

新对叶百部碱对人胰腺癌细胞凋亡的影响及作用机制

李 想^{1,2,3}, 卢 琳^{4#}, 夏 星¹, 蒋雅杰^{1,5}, 覃 静^{1,2,3}, 李州炜^{1,2,3}, 王孝勋^{1,2,3*}

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200
2. 广西壮瑶药重点实验室, 广西 南宁 530200
3. 壮瑶药协同创新中心, 广西 南宁 530200
4. 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁 530023
5. 中药壮瑶药创新药物教育部工程研究中心, 广西 南宁 530200

摘 要: **目的** 探究新对叶百部碱 (NTS) 对人胰腺癌细胞 MiaPaCa-2 和 PANC-1 凋亡的影响及作用机制。**方法** 以 0 (对照组)、20、40、60、80、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 NTS 分别处理 MiaPaCa-2、PANC-1 细胞 24、48、72 h 后, 采用 MTT 法检测细胞存活率; 分别设置对照组 (0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 NTS 低、中、高质量浓度 (20、40、60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组, 采用平板克隆法检测 NTS 对 MiaPaCa-2、PANC-1 细胞的增殖能力的影响; 采用划痕愈合实验检测细胞迁移能力; 采用 Hoechst 33258 染色法观察细胞的凋亡; 采用流式细胞术检测细胞的凋亡率、线粒体膜电位; 采用 Western blotting 法检测凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、活化半胱氨酸蛋白酶-3 (cleaved-Caspase-3)、半胱天冬酶-9 (Caspase-9) 相关蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较, 不同质量浓度 NTS 可显著降低 MiaPaCa-2、PANC-1 细胞存活率 ($P<0.01$)、克隆形成率 ($P<0.05$ 、0.01)、划痕愈合率 ($P<0.05$ 、0.01)、线体膜电位 ($P<0.01$); 显著增加 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞凋亡水平 ($P<0.01$); 在蛋白水平上, NTS 显著上调促凋亡相关因子 cleaved-Caspase-3、Bax、Caspase-9 蛋白的表达水平, 下调抑制凋亡因子 Bcl-2 蛋白表达水平 ($P<0.05$ 、0.01)。**结论** NTS 可有效抑制人胰腺癌 MiaPaCa-2、PANC-1 细胞增殖和迁移能力, 并促进其凋亡, 其机制可能与下调抑制凋亡蛋白 Bcl-2 并上调促凋亡蛋白 Bax、cleaved-Caspase-3、Caspase-9 表达有关。

关键词: 新对叶百部碱; 胰腺癌; 凋亡; 增殖; 迁移

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)03-0646-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.03.011

Effects and mechanisms of neotuberostemonine on apoptosis of human pancreatic cancer cells

LI Xiang^{1,2,3}, LU Lin⁴, XIA Xing¹, JIANG Yajie^{1,5}, QIN Jing^{1,2,3}, LI Zhouwei^{1,2,3}, WANG Xiaoxun^{1,2,3}

1. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China
2. Key Laboratory of Zhuang Yao Medicine in Guangxi, Nanning 530200, China
3. Zhuang Yao Medicine Collaborative Innovation Center, Nanning 530200, China
4. First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023, China
5. Innovative Traditional Chinese Medicine Zhuang Yao Medicine, Ministry of Education Engineering Research Center, Nanning, 530200, China

Abstract: Objective To explore the effects and mechanisms of neotuberostemonine on the apoptosis of human pancreatic cancer cells MiaPaCa-2 and PANC-1. **Methods** MiaPaCa-2 and PANC-1 cells were treated with NTS at concentrations of 0, 20, 40, 60, 80, and 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 24, 48, and 72 h, respectively. Cell viability was detected by the MTT assay. The control group (0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), the low, medium, high-concentration group of NTS (20, 40, 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), were set up. The effect of NTS on the proliferation ability of

收稿日期: 2024-10-10

基金项目: 广西壮瑶药重点实验室 (桂科基字 [2014] 32 号); 壮瑶药协同创新中心 (桂教科研 [2013] 20 号); 广西一流学科中药学 (民族药学) (桂教科研[2018]12 号)

作者简介: 李 想 (1999—), 硕士研究生, 研究方向为中药品种、质量及资源开发。E-mail: 761105603@qq.com

#共同第一作者: 卢 琳 (1988—), 主管检验技师。E-mail: 407958072@qq.com

*通信作者: 王孝勋 (1973—), 博士, 研究员, 研究方向为中药品种、质量及资源开发。E-mail: wangxx@gxctmu.edu.cn

MiaPaCa-2 and PANC-1 cells was detected by the plate cloning method. The cell migration ability was detected by the scratch healing assay. Apoptosis was observed by Hoechst 33258 staining. The apoptosis rate and mitochondrial membrane potential were detected by flow cytometry. The expression levels of apoptosis-related proteins B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), activated Caspase-3 (cleaved-Caspase-3), and Caspase-9 were detected by Western blotting. **Results** Compared with the control group, different concentrations of NTS significantly reduced the proliferation activity ($P < 0.01$), colony formation rate ($P < 0.05$ or 0.01), scratch healing rate ($P < 0.05$ or 0.01), and mitochondrial membrane potential ($P < 0.01$) of MiaPaCa-2 and PANC-1 cells. In addition, NTS increased the apoptosis level of MiaPaCa-2 and PANC-1 cells ($P < 0.01$). At the protein level, NTS significantly upregulated the expression levels of apoptosis-related factors cleaved-Caspase-3, Bax, and Caspase-9 proteins, while the expression level of the apoptosis factor Bcl-2 protein was significantly downregulated ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** NTS can effectively inhibit the proliferation and migration of human pancreatic cancer cells MiaPaCa-2 and PANC-1 and promote their apoptosis. The mechanism may be related to the downregulation of the anti-apoptotic protein Bcl-2 and the upregulation of the pro-apoptotic proteins Bax, cleaved-Caspase-3, and Caspase-9.

