

3-氢化松苓酸 B 诱导人胃癌 HGC-27 细胞的程序性死亡

张 盼¹, 闫喜明¹, 汪鋈植^{1*}, 余欣欣¹, 余海立¹, 贺海波¹, 李 湜¹, 李莉娥²
[1. 天然产物研究与利用湖北省重点实验室 (三峡大学) / 湖北省土家族医药研究所, 湖北 宜昌 443002;
2. 宜昌人福药业有限公司, 湖北 宜昌 443002]

摘要: **目的** 研究 3-氢化松苓酸 B 对人胃癌细胞 HGC-27 程序性死亡的影响。**方法** MTT 法测定细胞增殖。流式细胞仪测定细胞周期及凋亡率。吖啶橙染色及透射电镜观察细胞自噬; Western blot 法检测自噬相关蛋白的表达。**结果** 3-氢化松苓酸 B 对 HGC-27 细胞的增殖具有抑制作用, 并呈明显的时间、剂量依赖性。10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 3-氢化松苓酸 B 处理 HGC-27 细胞 24 h 后, 可将细胞阻滞于 G_0/G_1 期, 但对细胞凋亡无明显影响。20 $\mu\text{mol/L}$ 3-氢化松苓酸 B 处理 HGC-27 细胞 24 h 后, 透射电镜观察到大量自噬泡和自噬体, 细胞自噬比例随浓度增加而显著提高; 3-氢化松苓酸 B 促进 I 型微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3 I) 向 II 型微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3 II) 转化, 上调肌球蛋白样 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 结合蛋白 (Beclin-1) 和细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子 1A (p21) 的表达, 并抑制 G_1/S -特异性周期蛋白-D1 (CyclinD1) 的表达。**结论** 3-氢化松苓酸 B 可诱导 HGC-27 细胞发生自噬性死亡, 但是对细胞凋亡无明显影响。

关键词: 3-氢化松苓酸 B; 人胃癌细胞 HGC-27; 凋亡; 自噬; 自噬蛋白

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)01-0033-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.01.006

Trametenolic acid B induces the programmed death of human gastric cancer HGC-27 cells

ZHANG Pan¹, YAN Xi-ming¹, WANG Jun-zhi^{1*}, SHE Xin-xin¹, YU Hai-li¹, HE Hai-bo¹, LI Shi¹, LI Li-e²
[1. Hubei Provincial Key Laboratory of Natural Products Research and Development (China Three Gorges University) & Hubei Provincial Tujia Institute of Medicine, Yichang 443002, China; 2. Yichang Humanwell Pharmaceutical Co., Ltd., Yichang 443002, China]

ABSTRACT: AIM To study the programmed death effect of trametenolic acid B (TAB) against human gastric cancer HGC-27 cells. **METHODS** The proliferation of cells was examined by MTT assay; cell apoptosis rate and cell cycle were detected by flow cytometry; cell autophagy was observed by acridine orange staining and transmission electron microscope; expressions of autophagy-related proteins were detected by Western blot. **RESULTS** 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ Trametenolic acid B had good growth-inhibitory effects on HGC-27 cells, blocked in G_0/G_1 phase, in a dose-dependent and time-dependent manner, but had no obvious effect on cell apoptosis. After treatment with 20 $\mu\text{mol/L}$ trametenolic acid B for 24 h, a large number of autophagy vacuoles and autophagy bodies were observed under transmission electron microscope, and the proportion of cell autophagy was significantly increased with higher dose of TAB; TAB promoted the transformation of type I microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3 I) to type II microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3 II), up-regulated the expressions of myosin-like B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) interacting protein (Beclin-1) and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21), and inhibited the CCND1 gene protein (CyclinD1) expression. **CONCLUSION** Trametenolic acid B can induce the autophagic death of HGC-27 cells, but it has no significant effect on cell apoptosis.

收稿日期: 2016-09-07

作者简介: 张 盼 (1990—), 男, 硕士生, 从事天然产物提取分离和活性评价研究。E-mail: 1129666906@qq.com

* 通信作者: 汪鋈植 (1966—), 男, 博士, 教授, 从事三峡地区中药、民族药活性评价和质量控制研究。Tel: (0717) 6397478, E-mail: horsedog@163.com

KEY WORDS: trametenolic acid B; human gastric cancer HGC-27 cells; apoptosis; autophagy; autophagy protein

胃癌是常见恶性肿瘤之一,严重威胁人类健康,现有药物的耐药性及不良反应影响临床抗肿瘤药物对胃癌的治疗,因此寻找更有效的抗胃癌药物,防止耐药性,具有重要意义。3-氢化松苓酸 B (TAB) 是从土家族药大白栓菌中提取分离得到的一种三萜类的活性物质^[1],有抑制凝血酶^[2]的活性,对多种肿瘤细胞增殖具有抑制作用,尤其是胃癌细胞 HGC-27; TAB 还能逆转 P-gp 蛋白^[3]引起的耐药作用,且与化疗药物紫杉醇有药物协同作用。为进一步研究 TAB 对肿瘤细胞增殖抑制的选择性及机制,本研究对其抗胃癌作用进行研究。

