

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.003356

甘草内生菌联合顺铂对 A549 细胞的增殖及凋亡的影响

张尚龙,张楠,连小龙,叶礼巧,马趣环,邓毅

(甘肃中医药大学药学院,兰州 730000)

【摘要】目的:探讨甘草内生菌 JTZB55 联合顺铂对人肺癌 A549 细胞增殖和凋亡的影响及其可能机制。**方法:**MTT 法检测 JTZB55 或/和顺铂对 A549 细胞存活率的影响,根据协同指数筛选出后续实验浓度,将 A549 细胞分为正常对照组、2 μ g/mL 顺铂组、800 μ g/mL JTZB55 组、2 μ g/mL 顺铂+800 μ g/mL JTZB55 组;流式细胞术检测各组药物对 A549 细胞凋亡的影响;Western blot 法检测各组药物处理后细胞线粒体凋亡及内质网应激途径相关蛋白的表达水平。**结果:**MTT 结果显示,顺铂及 JTZB55 作用于 A549 细胞后,细胞存活率显著降低;与顺铂组相比,联合组细胞存活率显著降低($P<0.05$),且 800 μ g/mL JTZB55 与 2 μ g/mL 顺铂联用的协同指数最高;流式细胞术结果显示, JTZB55 及顺铂均能促进 A549 细胞凋亡($P<0.01$),两药联合组细胞凋亡率显著增高($P<0.01$);Western blot 实验结果表明,顺铂联合 JTZB55 能显著降低 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 蛋白(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)蛋白的表达,上调 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X, Bax)、细胞色素 C(Cytochrome C, CytC)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cysteine aspartate protease-3, Caspase-3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-8(cysteine aspartate protease-8, Caspase-8)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(cysteine aspartate protease-9, Caspase-9)、葡萄糖调节蛋白 78(Glucose regulated protein 78, GRP78)、CCAAT-增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein, CHOP)蛋白的表达($P<0.05$)。**结论:**JTZB55 可以增强顺铂对 A549 细胞的增殖抑制作用,促进 A549 细胞的凋亡,其机制可能与下调 Bcl-2 和上调 Bax、CytC、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、GRP78、CHOP 蛋白的表达相关。

【关键词】甘草内生菌;顺铂;肺癌;增殖抑制;细胞凋亡

【中图分类号】R734.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2023-04-30

Effect of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. endophytes combined with cisplatin on proliferation and apoptosis of A549 cells

Zhang Shanglong, Zhang Nan, Lian Xiaolong, Ye Liqiao, Ma Quhuan, Deng Yi

(College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine)

【Abstract】**Objective:** To investigate the effect of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. endophyte JTZB55 combined with cisplatin on proliferation and apoptosis of human lung cancer A549 cells and the possible mechanism. **Methods:** MTT assay was used to determine the effect of JTZB55 and/or cisplatin on the survival rate of A549 cells. According to the synergistic index, the subsequent experimental concentration was screened out, and A549 cells were divided into normal control group, 2 μ g/mL cisplatin group, 800 μ g/mL JTZB55 group, and 2 μ g/mL cisplatin + 800 μ g/mL JTZB55 group. Flow cytometry was used to determine the effect of drugs in each group on the apoptosis of A549 cells. Western blot was used to measure the expression levels of mitochondrial apoptosis and endoplasmic reticulum stress pathway-related proteins in cells treated with drugs in each group. **Results:** MTT results showed that the survival rate of A549 cells was decreased significantly after cisplatin and JTZB55 were administrated. Compared with the cisplatin group, the cell survival rate in the combination group was significantly decreased ($P<0.05$), and the synergistic index of 800 μ g/mL JTZB55 combined with 2 μ g/mL cisplatin was the highest. The results of flow cytometry showed that both JTZB55 and cisplatin could promote the apoptosis of A549 cells ($P<0.01$), and the apoptosis rate of A549 cells was significantly increased in the combination group ($P<0.01$). Western blot results showed that cisplatin combined with JTZB55 could significantly decrease the expression of B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) protein and up-regulate the expression of Bcl-2 associated X (Bax), cytochrome C (CytC), cysteine aspartate protease-3

作者介绍:张尚龙,Email:239133082@qq.com,

研究方向:从事中药及复方应用研究。

通信作者:邓毅,Email:dengyi@gzsy.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81960723);甘肃省科技计划资助项目(编号:21JR11RA145);兰州市科技计划项目(编号:2022-3-21);甘肃省中医药管理局资助项目(编号:GZKP-2022-37)。

优先出版:<https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20231101.1351.004>
(2023-11-02)

(Caspase-3), cysteine aspartate protease-8 (Caspase-8), cysteine aspartate protease-9 (Caspase-9), glucose regulated protein 78 (GRP78), and CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP) ($P < 0.05$). **Conclusion:** JTzb55 can enhance the inhibitory effect of cisplatin on the proliferation of A549 cells and promote the apoptosis of A549 cells. The mechanism may be related to the down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of Bax, CytC, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, GRP78, and CHOP.

