

[药 理]

## 桑皮素对人宫颈癌 Hela 细胞增殖与凋亡的影响

左亚奇, 高志红, 庞 策, 刘赛娜, 张晓丽, 孙转友, 甄 攀\*  
(河北北方学院, 河北 张家口 075000)

**摘要:** **目的** 探讨桑皮素对人宫颈癌 Hela 细胞的增殖抑制及其凋亡诱导作用。**方法** 用 10、15、20  $\mu\text{mol/L}$  桑皮素作用 Hela 细胞 24 h 后, 在扫描电镜、透射电镜及倒置显微镜下观察细胞形态学变化; 利用 MTT 法检测桑皮素对 Hela 细胞的增殖的影响; 应用 Hoechst 单染实验检测 Hela 细胞的凋亡情况; 采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 *Bax*、*Bcl-2* mRNA 及蛋白的表达。**结果** 桑皮素 (2.5、5、7.5、10、15、20、25  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 Hela 细胞 24、48 h, 能明显的抑制 Hela 细胞增殖 ( $P < 0.05$ ), 且呈浓度依赖性。桑皮素 (10、15、20  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 Hela 细胞 24 h, 细胞呈现早期凋亡。与 0  $\mu\text{mol/L}$  桑皮素组比较, 桑皮素 (10、15、20  $\mu\text{mol/L}$ ) 能显著上调 *Bax* mRNA 及蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 下调 *Bcl-2* mRNA 及蛋白表达 ( $P < 0.05$ )。**结论** 桑皮素通过上调 *Bax* 表达和下调 *Bcl-2* 表达, 从而诱导 Hela 细胞发生凋亡。

**关键词:** 桑皮素; Hela 细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)02-0317-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.02.010

## Effects of morusin on the proliferation and apoptosis of human cervical cancer Hela cells

ZUO Ya-qi, GAO Zhi-hong, PANG Ce, LIU Sai-na, ZHANG Xiao-li, SUN Zhuan-you, ZHEN Pan\*

(Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

**ABSTRACT: AIM** To investigate the effects of morusin on proliferation inhibition and apoptosis induction of human cervical carcinoma Hela cells. **METHODS** Hela cells treated with 10, 15 and 20  $\mu\text{mol/L}$  of morusin for 24 h had their morphology observed under inverted microscope, transmission electron microscope and scanning electron microscope. The effect of morusin on Hela cells proliferation was detected by MTT assay, and its impact on the apoptosis was performed by Hoechst single staining assay. The expressions of *Bax* and *Bcl-2* mRNA and protein were detected by RT-qPCR and Western blot. **RESULTS** 24 h and 48 h treatment of Hela cells with morusin (2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25  $\mu\text{mol/L}$ ) brought forth a significant concentration-dependent inhibition of Hela cells proliferation ( $P < 0.05$ ). Hela cells exposed to 24 h morusin (10, 15, 20  $\mu\text{mol/L}$ ) showed early apoptosis. Compared with 0  $\mu\text{mol/L}$  morusin, morusin (10, 15, 20  $\mu\text{mol/L}$ ) contributed significant up-regulation of *Bax* mRNA and protein expression ( $P < 0.05$ ), and down-regulation of *Bcl-2* mRNA and protein expression ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION** Morusin can induce apoptosis of Hela cells by up-regulating *Bax* expression and down-regulating *Bcl-2* expression.

**KEY WORDS:** Morusin; Hela cells; proliferation; apoptosis

收稿日期: 2019-04-12

基金项目: 河北省高等学校科学技术研究项目 (ZD2016016); 2018 年度河北北方学院一般项目 (YB2018030)

作者简介: 左亚奇 (1993—), 男, 硕士生, 研究方向为中医与中药学。Tel: 15369305611, E-mail: 1458057064@qq.com

