

赤星衣酸甲酯的抗癌作用及机制研究

税靖霖¹, 贺小琼^{1*}, 姜重阳¹, 吴 怡², 姚 乾³, 郭吉寅⁴

1. 昆明医科大学公共卫生学院, 云南 昆明 650500

2. 昆明医科大学科研实验中心, 云南 昆明 650500

3. 昆明医科大学第三附属医院 云南省肿瘤研究所, 云南 昆明 650031

4. 昆明医科大学第三附属医院 生物治疗中心, 云南 昆明 650031

摘要: 目的 探讨松萝 *Usnea diffracta* 中功效化合物赤星衣酸甲酯的体外抗癌活性及其作用机制。方法 采用 MTT 法检测不同质量浓度的赤星衣酸甲酯对宣威肺癌 XWLC-05 细胞、肝癌 HepG2 细胞、乳腺癌 MCF-7 细胞的体外抗癌活性; 以流式细胞技术分析赤星衣酸甲酯对 HepG2 细胞周期的调节作用; 通过基因芯片技术分析赤星衣酸甲酯对 MCF-7 细胞基因表达的影响。结果 赤星衣酸甲酯能够显著抑制 XWLC-05、HepG2、MCF-7 细胞的增殖, 其体外抗癌作用具有明显的量效关系, 对 3 株癌细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 8.818、11.905、13.328 μg/mL。赤星衣酸甲酯主要阻滞 HepG2 细胞于 G₀/G₁ 期。基因芯片分析得到 MCF-7 细胞差异倍数大于 1.5 的 mRNA 有 2 394 个, 其中 1 605 个下调, 789 个上调。结论 赤星衣酸甲酯为首次从松萝中分离得到, 且具有较强的抗癌活性, 其作用机制可能与调节细胞周期和蛋白激酶信号通路有关。

关键词: 松萝; 赤星衣酸甲酯; 抗肿瘤活性; 细胞周期; 基因芯片

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)12-2474-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.12.017

Anticancer effects and mechanism of methyl haematommate

SHUI Jing-lin¹, HE Xiao-qiong¹, JIANG Chong-yang¹, WU Yi², YAO Qian³, GUO Ji-yin⁴

1. School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming 650500, China

2. Experiment Center for Medical Science Research, Kunming Medical University, Kunming 650500, China

3. Yunnan Cancer Institute, the Third Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650031, China

4. Center for Biological Immunotherapy, the Third Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650031, China

Abstract: Objective To study the *in vitro* inhibitory effect of methyl haematommate (a new bioactive compound in *Usnea*), on the Xuanwei lung cancer cell line (XWLC-05), Hepato carcinoma cell line (HepG2), and breast carcinoma cell line (MCF-7), and investigate its mechanism. **Methods** MTT assay was used to determine the inhibitory effect of methyl haematommate on the three cancer cell lines at different concentration (2, 4, 8, 16, and 32 μg/mL). Cell cycle of HepG2 was analyzed by flow cytometry (FCM) and microarray assay was used to identify the differentially expressed gene profiles in MCF-7. **Results** MTT results showed that methyl haematommate could significantly inhibit the proliferation of cancer cells, and the inhibition was concentration-dependent. IC₅₀ values of the compound were 8.818, 11.905, and 13.328 μg/mL in XWLC, HepG2, and MCF-7 respectively. Cell cycle analysis indicated that methyl haematommate could arrest cancer cells at G₀/G₁. Totally 2 394 mRNAs were significantly regulated by the compound in MCF-7 (fold change ≥ 1.5, *P* < 0.05), of which 789 were up-regulated and 1 605 were down-regulated. **Conclusion** Methyl haematommate is isolated from *Usnea diffracta* for the first time, and it shows inhibitory effects on human cancer cell lines *in vitro*. MAPK pathway and G₀/G₁ arrest might contribute to the anticancer effects of methyl hematommate.

Key words: *Usnea diffracta* Vain.; methyl haematommate; antitumor activity; cell cycle; microarray

癌症已经成为全人类主要的死亡病因和全球最大的公共卫生问题^[1]。全球肿瘤流行病学统计数据 (Globocan 2012) 显示, 在 2012 年全球约有 1 400

万新发癌症病例和 820 万例癌症相关死亡病例。癌症发病率呈现逐年增长趋势, 预计到 2035 年全球癌症新发病人数将达到 2 400 万人, 其中肺癌、肝癌、

收稿日期: 2017-03-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30960437); 云南省科技计划项目 (2012FB001); 昆明医科大学重大科技成果培育项目 (CGPY201603)

作者简介: 税靖霖 (1990—), 女, 研究生在读, 从事天然产物活性成分与抗肿瘤药物研发。Tel: 18206885630 E-mail: 112937289@qq.com

