钩吻总生物碱及常绿钩吻碱的体外抗肿瘤作用及机制Δ

陈惠娴[1*]，王文义[2]，檀兴慧[1]，李高攀[1]，张晓琼[3]，李德森[1#]，吴水生[1]（1.福建中医药大学药学院，福州 350122；2.福建中医药大学科技创新与转化中心，福州 350122；3.泉州光前医院药剂科，福建 泉州 362321）

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408(2023)12-1437-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.12.06

摘 要 目的 探讨钩吻总生物碱（TA）和常绿钩吻碱（SPV）的体外抗肿瘤作用及机制。**方法** 观察低、中、高浓度TA（50、100、200 μg/mL）和SPV（10、30、50 μmol/L）对人肝癌细胞（HepG2、Bel-7402）、人肺癌细胞（A549）、人结肠癌细胞（HCT-8）形态的影响并实时监测TA和SPV对4种肿瘤细胞的毒性；检测TA和SPV对HCT-8细胞上清液中胱天蛋白酶3（caspase-3）、caspase-9含量和细胞中磷酸化蛋白激酶B（p-Akt）（Thr308、Ser473）、B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bax）、生存素、C/EBP-同源蛋白（CHOP）、免疫球蛋白结合蛋白（Bip）、微管相关蛋白1轻链3Ⅱ（LC3Ⅱ）蛋白表达的影响。**结果** TA和SPV干预后的4种肿瘤细胞形态均出现体积缩小、细胞核皱缩的现象，细胞活性均出现不同程度的降低，其中TA和SPV对HCT-8细胞的抑制效果最好。TA和SPV干预后的HCT-8细胞上清液中caspase-3、caspase-9含量和细胞中Bax、CHOP、Bip、LC3Ⅱ蛋白表达水平均不同程度升高，p-Akt（Thr308、Ser473）、Bcl-2、生存素蛋白表达水平均不同程度降低。**结论** TA和SPV对上述4种肿瘤细胞均具有抑制作用，其对HCT-8细胞的抑制效果最好；二者对HCT-8细胞的作用机制可能与促进细胞凋亡、激活内质网应激和细胞自噬有关。

关键词 钩吻总生物碱；常绿钩吻碱；抗肿瘤；细胞凋亡；内质网应激；细胞自噬

Antitumor effect and mechanism of total alkaloids of *Gelsemium elegans* and sempervirine *in vitro*

CHEN Huixian[1], WANG Wenyi[2], TAN Xinghui[1], LI Gaopan[1], ZHANG Xiaoqiong[3], LI Desen[1], WU Shuisheng[1]（1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. Innovation and Transformation Center, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 3. Dept. of Pharmacy, Quanzhou Guangqian Hospital, Fujian Quanzhou 362321, China）

ABSTRACT OBJECTIVE To explore the antitumor effect and mechanism of total alkaloids of *Gelsemium elegans*（TA）and sempervirine（SPV）*in vitro*. **METHODS** The effects of low, medium and high concentrations of TA（50, 100, 200 μg/mL）and SPV（10, 30, 50 μmol/L）on the morphology of human hepatoma cells（HepG2, Bel-7402）, human lung cancer cells（A549）and human colon cancer cells（HCT-8）were observed, and the toxicity of TA and SPV to four tumor cells was monitored. The effects of TA and SPV on the contents of caspase-3 and caspase-9 in the supernatant of HCT-8 cells, the protein expressions of phosphorylated protein kinase B（p-Akt）（Thr308, Ser473）, B-cell lymphoma 2（Bcl-2）, Bcl-2-related X protein（Bax）, survivin, C/EBP-homologous protein（CHOP）, immunoglobulin binding protein（Bip）and microtubule-associated protein 1 light chain 3Ⅱ（LC3Ⅱ）in HCT-8 cells were detected. **RESULTS** After the intervention of TA and SPV, the volume reduction and nuclear shrinkage were founded in four tumor cells; the cell activity decreased to varying degrees, among which TA and SPV had the best inhibitory effect on HCT-8 cells. After the intervention of TA and SPV, the contents of caspase-3 and caspase-9 in the supernatant of HCT-8 cells, the protein expressions of Bax, CHOP, Bip and LC3Ⅱ all increased to different degrees, while the protein expressions of p-Akt（Thr308, Ser473）, Bcl-2 and survivin in HCT-8 cells all decreased to different degrees. **CONCLUSIONS** TA and SPV have inhibitory effects on the above four tumor cells, and the inhibitory effect on HCT-8 cells is the best. The mechanism of their action on HCT-8 cells may be related to promoting apoptosis, activating endoplasmic reticulum stress and autophagy.

