

过氧麦角甾醇荧光衍生物 EP-Cy5 抗 MCF-7 细胞的作用机制

林 强¹, 罗 然², 赵音旭¹, 王 璐¹, 邹 宇¹, 陈宗兴¹, 田 爽¹, 卜 明¹, 林 宇^{1*}

1. 齐齐哈尔医学院 药学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

2. 南方医科大学 药学院, 广东 广州 510515

摘 要: **目的** 合成了具有荧光定位可视化功能的新型过氧麦角甾醇衍生物[过氧麦角甾醇-花菁染料 Cy5 (EP-Cy5)], 揭示其对乳腺癌 MCF-7 细胞的作用机制。**方法** 通过酯化反应将 EP 与花菁染料 Cy5 通过酯化反应得到 EP-Cy5。采用 MTT 法检测不同浓度 EP-Cy5 处理 MCF-7 细胞 24、48、72 h 后的增殖抑制效果。利用激光共聚焦显微镜考察细胞摄取及共定位: 以红色荧光标记的 EP-Cy5 染色细胞, 同时分别用绿色荧光标记细胞核、脂滴、高尔基体、溶酶体、内质网和线粒体等细胞器进行共染色分析; 使用斑马鱼模型评估 EP-Cy5 的活体成像性能。为深入探究 EP-Cy5 抑制 MCF-7 细胞的具体机制, 采用流式细胞术检测 EP-Cy5 对 MCF-7 细胞的凋亡率、活性氧 (ROS) 水平和线粒体膜电位变化 (JC-1) 的影响; 通过 Western blotting 法检测 EP-Cy5 对线粒体凋亡相关蛋白的表达。**结果** EP-Cy5 对 MCF-7 细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 4.48 μmol/L, 是母体药物 EP (IC₅₀=19.02 μmol/L) 的 4.25 倍。EP-Cy5 的荧光强度呈时间-浓度相关性增长; 与线粒体荧光探针高度共定位; 细胞总凋亡率、ROS 水平显著升高, 线粒体膜电位显著下降 ($P<0.01$ 、 0.001); Western blotting 结果表明, B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2) 蛋白表达显著下降, 而 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、细胞色素 C (Cyt-C)、剪切型半胱天冬酶-9 (cleaved Caspase-9) 及剪切型半胱天冬酶-7 (cleaved Caspase-7) 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001)。**结论** 化合物 EP-Cy5 主要富集于乳腺癌 MCF-7 细胞线粒体, 可升高 ROS 水平并显著降低线粒体膜电位, 调节凋亡相关蛋白的表达。

关键词: 过氧麦角甾醇; 花菁染料 Cy5; 乳腺癌; 线粒体; B 淋巴细胞瘤-2 基因; Bcl-2 相关 X 蛋白; 细胞色素 C; 剪切型半胱天冬酶-9

中图分类号: R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2026)07-1928-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.07.009

Mechanism of action of ergosterol peroxide fluorescent derivative EP-Cy5 against MCF-7 cells

LIN Qiang¹, LUO Ran², ZHAO Yinxu¹, WANG Lu¹, ZOU Yu¹, CHEN Zongxing¹, TIAN Shuang¹, BU Ming¹, LIN Yu¹

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

2. College of Pharmacy, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective This study designed and synthesized a novel ergosterol peroxide derivative EP-Cy5 with fluorescence localization and visualization function, aiming to reveal its mechanism of action on breast cancer MCF-7 cells. **Methods** EP-Cy5 was obtained by conjugating EP with the cyanine dye Cy5 via an esterification reaction. The MTT assay was used to evaluate the antiproliferative effects of various concentrations of EP-Cy5 on MCF-7 cells after 24, 48, and 72 hours of treatment. Cellular uptake and co-localization were examined using confocal laser scanning microscopy: cells were stained with red fluorescent EP-Cy5, while simultaneously co-stained with green fluorescent probes targeting the nucleus, lipid droplets, Golgi apparatus, lysosomes, endoplasmic reticulum, and mitochondria. In vivo imaging performance of EP-Cy5 was assessed using a zebrafish model. To deeply explore the specific mechanism by which EP-Cy5 inhibits MCF-7 cells, flow cytometry was used to detect the effects of EP-Cy5 on the apoptosis rate, ROS level and mitochondrial membrane potential change (JC-1) of MCF-7 cells. The expression of mitochondrial apoptosis-related proteins was detected by Western blotting. **Results** The antiproliferative activity (IC₅₀) of EP-Cy5 against MCF-7 cells was

收稿日期: 2026-04-25

基金项目: 齐齐哈尔市科学技术局联合引导项目 (LSFGG-2024111)

作者简介: 林 强, 硕士研究生。E-mail: 19060528721@163.com

*通信作者: 林 宇, 博士, 教授, 主要从事药物抗肿瘤作用研究。E-mail: linyu7373@163.com

4.48 $\mu\text{mol/L}$, which was 4.25 times that of the parent drug EP ($\text{IC}_{50} = 19.02 \mu\text{mol/L}$). The fluorescence intensity of EP-Cy5 increased in a time-concentration dependent manner. Highly co-localized with mitochondrial fluorescent probes, the total apoptosis rate of cells and ROS were increased ($P < 0.01, 0.001$), and the mitochondrial membrane potential decreased significantly. Western blotting indicated that the expression of the Bcl-2 were decreased, the protein expressions of Bax, Cyt-c, cleaved Caspase-9, and cleaved Caspase-7 were increased ($P < 0.01, 0.001$). **Conclusion** *In vitro* experiments showed that compound EP-Cy5 mainly accumulated in the mitochondria of breast cancer MCF-7 cells. It could increase the level of ROS and significantly reduce the mitochondrial membrane potential, and regulate the expression of apoptosis-related proteins.

Key words: ergosterol peroxide; cyanine dye Cy5; breast cancer; mitochondria; Bcl-2; Bax; Cyt-c; cleaved Caspase-9

乳腺癌已成为全球女性发病率最高的恶性肿瘤^[1]。近年来,放疗与化疗技术在乳腺癌综合治疗中不断发展、疗效显著提升,但多数临床治疗药物普遍存在毒副作用大、肿瘤耐药性突出等问题,严重限制了长期治疗效果与患者生活质量^[2-4]。因此,开发高效低毒、靶向性强的新型抗乳腺癌药物,已成为肿瘤领域的研究热点与迫切需求。中药富含多种结构新颖的天然活性成分,是筛选与发掘抗乳腺癌先导化合物及候选药物的优质资源,为乳腺癌靶向新药研发提供了广阔的研究前景^[5-7]。

过氧麦角甾醇(EP)是一种天然内过氧化甾体化合物,广泛分布于真菌、海绵及藻类中^[8-10]。EP具有抗肿瘤、抗菌、抗炎等多种生物活性,近年来研究尤其关注其对癌症的抑制作用。罗然等^[11]报道通过网络药理学获取磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)通路介导线粒体凋亡途径靶点抑制 MCF-7 乳腺癌细胞。林强等^[12]通过蛋白组学获取 PI3K/Akt、转化生长因子- β (TGF- β)信号通路和介导线粒体凋亡途径抑制 MCF-7 乳腺癌细胞。近年来,以 EP 为先导化合物进行结构修饰的研究也不断推进,已发现多个具有抗乳腺癌潜力的新结构衍生物^[13-14]。