*通信作者 贺小琼, 男, 教授, 硕士生导师, 从事天然活性成分与抗肿瘤药物研发。Tel: 13759589108 E-mail: hexqcn@aliyun.com

乳腺癌、胃癌、肠癌是死亡病例数最多的癌症^[2]。中国癌症统计数据 (cancer statistics in China, 2015) 中指出 2015 年约有 429 万个新增癌症病例, 281 万人死于癌症, 平均每天有 7 500 例癌症死亡病例^[3]。

肿瘤的化学疗法是利用化学药物杀死肿瘤细胞、抑制肿瘤细胞生长繁殖的一种全身性治疗方式, 大部分化疗药物主要是通过细胞毒作用杀伤肿瘤细胞, 由于缺乏选择性, 同时对人体正常细胞也有很大的损伤, 治疗中患者会出现严重毒副作用, 如造血抑制、败血症、肝损伤、肾衰、脱发等症状^[4]。此外, 目前大多数肿瘤细胞对抗癌药物都产生了多药耐药性 (multi-drug resistance, MDR)^[5], 使得化疗效果不理想。因此, 开发毒性小、治疗效果好、副作用小的新型抗肿瘤药物是新药研发的一个重要内容。生物资源中存在很好的防癌、抗癌活性成分, 药用植物具有作用时间持久、多靶点、多途径、毒副作用小等优点^[6], 因此从生物资源中寻找天然的防癌、抗癌活性成分作为抗肿瘤药物, 不仅在敏感性方面有很大优势, 同时减少了化疗的副作用和并发症, 提高患者生存质量, 延长了生存时间^[7]。1955 年, 美国国家癌症所 (national cancer institute, NCI) 成立了国家癌症化疗服务中心 (cancer chemotherapy, national service center, CCNSC), 1958 年开始大规模从植物中筛选抗癌有效成分。我国也已经对 2 000 多种植物进行了抗癌活性的筛选, 其中约有 190 种在动物实验中显示了抗癌活性^[8]。

本课题组前期研究成果证实, 松萝 *Usnea diffracta* Vain. 提取物 antimutagen-He (AMH) 对生产生活中多种常见的强致癌物、致突变物如 2-氨基芘 (2-AF)、苯并 (a) 芘 (Bap)、黄曲霉毒素 (AFB1)、环磷酰胺 (CP) 等的致突变作用具有很强的抑制作用, 同时具有抑制动物移植性肿瘤生长和体外抑制人癌细胞增殖的作用^[9-12]。采用植物化学分离手段结合抗癌活性检测, 对 AMH 中的功效化合物进行了分离纯化。根据理化性质和波谱数据, 并与文献报道^[13]对照, 确定该抗肿瘤功效化合物为赤星衣酸甲酯 (methyl haematommate, $C_{10}H_{10}O_5$), 是首次从松萝中分离得到。

本实验对赤星衣酸甲酯的质量分数进行测定, 并对其体外抗癌作用进行研究, 了解其体外抗癌作用的剂量反应关系和不同癌细胞的敏感性差异, 同时采用流式细胞技术和基因芯片技术分析赤星衣酸甲酯可能的抗癌作用机制。

1 材料

1.1 细胞

宣威肺腺癌 XWLC-05 细胞、人肝癌 HepG2 细胞、乳腺癌 MCF-7 细胞由云南省肿瘤研究所提供。

1.2 药物与试剂

赤星衣酸甲酯, 质量分数 >98%, 由本实验室从松萝提取物 AMH 中分离纯化得到。

完全培养液: DMEM/F12 培养基 + 10% 胎牛血清 + 1% 青链霉素。DMEM/F12 培养基、胰蛋白酶、PBS、胎牛血清等均购买于 HyClone 公司; 顺铂 (DDP) 购于齐鲁制药有限公司; 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 购于天津金耀氨基酸有限公司; Trizol reagent 购于美国 Invitrogen 公司; RNA 抽提试剂盒 (Qiagen RNeasy Mini Kit) 购于德国 Qiagen 公司; 基因芯片试剂 (GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kit) 购于美国 Affymetrix 公司。

1.3 仪器

Thermo Forma Series II 二氧化碳培养箱、Thermo Multiskan Spectrum 酶标仪 (Thermo Fisher 公司); BD FACSCanto II 流式细胞仪 (BD 公司); 电泳仪、杂交炉、洗脱站、扫描仪等基因芯片相关仪器均来自美国 Affymetrix 公司; Olymapus-CKX41 光学倒置显微镜 (Olympus 公司)。

2 方法

2.1 HPLC 法测定赤星衣酸甲酯质量分数

采用 HPLC 法对赤星衣酸甲酯的质量分数进行测定。1 mg 赤星衣酸甲酯溶于 1 mL 的分析级醋酸乙酯, 采用 SinoChrom C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 进行检测。HPLC 对样品的峰数目和保留时间与对照组 (醋酸乙酯) 对比, 分析样品的纯度。

