

· 实验研究 ·

# 预知子提取物增敏奥沙利铂诱导结肠癌 HCT116 细胞凋亡的研究

周婷婷<sup>1</sup>, 沈卫星<sup>1,2</sup>, 陈桐庆<sup>1</sup>, 冯慧<sup>1</sup>, 谭佳妮<sup>1,2</sup>, 徐长亮<sup>1,2</sup>, 余成涛<sup>1,2</sup>, 范旻旻<sup>1,2</sup>, 程海波<sup>1,2</sup>

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210023; 2. 江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 江苏 南京 210023)

**摘要:**目的 探讨预知子提取物增敏奥沙利铂(OXA)诱导结肠癌 HCT116 细胞凋亡的作用及机制,为减少 OXA 毒副作用发生的临床应用提供研究基础。方法 将预知子乙酸乙酯萃取成分进行中压柱层析分离,并进行抗肿瘤药效筛选,获取活性部位 B14,并进一步分离和鉴定该活性部位成分;运用 MTT 法检测 B14、OXA 及二者联用对 HCT116 的增殖抑制作用;采用 CompuSyn 软件评价联合药效,确定药物联用最佳剂量;流式细胞术检测 B14 与 OXA 联用后 HCT116 细胞的凋亡率及周期分布;Western blot 法检测凋亡及信号通路相关蛋白的表达水平。**结果** 筛选确定预知子活性部分 B14,检测并明确其主要成分为皂苷 B 和  $\alpha$ -常春藤皂苷;6  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  B14 可显著促进 15  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  OXA 对 HCT116 细胞的增殖抑制作用( $P < 0.001$ ),促进细胞凋亡( $P < 0.001$ );联合组细胞周期被阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期( $P < 0.001$ );Western blot 结果显示,与 OXA 组比较,联合组 Bcl-2、Caspase-3 及 Bcl-2/Bax 比值显著降低( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ),Bax、Cyt-c、Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-3/Caspase-3 比值及 p-p38 MAPK 显著升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。**结论** 预知子提取物具有增敏 OXA 诱导 HCT116 凋亡的作用,其机制可能与阻滞细胞周期在 G<sub>2</sub>/M 期及激活 p38 MAPK 介导的线粒体凋亡通路有关。研究结果为降低 OXA 毒副作用的临床应用提供了线索。

**关键词:**预知子;奥沙利铂;结肠癌;HCT116;增敏;凋亡**中图分类号:**R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-0482(2022)03-0204-08**DOI:**10.14148/j.issn.1672-0482.2022.0204**引文格式:**周婷婷,沈卫星,陈桐庆,等.预知子提取物增敏奥沙利铂诱导结肠癌 HCT116 细胞凋亡的研究[J].南京中医药大学学报,2022,38(3):204-211.

## Study on *Fructus Akebiae* Extraction Inducing Apoptosis Sensitization of Colon Cancer HCT116 Cells to Oxaliplatin

ZHOU Ting-ting<sup>1</sup>, SHEN Wei-xing<sup>1,2</sup>, CHEN Tong-qing<sup>1</sup>, FENG Hui<sup>1</sup>, TAN Jia-ni<sup>1,2</sup>, XU Chang-liang<sup>1,2</sup>, YU Cheng-tao<sup>1,2</sup>, FAN Min-min<sup>1,2</sup>, CHENG Hai-bo<sup>1,2</sup>

(1. The First College of Clinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine in Prevention and Treatment of Tumor, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the efficacy and mechanism of *Fructus akebiae* extraction (B14) inducing the apoptosis sensitization of colon cancer HCT116 cells to oxaliplatin (OXA), and provide the evidence for the prevention of side effect of OXA in clinical application. **METHODS** The ethyl acetate extraction of *Fructus akebiae* were isolated by medium pressure column chromatography, and the active fraction B14 was obtained by anti-tumor experiment, further followed by research for its component identification. MTT assay was used to detect the proliferation inhibition of HCT116 by B14, OXA and their combination. CompuSyn software was used to evaluate the sensitization efficiency and determine the optimal dose of the combination. The apoptosis rate and cycle distribution of HCT116 cells were detected by flow cytometry. The expressions of apoptosis-related proteins were detected by Western blot. **RESULTS** The main components of the active fraction B14 were identified as saponin B and  $\alpha$ -hederin. 6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  B14 combined with 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OXA significantly inhibited the proliferation and promoted the apoptosis of HCT116 cells ( $P < 0.001$ ). The cell cycle of HCT116 was arrested at G<sub>2</sub>/M stage after the combination treatment ( $P < 0.001$ ). Western blot results showed that, compared with OXA group, protein expressions of Bcl-2, Caspase-3 and the ratio of Bcl-2/Bax in combination group were significantly down-regulated ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), while Bax, Cyt-c, Cleaved caspase-3, the ratio of Cleaved caspase-3/Caspase-3 and p-p38 MAPK were significantly up-regulated ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ). **CONCLUSION** The extraction of *Fructus akebiae* can induce the apopto-

**收稿日期:**2021-09-09**基金项目:**国家自然科学基金面上项目(81973523)**第一作者:**周婷婷,女,硕士研究生,E-mail: 20200056@njucm.edu.cn**通信作者:**沈卫星,男,副教授,主要从事中医药防治肿瘤的临床研究,E-mail: weixingshen@njucm.edu.cn

sis sensitization of HCT116 cells to OXA, which may be related to the regulation of p38 MAPK pathway. This study may provide the evidence for preventing the side effect of OXA in clinical application.

