

岩大戟内酯B对HeLa细胞增殖的影响及其凋亡机制研究

马玉坤¹ 汤拓² 张鲁平² 孙珈¹ 郑皑雪² 洪鲜¹ 李静辉³ 王涛¹ 洪瑜^{1▲}

1. 齐齐哈尔医学院医药科学研究院, 黑龙江齐齐哈尔 161006; 2. 齐齐哈尔医学院医学技术学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006; 3. 齐齐哈尔医学院国有资产管理处, 黑龙江齐齐哈尔 161006

[摘要] 目的 研究岩大戟内酯B (JB) 对宫颈癌(HeLa) 细胞增殖与凋亡的影响及作用机制。方法 将体外培养的 HeLa 细胞分为空白对照组和 JB 组(0.05、0.1、0.2、0.4 mmol/L), 通过显微镜观察法、CCK-8 实验法对经过 JB 处理的 HeLa 细胞的形态以及增殖能力进行检测, 同时使用流式细胞技术荧光素 5-异硫氰酸酯(FITC)、碘化丙啶双标法、蛋白质免疫印记法等方法对细胞的凋亡率及凋亡关键蛋白表达情况进行研究。结果 与空白对照组比较, JB 在 0.05 ~ 0.2 mmol/L 范围内的细胞增殖抑制率显著增高($P < 0.05$), 且随 JB 浓度和处理时间的增加而显著提升; JB 0.05 ~ 0.2 mmol/L 组的相关蛋白表达量 Caspase-3、Bax 显著上调($P < 0.05$) 而 PCNA、Bcl-2 显著下调($P < 0.05$)。结论 JB 能有效抑制 HeLa 细胞增殖, 实现其诱导细胞凋亡的作用, 该机制可能和参与调控 HeLa 细胞增殖与凋亡的相关蛋白表达密切相关, JB 刺激 HeLa 细胞能够通过加重炎症反应从而促进癌症细胞凋亡的发生发展, 进而抑制 HeLa 细胞的增殖能力。

[关键词] 岩大戟内酯B; HeLa 细胞; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-0616 (2025) 05-0013-04

DOI: 10.20116/j.issn2095-0616.2025.05.03

Study on the effect of Jolkinolide B on HeLa cell proliferation and its apoptosis mechanism

MA Yukun¹ TANG Tuo² ZHANG Luping² SUN Jia¹ ZHENG Aixue² HONG Xian¹
LI Jinghui³ WANG Tao¹ HONG Yu¹

1. Research Institute of Medical Science, Qiqihar Medical University, Heilongjiang, Qiqihar 161006, China; 2. College of Medical Technology, Qiqihar Medical University, Heilongjiang, Qiqihar 161006, China; 3. Section of State-owned Assets Management, Qiqihar Medical University, Heilongjiang, Qiqihar 161006, China

[Abstract] Objective To study the effect and mechanism of Jolkinolide B (JB) on the proliferation and apoptosis of cervical cancer (HeLa) cells. **Methods** HeLa cells cultured in vitro were divided into blank control group and JB group (0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mmol/L). The morphology and proliferation ability of HeLa cells treated with JB were detected by microscopic observation and CCK-8 experiment. Flow cytometry techniques such as fluorescein 5-isothiocyanate (FITC), propidium iodide double staining, and Western blot were used to study the apoptosis rate and expression of key apoptotic proteins. **Results** Compared with the control group, the cell proliferation inhibition rate of JB was significantly increased within the range of 0.05-0.2 mmol/L ($P < 0.05$), and significantly increased with the increase of JB concentration and treatment time. The protein expression levels of Caspase-3 and Bax were significantly upregulated ($P < 0.05$) in the JB 0.05-0.2 mmol/L group, while PCNA and Bcl-2 were significantly downregulated ($P < 0.05$). **Conclusion** JB can effectively inhibit the proliferation of HeLa cells and induce cell apoptosis. This mechanism may be closely related to the expression of related proteins involved in regulating HeLa cell proliferation and apoptosis. JB stimulation of HeLa cells can promote the occurrence and development of cancer cell apoptosis by exacerbating the inflammatory response, thereby inhibiting the proliferation ability of HeLa cells.