\* 通信作者: 甄 攀 (1965—), 硕士, 教授, 硕士生导师, 从事天然药物学研究。E-mail: 1006867119@qq.com

桑皮素, 又名桑根皮素、桑白皮素, 是一种异戊二烯基取代的黄酮类化合物。研究发现桑皮素为桑白皮的主要药用成分, 常被用作对照品对桑白皮进行质量监测, 具有抗菌<sup>[1]</sup>、抗氧化<sup>[2]</sup>、降血糖<sup>[3]</sup>及抗肿瘤<sup>[4]</sup>等多种生物活性, 尤其是在抗肿瘤方面。邓洁等<sup>[5]</sup>将桑皮素作用于 STAT3 磷酸化下的卵巢癌 SKOV3 细胞后, 发现桑皮素显著抑制 SKOV3 细胞的增殖, 并降低 Cyclin D1 蛋白的表达; Dat 等<sup>[6]</sup>通过 MTT 实验发现桑叶中提取的桑皮素对多种肿瘤细胞均有较好的抑制作用; 有研究发现桑皮素是 STAT3 通路中的一个有效的抑制剂, 对肝癌和胰腺癌细胞具有抑制作用, 另有体内外实验研究表明桑皮素对多种肿瘤细胞具有抑制作用并且对正常细胞的生长几乎没有影响<sup>[7-9]</sup>。本实验主要研究桑皮素抑制人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖作用, 以及初步探讨其促进 HeLa 细胞凋亡的作用机制。

## 1 材料

1.1 药物 桑皮素分离自川桑枝 (采集于中国云南金平县, 由中国医学科学院药物研究所马林副研究员鉴定为 *Morus notabilis*), 结构式如图 1 所示。川桑树枝 20 kg, 粉碎, 用 95% 乙醇浸泡, 回流提取 3 次, 提取液合并, 减压浓缩得浸膏。将浸膏溶解后以硅胶 (100~200 目) 拌样并干燥, 分别用石油醚 (PE, 60~90 °C)、二氯甲烷、乙酸乙酯和丙酮依次洗脱。二氯甲烷部分浓缩得浸膏 200 g, 浸膏以 D101 大孔吸附树脂拌样并干燥, 用乙醇水梯度洗脱 (30%、80%、90% 乙醇), 80% 乙醇部分得浸膏 29 g, 然后依次用硅胶 (200~300 目) 柱色谱 (丙酮-石油醚梯度洗脱)、反相 C<sub>18</sub> 柱色谱 (甲醇-水梯度洗脱)、葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱 (乙醇洗脱)、制备型 RP-HPLC (甲醇-水或乙腈-水洗脱) 等分离纯制, 得到化合物桑皮素, 且含有量为 1.07 mg/g, 纯度为 99.6%。

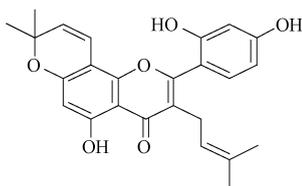


图 1 桑皮素结构式

Fig. 1 Chemical structure of morusin

1.2 细胞株 HeLa 细胞取自河北北方学院生命科学中心科技楼三楼 307 室细胞库。

1.3 试剂 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号 1616496); RPMI 1640 培养基 (北京索莱宝科技有

限公司, 批号 20180511); Bax 抗体 (英国 Abcam 公司, 批号 GR239643-1); Bcl-2 抗体 (英国 Abcam 公司, 批号 GR25072-1); Hoechst33258 染色试剂盒 (北京碧云天生物技术研究所, 批号 102017180427); 抗荧光淬灭剂 (北京碧云天生物技术研究所, 批号 010518180509);  $\beta$ -actin 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号 AG05127919S); MTT 试剂 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 20180428); SDS-PAGE 凝胶试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 20171113); 5-氟尿嘧啶 (5-FU, 海旭东海普药业有限公司, 批号 H31020593)。

## 2 方法

2.1 细胞培养 HeLa 细胞采用含 10% 胎牛血清、100  $\mu$ g/mL 青霉素、100  $\mu$ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下的培养箱中培养, 常规换液及传代培养, 正常情况下细胞贴壁生长。

2.2 药物配制 精密称取桑皮素 2.10 mg, 加入 0.05 mL 二甲基亚砜混匀震荡, 使药物全部溶解, 然后用 RPMI 1640 培养基稀释成各用药浓度, 放置于 4 °C 冰箱保存, 保质期 10 d。实验前取 1 支 5-FU (10 mL/支, 0.25 g), 用 RPMI 1640 培养基稀释配制阳性药 (192  $\mu$ mol/L), 放置于 4 °C 冰箱保存。