**KEYWORDS:** *Fructus akebiae*; oxaliplatin; colon cancer; HCT116; sensitization; apoptosis

结直肠癌是发病率最高的消化道恶性肿瘤,对社会造成巨大负担<sup>[1]</sup>。奥沙利铂(Oxaliplatin, OXA)是第3代铂类药物,临床常用于结直肠癌的治疗。患者常在用药24~48 h内出现急性神经毒性,长期剂量累积会引起慢性神经毒性。若OXA用药累积剂量超过 $1\ 165\ \text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$ ,大约有50%的患者会出现较严重的神经毒性反应,如肢端感觉麻木、钝痛等,从而导致化疗中止,最终影响疗效<sup>[2~3]</sup>。OXA神经毒性的产生与药物剂量累积效应呈正相关,此类周围神经毒性被称为蓄积性周围神经毒性<sup>[4]</sup>。临床研究表明,接受含OXA化疗方案的恶性肿瘤患者中蓄积性周围神经毒性发生率达60%~90%,不仅影响患者化疗耐受性、依从性及临床疗效,还严重影响患者精神心理健康和生存质量<sup>[5]</sup>。因此,如何有效防治含有OXA化疗方案造成的周围神经毒性,减轻周围神经系统损伤已成为临床迫切需要解决的问题。

探索一种新的化疗增效药物,在保持或增加化疗效果的前提下,降低OXA使用剂量,或缩短化疗周期,对减轻OXA所致的蓄积性周围神经毒性具有重要意义。近年来,中医药已广泛应用于肿瘤临床治疗。现代药理研究表明,预知子包含有三萜类及皂苷类等成分,具有抗肿瘤的作用<sup>[6~7]</sup>,但对预知子中的成分是否可增效OXA尚未有相关报道。本实验以结肠癌HCT116细胞为研究对象,探索预知子提取物增敏OXA的最佳组合浓度,在保证抗肿瘤药效的前提下,减少OXA的使用剂量,并初步探讨其作用机制,为OXA治疗结直肠癌的临床应用提供思路。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人结肠癌HCT116细胞由国家中医药管理局名医验方评价与转化重点实验室提供。

### 1.2 试剂

预知子(河北福君堂药业有限公司,批号:190505,产地:河北);OXA(美国MCE公司,货号:HY-17371);皂苷B(实验室自制,纯度>98%); $\alpha$ -常春藤皂苷(成都瑞芬思生物科技有限公司,货号:27013-91-8);噻唑蓝(德国Biofrox公司,货号:298-93-1);Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测

试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,货号:KGA107);Cleaved caspase-3抗体(美国Affinity公司,货号:AF7022);Caspase-3、Bcl-2、Bax、Cyt-c抗体(英国Abcam公司,货号:AB13847、AB196495、AB5714、AB133504);p-p38 MAPK、p38 MAPK、抗兔IgG、抗鼠IgG抗体(美国CST公司,货号:4511T、8690T、7074、7076);GAPDH抗体(美国Immuno way公司,货号:YM3029);RIPA裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,货号:P0013D);蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(瑞士Roche公司,货号:11697498001、4906845001)。

### 1.3 仪器

ACQUITY UPLC系统、Xevo TQ检测器、MassLynx4.1质谱工作站(美国Waters公司);全自动酶标仪(美国Bio-Tek公司,型号:ELx80);流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司,型号:EPICS XL-MCL ADC);电泳仪(美国Bio-Rad公司,型号:1645050);化学发光凝胶成像仪器(上海天能科技有限公司,型号:Tanon 5500)。

## 2 方法

### 2.1 预知子乙酸乙酯萃取物的制备

将10 kg预知子用无水乙醇浸泡3次,第1次7 d,第2次5 d,第3次3 d。合并浸出液过滤后,减压回收溶剂得粗浸膏。将粗浸膏分散于5 L纯水中,用不同极性的溶剂石油醚、乙酸乙酯依次萃取3次,将乙酸乙酯萃取层用旋转蒸发仪减压浓缩,最终得到乙酸乙酯部位干净粉末161.5 g。

### 2.2 预知子提取物样品活性部位的筛选分离及鉴定

将乙酸乙酯部位161.5 g以硅胶(200~300目)干法拌样,进行中压柱层析(200~300目)分离,用石油醚-乙酸乙酯作流动相进行梯度洗脱(纯石油醚 $\rightarrow$ 50:1 $\rightarrow$ 20:1 $\rightarrow$ 10:1 $\rightarrow$ 5:1 $\rightarrow$ 2:1 $\rightarrow$ 纯乙酸乙酯),得到18个馏分,记为1~18。将16馏分12.84 g以反相硅胶( $C_{18}$ )干法拌样,进行低压柱层析( $C_{18}$ )分离,以TLC检测,合并相同的馏分,最后得到25个馏分,记为B1~B25。以对肿瘤细胞的增殖抑制率为效应标准进行筛选,确定B14组分为活性部位<sup>[8]</sup>。

取B14提取物200 mg,以甲醇/水(1:1)溶解,

制备液相分离。使用 HPLC 进行分离, 色谱柱为 Waters X-Bridge C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 保护柱为 Phenomenex Wdepore C<sub>18</sub>(4 mm×3 mm), 流动相为乙腈(A)-水(B), 时长 50 min。梯度洗脱程序: 0~50 min, 40% A; 检测波长为 210 nm; 流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温为 26 °C; 进样量为 20 μL。

### 2.3 细胞培养与药物溶解

HCT116 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。将 B14 用 DMSO 溶解, 以 DMEM 培养液稀释至所需浓度, 对照组含相应浓度的 DMSO 而不含 B14。将 OXA 用双蒸水溶解, 以 DMEM 培养液稀释至所需浓度。

### 2.4 MTT 法检测细胞增殖抑制率

2.4.1 B14 对 HCT116 细胞的增殖抑制作用 将 HCT116 细胞培养至对数生长期, 以每孔 1×10<sup>4</sup> 个细胞接种于 96 孔板中, 设不同浓度 B14 组(0、2、4、6、8、16、32 μg·mL<sup>-1</sup>), 设置 3 个复孔, 孵育 24 h 后, 每孔加入 MTT 溶液(5 g·L<sup>-1</sup>) 20 μL, 37 °C 避光 4 h, 每孔加 150 μL DMSO 振荡 10 min, 测定 490 nm 处光密度值(OD), 计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 = (1 - OD<sub>给药组</sub> / OD<sub>对照组</sub>) × 100%。实验重复 3 次。

