

二氢杨梅素激活内质网应激促进卵巢癌 A2780 细胞凋亡

王凤杰^{1,3}, 王海静², 陈显兵^{1*}, 易永芬³, 谢雅¹, 张桃¹

(1. 湖北民族大学附属民大医院, 湖北恩施 445000; 2. 青岛市中医医院干部保健科, 山东青岛 266033;
3. 重庆医科大学基础医学院, 重庆 400016)

摘要: 本研究应用体内、外实验探讨二氢杨梅素 (dihydromyricetin, DHM) 通过作用于内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 通路而诱导卵巢癌 A2780 细胞凋亡的作用及机制。结果发现, DHM 处理人卵巢癌 A2780 细胞后, 可引起细胞内 ERS 标志性蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78)、应激性凋亡蛋白 C/EBP 同源蛋白 (C/EBP-homologous protein, CHOP) 和半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-12 (cysteiny aspartate specific proteinase-12, caspase-12) 的表达增加; 经 ERS 抑制剂 4-苯基丁酸 (4-phenyl butyric acid, 4-PBA) 预处理并进行 DHM 干预后, 细胞活力出现降低并伴随着凋亡率升高。动物实验遵循重庆医科大学动物伦理委员会的规定。将 DHM 混悬液以腹腔注射方法注射至卵巢癌模型裸鼠后, 可明显抑制裸鼠体内移植瘤的生长, 提高组织内 GRP78 和 CHOP 的表达水平并促进促凋亡蛋白 caspase-3 的活化, 同时瘤组织内可见肿胀和破碎的内质网, 提示 DHM 干预通过 ERS 通路诱导了细胞凋亡。以上结果表明, DHM 可诱导卵巢癌细胞凋亡并抑制裸鼠体内移植瘤的生长, 这与 ERS 通路激活有关。

关键词: 二氢杨梅素; 卵巢癌; 裸鼠; 内质网应激; 细胞凋亡

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)09-2127-07

Dihydromyricetin promotes cell apoptosis through activating endoplasmic reticulum stress in ovarian cancer A2780 cells

WANG Feng-jie^{1,3}, WANG Hai-jing², CHEN Xian-bing^{1*}, YI Yong-fen³, XIE Ya¹, ZHANG Tao¹

(1. Minda Hospital of Hubei Minzu University, Enshi 445000, China; 2. Qingdao Hospital of Traditional Chinese Medicine, Qingdao 266033, China; 3. School of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: This study was designed to investigate the effect of dihydromyricetin (DHM) on inducing apoptosis of ovarian cancer cells A2780 through endoplasmic reticulum stress (ERS) pathway and the mechanisms involved *in vitro* and *in vivo*. A2780 cells were treated with different concentrations of DHM, and the protein expression levels of glucose-regulated protein 78 (GRP78) which is related to ERS increased, apoptotic proteins C/EBP-homologous protein (CHOP), and cysteinyl aspartate specific proteinase-12 (caspase-12) elevated. After pretreatment with ERS inhibitor, 4-phenyl butyric acid (4-PBA), following the intervention with DHM, the A2780 cell viability decreased and apoptotic rate increased. All animal welfare and experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of Chongqing Medical University. Intraperitoneal injection of DHM suspension into nude mice with ovarian cancer could significantly inhibit the growth of transplanted tumor *in vivo*, increase the protein expression levels of GRP78, CHOP, and caspase-3. Moreover, swollen and broken endoplasmic reticulum could be observed in tumor tissues, suggesting that DHM intervention induces apoptosis mediated by ERS. The results indicated that DHM could induce apoptosis of ovarian cancer cells and inhibit the growth of transplanted

收稿日期: 2020-03-03; 修回日期: 2020-03-28.

基金项目: 湖北省卫生健康委员会基金资助项目 (WJ2019M104).

*通讯作者 Tel: 86-718-8301032, E-mail: 350805@hbmy.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0236

tumors in nude mice, which might be related to the activation of ERS pathway.