2.3 HeLa 细胞的形态学变化观察 ①倒置显微镜观察 HeLa 细胞的形态, 用 10、15、20  $\mu$ mol/L 桑皮素作用 HeLa 细胞 24 h 后, 镜下观察细胞形态变化。②透射电镜观察 HeLa 细胞的超微结构, 选取对数期生长的 HeLa 细胞, 经不同浓度 (0、15  $\mu$ mol/L) 桑皮素作用 24 h 后, 胰酶消化 2 min, 离心 (1 500 r/min, 5 min), 置于 1.5 mL 离心管内; 2.5% 的戊二醛固定细胞, PBS 清洗 3 次; 1% 锇酸对 HeLa 细胞进行固定, PBS 清洗细胞 3 次; 丙酮梯度脱水; 浸透在丙酮和包埋液 (1:1) 的混合液中, 于 37 °C 温箱中过夜; 包埋, 修块, 切片, 电子染色, 镜下观察。③扫描电镜观察 HeLa 细胞的超微结构, 选取对数期生长的 HeLa 细胞, 经不同浓度 (0、15  $\mu$ mol/L) 桑皮素作用 24 h 后, 经胰酶消化 2 min, 计数后进行铺板, 待细胞融合度为 80%~90% 时, PBS 清洗 3 次, 5 min/次, 2.5% 的戊二醛固定 1 h, PBS 清洗 3 次, 5 min/次, 采用酒精梯度脱水, 叔丁醇浸泡 30 min, 置于 -20 °C 冰箱里变为固体, 冷冻干燥仪进行干燥, 喷

金, 镜下观察。

#### 2.4 MTT法检测桑皮素对Hela细胞增殖抑制作用

取处于对数期并生长良好的Hela细胞, 胰酶消化后, 加入培养基轻轻吹打混匀单细胞悬液, 均匀加入96孔板内, 常规培养24 h后, 加入桑皮素(2.5、5、7.5、10、15、20、25 μmol/L), 作用24、48 h后, 终止培养。同时设置正常组、DMSO组(含0.1% DMSO的等量培养基)及阳性对照组(5-FU, 192 μmol/L), 并分别设置6个复孔。于每孔中加入10 μL MTT试剂, 培养箱中静置4 h后用酶标仪测定490 nm处吸光度值[OD(490 nm)], 并计算IC<sub>50</sub>。

#### 2.5 Hoechst染色法观察Hela细胞的凋亡

取处于对数期并生长良好的Hela细胞, 胰酶消化后, 用细胞计数板将细胞浓度调整为5×10<sup>5</sup>/mL, 将盖玻片放置于6孔板中, 并每孔加入2 mL单细胞悬液, 培养24 h。次日加入桑皮素(0、10、15、20 μmol/L)作用24 h后, 终止培养。爬片完成后用PBS清洗爬片3次, 3 min/次, 丙酮室温固定20 min, PBS清洗。暗室内滴加Hoechst 33258染液对细胞进行染色, PBS清洗。抗荧光淬灭剂封片, 镜下观察并拍照。

#### 2.6 Western blot检测Hela细胞Bax、Bcl-2蛋白表达

收集浓度为0、10、15、20 μmol/L桑皮素处理24 h及经15 μmol/L桑皮素分别处理0、24、48 h后的Hela细胞, PBS清洗, 1 700 r/min离心收集细胞。加入0.5 mL蛋白裂解液, 混匀静置5 min, 加1 mL蛋白抽提试剂, 混匀静置10 min, 10 000 r/min、4℃高速离心15 min, 保留中间蛋白膜, 加1 mL无水乙醇洗涤沉淀, 10 000 g、4℃离心3 min, 去掉无水乙醇室温干燥蛋白。加入100 μL 2% SDS溶解总蛋白, 测定蛋白浓度, 加入上样缓冲液蛋白煮沸, 冷却后置于4℃冰箱保存, 配制SDS聚丙烯酰胺凝胶。每孔分别加5 μL Maker, 正常组蛋白, 样品蛋白, 电泳1 h, 转膜1 h, 5%脱脂牛奶封闭1 h, PBST洗膜3次, 10 min/次, 加入一抗(1:1 000)覆盖, 4℃过夜; 次日, PBST清洗3次, 加入二抗(1:5 000)覆盖, 室温孵育1 h, PBST洗膜3次, 10 min/次, 滴加发光液拍照, 用Quantity one测定条带灰度值。