2.4.2 B14 增敏 OXA 对 HCT116 细胞的增殖抑制作用 将 HCT116 细胞培养至对数生长期, 以每孔 1×10<sup>4</sup> 个细胞接种于 96 孔板中, 采用正交试验设计方法, B14 组设浓度(0、3、6、12、24、32 μg·mL<sup>-1</sup>), OXA 组设浓度(0、7.5、15、25、40、80 μg·mL<sup>-1</sup>), 孵育时间为 24 h, 均设置 3 个复孔。检测方法同“2.4.1”。实验重复 3 次。采用 CompuSyn 软件分析两药联合效应, 并采用中位数效应原理确定复合指数(CI)值。 $CI = D_1/Dx_1 + D_2/Dx_2$ , 其中, D<sub>1</sub> 和 D<sub>2</sub> 分别表示 B14 和 OXA 联合使用产生同等效果所需的剂量, Dx<sub>1</sub> 和 Dx<sub>2</sub> 分别表示抑制一定水平细胞生长所需的 B14 和 OXA 游离药物剂量。CI < 1 表示两药联用为协同效应, CI = 1 为相加作用, CI > 1 为拮抗作用。

根据 MTT 的实验数据和软件分析结果, 为后续实验确定联合用药最佳药物量效比浓度。

### 2.5 细胞形态学观察

将 HCT116 细胞培养至对数生长期, 以每孔 1×10<sup>6</sup> 个细胞接种于 6 孔板。根据“2.4.2”实验中软件分析得到的最佳量效浓度, 将细胞分为对照组、B14 组(6 μg·mL<sup>-1</sup>)、OXA 组(15 μg·mL<sup>-1</sup>) 和联合

组(6 μg·mL<sup>-1</sup> B14 + 15 μg·mL<sup>-1</sup> OXA)。给药作用 24 h 后, 倒置显微镜下观察细胞形态改变。

### 2.6 流式细胞术检测细胞凋亡

将 HCT116 细胞培养至对数生长期, 以每孔 1×10<sup>6</sup> 个细胞接种于 6 孔板中, 分组同“2.5”。加药培养 24 h 后, 消化、离心收集细胞, 按照 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明操作, 避光室温孵育 15 min 后, 上流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。实验重复 3 次。

### 2.7 流式细胞术检测细胞周期

将 HCT116 细胞培养至对数生长期, 以每孔 1×10<sup>6</sup> 个细胞接种于 6 孔板中, 分组同“2.5”。细胞贴壁后, 换不含血清的 DMEM 培养液, 饥饿细胞 24 h 使细胞周期同步化。加药培养 24 h 后, 消化、离心收集细胞, 加入 10 mL 预冷的 70% 乙醇, -20 °C 固定过夜。固定结束后, 用预冷的 PBS 洗 2 遍, 再用碘化丙啶(PI) 染色, 避光、室温反应 10 min 后上流式细胞仪检测各组细胞周期百分率。实验重复 3 次。

### 2.8 Western blot 法检测细胞凋亡相关蛋白

各组细胞给药培养 24 h 后, 移去上清, PBS 洗 3 次后吸除, 加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 提取细胞总蛋白。BCA 法定量蛋白, 将各组蛋白浓度调整一致, 加入适量 4×蛋白上样缓冲液, 100 °C 沸水浴 10 min, 冷却备用。SDS-PAGE 凝胶电泳分离后, 转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉常温封闭 2 h。依次加入 PBST 稀释的一抗(Bcl-2 1:2 000; Bax 1:1 000; Cyt-c 1:5 000; Cleaved caspase-3 1:1 000; Caspase-3 1:5 000; p-p38 MAPK 1:1 000; p38 MAPK 1:1 000), 4 °C 孵育过夜, PBST 洗 3 次, 每次 10 min。二抗用 PBST 稀释至 1:5 000, 室温下孵育 2 h。洗膜后显色、曝光、拍照, 用 Image J 分析各条带光密度值, 蛋白相对表达量 = 目的蛋白灰度值 / GAPDH 蛋白灰度值。实验重复 3 次。

### 2.9 统计学分析

采用 SPSS23.0 软件进行数据处理。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验, P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 预知子活性部位 B14 的测定结果

根据 2015 年版《中国药典》<sup>[9]</sup>, 结合 HPLC 的检测结果(图 1~2), 初步分析预知子活性部位 B14

的主要成分为皂苷 B 和  $\alpha$ -常春藤皂苷。图 2 中 1 号峰保留时间为 35 min 左右,鉴定为皂苷 B,全称:3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl hederagenin<sup>[10-11]</sup>; 2 号峰保留时间为 37 min

左右,鉴定为  $\alpha$ -常春藤皂苷,全称:3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl hederagenin<sup>[12]</sup>。

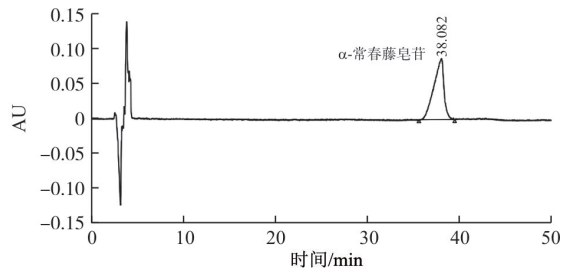
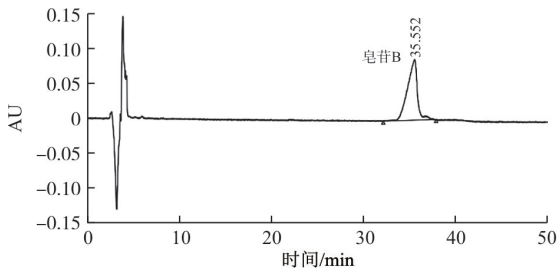
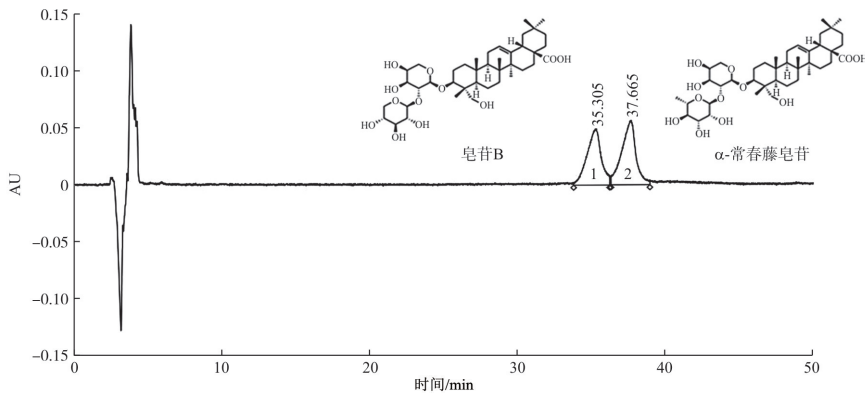


