

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.05.029

藏药材纤毛婆婆纳乙酸乙酯提取物的 抗癌活性及其机制研究

舒月悦, 卢秋霞¹, 孙意冉¹, 李玉², 陈放¹, 唐琳¹

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610064; 2. 四川大学新能源与低碳技术研究院, 成都 610207)

摘要: 采用 MTT 法检测纤毛婆婆纳 (*Veronica ciliata* Fisch.) 乙酸乙酯提取物 (ethyl acetate extract, VEAE) 对五种不同癌细胞 (A549, HeLa, U20S, MCF-7 和 SMMC-7721) 的增殖抑制作用, 筛选出对 VEAE 最敏感的细胞, 并进一步运用 DAPI 染色、Annexin V/PI 双染及荧光定量 PCR (qRT-PCR) 来探究其作用机制。MTT 结果显示, VEAE 对五种癌细胞的增殖均有抑制作用, 并呈现时间和剂量的依赖效应, 其中对 MCF-7 细胞的抑制作用最为显著, 处理 48 h 后其 IC_{50} 达到最低, 为 $63.42 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$; DAPI 染色和 Annexin V/PI 双染结果发现, VEAE 处理 MCF-7 细胞后, 细胞皱缩变圆, 凋亡细胞的数量增加, 从对照组的 5.00% 上升到 47.45%; qRT-PCR 结果表明; VEAE 处理 MCF-7 细胞后, 凋亡基因 *Caspase-3*, *Caspase-9* 和 *Bax* 的表达上调, 抗凋亡基因 *Bcl-2* 的表达下调。由此表明 VEAE 能抑制癌细胞的增殖, 诱导细胞发生凋亡, 其机制可能是通过调控与细胞凋亡相关基因的表达来实现。

关键词: 纤毛婆婆纳; 乙酸乙酯提取物; 抗癌; 细胞凋亡

中图分类号: Q279 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2018)05-1097-06

Study on anti-cancer activity and mechanism of ethyl acetate extract from *Veronica ciliata* Fisch.

SHU Yue-Yue¹, LU Qiu-Xia¹, SUN Yi-Ran¹, LI Yu², CHEN Fang¹, TANG Lin¹

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. Institute of New Energy and Low-Carbon Technology, Sichuan University, Chengdu 610207, China)

Abstract: This study utilized the MTT assay to detect the effect of *Veronica ciliata* Fisch. ethyl acetate extract (VEAE) on the proliferation of different cancer cells (A549, HeLa, U20S, MCF-7, SMMC-7721) and select the most sensitive cells. Furthermore, the mechanism of VEAE inhibiting cancer cells proliferation was measured by DAPI staining, Annexin-V/PI staining and quantitative real-time PCR. MTT assay showed that the proliferation of five cancer cells were gradually suppressed with the increasing of concentration and treatment time of VEAE. And VEAE exhibited the strongest inhibitory effect on MCF-7 cells, and IC_{50} of VEAE reached to minimum as $63.42 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$. Further studies by DAPI staining and Annexin-V/PI staining showed that after treatment of MCF-7 cells with VEAE, cell shrinkage and turn round, the ratios of apoptotic cells increased from 5.00% (control group) to 47.45% with the increasing of concentration of VEAE. Quantitative real-time PCR showed that VEAE could

收稿日期: 2017-09-06

基金项目: 国家自然科学基金 (31570351)

作者简介: 舒月悦 (1993-), 重庆潼南人, 硕士, 研究方向为植物天然产物. E-mail: shuyueyue888@163.com

通讯作者: 陈放. E-mail: chenfang@scu.edu.cn

promote the expression of *Caspase-3*, *Caspase-9*, *Bax* genes and inhibit the expression of *Bcl-2* gene. It indicated that VEAE could inhibit cells proliferation and induce cells apoptosis. The mechanism may be associated with the expression of apoptosis related genes.

