

技术与方法

牛蒡子苷元衍生物对肿瘤细胞的抑制作用及其机制研究

刘芳菲¹ 舒晖¹ 刘丁瑞¹ 张欣宏¹ 朱颜铂² 赵岩¹ 蔡恩博¹ 韩佳宏^{1*}

(¹吉林农业大学中药材学院, 长春 130118;

²吉林大学第一医院干细胞与肿瘤中心器官再生与移植教育部重点实验室, 长春 130021)

摘要 在该研究中, 共设计出27种牛蒡子苷元衍生物, 其中9种为新型靶向肿瘤细胞线粒体的衍生物。生物学研究表明, 与牛蒡子苷元相比, 所有连接有三苯基膦的化合物的抗肿瘤活性均有大幅度的提高。其中, Mito-ARG-7对A549细胞显示出高度的选择性, 其抗肿瘤活性相对于牛蒡子苷元增加了86.38%。其研究表明, Mito-ARG-7的抗肿瘤机制包括明显增加A549细胞内活性氧的产生量, 引起细胞线粒体膜电位下降, 促进内源性线粒体凋亡信号通路上的凋亡蛋白Cytochrome C自线粒体向细胞质的释放, 以及引起Caspase家族蛋白的活化, 最终诱发肿瘤细胞的凋亡。该研究合成的具有线粒体靶向功能的新牛蒡子苷元衍生物为靶向抗肿瘤药物的研发提供了参考。

关键词 牛蒡子苷元衍生物; A549细胞; 线粒体途径; 细胞凋亡

Inhibitory Effect of Arctigenin Derivatives on Tumor Cells and Its Mechanism

LIU Fangfei¹, SHU Hui¹, LIU Dingrui¹, ZHANG Xinhong¹, ZHU Yanbo², ZHAO Yan¹, CAI Enbo¹, HAN Jiahong^{1*}

(¹College of Chinese Medicinal Material, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

²Key Laboratory of Organ Regeneration and Transplantation of Ministry of Education, Stem Cell and Cancer Center, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract In this study, a total of 27 ARG (arctigenin) derivatives were designed, of which nine were novel derivatives targeting tumor cell mitochondria. Biological studies showed that all the triphenylphosphine conjugated compounds had a significant increase in anti-tumor activity compared with ARG. Among them, Mito-ARG-7 showed a high selectivity against A549 cells, and its anti-tumor activity was increased by 86.38% compared with ARG. This study showed that the anti-tumor mechanisms of Mito-ARG-7 included significantly increasing the production of reactive oxygen species in A549 cells, causing a decrease in mitochondrial membrane potential, promoting the release of apoptotic protein Cytochrome C from mitochondria to cytoplasm in the endogenous mitochondrial apoptosis signaling pathway, and causing the activation of Caspase family proteins to eventually induce the apoptosis of tumor cells. The novel arctigenin derivative with mitochondrial targeting function synthesized in this study provides a reference for the development of targeted anti-tumor drugs.

Keywords arctigenin derivatives; A549 cells; mitochondrial pathway; apoptosis

收稿日期: 2024-04-06

接受日期: 2024-04-30

吉林省科技发展计划(批准号: 20210101234JC)资助的课题

*通信作者。Tel: 13404322583, E-mail: hanjiahong126621@126.com

Received: April 6, 2024

Accepted: April 30, 2024

This work was supported by the Science and Technology Development Plan of Jilin Province (Grant No.20210101234JC)

*Corresponding author. Tel: +86-13404322583, E-mail: hanjiahong126621@126.com

癌症已成为威胁人类健康的重大疾病,其致死率高,是导致人类预期寿命降低的重要因素之一^[1]。而肺癌致死数约占全球癌症致死总数的18%,且发病率呈年轻化趋势^[2]。当前肺癌治疗方法主要有手术、化疗、放疗及免疫治疗等,尽管治疗方法有很大提升,但肺癌患者5年生存率仍低于21%,且治疗过程中存在不良反应、耐药性、应答率低等问题不容忽视^[3],寻找一种有针对性的治疗方法是当前研究的热点。

如今,中药化学成分的衍生化合物在癌症治疗中的研究越来越多。据统计,在1981年至2019年的时间框架内,全球批准的1 211个新化学实体中,65.3%药物属于天然产物或天然产物衍生物,这表明许多抗癌药物在某种程度上是天然衍生的药物。牛蒡子苷元(arctigenin, ARG)是中药牛蒡子的主要活性成分,ARG除具有抗菌^[4]、抗炎^[5]、免疫调节^[6]等功能外,还具有抗肿瘤作用,但其具有口服利用度低等问题。三苯基膦(triphenylphosphine, TPP⁺)则是一类结构中带有正电荷和疏水性基团,并在肿瘤细胞高线粒体膜电位的驱动下,能够通过磷脂双分子层从而积聚在线粒体中的亲脂性阳离子^[7]。因此,为探讨TPP⁺的线粒体靶向性是否能提高ARG的抗肿瘤活性,增加其对肿瘤细胞的选择性,本研究团队合成了ARG的TPP⁺衍生物,并对其体外抗肿瘤活性进行了评价,进一步对抗肿瘤作用机制进行了初探,以期发现新型、高效的抗肿瘤化合物,为具有线粒体靶向功能的牛蒡子苷元衍生物的研发提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

牛蒡子苷元由吉林农业大学中药材学院蔡恩博教授所在的中药新药研发实验室制备^[8]。化学合成所用化学试剂均购自西陇科学股份有限公司。化学合成药品均购自麦克林生化科技有限公司。RPMI-1640培养基、磷酸盐缓冲盐水、胰蛋白酶、胎牛血清和青霉素/链霉素混合液购自美国Gibco公司。5-氟尿嘧啶(5-FU)、DMSO购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。MTT噻唑蓝、脱脂奶粉、10×TBST、10×电泳转移缓冲液、Tris缓冲液、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司。DAPI染色液、活性氧试剂盒、

JC-1染色试剂盒、PI测定试剂盒和细胞线粒体分离试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司。Annexin V-FITC/PI双染试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司。Cytochrome C、Caspase-9、Caspase-3、Cleaved Caspase-3、偶联的二抗购自英国Abcam公司。Cleaved PARP购自武汉三鹰生物科技有限公司。RIPA裂解液和BCA蛋白检测试剂盒购自美国ThermoFisher Scientific公司。5×蛋白负载缓冲液购自北京博讯科技有限公司。PVDF、HRP发光液购自美国Millipore公司。