#### 2.7 qRT-PCR检测Bax、Bcl-2 mRNA表达

消化洗涤对数期正常组和加药组细胞, 2 500 g离心收集细胞, PBS清洗3次, 去上清, 加1 mL RNA抽提试剂静置5 min, 加入氯仿0.2 mL, 上下颠倒,

室温静置2 min, 于4℃下12 000 r/min离心15 min, 吸取上清至无酶离心管内, 加等体积异丙醇, 混匀后室温静置10 min, 于4℃下10 000 r/min离心10 min, 保留沉淀, 加1 mL 75%灭酶乙醇, 于4℃下7 500 r/min离心5 min, 保留沉淀并室温干燥, 加20 μL无酶水溶解, 取1 μL RNA于NanoDrop2000超微量分光光度计检测总RNA浓度及纯度。根据试剂盒说明进行反转录, Bax、Bcl-2及内参引物β-actin的引物序列及长度, 见表1。对反转录产物进行扩增, 反应体系参照Yu等<sup>[10]</sup>方法。采用2<sup>-ΔΔCt</sup>方法对mRNA的相对转录水平进行统计分析。

表1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因名称	引物序列(5'-3')	长度/bp
β-actin	正向 AGAGGAAATCGTGCGTGAC	305
	反向 CAATAGTGATGACCTGGCCGT	
Bax	正向 CTGAGTTGACTCCTACTGTGGA	257
	反向 TCTTCCCAGGTCGATAAAGT	
Bcl-2	正向 AGTGGTATAGACAGGTCTGTTG	304
	反向 CTGCAAGACTTCCATCCAG	

#### 2.8 统计学分析

采用SPSS 19.0统计分析, 数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组内比较采用配对样本t检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以P≤0.05表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 桑皮素对Hela细胞形态学的影响

##### 3.1.1 倒置显微镜观察

桑皮素(0、10、15、20 μmol/L)处理Hela细胞24 h, 倒置显微镜观察发现细胞状态由正常的六棱形逐渐皱缩变圆, 细胞贴壁率降低, 且有细胞穿孔现象, 并且随着桑皮素浓度的增高, 该现象越明显, 见图2。

##### 3.1.2 透射电镜观察

用透射电镜观察0、15 μmol/L桑皮素组细胞超微结构, 发现15 μmol/L桑皮素组细胞膜不完整, 染色质高度盘绕, 细胞器结构不完整, 形成许多气穴现象的空泡结构, 见图3。

##### 3.1.3 扫描电镜观察

用扫描电镜观察0、15 μmol/L桑皮素组细胞超微结构, 发现15 μmol/L桑皮素组细胞膜皱缩, 细丝状突起断裂, 表面呈不规则的块状, 见图4。

#### 3.2 MTT法检测Hela细胞增殖

与DMSO对照组比较, 不同浓度桑皮素(2.5、5、7.5、10、15、20、25 μmol/L)处理Hela细胞24、48 h, 均能抑制Hela细胞增殖(P<0.05), 且呈浓度依赖性;

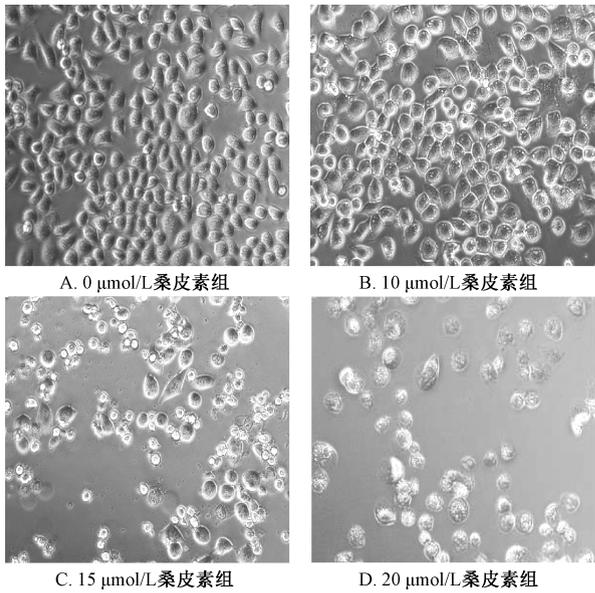


图2 不同浓度桑皮素对Hela细胞形态的影响(×200)

