved Caspase-7),剪切的聚ADP核糖聚合酶(cleaved PARP),磷酸化的组蛋白(p-H₂AX),磷酸化的检测点激酶2(p-CHK2),人共济失调毛细血管扩张症突变激酶(ATM),人共济失调毛细血管扩张症Rad3相关激酶(ATR),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),Anti-Rabbit免疫球蛋白(Ig)G, Anti-Mouse IgG(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为9665,9664,12827,8438,5625,9718,2661,2873,13934,8884,7074,7076);子宫内膜癌JEC细胞为本实验室冻存,传至第七代。

1.2 仪器 TH4-200型正置显微镜,CKX41型倒置显微镜(日本Olympus公司);Allegra X-15R型台

式冷冻离心机, CytoFLEX型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司); 1500型酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司); 041BR151060型 PowerPac™ Basic, 690BR017661型 Trans-Blot® Turbo™ System, ChemiDoc™ Touch Imaging System(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 As 浓度测定及给药剂量设定 原子吸收法测 As 的溶解度, 无血清培养基溶解含砷药物 24 h, 取上清液稀释 1 000 倍后上机检测 As 的浓度, 用上清液中 As 的浓度及各药物的含砷量计算药物的砷溶解度^[7]。根据溶解度梯度稀释得到母液, 根据 MTT 结果, 设六神丸低、中、高剂量(0.25, 0.5, 1 mg·L⁻¹) 组及 As₄S₄ 低、中、高剂量(0.25, 0.5, 1 mg·L⁻¹) 组。

2.2 细胞培养 JEC 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素(100 mg·L⁻¹ 链霉素和 10 万 U·L⁻¹ 青霉素)的 DMEM 培养基培养于 37 °C, 饱和湿度的 5%CO₂ 孵箱中。

2.3 MTT 比色法检测细胞增殖抑制 将 JEC 细胞接种于 96 孔板, 细胞密度为 1×10⁴ 个/孔, 24 h 后加药, 加药浓度为六神丸(0, 0.1, 0.3, 1, 10 mg·L⁻¹), As₄S₄(0, 0.1, 0.3, 1, 10 mg·L⁻¹), 于加药 48 h 后每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 溶液 10 μL, 孵育 4 h, 吸去培养基, 每孔加入二甲基亚砷(DMSO)溶液 100 μL, 震荡混匀后用酶标仪在 570 nm 处测定各孔的吸光度 A, 并计算细胞存活率。细胞存活率=(A_{加药组}-A_{空白组})/(A_{溶剂组}-A_{空白组})×100%。

2.4 Transwell 检测细胞迁移 JEC 细胞预先用无血清培养基培养 24 h, 消化细胞接种于上室, 细胞密度为 3×10⁵ 个/孔, 细胞接种同时加药, 上室培养基体积为 200 μL, 血清浓度为 2%。下室培养基体积为 500 μL, 血清浓度为 20%。细胞孵育 72 h, 进行结晶紫染色。结束后用刀片将 Transwell 膜取下, 倒置于加有中性树胶的载玻片上, 封片, 每个 Transwell 膜选择 5 个视野, 用显微镜进行观察并拍照。

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 取 JEC 细胞接种于 6 孔板, 细胞密度为 5×10⁵ 个/孔, 24 h 后加药, 于加药 24 h 后收集细胞(用 0.25% 不含乙二胺四乙酸的胰酶), 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 2 次, 细胞用 1×的 Binding 缓冲液 500 μL 重悬, 加入 Annexin V-FITC 5 μL 混匀, 再加入 PI 5 μL 混匀, 避光反应 5 min, 用流式细胞仪检测细胞凋亡的情况。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞凋亡及 DNA 损伤蛋白的表达 JEC 细胞接种于 6 孔板,

细胞密度为 5×10⁵ 个/孔, 24 h 后加药, 加药 24 h 后收蛋白, 并用 BCA 试剂盒测定蛋白含量。①根据目的蛋白大小用 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒配置 SDS-PAGE 凝胶(分离胶及浓缩胶); ②将提取的蛋白进行上样, Marker 3 μL, 待检测蛋白 20 μL(10 μg); ③恒压 80 V 电泳至分离胶后, 将电压调至 120 V, 待蛋白跑至分离胶下层即停止; ④恒流 350 mA, 120 min 转膜, 转膜完毕后, 将 PVDF 膜放于 5% BSA 封闭液中室温封闭 2 h; ⑤4 °C 孵育一抗(1:1 000)过夜, 第 2 天洗膜后室温孵育二抗(1:1 000)2 h; ⑥洗膜后加 ECL 超敏发光液用 ChemiDoc™ Touch Imaging System 曝光。采用 Image J 软件进行图片像素灰度值处理, 以 GAPDH 条带作为内参, 计算蛋白条带相对其内参的灰度比值, 作为目的蛋白的相对表达水平。