1.2 衍生物设计和合成

设计并合成27种ARG衍生物,结构如表1所示,其中9种为TPP⁺连接的ARG衍生物。总之,ARG-TPP⁺衍生物是通过在牛蒡子苷元的C-4-OH位点上与烷基链进行酯化反应得到ARG-b1~ARG-b9后,再与TPP⁺进行成盐反应而获得的。链的长度是影响终产物的产率的重要因素^[9]。因此,设计了不同长度(4~12个碳)的碳链以获得最优的终产物。合成路线如图1所示。

1.3 细胞系

本研究中采用的人源前列腺癌细胞PC-3M、人源非小细胞肺癌细胞A549、人源肝癌细胞BEL-7402、人源骨肉瘤细胞U-2OS、人源胰腺癌细胞PANC-1均购自北京北纳创联生物技术研究院。

1.4 样品溶液的配制

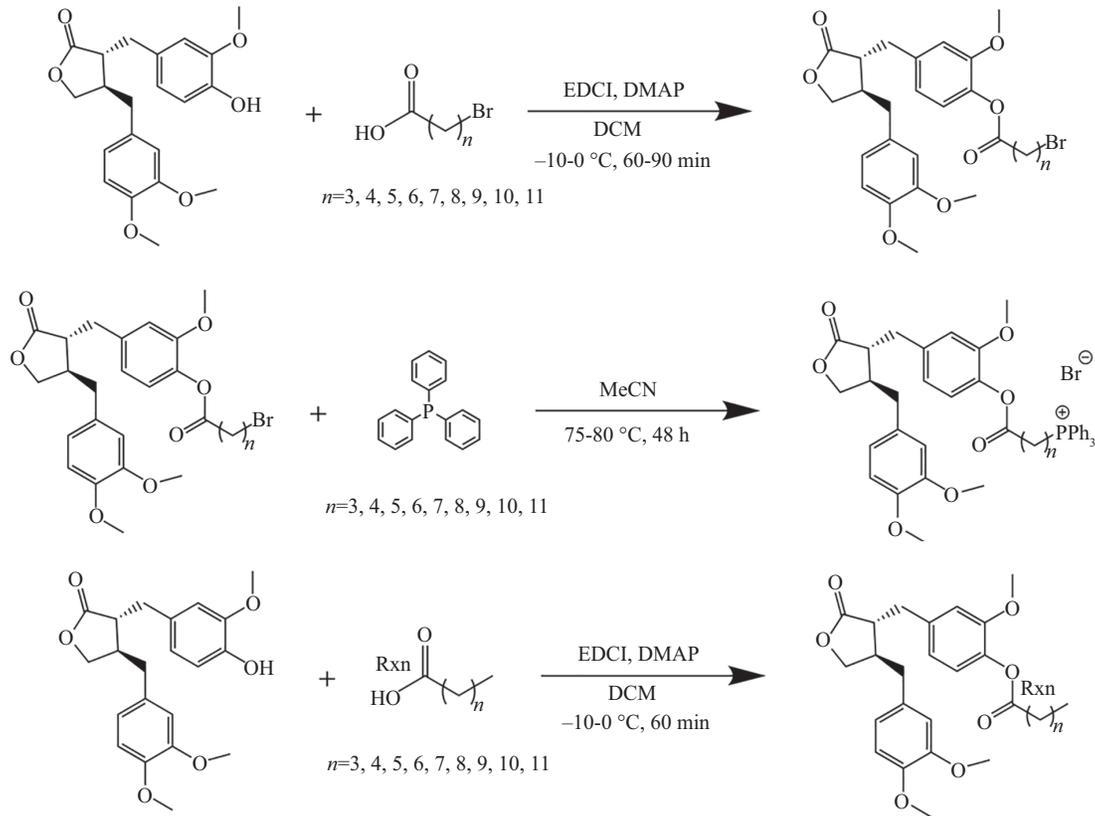
分别精确称取27种牛蒡子苷元衍生物及ARG、5-FU适量,加入DMSO溶解,配成浓度为10 mmol/L的母液,置于4 °C保存备用。现配现用,使用时稀释,配制成浓度为6.25、12.5、25、50、100 μmol/L的受试样品溶液。

1.5 细胞活力测定

细胞长满培养瓶底部90%即可取出,移至紫外灭菌过的超净工作台中,吸弃培养基,加入提前预热的2 mL磷酸盐缓冲盐水,轻轻吹洗细胞2次,将残留的培养基和死细胞洗净,然后加入500~800 μL胰酶,将胰酶均匀铺于瓶底,于培养箱中进行消化,消化40 s~60 s后,加入新鲜培养基混匀,用显微镜检查细胞,确保大多数细胞是单细胞。离心(室温、1 000 r/min、5 min)弃上清,加入2 mL完全培养基将细胞吹打均匀后补加3 mL培养基,取出10 μL细胞混悬液于血球计数板上进行计数,以每孔100 μL细胞混悬液、5×10³个细胞的密度将细胞接种于96孔板中,待细胞贴壁后进行药物

表1 牛蒡子苷元衍生物的结构
Table 1 Structure of arctigenin derivatives

| 编号 Number | 化合物的结构 Structure of compound | 编号 Number | 化合物的结构 Structure of compound | 编号 Number | 化合物的结构 Structure of compound |
|--------------|---------------------------------|--------------|---------------------------------|--------------|---------------------------------|
| 1 | | 10 | | 19 | |
| 2 | | 11 | | 20 | |
| 3 | | 12 | | 21 | |
| 4 | | 13 | | 22 | |
| 5 | | 14 | | 23 | |
| 6 | | 15 | | 24 | |
| 7 | | 16 | | 25 | |
| 8 | | 17 | | 26 | |
| 9 | | 18 | | 27 | |



EDCI为催化剂; DMAP为脱羧剂; MeCN为乙腈; DCM为二氯甲烷。

EDCI is the catalyst; DMAP is a decarboxylase agent; MeCN is acetonitrile; DCM is dichloromethane.