【Key words】*Glycyrrhiza uralensis* Fisch. endophyte; cisplatin; lung cancer; proliferation inhibition; apoptosis

肺癌是全球发病率最高的恶性肿瘤,目前主要采用手术切除、放疗、化疗、免疫治疗和中西药联合用药等多种方法治疗。顺铂(Cisplatin, CP)为临床常用的广谱抗肿瘤药物之一,常用于治疗卵巢癌、肺癌、乳腺癌等多种实体瘤^[1-2],具有剂量依赖性^[3-8],主要通过肝脏代谢和肾脏排泄,极易在肝脏和肾脏中积累,产生肝毒性、肾毒性等毒副作用^[9-13]。

甘草作为临床常用药物,素有“十方九草”之说,可解百毒,具有清热解毒、调和药性等功效及抗炎、抗氧化、抗肿瘤等药理作用^[14],甘草活性成分如(甘草素、甘草次酸、异甘草素、甘草查尔酮A)已被证实对肝癌、肺癌、结肠癌、胶质瘤等恶性肿瘤具有显著的抑制作用^[15-18]。课题组前期研究发现,甘草内生菌具有与宿主甘草相同或相似的活性成分及药理作用,对肝癌、结肠癌、宫颈癌及肺癌等具有抗肿瘤作用,对CP的抗肿瘤作用可能具有一定程度的协同作用。但目前尚无关于甘草内生菌联合化疗药物抗肿瘤方面的报道。本研究首次探究甘草内生菌联合CP对肺癌的治疗作用,确定两者是否在抑制肿瘤细胞增殖方面具有协同作用,并探索其联合治疗的疗效,旨在为治疗肺癌化疗增敏提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人肺腺癌A549细胞,由甘肃省肿瘤医院提供。
1.1.2 药品与试剂 JTzb55为本课题组成员由经甘肃中医药大学中药鉴定教研室李硕副教授鉴定的金塔县甘草中分离纯化所得芽孢杆菌属甘草内生细菌。顺铂,纯度≥98%,北京索莱宝公司,批号:124J021;DMEM高糖培养基(Cytiva公司,批号:AH29027412);四季青胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司,批号:21030707);噻唑蓝(北京索莱宝科技有限公司,批号:917Q051);胰蛋白酶、青链霉素(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:GP2211017、GA22020011094);二甲基亚砜(DMSO,北京索莱宝科技有限公司,批号:

1121E0331); β -actin购自武汉Abbkine公司(批号为ATVMA0302),Caspase-9、GRP78及CHOP抗体均购自北京博奥森公司(批号分别为AI08123806、A106117813、BA08307587),Bax、Bcl-2、CytC、Caspase-3及Caspase-8均购自Abmart公司(批号分别为GR3442109-8、GR3239757-16、GR3256622-11、GR3427617-10、GR3277358-6),山羊抗兔二抗购自Immunoway公司(批号为B0202),BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:20211213)。

1.1.3 仪器 CO_2 恒温培养箱(HF151,力康发展有限公司);酶标仪(RT-6100,深圳雷杜生命科学股份有限公司);电泳仪(DYY-6D,北京六一生物科技有限公司);超净工作台(B2HFsafe,上海力申科学有限公司);低温冷冻离心机(H1650R,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);荧光倒置显微镜(MoticamPro2058,上海捷辰仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 甘草内生菌代谢产物的制备 甘草内生细菌JTzb55于营养琼脂培养基(NA)上复苏,待菌落长成后,挑取单个菌落,接种到营养肉汤(NB)培养液,于37℃、220 r/min恒温振荡器中培养5 d,收集含有细菌代谢物的培养液,真空抽滤后,水浴加热蒸干成粉末。将所得代谢产物的粉末以水溶解成水溶液后,依次用乙酸乙酯和正丁醇进行萃取,各萃取3次,合并萃取液,挥干溶剂蒸干成粉末,得到甘草内生菌代谢产物粉末(JTzb55从5 000 mL培养液中富集得到代谢产物粉末7.6 g)^[19],保存于4℃冰箱。

1.2.2 细胞培养 人肺腺癌A549细胞培养用DMEM高糖培养液,含10%胎牛血清、1%双抗(青霉素10 000 U/mL,链霉素10 mg/mL),在37℃的饱和湿度、体积分数5%的 CO_2 培养箱中常规传代培养。

1.2.3 CP与JTzb55对肺癌A549细胞活性的影响 取对数生长期的A549细胞,用0.25%胰蛋白酶消化制备单细胞悬液,调整细胞密度到 5×10^4 个/mL,以每孔100 μL 接种于96孔板,每个组设3复孔,置于饱和湿度、37℃、5% CO_2 培养箱中培养24 h。分为对照组(不加药物)、CP组(2、4、8、16、32、64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、JTzb55组(50、100、200、400、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$),另设空白组(只含培养液),各组均培养24 h、48 h、72 h。每孔各加入MTT溶液10 μL ,37℃下培养4 h,弃上清液,再加入二甲基亚砜(DMSO)150 μL ,在摇床上振荡10 min,用酶标仪于570 nm处检测各组吸光度(absorbance, A)值。细胞存活率(%)=(实