2.7 统计学方法 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析, 样本比较采用独立样本 t 检验, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 As 浓度的测定与标化 与 As₄S₄ 组(1.6%)比较, 六神丸组(17.4%)As 的溶解度明显增加。说明六神丸与 As₄S₄ 的浓度相同时, 六神丸中 As 的含量高于 As₄S₄^[9]。对六神丸与 As₄S₄ 中 As 的含量进行标化, 用等 As 的六神丸与 As₄S₄ 溶液进行后续实验(后续实验中的浓度为 As 的浓度)。

3.2 对 JEC 细胞增殖的影响 与 As₄S₄ 组比较, 六神丸中、高剂量组细胞存活率更低(P<0.05)。见表 1。

表 1 六神丸与 As₄S₄ 对 JEC 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Liushenwan and As₄S₄ on cells proliferation in JEC cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞存活率/%
空白	-	100.00±5.97
六神丸	0.1	88.49±2.65
	0.3	75.53±0.17
	1	68.40±5.88
	3	43.39±1.31 ¹⁾
As ₄ S ₄	10	26.14±1.50 ¹⁾
	0.1	104.13±1.51
	0.3	92.34±2.72
	1	65.11±2.90
	3	59.29±5.37
	10	50.05±1.20

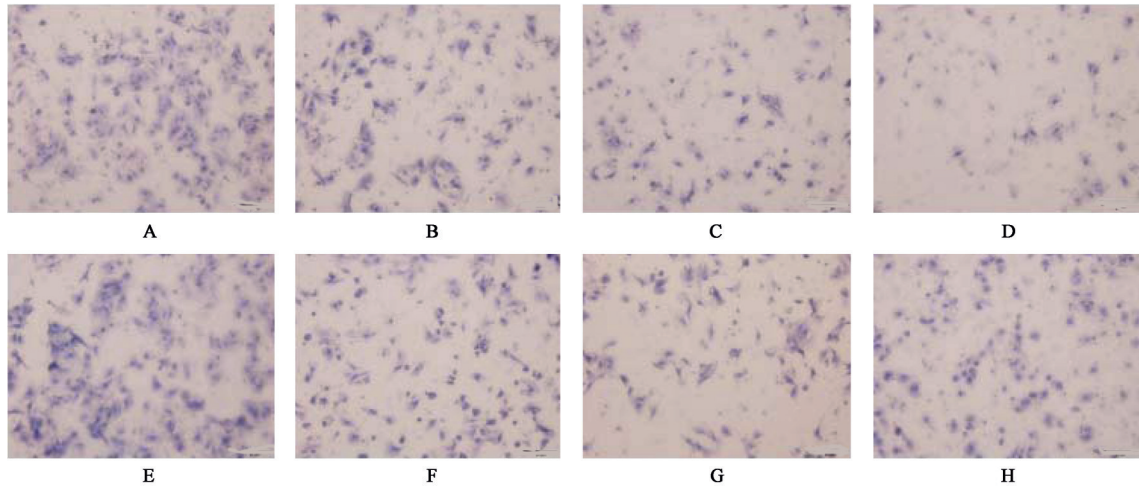
注: 与 As₄S₄ 组比较¹⁾P<0.05(表 2~5 同)。

3.3 对JEC细胞凋亡的影响 与As₄S₄组比较,六神丸高剂量组细胞凋亡率更高(P<0.05)。见表2。

表2 六神丸与As₄S₄对JEC细胞细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	正常细胞	早调细胞	晚调细胞	坏死或机械损伤的细胞
空白	-	94.68±3.25	1.21±0.09	0.35±0.04	3.76±0.31
六神丸	0.25	51.34±3.68 ¹⁾	43.24±1.39 ¹⁾	1.30±0.24	4.12±0.42
	0.5	33.24±4.21 ¹⁾	62.35±2.59 ¹⁾	1.99±0.33	2.42±0.22
	1	30.51±3.29 ¹⁾	58.24±3.21 ¹⁾	4.76±0.31 ¹⁾	3.84±0.14 ¹⁾
空白	-	95.32±4.38	2.94±0.09	0.18±0.01	1.56±0.09
As ₄ S ₄	0.25	86.58±5.31	6.54±0.61	0.73±0.08	6.19±0.51
	0.5	77.35±2.38	16.34±1.15	2.35±0.10	3.96±0.29
	1	66.35±3.69	29.35±2.51	1.25±0.15	1.47±0.11