图1 牛蒡子苷元衍生物的合成路线

Fig.1 Synthetic route of arctigenin derivatives

处理, 48 h后, 于每孔加入10 μ L的MTT, 4 h后用酶标仪检测吸光度(D)值。

1.6 DAPI染色

取对数生长期的A549细胞, 以每孔 1×10^5 个细胞的密度接种于6孔板中, 过夜贴壁后, 加入不同浓度的药物(Mito-ARG-7: 6.25、12.5、25 μ mol/L)处理细胞, 同时设置对照组, 培养48 h后, 用1 mL 4%多聚甲醛室温固定, 15 min后每孔加入500 μ L DAPI染液, 37 $^{\circ}$ C避光染色20 min后拍照。

1.7 DCFH-DA染色

用0.25%胰酶室温消化A549细胞30 s后, 将细胞接种至6孔板中, 每孔2 mL, 接种浓度为 2.5×10^5 /mL, 5% CO_2 、37 $^{\circ}$ C培养箱中培养过夜。加入不同浓度的药物(Mito-ARG-7: 6.25、12.5、25 μ mol/L)处理细胞, 同时设立阴性对照组(空白对照组: Control)和阳性对照组(ROSup组), 作用时间为48 h。药物作用结束后, 加入浓度为10 μ mol/L的DCFH-DA, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min。DCFH-DA孵育结束后, 0.25%胰酶室温消化细胞30 s, 室温离心5 min(1 000 r/min)后弃上清, 取磷酸盐缓冲

盐水重悬细胞制备细胞悬液, 然后立即用流式细胞仪检测细胞活性氧水平。

1.8 JC-1染色法

将A549细胞接种至6孔板中, 每孔2 mL, 接种浓度为 2.5×10^5 /mL, 5% CO_2 、37 $^{\circ}$ C培养箱中培养过夜。加入不同浓度的药物(Mito-ARG-7: 6.25、12.5、25 μ mol/L)处理细胞, 同时设立空白对照组, 作用时间为48 h。药物作用结束后, 加入浓度为5 μ g/mL的JC-1工作液, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min。JC-1孵育结束后, 于荧光倒置显微镜下观察后, 用0.25%胰酶室温消化细胞30 s, 室温离心5 min(1 000 r/min)后弃上清, 取磷酸盐缓冲盐水重悬细胞制备细胞悬液, 之后立即用流式细胞仪检测细胞膜电位。

1.9 Annexin V-FITC/PI双染法

将对数生长期的A549细胞以每孔 5×10^5 个的密度接种于6孔板中, 过夜贴壁后, 加入不同浓度的药物(Mito-ARG-7: 6.25、12.5、25 μ mol/L)处理细胞, 同时设置对照组, 48 h后将上清转入离心管中, 用不含EDTA的胰酶室温消化30 s, 4 $^{\circ}$ C离心5 min(10 000 r/min)后弃

上清, 每组加400 μL Annexin V-FITC结合液混匀, 然后加5 μL Annexin V-FITC和10 μL PI溶液, 避光、室温染色30 min后上机检测细胞凋亡情况。

1.10 PI单染法

选取生长至对数期的A549细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中, 过夜贴壁后, 加入不同浓度的药物(Mito-ARG-7: 6.25、12.5、25 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞, 同时设置对照组。48 h后将上清转入离心管中, 用不含EDTA的胰酶室温消化30 s, 4 $^\circ\text{C}$ 离心5 min(10 000 r/min), 加入1 mL预冷的70%乙醇, 4 $^\circ\text{C}$ 过夜后收集细胞, 加入500 μL PI/RNase染液, 37 $^\circ\text{C}$ 避光孵育30 min后用200目的微孔滤膜过滤, 上机检测细胞周期。

1.11 Western blot实验

取对数生长期的A549细胞, 以每孔 5×10^5 个细胞的密度接种于6孔板中, 细胞贴壁后, 弃培养基, 加入不同浓度的药物(Mito-ARG-7: 6.25、12.5、25 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞, 同时设置对照组。48 h后用预冷磷酸盐缓冲盐水洗2次, 每孔加150 μL 裂解液使细胞充分裂解, 将细胞碎片和裂解液移至离心管离心25 min(1 000 r/min), 取上清, 进行分装、标记后, 置于 -80 $^\circ\text{C}$ 低温冰箱保存。利用细胞线粒体分离试剂盒提取线粒体蛋白, 分装、标记后, 置于 -80 $^\circ\text{C}$ 低温冰箱保存。采用BCA法测定蛋白浓度。应用SDS-PAGE体系对提取的样品进行电泳, 电泳结束后, 将处理好的样品夹在电转槽内进行转膜。转膜结束后, 将PVDF膜根据蛋白分子量大小按照对应Marker条带裁剪, 脱脂牛奶室温封闭2 h, 加入对应的一抗(1:1 000), 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜后取出, 加入对应的二抗(1:3 000)孵育, 2 h后置于化学发光成像系统中显影拍照, 并用ImageJ软件进行分析。

1.12 统计分析

所有统计分析均使用GraphPad Prism 6软件进行, 所有实验数据结果均表示为均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$), 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 IC₅₀值