Fig. 2 Effects of different concentrations of morusin on the morphology of HeLa cells (×200)

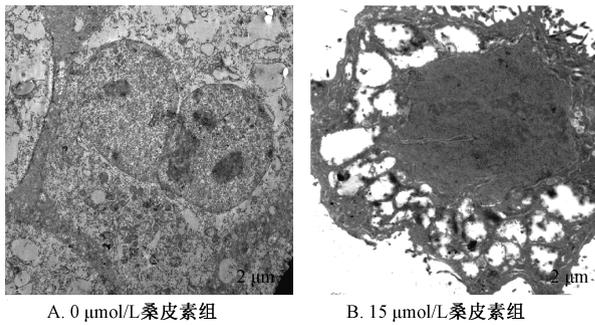


图3 桑皮素对Hela细胞超微结构的影响(透射电镜)

Fig. 3 Effect of morusin on the microstructure of HeLa cells (TEM)

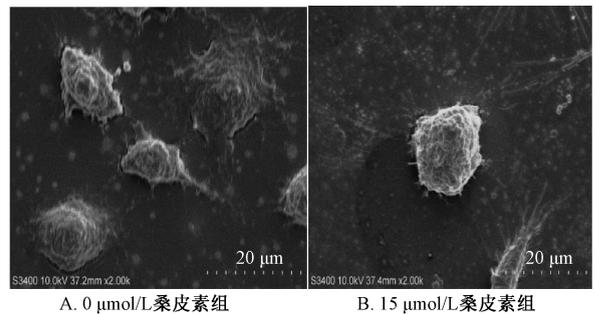


图4 桑皮素对Hela细胞显微结构的影响(扫描电镜)

Fig. 4 Effect of morusin on the microstructure of HeLa cells (SEM)

其中桑皮素处理Hela细胞24 h,  $IC_{50} = 17.2 \mu\text{mol/L}$ , 见表2。

3.3 Hoechst单染检测Hela细胞凋亡 不同浓度桑皮素(0、10、15、20  $\mu\text{mol/L}$ )处理Hela细胞

表2 桑皮素对Hela细胞的抑制作用( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab. 2 Inhibition of HeLa by morusin ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	增殖抑制率/%	
	24 h	48 h
0 $\mu\text{mol/L}$ 桑皮素组	0	0
DMSO 对照组	0.41±0.02	0.53±0.03
2.5 $\mu\text{mol/L}$ 桑皮素组	4.21±0.22*	5.65±0.11*
5 $\mu\text{mol/L}$ 桑皮素组	9.28±0.35*	11.41±0.33*
7.5 $\mu\text{mol/L}$ 桑皮素组	16.33±0.59*	20.17±0.88*
10 $\mu\text{mol/L}$ 桑皮素组	20.65±1.91*	25.03±2.06*
15 $\mu\text{mol/L}$ 桑皮素组	40.37±2.11*	43.12±2.51*
20 $\mu\text{mol/L}$ 桑皮素组	57.02±1.38*	62.28±2.71*
25 $\mu\text{mol/L}$ 桑皮素组	71.32±2.44*	75.33±2.06*
阳性对照组	43.72±1.61*	60.25±1.64*

注:与同一时间DMSO对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

24 h后,经Hoechst33258染色,镜下观察发现正常组细胞呈椭圆形和正常蓝色;10  $\mu\text{mol/L}$ 桑皮素组细胞个别染色加深,染色质固缩,细胞核呈致密浓染;15  $\mu\text{mol/L}$ 桑皮素组浓染细胞数量明显增多,多数细胞核边缘变钝;20  $\mu\text{mol/L}$ 桑皮素组有部分细胞核出现破碎的现象,见图5。