KEYWORDS Total alkaloids of *Gelsemium elegans*; sempervirine; antitumor; apoptosis; endoplasmic reticulum stress; autophagy

恶性肿瘤作为全球第二大死亡因素，死亡例数和发病例数逐年上升[1]。目前，对于恶性肿瘤的常规治疗手段主要有外科手术、化疗、放疗等，其中药物治疗在肿瘤综合治疗中占据重要地位，但毒副作用限制了许多一线治疗药物发挥疗效，亟须研发疗效显著、不良反应小的抗肿瘤药物。研究表明，中医药作为西医治疗的辅助手

Δ**基金项目** 国家中医药管理局临床中药学高水平中医药重点学科建设项目（No.国中医药人教函〔2023〕85号）；福建省科技计划项目（No.2020I0024，No.2020Y0051）

＊**第一作者** 硕士研究生。研究方向：中药药理学与毒理学。E-mail：1378828675@qq.com

＃**通信作者** 副教授，硕士。研究方向：中药药理学与毒理学。E-mail：32134753@qq.com

段，在癌症的预防和治疗中具有重要作用[2]。

钩吻 *Gelsemium elegans*（Gardn.et Champ.）Benth.为马钱科植物胡蔓藤的全草，又名胡蔓藤、断肠草、大茶药等，始载于《神农本草经》，味辛、苦，性温，有大毒，民间常用作治疗风湿痹痛、神经痛、水肿等症[3]。现代研究表明，钩吻具有较好的抗肿瘤、抗感染、抗炎镇痛、调节免疫等药理作用[4—5]，生物碱类成分为其主要活性成分，如钩吻素子、钩吻素甲、常绿钩吻碱（sempervirine，SPV）等[6—8]。研究发现，钩吻中的生物碱成分具有抗肝癌、结肠癌、食管癌的作用，对人结肠癌细胞、肝癌细胞、肺癌细胞等也具有明显的抑制作用[9—11]。但钩吻中的生物碱单体成分种类较多，目前其抗肿瘤物质基础及作用机制尚不明确。

自噬和凋亡是两种不同的程序性细胞死亡方式，是维持细胞自我平衡的重要机制，在生物组织器官分化、生长、发育、自我更新、疾病发生以及肿瘤形成中均有重要作用。已有研究证实，内质网应激（endoplasmic reticulum stress，ERS）途径可引起细胞凋亡，抑制磷脂酰肌醇3激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶B（protein kinase B，Akt）信号通路也可抑制肿瘤细胞增殖并诱导其凋亡[12—13]。本研究选择人肝癌细胞（HepG2、Bel-7402）、人肺癌细胞（A549）、人结肠癌细胞（HCT-8）为受试细胞，观察并分析钩吻总生物碱（total alkaloids of *G. elegans*，TA）和SPV对以上4种肿瘤细胞的影响，并进一步推测其可能的作用机制，以期为钩吻在肿瘤治疗领域的开发和应用提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括GENios Pro型酶标仪（德国Tecan公司）、xCELLigence RTCA型实时细胞分析仪（美国Agilent公司）、Ⅸ70型荧光倒置相差显微镜（日本Olympus公司）、Universal Hood Ⅱ型化学发光成像系统（美国Bio-Rad公司）、Milli-Q型超纯水系统（美国Millipore公司）。

1.2 主要药品与试剂

TA、SPV（纯度均不低于98%）均由福建中医药大学药学院3408实验室提供；紫杉醇（阳性对照药物，批号B21695，纯度≥98%）购自上海源叶生物科技有限公司；磷酸盐缓冲液（PBS）、双抗青链霉素（货号分别为SV30010、SV30010）均购自美国HyClone公司；RPMI-1640不完全培养液、0.25%胰蛋白酶（含乙二胺四乙酸）、胎牛血清（货号分别为8122298、25200056、10099-141）均购自美国Gibco公司；MTT（货号M2128）购自美国Sigma-Aldrich公司；胱天蛋白酶3（caspase-3）、caspase-9酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒（货号分别为F00370、F00372）均购自上海西唐生物科技有限公司；BCA蛋白定量分析试剂盒（货号P0012）购自上海碧云天生物技术有限公司；ECL发光检测试剂盒（货号S-6010）购自西安宇恒生物科技开发有限公司；鼠源B细胞淋巴瘤2（B-cell lymphoma 2，Bcl-2）、C/Ebp-同源蛋白（C/EBP-homologous protein，CHOP）抗体（货号分别为17447、2895）和兔源β-肌动蛋白（β-actin）、磷酸化Akt（p-Akt）（Thr308）、p-Akt（Ser473）、Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2-related X protein，Bax）、免疫球蛋白结合蛋白质（immunoglobulin binding protein，Bip）、微管相关蛋白1轻链3Ⅱ（microtubule-associated protein 1 light chain 3 Ⅱ，LC3Ⅱ）、生存素抗体（货号分别为4967、9275、9271、2772、3183、2775、2808）均购自美国CST公司；辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG二抗（货号分别为PR30011、PR30012）均购自武汉三鹰生物技术有限公司；其他试剂均为分析纯；水为自制超纯水。