验组 A 值-空白组 A 值)/(对照组 A 值-空白组 A 值)×100%。

1.2.4 CP 联合 JTZB55 的协同指数计算 细胞培养,同步化处理同“1.2.3”。以 2、4、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP 联合不同浓度 JTZB55, 分别作用 24 h、48 h、72 h, 计算出各浓度组作用不同时间的 A549 细胞存活率。采用金正均 Q 值法判断两种药物联合作用效果, 筛选出协同抑制效果最好的两药浓度及作用时间。金正均 Q 值公式 $Q = E(a+b)/(Ea+Eb-Ea \times Eb)$, 其中 Ea、Eb 表示 a、b 两药单独作用时对细胞的抑制率, E(a+b) 表示两药联合作用时对细胞的抑制率。当 Q 值大于或等于 1.15 时, 说明具有协同增效作用; Q 值小于 0.85 说明两药存在拮抗作用; 而当 Q 值在 0.85~1.15 时说明两药是相加作用^[20]。

1.2.5 CP 联合 JTZB55 对肺癌 A549 细胞活性的影响 细胞培养,同步化处理同“1.2.3”。根据课题组前期所进行的预实验筛选出的协同指数最高的药物浓度, 将 A549 细胞分为对照组、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP 组、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ JTZB55 组、联合组(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP+800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ JTZB55)。

1.2.6 CP 与 JTZB55 对肺癌 A549 细胞凋亡的影响 取对数生长期细胞, 0.25% 胰酶消化, 调整细胞浓度为 1×10^6 个/ mL , 以每孔 2 mL 接种于 6 孔板, 同步化处理、分组同“1.2.5”。各组细胞经药物处理后常规培养 24 h 后, 用 0.25% 胰酶消化收集 A549 细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 去上清后加 PBS 重悬, 使用 PBS 清洗细胞 2 次。使用 AnnexinV-FICT/PI 进行染色, 流式细胞仪上机检测。重复 3 次。

1.2.7 CP 与 JTZB55 对肺癌 A549 细胞凋亡关键蛋白表达的影响 细胞培养、同步化处理及分组同 1.2.5。用总体积胞裂解液 200 μL 冰上裂解 30 min。提细胞总蛋白, 参照试剂盒说明书操作测各组蛋白浓度。取每组蛋白 5 μg , 加入 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上样缓冲液, 电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 1 × TBST 溶液洗膜 3 次, 4 °C—抗孵育 12 h, 1 × TBST 溶液洗膜 3 次后, 二抗室温孵育 1 h, 1 × TBST 溶液洗膜 3 次, 用化学发光法显色, 以凝胶成像系统获取图像, 用 Image J 分析条带灰度值。以 β -actin 为内参, 以条带灰度值半定量 Bax、Bcl-2、CytC、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、GRP78、CHOP 蛋白表达。目的蛋白的相对表达量=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白(β -actin)灰度值。重复 3 次。

1.3 统计学方法

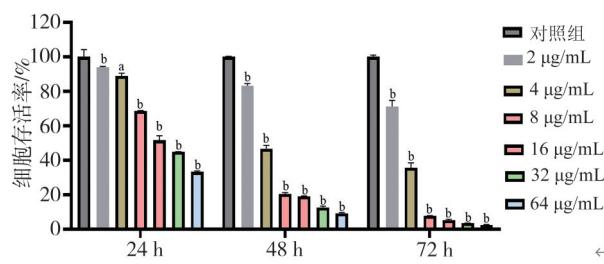
用 SPSS 25.0 软件对数据进行方差分析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较用单因素方差分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 CP 和 JTZB55 对 A549 细胞活性的影响

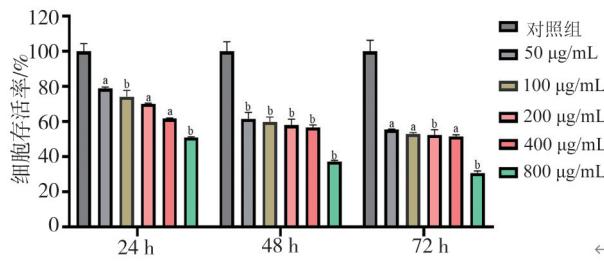
MTT 实验结果显示: 与对照组相比, CP 组和 JTZB55 组的 A549 细胞存活率显著下降, 差异具有统计学意义($F_{\text{CP-24h}}=1337.00, P_{\text{CP-24h}}=0.000; F_{\text{CP-48h}}=3918.00, P_{\text{CP-48h}}=0.000; F_{\text{CP-72h}}=$

1 417.00, $P_{\text{CP-72h}}=0.000; F_{\text{JTZB55-24h}}=136.70, P_{\text{JTZB55-24h}}=0.000; F_{\text{JTZB55-48h}}=116.40, P_{\text{JTZB55-48h}}=0.000; F_{\text{JTZB55-72h}}=178.40, P_{\text{JTZB55-72h}}=0.000$), 见图 1、图 2。结果表明, CP 组及 JTZB55 组对 A549 细胞的增殖均具有抑制作用, 且随着药物浓度及给药时间的增加, A549 细胞存活率逐渐降低, 具有浓度及时间依赖性。16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP 作用 24、48、72 h 后, A549 细胞存活率分别为 $(52.97 \pm 2.73)\%$ 、 $(19.13 \pm 0.24)\%$ 、 $(5.30 \pm 0.50)\%$, 故后续联合用药实验选择对 A549 细胞增殖具有抑制作用但毒性稍弱的 2、4、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP 浓度。