线粒体途径是内源性凋亡的核心通路,其激活与调控过程受 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)蛋白家族的

严格调控。其中促凋亡蛋白以 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)为代表,抗凋亡蛋白以 Bcl-2 为典型,二者的表达平衡直接决定线粒体外膜通透性(MOMP)的高低^[15]。当 MOMP 异常升高时,如半胱天冬酶-9(Caspase-9)被激活后,会进一步激活 Caspase-3,最终启动细胞凋亡程序^[16]。此外,线粒体也是细胞内活性氧(ROS)的主要产生部位,过量蓄积的 ROS 可直接损伤线粒体的脂质、蛋白质及核酸等成分,进一步加剧肿瘤细胞凋亡^[15, 17]。另外,肿瘤细胞线粒体膜电位显著高于正常体细胞,这一独特生物学异常为药物靶向递送提供了重要靶点,基于该特征设计靶向肿瘤细胞线粒体的新型乳腺癌治疗策略,提高治疗的特异性与有效性。

在研究中,通过将过氧麦角甾醇与花菁染料 Cy5(EP-Cy5)偶联,合成了一种新型的过氧麦角甾醇荧光衍生物(图 1)。在保留过氧麦角甾醇固有的抗肿瘤活性的同时,荧光团的引入赋予了分子在活细胞环境中的光学可追踪性。为了系统地评价这种荧光过氧麦角甾醇衍生物的细胞内行为及其在肿瘤细胞中的潜在应用价值,本研究为过氧麦角甾醇的亚细胞定位提供了一种新的可视化策略,并为其潜在抗肿瘤机制提供了新见解。利用荧光成像技术,能够更直观、更精确地观测过氧麦角甾醇在细胞内的分布,从而深化对其生物学功能的理解。

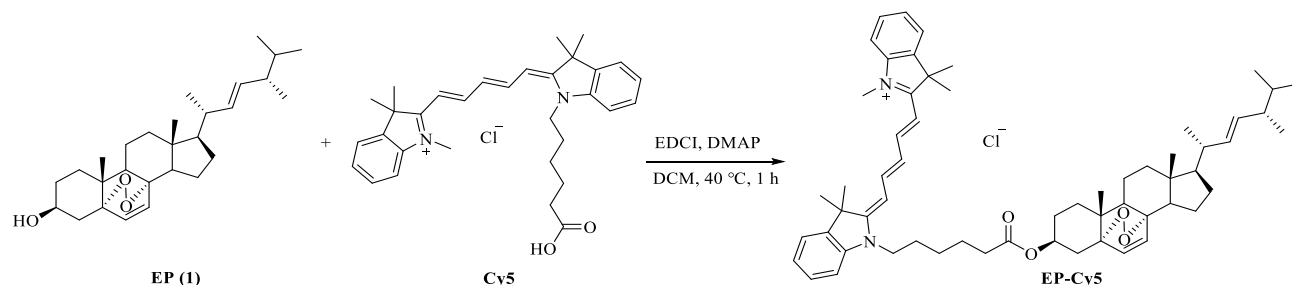


图 1 EP-Cy5 的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of EP-Cy5

1 材料

1.1 细胞

人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞(批号 SCSP-503)购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药品与试剂

EP 由齐齐哈尔医学院药学院药物化学研究室提供, 质量分数 >98%; 花菁染料 Cy5 (批号 C951310)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP, 批号 B04006194)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDCI, 批号 A01079249) 购自安徽泽升科技股份有限公司。高糖 DMEM 培养基 (批号 OMDCM-004)、胎牛血清 (批号 OMD-72503) 购自欧玛仕(上海)生物科技有限公司; MTT 试剂盒 (批号 M1020-500T) 购自北京索莱宝科技有限公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (批号 40302ES60) 购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司; JC-1 试剂盒 (批号 E-CK-A301) 购自武汉伊莱瑞特科技股份有限公司; ROS 检测试剂盒 (批号 J21799) 购自武汉吉立德科技有限公司; BCA 试剂盒 (批号 A55860)、RIPA 裂解液 (批号 89900)、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)、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) 均购自上海赛默飞世尔科技有限公司; Bcl-2 抗体 (批号 FNaB00839) 购自武汉菲恩生物科技股份有限公司; Bax 抗体 (批号 ab32503) 购自 Abcam plc; Cyt-c 抗体 (批号 ab133504) 购自 Abcam plc; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (批号 G6019-100UN) 购自德国默克密理博公司; 山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 LF102) 购自上海雅酶生物医药科技有限公司; 超敏 ECL 显色试剂盒 (批号 P10300) 购自苏州新赛美生物科技有限公司。脂滴绿色荧光检测试剂盒 (批号 C2053S)、高尔基体绿色荧光探针 (批号 C1045S)、内质网绿色荧光探针 (批号 C1042S)、溶酶体绿色荧光探针 (批号 C1047S)、线粒体绿色荧光探针 (批号 C1048) 购自碧云天生物技术有限公司。

1.3 仪器

DF-101S 型恒温磁力加热搅拌器 (艾卡广州仪器设备有限公司)、EYELA N-1300 型旋转蒸发仪 (埃朗科技国际贸易上海有限公司)、DRX400 型核磁共振仪 (美国布鲁克公司)、Bruker Esquire 6000

型质谱仪 (布美国鲁克公司)。Heracell™ VIOS 160i CR CO₂ 培养箱 (赛默飞世尔科技公司); Multiskan™ FC 酶标仪 (赛默飞世尔科技公司); FACSCalibur 型流式细胞仪 (美国 BD 公司); PowerPac 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 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); LSM710 型激光扫描共聚焦显微镜 (德国 Zeiss 公司)。