1 材料

1.1 仪器 DIONEX 3000 液相色谱仪 (美国赛默飞世尔公司); WATERS 2489 半制备液相色谱仪 (美国沃特世公司); COSMOSIL MS-II 色谱柱 (日本半井公司); EYELA SB-100 旋转蒸发仪 (日本东京理化器械株式会社); EPICS XL-4 型流式细胞系统 (英国 Beckman Coulte 公司); H-7500 透射电子显微镜 (日本日立公司); 5415D 微型台式高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); Stat Fax-2100 型酶联免疫检测仪 (美国 Awareness 公司)。

1.2 药物与试剂 3-氢化松苓酸 B (TAB), 由本实验室从土豆培养基培养的大白栓菌 [*Trametes lactinea* (Berk.) Pat] 中分离提取得到。取培养的大白栓菌菌丝体, 50 ℃ 烘干, 加入菌丝体质量 20 倍的 95% 乙醇, 反复热溶冷沉, 析出白色固体物, 过滤, 经硅胶柱层析分离得到 TAB, 使用制备型 HPLC, 按照乙腈: 水 = 90% : 10% 的条件制备, 即得到含有量为 98% 的 TAB。使用称量纸准确称取 TAB 1.5 mg, 用移液枪准确加入 15 μL 的 DMSO, 漩涡振荡 30 s, 然后用 135 μL 的无水乙醇将其混匀, 在无菌操作台下, 利用注射器进行微孔 (0.22 μm) 过滤, 最终制成 10 mg/mL 的 TAB 初始质量浓度。使用时, 再用含血清的培养基进行稀释即可, 确保 DMSO 在培养液的终浓度小于 0.1%。紫杉醇 (Taxol), 购于海南通用康力制药有限公司 (规格 5 mL/30 mg, 批号 131203); 胰蛋白酶 (批号 2907B503)、HEPES (批号 3006B022), 购于美国 Amresco 公司; RPMI-1640 培养液 (批号 1545374), 购于美国 Gibco 公司; 新生胎牛血清 (批号 20150514), 购于杭州四季青生物材料有限公司; 吡啶橙 (批号 A6014)、MTT

(批号 K0063), 购于美国 Sigma 公司; 细胞 DNA 含量检测试剂盒 (批号 20151107)、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 20151009), 购于凯基生物技术股份有限公司; Beclin-1 一抗 (批号 0002)、Cyclin D1 一抗 (批号 0018)、LC3 I/II 一抗 (批号 0003), p21 一抗及对应二抗 (批号 0011), 均购于美国 Cell Signaling 公司。

1.3 细胞 HGC-27 细胞购于武汉大学中国典型培养物保藏中心。

2 方法

2.1 细胞培养及接种 复苏人胃癌细胞株 HGC-27, 使用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养, 放在 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中进行半开口的单层细胞培养。当细胞贴壁生长状态良好且处于对数生长期时, 进行细胞消化、重悬, 调整 HGC-27 细胞密度为 1×10^5 /mL, 再将细胞接种于 96 孔板中, 孔板的外围用等体积的缓冲液 PBS 液封, 培养细胞贴壁生长 12 h。

2.2 细胞抑制率测定 HGC-27 细胞贴壁生长 12 h 后, 加入 TAB, 使其终浓度分别为 0、5、10、20、40、60、80 μmol/L, 然后培养 24、48 h。在试验终止前 4 h 每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 10 μL, 在 37 ℃ 培养箱中孵育 4 h, 终止培养时弃去培养基, 每孔加入 150 μL DMSO 均匀震荡溶解, 使用酶标仪在 492 nm 波长处测定其对应光密度值 (*D*)。实验重复 3 次, 计算细胞抑制率^[4]。

2.3 细胞周期与凋亡测定 HGC-27 细胞贴 6 孔板壁生长 12 h 后, 加入终浓度 10、20、40 μmol/L 的 TAB 处理 24 h, 时间终止时, 使用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 并收集细胞于离心管, 调整每组细胞密度在 1×10^6 /mL 为宜, 加入体积分数为 70% 的冷乙醇 500 μL 进行固定, 过夜。然后离心弃去固定液, 加入 RNaseA 100 μL, 混匀, 并在 37 ℃ 水浴锅中水浴 30 min, 最后加入 400 μL PI 均匀染色, 4 ℃ 冰箱避光反应 30 min, 流式细胞仪进行上机检测, 分析细胞周期分布。

