

· 实验研究 ·

羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐体内外抗乳腺癌 MCF-7 作用评价

赵音旭¹, 邓思琦¹, 郭晓珊¹, 洪鲜², 李刚², 王玉春¹, 李清漪¹, 卜明^{1*}, 王明^{1*}

1. 齐齐哈尔医学院 药学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

2. 齐齐哈尔医学院 医药科学研究院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

摘要: 目的 合成羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐衍生物, 并进行其体内外抗乳腺癌 MCF-7 活性及作用机制研究。方法 通过酯化、酰化和成盐反应得到目标化合物。采用紫外分光光度法在 305 nm 下测定羽扇豆醇和羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐的水溶性; 以羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐 0、1.25、2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 作用乳腺癌 MCF-7 细胞 24、48、72 h, 使用 MTT 法对其细胞增殖抑制能力进行测定; 采用羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐 (7、14、28 $\mu\text{mol/L}$) 作用 MCF-7 细胞 48 h 后, 采用流式细胞术 (AnnexinV-FITC/PI 法) 检测细胞凋亡, JC-1 染色法检测细胞线粒体膜电位, DCFH-DA 染色法检测细胞活性氧 (ROS) 水平; 同时在激光共聚焦显微镜下观察细胞凋亡、线粒体膜电位变化以及 ROS 水平; Western blotting 法检测 MCF-7 细胞中线粒体凋亡途径相关蛋白表达变化。通过构建 4T1 小鼠荷瘤模型, 设置对照组和羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐 (20、40 mg/kg) 组, 与对照组进行比较, 观察羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐在体内抑制乳腺癌的活性。**结果** 合成羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐, 其结构经 ¹H-NMR、¹³C-NMR 和 HR-ESI-MS 确证。紫外分光光度法结果显示羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐相对羽扇豆醇水溶性显著提高; MTT 提示羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对乳腺癌 MCF-7 细胞有显著的抑制能力 ($P < 0.01$ 、 0.001), 且抑制率呈浓度、时间相关趋势; 流式细胞术以及激光共聚焦显微镜观测结果表明羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐能够有效诱导细胞凋亡, 线粒体膜电位显著下降, 活性氧水平明显升高; 羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐能够显著上调 B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bax)、细胞色素 C (Cyt C)、Bax、cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-7 蛋白表达, 下调 Bcl-2 蛋白表达 ($P < 0.01$ 、 0.001); 羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐在体内抑制肿瘤生长效果显著, 并未引起明显毒性。**结论** 成盐后的羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐水溶性明显增加, 并显著提高了体内外抗乳腺癌活性, 本研究拓展了羽扇豆醇抗肿瘤研究的新思路。

关键词: 羽扇豆醇; 季铵盐衍生物; 溶解度; 乳腺癌; 线粒体; B 细胞淋巴瘤 2; 细胞色素 C

中图分类号: R284.3; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2024)11 - 2729 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.11.001

Effect of lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt on breast cancer MCF-7 *in vitro* and *in vivo*

ZHAO Yinxu¹, DENG Siqi¹, GUO Xiaoshan¹, HONG Xian², LI Gang², WANG Yuchun¹, LI Qingyi¹, BU Ming¹, WANG Ming¹

1. College of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China

2. Research Institute of Medicine & Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of a quaternary ammonium salt derivative of lupeol pyridine on breast cancer *in vitro* and *in vivo*. **Methods** The target compound was obtained by esterification, acylation and salt forming reactions. The water solubility of lupeol and lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt were determined by ultraviolet spectrophotometry at 305 nm. Breast cancer MCF-7 cells were treated with lupeol and lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt (0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$) for 24, 48, 72 h, and the cell proliferation inhibition ability was measured by MTT assay. MCF-7 cells were treated with 7, 14, and 28

收稿日期: 2024-08-13

基金项目: 黑龙江省教育厅基本科研业务费基础研究项目 (2020-KYYWF-0024)

作者简介: 赵音旭, 男, 硕士研究生, 研究方向为天然药物抗肿瘤作用。E-mail: zyx99813@163.com

*通信作者: 卜明, 男, 博士, 副教授, 研究方向为天然产物结构修饰。E-mail: buming@qmu.edu.cn

王明, 女, 硕士, 讲师, 研究方向为天然药物抗肿瘤作用。E-mail: wangming_qy@163.com

$\mu\text{mol/L}$ lupeol and lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt for 48 h, and the apoptosis was detected by flow cytometry (AnnexinV-FITC/PI method). The mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 staining, and the reactive oxygen species (ROS) level was detected by DCFH-DA staining. At the same time, apoptosis, mitochondrial membrane potential changes and ROS levels were observed under confocal laser microscopy. Western blotting was used to detect the expression of proteins related to mitochondrial apoptosis pathway in MCF-7 cells. The tumor bearing model of 4T1 mice was established, and the control group and lupinol-3-pyridine quaternary ammonium salt (20 and 40 mg/kg) groups were set up to compare with the control group, and the anti-breast cancer activity of lupinol-3-pyridine quaternary ammonium salt *in vivo* was observed. **Results** Lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt derivative was synthesized and the structure was confirmed by $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ and HR-ESI-MS. UV spectrophotometry showed that the water solubility of lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt was significantly higher than that of lupeol. MTT assay showed that lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt had a significant inhibitory effect on breast cancer MCF-7 cells ($P < 0.01, 0.001$), and the inhibition rate was concentration-time dependent. Flow cytometry and laser confocal microscopy showed that lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt could effectively induce cell apoptosis, significantly decrease mitochondrial membrane potential, and significantly increase the level of reactive oxygen species. Lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt could significantly up-regulate the expression of Bax, Cyt C, Bax, cleaved Caspase-9, and cleaved Caspase-7 proteins, and down-regulate the expression of Bcl-2 protein ($P < 0.01, 0.001$). Lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt significantly inhibited tumor growth *in vivo* without causing obvious toxicity. **Conclusion** The water solubility of Lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt significantly increased, and improved the anti-breast cancer activity *in vivo* and *in vitro*. The study has expanded the new idea of anticancer research of lupeol.

Key words: lupeol; quaternary ammonium salt derivative; solubility; breast cancer; mitochondrial; Bcl-2; Cyt C

乳腺癌作为女性最常见的疾病,在我国发病率逐年上升,女性的健康也因此受到严重威胁^[1-2]。临床上对于乳腺癌的治疗以手术为主,结合放化疗等模式,但是目前上市的化疗药物常伴有严重的毒副作用^[3-5]。因此,开发新型高效、低毒的抗乳腺癌药物就显得尤为重要。天然产物是抗肿瘤新药开发的重要来源,近年来基于天然产物结构修饰开发抗肿瘤药物受到人们的极大关注^[6]。