2 方法

2.1 EP-Cy5 的合成与性质评估

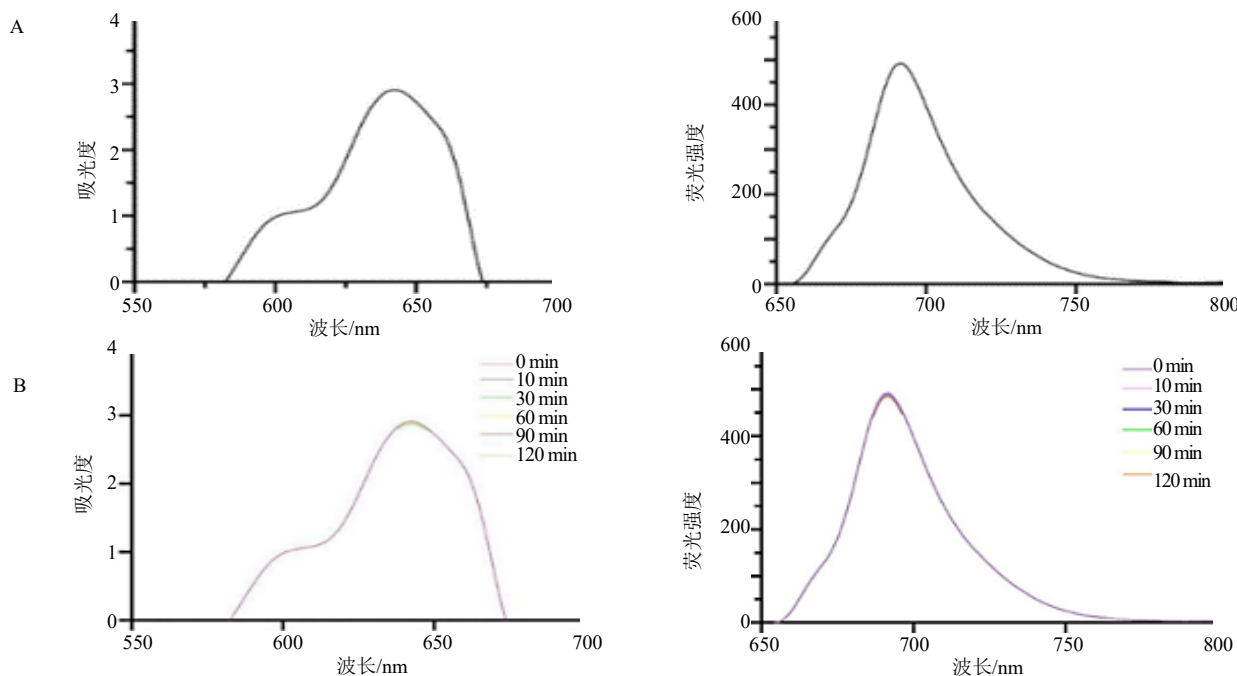
2.1.1 化合物 EP-Cy5 的合成 称取 Cy5 探针 (26 mg, 0.050 mmol) 于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 10 mL 二氯甲烷作为反应溶剂, 加入 EDCI (10 mg, 0.052 mmol) 和 DMAP (3.0 mg, 0.024 mmol) 于室温下搅拌 0.5 h。EDCI 使羧酸活化生成不稳定的 *O*-酰基异脲中间体; DMAP 作为亲核催化剂进攻 *O*-酰基异脲, 生成高活性的酰基吡啶鎓盐中间体。之后, 向体系中加入过氧麦角甾醇 (20 mg, 0.046 mmol), 置于 40 °C 恒温条件下搅拌反应 1~2 h, 其结构中的醇羟基亲核进攻酰基吡啶鎓盐, 生成目标酯化产物。反应期间采用薄层色谱 (TLC) 法监测反应进程, 直至原料点基本消失。反应结束后, 经减压浓缩后, 对粗产物进行硅胶柱色谱分离纯化, 洗脱剂选用二氯甲烷-甲醇体系 (20:1), 得到目标化合物 EP-Cy5。

蓝色固体, 8 mg, 产率 20%。MS (ESI) *m/z*: 895.32。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 8.20 (s, 2H), 7.36 (m, *J* = 6.6 Hz, 4H), 7.22 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.08 (d, *J* = 22.1 Hz, 3H), 6.88 (s, 1H), 6.41~6.32 (m, 2H), 5.34 (s, 2H), 4.32~3.89 (m, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.65 (s, 2H), 2.35 (t, *J* = 7.3 Hz, 4H), 2.04~1.32 (m, 35H), 1.25 (s, 9H), 1.08~0.69 (m, 10H); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 173.9, 173.5, 172.9, 154.0, 142.8, 142.1, 141.4, 141.0, 128.6, 128.5, 126.7, 125.1, 125.0, 122.3, 122.2, 110.4, 110.3, 104.2, 103.8, 49.4, 49.3, 44.2, 33.7, 31.9, 29.7, 29.3, 28.2, 28.0, 27.1, 26.4, 24.6, 22.7, 14.1。

2.1.2 化合物 EP-Cy5 光物理性质与光稳定性评估 该化合物的光学性质表征在浓度为 1.6 μ mol/L DMSO 溶液中进行。使用岛津 UV-2450 型紫外-可见分光光度计记录其紫外-可见吸收光谱, 扫描范围为 550~750 nm。荧光分析则采用日立 F-4600 型荧光分光光度计。为评估其在光照条件下的稳定性, 将溶液置于连续光源下照射, 并在预设时间点 (0、10、30、60、90、120 min) 跟踪记录吸光度与

荧光发射强度的变化。所有光谱数据均在室温下使用 10 mm 石英比色皿采集, 以确保测量的一致性。在 DMSO 溶剂中, 以浓度为 1.6 $\mu\text{mol/L}$ 的 EP-Cy5 为研究对象, 对其荧光特性进行了分析。该探针的最大激发波长 (E_x) 与发射波长 (E_m) 分别为 643、692 nm。为验证其生物成像适用性, 通过持续光照

2 h 考察了 EP-Cy5 的光谱稳定性。结果如图 2 所示, 在光照初始 30 min 内, 其吸收光谱与荧光光谱均未发生明显变化; 即使经过长达 2 h 的连续照射, EP-Cy5 仍能保持稳定的荧光强度。综上所述, EP-Cy5 具有优异的光稳定性, 是一种极具潜力的生物成像探针。



A-643 nm 激光照射下 EP-Cy5 的吸收光谱和荧光光谱, B-692 nm 激光照射下 EP-Cy5 的吸收光谱和荧光光谱。

Absorption spectrum and fluorescence spectrum of EP-Cy5 in DMSO solution under 639 nm (A) and 662 nm laser irradiation (B). fluorescence intensity

图 2 643 nm 激光照射下 (A)、692 nm 激光照射下 (B) EP-Cy5 的吸收光谱和荧光发射光谱

Fig. 2 Absorption spectrum and fluorescence emission spectrum of EP-Cy5 under 643 nm laser irradiation (A), and 692 nm laser irradiation (B)

2.2 细胞培养

MCF-7 细胞在含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温细胞培养箱中培养。

2.3 MTT 法检测细胞活力

取对数生长期 MCF-7 细胞, 接种于 96 孔培养板内, 接种密度为 3×10^3 个/孔。待细胞完全贴壁后, 弃去孔内原有培养基。本实验设置对照组、EP-Cy5 (2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 $\mu\text{mol/L}$) 组、EP (2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 $\mu\text{mol/L}$) 组。各给药孔分别加入 150 μL 对应浓度的含药完全培养基, 对照组加入等体积纯 DMEM 培养基。分别在药物作用 24、48、72 h 后, 每孔加入 20 μL MTT 工作液, 避光条件下继续孵育 4 h; 孵育结束后彻底吸弃孔内上清培养液, 每孔加入 150 μL DMSO, 低

速振荡 10 min 充分溶解甲瓚结晶。采用酶标仪于 490 nm 波长处检测各孔吸光度 (A) 值。运用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析, 拟合量效关系, 计算 EP-Cy5 作用于 MCF-7 细胞 24、48、72 h 的半数抑制浓度 IC_{50} 。

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.4 浓度和时间相关性成像研究

以 1×10^5 个细胞的密度将 MCF-7 细胞接种到放有细胞爬片的十二孔板中。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 至完全贴壁。PBS 洗涤 2 次, 用 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min, PBS 洗涤 2 次。细胞以 2、4、6、8、10、12 $\mu\text{mol/L}$ EP-Cy5 孵育 20 min, PBS 洗涤 3 次。将细胞爬片取出放到滴有 15~20 μL 的抗荧光淬灭封片剂上。使用激光扫描共聚焦显微镜成像测定不同浓度 EP-Cy5 的细胞摄取。细胞

用 8 $\mu\text{mol/L}$ EP-Cy5 处理 10、20、40、80 min。同上述操作封片,使用共聚焦显微镜观察不同孵育时间 EP-Cy5 的摄取情况。