注:a, 与对照组相比, $P<0.05$; b, 与对照组相比, $P<0.01$

图 1 不同浓度 CP 对 A549 细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$)



注:a, 与对照组相比, $P<0.05$; b, 与对照组相比, $P<0.01$

图 2 不同浓度 JTZB55 对 A549 细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$)

根据课题组前期进行的两药联合干预 A549 细胞活性的预实验, 采用金正均 Q 值分析两药联合应用产生的效应, 筛选出协同指数最高的两药浓度进行下一步实验, 如表 1。根据数据所得, 当 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP 与 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ JTZB55 联用, 且干预时间为 24 h 时, Q 值为 1.24, 表明两种浓度的药物存在协同作用, 故本研究均选择 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ JTZB55 和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP 为适浓度、干预时间 24 h 为最佳干预时间进行药物干预处理。

如表 2 所示, 对照组、CP 组、JTZB55 组及联合组的细胞存活率分别为 $(100.00 \pm 2.17)\%$ 、 $(95.39 \pm 0.12)\%$ 、 $(63.49 \pm 1.02)\%$ 、 $(51.49 \pm 0.62)\%$, 差异具有统计学意义($F=273.80, P=0.000$)。与对照组相比, CP、JTZB55 单用或联用均能显著抑制肺癌 A549 细胞增殖($P=0.001, P=0.000, P=0.000$), 且联合组对 A549 细胞的活性抑制作用强于两药单用组(均 $P=0.000$)。

2.2 JTZB55 联合 CP 对 A549 细胞生长情况的影响

各组细胞在加药后 24 h, 倒置显微镜下观察, 空白对照

组 A549 细胞呈梭形, 紧密贴壁生长, 几乎无脱落, 镜下胞浆饱满, 细胞体积、形态正常, 相邻细胞生长融合成片, 生长状态较好; 而加入 CP(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、JTZB55(800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)后, 镜下可见细胞间隙增大, 细胞形态呈不规则形, 细胞贴壁数量减少, 碎片增多, 细胞核固缩, 尤其联合组(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP+800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ JTZB55), 细胞贴壁细胞明显减少, 而脱落于培养液的细胞明显增多, 如图 3。

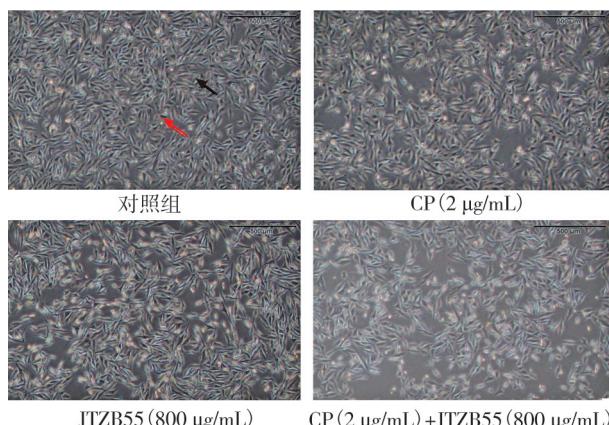
表 1 不同浓度联合用药作用 A549 细胞的 Q 值

药物浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)		Q 值		
CP	JTZB55	24 h	48 h	72 h
2	50	1.12	0.99	0.89
2	100	1.03	1.01	0.92
2	200	0.96	1.00	0.93
2	400	1.10	1.08	0.93
2	800	1.24	1.17	1.07
4	50	0.83	0.84	0.93
4	100	0.87	0.90	0.90
4	200	0.84	0.93	0.93
4	400	0.96	0.98	0.94
4	800	1.19	1.08	1.11
8	50	0.84	0.95	0.92
8	100	0.90	0.96	0.91
8	200	0.88	0.98	0.92
8	400	0.92	1.00	0.96
8	800	1.21	1.07	1.06

表 2 联合用药对 A549 细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	细胞存活率(%)
对照组	0	100.00 \pm 2.17
CP 组	2	95.39 \pm 0.12 ^a
JTZB55 组	800	63.49 \pm 1.02 ^{ab}
联合组	2+800	51.49 \pm 0.62 ^{ab}

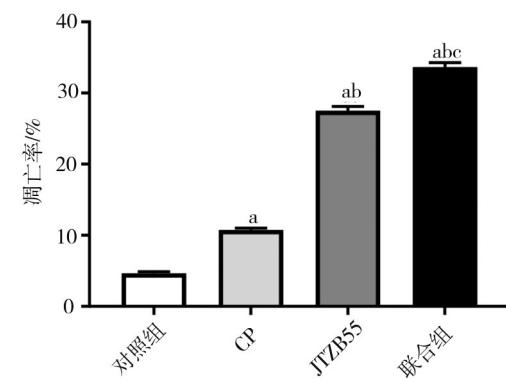
注: a, 与对照组相比, $P < 0.01$; b, 与 CP 组相比, $P < 0.01$