3.4 对JEC细胞迁移的影响 与As₄S₄组比较,六神丸高剂量组细胞迁移率更低(P<0.05)。六神丸低、中、高剂量组间比较差异无统计学意义。见图1,表3。



A. 空白组;B~D.六神丸低、中、高剂量组;E.空白组;F~H.As₄S₄低、中、高剂量组(图2同)

图1 六神丸与As₄S₄对JEC细胞细胞迁移的影响(倒置显微镜,×200)

Fig. 1 Effect of Liushenwan and As₄S₄ on cells migration of JEC cells (inverted microscope, ×200)

表3 六神丸与As₄S₄对JEC细胞细胞迁移的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Liushenwan and As₄S₄ on cells migration of JEC cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	穿出细胞数/个
空白	-	100.00±22.57
六神丸	0.25	63.11±13.56
	0.5	42.97±8.09
	1	28.94±4.63 ¹⁾
空白	-	100.00±14.18
As ₄ S ₄	0.25	72.96±11.21
	0.5	58.71±19.21
	1	72.63±8.47

3.5 对JEC细胞中相关蛋白表达的影响 与As₄S₄组比较,六神丸中剂量组 p-H₂AX, p-CHK2 蛋白含

量明显升高(P<0.05),六神丸高剂量组 cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-7, cleaved PARP, p-H₂AX, p-CHK2, ATM 与 ATR 蛋白含量明显升高(P<0.05)。见图2,表4,5。

4 讨论

六神丸在体内外均有较好的抗肿瘤作用^[13-14],其机制涉及诱导细胞凋亡,促进肿瘤细胞分化等^[15]。六神丸中雄黄为君药,蟾蜍为臣药,其他成分为佐药和使药。本课题组前期研究证明六神丸在肝癌 Hep3B 细胞中的抗肿瘤作用比 As₄S₄强,这与六神丸复方中 As 的溶出量大于 As₄S₄中 As 的溶出量有关^[7]。在本实验中,六神丸(10 mg·L⁻¹)对子宫内膜癌细胞 JEC 的增殖抑制率为 74%,具有明显抗肿瘤作用。而等 As 量的 As₄S₄则只有 50%,说明

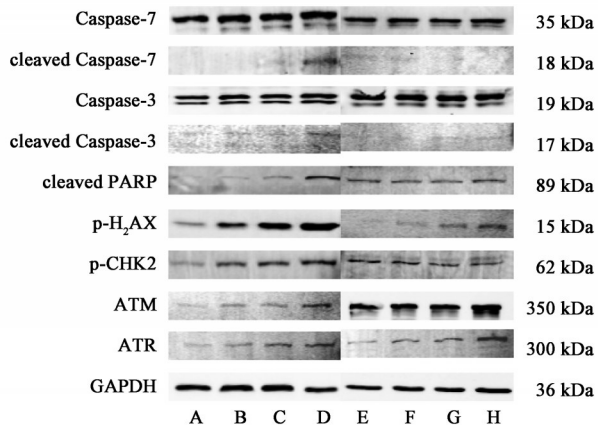


图2 六神丸与As₄S₄作用后相关蛋白表达电泳
Fig. 2 Effect of Liushenwan and As₄S₄ on expressions of proteins in JEC cells

六神丸的抗肿瘤作用不仅仅是依靠As的溶出。有报道称六神丸可以通过诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤作用,在等As的情况下,本研究首先利用流式细胞术检测细胞凋亡,结果显示六神丸与As₄S₄都可以引起细胞凋亡,但六神丸诱导细胞凋亡的效应优于As₄S₄。

肿瘤细胞迁移是恶性肿瘤最重要的特征之一^[16],目前检测肿瘤细胞迁移的方法主要有细胞划痕实验及Transwell实验。在本研究中,Transwell细胞迁移实验结果也证明六神丸与As₄S₄能有效抑制细胞迁移,但六神丸的效果更好。