2.5 亚细胞定位

细胞封片同 2.4 项下。按照制造商的方案进行细胞器染料染色,包括 Hoechst 33342、脂滴绿色荧光探针 (BODIPY493/503)、溶酶体绿色荧光探针 (Lyso-Tracker)、内质网绿色荧光探针 (ER-Tracker)、高尔基体绿色荧光探针 (Golgi-Tracker) 和线粒体绿色荧光探针 (Mito-Tracker Green)。孵育后,用 PBS 清洗 3 次,用激光扫描共聚焦显微镜进行荧光成像。

2.6 斑马鱼体内成像

将收集到的鱼卵用与原缸同温的清水轻轻冲洗 2~3 次,去除杂质和代谢废物。将选出的好卵转移到培养皿或浅盘中,每个培养皿放 30~50 颗,加水至容器的 1/2 或 2/3 处。将容器放入恒温培养箱中进行孵化。孵化出的鱼以 0、2、4、6、8、10 $\mu\text{mol/L}$ EP-Cy5 孵育 30 min 后利用共聚焦显微镜进行成像。

2.7 细胞凋亡情况检测

取 MCF-7 细胞,经胰酶消化后进行细胞计数;以 1×10^5 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、恒温培养箱培养 24 h,待细胞完全贴壁。实验分为对照组、EP-Cy5 (2、4、6 $\mu\text{mol/L}$) 组。药物持续作用 48 h 后,吸弃含药培养基,预冷 PBS 缓冲液洗涤细胞 1 次;采用无 EDTA 胰酶消化细胞,将细胞悬液收集至 1.5 mL 离心管内,2 000 r/min 离心 3 min,弃上清;PBS 重悬洗涤细胞 2 次。向每份细胞样品中依次加入 500 μL 结合缓冲液 (Binding Buffer)、5 μL 碘化丙啶 (PI)、5 μL Annexin V-FITC 染液,轻柔混匀后,室温避光孵育 20 min。孵育结束后立即采用流式细胞仪检测细胞凋亡水平,实验数据使用 FlowJo 10.8.1 软件进行分析处理。

2.8 细胞线粒体膜电位检测

取 2.7 项干预处理后的 MCF-7 细胞,弃原有细胞培养液;加入无菌 PBS 轻柔洗涤细胞 2 次,去除残留培养基与杂质;严格参照 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒说明书,配制稀释好的 JC-1 工作染色液;向细胞中加入足量 JC-1 稀释染色液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱避光孵育 30 min;孵育结束后,吸弃染色液,预冷 $1 \times$ 试剂盒缓冲液 ($1 \times$ Buffer) 洗涤细胞,去除未结合的多余染色试剂;消化、重悬制备单细胞悬液,采用流式细胞仪上机检测,采

集细胞荧光信号;收集实验数据,使用 FlowJo 10.8.1 软件进行数据分析,统计并评估各组细胞线粒体膜电位水平变化。

2.9 细胞 ROS 检测

MCF-7 细胞培养与接种操作同 2.7 项下方法。实验分为对照组、EP-Cy5 (2、4、6 $\mu\text{mol/L}$) 组。细胞给药处理 48 h 后,移除含药培养基,PBS 缓冲液洗涤 1 次;采用无 EDTA 胰蛋白酶消化细胞,收集细胞悬液于 1.5 mL 离心管内,2 000 r/min 离心 3 min,弃上清;PBS 缓冲液重复洗涤细胞 2 次。向各组细胞沉淀中加入 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 工作液,置于培养箱内避光孵育 20 min;孵育结束后弃上清,无血清培养基洗涤细胞 2 次,每管加入 500 μL 培养基重悬细胞。采用流式细胞仪检测各组细胞内 ROS 水平,检测数据使用 FlowJo 10.8.1 软件进行分析处理。

2.10 Western blotting 检测相关蛋白表达

按照 2.7 项下方法进行细胞培养和给药分组实验。采用 RIPA 裂解液提取总蛋白后,通过 BCA 法测定蛋白浓度并进行变性处理。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 电泳分离后转印至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜。随后使用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,与稀释一抗 (1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。经 TBST 洗涤后,加入稀释二抗 (1:2 000) 室温孵育 1.5 h。最后采用 ECL 显色系统检测信号,使用凝胶成像系统采集图像,并通过 Image J 软件进行定量分析。

2.11 统计学分析

使用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行统计学分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异通过单因素方差分析判定,若有差异则进一步采用 LSD-*t* 检验两两比较。

3 结果

3.1 EP-Cy5 对 MCF-7 细胞的增殖的影响

与对照组相比,EP-Cy5 在不同浓度下处理 MCF-7 细胞后,计算得到 EP-Cy5 在 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为 5.82、4.48、4.17 $\mu\text{mol/L}$,见表 1。作为对照,EP 在相应时间点的 IC_{50} 值分别为 24.31、19.02、12.82 $\mu\text{mol/L}$,见表 2。对比两者在 48 h 的 IC_{50} 值可知,EP-Cy5 的细胞毒性较 EP 提高了约 4.25 倍,表明其抗增殖效力显著增强。基于剂量效应关系及实验对亚毒性浓度的需求,选取 2、4、6 $\mu\text{mol/L}$ 作为 EP-Cy5 的给药浓度进行后续机制探讨。

表 1 EP-Cy5 对 MCF-7 细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Effect of the EP-Cy5 on proliferation inhibition rate of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	0	0	0
EP-Cy5	2.5	17.41±0.87*	19.59±1.29*	22.14±1.58*
	5.0	45.12±0.78*	58.51±1.06*	61.22±1.39*
	10.0	78.25±0.66*	86.66±1.06*	88.15±2.11*
	20.0	87.45±0.85*	90.25±1.47*	92.45±2.55*
	40.0	88.36±0.62*	91.19±1.19*	93.15±2.24*
	80.0	89.56±0.81*	91.70±1.57*	94.56±2.08*

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

表 2 EP 对 MCF-7 细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Effect of the EP on proliferation inhibition rate of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

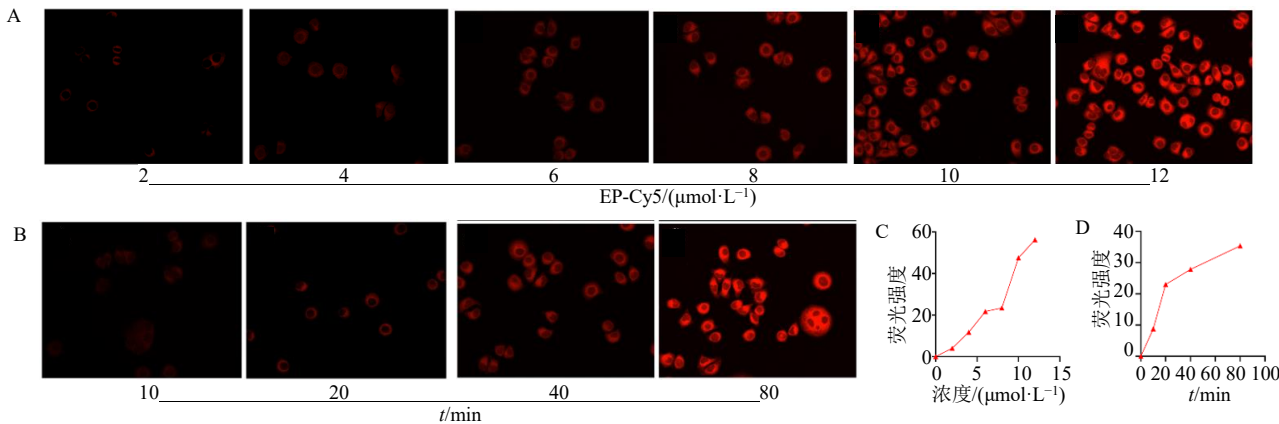
组别	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	0	0	0
EP	2.5	6.23±0.74*	15.26±1.21*	18.26±1.48*
	5.0	10.63±0.65*	20.13±1.08*	28.45±1.25*
	10.0	29.56±0.59*	36.26±1.04*	42.15±2.14*
	20.0	41.52±0.71*	49.56±1.36*	57.11±2.23*
	40.0	62.35±0.54*	61.45±1.26*	77.15±2.41*
	80.0	83.26±0.79*	84.96±1.61*	87.93±2.62*