2.2 MTT 法检测赤星衣酸甲酯体外抗肿瘤活性

收集 3 种对数生长期肿瘤细胞, 计数并用完全培养液调整细胞密度为 1×10^6 个/mL, 接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μL, 每组设 8 个复孔, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。24 h 后移出培养液, 然后加入含不同质量浓度 (2、4、8、16、32 μg/mL) 赤星衣酸甲酯的完全培养液, 同时设对照组、DMSO 溶剂对照组、DDP (1 μg/mL) 阳性对照组。置于培养箱中继续培养 72 h 后, 吸出培养液, 每孔加入含 10% MTT (5 mg/mL) 的 DMEM/F12 培养液 200 μL, 继续培养 4 h 后, 弃培养液, 每孔加入 150 μL DMSO, 避光振荡 10 min, 采用酶标仪在 490 nm 波长处检测吸光度 (A) 值, 计算细胞的生长抑制率,

并用 SPSS 19.0 软件计算半数抑制浓度 (IC_{50})。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{DMSO}} - A_{\text{赤星衣酸甲酯}}) / A_{\text{DMSO}}$$

2.3 显微镜观察细胞形态

药物处理 72 h 后, 从培养箱中取出 96 孔板放置于倒置显微镜的载物台, 选用低倍镜下分别观察不同质量浓度的赤星衣酸甲酯作用后的细胞形态。

2.4 流式细胞仪分析细胞周期

采用流式细胞技术分析赤星衣酸甲酯对 HepG2 细胞周期的影响。收集对数生长期的 HepG2 细胞, 以 1×10^6 个/mL 的浓度接种于 75 cm^2 培养瓶中, 放入培养箱中贴壁培养 24 h。弃去剩余培养液, 分别加入含有 DMSO、5-FU (5 $\mu\text{g/mL}$) 和赤星衣酸甲酯 (16 $\mu\text{g/mL}$) 的培养液 15 mL, 其中 DMSO 为溶剂对照组、5-FU 为阳性对照组。药物处理 24 h 后, 合并收集悬浮细胞和贴壁细胞, 1 000 r/min 离心 5 min 后, 再用 70%乙醇固定, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存过夜。用 PBS 洗 1 次, 将细胞混悬于 0.5 mL 的 PI-RNase 综合染液中, 室温下避光放置 30 min, 用流式细胞仪在 488 nm 波长处检测。

2.5 基因芯片技术分析基因表达

采用基因芯片技术分析赤星衣酸甲酯对 MCF-7 细胞基因表达的影响。设 DMSO 溶剂对照组和赤星衣酸甲酯 (16 $\mu\text{g/mL}$) 组, 药物处理 72 h 后, 加 5 mL 的 Trizol reagent 抽提总 RNA, 然后将细胞液全部收集到 15 mL 离心管中, 放入 -80°C 条件下保存。干冰保存的情况下将样品寄往上海其明信息技术有限公司, 先对样品进行质控检测以及 RNA 纯度检测, 然后使用标记试剂将双链 cDNA 进行荧光标记, 与芯片 Affymetrix GeneChip[®] Human Transcriptome Array 2.0 进行杂交, 该芯片包含 67 528

个寡核苷酸探针, 可以检测编码基因及长链非编码 RNA (lncRNA)。结合 Affymetrix 提供的芯片解析软件对原始数据进行分析, 筛选差异基因。基于 KEGG 数据库, 对差异基因利用 Fisher 精确检验, 把目标基因参与的通路进行显著性分析, 从而筛选出差异基因所体现的显著性通路。

2.6 统计学分析

数据分析采用 SPSS 19.0 软件和 Microsoft excel for mac 2011 软件完成, 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析。

3 结果与分析

3.1 赤星衣酸甲酯质量分数

赤星衣酸甲酯为白色针状晶体, 难溶于甲醇, 溶于醋酸乙酯、氯仿等。因此采用醋酸乙酯 (分析级) 溶解样品, 质量浓度为 1 mg/mL。HPLC 图谱见图 1, 保留时间为 15.423 min 的峰代表赤星衣酸甲酯, 其质量分数为 98.357%。

3.2 赤星衣酸甲酯的体外抗肿瘤活性

赤星衣酸甲酯分别在 2、4、8、16、32 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下对 XWLC-05、HepG2、MCF-7 细胞作用 72 h 后的增殖抑制作用结果见表 1。

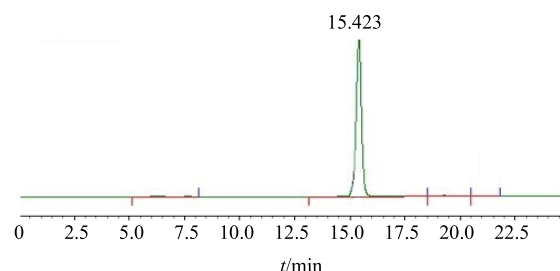


图 1 赤星衣酸甲酯的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of methyl haematommate