1.3 细胞株

人结肠癌HCT-8细胞株、人肺癌A549细胞株、人肝癌HepG2细胞株、人肝癌Bel-7402细胞株均来源于中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 受试药物的制备

分别用二甲基亚砜溶液将TA、SPV配制成500 μg/mL、200 μmol/L的受试药物溶液，于4 ℃保存待用，使用前用完全培养基稀释至相应浓度。

2.2 细胞培养

用含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的RPMI-1640培养基，将4种细胞均培养于37 ℃、5%CO_2培养箱中，待细胞生长达到对数生长期后用0.25%胰蛋白酶消化、传代。

2.3 细胞形态观察

取对数生长期的细胞消化后，分别以3×10^5个/孔接种至6孔板中，每孔加入2 mL相应的培养基，常规培养24 h使细胞贴壁后吸弃旧培养基，分别按低、中、高浓度TA组（50、100、200 μg/mL，根据前期预实验结果确定浓度）和低、中、高浓度SPV组（10、30、50 μmol/L，根据前期预实验结果确定浓度）加药干预48 h，另设空白组（含细胞不含药物），每组设3个复孔，用倒置相差显微镜观察细胞的形态变化。

2.4 细胞毒性考察

取对数生长期的细胞悬液，加入相应的培养基稀释，使细胞密度为8×10^4个/mL。取一块96孔板，按100 μL/孔加入细胞培养基，除去背景，吸弃旧培养基；取各细胞悬液分别接种于96孔板中，每孔100 μL，培养24 h，使细胞贴壁，吸弃旧培养基，分别按“2.3”项下低、中、高浓度TA组和低、中、高浓度SPV组加药继续培养24 h，另设调零组（只含培养基）和空白组，每组设4个复孔，用xCELLigence系统动态监测48 h内的细胞生长情况。

2.5 细胞上清液中caspase-3、caspase-9含量检测

取对数生长期的HCT-8细胞（经检测，TA和SPV对HCT-8细胞的抑制效果最好），按“2.4”项下方法分组，加药，继续培养48 h，另设空白组和紫杉醇组（5 μmol/L，根

据前期预实验结果确定浓度），每组设3个复孔。按ELISA试剂盒说明书操作，用酶标仪测定450 nm波长处的光密度，计算细胞上清液中caspase-3、caspase-9的含量。

2.6 细胞中凋亡、ERS、自噬相关蛋白表达检测

取对数生长期的HCT-8细胞，按“2.3”项下方法分组，加药，继续培养48 h，另设空白组，每组设3个复孔。培养结束后提取细胞总蛋白，用BCA法检测蛋白样本浓度，经电泳、切胶、转膜、封闭后，加入抗体孵育[一抗：β-actin、p-Akt（Thr308）、p-Akt（Ser473）、Bax、Bcl-2、Bip、LC3Ⅱ、CHOP、生存素，稀释比均为1∶1 000；二抗：相应的IgG，稀释比均为1∶10 000]，曝光，显影，以β-actin为内参，用Image Lab软件分析目标蛋白与内参的灰度值比值。

2.7 统计学分析

采用SPSS 26.0软件进行统计学分析。数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐性时组间两两比较采用LSD-t检验，方差不齐时组间两两比较采用Tamhane’s T2检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 TA和SPV对4种肿瘤细胞形态的影响

与空白组比较，低、中、高浓度TA和SPV干预后的HCT-8、HepG2、Bel-7402、A549细胞形态逐渐不规则，出现体积缩小、细胞核皱缩的现象，显微图见图1（低、中浓度TA和SPV组图略）。

3.2 TA和SPV对细胞毒性的影响

如图2所示，在给药后4～6 h（监测时间28～30 h）TA和SPV开始对4种肿瘤细胞的活性产生影响（给药干预后部分细胞活性升高可能是由于应激反应），与空白组比较，细胞增殖速率均减慢。给予TA和SPV后约4 h，随着药物浓度的增加，HCT-8细胞的活性也随之降低；而TA和SPV干预对其余3种细胞的增殖抑制作用较弱。