Key words: dihydromyricetin; ovarian cancer; nude mice; endoplasmic reticulum stress; cell apoptosis

卵巢癌是女性常见恶性肿瘤,其发病率逐年升高,晚期复发率高,化疗易耐药且化疗药物易引起不良反应,因此,寻找可抑制卵巢癌恶性程度发展的药物以增强临床疗效的研究成为热点。二氢杨梅素(dihydromyricetin, DHM; 3,5,7,3',4',5'-六羟基-2,3-二氢黄酮醇)是从民间用药藤茶和枳椇子中提取的植物性黄酮类化合物^[1],有抗肿瘤^[2,3]和提高免疫力^[4]等功效,具有毒副作用小和靶向作用效果明显等特点,但其抗卵巢癌的作用机制还有待研究。课题组前期已证实DHM处理可诱导卵巢癌SKOV3和A2780细胞的凋亡,并可降低癌细胞的迁移和侵袭^[5]。另有研究发现,DHM(又名蛇葡萄素)可通过内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)通路诱导乳腺癌细胞凋亡^[6]。而DHM诱导卵巢癌细胞凋亡作用是否由ERS通路介导尚不清楚。本文通过体内、外实验研究,深入探讨了DHM诱导卵巢癌细胞凋亡的机制及其抑制体内肿瘤生长的作用与ERS通路的相关性。

材料与方法

试剂 DHM(编号Bellancom-A1046,纯度99.51%,北京寰宇公司),溶于二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)配成50 mmol·L⁻¹储存液备用;Annexin V-FITC(fluorescein isothiocyanate)凋亡检测试剂盒(美国BD公司);葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, GRP78, 78 kDa)、C/EBP同源蛋白(C/EBP-homologous protein, CHOP, 27 kDa)及活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-3, cleaved-caspase-3, 17 kDa)一抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠及山羊抗兔IgG(美国Cell Signaling Technology公司);半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-12(cysteinyl aspartate specific proteinase-12, caspase-12, 38 kDa)一抗(美国Abcam公司);CCK-8(cell counting kit-8)试剂盒、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒和 β -actin抗体(中国碧云天生物技术公司);ERS抑制剂4-苯基丁酸(4-phenylbutyric acid, 4-PBA, 大连美仑生物技术有限公司)。

细胞培养及分组处理 人卵巢癌A2780细胞购自上海中国科学院细胞库。采用含10%胎牛血清及1%青/链霉素的改良Eagle培养基(Dulbecco's modification of Eagle's medium, DMEM)进行细胞培养。分组:①不同浓度DHM(0、40和80 μ mol·L⁻¹)处理A2780

细胞48 h后,检测ERS相关蛋白的表达;②4-PBA(10 mmol·L⁻¹)预处理A2780细胞1 h后,再用DHM(80 μ mol·L⁻¹)处理细胞48 h,检测细胞活力及凋亡情况。

CCK-8法检测细胞活力 A2780细胞接种于96孔板中培养,按实验分组进行处理后,每孔加入含CCK-8液的完全培养基100 μ L,继续孵育1~2 h,置于酶标仪中,测量各孔450 nm波长的吸光度值(A_{450}),计算细胞活力抑制率。

流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测细胞凋亡率 将细胞进行分组处理后,按照试剂盒说明书进行操作并上机检测。结果显示为:左下象限(Annexin V-/PI⁻),正常细胞;右下象限(Annexin V+/PI⁻),早期凋亡细胞;右上象限(Annexin V+/PI⁺),处于晚期凋亡或坏死细胞;左上象限(Annexin V-/PI⁺),可能是细胞收集过程中出现的损伤细胞^[7]。用FlowJo V10软件进行分析,通过计算处于早期凋亡和晚期凋亡的细胞所占总细胞数的比例为细胞凋亡率(apoptosis rate, AR)。

Western blot法检测细胞中GRP78、CHOP及caspase-12的表达 提取各组细胞内总蛋白,用BCA法测定蛋白浓度并进行SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白。将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)上,用10%脱脂牛奶封闭非特异性抗原后,于室温孵育2 h,加入一抗(均为1:1 000),并于4 °C孵育过夜。经Tris缓冲盐溶液(Tris buffered saline Tween, TBST)洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:4 000),于室温继续孵育3 h,再经TBST洗膜后,用电化学发光(electro-chemi-luminescence, ECL)法显色并曝光成像。应用凝胶成像分析软件扫描,以 β -actin作为内参对照,分析目的蛋白的相对表达水平。

裸鼠体内模型建立及DHM干预 BALB/c-nu雌性裸小鼠,28~42日龄,体重18~20 g,购自北京华康康生物科技股份有限公司,分为对照组(control, Con)和DHM处理组(DHM, 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹),每组6只,饲养于重庆医科大学实验动物中心无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级环境。动物实验遵循重庆医科大学动物伦理委员会的规定。