表 1 赤星衣酸甲酯对不同人癌细胞株的生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Inhibitory efforts of methyl haematommate on different human cancer cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	XWLC-05		HepG2		MCF-7	
		A 值	抑制率/%	A 值	抑制率/%	A 值	抑制率/%
DMSO	0	0.696 ± 0.045	—	1.234 ± 0.058	—	0.787 ± 0.010	—
DDP	1	$0.501 \pm 0.008^{**}$	28.20	$0.678 \pm 0.011^{**}$	45.05	$0.503 \pm 0.004^{**}$	36.07
赤星衣酸 甲酯	2	$0.667 \pm 0.015^{*}$	4.15	$0.980 \pm 0.035^{*}$	20.54	$0.720 \pm 0.023^{**}$	8.58
	4	$0.605 \pm 0.010^{**}$	13.07	$0.975 \pm 0.016^{*}$	20.98	$0.652 \pm 0.018^{**}$	17.18
	8	$0.402 \pm 0.015^{**}$	42.28	$0.807 \pm 0.020^{**}$	34.60	$0.533 \pm 0.012^{**}$	32.22
	16	$0.127 \pm 0.004^{**}$	81.77	$0.537 \pm 0.015^{**}$	56.50	$0.368 \pm 0.004^{**}$	53.21
	32	$0.034 \pm 0.005^{**}$	95.13	$0.279 \pm 0.023^{**}$	77.34	$0.165 \pm 0.003^{**}$	78.96

与 DMSO 组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$

$^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs DMSO group

DDP (1 $\mu\text{g/mL}$) 对 3 种细胞的抑制率依次为 28.20%、45.05%和 36.07%，差异具有统计学意义 ($P<0.01$)，说明实验条件可靠。通过 SPSS 回归分析得出赤星衣酸甲酯对 XWLC-05、HepG2、MCF-7 细胞的 IC_{50} 分别为 8.818、11.905、13.328 $\mu\text{g/mL}$ 。在 32 $\mu\text{g/mL}$ 时，赤星衣酸甲酯对 XWLC-05、HepG2、MCF-7 细胞均有显著性的抑制作用，抑制率分别为 95.13%、77.34%、78.96% ($P<0.01$)。可以得出赤星衣酸甲酯对多种癌细胞具有抑制增殖作用，抑制率随化合物的质量浓度增大而升高，存在明显的量效关系，同时不同的癌细胞对赤星衣酸甲酯的敏感性不同，其中 XWLC-05 细胞最为敏感。

显微镜下观察发现，72 h 后，DMSO 组中 XWLC-05 细胞生长紧密，贴壁生长，胞体饱满，无漂浮细胞。赤星衣酸甲酯组中，随着浓度的增加，贴壁细胞逐渐减少，细胞核皱缩，细胞变圆。在赤星衣酸甲酯质量浓度为 32 $\mu\text{g/mL}$ 时，XWLC-05 细胞几乎全部死亡，结果见图 2。

3.3 赤星衣酸甲酯对细胞周期的影响

为了进一步探讨赤星衣酸甲酯对癌细胞的增殖抑制作用是否与调节细胞周期有关，采用流式细胞仪分别比较 DMSO 组、5-FU (5 $\mu\text{g/mL}$) 组、赤星衣酸甲酯 (16 $\mu\text{g/mL}$) 组作用 24 h 后 HepG2 细胞各周期的细胞比例。结果见表 2。