注: 黑色箭头代表贴壁 A549 细胞, 红色代表死亡 A549 细胞
图 3 CP 联合 JTZB55 对肺癌 A549 细胞增殖的影响($\times 200$)

2.3 JTZB55 和 CP 对 A549 细胞凋亡的影响

如图 4、图 5 所示, 对照组、CP 组、JTZB55 组及联合组的细胞凋亡率分别为 $(4.65 \pm 0.23)\%$ 、 $(10.74 \pm 0.27)\%$ 、 $(27.51 \pm 0.62)\%$ 、 $(33.65 \pm 0.64)\%$, 差异具有统计学意义($F=2435.56, P=0.000$)。与对照组相比, CP、JTZB55 单用或联用均能显著促进肺癌 A549 细胞凋亡($P=0.000, P=0.000, P=0.000$), 且联合组 A549 细胞的凋亡率显著高于两药单用组(均 $P=0.000$)。



注: a, 与对照组比较, $P < 0.01$; b, 与 CP(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组相比, $P < 0.01$; c, 与 JTZB55(800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组相比, $P < 0.01$

图 4 各药物组作用 24 h 后 A549 细胞的凋亡率

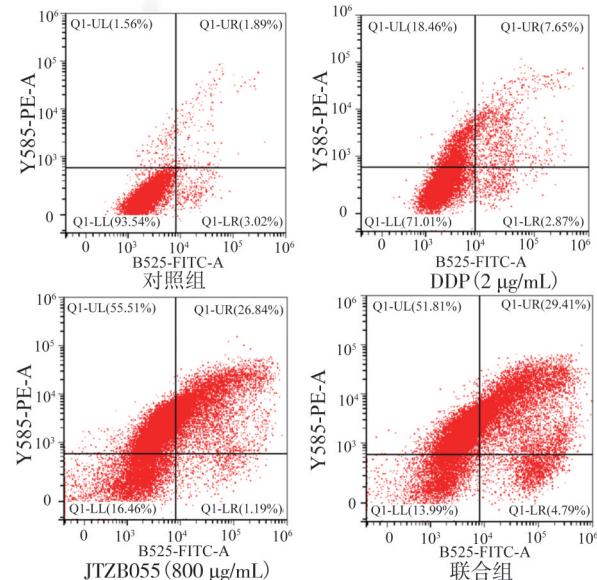
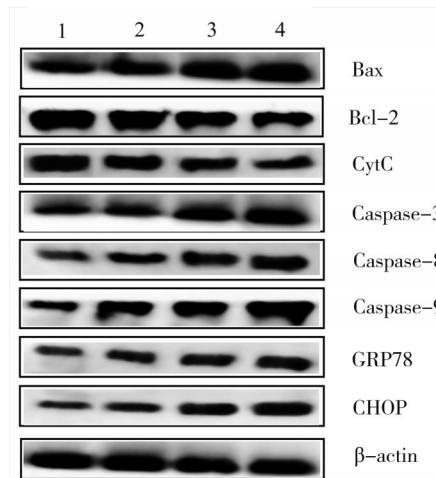


图 5 各药物组作用 24 h 后 A549 细胞的凋亡率

2.4 JTZB55 和 CP 对 A549 细胞凋亡关键蛋白表达的影响

各组药物处理 A549 细胞 24 h 后, 收集蛋白检测 Bax、Bcl-2、CytC、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、GRP78、CHOP 和内参蛋白 β -actin 的表达, 如表 3 和图 6 所示。结果显示, 与对照组相比, CP 组、JTZB55 组和联合组 Bax、CytC、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、GRP78、CHOP 蛋白的表达均增加, Bcl-2 蛋白表达降低, 差异有统计学意义(除 $P_{\text{CP-Bcl-2}}=0.000$)。

0.024, $P_{JTZB55-Bcl-2}=0.020$, $P_{CP-CHOP}=0.043$ 外, 其余均 $P=0.000$; 与各单药组相比, 联合组显著上调 Bax、CytC、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、GRP78 及 CHOP 蛋白表达水平, 下调 Bcl-2 蛋白表达水平, 差异具有统计学意义(除 $P_{\text{Combination}-CHOP}=0.011$ 外, 其余均 $P=0.000$)。



注:1. 对照组;2. CP 组;3. JTZB55 组;4. 联合组

图 6 不同药物组作用 24 h Bax、Bcl-2、CytC、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、GRP78、CHOP 蛋白相对表达量

3 讨 论

肺癌作为一种常见肿瘤, 具有发病率高、死亡率高等特点, 其治疗方法多以化疗为主。CP 常用于治疗多种肿瘤, 然而其在抗肿瘤的同时也会产生肝毒性、肾毒性等多种毒副作用, 影响患者的生存质量, 限制其临床应用。甘草可通过诱导细胞凋亡、干扰细胞周期、诱导自噬、抑制糖酵解、调节免疫、调控 miRNA 和多种信号通路等作用机制发挥抗肿瘤作用^[21]。甘草内生菌具有与甘草相似的药理作