细胞凋亡检测前细胞处理和加药方式与细胞周期检测相同。收集细胞后调整每组细胞密度在 $(1 \sim 5) \times 10^5$ /mL 范围内。然后用 500 μL Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 Annexin V-FITC 5 μL 混匀后, 接着加入 5 μL Propidium Iodide (PI) 混匀避光条件反应 5 ~ 15 min, 1 h 之内进行流式细胞仪上

机检测，分析细胞凋亡率。

2.4 细胞自噬检测 HGC-27 细胞贴 6 孔板壁生长 12 h 后，加入终浓度 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 TAB 处理 24 h，时间结束后，使用 0.25% 胰酶消化并收集细胞。500 μL 的 2.5% 戊二醛-1% 锇酸固定细胞过夜，再依次用 50%、70%、80%、90% 乙醇和无水乙醇各脱水 15 min，最后使用 100% 的丙酮进行 2 次脱水，每次 10 min。完成之后，包埋样本，并进行修片，制成超薄切片使用透射电镜观察，扫描细胞结果图。

吖啶橙是实验应用中的一种荧光染料，能够在发生自噬的细胞中，将酸性自噬小体进行染色，而利用流式细胞仪就可定量检测细胞自噬的比例。取对数期的 HGC-27 细胞，以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞密度接种于 6 孔板，培养 12 h 使其贴壁。加入 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ TAB 并设置空白对照组，处理细胞 24 h 后，收集细胞，PBS 洗涤 2 次，然后加入质量浓度为 1 mg/mL 的溶液避光反应 10 ~ 15 min。试验终止时，立刻用流式细胞仪进行检测分析细胞自噬比例，实验过程重复 3 次。

2.5 细胞周期相关蛋白及自噬相关蛋白检测

Western blot 法检测周期相关蛋白及自噬相关蛋白的表达。将对数生长期 HGC-27 细胞接种在 75 cm^2 培养瓶中，贴壁生长 12 h 后，加入 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ TAB 处理细胞 24 h，设置对照组。然后，分别收集各组细胞，使用细胞裂解液反复冻融裂解细胞。蛋白定量后，加入上样缓冲液，沸水浴变性，10% SDS 凝胶电泳，以 Marker 为参照，电泳至所有的条带均匀分开后，即可停止电泳。将其电转移至 PVDF 膜上，5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 2 h，依次孵育一抗过夜，再孵育二抗 1 h，TBST 洗涤 3 次，每次 10 min，凝胶成像系统分析细胞周期相关蛋白及自噬蛋白条带。实验重复 4 次。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计和分析，数据均用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示。组间的差异用单因素方差进行分析， $P < 0.05$ 为有显著性差异， $P < 0.01$ 为有极显著性差异。

3 结果

3.1 细胞抑制率检测结果 不同浓度 TAB (80、60、40、20、10、5 $\mu\text{mol/L}$) 作用 HGC-27 细胞 24、48 h，MTT 法检测细胞的抑制率，发现 TAB 对 HGC-27 细胞的抑制作用呈时间剂量依赖性。24 h 对应 IC_{50} 为 22.97 $\mu\text{mol/L}$ ，48 h 9.31 $\mu\text{mol/L}$ 。

见表 1。

表 1 HGC-27 细胞在不同时间点的抑制率 ($n=3, \bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Inhibition rates of HGC-27 cells at different time points ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	抑制率/%	
		24 h	48 h
空白对照组	—	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Taxol 组	4	28.16 $\pm$ 3.21 **	57.26 $\pm$ 2.03 **
TAB 组	5	1.46 $\pm$ 2.50 **	26.5 $\pm$ 3.66 **
TAB 组	10	14.88 $\pm$ 1.80 **	56.7 $\pm$ 5.73 **
TAB 组	20	52.27 $\pm$ 3.50 **	81.1 $\pm$ 2.58 **
TAB 组	40	67.90 $\pm$ 4.40 **	87.8 $\pm$ 3.67 **
TAB 组	60	73.22 $\pm$ 4.65 **	91.9 $\pm$ 2.16 **
TAB 组	80	86.01 $\pm$ 5.34 **	93.3 $\pm$ 1.30 **

注：与空白对照组比较，** $P < 0.01$

3.2 细胞周期检测结果 TAB (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 作用于胃癌 HGC-27 细胞后，对应的 G_0/G_1 期细胞分布分别为 (47.5 $\pm$ 4.7)%、(53.1 $\pm$ 3.3)%、(58.8 $\pm$ 3.8)%。与细胞对照组 (41.5 $\pm$ 4.1)% 比较，中剂量组的 TAB 使胃癌 HGC-27 细胞显著阻滞于 G_0/G_1 期 ($P < 0.05$)，高剂量组则极显著阻滞 HGC-27 细胞于 G_0/G_1 期 ($P < 0.01$)。结果如表 2、图 1 所示，说明 TAB 可使胃癌 HGC-27 细胞阻滞于 G_0/G_1 期，从而抑制胃癌 HGC-27 细胞的生长和增殖。