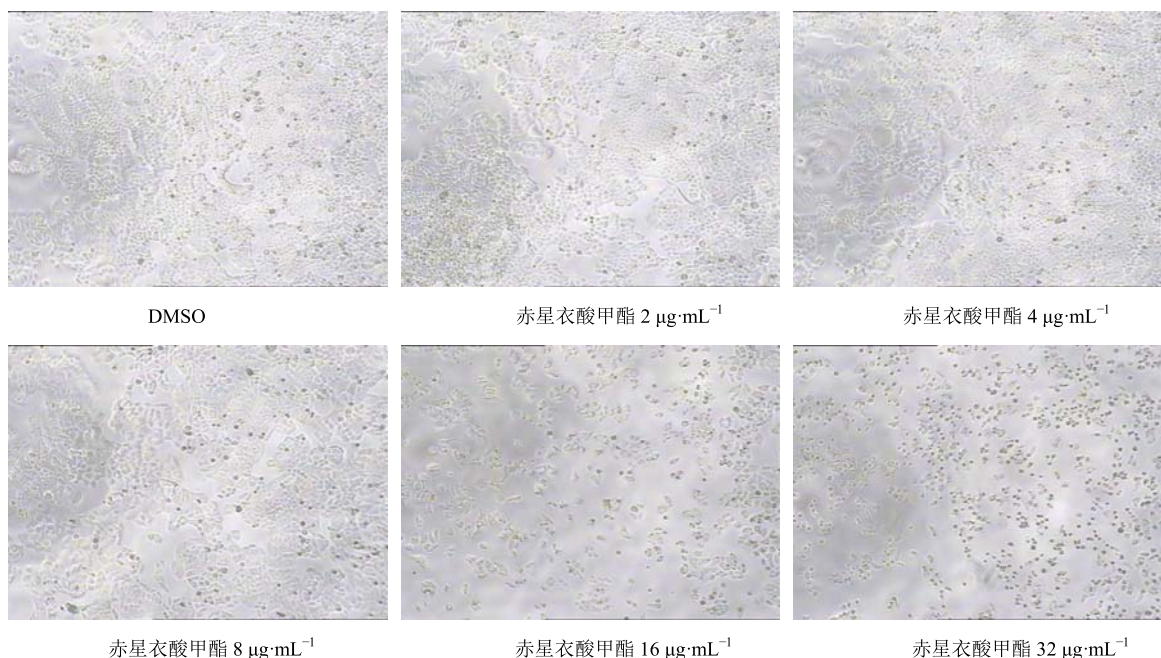


图 2 不同质量浓度的赤星衣酸甲酯对 XWLC-05 肿瘤细胞生长的影响

Fig. 2 Effect of methyl haematommate on growth of XWLC-05 cells in different doses

表 2 各组 HepG2 各细胞周期分布 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Cell cycle distribution of HepG2 cells of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞周期/%		
		G_0/G_1	S	G_2/M
DMSO	0	62.05 ± 1.45	25.82 ± 0.06	12.12 ± 1.40
赤星衣酸甲酯	16	79.96 ± 2.23	16.14 ± 5.56	5.85 ± 0.80
5-FU	5	28.88 ± 3.08	71.12 ± 3.08	0

表 2 结果显示，5-FU 组 S 期细胞所占的比例较 DMSO 组显著升高，将细胞阻滞在 S 期，这与 5-FU 的作用机制相符，说明本实验条件可靠。HepG2 细胞在赤星衣酸甲酯的作用下，处于 G_0/G_1 期的细胞数显著高于 DMSO 组，而 S 期和 G_2/M 期的细胞数低于 DMSO 组，说明赤星衣酸甲酯在调节细胞周期

的过程中，将细胞增殖阻滞在 G_0/G_1 期，使进入 S 期的细胞数量减少，阻滞细胞进入有丝分裂期。

3.4 基因芯片差异基因结果分析

赤星衣酸甲酯组与 DMSO 组比较，MCF-7 细胞差异倍数大于 1.5 的显著差异基因有 2 394 个 ($P<0.05$)，其中 1 605 个下调，789 个上调，最大的差异

倍数为 4.75。一个基因的表达受到其他基因的影响，而这个基因又影响了其他基因的表达，这种相互影响、相互制约的关系构成了复杂的基因表达调控网络，可以通过基因表达网络图进一步去挑选具有重

要节点的基因。基因表达调控网络图显示通过基因 PLCB4 共表达的基因最多，这个节点的介数为 30，其上游有 16 个基因，下游有 14 个基因。通过基因共表达分析后根据介数排名前 10 位的基因见表 3。

表 3 赤星衣酸甲酯对 MCF-7 细胞作用的核心差异基因

Table 3 Significantly altered genes in MCF-7 cells after methyl haematommate treatment

基因名称	全称	信号传递中介数	度
PLCβ4	phospholipase C, beta 4	4 431	30
JAK2	Janus kinase 2	2 754	15
GSK3β	glycogen synthase kinase 3 beta	2 535	8
PIK3Cα	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha	2 441	12
PIK3Cβ	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit beta	2 441	12
CREB1	cAMP responsive element binding protein 1	2 177	7
ENTPD3	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3	2 165	38
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	2 040	8
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	1 255	15
PLK1	polo-like kinase1	1 230	5

3.5 基因芯片信号通路分析

京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 是系统分析基因 (及其编码产物) 间关系、基因功能、基因组信息的数据库。通过数据库对目标基因参与的信号通路进行显著性分析,共筛出 93 条显著性相关的信号通路 (RVM *t*-test $P < 0.05$ 、FDR $P < 0.05$)。其中,有 8 条通路直接与癌症有关,包括非小细胞肺癌、小细胞肺癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、神经胶质瘤、胰腺癌、子宫内膜癌等。再根据信号通路上下游的关系对这 93 条通路进行进一步相互作用网络分析,结果见图 3。由图 3 可知,信号通路相互关系中最重要 3 个通路为丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路、细胞凋亡通路、细胞周期通路,3 个节点的介数分别为 30、22、20。图中与癌症直接相关的信号通路,如非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer)、子宫内膜癌 (endometrial cancer) 等都是通过各级信号通路逐级传导,最后到达这 3 个信号通路。