图 1 标准品色谱图

Fig. 1 The HPLC chromatograms of standard products



注:1. 皂苷B; 2.  $\alpha$ -常春藤皂苷

图 2 B14 的 HPLC 图谱

Fig. 2 The HPLC chromatogram of B14

### 3.2 B14 与 OXA 对 HCT116 细胞的增殖抑制作用

B14 能抑制 HCT116 细胞增殖,  $IC_{50}$  为  $18.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 且抑制作用呈时间与剂量依赖性, 见图 3。通过表 1 分析, 联合组的抑制作用强于单药组。  $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  B14 对 HCT116 细胞无明显毒性, 但与 OXA  $7.5, 15, 25, 40, 80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  联合应用时, 其抑制率比单独使用 OXA 显著提高 ( $P < 0.001$ )。

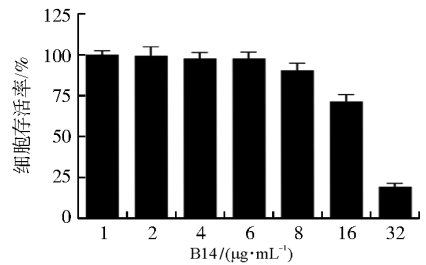


图 3 B14 对 HCT116 细胞增殖的作用

Fig. 3 The effect of B14 on HCT116 cells proliferation

表 1 各组 HCT116 细胞增殖抑制率的比较 ( $\bar{x} \pm s, \%, n=3$ )

Table 1 Comparison of inhibitory rates of HCT116 cells proliferation in each group ( $\bar{x} \pm s, \%, n=3$ )

B14	OXA					
	0	$7.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
0	$0.02 \pm 1.34$	$11.75 \pm 2.86^{***}$	$18.36 \pm 3.12^{***}$	$27.93 \pm 2.42^{***}$	$38.74 \pm 2.61^{***}$	$54.83 \pm 3.07^{***}$
$3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$-1.8 \pm 1.57$	$15.47 \pm 2.19^{***\#}$	$20.96 \pm 1.44^{***}$	$32.79 \pm 1.73^{***\#}$	$41.36 \pm 1.48^{***}$	$60.27 \pm 2.53^{***\#}$
$6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$-3.53 \pm 2.14$	$23.24 \pm 1.35^{***\#\#}$	$48.46 \pm 2.41^{***\#\#}$	$51.88 \pm 1.19^{***\#\#}$	$62.76 \pm 1.81^{***\#\#}$	$72.71 \pm 1.63^{***\#\#}$
$12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$20.62 \pm 1.44^{\#\#\#}$	$40.29 \pm 2.23^{***\#\#\#}$	$55.82 \pm 1.94^{***\#\#\#}$	$68.17 \pm 2.75^{***\#\#\#}$	$74.13 \pm 1.72^{***\#\#\#}$	$83.26 \pm 1.58^{***\#\#\#}$
$24 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$67.73 \pm 2.71^{\#\#\#\#}$	$80.85 \pm 2.38^{***\#\#\#\#}$	$87.74 \pm 1.39^{***\#\#\#\#}$	$92.95 \pm 1.93^{***\#\#\#\#}$	$96.11 \pm 2.96^{***\#\#\#\#}$	$97.68 \pm 2.15^{***\#\#\#\#}$
$32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$85.94 \pm 1.55^{\#\#\#\#\#}$	$95.95 \pm 2.79^{***\#\#\#\#\#}$	$96.58 \pm 1.26^{***\#\#\#\#\#}$	$99.87 \pm 2.34^{***\#\#\#\#\#}$	$98.03 \pm 2.19^{***\#\#\#\#\#}$	$99.78 \pm 1.93^{***\#\#\#\#\#}$

注:与 B14 单药组(OXA=0)比较,  $^{***} P < 0.001$ ; 与 OXA 单药组(B14=0)比较,  $^{\#} P < 0.05$ ,  $^{\#\#\#} P < 0.001$ 。

### 3.3 联合用药药效评价

将 B14 联合 OXA 的不同浓度 (3+7.5、6+15、12+25、24+40、32+80  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 抑制率数据输入 CompuSyn 软件生成图 4。提示本研究所选择的药物浓度配比中,6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  B14+15  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  OXA 方案 CI 值最小,协同作用最强,为最佳配比,故作为后续实验的浓度。