羽扇豆醇是一种天然五环三萜类化合物^[7],具有抗肿瘤、抗炎、抗基因突变等药理活性^[8]。在抗肿瘤研究中发现,羽扇豆醇对肝癌、肺癌、结肠癌等多种恶性肿瘤具有明显的抑制作用,其药理学活性主要体现在抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、诱导细胞周期阻滞、抑制肿瘤细胞迁移及侵袭等方面^[9-11]。羽扇豆醇对乳腺癌的抗肿瘤作用机制研究近年来受到广泛关注。曹文富等^[12]研究发现羽扇豆醇能够通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的相关基因表达而抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖。王明等^[13]研究发现羽扇豆醇可通过下调基质金属蛋白酶 (MMP)-2、MMP-9、环氧化酶-2 (COX-2) 及核因子- κB (NF- κB) 相关信号通路的表达进而抑制人乳腺癌 MDAMB-231 细胞的侵袭转移。江兴菊等^[14]研究发现羽扇豆醇能够调控 MAPKs 信号通路相关蛋白的磷酸化明显抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖。上皮细胞-间充质转化 (EMT) 主导着大多数肿瘤细胞侵袭和转移的过程,张昕^[15]研究发现羽

扇豆醇能够下调蛋白激酶 B (Akt) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路相关蛋白的表达,进而通过促进自噬的过程来抑制细胞 EMT 进程,抑制 EMT 的转录因子 Twist1 的表达,从而抑制三阴性乳腺癌的增殖与转移。

细胞凋亡是一种受到高度调控的细胞程序性死亡过程,它在生物体发育、维持组织稳态以及对各类生理和病理刺激作出反应等方面都起着关键作用。近年来,线粒体膜电位与活性氧水平这 2 个因素,因其与细胞凋亡的发生和调控关系密切,已成为细胞生物学的热点领域。线粒体膜电位降低是线粒体功能出现障碍的重要标志,它会促使线粒体释放促凋亡因子,触发细胞凋亡程序^[16-17]。此外,活性氧水平升高会在细胞内营造出氧化损伤环境,破坏线粒体功能,同时激活凋亡信号通路,促使细胞走向凋亡^[18]。在实验中对线粒体膜电位和活性氧水平进行检测具有多方面的重要意义。在科学研究领域,有助于我们更深入地理解细胞凋亡机制,明晰细胞凋亡过程中复杂的原理。在药物和治疗手段方面,通过观察这 2 个指标的变化,可以评估药物或治疗手段是否有效,如判断药物能否调节这 2 个指标来对细胞凋亡产生影响。在疾病方面,对它们进行考察有助于找到疾病诊断和治疗的潜在靶点,进而为开发新的治疗方法提供依据。羽扇豆醇对乳腺癌 MCF-7 细胞具有抑制作用,但由于其中等的抗增殖活性[48 h $\text{IC}_{50} = (62.03 \pm 0.76)$

$\mu\text{mol/L}$]和较差的水溶性 ($5.121 \mu\text{g/mL}$), 限制了其成药性的进一步研究。本研究对羽扇豆醇进行结构修饰, 在其 C-3 位羟基引入亲水性基团, 合成羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐衍生物, 以期提高其溶解性和抗乳腺癌活性, 并对其抗乳腺癌 MCF-7 细胞的作用机制进行探索, 为羽扇豆醇成药性研究提供参考。

1 仪器与试剂

Bruker Advance DRX400 型核磁共振仪 (美国布鲁克公司); Bruker Esquire 6000 型高分辨质谱仪 (美国布鲁克公司); DF-101S 型恒温加热磁力搅拌器 (广州艾卡仪器设备有限公司); EYELAN-1300 型旋转蒸发仪 (上海埃朗科技国际贸易有限公司); D180 二氧化碳培养箱 (深圳市瑞沃德科技有限公司); Varioskan LUX 多功能酶标仪 (上海赛默飞世尔科技有限公司); SOPTOP 激光共聚焦显微镜 CLSM600 (宁波舜宇仪器有限公司); SinoCyte 流式细胞仪 (苏州中生医疗科技有限公司); XINPOWER 电泳仪 (上海勤翔科学仪器有限公司); WB-600Auto 全自动蛋白印迹成像仪 (广州博鹭腾生物科技有限公司)。

实验中所用溶剂和原料均为分析纯。羽扇豆醇 (质量分数 98%, 批号 545-47-1) 购自南京道斯夫生物科技有限公司; 对硝基苯基氯甲酸酯、吡啶、乙腈、碘甲烷均购自安徽泽升 (中国) 科技股份有限公司; 二氯甲烷 (DCM)、石油醚、甲醇、三乙胺 (Et_3N) 购自天津市富宇精细化工有限公司; DMEM 高糖液体培养基 (批号 11965126) 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 胎牛血清 (批号 086-150) 购自维森特生物技术 (南京) 有限公司; MTT 试剂盒 (批号 E606334) 购自广州赛维尔生物科技有限公司; AO/EB 试剂盒 (批号 MX3249-100T) 购自上海懋康生物科技有限公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (批号 40302ES20) 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; JC-1 试剂盒 (批号 T3168) 购自上海赛默飞世尔科技有限公司; 活性氧检测试剂盒 (批号 50101ES01) 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; BCA 试剂盒 (批号 P0010) 购自上海碧云天生物技术有限公司; RIPA 裂解液 (批号 20115E) 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; 4% 多聚甲醛固定液 (批号 MM1505-500ML) 购自上海懋康生物科技有限公司; 结晶紫水溶液 (批号 RS1062) 购自金克隆 (北京) 生物技术有限公司; B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2) 抗体 (批号 14-1028-82)、

Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax 抗体, 批号 MA5-14003)、细胞色素 C (Cyt C) 抗体 (批号 PA5-86022)、磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (批号 PA1-987)、半胱天冬酶 9 (Caspase-9) 多克隆抗体 (批号 PA5-105272)、活化的 Caspase-9 (cleaved caspase-9) 抗体 (批号 PA5-17605)、半胱天冬酶 7 (Caspase-7) 多克隆抗体 (批号 PA5-114688)、活化的 Caspase-7 (cleaved Caspase-7) 抗体 (批号 PA5-105272) 购自上海赛默飞世尔科技有限公司; 山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 ab205718) 购自艾博抗 (上海) 贸易有限公司; ECL 显色试剂盒 (批号 36208ES) 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司。

人乳腺癌细胞系 MCF-7 (批号 CL-0149) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。鼠源乳腺癌细胞株 4T1 (批号 CL-0007) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。雌性 BALB/c 小鼠 18 只, 体质量 $18 \sim 22 \text{ g}$, 购自哈尔滨医科大学实验动物学部, 许可证号 SCXK (黑) 2019-0001。饲养于 SPF 级本校实验动物中心。动物实验内容经齐齐哈尔医学院实验动物伦理委员会授权 (批准号 QMU-AECC-2024-87)。