4 讨论

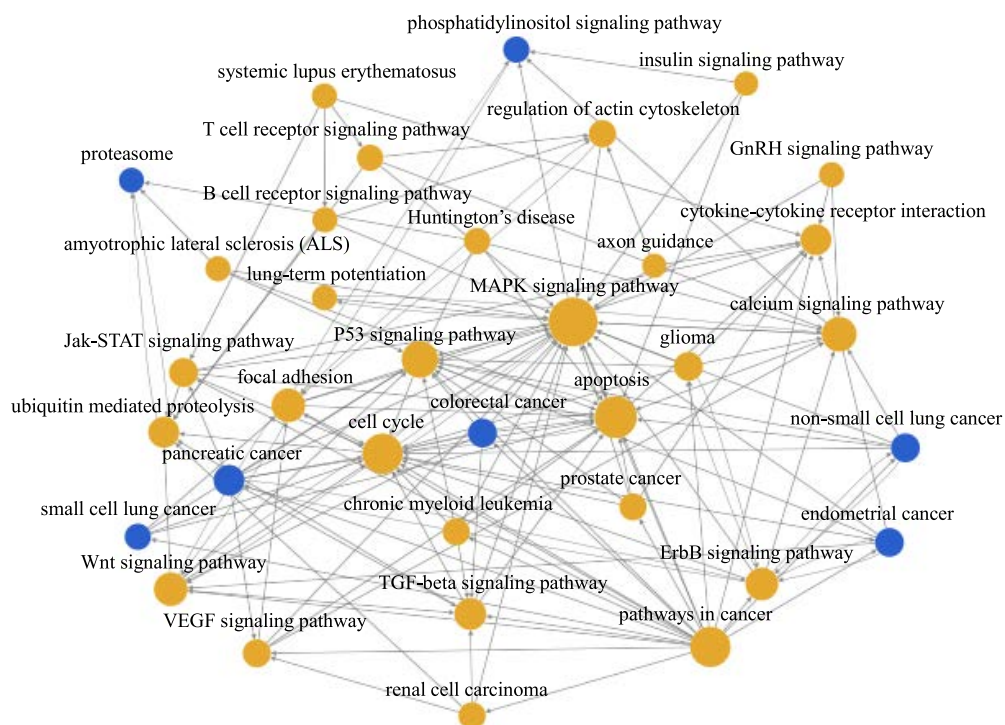
松萝属地衣门、松萝科植物,常生于深山的老树枝干或高山岩石上,在《本草纲目》《名医别录》中均有记载。很多研究表明,松萝具有很强的抗菌和抗病毒的作用,其中含有的松萝酸的抗菌作用尤为突出,有清肝、化痰、止血、解毒等作用^[14]。目前临床上已经使用从松萝中提取的松萝酸钠治疗肺结核和慢性气管炎等疾病,但是关于松萝提取物在抗癌作用方面的研究却很少。因此本实验对松萝功效化合物赤星衣酸甲酯体外抗癌作用进行研究,并在作

用机制方面进行了初步探索,其作用机制可能与调节细胞周期以及蛋白激酶信号通路有关。

本实验结果表明赤星衣酸甲酯对不同的癌细胞具有一定的靶向性,当质量浓度为 32 μg/mL 时,对 XWLC-05 细胞的抑制率达到了 95.13%,相同质量浓度下对 MCF-7 细胞抑制率只有 78.96%。说明 XWLC-05 细胞对赤星衣酸甲酯较为敏感,此结果在基因芯片相关分析中也得到了进一步验证,赤星衣酸甲酯能直接作用于肺癌相关的信号通路。肿瘤细胞的特点是具有一个开放的细胞周期,这有助于其增殖失控。由于许多抗癌药物细胞周期阻滞的分子机制涉及多种细胞周期调控蛋白的调控区域,为了研究赤星衣酸甲酯的作用机制是否与调节细胞周期、抑制细胞增殖有关,本实验采用流式细胞仪检测了赤星衣酸甲酯对细胞周期的影响。结果发现,赤星衣酸甲酯主要将细胞阻滞于 G₀/G₁ 期,使进入 S 期的细胞数量减少,阻滞细胞进入有丝分裂期,从而抑制癌细胞增殖。由于细胞处于不同周期时相应的周期蛋白 (cyclin A、B、D、E、G) 的浓度也会随之改变,这些周期蛋白可以与蛋白激酶 (CDKs) 结合,通过调节酶活性来调节细胞周期。