制备A2780单细胞悬液,进行裸鼠皮下种植,每只注射0.2 mL细胞悬液(约 5×10^6 个细胞),共接种12只。当接种7~10天后,可于接种部位皮下触及小米粒大小硬结,表明造模成功。待肿瘤达到约100 mm³体积时,开始给药处理。DHM组采用DHM混悬液

(200 mg·kg⁻¹·d⁻¹) 进行腹腔注射, Con 组注射等量生理盐水。按实验方案连续给药 21 天, 每隔 2 天测量 1 次裸鼠体重及肿瘤长、短径。实验结束处死裸鼠, 完整分离肿瘤组织用于检测。肿瘤体积计算公式为: 肿瘤体积 (mm³) = 短径 (mm)² × 长径 (mm) / 2。

苏木素-伊红 (haematoxylin-eosin, HE) 染色法观察皮下瘤组织的形态学改变 将裸鼠瘤组织经固定 (10% 多聚甲醛)、脱水、浸蜡、包埋和切片, 行常规 HE 染色后, 中性树脂封片并观察组织的形态结构特点。

透射电镜 (transmission electron microscope, TEM) 法观察裸鼠瘤组织细胞内质网等细胞器结构 取裸鼠瘤组织做电镜样本时, 尽量取靠近肿瘤边缘的非坏死区。将组织修剪为 1 mm³ 大小的样本块, 浸于 2.5% 的电镜专用戊二醛溶液中固定。组织样本依次采用 1% 锇酸固定 2 h, 50%、70%、80%、90% 及 95% 梯度酒精脱水各 5 min, 无水乙醇及丙酮浸泡 3 次、各 5 min, 丙酮包埋过夜, 固化、切片, 再行醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色后, 于透射电镜下观察。

裸鼠瘤组织内 GRP78、CHOP 和 cleaved-caspase-3 蛋白表达的检测 提取瘤组织的总蛋白, 进行蛋白浓度测定后, 取等量蛋白进行 Western blot 检测分析, 检测方法及各抗体稀释比例均同前。

统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 两组间比较用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 *P* < 0.05 为具有统计学差异, 采用 GraphPad Prism 5 软件绘制统计图。

结果

1 DHM 处理 A2780 细胞可激活 ERS

为研究 DHM 诱导 A2780 细胞凋亡是否与 ERS 信号通路有关, 检测了 DHM 处理后 A2780 细胞中 ERS 相关蛋白 GRP78 及凋亡蛋白 CHOP 和 caspase-12 的表达水平。

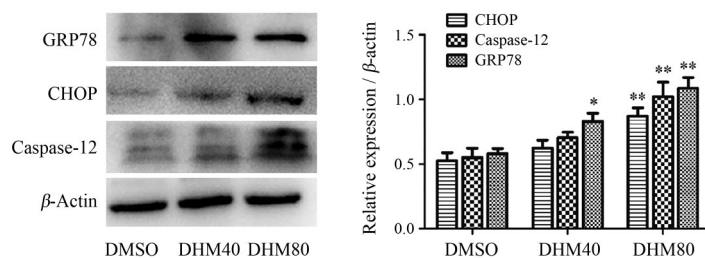


Figure 1 Dihydropyridin (DHM) activated endoplasmic reticulum stress (ERS). The protein expression levels of CHOP, GRP78, and caspase-12 were tested by Western blot after treatment with 40 and 80 μmol·L⁻¹ DHM, and with DMSO as the control for 48 h, respectively. The experiment was repeated three times and the statistical results are presented as $\bar{x} \pm s$ in the histogram (*n* = 3). **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs DMSO group. CHOP: C/EBP-homologous protein; GRP78: Glucose-regulated protein 78; Caspase-12: Cysteiny l aspartate specific protease-12; DMSO: Dimethyl sulfoxide; DHM40: 40 μmol·L⁻¹ DHM; DHM80: 80 μmol·L⁻¹ DHM