Key words: neotuberostemonine; pancreatic cancer; apoptosis; multiplication; migration

胰腺癌发病隐匿, 具有很强的侵袭转移能力, 病情进展迅速且预后较差, 其 5 年生存率仅约 6%, 平均中位生存期小于 6 个月^[1]。由于缺乏早期特征性症状、存在耐药性以及有效干预手段较少, 胰腺癌患者一旦确诊往往已是中晚期, 病情进展难以得到有效的控制^[2-3], 当前的治疗药物在疗效和安全性等方面存在一定局限。因此, 寻找新型抗胰腺癌药物非常重要。近年来, 多项研究证实, 中草药活性成分对肿瘤细胞有着重要的抑制作用^[4-6]。新对叶百部碱 (NTS) 是百部生物碱中最重要的一种单体活性成分, 具有镇咳、抗肺纤维化、抗炎、抗肿瘤等活性^[7-10]。有研究已经证明百部生物碱对肺癌、肝癌、卵巢癌等多种癌症均有显著的抑制作用^[11-14]。但目前尚未见 NTS 对胰腺癌的作用与机制研究。

诱导细胞凋亡是治疗胰腺癌的关键手段, 能有效促进癌细胞死亡。细胞凋亡是一个高度有序的细胞死亡过程, 它对于维持组织的稳态和响应各种内外刺激至关重要。在这个过程中, Bcl-2 家族蛋白起到了关键的调控作用。Bcl-2 和 Bax 是细胞抗凋亡和促凋亡的 2 种关键调控蛋白, Bcl-2 能抑制细胞凋亡, 是研究凋亡分子机制的主要靶分子, 通过调节线粒体外膜通透性, 并抑制细胞色素 C 从线粒体释放从而抑制细胞凋亡。Bax 是促凋亡蛋白, 它可以和 Bcl-2 形成异源二聚体, 当 Bax 相对含量增加时, 会促进细胞色素 C 的释放, 穿过线粒体膜并形成小孔, 进而促进细胞凋亡^[15-16]。Caspase-9 是凋亡启动因子, 细胞色素 C 释放后会和凋亡蛋白酶激活因子 1 (Apaf-1) 结合, 形成凋亡小体。然后招募并激活 Caspase-9。Caspase-9 激活后会进一步激活下游 Caspase-3。Caspase-3 是凋亡执行因子, 被激活

后可以切割多种细胞内的底物, 导致细胞的形态学和生化改变, 最终促使细胞凋亡, Caspase-3 激活是细胞进入不可逆凋亡阶段的标志^[17-19]。在细胞凋亡过程中, Bcl-2 和 Bax 在凋亡上游起调控作用, Caspase-9 启动凋亡程序, Caspase-3 执行凋亡过程, 它们共同构成一个细胞凋亡的调控和执行通路。通过检测这些产物可以判断细胞是否正在发生凋亡。本研究以胰腺癌细胞 MiaPaCa-2 和 PANC-1 作为研究对象, 探究 NTS 对 MiaPaCa-2、PANC-1 细胞凋亡的调控作用及其潜在的分子机制。

1 材料

1.1 细胞

人胰腺癌 MiaPaCa-2 细胞、PANC-1 细胞, 均购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。

1.2 主要试剂

NTS (质量分数 98.0%, 批号 PS020868), 购自成都普思生物科技股份有限公司; DMEM 培养基 (批号 6123151)、细胞裂解缓冲液 (批号 2312009)、胰蛋白酶-EDTA 消化液 (批号 2537578)、结晶紫染色液 (批号 240001001), 购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (批号 23120701), 购自杭州四季青生物工程材料有限公司; JC-1 染色液 (批号 220208G01-54), 购自苏州优逸兰迪生物科技有限公司; Hoechst 33258 染色液 (批号 A2307001)、MTT (批号 5221107001)、DMSO (批号 829R031)、TBST 缓冲液 (批号 2312013), 购自北京索莱宝科技有限公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 355957-000) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 FU01F6421641), 购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司; B 细胞淋巴瘤-2

(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、半胱氨酸蛋白酶-3 剪切体 (cleaved-Caspase-3)、半胱天冬酶-9 (Caspase-9) 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗 (批号 00126863、00120875、00120689、00121498、00130757), 购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

Epoch2 型全波长酶标仪 (美国 Bio Tek 公司); 5424R 型冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); LSRFortessa 流式细胞仪 (美国 BD 公司); CKX53 倒置生物显微镜 (日本 Olympus 公司); Mini PROTEAN Tetra Cell 型垂直电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

MiaPaCa-2 细胞、PANC-1 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱传代, 取对数期细胞进行实验。

2.2 MTT 法检测细胞的存活率

将 MiaPaCa-2、PANC-1 细胞以每孔 5×10^3 个接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 弃去原培养基, 换含有 0 (对照组)、20、40、60、80、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ NTS 的完全培养基继续分别培养 24、48、72 h 后, 每孔加入 20 μL 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液, 继续于培养箱中培养 4 h 后弃去培养基, 每孔加入 150 μL DMSO, 避光振荡 10 min 后, 用酶标仪于 490 nm 波长下测吸光度 (*A*) 值, 并计算细胞存活率。

细胞存活率 = NTS 给药组 *A* 值 / 对照组 *A* 值

2.3 平板克隆法检测细胞的增殖能力

将 MiaPaCa-2 细胞、PANC-1 细胞以每孔 5×10^2 个接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 弃去原培养基, 换含 0 (对照组)、20、40、60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 NTS 的完全培养基继续培养 48 h。弃去含药培养基, 换新鲜的完全培养基继续培养 14 d 以上, 用多聚甲醛固定细胞 15 min, 再用结晶紫染色, 晾干, 拍照, 通过 Image J 软件进行计数并计算克隆形成率。

克隆形成率 = 细胞克隆数 / 细胞接种数

2.4 划痕愈合实验检测细胞迁移能力

将 MiaPaCa-2、PANC-1 细胞以每孔 3×10^5 个接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 弃去原培养基, 换低浓度血清培养基继续培养 24 h, 当细胞生长到完全汇合时, 用枪头划痕, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗, 加入完全培养基 (对照组) 和含药培养基 (20、

40、60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ NTS), 分别于给药 0、48 h 后在显微镜下观察并拍照, 计算划痕愈合率。