[Key words] Jolkinolide B; HeLa cell; Proliferation; Apoptosis

[基金项目] 黑龙江省齐齐哈尔市科技计划联合引导项目(LSFGG-2022039); 黑龙江省卫生健康委科研项目(20221313050620)。

▲通讯作者

恶性肿瘤发病率和致死率呈现逐年上升的趋势, 已经成为世界性待解决的疑难病症, 其中宫颈癌是女性恶性肿瘤中最为常见的病症, 且女性患宫颈癌的患病

年龄越来越低^[1]。目前临床上对宫颈癌的治疗方法存在着副作用和并发症,发展高效、低细胞毒性的化学疗法成为当务之急^[2]。

《神农本草经》首次记载狼毒大戟具有较好的抗癌功效,对于恶性肿瘤的治疗及预后,都有较好的疗效,而且毒副作用极小^[3-4],分子式为 C₂₀H₂₆O₄,分子量为 330.42 g/mol 的根部提取化合物岩大戟内酯 B (Jolkinolide B, JB),经验证具有抑制癌细胞增殖、抗病毒等生物学功能^[5],见图 1。JB 在体外和体内都有很强的抗肿瘤作用,其作用机制是诱导细胞凋亡,抑制细胞的迁移^[6]。相关报道显示,JB 对人体多部位产生肿瘤均有明显的治疗效果^[7]。本研究通过探讨 JB 对宫颈癌(HeLa)细胞处理后的细胞周期变化以及细胞凋亡影响,探寻 JB 对宫颈癌的作用机制,有望成为宫颈癌治疗的潜在化疗药。

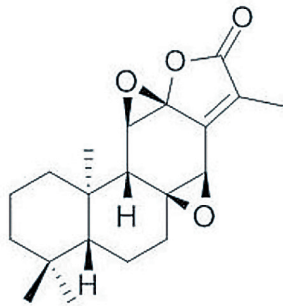


图 1 JB 分子结构式

1 材料与方法

1.1 细胞株的选择

HeLa 细胞购于国家生物医学实验细胞资源库。

1.2 试剂及相关仪器

本研究所用试剂及相关仪器见表 1 ~ 2。

表 1 实验所用相关试剂

试剂名称	生产厂家	货号
JB	加拿大 TRC 公司	P468400
CCK-8 检测试剂盒	MCE	HY-K0301
细胞凋亡试剂盒	美国 BD 公司	556547
内参抗体 GAPDH	PTG 公司	60004-1-Ig
兔单克隆抗体 Caspase-3	CST 公司	9662S
兔单克隆抗体 PCNA	PTG 公司	10205-2-AP
兔单克隆抗体 Bcl-2	PTG 公司	12789-1-AP
兔单克隆抗体 Bax	PTG 公司	50599-2-Ig
二抗兔抗	santa 公司	sc-2357
鼠抗	santa 公司	sc-516102
DMEM 高糖培养基	Hyclone 公司	SH30022.01
胎牛血清(FBS)	CLARK 公司	FB25015
胰酶	美国 Gibco 公司	25200056

注 JB: 岩大戟内酯 B

表 2 实验所用主要仪器

试剂名称	仪器型号	生产厂家
全波长酶标仪	SpectraMax 190	美国 Molecular Devices 公司
荧光倒置显微镜	TS100	日本尼康公司
药品冷藏箱	MPR-312DCN-PC	松下集团(中国大连)有限公司
超低温冰箱	MDF-U339	松下集团(中国大连)有限公司
二氧化碳培养箱	Thermo 3111	美国赛默飞世尔科技公司
高速冷冻离心机	Thermo X3R	美国赛默飞世尔科技公司
BDFACS 流式细胞仪	BDFACSCALLBUR	Becton, Dickinson and Company
电泳仪	JY300C	北京君意东方电泳设备有限公司
电泳槽	JY-SCZ 2+	北京君意东方电泳设备有限公司
超灵敏多功能成像仪	Amersham Imager 680	美国通用电气公司
电子天平	BSA4202S	赛多利斯科学仪器(北京)有限公司