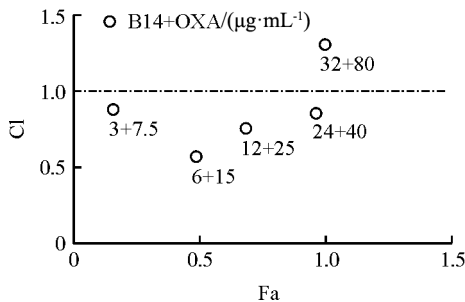
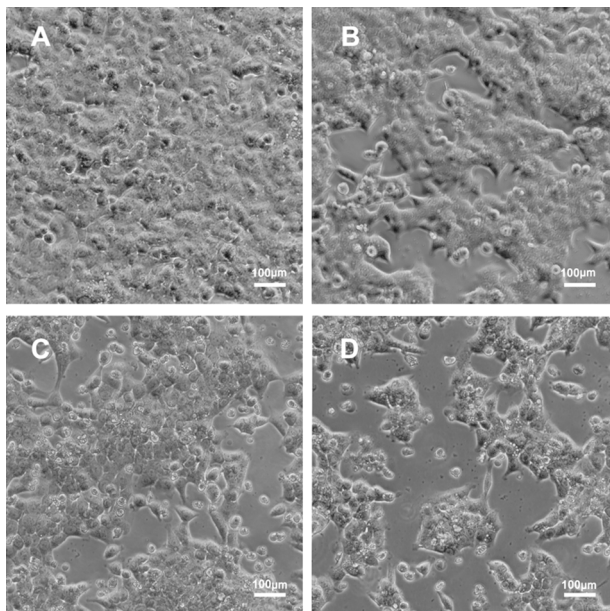


图 4 不同浓度 B14+OXA 抑制 HCT116 细胞增殖的联合指数图

Fig. 4 Fa-CI plot of HCT116 cells proliferation inhibition with different concentrations of B14+OXA

### 3.4 B14 与 OXA 对 HCT116 细胞形态的影响

对照组 HCT116 细胞生长状态良好。B14 组与 OXA 组细胞密度降低,细胞状态变差。联合组相邻细胞连接疏松,细胞增殖减少且形态发生明显变化,出现细胞变圆皱缩等现象,见图 5。



A. 空白组;B. B14 组;C. OXA 组;D. 联合组

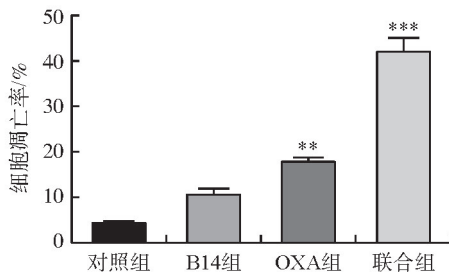
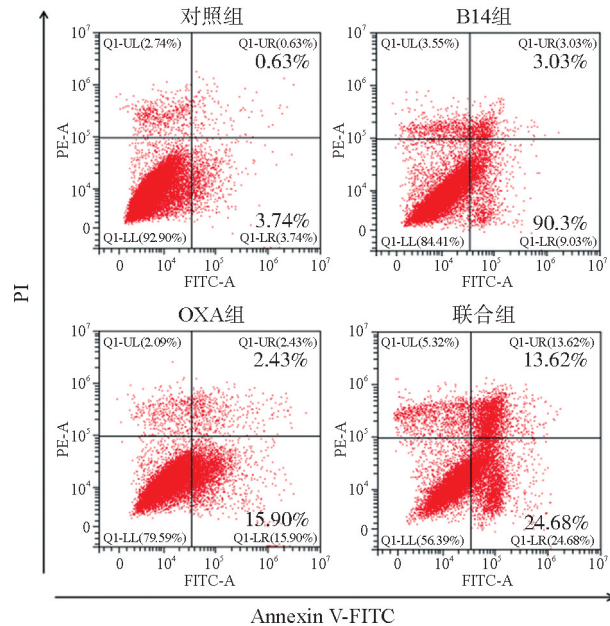
图 5 各组 HCT116 细胞形态比较 ( $\times 100$ )

Fig. 5 HCT116 cell morphology in each group ( $\times 100$ )

### 3.5 B14 与 OXA 对 HCT116 细胞凋亡的影响

与对照组比较,B14 组凋亡率有轻度升高,但无

明显统计学意义。OXA 组细胞凋亡率高于对照组 ( $P < 0.01$ ),但联合组具有显著诱导 HCT116 细胞凋亡的作用,差异均有统计学意义 ( $P < 0.001$ ),见图 6。



注:与对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 3$ 。

图 6 各组 HCT116 细胞凋亡的比较

Fig. 6 The apoptosis rates of HCT116 cells in each group

### 3.6 B14 与 OXA 对 HCT116 细胞周期的影响

与对照组比较,OXA 组和联合组 HCT116 细胞明显被阻滞于  $G_2/M$  期,S 期细胞减少,差异均有统计学意义 ( $P < 0.001$ ),见图 7。

### 3.7 B14 与 OXA 对 HCT116 细胞内蛋白表达水平的影响

与对照组比较,OXA 组和联合组 HCT116 细胞中 Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 比值显著降低 ( $P < 0.01, P < 0.001$ ),Bax、Cyt-c、Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-3/Caspase-3 比值及 p-p38 MAPK 显著升高 ( $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$ )。与 OXA 组比较,联合组 Bcl-2、Caspase-3 及 Bcl-2/Bax 比值显著降低 ( $P < 0.01, P < 0.001$ ),Bax、Cyt-c、

Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-3/Caspase-3 比值及 p-p38 MAPK 显著升高 ( $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$ ), 见图 8。