划痕愈合率 = (0 h 划痕宽度 - 48 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度

2.5 Hoechst 33258 染色法观察细胞的凋亡

将 MiaPaCa-2、PANC-1 细胞以每孔 2×10^5 个接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 弃去原培养基, 换含有 0 (对照组)、20、40、60、80、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ NTS 的完全培养基继续培养 48 h。弃去培养基。加入多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤, 加入 Hoechst 33258 工作液避光染色 10~15 min。弃去染液, PBS 洗 3 次后, 于荧光显微镜下观察。

2.6 流式细胞术检测细胞凋亡率

细胞接种及给药操作同“2.5”项, 弃去培养基, 用 PBS 洗涤 2 次, 加入结合缓冲液重悬细胞, 按照试剂盒说明书方法, 再加入 Annexin V-FITC 5 μL 染液避光染色 10 min, 加入碘化丙啶 (PI) 染色液 5 μL , 室温避光染色 10 min, 1 h 内上流式细胞仪分析。

2.7 流式细胞术检测细胞的线粒体膜电位

细胞接种及给药操作同“2.5”项, 弃去培养基, 用 PBS 洗涤 2 次, 重悬细胞, 按照试剂盒说明书方法, 加入 JC-1 染色工作液, 细胞培养箱中 37 °C 孵育 20 min, 孵育结束后, 离心, 用 Assay Buffer 重悬细胞, 洗涤 2 次, 上流式细胞仪分析。

2.8 Western blotting 法检测 Bax、Bcl-2、cleaved-Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平

细胞接种及给药操作同“2.5”项, 收集 MiaPaCa-2、PANC-1 细胞, 加入 RIPA 细胞裂解液, 于冰上裂解 30 min 后于 4 °C、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min 提取蛋白; 然后使用 BCA 法对蛋白进行定量统一后上样。经 80 V 电压条件下电泳 30 min 后, 再于 120 V 电压条件下电泳 1 h。后将蛋白转印至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 洗涤 3 次后, 分别加入抗体 Bax (稀释比例 1 : 5 000)、Bcl-2 (稀释比例 1 : 2 000)、cleaved-Caspase-3 (稀释比例 1 : 1 000)、Caspase-9 (稀释比例 1 : 500), 4 °C 孵育过夜。次日经 TBST 洗涤 3 次后, 加入二抗 (稀释比例 1 : 5 000), 于室温孵育 1.5 h 后, TBST 洗涤 3 次, 然后进行显影。以 β -actin 为内参对目的蛋白进行表达量分析。

2.9 统计学处理

用 GraphPad Prism 软件进行统计分析, 计量资

料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数间用单因素方差分析, 组间均数比较用 LSD 检验。

3 结果

3.1 NTS 对胰腺癌细胞增殖活力的影响

与对照组比较, NTS (20、40、60、80、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 作用 24、48、72 h 后, 均抑制了 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞的增殖, 细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$), 并随 NTS 浓度的增加和作用时间的增加而降低。NTS 作用 24、48、72 h 对 MiaPaCa-2 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 103.70、50.24、30.05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; NTS 作用 24、48、72 h 对 PANC-1 细胞的 IC_{50} 分别为

101.90、53.40、24.59 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 见图 1。

3.2 NTS 对胰腺癌细胞克隆形成率的影响

与对照组比较, 各 NTS 处理组对 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞集落的生长均呈显著的抑制作用, 且随 NTS 浓度增加, 增殖抑制作用增强 ($P < 0.05$ 、0.01), 见图 2。

3.3 NTS 对胰腺癌细胞细胞迁移能力的影响

与对照组比较, 各 NTS 处理组处理 48 h 后 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞划痕愈合率均随给药浓度增加而降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 表明 NTS 能够抑制 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞的迁移, 见图 3。

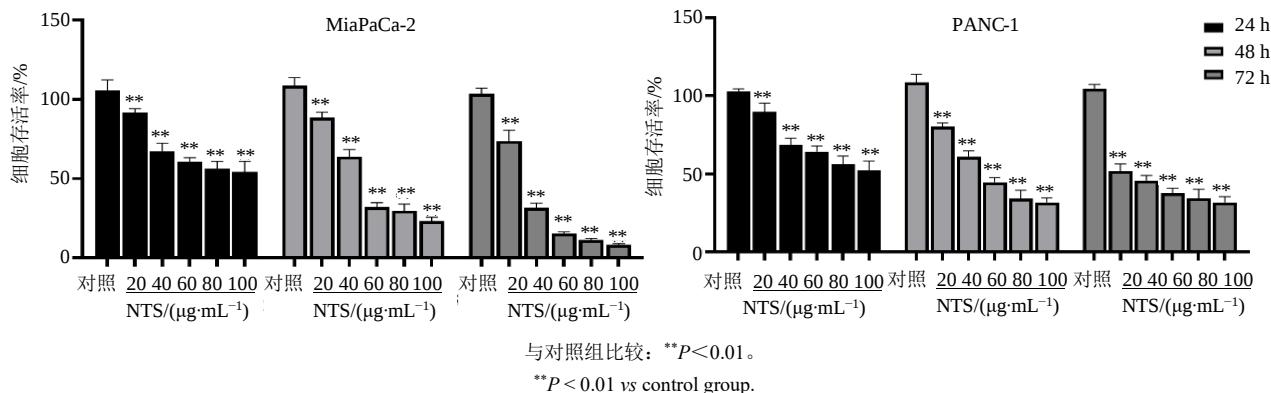


图 1 NTS 对 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞增殖活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 1 Effect of NTS on proliferation of MiaPaCa-2 and PANC-1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