作者前期实验结果显示, 不同浓度 DHM 干预 A2780 细胞 24 及 48 h 后, 采用 CCK-8 方法检测细胞活力, 计算获得半数抑制浓度 (50% inhibitory concentration, IC₅₀) 分别为 157.2 和 98.2 μmol·L⁻¹ [5]。本实验中采用 40 和 80 μmol·L⁻¹ 的 DHM 处理 A2780 细胞 48 h 后检测 ERS 相关蛋白的表达水平 (图 1)。结果显示, 与对照组 (DMSO) 相比, DHM (80 μmol·L⁻¹) 处理 48 h 可引起 GRP78 表达水平明显增加 (*P* < 0.01), 且凋亡蛋白 CHOP 和 caspase-12 水平升高 (*P* < 0.01), 表明 DHM 的处理激活了 A2780 细胞内的 ERS 并引起细胞凋亡。

2 ERS 抑制剂预处理可增强 DHM 诱导的细胞凋亡

为进一步探讨 ERS 在 DHM 诱导的细胞凋亡中的作用, 采用 ERS 抑制剂 (4-PBA, 10 mmol·L⁻¹) 预处理 A2780 细胞 1 h, 再用 DHM 干预 48 h 后, 检测各组细胞活力及凋亡率。细胞分组包括: Con 组; DHM (80 μmol·L⁻¹) 组; 4-PBA (10 mmol·L⁻¹) 组; DHM (80 μmol·L⁻¹) + 4-PBA (10 mmol·L⁻¹) 组。

应用 CCK-8 法检测各组细胞活力结果显示: 与 Con 组相比, DHM 单独处理组细胞活力呈显著性降低 (*P* < 0.01, 图 2A), 而 4-PBA 单独处理组细胞活力无变化, 提示 4-PBA 不影响细胞活力; 与 DHM 单独处理组相比, 4-PBA 预处理联合 DHM 组细胞活力降低 (*P* < 0.05, 图 2A)。

应用 FCM 法检测各组细胞凋亡率, 统计分析处于早期凋亡和晚期凋亡的细胞占总细胞的比例为各组细胞的凋亡率。结果显示: 与 Con 组相比, DHM 处理组细胞凋亡率明显增加 (*P* < 0.01, 图 2B、C), 而 4-PBA 单独处理组细胞凋亡率无变化, 提示 4-PBA 不影响细胞凋亡; 与 DHM 单独处理组相比, 4-PBA 预处理联合 DHM 组的细胞凋亡率明显增加 (*P* < 0.01, 图 2B、C)。细胞活力检测及凋亡率分析结果表明, 抑制 ERS 联合 DHM 处理可降低细胞活力并促进细胞凋亡。