表 2 TAB 对 HGC-27 细胞周期的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)
Tab. 2 Effect of TAB on the cell cycle of HGC-27 cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
空白对照组	—	41.5 $\pm$ 4.1	39.4 $\pm$ 1.8	19.1 $\pm$ 3.2
TAB 组	10	47.5 $\pm$ 4.7	33.9 $\pm$ 2.3	18.6 $\pm$ 2.9
TAB 组	20	53.1 $\pm$ 3.3 *	28.8 $\pm$ 2.1 **	18.1 $\pm$ 2.4
TAB 组	40	58.6 $\pm$ 3.8 **	25.1 $\pm$ 2.6 **	16.3 $\pm$ 2.1

注：与空白对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

3.3 细胞凋亡检测结果 从图 2 可见，TAB 没有使胃癌 HGC-27 细胞发生早期凋亡现象，坏死细胞的比例随药物剂量升高逐渐地增加，表明 TAB 使胃癌 HGC-27 死亡的方式不是通过细胞凋亡途径。

3.4 细胞自噬测定结果

3.4.1 透射电镜检测细胞亚显微结构结果 空白对照组细胞具有大而完整的细胞核，各细胞器排列整齐，没有缺失或损伤，细胞膜的边缘清晰可见。20 $\mu\text{mol/L}$ TAB 作用后，细胞核发生缺损或缺失，大多数细胞器受损或缺失，大量双侧膜结构的自噬体出现，且自噬体中还含有残留的消化物质，更有大量自噬空泡出现，表明 TAB 诱导胃癌 HGC-27 细胞发生了自噬。见图 3。

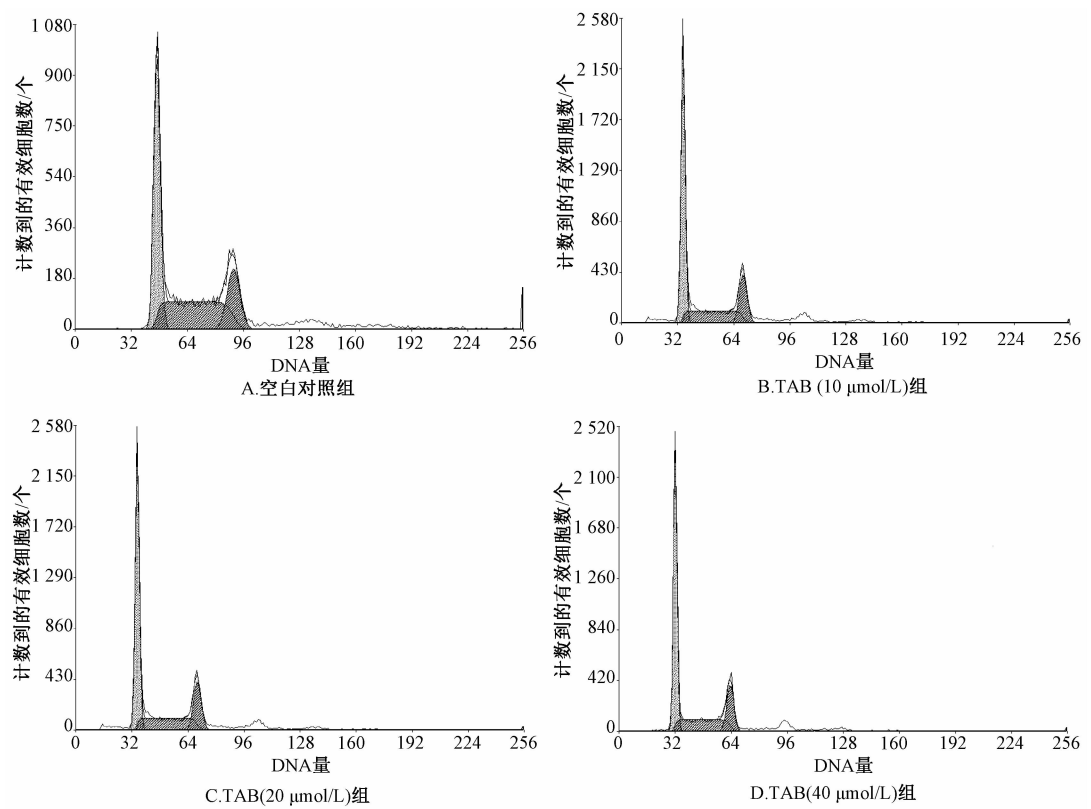


图 1 TAB 对 HGC-27 细胞周期的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig. 1 Effect of TAB on the cell cycle of HGC-27 cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)