2 方法与结果

2.1 化合物的合成

以羽扇豆醇为原料, 通过酯化、酰化和成盐反应得到目标化合物, 合成路线见图 1。

2.1.1 化合物 2 的合成 将羽扇豆醇 (**1**, 427 mg , 1 mmol) 溶于 20 mL 干燥二氯甲烷 (DCM) 中, 依次加入吡啶 ($278 \mu\text{L}$, 3 mmol) 和 4-硝基苯基氯甲酸酯 (402 mg , 2 mmol)。反应体系在氮气保护下, 室温搅拌 2 h , TLC 监测反应完全。将反应液用 20 mL 饱和实验水洗 3 次, 收集有机相, 用无水硫酸钠干燥, 滤过, 减压浓缩滤液, 残余物经硅胶柱色谱纯化, 得到化合物 **2** (455 mg , 产率 77%)。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz , CDCl_3) δ : 8.27 (d, $J = 9.2 \text{ Hz}$, 2H), 7.38 (d, $J = 9.1 \text{ Hz}$, 2H), 4.69 (s, 1H), 4.57 (s, 1H), 4.44 (m, 1H), 2.38 (td, $J = 11.0, 5.8 \text{ Hz}$, 1H), 1.94~1.90 (m, 1H), 1.83~1.78 (m, 2H), 1.75 (dd, $J = 13.4, 3.7 \text{ Hz}$, 2H), 1.68 (s, 3H), 1.65 (d, $J = 12.4 \text{ Hz}$, 2H), 1.55~1.52 (m, 1H), 1.48 (m, 1H), 1.41 (t, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 4H), 1.39 (d, $J = 4.7 \text{ Hz}$, 1H), 1.37 (s, 1H), 1.36 (s, 1H), 1.34 (s, 1H), 1.32 (s, 1H), 1.30 (d, $J = 2.8 \text{ Hz}$, 1H), 1.25 (d, $J = 3.6 \text{ Hz}$, 1H), 1.24~1.21 (m, 1H), 1.19 (d, $J = 10.9 \text{ Hz}$, 1H), 1.04 (s, 3H), 1.01 (dt, $J = 6.8, 4.0 \text{ Hz}$, 2H), 0.99 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.79 (s, 3H);

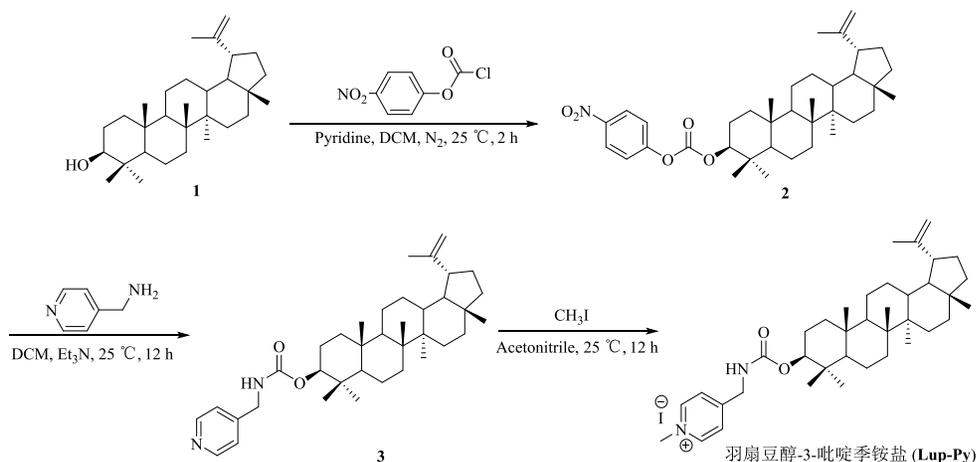


图 1 羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐合成路线

Fig. 1 Synthetic route of lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt

^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 155.9, 152.6, 151.1, 145.4, 125.4, 122.0, 109.5, 87.8, 55.5, 50.5, 48.4, 48.1, 43.1, 43.0, 41.0, 40.1, 38.4, 38.3, 38.1, 37.2, 35.7, 34.3, 30.0, 28.1, 27.6, 25.2, 23.7, 21.1, 19.4, 18.3, 18.1, 16.5, 16.3, 16.1, 14.7; HR-MS m/z : 592.399 8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.1.2 化合物 3 的合成 将化合物 2 (300 mg, 0.5 mmol) 溶于 20 mL 干燥二氯甲烷中, 依次加入 4-甲氨基吡啶 (108 mg, 1 mmol) 和三乙胺 (25 μL , 0.25 mmol)。反应体系在室温下搅拌 12 h, TLC 监测反应完全。将反应液用 20 mL 饱和实验水洗 3 次, 收集二氯甲烷相, 用无水硫酸钠干燥, 滤过, 减压浓缩滤液, 残余物经硅胶柱色谱纯化, 得到白色固体化合物 3 (204 mg, 产率 73%)。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.62 (s, 2H), 7.23 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 5.13 (s, 1H), 4.68 (s, 1H), 4.57 (s, 1H), 4.39 (p, $J = 6.0, 5.5$ Hz, 3H), 2.41~2.34 (m, 1H), 1.94~1.88 (m, 1H), 1.71 (s, 1H), 1.68 (s, 3H), 1.66 (s, 2H), 1.63 (s, 1H), 1.58 (s, 1H), 1.51 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 1.47 (s, 1H), 1.44~1.40 (m, 2H), 1.39 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.38 (s, 2H), 1.33 (d, $J = 9.8$ Hz, 2H), 1.30 (s, 1H), 1.29 (s, 1H), 1.26 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.22 (s, 1H), 1.18 (s, 1H), 1.09~1.06 (m, 1H), 1.03 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 0.78 (s, 3H); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 156.9, 151.0, 149.9, 148.1, 122.3, 109.4, 82.2, 55.4, 50.3, 48.3, 48.0, 43.8, 43.0, 42.8, 40.9, 40.0, 38.4, 38.0, 37.1, 35.6, 34.2, 29.8, 28.0, 27.4, 25.1, 24.1, 22.7, 21.0, 19.3, 18.0, 16.6, 16.2, 16.0, 14.5, 14.1; HR-MS m/z : 561.433 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.1.3 化合物羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐的合成 将

化合物 3 (200 mg, 0.36 mmol) 溶于 10 mL 乙腈中, 加入碘甲烷 (110 mg, 1 mmol)。反应体系在室温下搅拌 17 h, 反应过程中有大量固体沉淀产生, TLC 监测反应完全。滤过, 收集滤渣, 在乙腈中重结晶得到白色固体目标化合物, 即羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐 (179 mg, 产率 71%), 质量分数 98.793%。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.94 (s, 2H), 7.93 (s, 2H), 6.30 (s, 1H), 4.60 (m, 5H), 4.50 (s, 3H), 2.33~2.29 (m, 1H), 1.88~1.82 (m, 2H), 1.61 (s, 3H), 1.59 (s, 2H), 1.41 (d, $J = 13.0$ Hz, 4H), 1.37 (s, 1H), 1.32 (s, 6H), 1.28 (s, 2H), 1.27 (s, 2H), 1.19 (s, 3H), 1.12 (d, $J = 10.8$ Hz, 2H), 0.96 (s, 3H), 0.86 (s, 3H), 0.82 (d, $J = 5.4$ Hz, 6H), 0.78 (s, 3H), 0.72 (s, 3H); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 159.9, 156.2, 150.0, 143.9, 125.4, 108.4, 81.6, 54.4, 49.3, 48.0, 47.3, 47.0, 43.1, 42.0, 41.8, 39.8, 39.0, 37.0, 36.0, 34.5, 33.2, 30.9, 28.7, 28.3, 27.1, 26.4, 24.1, 23.2, 21.7, 19.9, 18.3, 17.0, 15.6, 15.0, 13.5, 13.1; HR-MS m/z : 575.457 7 $[\text{M}-\text{I}]^+$.