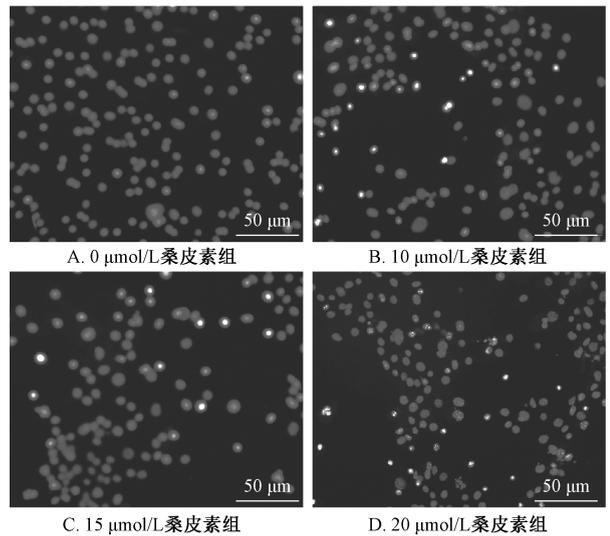


图5 不同浓度桑皮素对Hela细胞早期凋亡的影响

Fig. 5 Effects of different concentrations of morusin on early apoptosis of HeLa cells

3.4 Western blot检测Hela细胞凋亡相关蛋白的表达 不同浓度桑皮素(10、15、20  $\mu\text{mol/L}$ )处理Hela细胞24 h,与0  $\mu\text{mol/L}$ 桑皮素比较,桑皮素(10、15、20  $\mu\text{mol/L}$ )能显著抑制Hela细胞中Bcl-2蛋白表达,促进Bax蛋白表达( $P < 0.05$ );15  $\mu\text{mol/L}$ 桑皮素作用Hela细胞24、48 h,Hela细胞中Bcl-2蛋白下调,Bax蛋白表达上调( $P < 0.05$ )。见表3~4、图6。

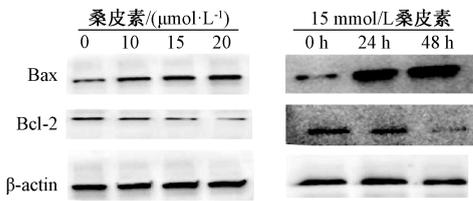


图6 Western blot 检测桑皮素作用 HeLa 细胞后 Bcl-2、Bax 蛋白表达

Fig. 6 Protein expressions of Bcl-2 and Bax in HeLa cells treated with morusin by Western blot

表3 不同浓度桑皮素对 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab. 3 Effects of different concentrations of morusin on the expressions of Bcl-2 and Bax proteins ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	Bax	Bcl-2
0 μmol/L 桑皮素组	0.610±0.012	0.925±0.084
10 μmol/L 桑皮素组	0.941±0.010*	0.856±0.021*
15 μmol/L 桑皮素组	1.042±0.021*	0.576±0.020*
20 μmol/L 桑皮素组	1.145±0.007*	0.466±0.017*

注:与 0 μmol/L 桑皮素组比较, \* $P < 0.05$ 。

表4 15 μmol/L 桑皮素处理 HeLa 细胞不同时间对 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab. 4 Effects of 15 μmol/L morusin treatment to HeLa cells at different times on the expression of Bcl-2 and Bax proteins ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

时间/h	Bax	Bcl-2
0	0.729±0.081	1.175±0.065
24	1.385±0.051*	0.836±0.055*
48	1.512±0.052*	0.273±0.041*

注:与 0 h 比较, \* $P < 0.05$ 。

3.5 qRT-PCR 检测 HeLa 细胞 Bcl-2、Bax mRNA 表达 不同浓度桑皮素 (0、10、15、20 μmol/L) 处理 HeLa 细胞 24 h, 与 0 μmol/L 桑皮素比较, 桑皮素 (10、15、20 μmol/L) 上调 Bax mRNA 表达, 下调 Bcl-2 mRNA 表达 ( $P < 0.05$ ), 见表 5。

表5 不同浓度桑皮素对 Bcl-2、Bax mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab. 5 Effects of different concentrations of morusin on the expressions of Bcl-2 and Bax mRNA ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	Bax	Bcl-2
0 μmol/L 桑皮素组	0.995±0.105	1.023±0.031
10 μmol/L 桑皮素组	1.801±0.132*	0.672±0.069*
15 μmol/L 桑皮素组	2.280±0.286*	0.498±0.061*
20 μmol/L 桑皮素组	3.679±0.304*	0.242±0.036*

