

小白菊内酯对 U-87 MG 细胞增殖和凋亡的影响及其机制研究

郑捷敏[△], 刘全[△], 陈宏谋, 闫宪磊, 黎耀, 陈家康*

广西医科大学第四附属医院, 广西柳州 545005

摘要:目的 考察小白菊内酯对于人脑恶性胶质瘤细胞 U-87 MG 细胞系的增殖、细胞周期及凋亡的影响, 并探讨其作用机制。方法 采用 CCK-8 比色法和克隆形成检测法检测小白菊内酯对 U-87 MG 的增殖抑制作用; 采用碘化丙啶 (PI) 染色后的流式细胞仪检测小白菊内酯处理前后对细胞周期、凋亡的影响; 采用 qPCR 以及 Western blotting 法研究药物处理后 U-87 MG 细胞的 Caspase 3、Bax、Cyclin D1 的表达变化以及 P53-Ser³⁹² 蛋白质磷酸化激活。结果 小白菊内酯可明显抑制 U-87 MG 的细胞增殖、克隆形成数量及克隆大小。处理 48 h 后, U-87 MG 细胞的 S 期、G2/M 期受到了阻滞, G0/G1 期细胞比例明显减少, 同时细胞的凋亡也明显增多。Caspase 3、Bax 基因的 mRNA 及蛋白表达明显上升, 而 Cyclin D1 基因的 mRNA 表达明显下降。同时 P53-Ser³⁹² 残基的磷酸化水平也明显上升。结论 小白菊内酯可通过调节 P53 基因的 Ser³⁹² 残基磷酸化抑制其下游的细胞凋亡、细胞周期途径上 Caspase 3、Bax、Cyclin D1 的基因表达, 影响细胞周期及凋亡, 从而抑制肿瘤细胞的增殖。

关键词: 小白菊内酯; 人脑恶性胶质瘤细胞 U-87 MG; P53; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)05-0497-06

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.05.005

Effects of parthenolide on proliferation and apoptosis of U-87 MG Cells and its mechanism

ZHENG Jie-min, LIU Quan, CHEN Hong-mou, YAN Xian-lei, LI Yao, CHEN Jia-kang

Fourth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou 545005, China

Abstract: Objective To study the effects of parthenolide on human malignant glioma cells U-87 MG cell growth, cell cycle regulation, and apoptosis, and explore its mechanism. **Methods** The inhibition of proliferation on U-87 MG cell of parthenolide were determined using CCK8 and colony formation assay. Effects on cell cycle and apoptosis changes treated by parthenolide were detected by flow cytometer analysis after PI staining. The expressions of cell cycle and apoptosis related proteins, Caspase 3, Bax, Cyclin D1, and P53-Ser³⁹² were analyzed by qPCR and western blotting. **Results** Parthenolide significantly inhibited cell proliferation, and induced decrease in the colony formation ability in U-87 MG cells. Treated by parthenolide after 48 h, U-87 MG cell were arrested at S and G2/M phases, the cells proportion at G0/G1 phase decreased, and the apoptotic cells increased. Furthermore, parthenolide could increase the mRNA expression of caspase 3, Bax, and P53-Ser³⁹², while decrease the mRNA expression of Cyclin D1. **Conclusion** Parthenolide can regulate the Ser³⁹² residue phosphorylation of P53 gene, inhibit apoptosis of downstream cells, and expression of caspase 3, Bax, and Cyclin D1 genes, which effects cell cycle and apoptosis, and induce cellular senescence and apoptosis.

Key word: parthenolide; human malignant glioma cells U-87 MG; P53; apoptosis

脑胶质瘤是一类神经系统最常见的颅内肿瘤, 在临床上主要是以手术治疗及放疗为主^[1]。但即使是进行了手术及放疗, 术后 3 年生存率也不足

5%^[2], 这使得明确其发病机制并寻找有效抑制胶质瘤的药物变得非常具有临床意义^[3]。长期的放疗对胶质瘤患者的伤害也是巨大的, 所以寻找一种能

收稿日期: 2015-04-13

基金项目: 广西壮族自治区卫生厅自筹经费科研课题 (Z2013624)

作者简介: 郑捷敏 (1973—), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向为神经外科肿瘤的研究。