Keywords: *Veronica ciliata* Fisch.; Ethyl acetate extract; Anti-cancer; Apoptosis

1 引言

纤毛婆婆纳(*Veronica ciliata* Fisch.), 藏药学名“帕夏嘎”, 是玄参科婆婆纳属一年生草本植物, 主要分布在我国西南地区, 包括四川、西藏的北部等地^[1]. 作为一种藏族民间常用药物, 用于多种藏药处方中, 具有清热解毒、祛风利湿、治疗肝胆疾病等功效^[2]. 目前, 从婆婆纳属植物中已提取出体外抗癌活性成分^[3, 4]. 另外, 有文献报道纤毛婆婆纳乙酸乙酯提取物中的主要成分为环烯醚萜苷, 而环烯醚萜苷作为一类具有广泛生物活性的化合物, 不仅对醋氨酚诱导的小鼠急性肝损伤有明显的保护作用, 在抗癌方面也发挥着重要的作用^[5, 6]. 药理学研究表明, 纤毛婆婆纳乙酸乙酯提取物及环烯醚萜苷类化合物能显著抑制 HepG2 细胞的增殖^[7]. 但目前对其抗癌活性研究仅限于 HepG2 细胞, 为了进一步探究纤毛婆婆纳乙酸乙酯提取物的抗癌活性, 本研究用纤毛婆婆纳乙酸乙酯提取物处理五种癌细胞, 观察其对癌细胞增殖及凋亡的影响, 并对其抗癌机制进行初步探讨.

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 细胞株 人肺癌细胞 A549, 人宫颈癌细胞 HeLa, 人骨肉瘤细胞 U20S, 人乳腺癌细胞 MCF-7, 人肝癌细胞 SMMC-7721 由四川大学华西医院提供.

2.1.2 药品与试剂 纤毛婆婆纳干燥全草购自西藏藏药厂, 经四川大学生命科学学院白洁副教授鉴定为纤毛婆婆纳; MTT、二甲基亚砜(DMSO)(美国 Sigma 公司); 胎牛血清、高糖 DMEM 培养液、PBS(美国 Hyclone 公司); 胰蛋白酶、双抗、DAPI 染液、抗荧光衰减封片剂(北京索莱宝科技有限公司); Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司); 细胞总 RNA 提取试剂盒(江苏溥博生物科技有限公司); qPCR 预混液、反转录试剂盒(宝生物工程有限公司).

2.1.3 仪器 CO₂ 培养箱(上海力申科学仪器有限公司, HF90); 生物安全柜(上海力申科学仪器有

限公司, HFsafe-1200LC); 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司, IX71); 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司, SoftMax Pro5); 流式细胞仪(美国 BD 公司, FACScalibur); Real-Time PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司, CFX-96).

2.2 方法

2.2.1 纤毛婆婆纳乙酸乙酯提取物的制备^[6] 取纤毛婆婆纳干燥全草粉末, 用 95% 乙醇浸提 24 h, 过滤, 浓缩提取液得粗提物浸膏, 加适量水溶解, 依次用石油醚、乙酸乙酯萃取, 所得乙酸乙酯萃取相经减压浓缩得到浸膏, 将浸膏用二甲基亚砜(DMSO)溶解配制成浓度为 $2 \times 10^5 \mu\text{g/mL}$ 的母液备用.

2.2.2 细胞培养 细胞接种于 25 cm² 细胞培养瓶中, 用含 10% 胎牛血清、1% 双抗的高糖 DMEM 培养液在 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中培养, 待细胞贴壁生长融合至 90% 左右时用胰蛋白酶消化传代, 继续培养.

2.2.3 MTT 法检测 VEAE 对细胞增殖抑制的影响 取处于对数生长期的细胞, 用胰蛋白酶消化后制成 1×10^4 个/mL 的单细胞悬液接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL , 置于 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中培养 12 h 后, 去除培养液, 加入新鲜的含有不同浓度 VEAE(50, 100, 200, 400, 600, 800 $\mu\text{g/mL}$) 的无血清培养液, 另设阴性对照组(不加 VEAE 而加等量无血清培养液)和空白对照组(不加细胞, 其他条件与前面相同), 每组重复 5 复孔, 分别培养 24 h 和 48 h 后, 每孔加入 20 μL MTT, 继续培养 4 h, 去除上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 于酶标仪上测定 490 nm 处的吸光度, 实验重复 3 次. 抑制率 = $[1 - (\text{实验组 OD} - \text{空白组 OD}) / (\text{对照组 OD} - \text{空白组 OD})] \times 100\%$.