应用 Western blot 法检测促凋亡蛋白 cleaved-

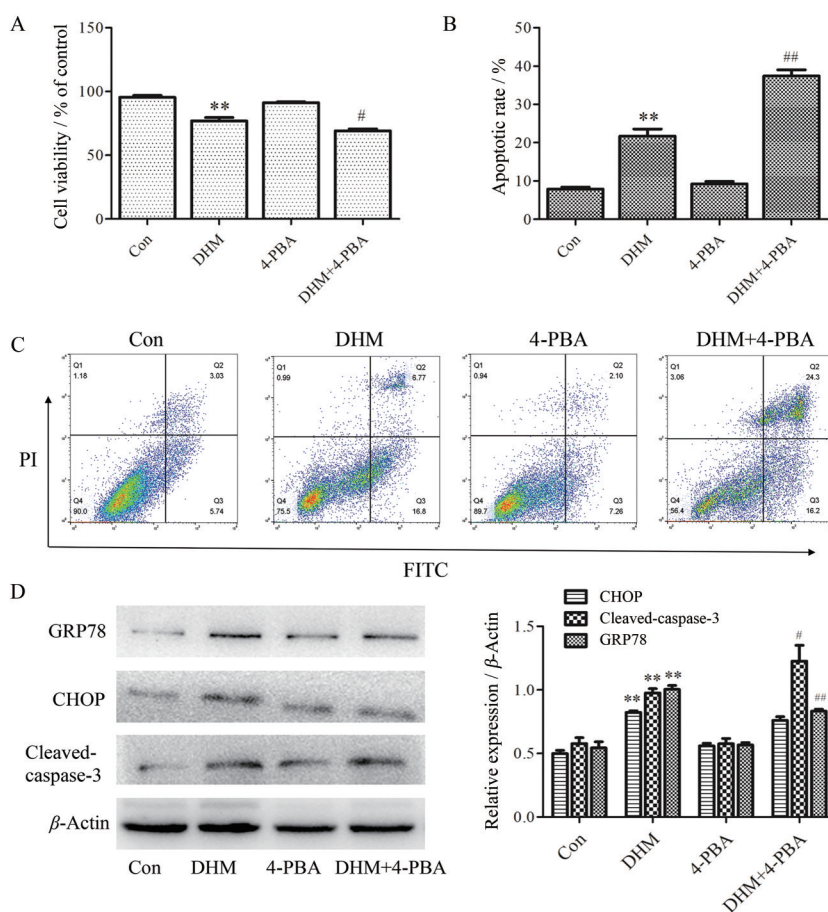


Figure 2 Inhibition of ERS enhanced DHM-induced apoptosis in A2780 cells. A: Cell viability was tested by CCK-8 assay; B and C: Apoptotic rate was detected by FCM (C) and the statistical analysis was shown (B); D: Protein expression was detected by Western blot. The experiment was repeated three times and the representative results of one experiment are shown. The statistical results are presented as $\bar{x} \pm s$ in the histogram ($n = 3$). ** $P < 0.01$ vs Con; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs DHM. Con: Control; 4-PBA: 4-Phenyl butyric acid; PI: Propidium iodide; FITC: Fluorescein isothiocyanate; CCK-8: Cell counting kit-8; FCM: Flow cytometry

caspase-3 和 ERS 相关蛋白 GRP78 和 CHOP 的表达。结果显示: 与 DHM 单独处理组相比, 4-PBA 预处理联合 DHM 组的促凋亡蛋白 cleaved-caspase-3 的表达增加 ($P < 0.05$), GRP78 表达降低 ($P < 0.01$), 而 CHOP 蛋白水平无明显变化, 表明 ERS 抑制剂联合 DHM 处理增加了 A2780 细胞凋亡的水平, 与 FCM 检测结果一致 (图 2D)。

3 DHM 具有抑制裸鼠卵巢癌移植瘤的作用

3.1 DHM 对裸鼠移植瘤生长的影响 将 A2780 细胞皮下接种于裸鼠, 接种后第 8 天进行 DHM ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 腹腔注射干预。共干预 21 天, 干预结束时, 检测各组裸鼠肿瘤体积。结果显示第 21 天时, 对照组 (Con) 平均肿瘤体积为 $(1\ 669.22 \pm 213.66) \text{ mm}^3$, DHM 组平均肿瘤体积为 $(1\ 119.02 \pm 109.29) \text{ mm}^3$, 二者差异显著 ($P < 0.01$, 图 3A)。肿瘤生长曲线结果显示 (图 3B), DHM 处理明显抑制了肿瘤的生长 ($P < 0.01$)。

3.2 DHM 对裸鼠移植瘤形态的影响 实验结束后, 完整分离各裸鼠的肿瘤组织。由于各裸鼠对药物敏感性有差异, 因而 DHM 组内肿瘤大小显示有差异, 但肉眼观察两组裸鼠的瘤组织形态无显著差别, 肿瘤质地均较软、呈单个肿块、形状椭圆形, 与皮肤无粘连、活动度好、被膜完整、表面光滑、血管丰富, 基部与肌肉、脂肪组织等无粘连, 切面呈灰白或灰红色、鱼肉样 (图 4A)。

经 HE 染色后在光镜下观察皮下瘤组织的形态特点, 结果显示, 对照组瘤细胞均较密集、有腺样结构形成, 间质内可见丰富的血管, 纤维性被膜清晰, 坏死较少 (图 4B)。DHM 处理组瘤细胞密度降低、瘤组织内坏死多见, 间质内大量炎细胞浸润, 可见纤维增生 (图 4B), 表明 DHM 处理可引起瘤组织内出现明显细胞坏死。

3.3 透射电镜观察细胞超微结构改变 通过透射电镜观察组织细胞内的内质网等细胞器的结构特点, 结

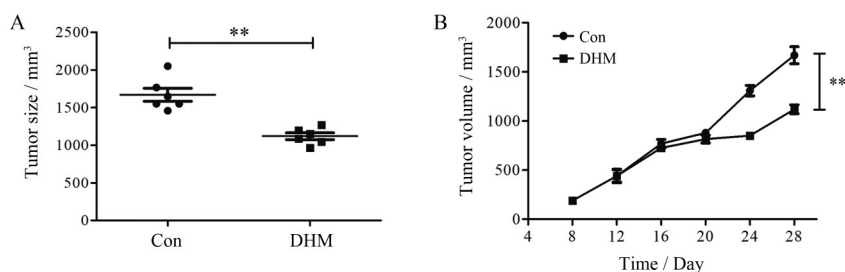


Figure 3 Effect of DHM on the transplanted tumor in nude mice. A2780-bearing mice were randomly divided into two groups. One group received saline solution as control and the other group received DHM ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) daily for 21 days. A: The tumor size difference in two groups; B: Growth curves of transplanted tumor in two groups. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs Con

