

• 研究论文 •

吉祥草活性成分 RCE-4 与塞来昔布联合应用抗宫颈癌 Ca Ski 细胞增殖效果与机制研究

甄虹恒, 游方芳, 程 凡, 邹 坤, 陈重旭, 陈剑锋*

(三峡大学生物与制药学院, 三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443002)

摘要: 本研究旨在探讨 RCE-4 与非甾体抗炎药联用抗宫颈癌 Ca Ski 细胞增殖的协同作用及分子机制。采用 MTT 法和 CalcuSyn V2.0 软件检测细胞增殖并计算联合用药指数 (combination index, CI); Western blot 法分析蛋白表达; Jc-1 染色检测线粒体膜电位; 吖啶橙/溴化乙锭 (acridine orange/ethidium bromide, AO/EB) 染色检测细胞凋亡; 免疫共沉淀法检测 Bcl-2-Bcl-1 复合体的相对含量。结果显示, 塞来昔布与 RCE-4 的协同效果最好, 最佳协同指数为 0.32。二者联用能显著抑制环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 和核转录因子 κ B (nuclear transcription factor kappa B, NF- κ B) 的表达, 促进非甾体抗炎药活化因子 1 (non-steroidal anti-inflammatory drugs activity gene-1, NAG-1) 的表达。同时, 联用也显著抑制了微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein 3, LC3)-II、Bcl-1、p62 以及自噬相关基因 (autophagy-related gene, ATG) 3/4B/5/7/14 的表达, 促进了线粒体膜电位的去极化, 显著抑制了 B 淋巴瘤-2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2) 和 B 淋巴瘤-x1 (B cell lymphoma-x1, Bcl-x1) 的表达, 促进了 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、Bcl-2/Bcl-x1 相关死亡启动因子 (Bcl-2/Bcl-x1-associated death promoter, Bad) 以及活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase, cleaved-caspase) 3/7/9 的表达。另外, 二者联用也极显著地抑制了 Bcl-2-Bcl-1 复合体的形成。综上所述, RCE-4 与塞来昔布联用可能通过抑制 Bcl-2-Bcl-1 复合体的形成, 抑制 RCE-4 诱导的自噬并增强其凋亡, 从而提高 RCE-4 对宫颈癌 Ca Ski 细胞的敏感性。

关键词: RCE-4; 塞来昔布; 凋亡; 自噬; Bcl-2-Bcl-1 复合体

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)07-1911-10

The mechanism of RCE-4, an active ingredient of *Reineckia carnea*, in combination with celecoxib on the anti-proliferation of cervical cancer Ca Ski cells

ZHEN Hong-heng, YOU Fang-fang, CHENG Fan, ZOU Kun, CHEN Chong-xu, CHEN Jian-feng*

(College of Biological and Pharmaceutical Sciences of China Three Gorges University, Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, Yichang 443002, China)

Abstract: This research explored the synergistic effects and the potential mechanisms of RCE-4 and various nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on the proliferation of cervical cancer Ca Ski cells. The MTT assay and CalcuSyn V2.0 software were used to detect cell proliferation and calculate the combination index (CI); the expression levels of various proteins were analyzed using Western blot assay; mitochondrial membrane potential (MMP) was assessed using JC-1 staining; acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) double-fluorescence staining was used to detect the apoptosis of Ca Ski cells; a co-immunoprecipitation (Co-IP) assay was used to analyze the

收稿日期: 2021-01-01; 修回日期: 2021-03-01.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773952).