注:与 0 μmol/L 桑皮素组比较, \* $P < 0.05$ 。

#### 4 讨论

宫颈癌是世界上常见的恶性肿瘤之一, 较多发

生在欧洲和非洲, 临床诊治中宫颈癌的早期症状不甚明显, 患者多数表现为中晚期, 而且预后效果不好<sup>[11]</sup>。目前在宫颈癌的常规治疗中, 常常以早中期的外科手术治疗为主, 同时以中晚期的放疗和化疗为辅助手段<sup>[12]</sup>。但是宫颈癌大都早期不易发现, 而放化疗在治疗的同时对机体又有一定程度的损伤并增加了患者的痛苦。

黄酮类化合物广泛存在于药用植物中, 不同的黄酮类化合物都表现出不同的抗肿瘤效果, 并且有部分已被用于癌症的治疗中<sup>[13]</sup>。其中有些黄酮类化合物 (如蛇葡萄素) 被用于前列腺癌的防治研究并获得不错的效果<sup>[14]</sup>。异戊二烯基黄酮作为黄酮化合物的一种, 具有抑菌、消炎、抗氧化等作用<sup>[15]</sup>。

桑皮素是从桑树根皮或者枝皮中提取分离得到的, 广泛存在于桑树的各个部位中, 特别是在桑树的根皮中含有量最高, 枝皮中的含有量次之<sup>[16-17]</sup>。国内外的学者对其做了大量研究, 发现桑皮素的药理作用十分丰富, 具有抑菌、抗炎及抗病毒等作用, 并且具有一定的细胞毒性, 对多种癌细胞均有抑制作用<sup>[18]</sup>。

本实验 MTT 结果表明, 桑皮素作用 HeLa 细胞 24 h 后,  $IC_{50} = 17.2 \mu\text{mol/L}$ , 且随着桑皮素浓度的提高, 效果越明显。镜下观察发现正常组的细胞状态良好呈六棱形, 桑皮素组细胞皱缩变圆, 贴壁细胞数量相对减少, 明显可以看到细胞穿孔的现象, 并且随着桑皮素浓度的增高, 细胞变化越明显。透射电镜结果显示, 15 μmol/L 桑皮素组细胞膜不完整, 染色质固缩, 细胞器结构损坏, 出现许多气穴现象的空泡结构。扫描电镜结果显示, 15 μmol/L 桑皮素组细胞膜皱缩, 细丝状突起断裂, 表面呈不规则的块状。

桑皮素作用于癌细胞的重要靶点, 抑制肿瘤细胞的生长并诱导其凋亡, 最终使癌细胞走向死亡<sup>[19]</sup>。本实验通过利用 Hoechst 单染检测 HeLa 细胞凋亡, 明显地看到随着桑皮素作用浓度升高, 核染色逐渐加深, 高浓度桑皮素作用下, 细胞核裂解。

细胞凋亡与相关基因的表达有关, 药物可以通过调控一个或多个基因来诱导癌细胞的凋亡或者坏死。Bcl-2 蛋白家族成员可以通过调控线粒体途径影响细胞凋亡。Bcl-2 家族包括诱导凋亡的蛋白 (Bax、Bak、Bid、Bim) 以及抑制凋亡的蛋白 (Bcl-2、Bcl-xL)。当细胞发生凋亡时, Bax 与 Bak

发生寡聚化,从胞质聚集到线粒体的外膜上,与膜上电压作用打开阴离子通路,使线粒体内的细胞色素C等凋亡因子等释放到细胞质基质中,引起细胞死亡<sup>[20]</sup>。

为了验证桑皮素促进Hela细胞凋亡的分子机制,本实验利用Western blot和qRT-PCR实验观察Hela细胞中*Bax*、*Bcl-2* mRNA和蛋白的表达。结果表明,桑皮素可能通过促进*Bax*和抑制*Bcl-2* mRNA和蛋白的表达来诱导宫颈癌Hela细胞的凋亡,但是其作用机理尚不清楚,仍需要做进一步的研究。综上所述,桑皮素通过升高*Bax*因子的表达和降低*Bcl-2*因子的表达,从而诱导Hela细胞发生凋亡。

#### 参考文献:

[1] 庞道睿,刘凡,沈维治,等.桑根皮素的抑菌活性及其稳定性研究[J].蚕业科学,2013,39(6):1150-1154.