从基因芯片的差异基因分析发现,核心基因中有很多关于细胞周期蛋白调节的基因 (如 cyclin E2、CDK2),且均为下调。通过下调 CDK2 等 D 型细胞周期蛋白可将细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期^[15-17]。因此,从基因的角度也进一步验证了调节细胞周期是赤星衣酸甲酯抑制癌细胞增殖的机制之一。

基因芯片分析的差异基因中,有很多已报道的



黄色圆点代表上调和下调差异基因都参与的显著性信号通路，蓝色圆点为下调差异基因参与的显著性信号通路，带箭头的实线表示 2 个信号通路之间的上下游关系，箭头起始端为上游信号通路，箭头指向端为下游的效应信号通路

Yellow nodes indicate that these pathways harbored both upregulated and downregulated genes related to the pathways and blue nodes represent the downregulated pathways; Lines indicate interactions between pathways, where pathways indicated by the arrowhead are regulated by the pathways located at the arrow tails

图 3 信号通路相互关系网络

Fig. 3 Pathway network (path-net) analysis of MCF-7 cells after methyl haematommate treatment

抗癌基因，如 Rb1、BRCA2、Bcl2、N-MYC 等。通过差异基因相互作用进一步分析可知，基因 PLC β 4 是其中介导数最多的。PLC β 4 作为磷脂酶 C 家族 (PLC-b、c、d、e、f、g) 的 1 种，其编码的蛋白能催化磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸的三磷酸肌醇和甘油二酯的形成。此反应利用钙作为辅助，并在许多细胞外信号的细胞内转导中起着重要的作用。

PLCB4 可以通过调节 G 蛋白来促进三磷酸 (IP3，作为触发 Ca²⁺离子通路的第二信使) 的产生，从而激活 Ca²⁺离子通路^[18]。根据 KEGG 数据库对信号通路的描述，Ca²⁺离子通路可以进一步诱导 MAPK 信号通路和细胞凋亡信号通路的激活，其中 MAPK 又是介导数最多的信号通路。MAPK 是细胞内一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，在细胞的增殖、生长、凋亡及细胞间功能同步化的过程中发挥着关键性作用。目前在哺乳动物细胞中发现了 5 条并行的 MAPK 信号通路：细胞外信号调节激酶 (ERK)、c-Jun N-末端激酶 (JNK/SAPK)、p38 激酶同工酶 (p38A、p38B、p38C 和 p38D)、ERK3/ERK4、ERK5。

MAPK 信号传导通路通过一系列酶的激活和失活调节细胞内的某些反应，参与肿瘤生长、增殖和转移。p38/MAPK 可通过直接或间接活化 caspase 家族成员，通过 caspase 依赖途径诱导细胞凋亡，如肿瘤坏死因子以此途径发挥作用^[19]。p38/MAPK 可以通过非 caspase 依赖途径诱导细胞凋亡，可通过磷酸化 p53 的特殊位点，使其活化诱发细胞凋亡；参与 FAS-FasL 介导的凋亡的调控；可直接作用于抗凋亡蛋白 Bcl-2 家族成员，诱发肿瘤细胞凋亡^[20]。ERK 也参与了肿瘤的侵袭和转移，有些药物是通过抑制 MAPK/ERK 通路的激活，下调基质金属蛋白酶 2/9 (MMP-2/9) 的表达，抑制肿瘤细胞的侵袭和转移^[21]。ERK 通路不仅与肿瘤的发生、发展有关，可能也参与了肿瘤细胞的耐药过程，其作用机制可能是通过调控耐药相关基因和蛋白的表达。ERK/MAPK 信号转导系统可以通过调节耐药相关基因和蛋白如 MDR1、MRP1、LRP 等的表达来参与肿瘤细胞的耐药过程^[22]。可考虑以 MAPK 通路作为一个治疗肿瘤化疗抵制的新靶点，为逆转肿瘤

的多药耐药性提供新的战略方针。

在本研究中,选择了呼吸、消化、生殖系统具有代表性的3种细胞株HepG2、MCF-7和XWLC-05细胞,其中XWLC-05细胞是具有云南地方特色的细胞株,这些细胞株被广泛运用于抗肿瘤药物的研究中。同时,研究中使用的基因芯片是一种通过分析mRNA并结合数据库,通过对特定刺激的反应发现关键途径和调节基因的有力工具。实验表明赤星衣酸甲酯的抗癌作用机制与调节细胞周期和蛋白激酶信号通路有关。然而本研究中体外抗肿瘤检测仅研究了赤星衣酸甲酯对肺癌、肝癌以及乳腺癌的体外抗癌作用,对其他癌细胞株有待进一步的研究,发现更多的敏感细胞株,从而全面地了解其应用前景。由于体外实验可控性强,干扰因素少,为了进一步了解赤星衣酸甲酯是否能在体内环境下也表现出强抗癌作用的疗效,下一步将采用裸鼠体内移植人癌细胞株进行体内实验。同时,对化合物进行毒理学安全性评价,检测赤星衣酸甲酯是否对机体具有有害作用。