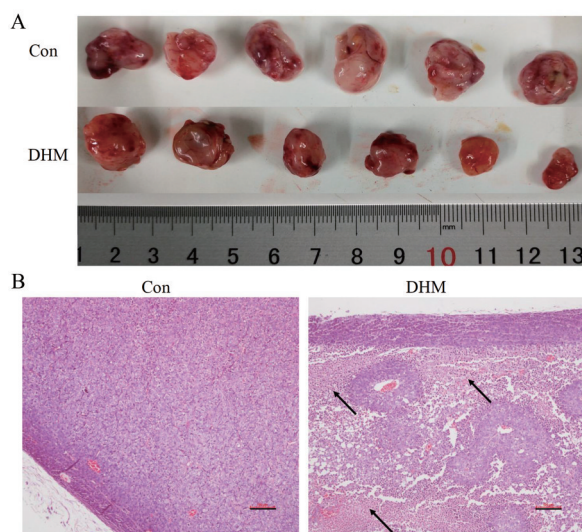


Figure 4 Morphological features of transplanted tumor in two groups. A: Implanted tumors gained from nude mice after 21 days ($n = 6/\text{group}$); B: The representative morphological features of tumor tissues analyzed by haematoxylin-eosin (HE) staining (scale bar, $100 \mu\text{m}$)

果如图 5 所示。对照组细胞内的细胞核 (nucleus, N)、内质网 (endoplasmic reticulum, ER)、高尔基体 (Golgi apparatus, GA) 和线粒体 (mitochondria, M) 等细胞器结构正常, 而 DHM 处理组细胞内可见明显 ER 肿胀和破碎。

3.4 DHM 对肿瘤组织内 GRP78、CHOP 及 cleaved-caspase-3 表达的影响 通过 Western blot 法检测 DHM 干预 21 天后裸鼠瘤组织内 GRP78、CHOP 及 cleaved-caspase-3 蛋白的表达水平, 结果如图 6 所示。与对照组 (Con) 相比, DHM 处理组内 ERS 相关蛋白 GRP78、CHOP 和促凋亡蛋白 cleaved-caspase-3 的表达水平均增加, 表明 DHM 的处理激活了 ERS 并促使细胞凋亡。

讨论

DHM 是一种存在于植物性食物中的黄酮类化合

物, 在藤茶 (广泛分布于湖北、广西和湖南等地) 的嫩茎叶中含量最高^[8]。已报道 DHM 具有抑菌抗炎、抗氧化和抗癌等多种药理活性, 具有潜在的多靶点作用, 而且在不同肿瘤细胞中的作用机制也不尽相同^[9]。作者前期研究发现 DHM 可促进卵巢癌细胞凋亡, 其机制可能与通过线粒体途径而诱发高尔基体碎裂有关^[5]。有研究报道同为食源性黄酮类化合物的珍珠梅黄酮可能通过 ERS 途径诱导肝癌移植瘤细胞凋亡^[10], 芹菜素能诱导肝癌细胞自噬及凋亡^[11], 均表明食源性黄酮类化合物可能通过诱导细胞凋亡而抑制肿瘤生长。目前亦有报道 DHM 可通过 p53 通路诱导卵巢癌细胞凋亡及逆转多药耐药^[12], 然而 DHM 作用靶点多样化、作用机制复杂, 其能否通过 ERS 通路诱导卵巢癌细胞凋亡还未见报道。