2.2 化合物的溶解度测定

采用紫外分光光度法测定羽扇豆醇和羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐的水溶性。化合物羽扇豆醇和羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐的浓度梯度分别为 0.01、0.02、0.05、0.22、0.35、0.40 mg/mL。将羽扇豆醇和羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐分别溶解于 3 mL 蒸馏水中, 并以蒸馏水作为对照。用紫外可见分光光度计在 305 nm 下测量吸光度 (A)。结果如图 2 显示, 羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐的溶解度为 $(0.306\ 527 \pm 0.016)$ mg/mL, 较羽扇豆醇的溶解度提高了近 59 倍 ($P < 0.001$), 说明羽扇豆醇成盐衍生物羽扇豆醇-3-吡啶

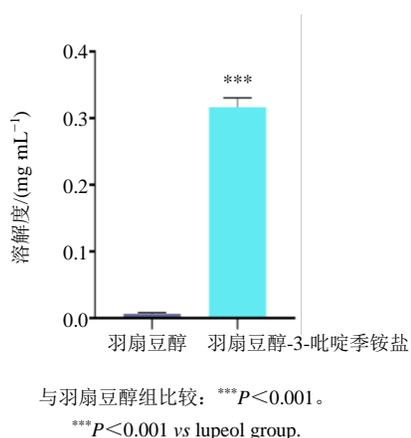


图 2 羽扇豆醇与羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐溶解度测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Determination of the solubility of lupeol and lupeol-3-pyridinium salt ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

季铵盐可大幅度提高水溶性。

2.3 目标化合物对人乳腺癌 MCF-7 作用研究

2.3.1 数据分析 使用 IBM SPSS Statistics 27 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 再采用 LSD-t 检验进行两两比较。各组数值均应用 Image J 和 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计学分析并绘图, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2.3.2 目标化合物对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响 使用 DMEM 培养基 (含 10% FBS 及 1% 青霉

素-链霉素双抗) 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境下对乳腺癌 MCF-7 细胞进行培养。取对数期的乳腺癌 MCF-7 细胞以每孔 3×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁, 吸弃培养基后给药。实验分为对照组、羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐 (1.25、2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 组。96 孔板中每孔使用 150 μL 含药培养基分别培养 24、48、72 h, 对照组中加入与所加含药培养基等量 150 μL 的 DMEM 培养基, 培养时间同上。各时间点培养完成后向 96 孔板每孔加入 20 μL MTT 溶液混匀, 孵育 4 h, 弃去培养液, 每孔加入 150 μL DMSO, 充分振荡, 各孔的 A 值使用酶标仪在 490 nm 波长条件下进行检测。增殖抑制率 = $1 - A_{\text{给药组}} / A_{\text{对照组}}$ 。用 IBM SPSS Statistics 27 软件计算羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐作用于 MCF-7 细胞半数抑制浓度。羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对乳腺癌 MCF-7 细胞 24、48、72 h 的半数抑制率见图 3。结果表明, 羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对 MCF-7 细胞具有明显的细胞毒性作用 ($P < 0.01$ 、0.001), 且呈浓度与时间相关性。羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐在 24、48、72 h 的半数抑制浓度分别为 (23.21 ± 0.37)、(12.72 ± 0.24)、(9.30 ± 0.14) $\mu\text{mol/L}$ 。为更贴近药物半数抑制浓度, 同时减少误差, 保证良好的可重复性和稳定性, 故将后续实验羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐给药浓度设置为 7、14、28 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.3.3 羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对 MCF-7 细胞凋亡

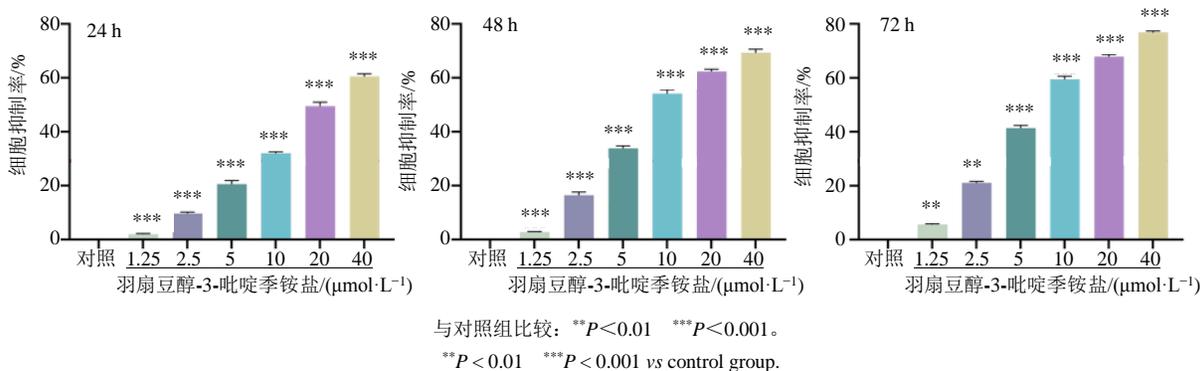


图 3 羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Inhibitory rate of lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt on the proliferation of breast cancer MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

的影响 在 6 孔板中以每孔 1×10^5 个细胞的浓度接种 MCF-7 细胞, 培养至细胞完全贴壁, 将实验分为对照组、羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐 (7、14、28 $\mu\text{mol/L}$) 组。培养 48 h 后, 消化收集细胞, 使用 PBS 重悬细胞洗涤 2 次, 使用 Annexin V-FITC/PI 细胞

凋亡检测试剂盒对细胞进行染色, 于室温下避光孵育 15 min, 用流式细胞仪定量检测, 结果使用 Flow Jo 10.8.1 软件进行处理和分析。流式细胞术结果如图 4 所示, 与对照组比较, 随着羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐给药浓度升高, MCF-7 细胞的凋亡率明显升

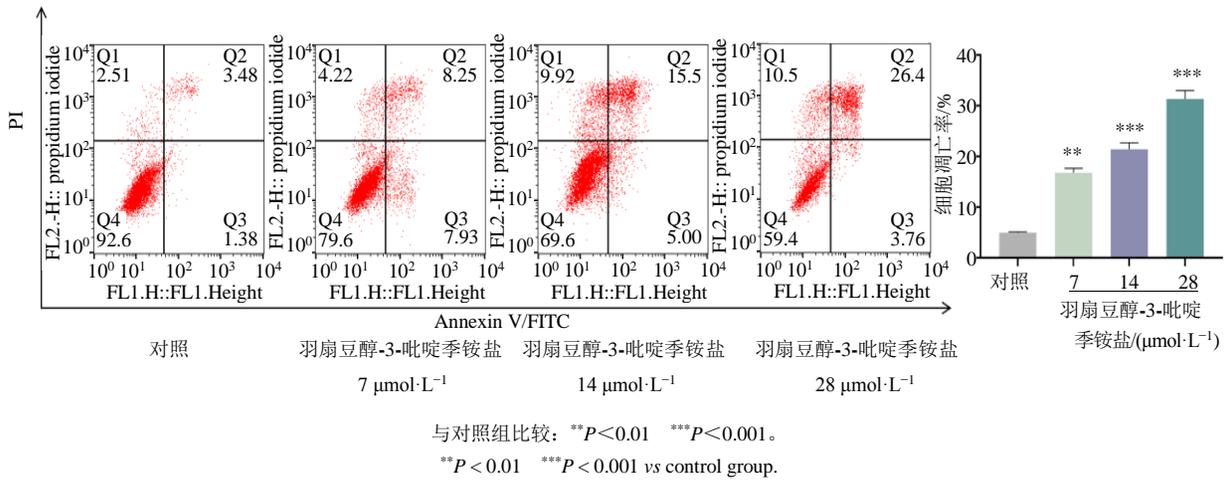


图 4 流式细胞术测定不同浓度羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐作用下 MCF-7 细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Flow cytometry determination of apoptosis rate of MCF-7 cells in response to different concentrations of lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