六神丸通过上调B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)和下调Bcl-2基因的表达诱导白血病细胞发生细胞凋亡^[17];六神丸的含药血清能通过上调Caspase-3的表达诱导人乳腺癌MCF-7细胞发生凋亡^[18];本课题组前期研究也表明六神丸能通过下调Bcl-2基因的表达诱导肝癌细胞Hep3B发生细胞凋亡^[7]。本研究进一步表明六神丸比同等As含量的As₄S₄更明显的影响细胞凋亡蛋白的表达。

细胞发生凋亡前会发生一系列生物学行为,DNA损伤就是其中之一。DNA损伤信号主要由ATM或ATR介导,ATM或ATR传递信号给DNA损伤检测点激酶(Chk1和Chk2)^[19]。ATM的激活代表DNA损伤应答的启动,发生DNA损伤后,γH₂AX被ATM磷酸化并招募到DNA损伤位点上,通过检测

表4 六神丸与As₄S₄对Caspase-7,cleaved Caspase-7,Caspase-3,cleaved Caspase-3和cleaved PARP蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Liushenwan and As₄S₄ on expressions of Caspase-7, cleaved Caspase-7, Caspase-3, cleaved Caspase-3 and cleaved PARP proteins in JEC cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	Caspase-7 /GAPDH	cleaved Caspase-7 /GAPDH	Caspase-3 /GAPDH	cleaved Caspase-3 /GAPDH	cleaved PARP /GAPDH
空白	-	1.30±0.03	0.33±0.12	1.42±0.04	0.28±0.19	0.85±0.17
六神丸	0.25	1.85±0.30	0.28±0.31	1.53±0.15	0.46±0.14	0.90±0.17
	0.5	1.96±0.19	0.60±0.23	1.49±0.24	0.65±0.08	1.03±0.21
	1	2.00±0.16	1.68±0.14 ¹⁾	1.67±0.08	1.29±0.35 ¹⁾	1.27±0.24 ¹⁾
空白	-	1.79±0.21	0.51±0.16	2.10±0.15	0.78±0.34	1.55±0.46
As ₄ S ₄	0.25	1.75±0.34	0.70±0.24	2.18±0.19	0.82±0.26	1.17±0.24
	0.5	1.50±0.51	0.34±0.24	2.17±0.17	0.55±0.20	1.18±0.39
	1	1.83±0.19	0.35±0.16	1.95±0.31	0.73±0.25	1.23±0.18

表5 六神丸与As₄S₄对p-H₂AX,p-CHK2,ATM与ATR蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Liushenwan and As₄S₄ on expressions of p-H₂AX, p-CHK2, ATM and ATR proteins in JEC cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	p-H ₂ AX/GAPDH	p-CHK2/GAPDH	ATM/GAPDH	ATR/GAPDH
空白	-	0.51±0.18	0.67±0.29	0.66±0.24	0.88±0.11
六神丸	0.25	0.88±0.16	0.73±0.18	0.55±0.27	0.92±0.22
	0.5	1.24±0.34 ¹⁾	0.81±0.18 ¹⁾	0.70±0.16	0.79±0.09
	1	2.34±0.31 ¹⁾	1.77±0.16 ¹⁾	1.88±0.24 ¹⁾	1.77±0.08 ¹⁾
空白	-	0.82±0.09	1.85±0.13	1.46±0.24	1.21±0.04
As ₄ S ₄	0.25	0.79±0.16	1.15±0.16	1.23±0.29	1.60±0.09
	0.5	1.01±0.09	1.04±0.17	1.58±0.34	1.62±0.16
	1	1.06±0.18	1.11±0.54	1.77±0.09	2.01±0.27

γ H₂AX,能进一步确认DNA损伤的发生^[20]。DNA损伤修复失败会导致细胞转录和复制失调、细胞突变和凋亡^[21-22]。本研究表明六神丸可引起DNA损伤相关蛋白p-H₂AX, p-CHK2, ATM, ATR表达上调。但As₄S₄仅能引起ATM与ATR表达上调,ATM与ATR代表DNA损伤应答的启动,说明在等As剂量下,As₄S₄只能初步激活DNA损伤应答通路,并不能进一步促进下游相关因子的表达。这也直接导致As₄S₄不能激活凋亡相关蛋白Caspase家族的表达,而六神丸可以进一步激活cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-7和cleaved PARP蛋白的表达。

综上,本研究发现六神丸与As₄S₄都能抑制子宫内膜癌JEC细胞的增殖和迁移,诱导细胞凋亡和DNA损伤,但在等As剂量下,六神丸的效果优于As₄S₄。六神丸发挥作用不仅仅依赖于君药(As₄S₄)的浓度,处方中的其他成分(牛黄、麝香、蟾酥等)也参与药效发挥的整个过程,起到协同作用,这也是中药发挥作用的-大特点。

[参考文献]

[1] MITTAL P, KLINGLER-HOFFMANN M, ARENTZ G, et al. Proteomics of endometrial cancer diagnosis, treatment, and prognosis[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2016, 10(3):217-229.