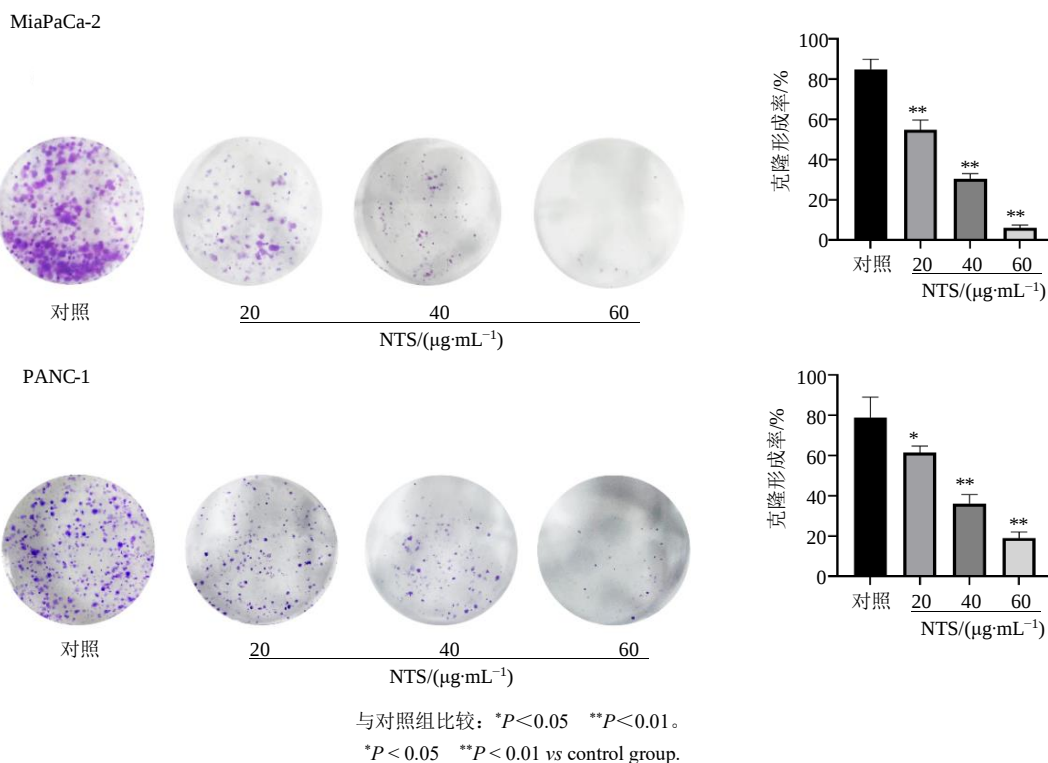


图 2 NTS 对 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞克隆形成率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Effect of NTS on clone formation rate of MiaPaCa-2 and PANC-1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

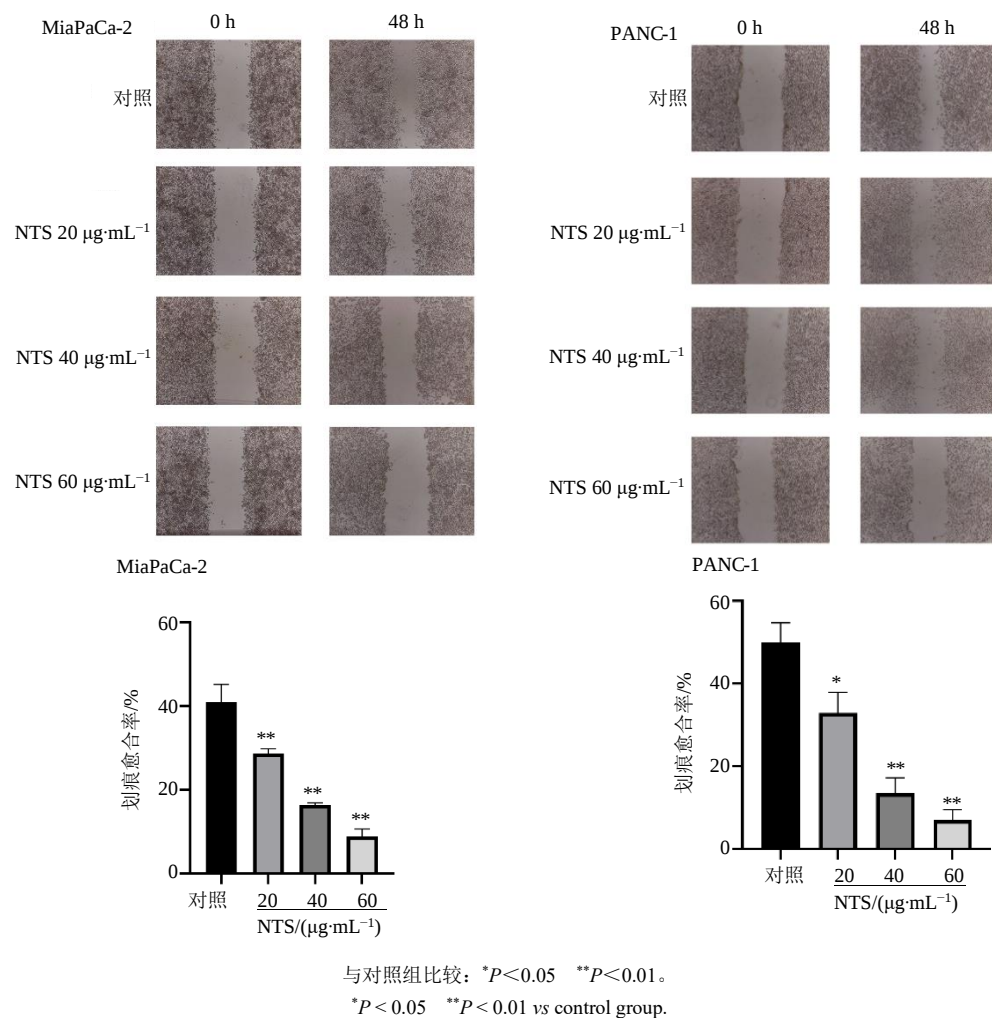


图 3 NTS 对 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞迁移能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Effect of NTS on cell migration of MiaPaCa-2 and PANC-1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.4 NTS 对胰腺癌细胞凋亡形态的影响