2.2.4 DAPI 染色检测细胞凋亡的形态学变化 取处于对数生长期的细胞, 用胰蛋白酶消化后制成 1×10^5 个/mL 的单细胞悬液接种于含盖玻片的 6 孔板中, 每孔 2 mL, 置于 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中培养 12 h 后, 去除培养液, 加入新鲜的含有不同浓度 VEAE(50, 100, 200, 400, 600 $\mu\text{g/mL}$) 的无血清培养液, 另设阴性对照组加入等量无血清培养

液培养 48 h 后,终止培养,弃去培养液,用 PBS 洗涤 1 次,4%多聚甲醛固定 30 min,用 PBS 洗涤 3 次,加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DAPI 溶液室温避光染色 10 min,吸除 DAPI 染液,用 PBS 洗涤 2 次,每次 3 min,取出盖玻片,用抗荧光衰减封片剂封片,在倒置荧光显微镜下观察、拍照。

2.2.5 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡 取处于对数生长期的细胞,用胰蛋白酶消化后制成 5×10^5 个/mL 的单细胞悬液接种于 6 孔板中,每孔 2 mL,置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5%的 CO_2 培养箱中培养 12 h 后,去除培养液,加入新鲜的含有不同浓度 VEAE (20, 80, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的无血清培养液,另设阴性对照组加入等量无血清培养液培养 48 h 后,终止培养,弃去培养液,用 PBS 洗涤 1 次,收集细胞,Annexin V/PI 染色,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.2.6 qRT-PCR 检测 *Bcl-2*, *Bax*, *Caspase-3*, *Caspase-9* mRNA 的表达 取处于对数生长期的细胞,用胰蛋白酶消化后制成 5×10^5 个/mL 的单细胞悬液接种于 6 孔板中,每孔 2 mL,置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5%的 CO_2 培养箱中培养 12 h 后,去除培养液,加入新鲜的含有不同浓度 VEAE (50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的无血清培养液,另设阴性对照组加入等量无血清培养液培养 24 h 后,终止培养,弃去培养液,用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA 后反转录成 cDNA. 以 β -actin 作为内参进行荧光定量 PCR 检测. qRT-PCR 引物见表 1.

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab.1 Primers for qRT-PCR

名称	序列(5'→3')
Bcl-2-F	GTGGATGACTGAGTACCTGAAC
Bcl-2-R	CTTCACTTGTGGCCAGATAG
Bax-F	GTTGTGCGCCCTTTTCTACTTTG
Bax-R	GGACATCAGTCGCTTCAGTG
Caspase-3-F	GGATGGGTGCTATTGTGAGG
Caspase-3-R	TGGGATTTCAAGGCGACG
Caspase-9-F	AGAGATTCGCAAACAGAGG
Caspase-9-R	CACGGCAGAAGTTCACATTG
β -actin-F	ACCACACCTTCTACAATGAGC
β -actin-R	GCGTACAGGGATAG CACAG

2.2.7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间比较,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 VEAE 对不同癌细胞增殖抑制的影响

为研究 VEAE 对不同癌细胞增殖抑制能力的强弱,选用不同浓度的 VEAE 对癌细胞进行处理,测定其增殖抑制率,以筛选出对 VEAE 最敏感的癌细胞. 结果见表 2、3,不同浓度的 VEAE 分别作用于 A549, HeLa, U20S, MCF-7 和 SMMC-7721 五种癌细胞 24 h 和 48 h,其细胞增殖均受到抑制,与阴性对照组相比,随着药物浓度及处理时间的增加,细胞增殖抑制率逐渐增加. 由于细胞增殖抑制率与药物浓度的对数存在线性关系,将细胞增殖抑制率与相应的药物浓度的对数各点进行直线回归和统计处理,计算出 VEAE 对癌细胞的半抑制浓度 (IC_{50}). 结果见表 4,从 IC_{50} 值可以看出,VEAE 对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用均强于其它几种细胞,因此选择 MCF-7 细胞进行后续研究。

表 4 VEAE 对不同癌细胞的 IC_{50}

Tab.4 IC_{50} of VEAE on different cancer cells

细胞	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	24 h	48 h
A549	231.66 \pm 0.39	144.37 \pm 0.29
HeLa	501.74 \pm 0.56	409.18 \pm 0.53
U20S	199.73 \pm 0.47	110.82 \pm 0.23
MCF-7	101.30 \pm 0.32	63.42 \pm 0.19
SMMC-7721	277.46 \pm 0.27	151.60 \pm 0.38