1.3 HeLa 细胞培养及传代

取宫颈癌细胞株 HeLa,接种于 DMEM 高糖培养基(内含 1% 双抗、10% 胎牛血清),于 37℃、5%CO₂ 培养。

1.4 JB 细胞毒性测定

利用 CCK-8 法对 JB 的细胞毒性进行检测,取 HeLa 细胞消化后按每孔细胞数为 5 × 10³ 个接种于 96 孔板中,经 37℃、5%CO₂ 培养过夜后,用药组加入含 JB 的 DMEM 高糖培养液 100 μl 至 JB 终浓度分别为 0.05、0.1、0.2、0.4 mmol/L,于 37℃、5%CO₂ 条件下培养,分别在 1、3、5、7、12、24 h 加入 10 μl CCK-8 溶液,孵育 2 h 后,使用酶标仪测定吸光度值(检测波长为 450 nm)。

1.5 JB 对 HeLa 细胞凋亡的影响

将 HeLa 细胞接种于 6 孔板中,接种细胞数为 1 × 10⁵ 个/孔。于 37℃、5%CO₂ 孵育 12 h 后分别加入终浓度为 0.05、0.1、0.2、0.4 mmol/L JB,孵育 4 h。使用 4℃ 预冷的 PBS 洗涤收集到的细胞,并加入 5 μl AnnexinV-FITC 与 PI,轻旋细胞后,常温下避光孵育 30 min; 然后加入体积为 400 μl 的 Binding Buffer 结合缓冲液混匀,尽快上机检测。

1.6 JB 对细胞周期和凋亡相关蛋白表达的影响

将 HeLa 细胞接种于每孔 2.5 ml 培养基的 6 孔板中,37℃、5%CO₂ 孵育 12 h 后,分别加入终浓度为 0.05、0.1、0.2、0.4 mmol/L 的 JB 混合液,孵育 4 h 后,细胞于冰上加 PBS 冲洗,用细胞刮刀收集细胞,测定蛋白浓度,加入相应体积的 6 倍上样缓冲液,调整蛋

白浓度为 2 mg/ml, 95℃变性 5 min 得蛋白样品。上样 20 μl 后, 电转至 PVDF 膜上; 封闭 30 min 后, 加入一抗 GAPDH、Caspase-3、PCNA、Bax、Bcl-2 后 4℃ 孵育过夜, TBST 清洗后, 在室温条件下二抗孵育 1.5 h; 再次清洗后, 曝光, 显影。

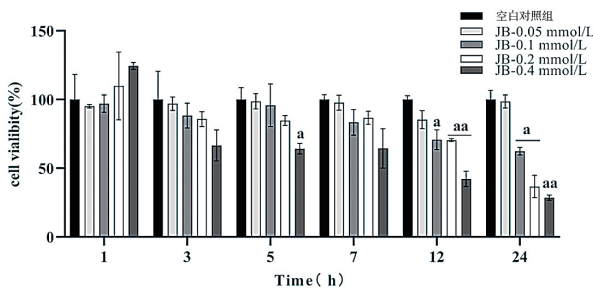
1.7 统计学处理

实验数据用 Graphpad Prism 8、Image J 软件进行分析处理, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果与分析

2.1 JB对HeLa细胞增殖的抑制作用

如图 2 所示, 与空白对照组比较, 采用不同 JB 浓度的用药组在处理 HeLa 细胞 1、3、5、7、12、24 h 后, 细胞增殖抑制率均有不同程度的升高, 且 JB 处理 12、24 h 后细胞的增殖抑制率显著增加。JB 0.05、0.1、0.2、0.4 mmol/L 组对 HeLa 细胞的增殖抑制率与浓度呈显著正相关 ($P < 0.05$), 其中 0.2、0.4 mmol/L 组明显增加 ($P < 0.01$)。结果表明, JB 对 HeLa 细胞增殖具有明显的抑制作用, 且浓度越高, 抑制作用越明显。