志谢:昆明医科大学科研实验中心、昆明医科大学第三附属医院云南省肿瘤研究所以及生物免疫治疗中心在科研上给予的帮助。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(1): 5-29.
- [2] Torre L A, Bray F, Siegel R L. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [3] Chen W Q, Zheng R S, Baade P D, *et al*. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [4] 段庚仙. 恶性肿瘤化疗的毒副作用及其防治 [J]. *肿瘤研究与临床*, 2004, 16(5): 353-354.
- [5] Kobayashi E, Hornicek F J. Lipid-functionalized dextran nanosystems to overcome multidrug resistance in cancer [J]. *Clin Orthop Relat R*, 2013, 471(3): 915-925.
- [6] Gai R Y, Xu H L, Qu X J, *et al*. Dynamic of modernizing traditional Chinese medicine and the standards system for its development [J]. *Drug Discov Ther*, 2008, 2(1): 2-4.
- [7] Qi F H, Li A Y. Chinese herbal medicines as adjuvant treatment during chemo- or radio-therapy for cancer [J]. *Biosci Trends*, 2010, 4(6): 297-307.
- [8] 史清文, 李力更, 霍长虹, 等. 天然药物化学研究与新药开发 [J]. *中草药*, 2010, 41(10): 1583-1589.
- [9] He X Q, Hu Y, Winter J, *et al*. Anti-mutagenic lichen extract has double-edged effect on azoxymethane-induced colorectal oncogenesis in C57BL/6J mice [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2010, 20(1): 31-35.
- [10] He X Q. The inhibitory effects of natural plant extract AMH on the mutagenicity of several carcinogens *in vitro* [J]. *Chin J Lymphol Oncol*, 2004, 3(2): 105-107.
- [11] 贺小琼. 天然植物制剂 AMH 体外抑制多种强致癌物的致突变作用 [J]. *肿瘤*, 2003, 23(6): 494-496.
- [12] 贺小琼, 李凝诗, 李 凤, 等. 真菌提取物 AMH 的肿瘤化学预防活性组分追踪 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2011, 23(3): 166-170.
- [13] Rojas I S, Lotinahennsen B, Mata R. Effect of lichen metabolites on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(10): 1396-1399.
- [14] Sultana N, Afolayan A J. A new depsidone and antibacterial activities of compounds from *Usnea undulata* Stirton [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2011, 13(12): 1158-1164.
- [15] Saleh A M, El-Abadela M M, Aziz M A. Antiproliferative activity of the isoindigo 5'-Br in HL-60 cells is mediated by apoptosis, dysregulation of mitochondrial functions and arresting cell cycle at G₀/G₁ phase [J]. *Cancer Lett*, 2015, 361(2): 251-261.
- [16] Zuo M X, Li Y, Wang H B, *et al*. The antitumor activity of meisoindigo against human colorectal cancer HT-29 cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Chemother*, 2008, 20(6): 728-733.
- [17] Moon M J, Lee S K, Lee J W, *et al*. Synthesis and structure-activity relationships of novel indirubin derivatives as potent anti-proliferative agents with CDK2 inhibitory activities [J]. *Bioorg Med Chem*, 2006(14): 237-246.
- [18] Ishida S, Matsu-ura T, Fukami K, *et al*. Phospholipase C-b1 and b4 contribute to non-genetic cell-to-cell variability in histamine-induced calcium signals in HeLa cells [J]. *Plos One*, 2014, 9(1): 1-12.
- [19] Azijli K, Yuvaraj S, Roosmalen I, *et al*. MAPK p38 and JNK have opposing activities on TRAIL-induced apoptosis activation in NSCLC H460 cells that involves RIP1 and caspase-8 and is mediated by Mcl-1 [J]. *Apoptosis*, 2013, 18(7): 851-860.
- [20] 李 琦, 刘宁宁, 范忠泽. p38 丝裂原活化蛋白激酶信号转导对肿瘤细胞凋亡的调控 [J]. *国际肿瘤学杂志*, 2009, 36(3): 163-166.
- [21] Deng W, Sui H, Wang Q, *et al*. A Chinese herbal formula, Yi-Qi-Fu-Sheng, inhibits migration/invasion of colorectal cancer by down-regulating MMP-2/9 via inhibiting the activation of ERK/MAPK signaling pathways [J]. *BMC Compl Altern Med*, 2013, 13(1): 65-75.
- [22] 朱 虹, 陈孝平, 罗顺峰, 等. ERK/MAPK 通路参与肝癌产生多药耐药的胞内信号传导 [J]. *中华外科杂志*, 2007, 45(13): 917-920.