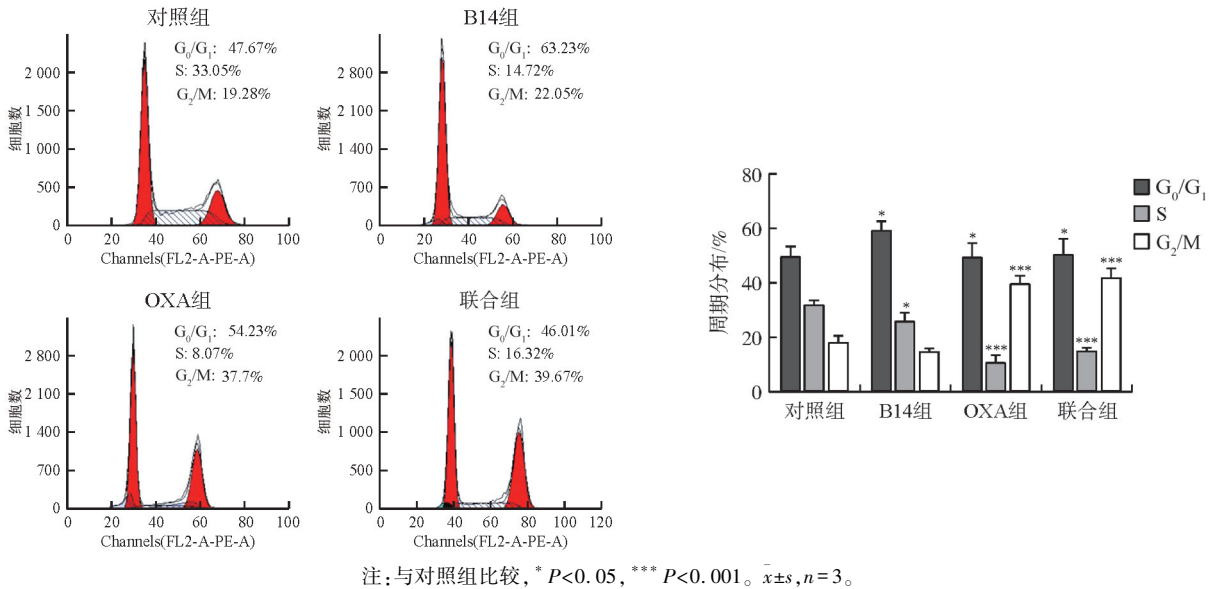


图7 各组 HCT116 细胞周期的比较

Fig. 7 The cycle distribution of HCT116 cells in each group

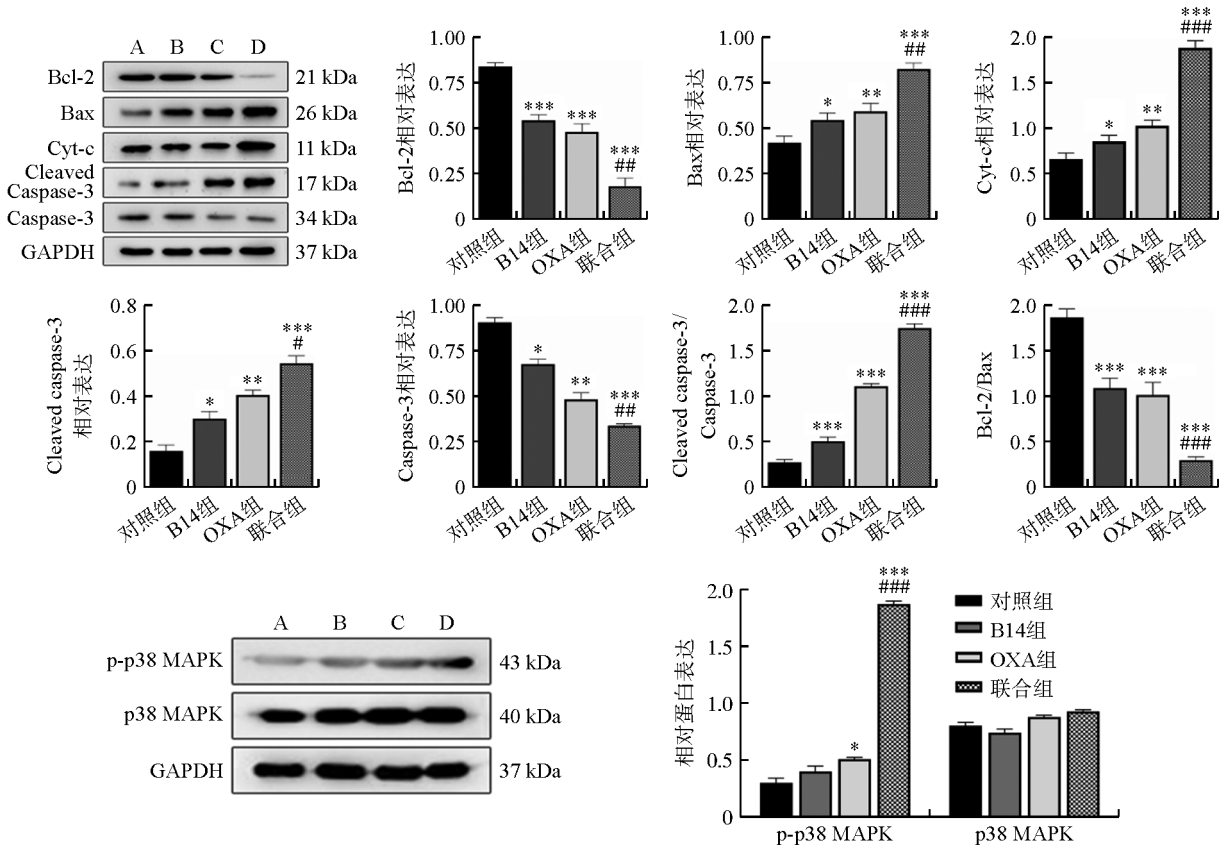


图8 各组 p38 MAPK 信号通路及凋亡相关蛋白的表达情况

Fig. 8 The expressions of p38 MAPK signal pathway and apoptosis related proteins in each group

## 4 讨论

结直肠癌常由致癌因子引起细胞无限增殖,治疗的关键是诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[13]</sup>。OXA 常用于治疗Ⅱ、Ⅲ期结直肠癌,其抗肿瘤作用显著,但也常引起骨髓抑制、神经毒性等不良反应,降低患者生活质量,影响临床化疗效果。OXA 毒副作用的产生与剂量累积密切相关<sup>[14]</sup>。近年来,基于增效减毒目的的 OXA 与其他药物联合使用的临床与实验研究表明,在不影响 OXA 抗肿瘤疗效的前提下,降低 OXA 的使用量是减少其毒副作用的可能途径之一。肖海娟等<sup>[15]</sup>研究发现,肠胃清粗提物协同增效 OXA 对结肠癌 HCT116 细胞的化疗敏感性。冯杰等<sup>[16]</sup>研究发现,葫芦素 B 促进 Cleaved caspase-3 和 Bax 蛋白表达,抑制 Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达,诱导结肠癌 SW480 细胞凋亡,与 OXA 联合后抑制作用更显著。