3.3 TA和SPV对HCT-8细胞上清液中caspase-3、caspase-9含量的影响

与空白组比较，中、高浓度TA和高浓度SPV以及紫杉醇干预后的HCT-8细胞上清液中caspase-3含量均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），且高浓度TA的效果与紫杉醇相近；高浓度TA和中、高浓度SPV干预后的HCT-8细胞上清液中caspase-9含量均显著增加（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图3。

3.4 TA和SPV对HCT-8细胞中凋亡、ERS、自噬相关蛋白表达的影响

3.4.1 凋亡相关蛋白 与空白组比较，TA和SPV干预后的HCT-8细胞中p-Akt（Thr308）（低浓度TA组除外）、p-Akt（Ser473）、Bcl-2（低浓度TA组除外）、生存素蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），Bax蛋白表达水平均显著升高（$P<0.01$）。结果见图4和图5。

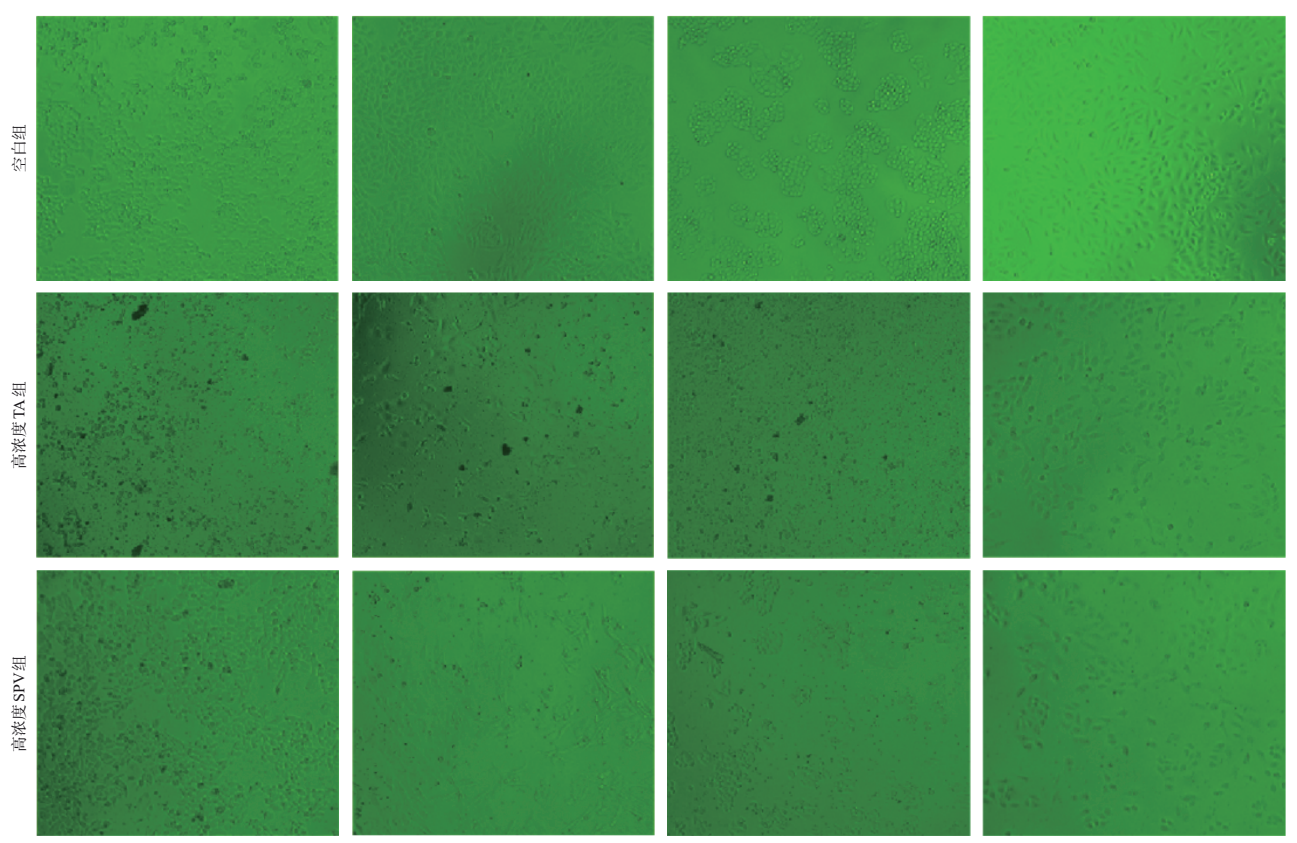


图1 TA和SPV对4种肿瘤细胞形态的影响（×200）

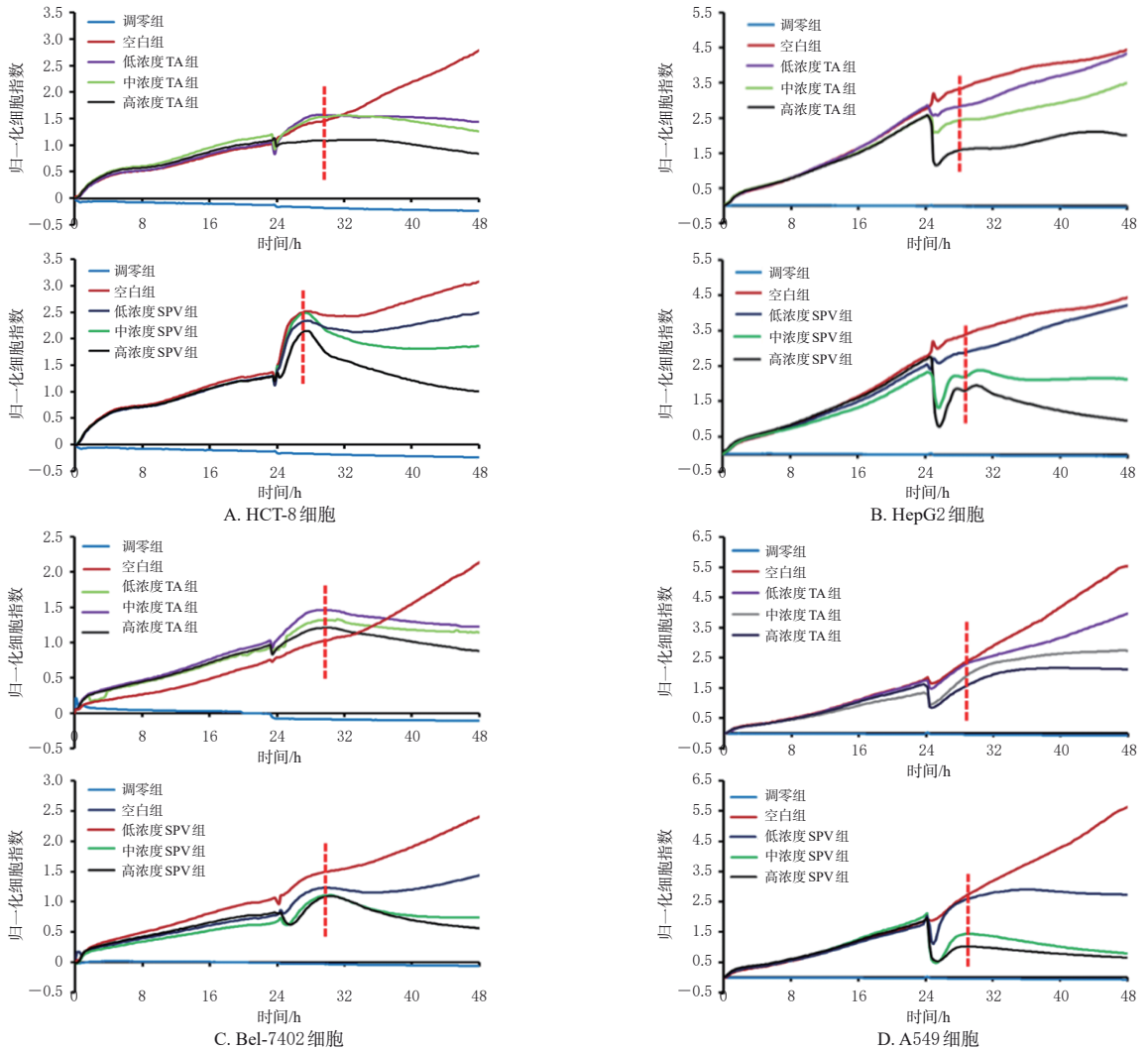
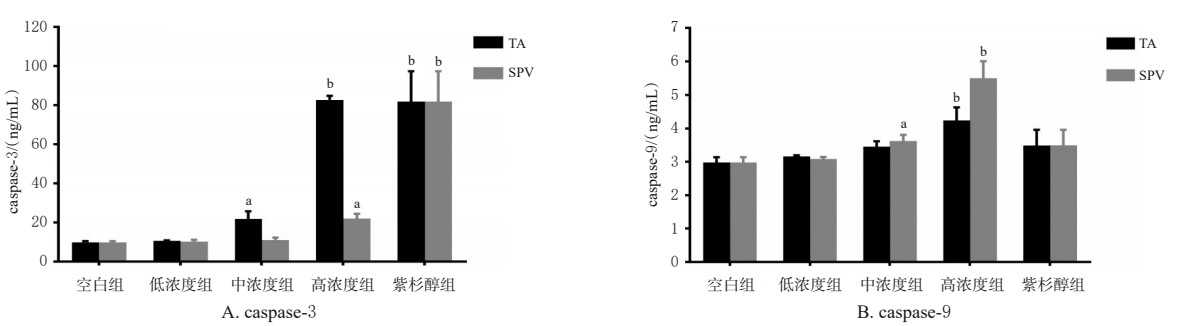