用, 然而其是否对肺癌的化疗有辅助治疗作用报道较少。本实验研究 CP、甘草内生菌 JTZB55 单用及 CP 与 JTZB55 联用分别对 A549 细胞增殖及凋亡的影响。结果显示, JTZB55、CP 均抑制 A549 细胞增殖, 具有浓度和时间依赖性。且 JTZB55 联合 CP 组显著增强 A549 细胞的增殖抑制及促进 A549 细胞凋亡的作用。

细胞凋亡过程非常复杂, 可分为内源性途径、死亡受体途径及内质网应激途径。B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 家族作为凋亡信号通路的开关, 在细胞凋亡过程中发挥着关键作用。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cysteine aspartate protease-3, Caspase-3) 作为诱导细胞凋亡的关键蛋白酶, 具有执行剪切细胞结构蛋白的作用。Bcl-2/B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated x, Bax) 比值的降低可诱导线粒体释放细胞色素 C (Cytochrome, CytC), 使线粒体功能失调, 通过死亡受体介导并激活 Caspase-8 的外源性途径及 CytC 参与且活化 Caspase-9 的线粒体途径来激活 Caspase-3, 诱导细胞凋亡^[22-24]。王娜等^[25]研究发现, 甘草甜素可上调 Bax 及 Caspase-3 mRNA 的表达, 下调 Bcl-2 mRNA 的表达, 诱导宫颈癌细胞凋亡, 抑制宫颈癌小鼠肿瘤增殖。甘草次酸也可诱导线粒体凋亡, 增加 p38 和 JNK1/2 的磷酸化水平, 上调 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达, 诱导卵巢癌细胞凋亡^[26]。

持续的内质网应激也会引起 CytC 释放, 失调线粒体功能, 激活 Caspase-3, 诱导细胞凋亡^[27]。内质网应激下游目标蛋白 CHOP 又称为生长抑制 DNA 损伤基因 153 (Growth arrest and DNA damage-inducible 153, GADD153), 内质网应激三条信号通

表 3 不同药物组作用 24 h Bax、Bcl-2、CytC、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、GRP78、CHOP 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	CP	JTZB55	联合组	F 值	P 值
Bax	0.42 ± 0.02	0.50 ± 0.01^b	0.63 ± 0.04^{bc}	0.79 ± 0.04^{bdf}	121.85	0.000
Bcl-2	1.05 ± 0.04	0.82 ± 0.00^a	0.79 ± 0.01^{ad}	0.70 ± 0.01^{bdf}	25.77	0.000
CytC	0.36 ± 0.01	0.40 ± 0.01^b	0.51 ± 0.01^{bd}	0.66 ± 0.01^{bdf}	781.74	0.000
Caspase-3	0.42 ± 0.01	0.47 ± 0.00^b	0.64 ± 0.02^{bc}	0.83 ± 0.03^{bdf}	112.06	0.000
Caspase-8	0.34 ± 0.01	0.42 ± 0.01^b	0.51 ± 0.01^{bd}	0.61 ± 0.02^{bdf}	295.77	0.000
Caspase-9	0.35 ± 0.01	0.63 ± 0.01^b	0.67 ± 0.01^{bc}	1.11 ± 0.04^{bdf}	45.68	0.000
GRP78	0.30 ± 0.00	0.38 ± 0.01^b	0.47 ± 0.01^{bd}	0.57 ± 0.01^{bdf}	144.35	0.000
CHOP	0.32 ± 0.00	0.37 ± 0.01^a	0.57 ± 0.01^{bd}	0.70 ± 0.02^{bde}	87.46	0.000

注: a, 与对照组比较, $P<0.05$; b, 与对照组比较, $P<0.01$; c, 与顺铂组相比, $P<0.05$; d, 与顺铂组相比, $P<0.01$; e, 与 JTZB55 (800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组相比, $P<0.05$; f, 与 JTZB55 (800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组相比, $P<0.01$;

路均能诱导 CHOP 的表达,是内质网应激介导细胞凋亡的重要组成部分^[28]。袁永贵等^[29]研究发现,甘草查尔酮 A 作用人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞后,增加细胞内 ROS 的水平,降低线粒体膜电位进而诱导线粒体功能障碍和内质网应激,上调 Bax 和 CHOP 的表达,降低 Bcl-2 的表达,诱导细胞凋亡。此外,GRP78 作为内质网应激的标志蛋白之一,上调 GRP78 的表达可能会增强肿瘤细胞对顺铂的敏感性^[30],诸多研究表明^[31-33],GRP78 可能为治疗肿瘤的一个重要靶点。Western blot 实验发现,CP 和 JTzb55 可提高 A549 细胞内 Bax、CytC、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、GRP78、CHOP 蛋白的表达,下调 Bcl-2 的表达,且联合组的作用更加显著。