如图 4 所示, 经 Hoechst 33258 染色, 细胞核

呈蓝色, 对照组细胞细胞核荧光微弱, 其核染色质分布均匀; NTS 给药组细胞数量减少, 细胞核呈亮

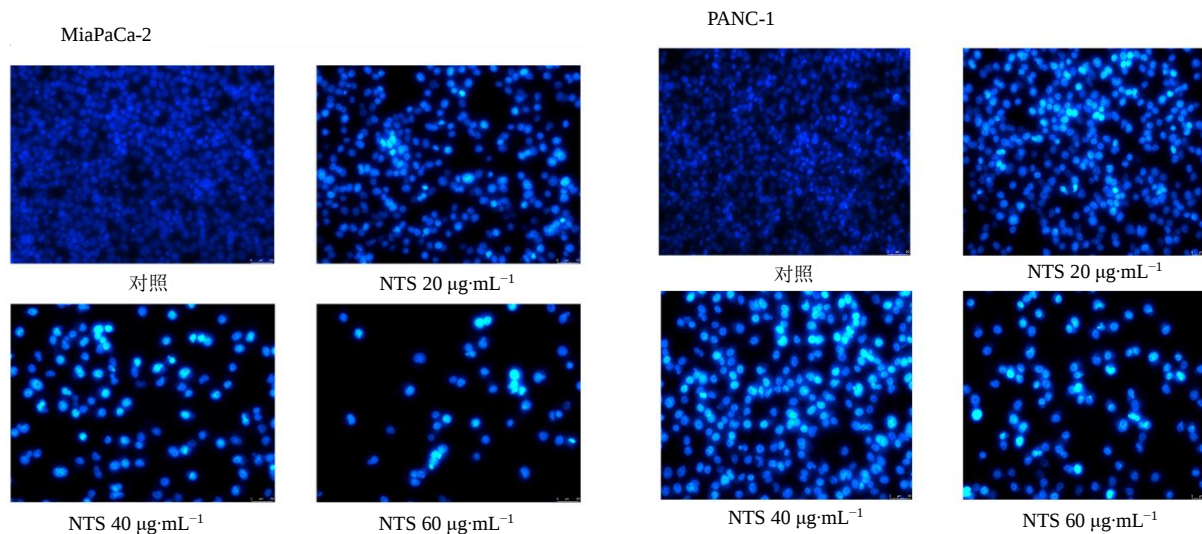


图 4 NTS 对 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞凋亡形态的影响 ($\times 200$)

Fig. 4 Effect of NTS on apoptotic morphology of MiaPaCa-2 and PANC-1 cells ($\times 200$)

蓝色荧光,致密浓染,出现固缩状。MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞荧光均随给药浓度增加逐渐增强,表明 NTS 可诱导 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞凋亡。

3.5 NTS 对胰腺癌细胞凋亡的影响

与对照组比较,随 NTS 浓度增加,MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞凋亡率逐渐升高 ($P < 0.01$),呈剂量相关性,表明 NTS 能诱导胰腺癌细胞 MiaPaCa-2 和 PANC-1 凋亡,见图 5。

3.6 NTS 对胰腺癌细胞线粒体膜电位的影响

与对照组比较,各 NTS 处理组的红色荧光强度显著降低 ($P < 0.01$),绿色荧光强度显著升高 ($P < 0.01$)

0.01),说明线粒体膜电位下降,且随 NTS 浓度增加,线粒体膜电位降低作用更明显,说明 NTS 能促进 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞线粒体膜电位下降,见图 6。

3.7 NTS 对胰腺癌细胞 Bax、Bcl-2、cleaved-Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达的影响

与对照组比较,各 NTS 处理组细胞的 Bax、cleaved-Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01),Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),见图 7 和表 1、2,表明 NTS 能够诱导胰腺癌细胞 MiaPaCa-2 和 PANC-1 凋亡。

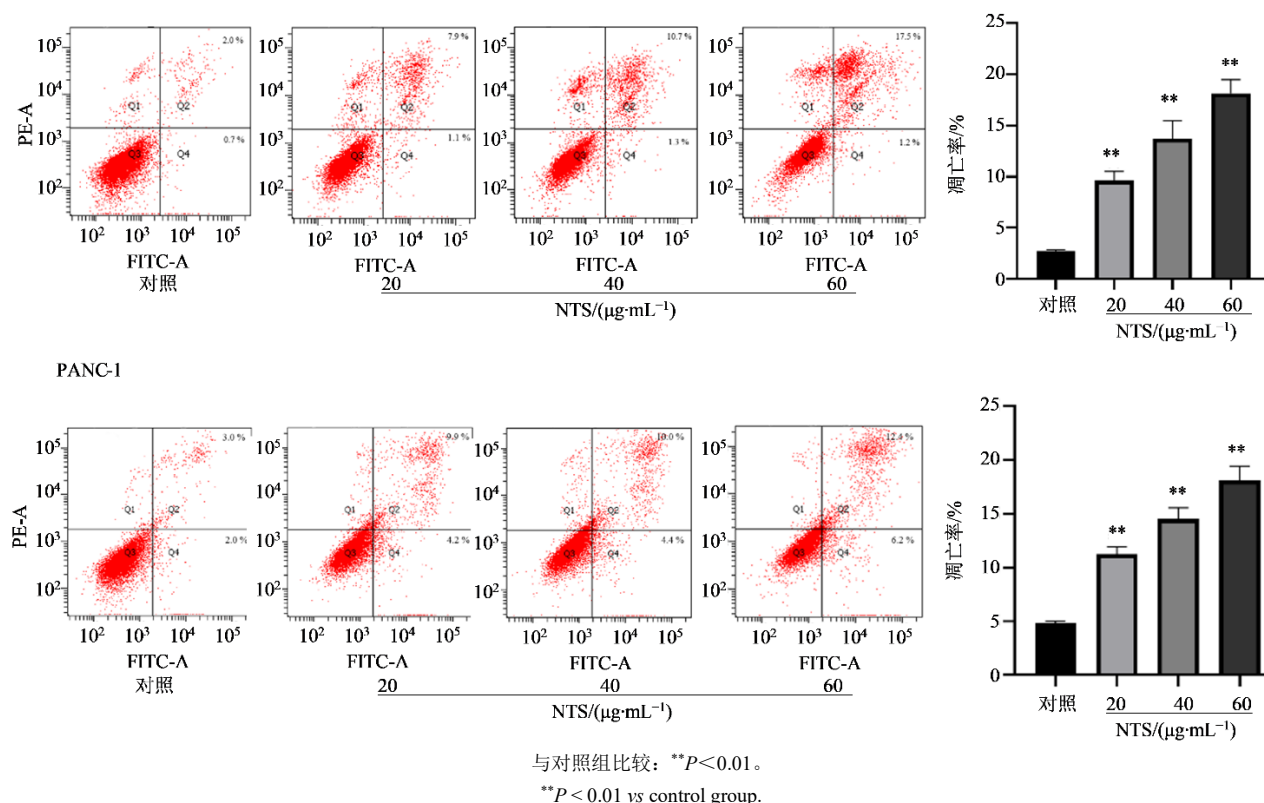


图 5 NTS 对 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effect of NTS on apoptosis of MiaPaCa-2 and PANC-1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