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

3.2 MCF-7 细胞对 EP-Cy5 的摄取影响

采用共聚焦显微镜研究 EP-Cy5 在 MCF-7 细胞中的摄取, 探讨其抗肿瘤活性与细胞摄取之间的关系。用不同浓度的 EP-Cy5 处理 MCF-7 细胞 30 min 后, 用共聚焦显微镜成像。如图 3 所示, 随着 EP-Cy5 浓度的升高, 荧光强度显著增加。这表明 EP-

Cy5 具有有效的细胞穿透能力。此外, MCF-7 细胞对 EP-Cy5 摄取的时间依赖性。EP-Cy5 孵育 10 min 内出现弱红色荧光, 经过长时间的孵育, EP-Cy5 在 MCF-7 细胞中的荧光强度显著增强。结果表明, EP-Cy5 能在短时间内快速进入 MCF-7 细胞, 且荧光强度呈时间相关性增加。



A-EP-Cy5 的不同浓度孵育 30 min 的摄取情况, B-不同时间 EP-Cy5 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 孵育 MCF-7 细胞的摄取情况, C-EP-Cy5 浓度与荧光强度的相关性, D-孵育时间与荧光强度的相关性。
A-uptake situation after incubation with different concentrations of EP-Cy5 for 30 min, B-the distribution of EP-Cy5 at 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 h in MCF-7 cells, C-the correlation between EP-Cy5 concentration and fluorescence intensity, D-correlation between incubation time and fluorescence intensity.

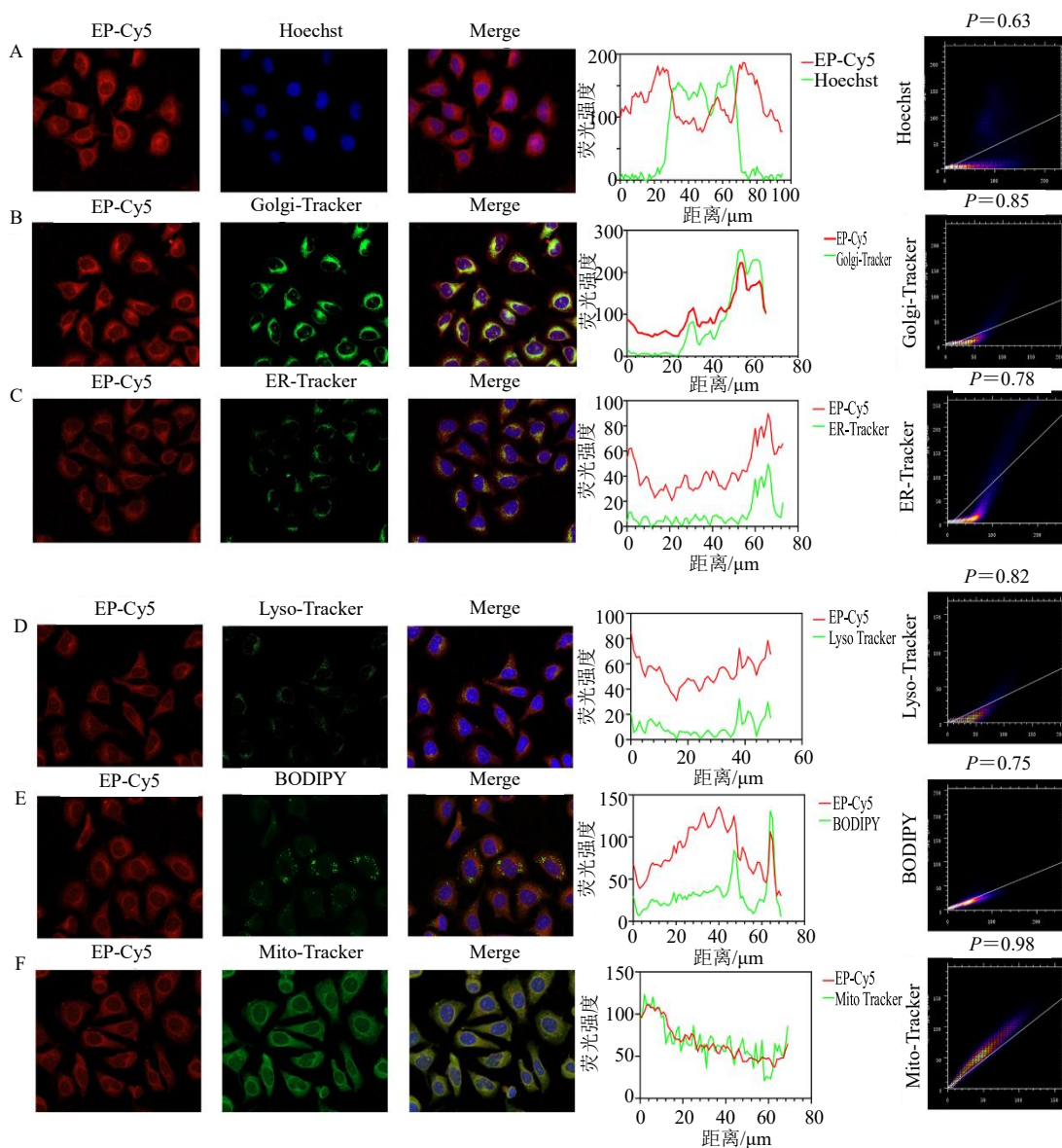
图 3 MCF-7 细胞对 EP-Cy5 的摄取 (免疫荧光, $\times 20$)
Fig. 3 Uptake of EP-Cy5 by MCF-7 cells (immunofluorescence, $\times 20$)

3.3 EP-Cy5 对 MCF-7 细胞的亚细胞定位

如图 4A 所示, EP-Cy5 的红色荧光信号集中在细胞质中, 与 DAPI 产生蓝色荧光的细胞核几乎不重叠。随后用脂滴绿色荧光探针、溶酶体绿色荧光探针、内质网绿色荧光探针、高尔基体绿色荧光探针和线粒体绿色荧光探针对 MCF-7 细胞进行染色 (图 4B~4E)。用 DAPI 染色确定细胞内的核区。值得注意的是, 在 EP-Cy5 和线粒体之间观察到了强

烈的共定位, 产生了明亮的黄绿色信号, 并伴随着线粒体形态的改变 (图 4F)。皮尔逊相关系数为 0.98。相反, EP-Cy5 与 BODIPY、Lyso-Tracker Green、Golgi-Tracker Green 或 ER-Tracker Green 之间没有显著重叠。

皮尔逊相关系数分别为 0.75、0.82、0.85、0.78。这些发现表明, EP-Cy5 主要积聚在线粒体中。线粒体是麦角甾醇发挥抗肿瘤活性的主要器官。



A-EP-Cy5 荧光定位, B-EP-Cy5 与高尔基体荧光共定位, C-EP-Cy5 与内质网荧光共定位, D-EP-Cy5 与溶酶体荧光共定位, E-EP-Cy5 与脂滴荧光共定位, F-EP-Cy5 与线粒体荧光共定位。

A-EP-Cy5 fluorescence localization, B-EP-Cy5 and Golgi fluorescence co-localization, C-EP-Cy5 and endoplasmic reticulum fluorescence co-localization, D-EP-Cy5 and lysosome fluorescence co-localization, E-EP-Cy5 and lipid droplet fluorescence co-localization, F-EP-Cy5 and mitochondria fluorescence co-localization.