综上所述,CP 联合 JTzb55 抑制 A549 细胞增殖,促进 A549 细胞凋亡,其机制可能为上调 Bax、CytC、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、GRP78、CHOP 蛋白的表达,下调 Bcl-2 蛋白的表达,从而进一步激活线粒体途径、死亡受体途径及内质网应激途径,促进 A549 细胞凋亡。近年来,抗肿瘤药物的研究思路和治疗靶点多集中于铁死亡、焦亡、坏死、自噬性死亡等多种非凋亡性死亡。因此,在后续实验中,可对前期研究进行体内验证,也可通过铁死亡、焦亡、坏死、自噬性死亡等多种非凋亡性死亡方式来进一步探索甘草内生菌联合 CP 抗肿瘤的作用机制,为甘草内生菌的药理活性研究提供依据,也为今后制定抗肿瘤药物联合应用方案提供参考,推动抗肿瘤创新药物的开发及研究。

参 考 文 献

- [1] Gómez-Ruiz S, Maksimović-Ivanić D, Mijatović S, et al. On the discovery, biological effects, and use of Cisplatin and metallocenes in anticancer chemotherapy[J]. *Bioinorg Chem Appl*, 2012, 2012: 140284.
- [2] Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts[J]. *Chem Rev*, 1999, 99(9): 2467-2498.
- [3] Karadeniz A, Simsek N, Karakus E, et al. Royal jelly modulates oxidative stress and apoptosis in liver and kidneys of rats treated with cisplatin[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2011, 2011: 981793.
- [4] Jakupcak MA, Galanski MS, Keppler BK. Tumour-inhibiting platinum complexes: state of the art and future perspectives[J]. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2003, 146: 1-54.
- [5] Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents[J]. *Cancer Treat Rev*, 2007, 33(1): 9-23.
- [6] Gao Y, Chu SF, Shao QH, et al. Antioxidant activities of ginsenoside Rg1 against cisplatin-induced hepatic injury through Nrf2 signaling pathway in mice[J]. *Free Radic Res*, 2017, 51(1): 1-13.
- [7] Isoda K, Nozawa T, Taira Y, et al. Effects of surface charge and palladium on hepatic and kidney injury induced by polystyrene nanoparticles co-administered to mice with paraquat and cisplatin[J]. *Pharmazie*, 2018, 73(3): 165-168.
- [8] K V A, Madhana RM, Kasala ER, et al. Morin hydrate mitigates cisplatin-induced renal and hepatic injury by impeding oxidative/nitrosative stress and inflammation in mice[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2016, 30(12): 571-579.
- [9] Ekinci Akdemir FN, Albayrak M, Çalik M, et al. The protective effects of p-coumaric acid on acute liver and kidney damages induced by cisplatin[J]. *Biomedicines*, 2017, 5(2): 18.
- [10] Boroja T, Katanić J, Rosić G, et al. Summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract: Phytochemical profile and modulation of cisplatin-induced liver, renal and testicular toxicity[J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 118: 252-263.
- [11] Bunel V, Antoine MH, Nortier J, et al. Nephroprotective effects of ferulic acid, Z-ligustilide and E-ligustilide isolated from *Angelica sinensis* against cisplatin toxicity *in vitro*[J]. *Toxicol Vitro*, 2015, 29 (3): 458-467.
- [12] Kilic K, Sakat MS, Akdemir FNE, et al. Protective effect of Gallic acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats[J]. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2019, 85(3): 267-274.
- [13] Sherif IO, Abdel-Aziz A, Sarhan OM. Cisplatin-induced testicular toxicity in rats: the protective effect of arjunolic acid[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2014, 28(11): 515-521.
- [14] 李葆林, 麻景梅, 田宇柔, 等. 甘草中新发现化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(8): 2438-2448.
- [15] Li BL, Ma JM, Tian YR, et al. Research progress on newly discovered chemical constituents and pharmacological effects of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(8): 2438-2448.
- [16] 张云云, 吴开祥, 孙雯雯, 等. 甘草查尔酮 A 促进 MCF-7 乳腺癌细胞 TRAIL 敏感性的机制研究[J]. 中药材, 2022, 45(4): 974-977.
- [17] Zhang YY, Wu KX, Sun WW, et al. Mechanism of *Glycyrrhiza chalcone A* promoting TRAIL sensitivity in MCF-7 breast cancer cells[J]. *J Chin Med Mater*, 2022, 45(4): 974-977.
- [18] 王 勇, 黄大兵, 沈夏波, 等. 甘草素调控 WIG-1 基因对肺癌细胞增殖、细胞凋亡以及放疗敏感性影响的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(10): 1194-1200.
- [19] Wang Y, Huang DB, Shen XB, et al. Liquiritigenin effects on proliferation, apoptosis and radio-sensitivity of lung carcinoma cells by regulating WIG-1 gene[J]. *Chin J Immunol*, 2020, 36(10): 1194-1200.
- [20] 郝文龙, 荔志云. 异甘草素在脑胶质瘤治疗中的作用与进展[J]. 西北国防医学杂志, 2019, 40(4): 255-259.
- [21] Hao WL, Li ZY. Effect and progress of isoliquiritigenin in the treatment