近年来,胰腺癌的诊治正在获得逐步的进展,但是其较高的致死率并未得到显著改善,临床上对胰腺癌的诊治疗法仍以化疗为主,患者病情发展预后差,生存质量低^[19-22]。目前治疗胰腺癌的一线药物如吉西他滨等因其毒性和耐药性,只能相对减缓症状提高生存率^[23]。因此,开发寻找高效低毒的胰腺癌化疗替代药是临床上亟待解决的问题。

中药单体化学结构明确,疗效确切,作用靶点

清晰,不良反应小,来源广泛,可作为胰腺癌治疗的药物来源。NTS 为百部总生物碱中的主要组成成分之一,是一种具有清楚化学结构的中药单体。可抑制癌细胞介导的破骨细胞生成、改善肺纤维化、抑制肺炎,具有多种生物学活性和药理作用^[8-10,24]。而目前关于 NTS 对肿瘤细胞凋亡影响的研究较少。本研究显示,NTS 能够诱导人胰腺癌 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞凋亡。

本研究首先通过 MTT 法探究发现不同浓度的

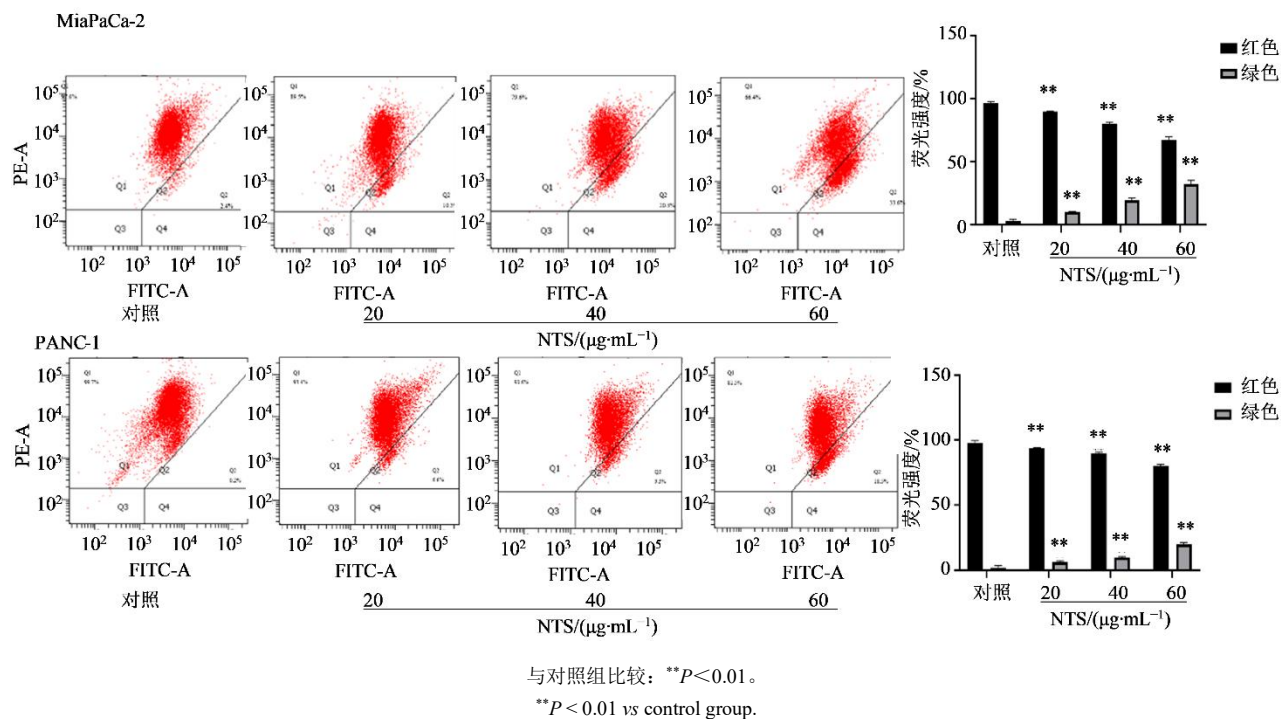


图 6 NTS 对 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Effect of NTS on mitochondrial membrane potential in MiaPaCa-2 and PANC-1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