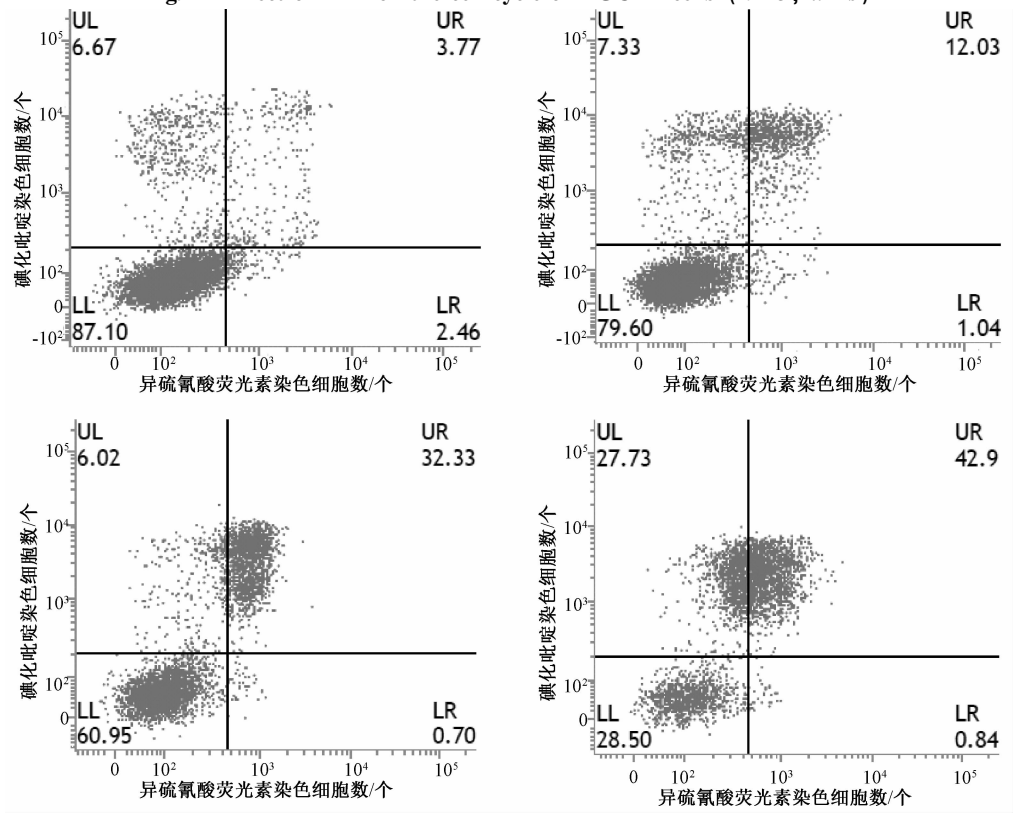
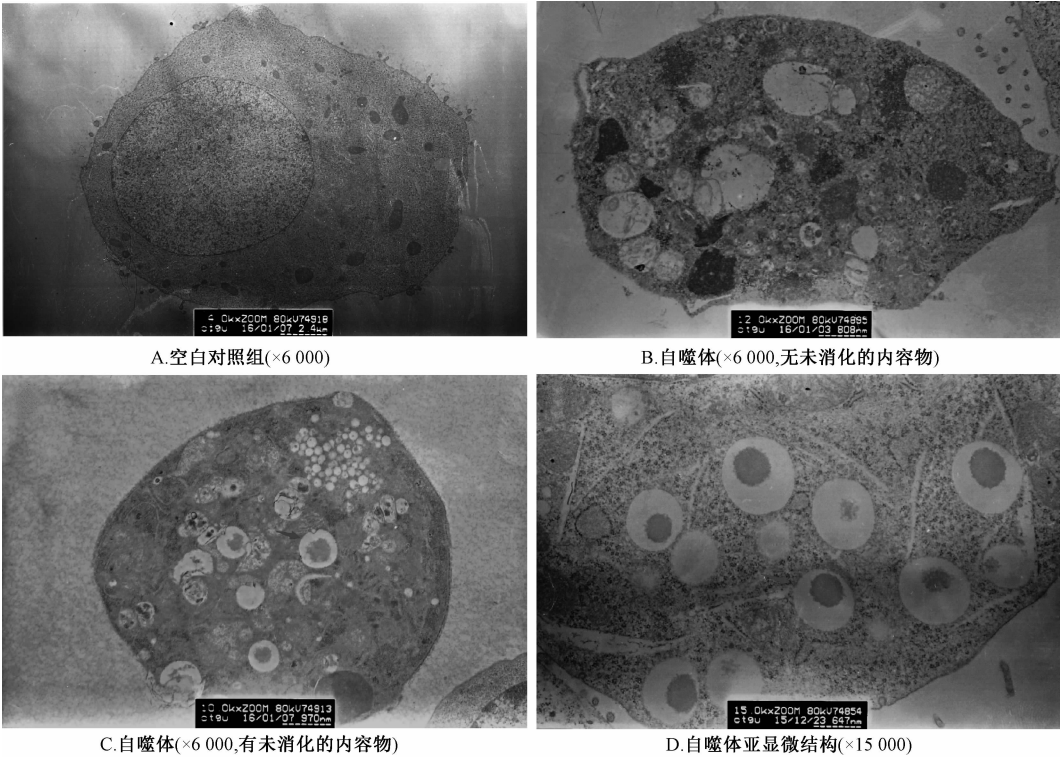