[2] 刘妮, 闫雅欣, 钱延玲, 等. 子宫内-膜癌的治疗进展[J]. *医药前沿*, 2016, 6(11):5-7.

[3] 侯倩倩. 六神丸通过Wnt信号转导通路抗肿瘤的-临床与实验研究[D]. 济南:山东中医药大学, 2011.

[4] 刘寨东, 齐元富, 李秀荣. 六神丸抗肿瘤实验研究进展[J]. *山东中医杂志*, 2011, 30(7):519-520.

[5] 蔡国琴, 张聪, 郑礼. 六神丸对肝癌BEL7402、肺癌A549和白血病HL60的体外抗肿瘤作用[J]. *中成药*, 2012, 34(5):935-936.

[6] 李炜, 赵玲, 孙莉, 等. 六神丸抗肿瘤血管生成的体外实验研究[J]. *山东中医杂志*, 2006, 25(6):403-406.

[7] 梁世霞, 刘正芸, 余丽梅, 等. 六神丸和砷化合物对人肝癌Hep3B细胞增殖的影响[J]. *遵义医学院学报*, 2016, 39(6):558-562.

[8] WANG J, LIN M, ZHANG T, et al. Arsenic(II) sulfide quantum dots prepared by a wet process from its bulk[J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(35):11596-11597.

[9] QIN Y, WANG H, LIU Z, et al. Realgar quantum dots induce apoptosis and necrosis in HepG2 cells through endoplasmic reticulum stress[J]. *Biomed Rep*, 2015, 3(5):657-662.

[10] WANG H, LIU Z, GOU Y, et al. Apoptosis and necrosis induced by novel realgar quantum dots in human endometrial cancer cells via endoplasmic reticulum stress signaling pathway[J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 2015:5505-5512.

[11] LIU J, WEI L X, WANG Q, et al. A review of cinnabar and/or realgar-containing traditional medicines[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, doi: 10.1016/j.jep.2017.08.037.

[12] 岐黄. 中药王国里的君臣佐使[J]. *现代养生*, 2015(12):26.

[13] 张保国, 刘庆芳. 六神丸的内科应用[J]. *中成药*, 2006, 28(9):1360-1362.

[14] 杜建. 中药抗肿瘤机制研究进展[J]. *福建中医学院学报*, 2009, 19(4):1-5.

[15] 覃钰, 金凤, 金海, 等. 雄黄量子点和六神丸对荷瘤小鼠子宫颈癌的抑制作用[J]. *中国新药与临床杂志*, 2015, 34(1):64-67.

[16] WITTCHEN E S. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration[J]. *Front Biosci*, 2009, 14(7):2522-2545.

[17] 史哲新, 杨文华, 汤毅, 等. 六神丸逆转白血病细胞多药耐药作用及相关机制研究[J]. *天津中医药大学学报*, 2007, 26(1):11-13.

[18] 李炜, 孟艳冬, 赵玲, 等. 六神丸逆转灯盏细辛抑制MCF-7细胞凋亡作用的实验研究[J]. *河北中医*, 2006, 28(12):940-942.

[19] YANG J, XU Z P, HUANG Y, et al. ATM and ATR: Sensing DNA damage[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(2):155-160.

[20] WANG J Y, CHEN S Y, SUN C N, et al. A central role of TRAX in the ATM-mediated DNA repair[J]. *Oncogene*, 2015, 35(13):1657-1670.

[21] ROOS W P, KAINA B. DNA damage-induced cell death by apoptosis[J]. *Trends Mol Med*, 2006, 12(9):440-450.

[22] WARMERDAM D O, KANAAR R. Dealing with DNA damage: relationships between checkpoint and repair pathways[J]. *Mutat Res*, 2010, 704(1/3):2-11.

[责任编辑 张丰丰]