刘全, 主治医师。Tel: 13597222786 E-mail: liuq1981@hotmail.com

*通信作者 陈家康, 主任医师。E-mail: neurosurgeryz@163.com

△ 为并列第一作者

有效杀死胶质瘤细胞, 并且降低毒性以改善患者生存质量的药物有极大的临床意义。小白菊内酯是从艾菊 *Tanacetum vulgare* Linn. 中提取的一种倍半萜内酯化合物, 实验证实小白菊内酯是艾菊中药理活性最好的成分之一^[4]。有研究证实小白菊内酯可抑制肝癌、肠癌等多种肿瘤的增殖, 并对其细胞周期也有一定的影响^[5]。本研究以人脑恶性胶质瘤细胞系 U-87 MG 为研究模型, 对其进行小白菊内酯的药物处理, 研究了小白菊内酯对恶性胶质瘤的增殖、细胞周期细胞凋亡的影响及初步的分子机制研究, 探讨小白菊内酯辅助治疗恶性胶质瘤的可行性。

1 材料及仪器

人脑恶性胶质瘤细胞系 U-87 MG 购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所。小白菊内酯(质量分数 >99.0%) 由上海锐谷生物科技有限公司提供。DMEM (High Glycose) 培养基、胎牛血清 (FBS)、青霉素、链霉素双抗溶液 (PS) 及 0.25% 胰蛋白酶均采购自美国 HyClone 公司。Cell Counting Kit 8 (CCK 8 试剂盒) 购自北京索莱宝科技有限公司。碘化丙啶 (PI)、二甲基亚砜采购自美国 Sigma 公司。结晶紫染色液购自上海碧云天生物科技有限公司。SYBR Green 2×Mix、qPCR 引物均购自宝生物(大连)工程有限公司。抗体(兔抗 P53、Caspase3、Bax 及 P53-Ser³⁹² 磷酸化)、PVDF 膜、ECL 试剂盒采购自美国 Millipore 公司。引物由宝生物(大连)工程有限公司定制合成。依托泊苷注射液(5 mL:100 mg, 批号 90140301) 购自四川升和药业股份有限公司。

37 °C、5% CO₂ 培养箱由美国赛默飞公司生产, 荧光显微镜为日本 Olympus 公司产品。EL-312E 酶联免疫检测仪为美国 Bio-Tek 公司产品。FACScalibur 流式细胞仪为美国 BD 公司生产。SYBR Green 2×Mix、CFX-96 荧光定量 PCR 仪由美国 Bio-Rad 公司生产, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。电泳仪垂直电泳槽采购自北京六一仪器厂。

2 方法

2.1 小白菊内酯溶液的配制

2.1.1 贮存液的配制 称取 2.48 mg 小白菊内酯粉剂, 吸取 1 mL DMSO 与小白菊内酯粉剂混合, 使用移液器反复吹打至完全溶解, 继而加入无抗生素的 DMEM 配制成 10 mmol/L 贮存液, 0.22 μm 滤器滤过除菌。

2.1.2 工作液的配制 采用无抗生素的 DMEM 培养基将贮存液稀释为 10、20 μmol/L 工作液。

2.2 人脑恶性胶质瘤细胞系 U-87 MG 的培养

人脑恶性胶质瘤细胞株 U-87 MG 经复后传代培养, 使用 DMEM+10% FBS+1% PS 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 实验用细胞均处于对数生长期。

2.3 小白菊内酯对 U-87 MG 细胞增殖影响

取对数生长期的 U-87 MG 细胞, 消化后细胞计数, 稀释至浓度为 3×10⁵/mL, 进行 96 孔板铺板, 每孔加液量 100 μL, 12 h 后换液。在孔内加入小白菊内酯工作液, 按照不同浓度进行稀释, 并取 10 μL 分别加入各个孔中, 使终浓度分别为 1、10、20、50、100 μmol/L, 每种浓度各设 3 个复孔。设对照组, 由于溶剂为 DMSO, 故对照组细胞加入 10 μL DMSO 处理, 阳性组为 50 μmol/L 依托泊苷处理, 同样对照组、阳性组也各设 5 个复孔。培养 48 h 后, 加入 CCK8 (5 mg/mL) 20 μL, 继续培养 4 h 后, 每孔加入 0.1 mol/L HCl 溶液 10 μL, 并遮盖培养板避光保存在室温条件下。24 h 内在 EL-312E 酶标仪上选择波长 450 nm, 读出每孔的吸光度 (A) 值, 并进行统计。计算药物抑制率, 利用概率单位法计算半数抑制浓度 (IC₅₀)。