3.2 VEAE 对 MCF-7 细胞形态的影响

为研究 VEAE 对细胞形态的影响,用不同浓度的 VEAE 处理 MCF-7 细胞 48 h,经 DAPI 染色在荧光显微镜下观察可见,阴性对照组细胞呈圆形或椭圆形,细胞核形态完整,呈均匀的蓝色荧光;而用不同浓度药物处理后,与阴性对照组相比,细胞边缘开始变得不规则,细胞核变小,染色质开始出现聚集浓缩,细胞核荧光增强,呈亮蓝色,部分核内出现了新月形的凋亡小体,且随着药物浓度的增加,浓缩深染成亮蓝色的细胞核数目逐渐增加(图 1)。

3.3 VEAE 对 MCF-7 细胞凋亡的影响

为了进一步检测 VEAE 是否通过诱导细胞凋亡来发挥抗癌作用,采用 Annexin V/PI 双染法对不同浓度 VEAE 诱导 MCF-7 细胞凋亡的水平进行了评估,结果见图 2,VEAE 处理 MCF-7 细胞 48 h 后,阴性对照组细胞凋亡率为 5.00%, VEAE 处理组细胞随浓度的增加早期凋亡和晚期凋亡的细胞数量逐渐增加,细胞凋亡率分别为 18.95%,

29.85%, 47.45%, 这表明 VEAE 能诱导 MCF-7 细胞发生凋亡, 且具有浓度依赖性. 因此, VEAE

的抗癌作用在一定程度上是通过诱导细胞凋亡实现的.

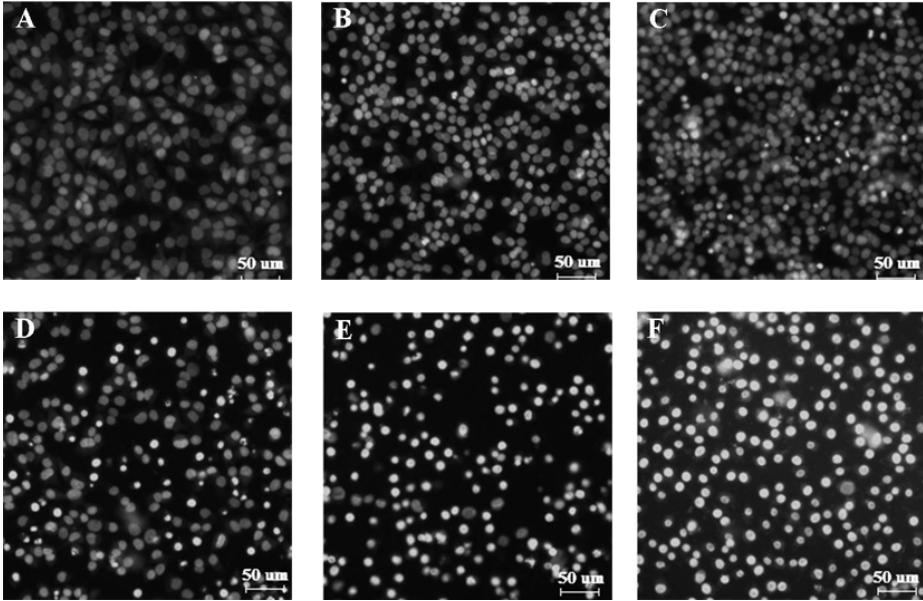


图 1 VEAE 处理 48 h 对 MCF-7 细胞形态的影响(×200)

A: 阴性对照组; B: 50 μg/mL; C: 100 μg/mL; D: 200 μg/mL; E: 400 μg/mL; F: 600 μg/mL
 Fig. 1 The effect of morphology in MCF-7 cells after treated with VEAE for 48 h(×200)
 A: Negative control; B: 50 μg/mL; C: 100 μg/mL; D: 200 μg/mL; E: 400 μg/mL; F: 600 μg/mL

表 2 VEAE 作用于癌细胞 24 h 对细胞增殖的抑制作用

Tab. 2 Inhibition effect on the proliferation of different cancer cells after treated with VEAE for 24 h