为了验证化合物的选择性, 我们采用MTT法检测了所有化合物对5种肿瘤细胞株(PC-3M、A549、

BEL-7402、U-2OS、PANC-1)的体外抗肿瘤活性。使用5-FU作为阳性对照组。如表2所示, 与ARG相比, Mito-ARG-1~Mito-ARG-9的抗肿瘤活性均有不同程度的增加, 正如预期的那样, ARG-TPP^{*}衍生物显示出对肿瘤细胞的选择性趋势。其中, Mito-ARG-7对A549(IC₅₀值: 9.11 $\mu\text{mol/L}$)相较于ARG(IC₅₀值: 66.91 $\mu\text{mol/L}$)及5-FU(IC₅₀值: 56.94 $\mu\text{mol/L}$)表现出明显的肿瘤细胞选择性, Mito-ARG-7的抗肿瘤活性相对于ARG增加了86.38%; 而对于BEL-7402这株细胞系来说, Mito-ARG-8(IC₅₀值: 10.59 $\mu\text{mol/L}$)表现出较好的抗肿瘤活性; ARG及5-FU本身对U-2OS的IC₅₀值均大于100 $\mu\text{mol/L}$, 但Mito-ARG-9对U-2OS的IC₅₀为20.30 $\mu\text{mol/L}$, Mito-ARG-9有明显的抗肿瘤活性; 在PANC-1这株细胞系中, ARG的IC₅₀值大于100 $\mu\text{mol/L}$, 并无明显的抗肿瘤活性, 但Mito-ARG-8抗肿瘤活性(IC₅₀: 20.24 $\mu\text{mol/L}$)优于5-FU(IC₅₀值: 43.60 $\mu\text{mol/L}$); IC₅₀值的结果表明Mito-ARG-2~Mito-ARG-9对PC-3M细胞的抗肿瘤活性一般, 但Mito-ARG-1的抗肿瘤活性可与阳性药相媲美。同时, 与ARG相比, ARG-b1~ARG-b6以及ARG-c1~ARG-c6均未表现出明显的肿瘤细胞选择性。基于上述数据, 我们选择6.25 $\mu\text{mol/L}$ 、12.5 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 的Mito-ARG-7和A549细胞进行后续研究。

2.2 Mito-ARG-7对细胞内活性氧(ROS)的影响

以ROSup为阳性对照, 使用流式细胞仪检测Mito-ARG-7对A549细胞中ROS水平的影响。Mito-ARG-7处理细胞48 h后, 如图2A和图2B所示, A549细胞内ROS水平显著提高, ROS水平随药物浓度增大而升高, 具有显著的剂量依赖性。

2.3 Mito-ARG-7对线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)的影响

如图3所示, 荧光显微镜下可见, 对照组细胞膜电位较高, 形成聚合物, 产生红色荧光; 而相对于对照组来说, 给药后的细胞大部分为单体产生绿色荧光。这表明Mito-ARG-7诱发了细胞线粒体膜电位的降低, A549细胞线粒体受到损伤。高浓度组Mito-ARG-7对A549细胞线粒体膜电位的影响超过50%。

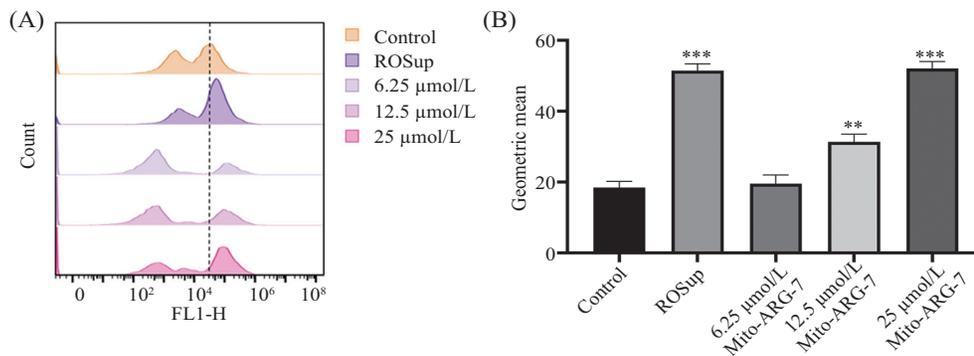
2.4 Mito-ARG-7诱导细胞凋亡

如图4A所示, Mito-ARG-7能够诱导A549细胞的凋亡, 并且呈浓度依赖性。如图4B和图4C所示, 随着药物浓度增加, 细胞凋亡率从对照组的0.15%增加至14.30%、16.20%和21.20%, 由此推测Mito-ARG-7能够诱导A549细胞发生凋亡。

表2 牛蒡子苷元及其衍生物对肿瘤细胞活性的影响

Table 2 Effects of arctigenin and its derivatives on tumor cell activity

| 化合物 Compound | 化合物的IC ₅₀ 值/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IC ₅₀ value of compound / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | | | | |
|-----------------|---|------------|------------|------------|------------|
| | PC-3M | A549 | BEL-7402 | U-2OS | PANC-1 |
| ARG | 56.34±3.68 | 66.91±3.74 | 55.74±1.55 | >100 | >100 |
| 5-FU | 13.03±2.14 | 56.94±1.28 | 41.80±3.83 | >100 | 43.60±7.26 |
| ARG-b1 | 57.01±4.27 | 74.06±3.57 | 73.28±4.10 | 66.32±2.94 | 67.24±4.96 |
| ARG-b2 | 87.25±2.58 | 75.37±2.90 | 47.21±3.19 | >100 | >100 |
| ARG-b3 | >100 | 77.44±1.83 | 70.08±2.55 | >100 | >100 |
| ARG-b4 | 79.23±6.80 | 86.44±2.14 | 86.33±3.15 | 59.07±1.96 | 59.24±2.23 |
| ARG-b5 | 91.32±4.29 | 68.26±2.65 | 57.62±4.99 | 82.55±3.30 | 61.28±3.23 |
| ARG-b6 | 59.29±2.61 | 69.34±4.23 | 59.27±1.64 | >100 | 48.25±1.90 |
| ARG-b7 | 62.11±3.25 | 67.45±5.62 | 54.23±2.19 | 37.61±1.66 | 42.09±2.85 |
| ARG-b8 | 69.34±5.08 | 70.30±4.67 | 30.33±4.81 | 42.75±2.47 | 38.25±1.41 |
| ARG-b9 | 90.17±4.20 | 79.24±3.02 | 73.01±6.95 | 30.49±3.24 | 52.24±1.59 |
| Mito-ARG-1 | 13.04±1.20 | 18.99±1.54 | 28.47±1.76 | 58.00±2.03 | 33.24±1.08 |
| Mito-ARG-2 | 31.28±2.82 | 18.87±1.16 | 16.46±1.89 | >100 | 41.28±2.43 |
| Mito-ARG-3 | 51.46±4.29 | 19.74±1.60 | 28.12±0.90 | >100 | 56.43±4.25 |
| Mito-ARG-4 | 28.00±2.24 | 12.64±1.67 | 35.42±3.13 | 51.76±2.03 | 29.54±1.13 |
| Mito-ARG-5 | 33.95±3.22 | 14.53±1.80 | 19.29±2.00 | 62.42±1.52 | 30.01±4.82 |
| Mito-ARG-6 | 20.24±3.94 | 14.23±2.17 | 19.39±1.46 | 99.87±1.71 | 25.99±2.14 |
| Mito-ARG-7 | 24.25±2.17 | 9.11±0.67 | 18.27±2.36 | 28.38±2.27 | 24.15±1.16 |
| Mito-ARG-8 | 21.26±3.52 | 15.69±1.43 | 10.59±1.17 | 34.33±1.88 | 20.90±1.92 |
| Mito-ARG-9 | 32.33±3.94 | 20.93±1.48 | 29.71±1.77 | 20.30±2.13 | 28.11±2.90 |
| ARG-c1 | 65.00±2.29 | 75.28±1.55 | 74.67±3.38 | 72.51±3.67 | 81.04±3.34 |
| ARG-c2 | >100 | 74.95±2.67 | 50.28±2.33 | >100 | >100 |
| ARG-c3 | >100 | 80.04±1.42 | 71.49±2.80 | >100 | >100 |
| ARG-c4 | 85.40±2.33 | 71.21±1.96 | 84.20±2.00 | 69.92±1.76 | 70.01±1.99 |
| ARG-c5 | >100 | 69.73±2.09 | 54.04±1.51 | 81.68±1.32 | 74.38±3.44 |
| ARG-c6 | 72.94±1.16 | 73.96±1.91 | 54.47±2.95 | >100 | 68.85±2.83 |
| ARG-c7 | 76.34±1.94 | 68.65±1.88 | 58.52±2.27 | 40.44±1.97 | 65.92±2.90 |
| ARG-c8 | 82.31±2.10 | 77.90±2.60 | 27.23±2.09 | 47.80±2.35 | 49.03±2.98 |
| ARG-c9 | >100 | 88.31±1.96 | 75.46±1.14 | 31.06±2.22 | 56.61±4.34 |