图 2 TAB 对 HGC-27 细胞凋亡的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Effect of TAB on the apoptosis of HGC-27 cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)

注：UL 表示上左（碎片及损伤细胞），UR 表示上右（晚期凋亡及死亡细胞），LL 表示下左（阴性对照的正常细胞），LR 表示下右（早期凋亡细胞）。图 4 同



注：箭头表示自噬泡的位置

图 3 透射电镜 (TEM) 图

Fig. 3 TEM graphs

3.4.2 细胞自噬比例检测结果 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ TAB 处理细胞后, 10 $\mu\text{mol/L}$ TAB 没有使自噬比例发生明显改变, 而 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 TAB 分别使细胞的自噬比例增加到 $(3.50 \pm 2.37)\%$ 、 $(43.85 \pm 7.09)\%$, 与空白对照组 $(0.57 \pm 0.56\%)$ 比较, 细胞自噬比例逐渐升高, 高剂量组 TAB (40 $\mu\text{mol/L}$) 引起的自噬比例与空白对照组比较差异具有极显著性 ($P < 0.01$)。见表 3、图 4。

表 3 TAB 对 HGC-27 细胞自噬比例的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effect of TAB on the proportion of autophagy of HGC-27 cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	空白对照组	TAB/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)		
		10	20	40
细胞自噬比/%	0.57 $\pm$ 0.56	0.66 $\pm$ 0.52	3.50 $\pm$ 2.37	43.85 $\pm$ 7.09 **

注：与空白对照组比较, ** $P < 0.01$

3.5 细胞周期相关蛋白及自噬相关蛋白检测结果

3.5.1 细胞周期相关蛋白检测结果 细胞周期蛋白 CyclinD1 的表达随 TAB 浓度的增加而显著降低 ($P < 0.01$), 而蛋白 p21 的表达则是随着 TAB 剂量的增加逐渐升高 ($P < 0.01$)。此结果更有力地证明 TAB 阻滞 HGC-27 细胞于 G_0/G_1 期, 且影响 G_0/G_1

G_1 期相关周期蛋白的表达情况。见表 4、图 5。

表 4 TAB 对 CyclinD1 和 p21 周期蛋白的影响 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Effects of TAB on the cycle proteins of CyclinD1 and p21 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	CyclinD1	p21
空白对照组	—	4.3 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.2
TAB 组	10	2.0 $\pm$ 0.1 **	1.6 $\pm$ 0.1
TAB 组	20	1.0 $\pm$ 0.2 **	4.7 $\pm$ 0.2 **
TAB 组	40	1.3 $\pm$ 0.2 **	4.1 $\pm$ 0.2 **

注：与空白对照组比较, ** $P < 0.01$

3.5.2 自噬相关蛋白检测结果 自噬关键调控蛋白 Beclin-1 的表达随药物浓度增加明显升高, 20、40 $\mu\text{mol/L}$ TAB 使 Beclin-1 的表达出现极显著升高 ($P < 0.01$)。LC3 是参与自噬发生的重要基因, 其检测结果显示, LC3 I /LC3 II 的比例显著降低, 即 LC3 I 逐渐向 LC3 II 转化, 且低、中、高剂量均具有极显著差异 ($P < 0.01$), 表明 TAB 可引起自噬关键蛋白发生改变。见表 5、图 6。

4 讨论

3-氢化松苓酸 B 可诱导 HGC-27 细胞发生自噬性死亡, 而对细胞凋亡无明显影响。自噬是诱导肿瘤细胞死亡的一种有效途径, 已有研究发现多种化合物可诱导肿瘤细胞发生自噬性死亡, 如丹参酮Ⅱ_A