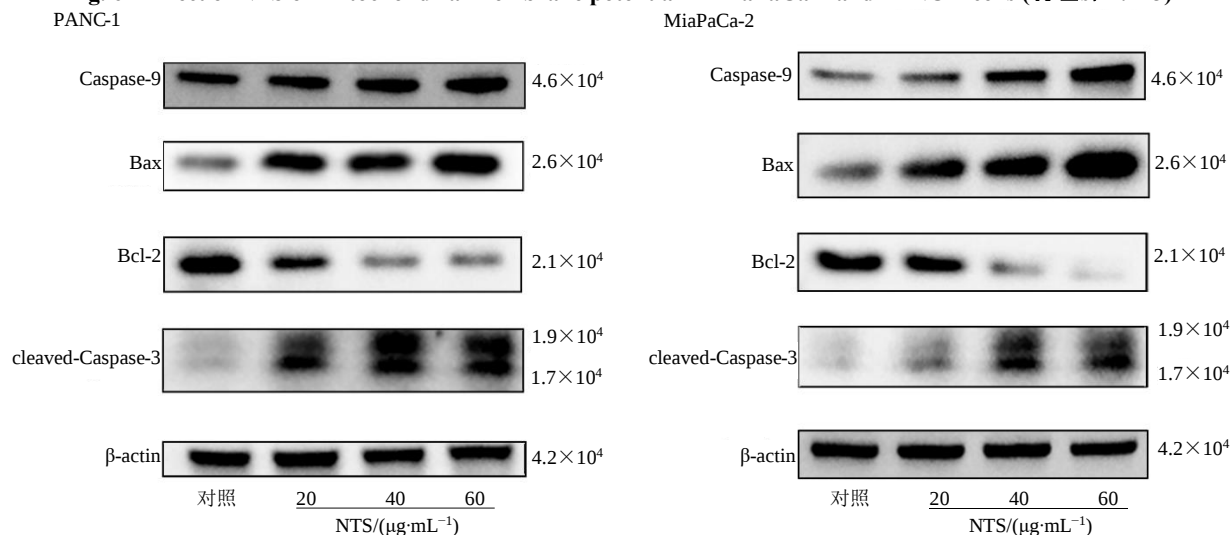


图 7 NTS 对 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 7 Effect of NTS on expression of apoptosis-related proteins in MiaPaCa-2 and PANC-1 cells

表 1 NTS 对 MiaPaCa-2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effect of NTS on expression of apoptosis-related proteins in MiaPaCa-2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	Caspase-9/ β -actin	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	cleaved-Caspase-3/ β -actin
对照	—	0.28 ± 0.04	0.44 ± 0.14	0.91 ± 0.05	0.19 ± 0.09
NTS	20	$0.42 \pm 0.06^*$	$0.71 \pm 0.09^*$	$0.64 \pm 0.1^*$	$0.38 \pm 0.07^*$
	40	$0.61 \pm 0.09^{**}$	$0.92 \pm 0.14^*$	$0.37 \pm 0.1^{**}$	$0.73 \pm 0.15^*$
	60	$1.13 \pm 0.19^{**}$	$1.08 \pm 0.08^{**}$	$0.21 \pm 0.14^{**}$	$0.79 \pm 0.05^{**}$

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group.

表 2 NTS 对 PANC-1 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 2 Effect of NTS on expression of apoptosis-related proteins in PANC-1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Caspase-9/ β -actin	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	cleaved-Caspase-3/ β -actin
对照	—	0.71 ± 0.01	0.67 ± 0.13	1.17 ± 0.10	0.36 ± 0.22
NTS	20	$0.89 \pm 0.11^*$	$0.97 \pm 0.07^*$	$0.85 \pm 0.17^*$	$0.71 \pm 0.05^*$
	40	$1.00 \pm 0.19^*$	$1.15 \pm 0.27^*$	$0.59 \pm 0.32^*$	$0.84 \pm 0.11^*$
	60	$1.11 \pm 0.22^*$	$1.07 \pm 0.2^*$	$0.32 \pm 0.07^{**}$	$0.90 \pm 0.08^*$

与对照组比较: $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ 。 $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs control group.

NTS 对人胰腺癌 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞具有增殖抑制作用,可降低细胞存活率;平板克隆实验结果表明 NTS 可抑制细胞增殖与形成集落;划痕愈合实验结果表明 NTS 干预 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞后与对照组比较,细胞的迁移距离变低,迁移能力被抑制;Hoechst 33258 染色法实验结果表明 NTS 能诱导 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞凋亡,与对照组比较,药物干预组细胞荧光强度增强,核染色质固缩,出现了明显的凋亡特征;利用流式细胞术检测细胞的凋亡率及线粒体膜电位发现,NTS 能显著增加 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞凋亡率并可显著降低 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞线粒体膜电位,增加线粒体膜通透性进而促进细胞产生凋亡。

细胞凋亡是阻止肿瘤发展的关键手段,其调控涉及众多基因的相互作用^[25]。细胞凋亡初期,线粒体会出现 2 种变化:一是膜电位降低,二是线粒体的外膜通透性增加。在细胞感应到刺激后,促凋亡蛋白(如 Bax、Bak)会在线粒体外膜上形成孔道,导致细胞色素 C 等促凋亡因子释放,细胞色素 C 通过 Apaf-1 与 Caspase-9 结合形成凋亡复合物,诱导 Caspase-9 活化,进而活化 Caspase-3,触发 Caspase 级联反应,启动线粒体介导的凋亡^[26]。因此,线粒体膜电位下降可作为内源性细胞凋亡的早期指标。本研究结果发现,NTS 可上调 Bax、cleaved-Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平,并下调 Bcl-2 蛋白表达水平,降低线粒体膜电位,说明 NTS 可通过影响细胞线粒体膜电位,进而调节 Bax、Bcl-2 等蛋白表达,从而诱导细胞凋亡。

本研究同时选取 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞作为研究对象,通过二者结合研究可较全面地反映 NTS 作用于胰腺癌的效果,但 NTS 对这 2 种同类型的癌细胞效应不完全相同,这可能是由于 2 种细胞生长周期的差异、内在基因和酶的作用有所不同导致对 NTS 响应的效果不完全相同。这种差异提示在癌症治疗中,需要充分考虑癌细胞的异质性,包