$$\text{抑制率} = [A(\text{对照}) - A(\text{加药})] / A(\text{对照})$$

2.4 小白菊内酯对 U-87 MG 细胞克隆形成的影响

取对数生长期的 U-87 MG 细胞, 消化后细胞计数, 6 孔板铺板, 每孔加细胞数 200 个, 12 h 后待细胞贴壁, 将培养基换成含有 IC₅₀ 浓度 (36 μmol/L)、100 μmol/L 小白菊内酯以及对照组的培养基, 各 3 个复孔。药物作用 48 h 后弃去含有药物的培养基, 换为 2 mL 普通培养基, 培养 7 d。弃去培养基, 4% 多聚甲醛固定后, 结晶紫染色液染色, 对克隆计数, 计算单个克隆形成集落大小。

2.5 小白菊内酯对 U-87 MG 细胞周期及凋亡的影响

将 U-87 MG 细胞在六孔板中铺板, 每孔 1×10⁵ 个细胞, 将细胞分组为 IC₅₀ 浓度 (36 μmol/L)、100 μmol/L 小白菊内酯处理及对照组, 每组设 3 个复孔。培养 12 h 后, 按照分组加入小白菊内酯, 继续培养 48 h 后, 收集样本, 70% 乙醇固定, PI 染色, 并进行流式细胞仪检测。

2.6 小白菊内酯对 U-87 MG 细胞周期相关基因 mRNA 表达的影响

取 IC₅₀ 浓度 (36 μmol/L)、100 μmol/L 小白菊

内酯处理 48 h 后的 U-87 MG 细胞, 以及对照组, 裂解细胞提取 RNA 进行反转录, 使用 SYBR Green 2×Mix 进行 qPCR。扩增条件为: 95 °C、5 min; 95 °C、5 s; 60 °C、10 s, 并读取荧光,; 第 2~3 步循环 45 次。引物见表 1。

表 1 qPCR 引物序列
Table 1 qPCR primer

名称	引物序列
Bax F	GCGTCCACCAAGAAGC
Bax R	CGGCGGCAATCATCC
Caspase3 F	ACCTGTGGCTGTGTATC
Caspase3 R	GGCTCGTAACTCCTC
Cyclin D1 F	CTGCTCTGGTGAACAAG
Cyclin D1 R	TCTCTCCGCTCTGG
β-Actin F	TCGGCGGCTCCATCCTG
β-Actin R	ACTCGTCATACTCCTGCTTGC

2.7 小白菊内酯对 U-87 MG 细胞周期相关基因蛋白表达的影响

取 IC₅₀ 浓度 (36 μmol/L)、100 μmol/L 小白菊内酯处理 48 h 后的 U-87 MG 细胞, 以及对照组, 裂解细胞提取蛋白质, 利用 Lowry 法测定总蛋白浓度, 以每个泳道 20 μg 蛋白样品上样, 经 30% 变性 SDS-PAGE 电泳后, 经电转至 PVDF 膜上。封闭后, 分别检测 Bax、Caspase 3、P5P53-Ser³⁹²、GAPDH, 按顺序加上一抗 (1:1 000)、二抗 (1:5 000) 进行杂交, ECL 发光试剂盒进行显色, 检测杂交信号。

2.8 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 12.0 统计软件进行 ANOVA 单因素方差分析。

3 结果

3.1 不同浓度小白菊内酯对 U-87 MG 细胞增殖的抑制作用

不同浓度药物与细胞共同培养 48 h 之后, 发现 1、10、20、50、100 μmol/L 小白菊内酯处理 U-87 MG 细胞 48 h 后的增殖抑制率和依托泊苷处理的细胞增殖抑制率均远远大于对照组 ($P < 0.01$), 并且白菊内酯对于 U-87 MG 细胞的增殖抑制作用呈明显的剂量相关性。小白菊内酯处理 U-87 MG 细胞 48 h 的 IC₅₀ 为 (35.89 ± 2.2) μmol/L, 因此选择 IC₅₀ 浓度为 36 μmol/L。结果见表 2。