高 ($P < 0.01, 0.001$)。

2.3.4 AO/EB 染色观察细胞凋亡 按照 2.3.2 项下的方法, 进行细胞培养和分组给药。培养 48 h, PBS 重悬洗涤, 分别加入 5 μL AO、EB 染色液进行染色, 室温避光孵育 5 min, 在激光共聚焦显微镜下对各组细胞的凋亡形态观察并拍照。AO/EB 染色激光共聚焦显微镜镜下观察结果如图 5 所示, 对照组 MCF-7 细胞结构正常, 细胞核染色均一, 呈绿色; 随给药浓度升高, 凋亡细胞逐渐增多, 且细胞皱缩, 呈橙红色。

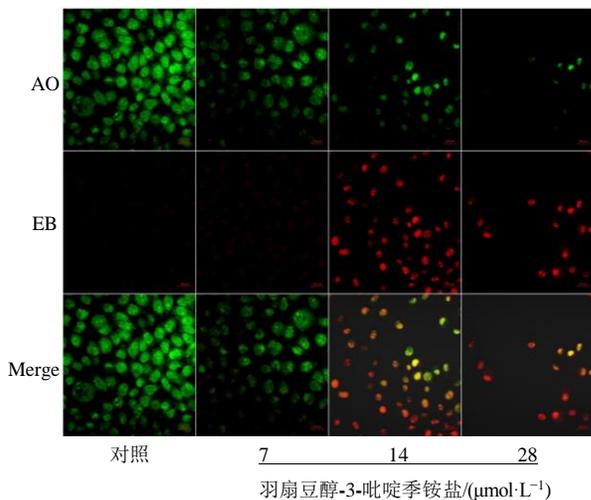


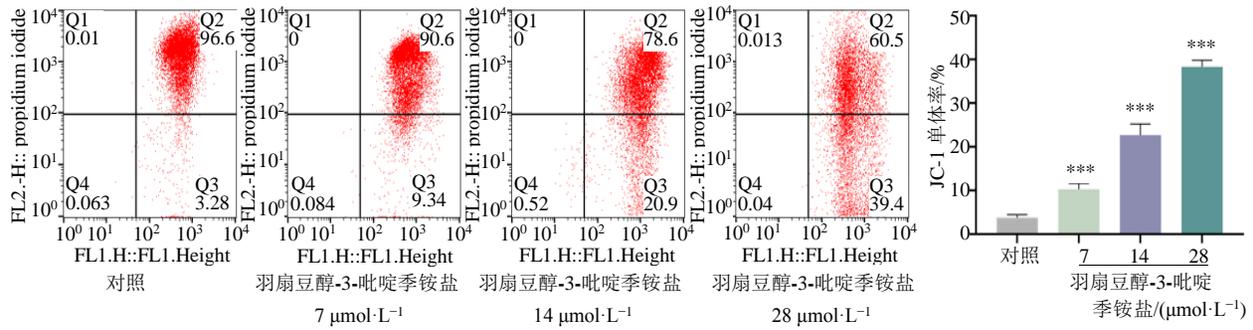
图 5 镜下观察羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对 MCF-7 细胞凋亡的影响 (免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 5 Effect of lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt on apoptosis of MCF-7 cells observed under microscope (immunofluorescence, $\times 400$)

2.3.5 羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对 MCF-7 细胞线粒

体膜电位的影响 按照 2.3.2 项下方法, 进行细胞培养和分组给药。培养 48 h 后, PBS 重悬洗涤 2 次, 加入 500 μL JC-1 工作液进行染色, 37 °C 孵育 20 min, 弃上清液; 用 JC-1 缓冲液 (1×) 重悬洗涤 2 次将残留的染色剂洗净, 加入适量 JC-1 缓冲液 (1×) 重悬后, 在激光共聚焦显微镜下观察拍照 ($\times 400$) 或收集细胞后用流式细胞仪定量检测, Flow Jo 10.8.1 软件处理流式检测数据。流式细胞术检测结果显示, 随着羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐浓度升高, MCF-7 细胞线粒体膜电位水平均明显下降 ($P < 0.001$), 见图 6。通过激光共聚焦显微镜观察 (图 7), 对照组 MCF-7 细胞均为红色; 随着羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐浓度的增加, 绿色细胞逐渐增多, 红色细胞逐渐减少, 提示 MCF-7 细胞线粒体膜电位水平随给药浓度升高逐渐下降。

2.3.6 羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对 MCF-7 细胞活性氧水平的影响 按照 2.3.2 项下方法, 进行细胞培养和给药分组实验。培养 48 h 后, 每孔加入 500 μL DCFH-DA 染液进行染色, 37 °C 避光孵育 20 min。无血清培养基重悬洗涤 3 次, 洗净多余的染液。在激光共聚焦显微镜下观察拍照 ($\times 400$) 或收集细胞后用流式细胞仪定量检测, Flow Jo 10.8.1 软件处理流式检测数据。流式细胞术检测结果显示, 与对照组比较, MCF-7 细胞内的活性氧水平随羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐浓度升高明显上升 ($P < 0.01, 0.001$), 呈浓度相关性, 见图 8。激光共聚焦显微镜镜下观察结果表明, 与对照组相比, 羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐组绿色荧光逐渐增强, 见图 9。



与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group.