图 4 EP-Cy5 与亚细胞器特异性荧光探针在 MCF-7 细胞中的共定位荧光图像 (免疫荧光, $\times 20$)

Fig. 4 Fluorescence colocalization images of EP-Cy5 with subcellular organelle-specific fluorescent probes in MCF-7 cells (immunofluorescence, $\times 20$)

3.4 EP-Cy5 斑马鱼体内成像

为进一步评估 EP-Cy5 在活体内的成像性能,本研究采用斑马鱼作为活体模型,以不同浓度的 EP-Cy5 孵育 30 min 后,利用共聚焦显微镜进行成

像。如图 5 所示,随着 EP-Cy5 浓度的递增,荧光信号强度呈现显著增强趋势。该结果表明,EP-Cy5 具有良好的组织穿透能力,能够有效进入斑马鱼体内并释放荧光信号。

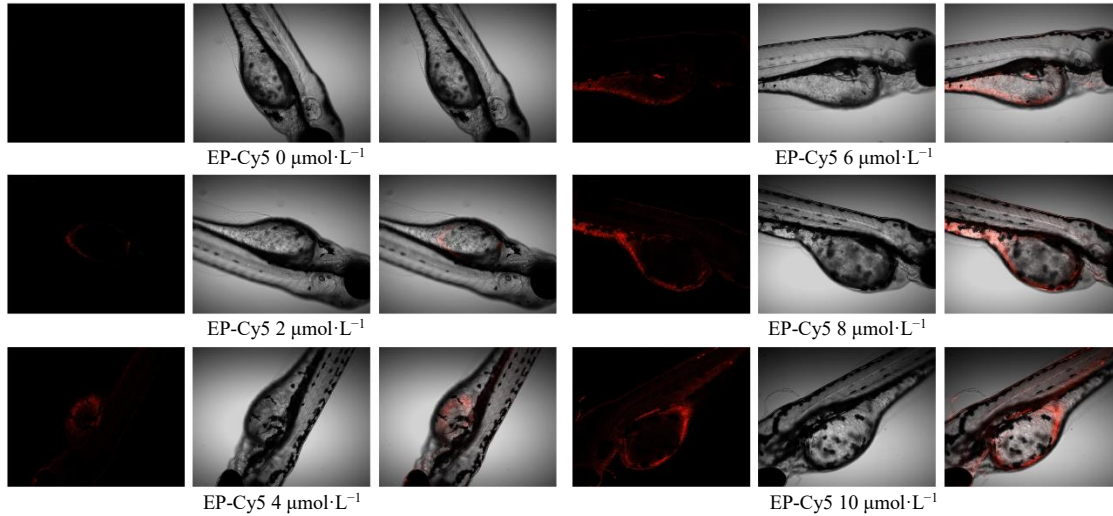


图 5 EP-Cy5 处理的斑马鱼的共聚焦荧光成像 (免疫荧光, $\times 10$)

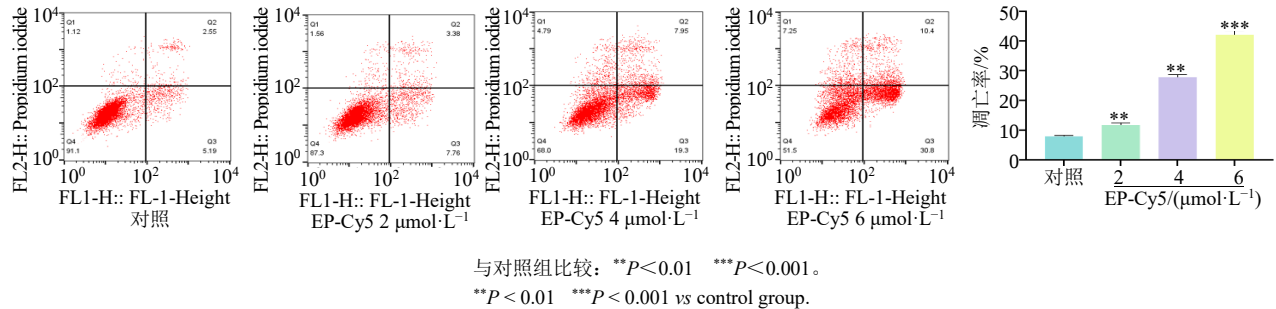
Fig. 5 Confocal fluorescence imaging of EP-Cy5-treated zebrafish (immunofluorescence, $\times 10$)

3.5 EP-Cy5 对 MCF-7 细胞凋亡的影响

流式细胞术结果见图 6, EP-Cy5 处理 48 h 后,各浓度组诱导的总凋亡率分别达到 $(11.14 \pm 1.28)\%$ 、 $(27.25 \pm 2.46)\%$ 、 $(41.20 \pm 3.56)\%$,与对照组相比具有显著差异 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

3.6 EP-Cy5 对 MCF-7 细胞线粒体膜电位的影响

流式细胞术结果如图 7 所示,经不同浓度 EP-Cy5 处理 48 h 后,细胞内 JC-1 单体比例较对照组分别显著升高 $(9.93\% \pm 1.12)\%$ 、 $(19.73\% \pm 2.96\%)$ 、 $(45.33\% \pm 4.52)\%$ ($P < 0.01$ 、 0.001)。

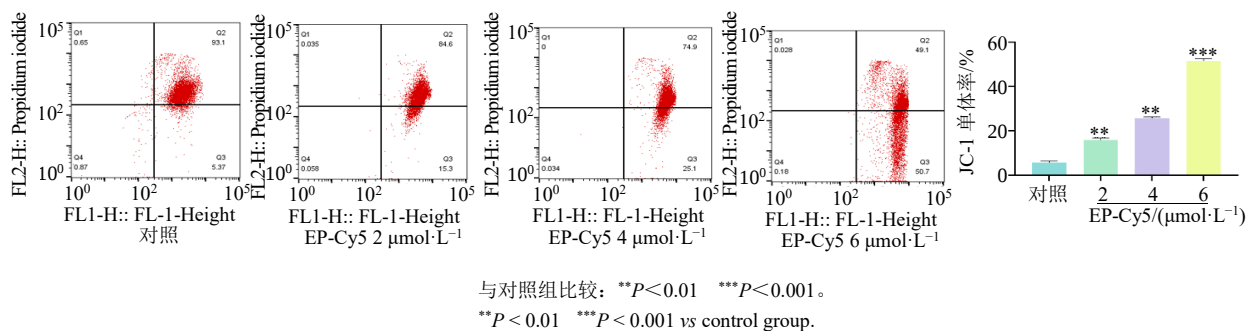


与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

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

图 6 化合物 EP-Cy5 对 MCF-7 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effect of compound EP-Cy5 on apoptosis in 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 7 化合物 EP-Cy5 对 MCF-7 细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Effect of compound EP-Cy5 on mitochondrial membrane potential in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.7 EP-Cy5 对 MCF-7 细胞 ROS 的影响