*通讯作者 Tel: 15997621712, E-mail: chenjianfeng2003@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0004

relative content of Bcl-2-Beclin 1 complex in Ca Ski cells. The results demonstrate that the combination of RCE-4 and NSAIDs increases the inhibition of Ca Ski cells compared to the single-RCE-4 group, and celecoxib provided the best synergistic effect among the four NSAIDs tested, with a CI of 0.32. The combination of RCE-4 and celecoxib significantly down-regulated the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B), and promoted the expression of non-steroidal anti-inflammatory drugs activity gene-1 (NAG-1). In addition, autophagy induced by RCE-4 was markedly inhibited in combination with celecoxib, which was associated with down-regulation of the expression of microtubule-associated protein 3 (LC3)-II, Beclin 1, p62 and autophagy-related gene (ATG) 3/4B/5/7/14. RCE-4-induced apoptosis was significantly enhanced by altering the depolarization of mitochondrial membrane potential and the expression of B cell lymphoma-2 (Bcl-2), B cell lymphoma-x1 (Bcl-x1), Bcl-2 associated X protein (Bax), Bcl-2/Bcl-x1-associated death promoter (Bad) and cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase (cleaved-caspase) 3/7/9. Furthermore, the formation of the Bcl-2-Beclin 1 complex was significantly inhibited in Ca Ski cells treated with RCE-4 in combination with celecoxib. Taken together, this research shows that the combination of RCE-4 and celecoxib has a significant synergistic effect on the proliferation of Ca Ski cells by promoting apoptosis, inhibiting autophagy and disturbing the formation of the Bcl-2-Beclin 1 complex, which may be a novel strategy to increase the sensitivity of anti-cervical cancer drugs.

Key words: RCE-4; celecoxib; apoptosis; autophagy; Bcl-2-Beclin 1 complex

吉祥草 [*Reineckia carnea* (Andr.) Kunth.] 为百合科铃兰族吉祥草属植物, 以全草入药, 在我国鄂西土家族聚居区广为分布, 当地土家药匠利用其治疗痈肿疮疔、赤火毒疮和感冒、急慢性支气管炎引起的咳嗽气喘等疾患^[1]。RCE-4是本实验室从吉祥草中分离得到的一个螺甾烷型甾体皂苷, 化学名称为(1 β ,3 β ,5 β ,25S)-螺甾烷-1,3-diol-1-[α -L-鼠李糖-(1 \rightarrow 2)- β -D-木吡喃糖苷], 结构见图1。RCE-4在吉祥草总皂苷中的含量最高(13%), 同时其药理活性也最好, 现该化合物已作为吉祥草的标志性成分被湖北省地方中药材标准收录^[2]。

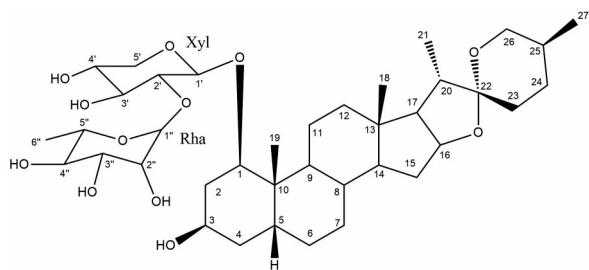


Figure 1 The molecular structure of RCE-4

本实验室在前期对 RCE-4 进行了初步研究, 结果显示 RCE-4 对宫颈癌 Ca Ski 细胞的增殖具有显著的抑制效果及较好的选择性细胞毒活性^[3]。裸小鼠 Ca Ski 细胞移植瘤实验显示, RCE-4 能显著抑制肿瘤生长, 最高抑瘤率可达到 69.1%, 显示了其对宫颈癌治疗的巨大潜力^[4]。前期研究也发现了 RCE-4 作为潜在抗宫颈癌药物的一些不足之处, 如抗宫颈癌效果(抑瘤率)还有待提高, 给药剂量相对较大等。因此, 本研究拟尝试将 RCE-4 与其他药物联合应用以解决该问题。