图 6 流式细胞术测定羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对 MCF-7 细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Flow cytometry measurement of mitochondrial membrane potential in MCF-7 cells treated with lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

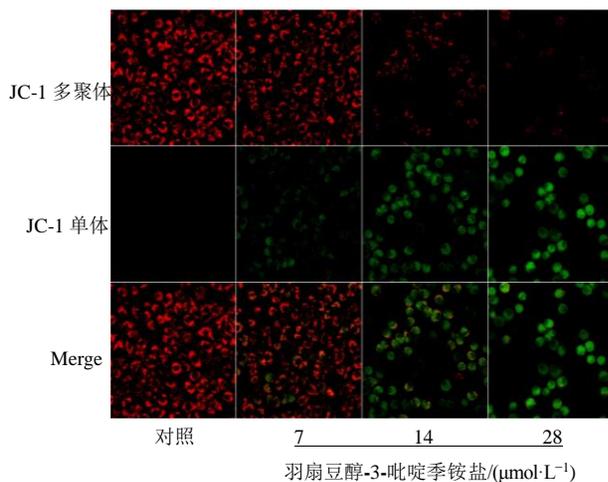
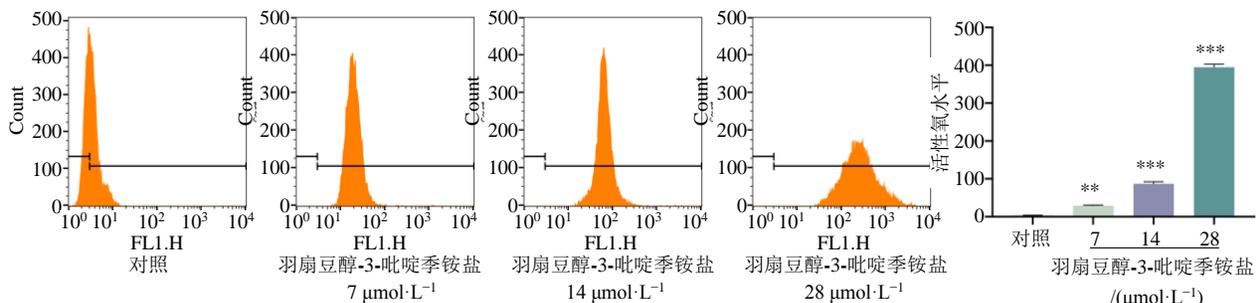


图 7 镜下观察羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对 MCF-7 细胞线粒体膜电位的影响 (免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 7 Effects of lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt on the mitochondrial membrane potential of MCF-7 cells observed under microscopy (immunofluorescence, $\times 400$)

2.3.7 羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对 MCF-7 细胞线粒体凋亡相关蛋白表达水平的影响 按照 2.3.2 项下方法, 进行细胞培养和分组给药。用 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法进行蛋白定量及变性处理。将蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 加入一抗 (1 : 1000) 进行孵育, 放入 4 °C 冰箱孵育过夜。洗膜, 孵育二抗 (1 : 2000) 1.5 h, 洗膜。ECL 发光试剂盒显影, 凝胶成像分析仪成像, Image J 软件进行分析。使用 Western blotting 检查在乳腺癌 MCF-7 细胞中 Bcl-2、Bax、Cyt C、Caspase-9、cleaved Caspase-9、Caspase-7、cleaved Caspase-7 的表达。如图 10 所示, 经不同浓度羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐处理 48 h 后, MCF-7 细胞中 Bax、Cyt C、cleaved Caspase-9 和 cleaved Caspase-7 蛋白表达呈现上调的趋势, Bcl-2 蛋白表达呈现下调的趋势 ($P < 0.01, 0.001$)。



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 8 流式细胞术测定羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对 MCF-7 细胞内活性氧水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Flow cytometry measurement of ROS levels in MCF-7 cells treated with lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

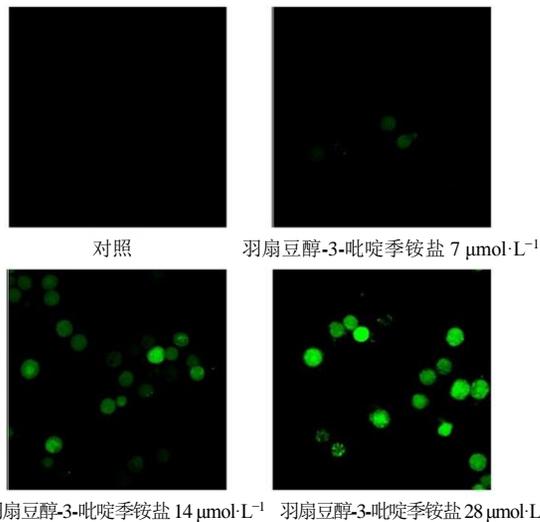
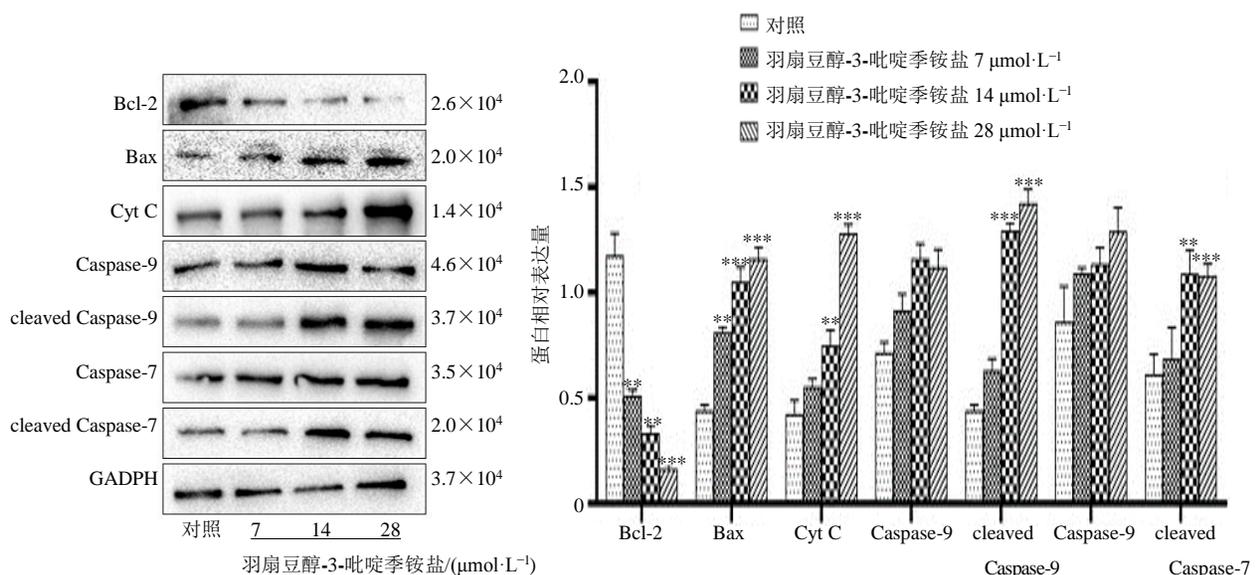


图 9 镜下观察羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对 MCF-7 细胞内活性氧水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Microscopic observation of effect of lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt on ROS level of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 10 羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对 MCF-7 细胞线粒体凋亡通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt on the expression of proteins involved in the mitochondrial apoptotic pathway in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

瘤, 称重并拍照。肿瘤组织投入到 4% 多聚甲醛通用型组织固定液中固定。

为进一步验证羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐抗乳腺癌肿瘤的增殖抑制作用, 通过设计体内实验考察羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐抑制 4T1 荷瘤小鼠肿瘤生长