表 2 不同浓度小白菊内酯对 U-87 MG 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effects of parthenolide with various concentrations on growth inhibition of U-87 MG ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	浓度/(μmol·L ⁻¹)	抑制率/%
对照	0	2.85 ± 1.21
小白菊内酯	1	8.92 ± 3.12*
	10	28.89 ± 4.29*
	20	40.68 ± 5.92**
	50	56.32 ± 2.32**
	100	68.75 ± 3.12**
依托泊苷	50	87.45 ± 2.60**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.2 小白菊内酯抑制 U-87 MG 细胞克隆能力

IC₅₀ 浓度 (36 μmol/L)、100 μmol/L 小白菊内酯处理后的 U-87 MG 细胞克隆形成的大小及数目均明显低于对照组, 见图 1。克隆形成数统计结果也表明小白菊内酯可明显抑制人脑恶性胶质瘤 U-87 MG 的集落形成率, 见表 3。

3.3 小白菊内酯对 U-87 MG 细胞周期的影响

PI 单染流式细胞仪检测结果显示, 经 36 μmol/L 小白菊内酯处理 48 h 后, U-87 MG 细胞的 S 期、

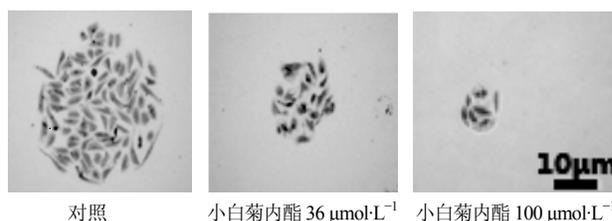


图 1 不同浓度小白菊内酯对 U-87 MG 克隆形成的影响
Fig. 1 Effect of parthenolide on the clone formation of U-87 MG cells

表 3 不同浓度小白菊内酯对 U-87 MG 克隆形成数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Number of colony formations of U-87 MG cells treated by parthenolide with various concentrations ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	浓度/(μmol·L ⁻¹)	克隆形成数/个
对照	0	150.33 ± 8.08
小白菊内酯	36	53.67 ± 2.52**
	100	28.33 ± 5.51**

与对照组比较: ** $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs control group

G2/M 期的细胞比例明显降低, 即小白菊内酯使得 U-87 MG 细胞的 S 期及 G2/M 期受到了阻滞, 见表 4。同时, G0/G1 期细胞比例明显降低, 随着浓度增

加, 这种趋势愈加增强。同时经 36、100 $\mu\text{mol/L}$ 小白菊内酯处理后 U-87 MG 细胞的凋亡 (Sub-G1) 也明显增多, 见表 5。

表 4 不同浓度小白菊内酯对 U-87 MG 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effects of parthenolide with various concentrations on cell cycle distribution of U-87 MG cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	G0/G1/%	S/%	G2/M/%	sub-G1/%
对照	0	57.57 \pm 0.85	29.24 \pm 0.33	15.20 \pm 0.75	5.16 \pm 0.31
小白菊内酯	36	76.45 \pm 0.34**	17.56 \pm 1.09**	6.60 \pm 1.07*	14.89 \pm 1.07**
	100	78.57 \pm 0.95**	19.24 \pm 0.60*	5.20 \pm 0.51*	12.92 \pm 0.04*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

表 5 不同浓度小白菊内酯对 U-87 MG 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effects of parthenolide with various concentrations on apoptosis of U-87 MG cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	凋亡率/%
对照	0	5.16 \pm 0.31
小白菊内酯	36	14.89 \pm 1.07**
	100	12.92 \pm 0.04*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

表 6 小白菊内酯对 U-87 MG 细胞凋亡相关基因 mRNA 表达变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Apoptosis gene mRNA expression of U-87 MG cells treated by parthenolide ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
		Bax	Caspase3	Cyclin D1
对照	0	1.03 \pm 0.32	1.07 \pm 0.63	1.02 \pm 0.11
小白菊内酯	36	1.99 \pm 0.19**	1.82 \pm 0.20**	0.75 \pm 0.06*
	100	2.32 \pm 0.06**	2.12 \pm 0.22**	0.61 \pm 0.23*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