图2　TA和SPV对4种肿瘤细胞生长影响的动态监测结果（$n=4$）



a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与空白组比较，$P<0.01$

图3　TA和SPV对HCT-8细胞上清液中caspase-3、caspase-9含量的影响（$n=3$）

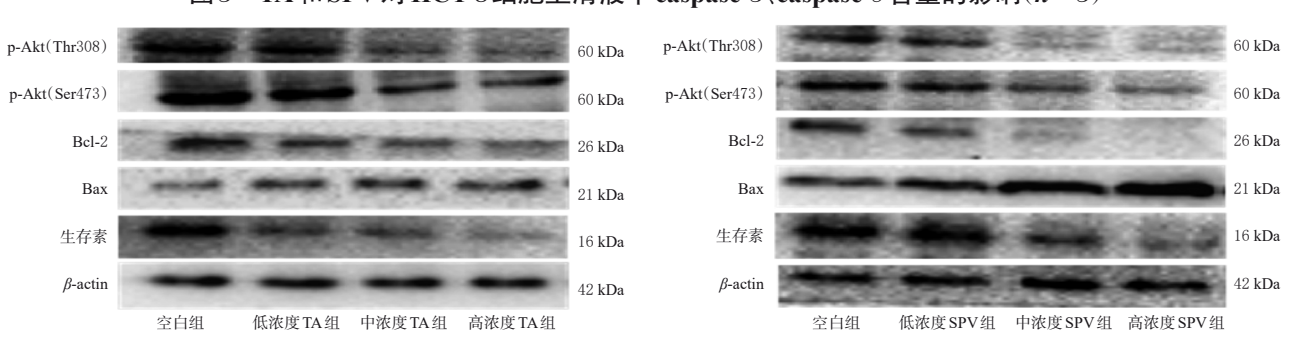
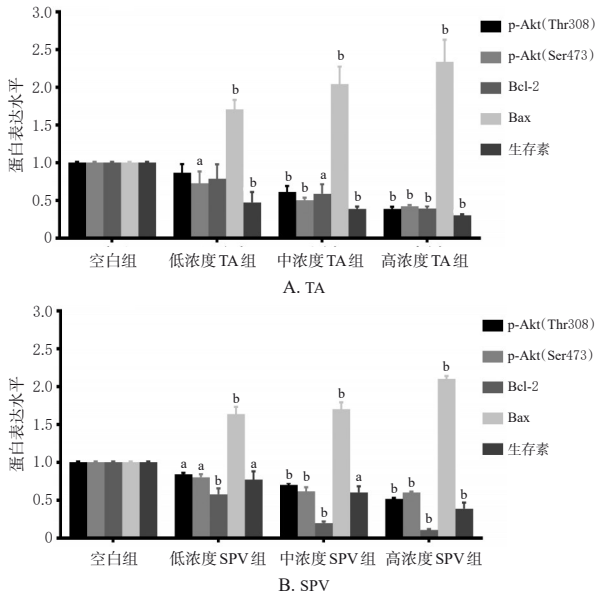


图4　TA和SPV对HCT-8细胞中凋亡相关蛋白表达影响的电泳图



a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与空白组比较，$P<0.01$

图5　TA和SPV对HCT-8细胞中凋亡相关蛋白表达的影响（$n=3$）

3.4.2　ERS相关蛋白　与空白组比较，TA和SPV干预后的HCT-8细胞中CHOP（低浓度TA和SPV组除外）、Bip蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图6和图7。