研究表明,预知子是中医治疗肿瘤行气活血治法的代表药,对肝癌、大肠癌、胃癌等具有抑制作用,但研究成果主要集中在临床经验及实验研究中,预知子抗肿瘤的机制研究仍有相当大的空间。吴晓等<sup>[17]</sup>研究发现,预知子醇提物协同雷公藤红素具有显著抑制 SMMC7721 细胞增殖及凋亡的作用,其机制可能与内质网应激和自噬有关。张瑜等<sup>[18]</sup>研究发现,预知子醇提物可抑制 H22 细胞小鼠移植瘤的生长,减轻化疗的毒副作用。

根据本研究 HPLC 图显示,通过与对照品比对,乙腈溶剂峰对皂苷 B 和  $\alpha$ -常春藤皂苷的峰没有影响;对照品与 B14 样品溶液中的皂苷 B 和  $\alpha$ -常春藤皂苷的保留时间基本相同,RSD 值均小于 2.0%,故该色谱条件适合作为 B14 定性的 HPLC 色谱条件,预知子的抗肿瘤活性部位 B14 的主要成分为皂苷 B 和  $\alpha$ -常春藤皂苷。MTT 结果提示,联合组细胞增殖抑制率显著高于 B14 单药组( $P < 0.001$ )或 OXA 单药组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ),提示 B14 可以增强 HCT116 细胞对 OXA 的化疗敏感性。CompuSyn 结果提示,B14 与 OXA 联合可能存在最佳抑制效果的浓度配比,即浓度分别为  $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。B14 促进细胞凋亡的作用并不显著,但可以显著增加 OXA 诱导的细胞凋亡( $P < 0.001$ )。与对照组比较,联合组和 OXA 组细胞  $G_2/M$  期比例明显升高,S 期细胞百分率降低,差异均有统计学意义( $P < 0.001$ ),说明联合组和 OXA 组将 HCT116 细胞阻滞在了  $G_2/M$  期。

既往研究表明,p38 MAPK 属于丝裂原活化蛋白激酶,参与调控肿瘤细胞的增殖、凋亡等多种生物学过程。一旦肿瘤形成,p38 MAPK 常处于低活化状态。本实验发现低剂量  $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  B14 联合 OXA 可以诱导结直肠癌细胞凋亡,激活 p38 MAPK 磷酸化,可能与介导 Bax 释放至线粒体膜上,破坏膜内外离子浓度差,进而使 Cyt-c 释放到细胞质中,激活 Caspase-3,引发的细胞凋亡级联反应<sup>[19]</sup>相关。Bcl-2/Bax 是调节细胞存活与凋亡的经典信号通路,其中 Bcl-2 是抗凋亡因子,Bax 是促凋亡因子<sup>[20]</sup>。二者结合后可以激活 Caspase-3 途径,加速结直肠癌细胞凋亡<sup>[21]</sup>。Cleaved caspase-3 是调控细胞凋亡过程的核心因子,也是预知子治疗肿瘤的潜在靶点,通过活化 Caspase-3,激活级联反应,诱导细胞凋亡<sup>[22]</sup>。因此,B14 可能成为一种潜在的 OXA 化疗增敏剂,可降低 OXA 的使用量,进一步限制其副作用。

综上所述,预知子提取物 B14 可增加结肠癌 HCT116 细胞的 OXA 化疗敏感性,这种作用可能与阻滞细胞周期在  $G_2/M$  期及激活 p38 MAPK 介导的线粒体凋亡通路有关。本研究结果为临床减轻 OXA 毒副作用、提高化疗疗效提供了方向和线索。同时,由于 B14 是包含 2 种成分的混合物,其确切的增敏 OXA 的活性成分及机制将在今后进行深入研究。

### 参考文献:

- [1] TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA A Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] 苏晓琳,王江威,王长福,等. 中药防治奥沙利铂神经毒性的作用及机制研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(13): 3148-3152. SU XL, WANG JW, WANG CF, et al. Progress research on effect and mechanism of Chinese materia medica preventing oxaliplatin-induced neurotoxicity[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2018, 49(13): 3148-3152.
- [3] FOUNTZILAS E, KRISHNAN E, JANKU F, et al. A phase I clinical trial of hepatic arterial infusion of oxaliplatin and oral capecitabine, with or without intravenous bevacizumab, in patients with advanced cancer and predominant liver involvement[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2018, 82(5): 877-885.
- [4] 朱兆承,王生,胡彦辉. 中药内服联合外浴治疗 42 例奥沙利铂致蓄积性周围神经毒性的临床分析[J]. 安徽医药, 2017, 21(9): 1696-1698. ZHU ZC, WANG S, HU YH. Oral administration and external bath of TCM for cumulative peripheral neurotoxicity induced by oxaliplatin: A report of 42 cases[J]. Anhui Med Pharm J, 2017, 21(9): 1696-1698.
- [5] SOBRERO A, GROTHEY A, IVESON T, et al. The hard road to data interpretation: 3 or 6 months of adjuvant chemotherapy for patients with stage III colon cancer? [J]. Ann Oncol, 2018, 29(5): 1099-1107.
- [6] 周向文,王艳,王娜. 预知子的化学成分和药理作用研究进展