注 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$

图 2 不同浓度 JB 及处理时间对 HeLa 细胞增殖能力的影响

2.2 JB对HeLa细胞凋亡的影响

采用 AnnexinV/FITC/PI 双染试剂盒对 HeLa 细胞进行凋亡检测。如表 3 所示, 相较于空白对照组的细胞凋亡率 (6.91 ± 0.60)%, 以 0.05、0.1、0.2、0.4 mmol/L 浓度的 JB 处理 HeLa 细胞 4 h 后, 细胞的凋亡程度均有显著增加 ($P < 0.05$), 分别为 (9.68 ± 0.32)%、(11.26 ± 0.42)%、(14.70 ± 1.85)% 和 (17.47 ± 0.55)%, 且当 JB 浓度达到 0.4 mmol/L 时与对照组比较, 凋亡率差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。结果显示 JB 呈浓度相关性地诱导 HeLa 细胞凋亡。

2.3 JB对HeLa细胞凋亡相关蛋白表达的影响

蛋白质免疫印记法检测不同浓度 JB 条件下 HeLa 细胞凋亡相关蛋白 PCNA、Bax、Bcl-2、Caspase-3 的表达情况, 结果如图 3 所示。与空白对照组比较, 不同 JB 浓度处理 HeLa 细胞 4 h 后, 促凋亡蛋白 Bax 及凋亡关键蛋白酶 Caspase-3 表达量均显著升高 ($P < 0.01$); 而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达量显著降低 ($P < 0.01$)。JB 对 HeLa 细胞中 PCNA、Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达的调节具有浓度相关性 ($P < 0.01$)。结果显示, JB 通过调节凋亡相关蛋白 PCNA、Bax、Bcl-2、Caspase-3 的表达诱导 HeLa 细胞凋亡, 并将细胞阻滞于 G2/M 期。

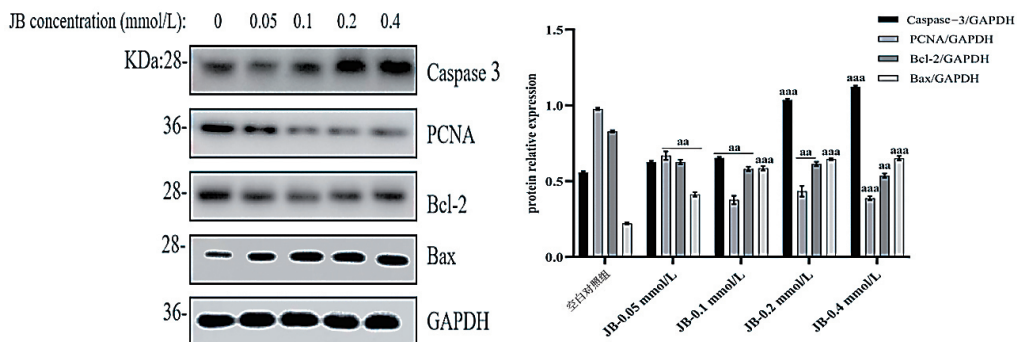
3 讨论

天然的萜类化合物有良好的抗肿瘤作用, 且在大多数癌症治疗中有较大的潜力 [8-9]。JB 是天然中药狼毒的有效成分, 研究显示 JB 通过激活乳腺癌 MDA-MB-231 细胞、U937 细胞凋亡线粒体和死亡受体途径并上调 Bax/Bcl-2 表达比例, 促进

表 3 不同浓度 JB 对 HeLa 细胞凋亡的影响

JB 浓度 (mmol/L)	0	0.05	0.1	0.2	0.4
凋亡率 (%)	6.91 ± 0.60	9.68 ± 0.32^a	11.26 ± 0.42^a	14.70 ± 1.85^{aa}	17.47 ± 0.55^{aaa}

注 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$



注 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$, ^{aaa} $P < 0.001$

图 3 不同 JB 浓度对 HeLa 细胞相关蛋白的影响

Fas, FasL 和 Caspase-8 的活化来抑制乳腺癌 MDA-MB-231、U937 细胞的增殖^[10-13]。

细胞的增殖和凋亡是检测细胞存活的重要指标,在癌细胞的生长过程中尤为重要。Caspase-3、PCNA、Bax 和 Bcl-2 是目前观察细胞增殖和凋亡的常用指标,PCNA 蛋白在 DNA 链的合成和延伸作用增强后可以对细胞生长和增殖起到促进作用^[14],而 Bcl-2 和 Bax 蛋白是细胞凋亡中检测的两种重要蛋白,Bax/Bcl-2 比值可以作为细胞凋亡研究的重要因素^[15]。本研究探讨 JB 对 HeLa 细胞凋亡率的影响,这些结果表明 HeLa 细胞使受损未复制的 DNA 无法进入有丝分裂,随后诱导细胞凋亡。