A: 通过流式细胞仪分析得到的活性氧水平示意图, 图中虚线是活性氧增长程度的参照线; B: 活性氧水平变化。n=3; ** P <0.01, *** P <0.001, 与Control组比较。

A: schematic representation of ROS levels obtained by flow cytometry analysis, the dashed line in the figure is the reference line for the degree of ROS growth; B: changes of reactive oxygen species levels. n=3; ** P <0.01, *** P <0.001 compared with Control group.

图2 流式细胞仪定量检测Mito-ARG-7(6.25、12.5、25 $\mu\text{mol/L}$)对A549细胞内活性氧的影响Fig.2 The effects of Mito-ARG-7 (6.25, 12.5, 25 $\mu\text{mol/L}$) on reactive oxygen species in A549 cells were quantitatively detected by flow cytometry

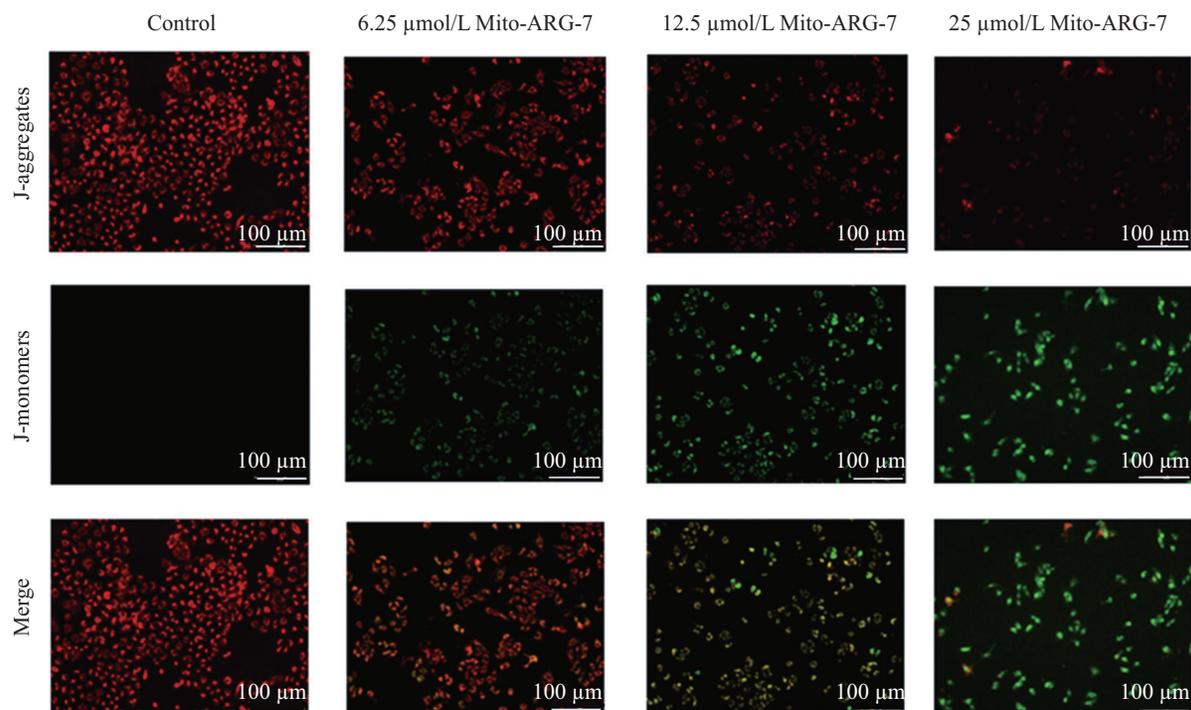


图3 JC-1染色法检测Mito-ARG-7(6.25、12.5、25 $\mu\text{mol/L}$)对A549细胞内 $\Delta\Psi\text{m}$ 的影响

Fig.3 Effects of Mito-ARG-7 (6.25, 12.5, 25 $\mu\text{mol/L}$) on $\Delta\Psi\text{m}$ in A549 cells detected by JC-1 staining

2.5 Mito-ARG-7对细胞周期的影响

由图5A和图5B可见,对于A549细胞,对照组的周期分布为 G_0/G_1 : 56.53%, S: 17.01%, G_2/M : 26.45%,与对照组相比,给药组随着药物浓度增加, G_0/G_1 期所占比例由对照组的56.53%,增加到64.92%、70.93%、78.24%,远高于对照组。而处于 G_2/M 期的细胞所占比例随着给药浓度增加而下降,S期所占比例的变化不明显。因此,可以推论Mito-ARG-7能够阻滞细胞的 G_0/G_1 期,从而抑制A549细胞增殖。