2.3.8 羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐在体内对乳腺癌增殖作用的影响 BALB/c 雌性小白鼠在恒温 (21~23 $^{\circ}\text{C}$)、恒湿 (45%~65%) 环境, 使用全价颗粒饲料喂养, 自由进食、饮水, 适应环境 7 d。使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基对小鼠乳腺癌细胞 4T1, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养。取贴壁生长对数期细胞, 经胰酶消化, PBS 重悬洗涤, 加入 PBS 将细胞浓度调整为 3×10^7 个/mL 重悬进行造模。于小鼠右肢腋下 1 cm 处皮下注射 4T1 细胞 100 μL (3×10^6 个细胞), 48 h 后观察接种部位若有 2 mm \times 2 mm 粉红色小突起, 即表明 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠造模成功。将小鼠随机分为肿瘤对照组 (生理盐水)、羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐 (20、40 mg/kg) 组。肿瘤大小生长至 10 mm^3 时对小鼠进行称重并使用游标卡尺对肿瘤长径 (a) 与短径 (b) 进行测量, 开始给药, 每 24 小时用 1 mL 注射器进行 ip。对其肿瘤大小以及体质量每天进行记录, 持续给药 10 d。给药结束采用颈椎脱位法将小鼠处死, 剥离皮下肿

的作用。在接种肿瘤 10 d 后, 结果如图 11 所示, 与对照组相比, 随着给药时间的增长, 羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐组小鼠肿瘤体积呈降低趋势。同时, 羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐组小鼠的体质量无明显下降 (图 12)。

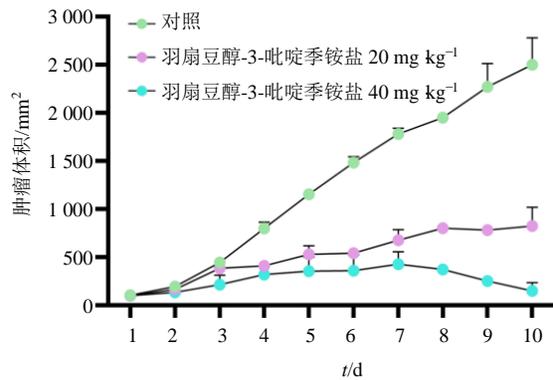
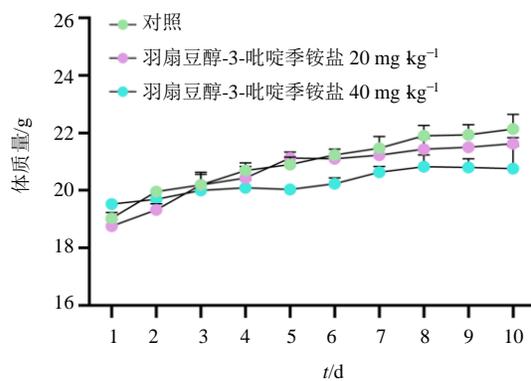
图 11 各组小鼠肿瘤体积大小变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 11 Changes of tumor size in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

图 12 各组小鼠体质量变化

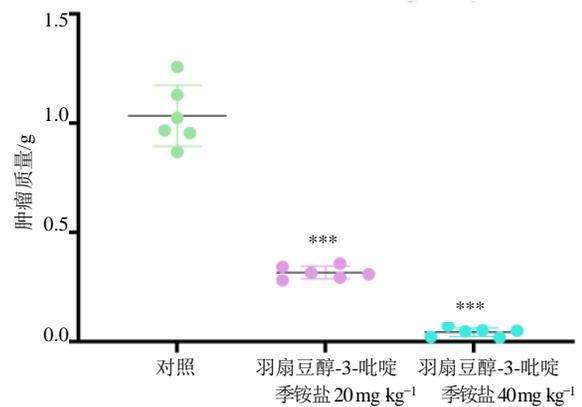
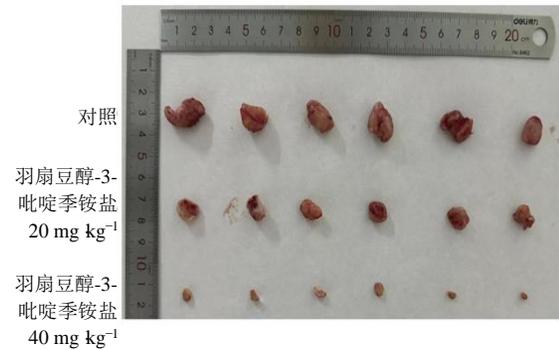
Fig. 12 Changes of body mass in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

实验结束后处死小鼠并剥离肿瘤组织称重, 如图 13 所示, 对照组、羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐 20、40 mg/kg 组的瘤质量分别为 (1.03 ± 0.19) 、 (0.42 ± 0.04) 、 (0.03 ± 0.01) g。与对照组相比, 羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐 20、40 mg/kg 组瘤质量分别减少 69.36%、95.77% ($P < 0.001$)。

3 讨论

乳腺癌作为严重危害女性身体健康的恶性肿瘤之一, 随着经济水平的提高, 人们生活方式的改变, 乳腺癌的发病率逐年升高^[19-20]。如今手术、化疗等治疗手段已有长足的进步, 但治疗的预后仍有许多缺陷^[21-22], 因此, 创新治疗药物及治疗手段具有重要的临床意义。在本研究中, 通过对天然抗肿瘤药物羽扇豆醇进行结构修饰, 合成羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐, 与羽扇豆醇相比极大提高了其溶解性, 改善了药物的成药性。本研究还将继续探索羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐体内外抗肿瘤机制。

实验中使用羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐 (0、1.25、



与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group.

图 13 羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对乳腺癌肿瘤质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 13 Effect of lupeol-3-pyridine quaternary ammonium salt on tumor quality of breast cancer ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 处理乳腺癌 MCF-7 细胞 24、48、72 h, 评价其随时间浓度变化对乳腺癌 MCF-7 细胞抑制率的影响, 结果提示羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对 MCF-7 细胞有显著的抑制作用, 并通过流式细胞术验证其能够诱导 MCF-7 细胞凋亡, 说明羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐能更加有效的抑制乳腺癌的发展。

通过流式细胞仪检测和荧光显微镜观察表明, 随着羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐浓度的增加, MCF-7 细胞线粒体膜电位水平显著降低, 提示羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐能够引起 MCF-7 细胞线粒体膜去极化。在细胞凋亡中, 线粒体膜电位去极化是线粒体功能丧失和细胞死亡的关键过程, 当线粒体膜电位降低时, 可导致线粒体功能障碍, 同时释放凋亡因子, 激活相关蛋白的表达, 从而触发细胞凋亡的级联反应, 最终诱导细胞凋亡。

活性氧是细胞内信号传导通路的重要信号分子^[23],但细胞内过多的 ROS 积累会导致细胞损伤,进而诱发细胞凋亡,故 ROS 积累也具有一定的抗癌效应^[24-25]。有研究表明,ROS 积累引起的氧化胁迫还与线粒体膜电位水平的降低有关^[26]。本研究结果显示,MCF-7 细胞内 ROS 积累增加,线粒体膜电位水平降低,提示细胞内 ROS 的积累也可能是羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐抑制 MCF-7 细胞增殖和诱导其凋亡的另一重要因素。