VEAE 浓度 (μg/mL)	24 h 抑制率(%)				
	A549	Hela	U20S	MCF-7	SMMC-7721
阴性对照	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
50	4.25±1.07	1.04±0.42	11.56±1.17	38.01±1.02	9.05±1.68
100	20.85±1.41	2.61±0.58	31.51±4.76	47.17±2.02*	11.58±0.57
200	55.78±1.33*	7.09±0.95	38.88±0.94*	56.79±0.72**	27.08±0.54*
400	64.67±0.77**	25.07±0.93*	69.44±0.84**	96.69±0.62**	54.83±0.83**
600	80.01±0.87**	62.37±1.88*	85.99±0.76**	99.68±0.17**	88.16±0.60**
800	90.37±0.27**	85.66±1.17**	98.31±0.37**	99.48±0.23**	97.39±0.35**

* 表示与阴性对照组相比 $P < 0.05$; ** 表示与阴性对照组相比 $P < 0.01$ (表 3 同)

* indicate P value < 0.05 compared with negative control; ** indicate P value < 0.01 compared with negative control (The same with tab. 3)

表 3 VEAE 作用于癌细胞 48 h 对细胞增殖的抑制作用

Tab. 3 Inhibition effect on the proliferation of different cancer cells after treated with VEAE for 48 h

VEAE 浓度 (μg/mL)	48 h 抑制率(%)				
	A549	Hela	U20S	MCF-7	SMMC-7721
阴性对照	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
50	9.46±1.70	5.29±0.10	38.07±0.84*	45.15±1.11*	23.41±0.58*
100	31.90±0.80*	6.68±0.10	43.99±1.71*	64.12±0.78**	29.58±0.46*
200	71.87±1.06**	9.68±0.88	55.12±1.02*	84.02±0.59**	44.80±1.71*
400	82.56±0.22**	42.20±2.23*	95.32±0.47**	99.11±0.20**	77.87±0.53**
600	94.72±0.29**	71.04±2.05**	97.88±0.40**	99.49±0.14**	98.93±0.13**
800	98.28±0.34**	87.63±1.81**	98.85±0.18**	99.86±0.05**	99.33±0.41**

3.4 VEAE 对 MCF-7 细胞 *Bax*, *Bcl-2*, *Caspase-3*, *Caspase-9* mRNA 表达的影响

为研究 VEAE 诱导 MCF-7 细胞凋亡的机制, 采用 qRT-PCR 检测了 VEAE 处理 24 h 后, MCF-7 细胞中 *Bax*, *Bcl-2*, *Caspase-3*, *Caspase-9* mRNA 的表达变化. 结果见图 3, 用 VEAE 处理 MCF-7 细胞后, 促凋亡基因 *Caspase-3*, *Caspase-*

9, *Bax* mRNA 的表达随浓度的增加逐渐上调, 当浓度达到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 其表达量与阴性对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$); 当药物浓度大于 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后, 与阴性对照组相比, 抗凋亡基因 *Bcl-2* mRNA 的表达逐渐下调. 这初步表明 VEAE 诱导 MCF-7 细胞凋亡主要是通过上调促凋亡基因的表达来实现.

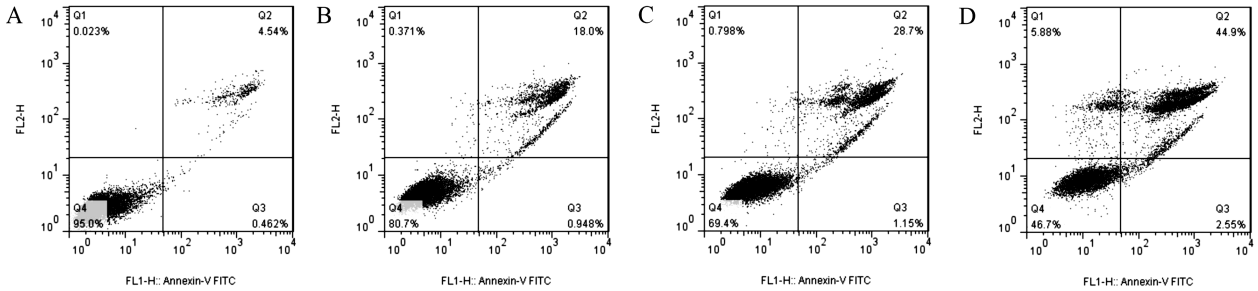


图 2 VEAE 处理 48 h 对 MCF-7 细胞凋亡的影响

A: 阴性对照组; B: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C: 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$; D: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Fig. 2 The effect of apoptosis in MCF-7 cells after treated with VEAE for 48 h

A: Negative control; B: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C: 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$; D: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