用 Western blotting 法检测细胞凋亡相关蛋白, 结果与 qPCR 结果相互印证, 即 U-87 MG 细胞经小白菊内酯处理 48 h 后, 可明显上调 Bax 及 Caspase 3 基因的蛋白表达水平, 同时 Cyclin D1 基因的蛋白表达水平明显下降。有一定的剂量效应, 见图 2。U-87 MG 细胞经小白菊内酯处理 48 h 后, 用 Western blotting 法检测 P53 及 P53-Ser³⁹² 残基的磷酸化, 结果表明小白菊内酯处理后可明显促进 P53-Ser³⁹² 的蛋白质磷酸化, 见图 3。

4 讨论

恶性胶质瘤是最常见的颅内肿瘤之一, 国内 16 个单位统计资料表明神经胶质瘤占颅内肿瘤的

3.4 小白菊内酯对 U-87 MG 细胞凋亡相关基因的影响

荧光定量 PCR 检测不同浓度的小白菊内酯处理后的 U-87 MG 细胞的凋亡相关基因 Bax、Caspase 3 及 Cyclin D1 基因的 mRNA 水平表达。结果显示, U-87 MG 细胞经小白菊内酯处理 48 h 后, 可明显上调 Bax 基因及 Caspase3 基因的 mRNA 表达水平, 同时 Cyclin D1 基因的 mRNA 表达水平明显下降。见表 6。

44.6%, 欧洲报道的发生率占颅内肿瘤的 36.0%~50.1%^[6]。人脑胶质瘤是颅内最常见的原发性肿瘤, 是人类最恶性最具侵袭性的肿瘤之一, 其中恶性胶质瘤约占 60%, 即使联合手术、放疗和化疗, 其中位生存期也只有 9~12 月, 几十年来, 尽管尝试各种改进的治疗方案, 恶性胶质瘤生存期仍没有明显的提高^[7]。

小白菊内酯已经显示出显著抑制肿瘤能力。研究表明, 同时使用小白菊内酯与舒林酸时, 对胰腺癌具有细胞增殖的影响的协同抑制作用^[8]。与此同时, 另一项研究表明, 小白菊内酯在多发性骨髓瘤细胞增殖上起到了抑制的作用^[9]。

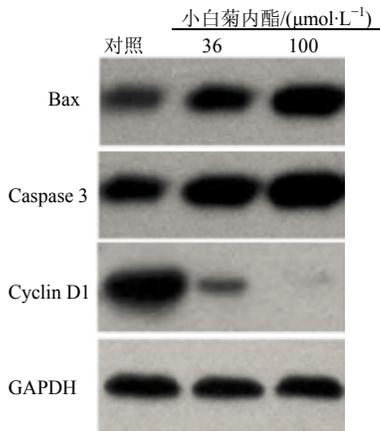


图2 小白菊内酯对 U-87 MG 细胞凋亡及细胞周期相关基因蛋白表达变化影响

Fig. 2 Effects of parthenolide on apoptosis and cell cycle gene expression of U-87 MG cells

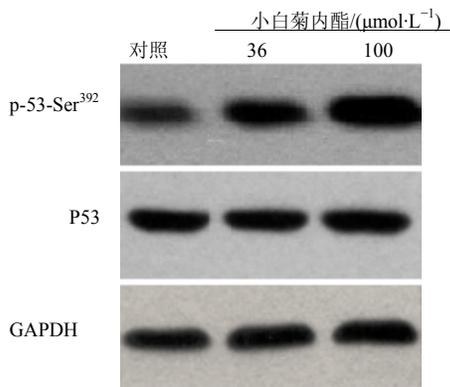


图3 小白菊内酯对 U-87 MG 细胞凋亡及细胞周期相关基因 P53-Ser³⁹² 磷酸化变化影响

Fig. 3 Effects of parthenolide on apoptosis gene protean expression and P53-Ser³⁹² phosphorylation of U-87 MG cells