流式细胞术结果如图 8 显示, 与对照组相比, 不同浓度 EP-Cy5 处理可显著升高细胞内 ROS 水平 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

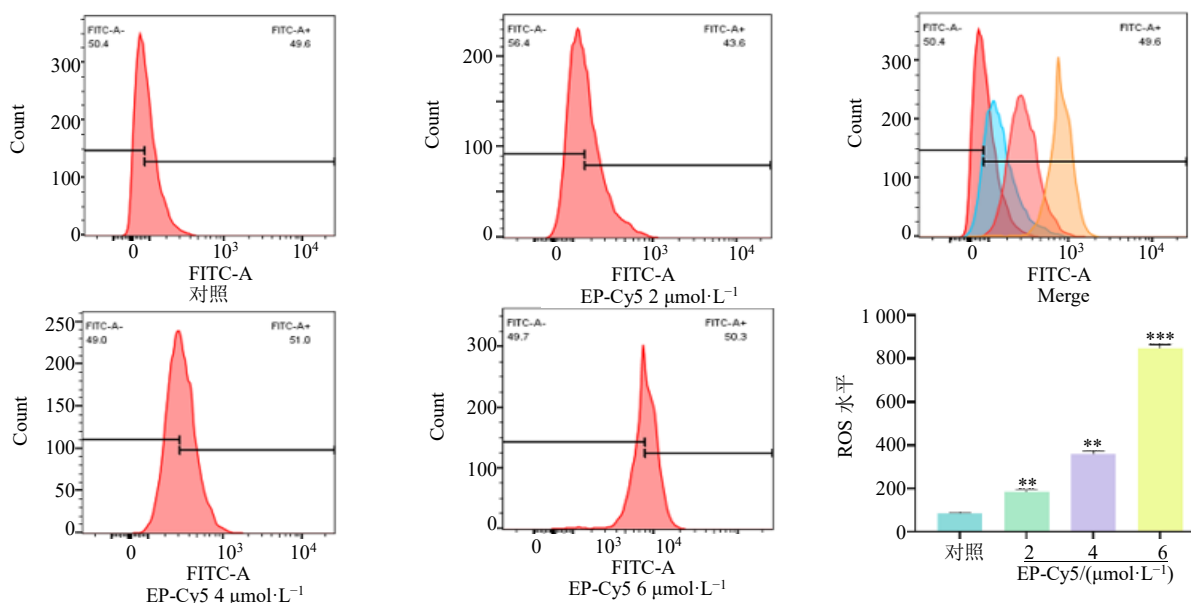
3.8 EP-Cy5 对 MCF-7 细胞线粒体凋亡相关蛋白表达的影响

Western blotting 实验如图 9 所示, 经过 48 h 不

同浓度 EP-Cy5 处理后, MCF-7 细胞内 Bax、Cyt-c、cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-7 的表达水平显著上升, 而 Bcl-2 的表达显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

4 讨论

乳腺癌组织形态特异、恶性程度和转移率极高, 严重危害女性健康^[18]。尽管乳腺癌的诊断方法

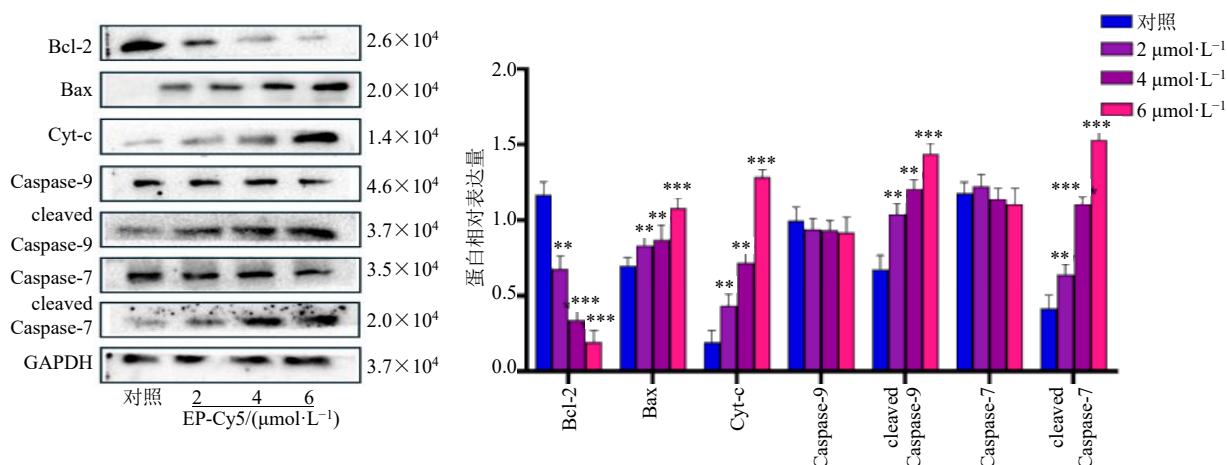


与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

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

图 8 EP-Cy5 对 MCF-7 细胞 ROS 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 8 Effect of EP-Cy5 on ROS in 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 9 化合物 EP-Cy5 对 MCF-7 细胞线粒体凋亡相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 9 Effect of compound EP-Cy5 on mitochondrial apoptosis-related proteins in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

及综合治疗手段近几年来不断发展和革新,病死率仍处于女性恶性肿瘤第 2 高位^[19]。因此,从天然来源中寻找有效的抗癌药物受到了广泛关注。

EP 作为一种具有广谱抗癌活性的天然内过氧化甾醇化合物,其针对乳腺癌^[20]、卵巢癌^[21]等多种肿瘤的抑制作用已得到初步验证。然而,传统研究手段难以实现对其在细胞内的时空分布、动态转运及亚细胞定位等关键药代动力学行为的直观示踪,这在一定程度上限制了对 EP 深层作用机制的阐释。为此,本课题组通过理性设计,在 EP 分子的 C-3 位羟基修饰具有近红外荧光特性的花菁染料 Cy5,成功构建了兼具生物活性与荧光示踪功能的 EP-Cy5 双功能探针。基于此探究其对乳腺癌的作用机制。