括基因层面、细胞微环境和细胞周期等因素对药物疗效的影响,进一步深入探究其在不同癌细胞个体差异下的作用机制,为提高药物疗效和精准医疗提供依据。

NTS 对人胰腺 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞具有显著的抑制生长并促进凋亡的作用,其机制可能与下调抑制凋亡蛋白 Bcl-2 和上调促凋亡蛋白 Bax、cleaved-Caspase-3、Caspase-9 表达有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gupta R, Amanam I, Chung V. Current and future therapies for advanced pancreatic cancer [J]. J Surg Oncol, 2017, 116(1): 25-34.
- [2] Draper A. Updates in pancreatic cancer: Modest gains and hopeful targets [J]. J Oncol Pharm Pract, 2019, 25(1): 101-109.
- [3] Neoptolemos J P, Kleeff J, Michl P, et al. Therapeutic developments in pancreatic cancer: Current and future perspectives [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(6): 333-348.
- [4] 周孟, 廖祥明, 王珊, 等. 槲皮素抑制人肝癌细胞 HepG2 的体内外活性研究 [J]. 安徽医药, 2019, 23(11): 2136-2141.
Zhou M, Liao X M, Wang S, et al. In vivo and in vitro anticancer activity of quercetin against human liver cancer HepG2 Cells [J]. Anhui Med Pharm J, 2019, 23(11): 2136-2141.
- [5] 王琰, 刘耀冲. 中药单体对胰腺癌的抑制作用及机制研究进展 [J]. 中医药导报, 2023, 29(9): 82-85, 90.
Wang Y, Liu Y C. Research progress on the inhibitory effect and mechanism of traditional Chinese medicine monomer on pancreatic cancer [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 29(9): 82-85, 90.
- [6] 陈佳骏, 邱磊, 王蕾, 等. 中药在治疗非小细胞肺癌中的潜在作用研究进展 [J]. 中成药, 2024, 46(1): 204-210.
Chen J J, Qiu L, Wang L, et al. Research progress on the

- potential role of traditional Chinese medicine in the treatment of non-small cell lung cancer [J]. Chin Tradit Pat Med, 2024, 46(1): 204-210.
- [7] Pilli R A, Rosso G B, Maria Da Conceição F. The stemona alkaloids [J]. Alkaloids Chem Biol, 2005, 62: 77-173.
- [8] Xiang J, Cheng S, Feng T L, et al. Neotuberostemonine attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by suppressing the recruitment and activation of macrophages [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 36: 158-164.
- [9] Lim D, Lee E, Jeong E, et al. Stemona tuberosa prevented inflammation by suppressing the recruitment and the activation of macrophages *in vivo* and *in vitro* [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 160: 41-51.
- [10] Yun J, Lee K Y, Park B. Neotuberostemonine inhibits osteoclastogenesis via blockade of NF- κ B pathway [J]. Biochimie, 2019, 157: 81-91.
- [11] Rinner B, Siegl V, Pürstner P, et al. Activity of novel plant extracts against medullary thyroid carcinoma cells [J]. Anticancer Res, 2004, 24(2A): 495-500.
- [12] 林思, 朱华, 秦慧真, 等. 对叶百部总生物碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡及 Bcl-2, Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(19): 73-79.
- Lin S, Zhu H, Qin H Z, et al. Effect of Stemona tuberosa alkaloids on apoptosis of SMMC-7721 cells and expression of bcl-2, bax, and cleaved caspase-3 [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(19): 73-79.
- [13] 林思, 秦慧真, 李泽宇, 等. 对叶百部总生物碱对人肺癌 A549 细胞凋亡、PI3K/Akt 和 JNK/p38 MAPK 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(4): 69-76.
- Lin S, Qin H Z, Li Z Y, et al. Effect of Stemona tuberosa alkaloids on apoptosis and PI3K/Akt and JNK/MAPK signaling pathways of human lung cancer A549 cells [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(4): 69-76.
- [14] 何石燕, 英菲雨, 夏星, 等. 基于 Wnt/ β -catenin 通路探究对叶百部碱抗卵巢癌的作用机制 [J]. 中草药, 2024, 55(17): 5887-5897.
- He S Y, Ying F Y, Xia X, et al. Mechanism of tuberostemonine against ovarian cancer based on Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(17): 5887-5897.
- [15] Hentzen N B, Mogaki R, Otake S, et al. Intracellular photoactivation of caspase-3 by molecular glues for spatiotemporal apoptosis induction [J]. J Am Chem Soc, 2020, 142(18): 8080-8084.
- [16] Estaphan S, Abdel-Malek R, Rashed L, et al. Cimetidine a promising radio-protective agent through modulating Bax/Bcl2 ratio: An *in vivo* study in male rats [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(11): 8495-8506.
- [17] 阙悦, 杨雁. 基于 Cleaved caspase-9 研究丹酚酸 B 对肝纤维化细胞凋亡的影响 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(6): 827-832.
- Kan Y, Yang Y. Effect of salvianolic acid B on apoptosis of liver fibrotic cells based on cleaved caspase-9 protein [J]. Chin Pharmacol Bull, 2019, 35(6): 827-832.
- [18] Galluzzi L, Pietrocola F, Pedro J M B, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression [J]. EMBO J, 2015, 34(7): 856-880.
- [19] Kashyap D, Garg V K, Goel N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis [J]. Adv Protein Chem Struct Biol, 2021, 125: 73-120.
- [20] 谢书海, 孙早喜. 肠道菌群与胰腺癌诊疗及发病机制的研究进展 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2022, 31(9): 1071-1074.
- Xie S H, Sun Z X. Research progress on gut microbiota and diagnosis, treatment and pathogenesis of pancreatic cancer [J]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2022, 31(9): 1071-1074.
- [21] Lan B, Zeng S Y, Grützmann R, et al. The role of exosomes in pancreatic cancer [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4332.
- [22] Zeng S Y, Pöttler M, Lan B, et al. Chemoresistance in pancreatic cancer [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4504.
- [23] Gao Y, Chen S Y, Sun J Y, et al. Traditional Chinese medicine may be further explored as candidate drugs for pancreatic cancer: A review [J]. Phytother Res, 2021, 35(2): 603-628.
- [24] 梁爽, 蒙艳丽, 刘畅, 等. 新对叶百部碱对肺炎支原体肺炎小鼠肺组织致咳因子 TRPA1 表达的影响 [J]. 中国中医药科技, 2022, 29(5): 758-761.
- Liang S, Meng Y L, Liu C, et al. Effect of neotuberostemonine on expression of cough inducing factor TRPA1 in lungs of mice with Mycoplasma pneumoniae pneumonia [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol, 2022, 29(5): 758-761.
- [25] Thandapani P, Aifantis I. Apoptosis, up the ante [J]. Cancer Cell, 2017, 32(4): 402-403.
- [26] Akbari-Birgani S, Khademy M, Mohseni-Dargah M, et al. Caspases interplay with kinases and phosphatases to determine cell fate [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 855: 20-29.

[责任编辑 兰新新]