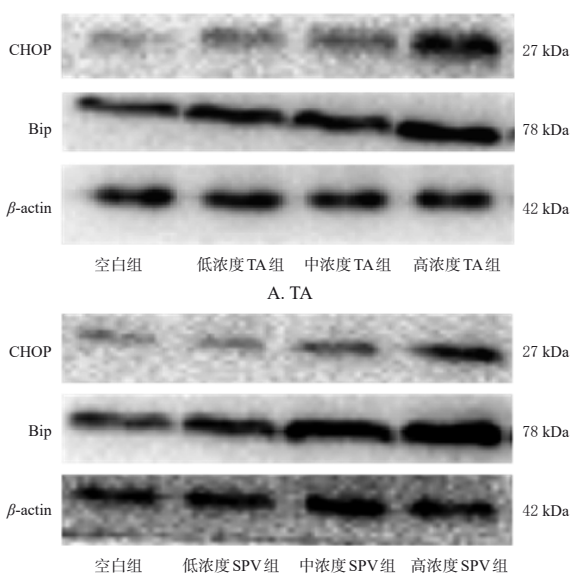
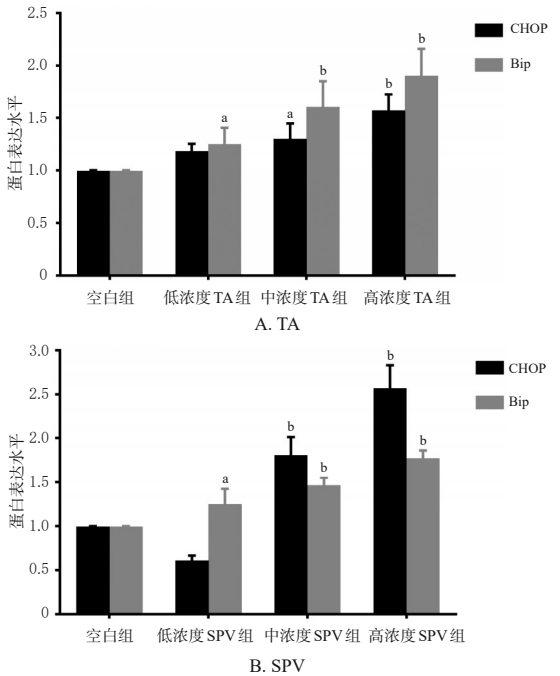


图6　TA和SPV对HCT-8细胞中ERS相关蛋白表达影响的电泳图

3.4.3　自噬相关蛋白　与空白组比较，中、高浓度TA和SPV干预后的HCT-8细胞中LC3Ⅱ蛋白表达水平均显著升高（$P<0.01$）。结果见图8和图9。

4　讨论

基于细胞体外的潜在抗癌化合物筛选是新药物开发的重要方法之一。为了明确TA和SPV对不同肿瘤细胞的影响，本研究通过观察TA及SPV对HCT-8、



a：与空白组比较$P<0.05$；b：与空白组比较$P<0.01$

图7　TA和SPV对HCT-8细胞中ERS相关蛋白表达的影响（$n=3$）

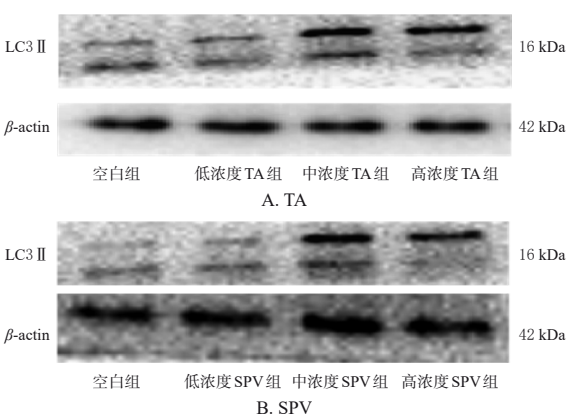
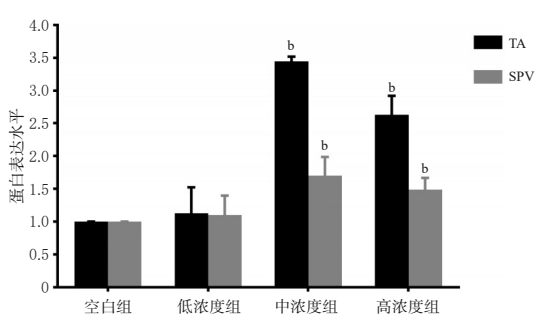


图8　TA和SPV对HCT-8细胞中LC3Ⅱ蛋白表达影响的电泳图



a：与空白组比较，$P<0.01$

图9　TA和SPV对HCT-8细胞中LC3Ⅱ蛋白表达的影响（$n=3$）

HepG2、Bel-7402、A549细胞形态的影响并实时监测细胞活性，发现TA和SPV干预对上述4种肿瘤细胞的活性均产生影响，且对HCT-8细胞的抑制效果最好。