在本研究中,通过对 CCK8 的增殖和集落形成能力的研究,发现小白菊内酯处理后对人类神经胶质瘤细胞系 U-87 MG 有着显著的抑制作用。经过小白菊内酯处理 48 h 后, U-87 MG 细胞的增殖能力,以及集落形成能力都明显受到抑制。在同一时间内,有着明显的抑制药浓度和处理时间相关性,即小白菊内酯的浓度越高,或更长的处理时间,其对肿瘤生长抑制更明显。流式细胞仪检测发现,小白菊内酯为人类恶性神经胶质瘤细胞的 U-87 MG 细胞周期的变化也可以在细胞的 S 期、G2/M 期以及 G0/G1 期起到了相当显著的效果,小白菊内酯处理 48 h 后, U-87 MG 细胞的 S 期及 G2/M 期显著下降,与此同时细胞的 G0/G1 期显著增加,而显示凋亡细胞的

Sub-G1 期也有着显著的增加。这表明,随着处理 U-87 MG 细胞的 PAR 浓度增加,细胞周期在 G0/G1 期的停滞,同时也伴随着 G2/M 期以及 S 期的细胞比例显著降低。这些结果表明,小白菊内酯作用在 U-87 MG 细胞中,将细胞阻滞在 G0/G1 期,细胞不能合成 DNA,因此通过阻滞了有丝分裂,使细胞增殖受到抑制。增加的 Sub-G1 峰,说明在小白菊内酯的作用下, U-87 MG 细胞周期受到了阻断,同时也伴随着大量的细胞凋亡。

为了探究小白菊内酯对肿瘤细胞增殖的抑制,及细胞周期的变化,实验首先检测了小白菊内酯处理后的 U-87 MG 细胞的 mRNA 表达变化。发现经过小白菊内酯的处理后, U-87 MG 细胞内的 Caspase 3 以及 Bax 基因的 mRNA 表达量明显增高,同时 Cyclin D1 基因表达明显下降。为了验证这个表达,继而通过 Western blotting 法检测了 Caspase 3、Bax 以及 Cyclin D1 基因的蛋白表达水平。结果表明确实是在小白菊内酯处理后, Caspase 3、Bax 的蛋白表达水平明显升高,而 Cyclin D1 表达明显降低。这说明了小白菊内酯对于 U-87 MG 细胞的细胞凋亡影响可能是通过上调 Caspase 9 以及 Bax 基因起作用的,而细胞周期的阻滞可能是受到了 Cyclin D1 的影响。

同时,对 P53 基因的磷酸化研究发现,加入小白菊内酯后, P53 基因的 Ser³⁹² 位点磷酸化增强,而 P53 基因作为 Bax、Caspase 3 等基因的上游,其磷酸化可能就是促进这些基因表达的关键原因。

当细胞及 DNA 受到一定的损伤之后,如紫外辐射或电离辐射伤害,或依托泊苷、nutlin-3 等伤害后,可以检测到 P53 的 Ser³⁹² 的残基产生磷酸化^[10],这表明 P53-Ser³⁹² 这个残基可能会受到药物影响而产生,并进一步激活下游基因的表达。P53 基因的 Ser³⁹² 位点残基的磷酸化,可激活下游大量靶基因,如 P21、Bax 等^[11]。

Bax、Bcl-2 基因是两种重要的细胞凋亡调节基因,高表达的 Bcl-2 可以与 Bax 形成异二聚体从而抑制细胞凋亡,高表达的 Bax 蛋白会与自身形成同源二聚体,从而促进细胞凋亡^[12]。有研究表明,所有促进或抑制细胞凋亡的细胞凋亡的基因,最终归结到 Bax 蛋白的表达量增加^[13]。

Bax 在线粒体外膜表面,主要是允许跨线粒体膜的 CYT-c 进入细胞质,从而导致细胞凋亡。进入 CYT-c 和凋亡酶激活因子 1 细胞质 (APAF-1) 会相

互结合, 同时将 APAF-1 激活, 然后再结合辅助因子 dATP/ATPAPA 构成了凋亡小体, 在凋亡小体上的 APAF-1 会招募 Procaspase-9 在凋亡小体上形成低聚物, 使得 Procaspase-9 发生同源活化^[14], 活化的 Caspase 9 便更进一步激活下游的 Caspase 3, 继而激活 Caspase 6、7 从而促进细胞活化凋亡^[15]。他们会通过一系列的激活下游基因, 来发挥调控细胞凋亡的功能。