[2] Ding B, Lü Y, Zhang Y Q. Anti-tumor effect of morusin from the branch bark of cultivated mulberry in Bel-7402 cells via the MAPK pathway[J]. *RSC Adv*, 2016, 6(21): 17396-17404.

[3] Abd El-Mawla A M, Mohamed K M, Mostafa A M. Induction of biologically active flavonoids in cell cultures of *Morus nigra* and testing their hypoglycemic efficacy[J]. *Sci Pharm*, 2011, 79(4): 951-961.

[4] Tseng T H, Chuang S K, Hu C C, et al. The synthesis of morusin as a potent antitumor agent[J]. *Tetrahedron*, 2010, 66(6): 1335-1340.

[5] 邓洁,张小霞,邓晓杨,等.桑皮素通过抑制STAT3磷酸化下调卵巢癌SKOV3细胞Cyclin D1表达的实验研究[J].西部医学,2016,28(1):19-21.

[6] Dat N T, Binh P T, Quynh le T P, et al. Cytotoxic prenylated flavonoids from *Morus alba* [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(8): 1224-1227.

[7] Kim C, Kim J H, Oh E Y, et al. Blockage of STAT3 signaling pathway by morusin induces apoptosis and inhibits invasion in human pancreatic tumor cells[J]. *Pancreas*, 2015, 45(3): 409-419.

[8] Lim S L, Park S Y, Kang S, et al. Morusin induces cell death through inactivating STAT3 signaling in prostate cancer cells

[J]. *Am J Cancer Res*, 2014, 5(1): 289-299.

[9] Wan L Z, Ma B, Zhang Y Q. Preparation of morusin from *Ramulus mori* and its effects on mice with transplanted H22 hepatocarcinoma[J]. *Biofactors*, 2014, 40(6): 636-645.

[10] Yu X, Liu S, Li J, et al. MicroRNA-572 improves early post-operative cognitive dysfunction by down-regulating neural cell adhesion molecule 1 [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0118511.

[11] Aggarwal P. Cervical cancer: can it be prevented? [J]. *World J Clin Oncol*, 2014, 5(4): 775-780.

[12] McGraw S L, Ferrante J M. Update on prevention and screening of cervical cancer [J]. *World J Clin Oncol*, 2014, 5(4): 744-752.

[13] Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types[J]. *Pharmacogn Rev*, 2014, 8(16): 122-146.

[14] 李伟,许学芬.白藜芦醇诱导人前列腺癌DU145细胞凋亡的作用机制[J].中国药科大学学报,2018,49(6):711-717.

[15] Yeap S, Akhtar M N, Lim K L, et al. Synthesis of an anthraquinone derivative (DHAQC) and its effect on induction of G2/M arrest and apoptosis in breast cancer MCF-7 cell line [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 983-992.

[16] Nomura T, Fukai T, Yamada S, et al. Studies on the constituents of the cultivated mulberry tree. I. three new prenylflavones from root bark of *Morus alba* L [J]. *Chem Pharm Bull*, 1978, 26(3): 1394-1402.

[17] Ma B, Cui F, Zhang Y. Rapid analysis of morusin from *Ramulus Mori* by HPLC-DAD, its distribution *in vivo* and differentiation in the cultivated mulberry species [J]. *Food Nutr Sci*, 2013, 4(2): 189-194.

[18] Asano N, Kuroi H, Ikeda K, et al. New polyhydroxylated pyrrolizidine alkaloids from *Muscari armeniacum*: structural determination and biological activity [J]. *Tetrahedron*, 2000, 11(1): 1-8.

[19] Wang L, Guo H, Yang L, et al. Morusin inhibits human cervical cancer stem cell growth and migration through attenuation of NF- $\kappa$ B activity and apoptosis induction [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 379(1-2): 7-18.

[20] Bonora M, Pinton P. The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death [J]. *Front Oncol*, 2014, 4: 302.