细胞凋亡途径包括死亡受体 (death receptor, DR) 介导的外源性凋亡、线粒体依赖的内源性凋亡和 ERS 通路介导的凋亡^[13]。研究已证实 CHOP 和 caspase-12 在 ERS 诱导的细胞凋亡中发挥重要作用^[14]。ERS 通路激活后可通过下游促凋亡因子 CHOP 来诱发 caspase 级联反应^[15,16], 其中 caspase-12 位于 ER 膜, caspase-12 活化可进一步激活 caspase-3, 再通过后续级联反应执行细胞凋亡程序^[17]。GRP78 是 ER 上的伴侣蛋白, 可重新折叠 ER 中的“错误折叠蛋白”来保护细胞免受损伤, ERS 激活后其表达水平增加^[18], 因而 GRP78 成为 ERS 标志性蛋白之一。有研究发现白花地胆草 (*Elephantopus mollis* H.B.K.) 单体分子 EM-12 可通过激活 ERS 介导的细胞凋亡通路来诱导卵巢癌 A2780 细胞凋亡^[19], 这与本研究结果一致, 本研究发现 DHM 处理 A2780 细胞可引起 GRP78、CHOP 的蛋白表达增加, 及 caspase-12 的水平增加, 表明 DHM 处理激活了 ERS 通路引起细胞凋亡。

为深入探讨, 本研究又采用 ERS 抑制剂 4-PBA 预处理 A2780 细胞 1 h, 再用 DHM 干预 48 h, 结果发现抑制 ERS 后, A2780 细胞的凋亡率明显增加, 说明 ERS 在

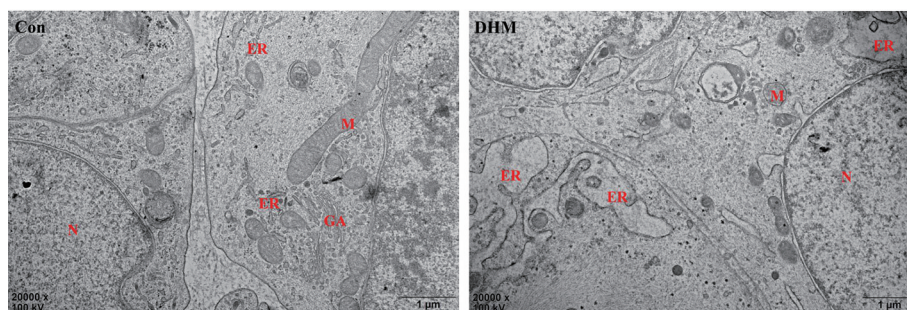


Figure 5 Ultrastructural features of tumor tissues of nude mice were observed by transmission electron microscope (TEM). A2780-bearing mice were randomly divided into two groups. One group received saline solution as control and the other group received DHM (200 mg·kg⁻¹·d⁻¹) daily for 21 days. Scale bar: 1 μm. N: Nucleus; ER: Endoplasmic reticulum; GA: Golgi apparatus; M: Mitochondria

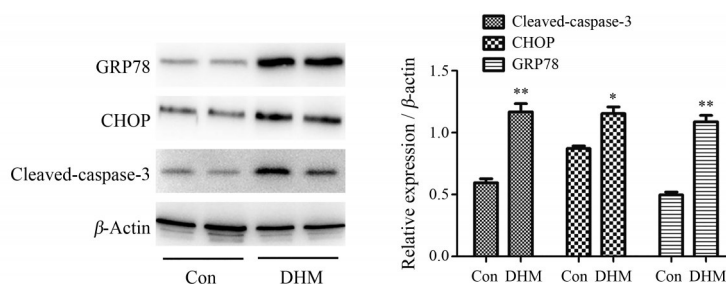


Figure 6 Protein expression levels of GRP78, CHOP, and cleaved-caspase-3 in tumor tissues were analyzed by Western blot. Nude mice bearing A2780 tumors were randomized and treated with DHM (200 mg·kg⁻¹·d⁻¹) once daily continuously for 21 days. The statistical data of relative expression are presented as $\bar{x} \pm s$ in the histogram ($n = 6$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Con

DHM 诱导细胞凋亡过程中可能起细胞保护作用, 而且 DHM 联合 ERS 抑制剂处理可促进癌细胞的凋亡, 进而提高其临床疗效。体内实验亦发现 DHM 腹腔注射抑制了裸鼠体内肿瘤的生长, 同时在瘤组织内可见 ER 水肿、破碎等 ERS 性改变, 且瘤组织内 ERS 相关的蛋白及凋亡蛋白的表达均增加, 因此体内实验结果表明 DHM 干预可抑制体内卵巢癌的生长, 与激活 ERS 通路促进肿瘤细胞凋亡有关。

综上所述, 本研究发现 DHM 可通过激活 ERS 通路促进卵巢癌细胞凋亡, 但其调控 ERS 并诱导细胞凋亡的具体分子机制还有待深入研究。本研究可为藤茶、枳椇子等药食两用植物的研发及应用提供理论依据。