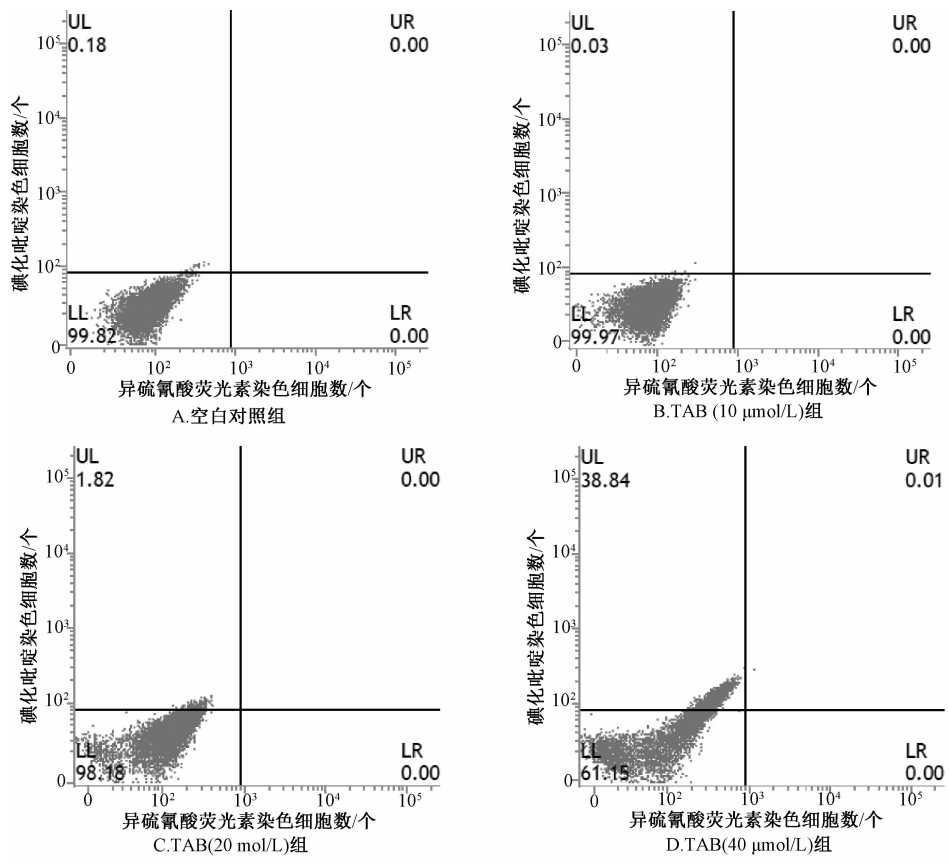


图 4 TAB 对 HGC-27 细胞自噬比例的影响 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Fig. 4 Effect of TAB on the proportion of autophagy of HGC-27 cells (n=3, $\bar{x} \pm s$)

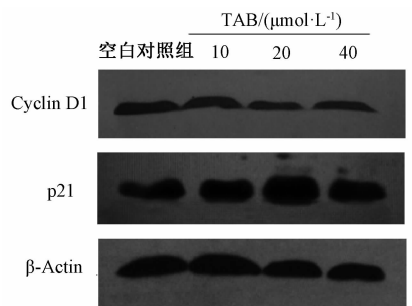


图 5 TAB 对 CyclinD1 和 p21 周期蛋白的影响 (n=4, $\bar{x} \pm s$)

Fig. 5 Effects of TAB on the cycle proteins of CyclinD1 and p21 (n=4, $\bar{x} \pm s$)

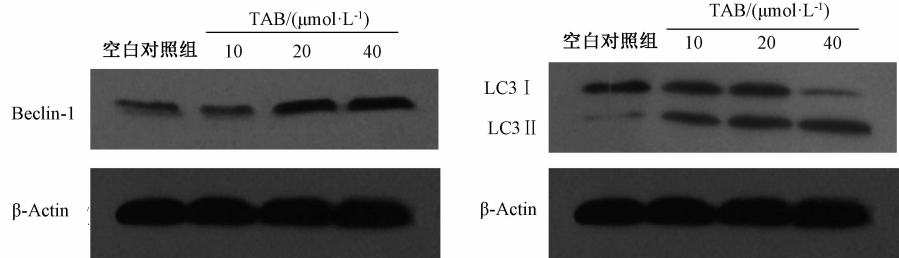


图 6 不同浓度 TAB 对自噬蛋白 Beclin-1 和 LC3 表达的影响 (n=4, $\bar{x} \pm s$)

Fig. 6 Effects of different concentrations of TAB on Beclin-1 and LC3 expressions (n=4, $\bar{x} \pm s$)

和二氢青蒿素均可抑制 PI3K/Akt /mTOR 信号通路诱导胃癌细胞发生自噬性死亡^{〔5-6〕}, 3-O-α-L-吡

表 5 不同浓度 TAB 对自噬蛋白 Beclin-1 和 LC3 表达的影响 (n=4, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Effects of different concentrations of TAB on Beclin-1 and LC3 expressions (n=4, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Beclin-1	LC3 II/LC3 I
空白对照组	-	0.25 ± 0.07	3.95 ± 0.50
TAB 组	10	0.23 ± 0.04	1.35 ± 0.21 **
TAB 组	20	0.74 ± 0.08 **	0.98 ± 0.25 **
TAB 组	40	0.84 ± 0.04 **	0.40 ± 0.11 **