线粒体诱导凋亡是抗癌机制研究的热点之一。研究表明,多种信号通路中各相关蛋白的相互作用能够调控凋亡发生的过程^[27],Bcl-2 蛋白作为抑制细胞凋亡的重要基因,它与 Bax、Cyt C、Casepase-9 以及 Casepase-7 等蛋白相互协同,影响细胞生存状态,使其线粒体膜电位产生变化并能够引起线粒体凋亡^[28],而 Bax/Bcl-2 决定了其诱导线粒体功能障碍的能力,使线粒体膜电位下降,增加膜通透性,从而释放凋亡相关因子,进而促使 Caspase-9、Caspase-7 活化,最终诱导细胞凋亡^[29-30]。本研究结果显示羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对 MCF-7 细胞处理后,Bax、cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-7 蛋白表达水平上调,Bcl-2 蛋白表达水平下调,提示羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐可能通过介导线粒体相关途径影响 MCF-7 细胞的凋亡。实验结果表明,羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐可能通过线粒体凋亡途径诱导 MCF-7 细胞凋亡。

本研究通过体外实验验证了羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对乳腺癌有良好的治疗作用,为了进一步验证羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐在体内对乳腺癌的治疗效果,建立了 4T1 小鼠乳腺癌模型,结果提示,成盐后的羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对乳腺癌有显著的体内抑制瘤作用。

综上所述,在体外实验中,验证了羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐对乳腺癌 MCF-7 有明显的抗增殖作用,其可能通过介导线粒体途径抑制乳腺癌细胞的增殖并诱导其凋亡。乳腺癌移植瘤小鼠的抑瘤实验表明,羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐能够明显抑制乳腺癌 4T1 移植瘤小鼠的肿瘤生长,且不良反应更小,有更高的安全性。本研究中通过成盐改进水溶性的方式开发新型羽扇豆醇类抗肿瘤药物提供思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 张彦收,刘运江. 乳腺癌手术治疗回顾和进展 [J]. 现

代肿瘤医学,2015,23(5): 719-723.

- [2] Sung H, Ferlay J, Siegal 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.
- [3] 王英哲,殷咏梅,江泽飞. 2023 年 CSCO《乳腺癌诊疗指南》更新要点解读 [J]. *中国肿瘤外科杂志*, 2023, 15(3): 209-213.
- [4] 王青伟,丁荣晶. 阿霉素诱导心脏毒性的发病机制与防治 [J]. *自然杂志*, 2022, 44(2): 103-108.
- [5] Suero-Abreu G A, Ganatra S, Neilan T G. Cardiotoxicity monitoring in patients with cancer: Focus on safety and clinical relevance [J]. *JCO Oncol Pract*, 2021, 17(5): 237-239.
- [6] Naeem A, Hu P Y, Yang M, *et al.* Natural products as anticancer agents: Current status and future perspectives [J]. *Molecules*, 2022, 27(23): 8367.
- [7] 乔文姝,赵海田,姚磊. 羽扇豆烷型五环三萜生物活性研究进展 [J]. *食品科学*, 2020, 41(13): 235-241.
- [8] Liu K, Zhang X M, Xie L, *et al.* Lupeol and its derivatives as anticancer and anti-inflammatory agents: Molecular mechanisms and therapeutic efficacy [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 164: 105373.
- [9] 蒋亦雯,洪丹,楼哲丰,等. 羽扇豆醇通过抑制 RhoA-ROCK1 信号通路抑制结肠癌细胞增殖 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42(2): 186-194.
- [10] Jiang X J, Pan N S, Tian X Y, *et al.* Study on the inhibitory effects of lupeol on the proliferation of human breast cancer MCF-7 cells by MAPKs signaling pathway [J]. *China Pharm*, 2019, 30(14): 1925-1930.
- [11] 赵芳,宋玉霞,周莎莎,等. 羽扇豆醇通过上调 FOXO1 表达促进上皮性卵巢癌细胞凋亡的机制研究 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2023, 31(3): 565-570.
- [12] 曹文富,潘年松,李颖. 羽扇豆醇抑制乳腺癌 MCF-7 增殖迁移和侵袭及机制研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(10): 156-159.
- [13] 王明,崔红霞,孙超,等. 羽扇豆醇对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞侵袭转移作用及机制研究 [J]. *药学学报*, 2016, 51(4): 558-562.
- [14] 江兴菊,潘年松,田晓云,等. 羽扇豆醇通过 MAPKs 信号通路对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的抑制作用研究 [J]. *中国药房*, 2019, 30(14): 1925-1930.
- [15] 张昕. 羽扇豆醇通过促进自噬抑制三阴性乳腺癌的作用机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2023.
- [16] Xu J Y, Su L Y, Han J Y, *et al.* Rapid and quantitative *in vitro* analysis of mitochondrial fusion and its interplay with apoptosis [J]. *Talanta*, 2021, 222: 121523.
- [17] Tait S W, Green D R. Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond [J]. *Nat Rev Mol*

- Cell Biol*, 2010, 11(9): 621-632.
- [18] Deng YQ, Gao M, Lu D, *et al.* Compound-composed Chinese medicine of Huachansu triggers apoptosis of gastric cancer cells through increase of reactive oxygen species levels and suppression of proteasome activities [J]. *Phytomedicine*, 2024, 123: 155169.
- [19] 曹毛毛, 陈万青. GLOBOCAN 2020 全球癌症统计数据解读 [J]. 中国医学前沿杂志: 电子版, 2021, 13(3): 63-69.
- [20] 徐子晨, 范子祥, 王文倩, 等. 人参皂昔抗乳腺癌分子机制的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(20): 6601-6610.
- [21] Park M, Kim D, Ko S, *et al.* Breast cancer metastasis: Mechanisms and therapeutic implications [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(12): 6806.
- [22] Sun L, Zuo CL, Ma B, *et al.* Intratumoral injection of two dosage forms of paclitaxel nanoparticles combined with photothermal therapy for breast cancer [EB/OL]. *Chin Herb Med*, 2024. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1674638424000637>.
- [23] Hasanuzzaman M, Parvin K, Bardhan K, *et al.* Biostimulants for the regulation of reactive oxygen species metabolism in plants under abiotic stress [J]. *Cells*, 2021, 10(10): 2537.
- [24] Yang P, Yu D, Zhou Y, *et al.* TGM2 interference regulates the angiogenesis and apoptosis of colorectal cancer via Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(10): 1122-1134.
- [25] 汪紫薇, 陈坤英, 张珂, 等. 茶树菇多糖通过 ROS-线粒体功能障碍通路诱导结直肠癌细胞凋亡 [J]. 南昌大学学报: 理科版, 2023, 47(4): 352-360.
- [26] 马雪连. CircEZH2 靶向 miR-22 抑制 TGEV 诱导的线粒体损伤作用与机制研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [27] 谢崑. 红景天苷诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡机理研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2016.
- [28] Kale J, Osterlund E J, Andrews D W. BCL-2 family proteins: Changing partners in the dance towards death [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(1): 65-80.
- [29] Kumar M, Sandhir R. Hydrogen sulfide attenuates hyperhomocysteinemia-induced mitochondrial dysfunctions in brain [J]. *Mitochondrion*, 2020, 50: 158-169.
- [30] 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.

[责任编辑 高源]