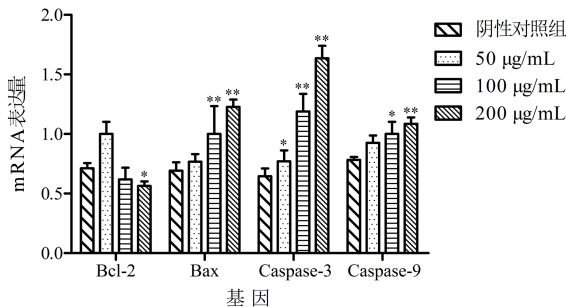


图 3 VEAE 对 MCF-7 细胞 *Bax*, *Bcl-2*, *Caspase-3*, *Caspase-9* mRNA 表达的影响

* 表示与阴性对照组相比 $P < 0.05$; ** 表示与阴性对照组相比 $P < 0.01$

Fig. 3 The effect of VEAE on the expression of *Bax*, *Bcl-2*, *Caspase-3*, *Caspase-9* in MCF-7 cells

* indicate P value < 0.05 compared with negative control; ** indicate P value < 0.01 compared with negative control

4 讨论

癌症的发生、发展是由细胞增殖和凋亡失调而导致细胞无限增殖所致, 因此抑制癌细胞增殖及促进其凋亡成为评估抗癌药物作用能力的重要指标^[8]. 纤毛婆婆纳作为一种西藏常用药材, 用于多种藏药处方中, 有研究已经表明其提取物具有抗癌活性, 且以乙酸乙酯提取物的活性最高. 本研究选用纤毛婆婆纳乙酸乙酯提取物处理五种癌细胞, 通过 MTT 实验发现乙酸乙酯提取物能有效抑制 A549, HeLa, U20S, MCF-7 及 SMMC-7721 细胞

的增殖, 抑制能力的强弱为: MCF-7 > U20S > A549 > SMMC-7721 > HeLa, 其中对于 MCF-7 细胞的增殖抑制作用最为显著, 且具有浓度及时间的依赖效应. 用不同浓度的乙酸乙酯提取物处理 MCF-7 细胞 48 h 后, 经 DAPI 荧光染色发现 MCF-7 细胞形态发生变化, 细胞皱缩变圆, 染色质浓缩聚集破碎成片状, 出现凋亡小体等典型的细胞凋亡特征, 说明纤毛婆婆纳乙酸乙酯提取物能诱导 MCF-7 细胞发生凋亡, Annexin V/PI 双染法进一步验证了这一结果. 用 20, 80, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乙酸乙酯提取物处理细胞 48 h, 染色后经流式细胞仪检测发现随着药物浓度的增加, 细胞凋亡率逐渐增加. 由此看出纤毛婆婆纳乙酸乙酯提取物具有抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡的作用.

目前认为药物诱导癌细胞凋亡是由多种基因参与调控的一个复杂的级联反应^[9]. 细胞凋亡涉及一系列基因如 *Caspase* 家族基因、*Bcl-2* 家族基因和 *p53* 等基因的表达. *Bcl-2* 家族基因在控制细胞凋亡的过程中发挥着重要的作用, *Bcl-2* 属于 *Bcl-2* 家族的抗凋亡蛋白, *Bax* 属于 *Bcl-2* 家族的促凋亡蛋白, 二者的平衡在癌症发生、发展、治疗中发挥着重要的作用^[10]. 因此在本研究中采用 qRT-PCR 检测了纤毛婆婆纳乙酸乙酯提取物处理 MCF-7 细胞后 *Bcl-2*, *Bax* mRNA 的表达, 结果发现用不同浓度的纤毛婆婆纳乙酸乙酯提取物处理 MCF-7 细胞 24 h 后, 促凋亡基因 *Bax* mRNA 的表达显著上

调,抗凋亡基因 *Bcl-2* mRNA 的表达逐渐下调. 这表明纤毛婆婆纳乙酸乙酯提取物诱导 MCF-7 细胞凋亡与 *Bcl-2* 和 *Bax* mRNA 的表达有关.