2.6 Mito-ARG-7对细胞凋亡相关蛋白的影响

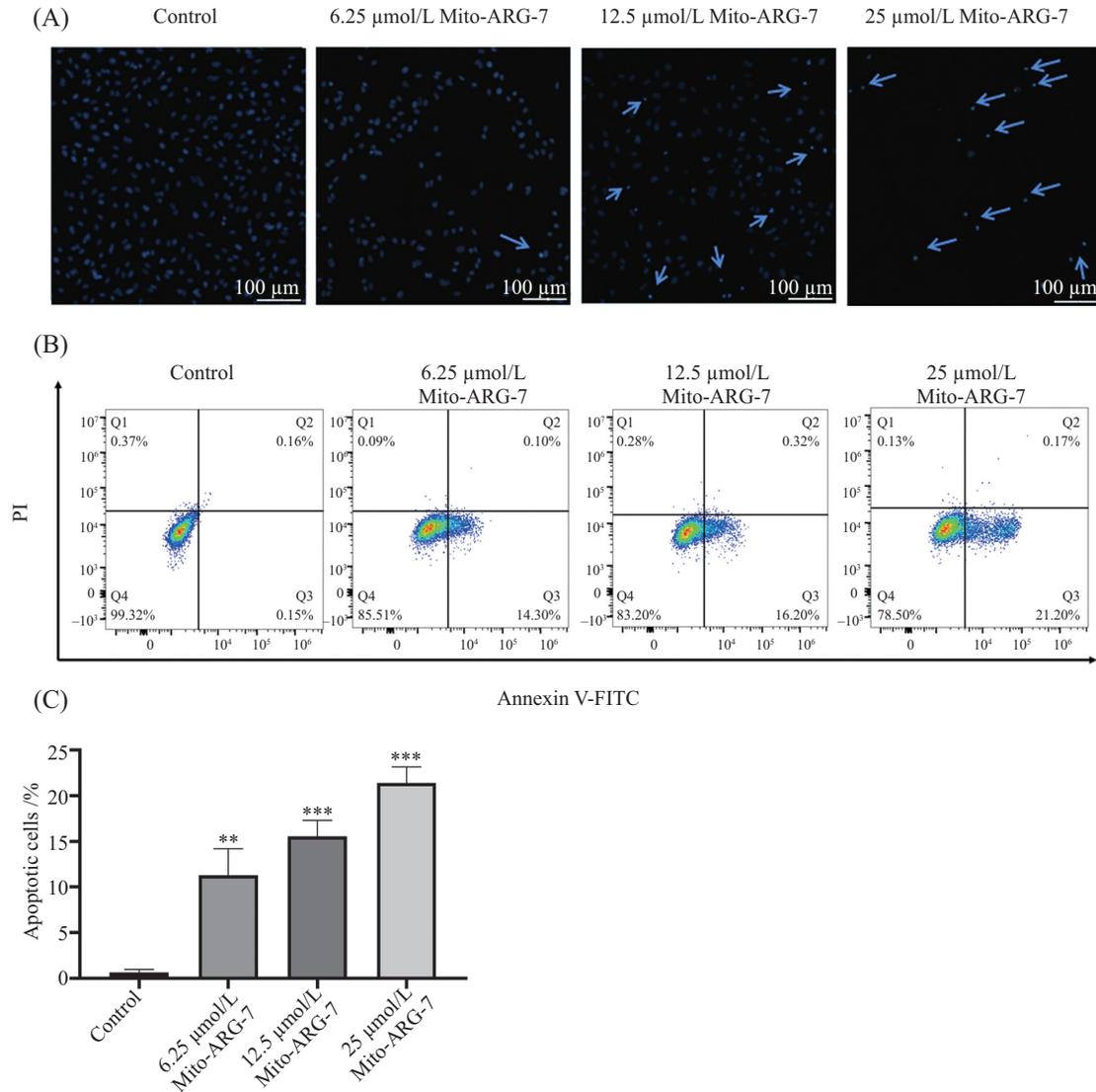
结果如图6A可以看出,Cytochrome C在线粒体内的量减少了,表明线粒体膜电位降低导致了Cytochrome C从线粒体向细胞质的释放。随后,Cytochrome C引发了Caspase-9的剪切,继而使Caspase-9下游的Caspase-3被剪切,最终,PARP作为信号通路末端被剪切,剪切后的PARP引发了肿瘤细胞的凋亡。

3 讨论

肿瘤在发展过程中进化出多种特性,其中凋亡逃逸使肿瘤更加难以被治愈,同时也是化疗药物产生耐药性的原因之一。特异性靶向线粒体的药物已

成为逆转肿瘤耐药的研究热点^[10]。研究表明,肿瘤的发生、发展与细胞凋亡有关。在大多数脊椎动物中,细胞凋亡主要由线粒体来调节^[11]。而肿瘤细胞的线粒体膜电位明显高于正常细胞,利用这一特性可将药物特异性靶向运输至肿瘤线粒体。木脂素化合物广泛存在于中药材中,并具有丰富的药理作用,许多木脂素化合物均具有较强的抗肿瘤活性^[12]。研究表明,牛蒡子苷元对多种肿瘤细胞均具有较高的活性,并且通过多种途径和靶点发挥作用,抗肿瘤谱广,应用前景广阔^[13]。近年来,关于牛蒡子苷元的抗肿瘤作用及其作用机制的报道逐渐增多^[14]。因此,基于 TPP^+ 的偶联物被广泛用于靶向肿瘤细胞线粒体,以提高化合物的抗肿瘤活性和敏感性。

用人源癌细胞PC-3M、A549、BEL-7402、U-2OS、PANC-1评价牛蒡子苷元衍生物的抗肿瘤活性。活性筛选实验表明,大多数靶向线粒体化合物的活性比相应的母体化合物强,ARG- TPP^+ 衍生物在不同的肿瘤细胞株之间也表现出一定的选择性。在ARG的9种 TPP^+ 衍生物中,Mito-ARG-7不仅可明显提高ARG的抗肿瘤活性,而且在人非小细胞肺癌细胞A549中具有肿瘤细胞选择性趋势。对于大多数细胞系,抗肿瘤活性最好的ARG- TPP^+ 化合物主要集



A: DAPI染色法观察细胞凋亡情况, 箭头所指的细胞核出现浓缩、裂解的现象, 荧光强度增强; B: 通过流式细胞仪分析得到的细胞凋亡示意图; C: 细胞凋亡的百分比。n=3; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与Control组比较。

A: apoptosis was observed by DAPI staining, the nuclei indicated by the arrow showed shrinkage and lysis, and the fluorescence intensity increased; B: diagram of apoptosis by flow cytometry analysis; C: percentage of apoptosis. n=3; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with Control group.