非甾体抗炎药 (non-steroidal anti-inflammatory

drugs, NSAIDs) 是一类通过抑制环氧合酶 (cyclooxygenase, COX) 而具有解热镇痛抗炎活性的药物, 其抗肿瘤活性和对其他抗肿瘤药物的协同增效作用也已得到广泛证实, 其机制主要是通过抑制 COX-2 的表达和炎症信号通路 [如核转录因子 (nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)] 的活化而发挥协同增效作用^[5-8]。预实验结果显示, RCE-4 对炎症的主要靶标 COX-2 和 NF- κ B 的表达均具有明显的诱导作用, 不同浓度的 RCE-4 作用于 Ca Ski 细胞后, COX-2 和 NF- κ B 蛋白的表达量提高了 3~5 倍, 推测 RCE-4 在作用于 Ca Ski 细胞后可能会激活炎症信号通路从而削弱其抗宫颈癌效果。另外, 预实验还发现, RCE-4 能显著增加非甾体抗炎药活化因子 1 (non-steroidal anti-inflammatory drugs activity gene-1, NAG-1) 在 Ca Ski 细胞中的表达。NAG-1 是一种转化生长因子 (TGF- β) 超家族成员, 具有抑制肿瘤细胞增殖和促进凋亡的作用, NSAIDs 能诱导某些肿瘤细胞表达 NAG-1 而导致肿瘤细胞生长停滞和凋亡增加^[9], 因此, 该蛋白是非 COX-2 途径的重要炎症靶点^[10,11]。在预实验结果的启发下, 本课题组推测是否可以将 RCE-4 与非甾体抗炎药联用, 通过抑制 COX-2 和 NF- κ B, 激活 NAG-1 的表达, 从而发挥协同抗肿瘤作用, 以增强 RCE-4 的抗宫颈癌效果。

化疗药物的最终目标是诱导肿瘤细胞死亡, 比如坏死 I 型程序性细胞死亡 (凋亡) 和 II 型程序性细胞死亡 (自噬)^[12]。本课题组前期的工作已经证实, RCE-4 主要通过诱导 Ca Ski 细胞凋亡和自噬而发挥抗宫颈癌作用^[3,13,14]。其中, 诱导的凋亡促进了 Ca Ski 细胞的死亡, 为正调控, 但诱导的自噬则保护了 Ca Ski 细胞的存活和增殖, 为负调控。另外, 凋亡和自噬作为细胞程序

性死亡的两种方式并不是孤立存在的, 现有研究已证实, Bcl-2-Bcl-1 复合体分子是细胞内自噬与凋亡互反馈调控网络的核心和“总开关”, 其胞内分子数量的动态变化调控着细胞程序性死亡的启动、进行和终止的全过程^[15-19]。因此, 本研究将RCE-4与非甾体抗炎药联用, 探究联合用药方案是否可以改变对Ca Ski细胞自噬和凋亡的调控, 比如加强其正调控(促进凋亡)、减弱负调控(抑制自噬), 是否可以调节Bcl-2-Bcl-1复合体的形成和解离, 从而深入解析二者联用的分子作用机制。

综上所述, 本研究拟尝试将RCE-4与不同的非甾体抗炎药联用, 寻找最佳的联用药物和剂量, 探索RCE-4减毒增效的途径。同时以Ca Ski细胞的程序性死亡为切入点, 系统研究药物联用的分子作用机制, 为RCE-4将来的临床应用提供理论支撑。

材料与方法

细胞株 人宫颈癌Ca Ski细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)。

主要材料与试剂 RCE-4(本实验室从吉祥草中分离并进行结构鉴定); 布洛芬(ibuprofen)、吲哚美辛(indometacin)、双氯芬酸钠(diclofenac sodium)、塞来昔布(celecoxib)(阿拉丁aladdin); 一抗COX-2、NAG-1、NF- κ B、p62、Bcl-1、pBcl-1、微管相关蛋白轻链3(microtubule-associated protein 3, LC3)-I/II、自噬相关基因(autophagy-related gene, ATG) 3、ATG5、ATG7、ATG4B、ATG14、B淋巴细胞瘤-2(B cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、Bcl-2/Bcl-x1相关死亡启动因子(Bcl-2/Bcl-x1-associated death promoter, Bad)、B淋巴细胞瘤-x1(B cell lymphoma-x1, Bcl-x1)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteiny aspartate specific proteinase, caspase) 3、cleaved-caspase 3、caspase 9、cleaved-caspase 9、cleaved-caspase 7、 β -actin(美国Cell Signaling Technology公司); 二抗辣根酶标记山羊抗小鼠IgG(武汉塞维尔生物科技有限公司); 1640培养基(美国Gibco公司); 胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司); 青霉素-链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司); MTT(美国Amersco公司); DMSO(美国Sigma公司); ECL超敏发光液(北京普利莱基因技术有限公司); Jc-1染色试剂盒(国产Beyotime C2006); AO/EB双荧光染色试剂盒(雷根生物公司)。