- of glioma[J]. Med J Natl Defending Forces Northwest China, 2019, 40 (4):255-259.
- [18] 张九成,陈卫东,邹 宁.甘草查尔酮A调控人结肠癌细胞增殖与凋亡的分子机制研究[J].中国免疫学杂志, 2019, 35 (5) : 549-554.
- Zhang JC, Chen WD, Zou N. Molecular mechanism of Licochalcone A regulating proliferation and apoptosis of human colon cancer cells[J]. Chin J Immunol, 2019, 35(5):549-554.
- [19] 闫 潘,马 骏,张 楠,等.马钱子总生物碱致肾毒性模型建立及甘草内生菌代谢产物减毒作用对比[J].中药药理与临床, 2022, 38(4):121-126.
- Yan X, Ma J, Zhang N, et al. Establishment of nephrotoxicity model induced by total alkaloids of strychni semen and comparison on attenuation effects of endophytes metabolites from glycyrrhizae radix et rhizoma [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2022, 38(4):121-126.
- [20] 刘智丹.姜黄素联合顺铂诱导腺样囊性癌ACC-M细胞凋亡及对内质网应激相关蛋白表达的影响[D].遵义:遵义医科大学, 2021.
- Liu ZD. Effect of curcumin combined with cisplatin on apoptosis and expression of endoplasmic reticulum stress related proteins in ACC-M cells of adenoid cystic carcinoma[D]. Zunyi:Zunyi Med Univ, 2021.
- [21] 连小龙,令 颖,张尚龙,等.甘草有效成分抗肿瘤作用机制及联合抗肿瘤研究进展[J].中国实验方剂学杂志, 2022, 28(11) : 238-245.
- Lian XL, Ling Y, Zhang SL, et al. Anti-tumor mechanism of active ingredients of glycyrrhizae Radix et rhizoma and its combined use in anti-tumor treatment: a review[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28 (11):238-245.
- [22] Iizaka T, Tsuji M, Oyamada H, et al. Interaction between caspase-8 activation and endoplasmic reticulum stress in glycochenodeoxycholic acid-induced apoptotic HepG2 cells[J]. Toxicology, 2007, 241 (3):146-156.
- [23] Zhao H, Yenari MA, Cheng DY, et al. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity[J]. J Neurochem, 2003, 85(4):1026-1036.
- [24] 张丽惠,张琬莹,张志鹏,等.复方苦参注射液联合表柔比星对膀胱癌细胞凋亡的影响[J].中药药理与临床, 2020, 36(3):203-207.
- Zhang LH, Zhang WY, Zhang ZP, et al. Effect of compound Kushen injection combined with epirubicin on apoptosis of bladder cancer cells[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2020, 36(3):203-207.
- [25] 王 娜,张 霞.甘草甜素调节U14宫颈癌小鼠免疫功能及诱导凋亡的作用[J].食品工业科技, 2021, 42(23):370-376.
- Wang N, Zhang X. Effect of glycyrrhizin on immune function and apoptosis of U₁₄Cervical cancer mice[J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42 (23):370-376.
- [26] Li JJ, Tang F, Li RK, et al. Dietary compound glycyrrhetic acid suppresses tumor angiogenesis and growth by modulating antiangiogenic and proapoptotic pathways *in vitro* and *in vivo*[J]. J Nutr Biochem, 2020, 77:108268.
- [27] Li YM, Guo YS, Tang JA, et al. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2014, 46(8):629-640.
- [28] Limonta P, Moretti RM, Marzagalli M, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in the anticancer activity of natural compounds[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(4):961.
- [29] 袁永贵,张夏炎,朱晓俊,等.甘草查尔酮A对人乳腺癌MDA-MB-231细胞凋亡的影响[J].中国实验方剂学杂志, 2021, 27(20) : 95-100.
- Yuan YG, Zhang XY, Zhu XJ, et al. Effect of licochalcone A on apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cells[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(20):95-100.
- [30] 张冉浠,周 莉,陆安伟,等.GRP78在不同亚型宫颈癌细胞株中表达情况及对顺铂敏感性影响[J].肿瘤预防与治疗, 2020, 33(5): 389-394.
- Zhang RX, Zhou L, Lu AW, et al. Expression of GRP78 and its effect on cisplatin sensitivity in different subtypes of cervical cancer cells[J]. J Cancer Contr Treat, 2020, 33(5):389-394.
- [31] Zhang L, Cheng X, Xu SC, et al. Curcumin induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in human papillary thyroid carcinoma BCPAP cells via disruption of intracellular calcium homeostasis [J]. Medicine, 2018, 97(24):e11095.
- [32] Chang YJ, Huang CY, Hung CS, et al. GRP78 mediates the therapeutic efficacy of curcumin on colon cancer[J]. Tumor Biol, 2015, 36 (2):633-641.
- [33] 张美兰,沈哲式,张英哲,等.姜黄素诱导人肝癌BEL-7404细胞凋亡的内质网应激作用的研究[J].吉林医学, 2021, 42(1):5-8.
- Zhang ML, Shen ZS, Zhang YZ, et al. Curcumin induces endoplasmic reticulum stress- apoptosis in human liver cancer BEL-7404 cell[J]. Jilin Med J, 2021, 42(1):5-8.

(责任编辑:李青颖)