Cyclin D1 是在细胞周期调控细胞周期 G1 期的调节的关键蛋白质, 是必不可少一个环节的。研究发现^[16], 细胞周期调控的关键蛋白质 CyclinD1 已被确认为一种原癌基因, Cyclin D1 的过度表达会导致细胞 G1 期的阻滞, 所以它在细胞周期调控中起着非常重要的作用。P53 基因的磷酸化激活后, 会激活下游基因 P21 的转录表达, 而 P21 作为 Cyclin D1 的抑制基因, 可以对 Cyclin D1 与 CDK 复合物的形成加以抑制, 从而使得细胞周期于 G1 期受到阻滞, 进一步导致细胞凋亡^[17]。

综上所述, 小白菊内酯可能是通过对肿瘤细胞的损伤, 激活了 P53 的 Ser³⁹² 残基的磷酸化。从而激活了 Bax 以及 Caspase 9 基因的高表达, 激活了肿瘤细胞的线粒体凋亡途径, 抑制了细胞的增殖以及克隆形成能力。同时磷酸化激活的 P53 基因, 通过抑制了 Cyclin D1 基因的表达, 从而引起了 U-87 MG 细胞周期被阻滞在了 G1 期, 继而进一步引起了大量的肿瘤细胞凋亡。

参考文献

- [1] Fisher J L, Schwartzbaum J A, Wrensch M, *et al.* Epidemiology of brain tumors [J]. *Neurol Clin*, 2007, 25(4): 867-890.
- [2] Sanai N, Berger M S. Operative techniques for gliomas and the value of extent of resection [J]. *Neurotherapeutics*, 2009, 6(3): 478-486.
- [3] Demuth T, Rennert J L, Hoelzinger D B, *et al.* Glioma cells on the run—the migratory transcriptome of 10 human glioma cell lines [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 54.
- [4] Heptinstall S, Awang D V, Dawson B A, *et al.* Parthenolide content and bioactivity of feverfew (*Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip.). Estimation of commercial and authenticated feverfew products [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1992, 44(5): 391-395.
- [5] Park J H, Liu L, Kim I H, *et al.* Identification of the genes involved in enhanced fenretinide-induced apoptosis by parthenolide in human hepatoma cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(7): 2804-2814.
- [6] 赵继宗. 颅脑肿瘤外科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 208-234.
- [7] Deorah S, Lynch C F, Sibenaller Z A, *et al.* Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, 1973 to 2001 [J]. *Neurosurg Focus*, 2006, 20(4): E1.
- [8] Yip-Schneider M T, Wu H, Rrlstin M, *et al.* Suppression of pancreatic tumor growth by combination chemotherapy with sulindac and LC-1 is associated with cyclin D1 inhibition *in vivo* [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(6): 1736-1744.
- [9] Suvannasankha A, Crean C D, Shanmugam R, *et al.* Antimyeloma effects of a sesquiterpene lactone parthenolide [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(6): 1814-1822.
- [10] Lew Q J, ChiaY L, Chu K L, *et al.* Identification of HEXIM1 as a positive regulator of P53 [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(43): 36443-36454.
- [11] Blaydes J P, Hupp T R. DNA damage triggers DRB-resistant phosphorylation of human p53 at the CK2 site [J]. *Oncogene*, 1998, 17(8): 1045-1052.
- [12] Chien C T, Chang T C, Tsai C Y, *et al.* Adenovirus-mediated bcl-2 gene transfer inhibits renal ischemia/reperfusion induced tubular oxidative stress and apoptosis [J]. *Am J Transplant*, 2005, 5(6): 1194-1203.
- [13] Lin H H, Chen J H, Huang C C, *et al.* Apoptotic effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(11): 2306-2316.
- [14] Tan K O, Fu N Y, Sukumaran S K, *et al.* MAP-1 is a mitochondrial effector of Bax [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(41): 14623-14628.
- [15] Tang W, Wang W, Zhang Y, *et al.* Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced chemokine release in both TRAIL-resistant and TRAIL-sensitive cells via nuclear factor kappa B [J]. *FEBS J*, 2009, 276(2): 581-593.
- [16] Inaba T, Matsushime H, Valentine M, *et al.* Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes [J]. *Genomics*, 1992, 13(3): 565-574.
- [17] Gulsppa T, Reddy R S, Suman S, *et al.* Molecular interplay between cdk4 and p21 dictates G0/G1 cell cycle arrest in prostate cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2013, 337(2): 177-183.