注：与空白对照组比较，**P<0.01

喃鼠李糖基-(1→2)- α -L-吡喃阿拉伯糖苷(三萜皂苷 PD)也可通过 mTOR 途径,诱导非小细胞肺癌发生自噬而死亡^[7]。因此,深入研究 3-氢化松苓酸 B 诱导肿瘤细胞自噬的机制,对于有效防控肿瘤具有重要意义。

自噬作为细胞死亡的另一种形式^[8],为预防和治疗肿瘤提供了新的思路和策略,但目前自噬在肿瘤中的作用还未完全阐明。自噬的发生对肿瘤细胞起着双向调节作用,一方面,肿瘤细胞可通过自噬作用得以生存,对抗相应药物产生的治疗作用;另一方面,许多抗肿瘤药物又可通过诱导细胞发生自噬引起程序性死亡^[9]。自噬对肿瘤细胞的双向作用可能与药物剂量等药物因素有关,也可能与与细胞因素有关,如细胞分化程度,抑癌基因与癌基因表达^[10]等。因此,利用 3-氢化松苓酸 B 诱导自噬的作用,进一步研究其诱导自噬的机制。探讨不同剂量对细胞自噬的影响,不同细胞对 3-氢化松苓酸 B 作用的响应等,有利于阐明自噬对肿瘤细胞的调节作用,并落实针对性的治疗策略和用药方案。

3-氢化松苓酸 B 剂量增加可使 HGC-27 细胞自噬比例升高,自噬调控因子 Beclin-1 表达也随 3-氢化松苓酸 B 剂量增加而逐渐升高。Beclin-1 是自噬通路中的重要调节因子,在自噬形成的早期发挥重要作用,其复合物可促进自噬的发生。Beclin-1^[11]的缺失或降低在人类很多肿瘤细胞中都有出现,如前列腺癌、乳腺癌和卵巢癌^[12]等,可为进一步筛选 3-氢化松苓酸 B 抑瘤谱提供了依据。

正常细胞可通过自噬降解物质、促进代谢来满足自身正常生理活动^[13]和稳态,3-氢化松苓酸 B 还具有降糖、保护神经细胞等多种作用^[3,14],故调节自噬可能是 3-氢化松苓酸 B 多种药理作用的共同机制,值得进一步研究。

参考文献:

[1] 王星琴,汪鋆植,郭志勇,等. 大白栓菌中 3-氢化松苓酸

B 含量的测定[J]. 三峡大学学报:自然科学版,2010,32(3):94-99.

[2] Keller A C, Maillard M P, Hostettmann K, *et al.* Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*[J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(4):1041-1046.

[3] Zhang Q Y, Wang J H, He H B, *et al.* Trametenolic acid B reverses multidrug resistance in breast cancer cells through regulating the expression level of P-glycoprotein[J]. *Phytother Res*, 2014, 28(7):1037-1044.

[4] 陈 奇. 中药药理研究方法学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2006:442.

[5] 王玉钰,王爱华,郑宝军,等. 二氢青蒿素诱导胃癌 SGC7901 细胞体外自噬研究[J]. 广东医学,2012,33(22):3394-3397.

[6] 赵雪峰,魏敬妙,李 勇,等. 丹参酮 II_A 诱导体外胃癌细胞的自噬[J]. 中成药,2014,36(1):10-14.

[7] Zhao R L, Chen M J, Jiang Z Q, *et al.* Platycodin-D induced autophagy in non-small cell lung cancer cells via PI3K/Akt/mTOR and MAPK signaling pathways[J]. *J Cancer*, 2015, 6(7):623-631.

[8] 张志才,邵增务,熊鑫茗,等. 顺铂诱导骨肉瘤细胞自噬及其与凋亡关系的体外研究[J]. 华中科技大学学报:医学版,2011,40(2):178-182.

[9] Abrahamsen H, Stenmark H, Platta H W. Ubiquitination and phosphorylation of Beclin 1 and its binding partners: turning class III phosphatidylinositol 3-kinase activity and tumor suppression[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(11):1584-1591.

[10] Li M, Sun H, Song L, *et al.* Immunohistochemical expression of mTOR negatively correlates with PTEN expression in gastric carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2012, 4(6):1213-1218.

[11] Fu L L, Cheng Y, Liu B. Beclin-1: autophagic regulator and therapeutic target in cancer[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(5):921-924.

[12] Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(12):961-967.

[13] 刘 虹,邵荣光. 自噬在肿瘤发生与发展过程中的调节作用[J]. 药学报,2016,51(1):23-28.

[14] 蒋 刚,汪鋆植,李建新,等. 大白栓菌乙酸乙酯萃取部位的降糖机制研究[J]. 中国药师,2012,15(3):287-290.