- [J]. 中兽药学, 2021, 19(4): 691-696.
- ZHOU XW, WANG Y, WANG N. Research progress in chemical constituents and pharmacological effects of *Akebiae Fructus* [J]. *Centr South Pharm*, 2021, 19(4): 691-696.
- [7] 宋秋佳, 卢文丽, 方肇勤, 等. 预知子种子提取物抑制 HepG2 肝癌细胞的增殖及黏附作用及相关机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(24): 146-151.
- SONG QJ, LU WL, FANG ZQ, et al. Inhibitory effect of *Akebia trifoliata* seed extract on proliferation and adhesion of HepG2 cells and corresponding mechanism [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2018, 24(24): 146-151.
- [8] 叶仲昊. 预知子功效物质分离及其诱导胃癌细胞凋亡的机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- YE ZH. Separation of active substances from *Fructus akebiae* and its mechanism of inducing apoptosis of gastric cancer cells [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2021.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 三部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- National Pharmacopoeia Committee. *Pharmacopoeia of People's Republic of China: III* [M]. Beijing: China medical science press, 2015.
- [10] 马双成, 陈德昌, 赵淑杰. 预知子的化学成分研究I. 白木通种子中的3位单糖链皂甙化合物[J]. 中草药, 1994, 25(11): 2.
- MA SC, CHEN DC, ZHAO SJ. Studies on the chemical components of Chinese drug *Yuzhizi I. hederagenin 3-O-glycosides of the seeds of austral Akebia (Akebia trifoliata var. australis)* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 1994, 25(11): 2.
- [11] 蒋丹. 预知子化学成分及其生物活性研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2006.
- JIANG D. Studies on the chemical constituents and bioactivities of *akebiae quinata* [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2006.
- [12] ZHONG HM, CHEN CX, TIAN X, et al. Triterpenoid saponins from *Clematis tangutica* [J]. *Planta Med*, 2001, 67(5): 484-488.
- [13] WANG H. microRNAs and apoptosis in colorectal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5353.
- [14] GROTHEY A. Oxaliplatin-safety profile: Neurotoxicity [J]. *Semin Oncol*, 2003, 30(S15): 5-13.
- [15] 肖海娟, 金泉克, 陆海, 等. 肠胃清粗提物协同奥沙利铂抑制人结肠癌 HCT116 细胞及其作用机制研究[J]. 中成药, 2012, 34(5): 804-807.
- XIAO HJ, JIN QK, LU H, et al. Synergetic effect of Changweiqing extract combined with oxaliplatin on human colon cancer HCT116 cells [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2012, 34(5): 804-807.
- [16] 冯杰. 葫芦素 B 联合奥沙利铂调控 AKT/mTOR 通路诱导结肠癌细胞 SW480 凋亡的影响[D]. 锦州: 锦州医科大学, 2019.
- FENG J. The effect of AKT/mTOR pathway on apoptosis of colon cancer cells SW480 induced by cucurbitacin B combined with oxaliplatin [D]. Jinzhou: Jinzhou Medical University, 2019.
- [17] 吴晓, 卢文丽, 张夜航, 等. 预知子醇提物联合雷公藤红素对 SMMC7721 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(3): 69-75.
- WU X, LU WL, ZHANG YH, et al. Effects of ethanol extract of *Akebia fructus* combined with celastrol on proliferation and apoptosis of SMMC7721 cells [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2021, 28(3): 69-75.
- [18] ZHANG Y, YANG X, GE XH, et al. Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/Bax/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 726-733.
- [19] 崔珊, 黄金清, 李金娣, 等. 奥沙利铂通过丝裂原活化蛋白激酶通路对直肠癌作用的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(6): 759-763.
- CUI S, HUANG JQ, LI JD, et al. Research progress on the role of oxaliplatin on rectal cancer through mitogen activated protein kinase pathway [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2021, 37(6): 759-763.
- [20] ZHANG Y, YANG X, GE XH, et al. Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/Bax/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 726-733.
- [21] ARANGO D, WILSON AJ, SHI Q, et al. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 2004, 91(11): 1931-1946.
- [22] 张莹, 章田野, 马捷, 等. 奥沙利铂对结肠癌 SW480 细胞迁移侵袭及细胞凋亡的影响[J]. 解剖科学进展, 2019, 25(3): 241-244.
- ZHANG Y, ZHANG TY, MA J, et al. The effect of oxaliplatin on the migration and invasion and apoptosis of colon cancer SW480 cells [J]. *Prog Anat Sci*, 2019, 25(3): 241-244.

(编辑:杨巍敏)

## (上接 203 页)

- [9] 胡琪祥. 吴翰香教授治疗急性白血病的经验[J]. 上海中医药杂志, 2003, 37(4): 14-16.
- HU QX. Professor wu Han-xiang's experience in treating acute leukemia [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2003, 37(4): 14-16.
- [10] 胡晓莹, 陈珮, 邱仲川, 等. 中西医结合治疗老年性急性髓细胞白血病临床研究[J]. 山东中医杂志, 2015, 34(4): 273-275.
- HU XY, CHEN P, QIU ZC, et al. Clinical research on treatment of age-related acute myelogenous leukemia with integrated treatment of Chinese and western medicine [J]. *Shandong J Tradit Chin Med*, 2015, 34(4): 273-275.
- [11] 许毅, 陈其文, 胡令彦. 骨髓增生异常综合征转化的急性白血病中医病机特点和治疗对策[J]. 中医杂志, 2010, 51(10): 947-949.
- XU Y, CHEN QW, HU LY. TCM pathogenesis and treatment of acute leukemia transformed by myelodysplastic syndrome [J]. *J Tradit Chin Med*, 2010, 51(10): 947-949.
- [12] 陈其文, 鲍计章, 周永明. 周永明治疗围化疗期急性白血病的经验[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(3): 23-25.
- CHEN QW, BAO JZ, ZHOU YM. Zhou Yongming's experience in treating peri-chemotherapeutic acute leukemia [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2010, 44(3): 23-25.
- [13] 胡令彦, 陈其文, 周永明. 周永明教授治疗老年急性白血病经验[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(10): 81-82.
- HU LY, CHEN QW, ZHOU YM. Professor ZHOU yong-ming's treatment experience on senile acute leukemia [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2009, 11(10): 81-82.
- [14] 裴岩岩, 李雅, 闫春生, 等. 黄芪甲苷通过 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(9): 1077-1082.
- PEI YY, LI Y, YAN CS, et al. Astragaloside-IV induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells via modulating bax/bcl-2/caspase-3 signaling pathway [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2019, 30(9): 1077-1082.

(编辑:周建英 董盈妹)