图4 Annexin V-FITC/PI 双染法检测Mito-ARG-7(6.25、12.5、25 μmol/L)对A549细胞凋亡的影响

Fig.4 Annexin V-FITC/PI double staining was used to detect the effect of Mito-ARG-7 (6.25, 12.5, 25 μmol/L) on apoptosis of A549 cells

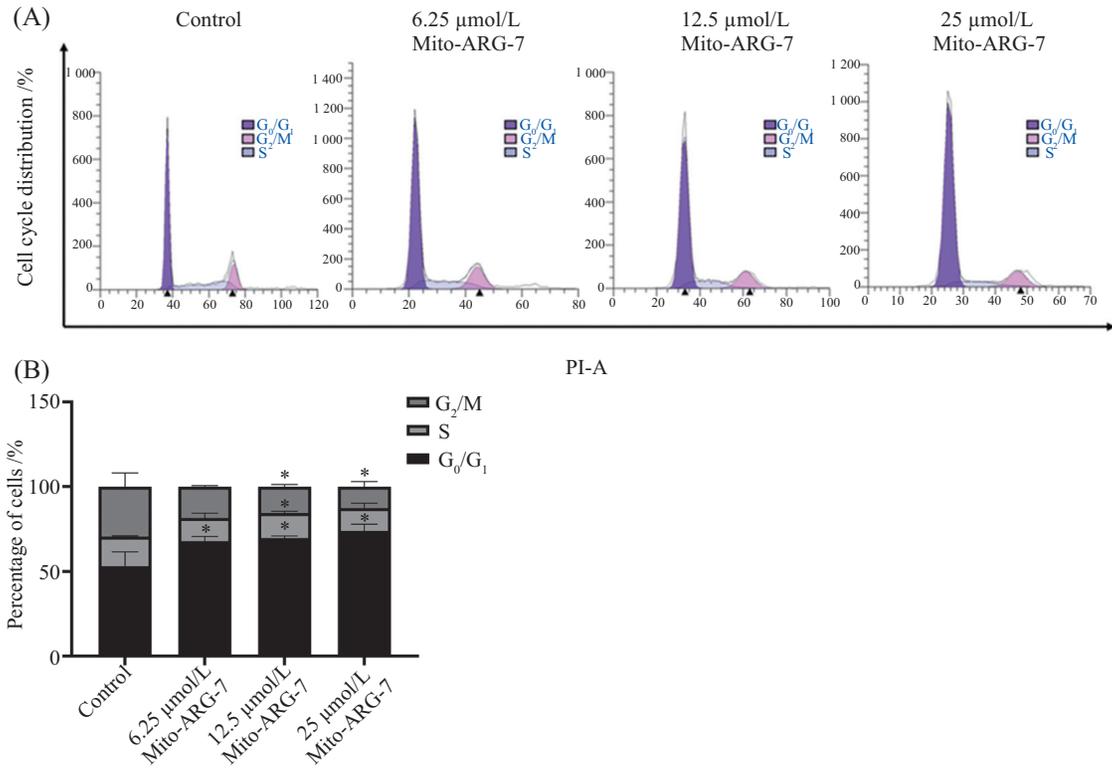
中在长碳烷基链, 但是对于PC-3M细胞系来说, 最优化合物是短碳烷基链。

细胞的凋亡途径主要包括死亡受体介导的凋亡途径和线粒体介导的凋亡途径。在内源性途径中凋亡由线粒体膜去极化启动, 这导致线粒体膜电位的丧失^[15]。实验结果表明, Mito-ARG-7可以诱导ROS的产生, 继而引发 $\Delta\Psi_m$ 的降低, 而 $\Delta\Psi_m$ 的降低, 在一定程度上破坏了线粒体内膜的稳态, 使Cytochrome C进入到细胞质中, 参与Caspase-9的活化, 而Cleaved Caspase-9是Caspase-9的活化形式, 在

凋亡体诱导下, 引导下游Caspase-3催化成熟, 被激活的Caspase-3生成Cleaved Caspase-3, 使其底物PARP发生裂解, 进而失去修复已损伤的DNA的功能, 最终核小体间的DNA被降解, 导致细胞走向凋亡。这一研究不仅为牛蒡子苷元的结构修饰提供了理论依据, 还为体外抗肿瘤作用和机制的研究开辟了新的视角。