作者贡献: 王凤杰负责课题实施及撰写初稿; 王海静负责数据整理及统计分析; 陈显兵负责课题设计及指导; 易永芬负责课题指导及终稿审查; 谢雅负责细胞学实验; 张桃负责动物体内实验。

利益冲突: 所有作者均不存在利益冲突。

References

[1] Liu C, Wu JL, Zhao N, et al. Correlation analysis between quality and habitat phenotype of *Hovenia acerba* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2017, 42: 4769-4774.
 [2] Zhou DZ, Sun HY, Yue JQ, et al. Dihydromyricetin induces

apoptosis and cytoprotective autophagy through ROS-NF-κB signalling in human melanoma cells [J]. Free Radic Res, 2017, 51: 517-528.
 [3] Qi SM, Jiang Q, Li Q, et al. Ampelopsin inhibited apoptosis and migration of SMMC-7721 cells through MAPKs signaling pathway [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2019, 54: 1431-1438.
 [4] Wu B, Lin J, Luo J, et al. Dihydromyricetin protects against diabetic cardiomyopathy in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 3764370.
 [5] Wang F, Chen X, Yuan D, et al. Golgi reassembly and stacking protein 65 downregulation is required for the anti-cancer effect of dihydromyricetin on human ovarian cancer cells [J]. PLoS One, 2019, 14: e0225450.
 [6] Zhou Y, Shu F, Liang X, et al. Ampelopsin induces cell growth inhibition and apoptosis in breast cancer cells through ROS generation and endoplasmic reticulum stress pathway [J]. PLoS One, 2014, 9: e89021.
 [7] Azuma K, Ishihara T, Nakamoto H, et al. Effects of oral administration of fucoidan extracted from *Cladosiphon okamuranus* on tumor growth and survival time in a tumor-bearing mouse model [J]. Mar Drugs, 2012, 10: 2337-2348.
 [8] Zhou TD, Zhou XX. Isolation, structure determination and pharmacological activity of flavanonol from *Ampelopsis grossedentata* [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 1996, 31: 458-461.
 [9] Chen YL, Yin YF, Li Y, et al. Advances in pharmacological

- study of dihydromyricetin [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2019, 28: 173-178.
- [10] Liu RR, Zhang X, Xiao B, et al. Mechanism of TTF1-NP induced implanted hepatoma tumor apoptosis in nude mice by endoplasmic reticulum stress pathway [J]. *Acta Pharm Sin (药理学学报)*, 2016, 51: 403-407.
- [11] Yang J, Pi C, Wang G, et al. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 699-707.
- [12] Xu Y, Wang S, Chan HF, et al. Dihydromyricetin induces apoptosis and reverses drug resistance in ovarian cancer cells by p53-mediated downregulation of survivin [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 46060.
- [13] Wang M, Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease [J]. *Nature*, 2016, 529: 326-335.
- [14] Badiola N, Penas C, Miñano-Molina A, et al. Induction of ER stress in response to oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of the PERK and IRE-1 pathways and of caspase-12 [J]. *Cell Death Dis*, 2011, 2: e149.
- [15] Li Y, Guo Y, Tang J, et al. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2015, 47: 146-147.
- [16] Zhou W, Fang H, Wu Q, et al. Ilamycin E, a natural product of marine actinomycete, inhibits triple-negative breast cancer partially through ER stress - CHOP - Bcl-2 [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15: 1723-1732.
- [17] Song J, Zhang Q, Wang S, et al. Cleavage of caspase-12 at Asp94, mediated by endoplasmic reticulum stress (ERS), contributes to stretch-induced apoptosis of myoblasts [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233: 9473-9487.
- [18] Ibrahim IM, Abdelmalek DH, Elfiky AA. GRP78: a cell's response to stress [J]. *Life Sci*, 2019, 226: 156-163.
- [19] Huang X. EM-12, An *Elephantopus mollis* H.B.K. Monomer, Induces Apoptosis by Activating the Intrinsic Apoptotic Signaling Pathway in Response Endoplasmic Reticulum Stress in Ovarian Cancer Cells (白花地胆草单体EM-12通过激活内质网应激介导的内源性凋亡通路诱导卵巢癌细胞凋亡) [D]. Guangzhou: Jinan University, 2018.