本研究通过考察TA和SPV对HCT-8细胞中凋亡、ERS、自噬相关蛋白的表达，发现TA和SPV的抗结肠癌作用机制可能是通过降低细胞内p-Akt（Thr308和Ser473）、Bcl-2、生存素蛋白表达以及升高Bax蛋白表达，使得caspase-9发生活化；活化的caspase-9进一步激活caspase-3，导致蛋白酶级联切割放大，最终引起细胞凋亡。已有研究证实，ERS对细胞凋亡有着重要影响，当ERS途径启动时，下游的凋亡信号将被激活，从而引起细胞凋亡。CHOP和Bip作为ERS诱导凋亡信号通路的主要分子，在细胞凋亡过程中发挥重要作用。在正常生理状态下，细胞中CHOP、Bip蛋白呈现低表达，但在ERS状态下，CHOP、Bip蛋白表达水平显著升高[14]。过度自噬会导致细胞凋亡，而LC3Ⅱ蛋白的表达量可反映细胞的自噬水平[15]。本研究结果显示，TA和SPV干预后的HCT-8细胞上清液中CHOP、Bip、LC3Ⅱ蛋白表达水平均有所升高，表明TA和SPV在诱导HCT-8细胞凋亡的过程中，可能激活了ERS途径和细胞自噬。

综上所述，TA和SPV对HCT-8、HepG2、Bel-7402、A549细胞的活性均产生影响，且对HCT-8细胞的抑制效果最好；二者对HCT-8细胞的作用机制可能与促进细胞凋亡、激活ERS和细胞自噬有关。

参考文献

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] 陈姣，林聃，杨杰，等. 中药抗肿瘤的增效减毒效应研究进展[J]. 中国科学(生命科学)，2022，52(6)：920-934.

[3] 沈舶宁，王文忠，曹娜，等. 钩吻的本草考证[J]. 中国民族民间医药，2019，28(10)：30-34.

[4] JIN G L, SU Y P, LIU M, et al. Medicinal plants of the genus *Gelsemium* (Gelsemiaceae, Gentianales): a review of their phytochemistry, pharmacology, toxicology and traditional use[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 152(1): 33-52.

[5] 孙铭学，徐庆强，孟文琪，等. 钩吻药理及毒理机制研究进展[J]. 毒理学杂志，2020，34(4)：336-341.

[6] LIN H L, QIU H Q, CHENG Y, et al. *Gelsemium elegans* Benth: chemical components, pharmacological effects, and toxicity mechanisms[J]. Molecules, 2021, 26(23): 7145.

[7] 赵雅婷，武淑鹏，胡春丽，等. 钩吻的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25(3)：200-210.

[8] 沈锦煌，杨娜娜，张艺凡，等. 葫蔓藤根茎总生物碱的化学成分和抗肿瘤活性研究[J]. 天然产物研究与开发，2021，33(10)：1675-1680.

[9] YUE R C, LIU H P, HUANG Y X, et al. Sempervirine inhibits proliferation and promotes apoptosis by regulating Wnt/β -catenin pathway in human hepatocellular carcinoma[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 806091.

[10] 赵斌，吴紫陆，席作武. ROS/JNK/FoxO3a信号通路在钩吻素子抑制结肠癌细胞增殖和诱导凋亡中的作用[J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27(24)：100-108.

[11] WANG L, XU H L, LIANG J W, et al. An integrated network, RNA sequencing, and experiment pharmacology approach reveals the active component, potential target, and mechanism of *Gelsemium elegans* in the treatment of colorectal cancer[J]. Front Oncol, 2020, 10: 616628.

[12] ASHKENAZI A, FAIRBROTHER W J, LEVERSON J D, et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors[J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(4): 273-284.

[13] LI X Y, CHEN H L, ZHANG Z L, et al. Isorhamnetin protects Zearalenone-induced damage via the PI3K/Akt signaling pathway in porcine ovarian granulosa cells[J]. Anim Nutr, 2022, 11: 381-390.

[14] 甘桂香，胡瑞成，谭双香. 吸烟COPD模型大鼠肺组织内质网相关凋亡蛋白CHOP的表达[J]. 中国病理生理杂志，2018，34(2)：314-320.

[15] 汝少国，朱增光，崔鹏飞. 细胞自噬与应激反应[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版)，2022，52(7)：1-13.

（收稿日期：2023-01-11　修回日期：2023-06-02）

（编辑：邹丽娟）