综上所述,JB 具有抑制 HeLa 细胞增殖、诱导 HeLa 细胞凋亡的作用,其作用机制与 JB 抑制 HeLa 细胞 Caspase-3、PCNA 表达以及调控肿瘤细胞增殖的表达有关。

利益冲突:所有作者声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] Parkhurst JO, Vulimiri M. Cervical cancer and the global health agenda: Insights from multiple policy-analysis frameworks[J]. *Global Public Health*, 2013, 8 (10): 1093-1108.
- [2] Mackay HJ, Wenzel L, Mileshekin L. Nonsurgical management of cervical cancer: locally advanced, recurrent, and metastatic disease, survivorship, and beyond[J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2015, 35(35): e299-309.
- [3] 史影雪, 赫军, 张佳, 等. 狼毒大戟化学成分研究[J]. *中草药*, 2020, 51 (8): 136-140.
- [4] 刘文燊, 吴晓云. 狼毒大戟二萜内酯对人癌细胞体外抑制作用的研究[J]. *中药材*, 2000, 23 (10): 623-625.
- [5] Wang JH, Zhou YJ, Bai X, et al. Jolkinolide B from *Euphorbia fischeriana* Steud induces apoptosis in human leukemic U937 cells through PI3K/Akt and XIAP pathways[J]. *Molecules and Cells*, 2011, 32 (5): 451-457.
- [6] Lin Y, Cui H, Xu H, et al. Jolkinolide B induces apoptosis in MDA-MB-231 cells through inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Oncology Reports*, 2012, 27 (6): 1976-1980.
- [7] Wang JH, Zhang K, Niu HY, et al. Jolkinolide B from *Euphorbia fischeriana* Steud induces in human leukemic cells apoptosis via JAK2/STAT3 pathways[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2013, 51 (3): 170-178.
- [8] Aiello P, Sharghi M, Mansourkhani SM, et al. Medicinal Plants in the Prevention and Treatment of Colon Cancer[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019 (10): 1-53.
- [9] Zhang H, Qian J, Jin M, et al. Jolkinolide B induces cell cycle arrest and apoptosis in MKN45 gastric cancer cells and inhibits xenograft tumor growth in vivo[J]. *Biosci Rep*, 2022, 42 (6): BSR20220341.
- [10] Uto T, Qin GW, Morinaga O, et al. 17-Hydroxy-jolkinolide B, a diterpenoid from *Euphorbia fischeriana*, inhibits inflammatory mediators but activates heme oxygenase-1 expression in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 12 (1): 101-109.
- [11] Sang J, Li W, Diao HJ, et al. Jolkinolide B targets thioredoxin and glutathione systems to induce ROS-mediated paraptosis and apoptosis in bladder cancer cells[J]. *Cancer Letters*, 2021, 7 (509): 13-25.
- [12] 陈林俊, 陈文斌. 岩大戟内酯 B 通过阻断 PI3K/Akt/NF- κ B 通路抑制结肠癌细胞的增殖和转移[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2021, 26 (3): 250-257.
- [13] Renault TT, Dejean LM, Manon S. A brewing understanding of the regulation of Bax function by Bcl-xL and Bcl-2[J]. *Mech Ageing Dev*, 2017, 161 (Pt.B): 201-210.
- [14] Gustavsson M. New insights into the structure and function of chemokine receptor: chemokine complexes from an experimental perspective[J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 107 (6): 1115-1122.
- [15] Qi YL, Li Y, Man XX, et al. CXCL3 overexpression promotes the tumorigenic potential of uterine cervical cancer cells via the MAPK/ERK pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235 (5): 4756-4765.

(收稿日期: 2024-05-09)