作者贡献

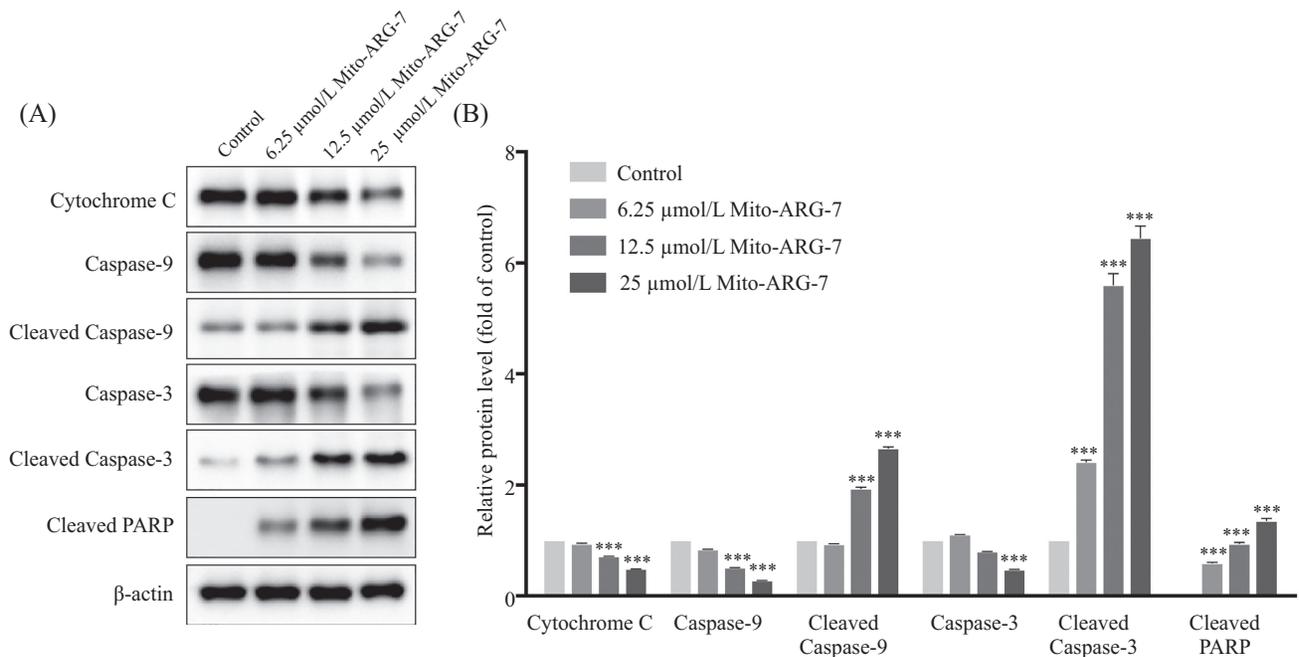
刘芳菲、舒晖: 参与实验研究、数据分析及论



A: 通过流式细胞仪分析得到的细胞周期分布图; B: G₀/G₁、S和G₂/M期的百分比; n=3; *P<0.05, 与Control组比较。

A: cell cycle profile obtained by flow cytometry analysis; B: percentage of G₀/G₁, S and G₂/M phases; n=3; *P<0.05 compared with Control group.

图5 Mito-ARG-7(6.25、12.5、25 μmol/L)对A549细胞周期的影响
Fig.5 Effects of Mito-ARG-7 (6.25, 12.5, 25 μmol/L) on A549 cell cycle



A: 经Mito-ARG-7处理的A549细胞中Cytochrome C、Caspase-9、Cleaved Caspase-9、Caspase-3、Cleaved Caspase-3与Cleaved PARP的表达; B: 经Mito-ARG-7处理的A549细胞中Cytochrome C、Caspase-9、Cleaved Caspase-9、Caspase-3、Cleaved Caspase-3与Cleaved PARP的相对蛋白含量, β-actin为内参; n=3; ***P<0.001, 与Control组比较。

A: expression of Cytochrome C, Caspase-9, Cleaved Caspase-9, Caspase-3, Cleaved Caspase-3 and Cleaved PARP in A549 cells treated with Mito-ARG-7; B: relative protein contents of Cytochrome C, Caspase-9, Cleaved Caspase-9, Caspase-3, Cleaved Caspase-3 and Cleaved PARP in A549 cells treated with Mito-ARG-7. β-actin was used as internal control. n=3; ***P<0.001 compared with Control group.

图6 Western blot检测Mito-ARG-7对线粒体凋亡途径相关蛋白的影响

Fig.6 Western blot was used to detect the effect of Mito-ARG-7 on the proteins related to mitochondrial apoptosis pathway

文撰写;刘丁瑞、张欣宏:协助完成实验,采集及分析数据;蔡恩博、韩佳宏:研究设计构思,对文章的知识性内容作批评性审阅;朱颜铂、赵岩:文章修改审阅、项目经费资助。

参考文献 (References)

- [1] SANTUCCI C, CARIOLI G, BERTUCCIO P, et al. Progress in cancer mortality, incidence, and survival: a global overview [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2020, 29(5): 367-81.
- [2] LEITER A, VELUSWAMY R R, WISNIVESKY J P. The global burden of lung cancer: current status and future trends [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20(9): 624-39.
- [3] SUAZO-ZEPEDA E, BOKERN M, VINKE P C, et al. Risk factors for adverse events induced by immune checkpoint inhibitors in patients with non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2021, 70(11): 3069-80.
- [4] PIRVU L, HLEVCA C, NICU I, et al. Comparative studies on analytical, antioxidant, and antimicrobial activities of a series of vegetal extracts prepared from eight plant species growing in Romania [J]. *JPC-J Planar Chromat*, 2014, 27: 346-56.
- [5] LIANG H, FENG Q, GUO H, et al. Twelve novel sesquiterpenes with anti-inflammatory and cholesterol-lowering activities from burdock leaves [J]. *Bioorg Chem*, 2022, 127: 105940.
- [6] LI W, ZHANG Z, ZHANG K, et al. Arctigenin suppress Th17 cells and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis through AMPK and PPAR- γ /ROR- γ t signaling [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53: 5356-66.
- [7] MURPHY M P. Targeting lipophilic cations to mitochondria [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1777(7/8): 1028-31.
- [8] 蔡恩博. 牛蒡子苷元氨基酸酯衍生物的合成及其药代动力学研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2017.
- [9] ARDHAOU M, FALCIMAIGNE A, OGNIER S, et al. Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids [J]. *J Biotechnol*, 2004, 110(3): 265-72.
- [10] WANG J, LI J, XIAO Y, et al. TPP-based mitocans: a potent strategy for anticancer drug design [J]. *RSC Med Chem*, 2020, 11(8): 858-75.
- [11] WWALLACE D C. Mitochondria and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(10): 685-98.
- [12] GOGVADZE V, ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them [J]. *Trends Cell Biol*, 2008, 18: 165-73.
- [13] UMEZAWA T. Diversity in lignan biosynthesis [J]. *Phytochem Rev*, 2003, 2(3): 371-90.
- [14] SHABGAH A G, SUKSATAN W, ACHMAD M H, et al. Arctigenin, an anti-tumor agent; a cutting-edge topic and up-to-the-minute approach in cancer treatment [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 909: 174419.
- [15] SUN B, CAI E, ZHAO Y, et al. Arctigenin triggers apoptosis and autophagy via PI3K/Akt/mTOR inhibition in PC-3M cells [J]. *Chem Pharm Bull*, 2021, 69(5): 472-80.