正常的 ROS 水平有利于细胞的生长,当药物损伤细胞,细胞内 ROS 升高,细胞产生氧化应激,导致细胞受损^[22]。ROS 是诱导线粒体通透性转换孔(mPTP)持续开放的关键因素之一。mPTP 是一个位于线粒体内外膜之间的非特异性孔道。会导致内膜两侧的离子平衡被彻底打破,质子自由回流,膜电位迅速且不可逆地崩溃(即“去极化”)^[23]。呼吸链受损直接导致氧化磷酸化效率降低,质子泵出减少,膜电位生成不足。相关研究证实,ROS 过度蓄积会诱发线粒体功能损伤^[24],进而促使 Cyt-c 大量释放。Cyt-c 是调控细胞凋亡的核心因子,可作为凋亡启动因子与凋亡蛋白酶激活因子-1 相结合^[25],促使 Caspase-9、Caspase-7 剪切活化,形成裂解型 cleaved Caspase-9 与 cleaved Caspase-7,最终启动细胞凋亡程序^[26]。Bcl-2 家族蛋白主要定位于线粒体膜、内质网膜及核膜表面,该家族蛋白可与多种促凋亡蛋白协同作用,改变线粒体膜通透性,进一步加速细胞凋亡进程^[27]。本研究通过化学合成构建了具有荧光示踪功能的过氧麦角甾醇衍生物 EP-Cy5。激光共聚焦显微成像显示,在乳腺癌 MCF-7 细胞中,化合物 EP-Cy5 呈时间-浓度相关性进入细胞,同时 EP-Cy5(红色荧光)与线粒体特异性荧光探针(绿色荧光)的荧光信号高度共定位,表明该化合物能够特异性靶向并蓄积于细胞线粒体,提示线粒体可能是其发挥药理作用的主要亚细胞靶点。在斑马鱼活体成像中 EP-Cy5 具有良好的组织穿透能力,能够有效进入斑马鱼体内并释放荧光信号。为进一步探究其潜在作用机制,本研究采用 Western blotting 法检测细胞凋亡关键蛋白的表达水平。结果表明,EP-Cy5 干预处理后,细胞内促凋亡蛋白 Bax

表达水平显著上调,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显受到抑制,同时 Bcl-2/Bax 比值显著下降。同时,线粒体途径的关键标志蛋白 Cyt-c 在胞质中的释放增加,其下游的 cleaved Caspase-9 与 cleaved Caspase-7 的表达水平也显著升高。这一系列蛋白变化清晰地勾勒出了线粒体相关性凋亡通路的激活轨迹。在此基础上,本研究通过流式细胞术分析了线粒体功能的关键早期指标。实验结果表明,EP-Cy5 处理能够引起 MCF-7 细胞内 ROS 水平显著升高,并伴随线粒体膜电位的明显下降。ROS 的积累与膜电位的丧失通常是线粒体功能障碍的体现,并可直接触发线粒体膜通透性改变,从而导致上述 Cyt-c 的释放。

综合以上结果,EP-Cy5 主要通过靶向 MCF-7 细胞的线粒体,诱导线粒体功能障碍。本研究通过荧光示踪直观显示了过氧麦角甾醇靶向线粒体的特性,并系统阐明了其诱导乳腺癌细胞凋亡的分子机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wu Z H, Xia F N, Lin R. Global burden of cancer and associated risk factors in 204 countries and territories, 1980-2021: A systematic analysis for the GBD 2021 [J]. *J Hematol Oncol*, 2024, 17(1): 119.
- [2] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [3] 徐婷婷, 杨雪玲, 李净净. 全球女性乳腺癌疾病负担现状分析 [J]. *中国肿瘤*, 2024, 33(7): 550-556.
- [4] Pal S K, Figlin R A, Reckamp K. Targeted therapies for non-small cell lung cancer: An evolving landscape [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(7): 1931-1944.
- [5] Qian J J, Cui J H, Li S S, et al. Anticancer natural products with collateral sensitivity: A review [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2021, 21(12): 1465-1486.
- [6] Ahmad R, Khan M A, Srivastava A N, et al. Anticancer potential of dietary natural products: A comprehensive review [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2020, 20(2): 122-236.
- [7] Melfi F, Carradori S, Mencarelli N, et al. Natural products as a source of new anticancer chemotypes [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2023, 33(11): 721-744.
- [8] Merdivan S, Lindequist U. Ergosterol peroxide: A mushroom-derived compound with promising biological

- activities-a review [J]. *Int J Med Mushrooms*, 2017, 19(2): 93-105.
- [9] Lin Y D, Wen B Q, Zhang Z W, *et al.* Ergosterol peroxide: An effect-directed detecting method from *Anoectochilus elwesii* and evaluation of anticancer activity [J]. *Nat Prod Res*, 2022, 36(12): 3177-3182.
- [10] Bocachica-Adorno A L, Aponte-Ramos A Y, Rivera-Fuentes P S, *et al.* Ergosterol peroxide disrupts triple-negative breast cancer mitochondrial function and inhibits tumor growth and metastasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(10): 4588.
- [11] 罗然, 邓思琦, 赵音旭, 等. 基于网络药理学及体外实验探讨过氧麦角甾醇对乳腺癌 MCF-7 细胞的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(13): 3627-3635.
- [12] 林强, 李登辉, 李修宸, 等. 过氧麦角甾醇诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的蛋白质组学机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2025, 50(21): 6081-6090.
- [13] Wang L, Tian S, Deng S Q, *et al.* Design and synthesis of novel mitochondria-targeted ergosterol peroxide derivatives as potential anti-cancer agents [J]. *Bioorg Chem*, 2024, 153: 107862.
- [14] Luo R, Zhao H Y, Deng S Q, *et al.* Discovery and optimization of ergosterol peroxide derivatives as novel glutaminase 1 inhibitors for the treatment of triple-negative breast cancer [J]. *Molecules*, 2024, 29(18): 4375.
- [15] 肖俊珂, 慕晓艳, 郭娇娇, 等. 中药活性成分靶向线粒体凋亡途径抑制食管癌的研究进展 [J]. 中国药房, 2025, 36(10): 1283-1288.
- [16] Gizem Özkan H, Thakor V, Xu H G, *et al.* Anticancer aminoferrocene derivatives inducing production of mitochondrial reactive oxygen species [J]. *Chemistry*, 2022, 28(30): e202104420.
- [17] 赵盈, 姜盼, 雷丹, 等. 左旋含羞草碱调控 ROS/JNK/c-Jun 轴诱导黑色素瘤细胞线粒体凋亡的研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2025, 41(5): 678-688.
- [18] Qayoom H, Alshehri B, Ul Haq B, *et al.* Decoding the molecular mechanism of stypoldione against breast cancer through network pharmacology and experimental validation [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2023, 30(12): 103848.
- [19] 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.
- [20] Govindharaj M, Arumugam S, Nirmala G, *et al.* Effect of marine basidiomycetes *Fulvifomes* sp.-derived ergosterol peroxide on cytotoxicity and apoptosis induction in MCF-7 cell line [J]. *J Fungi*, 2019, 5(1): 16.
- [21] Tan W W, Pan M H, Liu H, *et al.* Ergosterol peroxide inhibits ovarian cancer cell growth through multiple pathways [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 3467-3474.
- [22] Yang P, Yu D, Zhou J, *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.
- [23] Murphy M P. How mitochondria produce reactive oxygen species [J]. *Biochem J*, 2009, 417(1): 1-13.
- [24] 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.
- [25] Kaplan P, Tatarkova Z, Sivanova M K, *et al.* Homocysteine and mitochondria in cardiovascular and cerebrovascular systems [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7698.
- [26] 吴晓, 卢文丽, 张夜航, 等. 预知子醇提取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.
- [27] Opferman J T, Kothari A. Anti-apoptotic BCL-2 family members in development [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(1): 37-45.

[责任编辑 高源]