Bcl-2 家族在细胞凋亡的线粒体信号通路上游发挥作用,而 Caspase 蛋白激酶家族则在下游发挥作用^[11]. Caspase 分为三大类:凋亡启动因子(apoptotic initiators)、凋亡执行因子(apoptotic executioner-s)和炎症介导因子(inflammatory mediators),构成了级联放大效应. Caspase-9 属于凋亡启动因子在级联反应的上游,能在其它蛋白辅助下发生自我活化并识别和激活下游的 Caspase, Caspase-3 属于凋亡执行因子在级联反应的下游,能直接裂解多个重要的结构与功能蛋白,是细胞凋亡的最终执行者^[12]. 在诱导癌细胞凋亡的途径中, Caspase-3 的活化是凋亡进入不可逆阶段的标志^[13]. Caspase-9 活化后酶解 Caspase-3 前体,释放出 C 末端小肽片段,从而活化 Caspase-3,活化的 Caspase-3 再瀑布式激活 Caspase-2, 6, 8, 10 等. 因此激活 Caspase-9 及 Caspase-3 是细胞凋亡的必经之路. 在本研究中我们采用 qRT-PCR 检测了纤毛婆婆纳乙酸乙酯提取物处理后 MCF-7 细胞中 *Caspase-3* 和 *Caspase-9* mRNA 的表达,结果发现随着乙酸乙酯提取物浓度的增加, *Caspase-3* 与 *Caspase-9* mRNA 的表达水平显著上调. 由此表明纤毛婆婆纳乙酸乙酯提取物主要是通过上调促凋亡基因的表达,诱导细胞发生凋亡,从而发挥抗癌作用.

以上研究证明纤毛婆婆纳乙酸乙酯提取物对五种癌细胞的增殖均有一定的抑制作用,且对 MCF-7 细胞的抑制效果最为显著,其机制主要是通过调控与细胞凋亡相关基因的表达来实现,为进一步研究纤毛婆婆纳乙酸乙酯提取物的体内抗癌活性提供了实验依据.

参考文献:

- [1] 侯宽昭. 中国种子植物科属辞典[M]. 北京: 科学出版社, 1982: 512.
- [2] 李展, 陈放, 唐琳. 藏药纤毛婆婆纳的愈伤组织诱导

- 和快速繁殖研究[J]. 植物科学学报, 2011, 29: 531.
- [3] 张富庚, 胡人杰, 张韶瑜, 等. 轮叶婆婆纳中二萜类化学成分的体外抗癌活性研究[J]. 中草药, 2005, 36: 1520.
- [4] 滕杰, 李会强, 姚智, 等. 轮叶婆婆纳的抗肿瘤活性二萜成分研究[J]. 中草药, 2008, 39: 967.
- [5] Tan S, Lu Q, Shu Y, *et al.* Iridoid glycosides fraction isolated from *Veronica ciliata* Fisch. protects against acetaminophen-induced liver injury in mice[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 6106572.
- [6] Lu Q, Sun Y, Shu Y, *et al.* HSCCC separation of the two iridoid glycosides and three phenolic compounds from *Veronica ciliate* and their in vitro antioxidant and anti-hepatocarcinoma activities[J]. Molecules, 2016, 21: E1234.
- [7] Yin L, Wei L, Fu R, *et al.* Antioxidant and hepatoprotective activity of *Veronica ciliata* Fisch. extracts against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice[J]. Molecules, 2014, 19: 7223.
- [8] Scatena R. Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation[J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 942: 287.
- [9] Mao H, Lebrun D G, Yang J, *et al.* Deregulated signaling pathways in glioblastoma multiforme: molecular mechanisms and therapeutic targets[J]. Cancer Invest, 2012, 30: 48.
- [10] Yin X M, Oltvai Z N, Korsmeger S J. BH1 and BH2 domains Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax[J]. Nature, 1994, 369: 321.
- [11] 石梦琼, 刘雄, 周继刚, 等. 南赤爬提取物诱导宫颈癌 Hela 细胞凋亡及作用机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34: 1844.
- [12] Moditahedi N, Giordanetto F, Madeo F, *et al.* Apoptosis inducing factor: vital and lethal[J]. Trends Cell Bio, 2006, 16: 264.
- [13] Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis[J]. Methods Mol Biol, 2008, 414: 13.

引用本文格式:

- 中文: 舒月悦, 卢秋霞, 孙意冉, 等. 藏药材纤毛婆婆纳乙酸乙酯提取物的抗癌活性及其机制研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2018, 55: 1097.
- 英文: Shu Y Y, Lu Q X, Sun Y R, *et al.* Study on anti-cancer activity and mechanism of ethyl acetate extract from *Veronica ciliata* Fisch. [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2018, 55: 1097.