仪器 酶标仪(瑞士TECAN infinite F200 PRO); 荧光显微镜(宁波舜宇仪器有限公司XD30A-RFL); CO₂培养箱(德国Binder公司)。

Ca Ski细胞培养和传代 Ca Ski细胞采用1640培养基(含10%胎牛血清、1%青链霉素双抗)于37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养, 0.25%胰酶消化传代。

MTT法及CalcuSyn V2.0软件检测RCE-4与非甾体抗炎药联合应用对Ca Ski细胞增殖的影响 以2、4、6、8、10和12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RCE-4单用及分别与20、40、60、80、100、120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 非甾体抗炎药联合应用, 并设置对照组, 每组设定5个复孔, 检测对Ca Ski细胞的增殖抑制效果。待细胞培养到对数期后, 调整Ca Ski细胞浓度为每毫升 1×10^5 个, 以每孔100 μL 细胞悬液接种至96孔板中, 培养24 h后, RCE-4单药组加入上述6个浓度梯度的100 μL RCE-4溶液, 联用组加入上述浓度梯度RCE-4和相应浓度的非甾体抗炎药100 μL 混合溶液, 对照组(control)加100 μL 培养基, 48 h后每孔加入5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT工作液20 μL , 避光孵育4 h后, 每孔加入150 μL DMSO, 室温震荡10 min。在酶标仪上492 nm波长处测定各孔的吸光度值, 计算对细胞的抑制率。细胞抑制率(%) = $1 - (\text{加药孔吸光度值} - \text{空白孔吸光度值}) / (\text{对照孔吸光度值} - \text{空白孔吸光度值}) \times 100\%$, 取平均值, 每组重复3次。而后, 以CalcuSyn V2.0软件计算两药联合用药协同指数(combination index, CI), CI > 1为拮抗作用, CI = 1为相加作用, $0.7 < \text{CI} < 1$ 为轻微协同作用, $0.3 < \text{CI} < 0.7$ 为协同作用, CI < 0.3为强协同作用。

Western blot分析炎症、自噬及凋亡相关蛋白表达水平 待细胞长到对数期, 经过药物处理24 h后收集细胞, 加入含磷酸蛋白酶抑制剂的蛋白质裂解液裂解细胞提取蛋白质, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳80 V恒压30 min, 再转120 V恒压分离出目的蛋白, 电泳结束后转印蛋白至PVDF膜上, 脱脂牛奶封闭液室温封闭2 h, TBST洗3次, 每次10 min, 加入相应一抗, 4℃摇床孵育过夜, TBST洗3次, 每次10 min, 然后用辣根酶标记的二抗室温孵育1 h, 再次用TBST洗涤3次, 每次10 min, 然后用ECL发光液显影, 以 β -actin作为内参, 使用Image J软件进行各组蛋白条带灰度值计算。

Jc-1试剂盒检测线粒体膜电位 调整Ca Ski细胞浓度为每毫升为 1×10^5 个, 接种于24孔板, 培养至贴壁后, 设置对照组, 加入相应药液分别处理6、12和24 h。将冻存的储存液置于室温充分融化后, 用预热的培养基稀释至所需工作液浓度。吸去培养液, PBS漂洗2次后加入Jc-1染色工作液, 5% CO₂饱和湿度、37℃的培养箱中孵育20 min后, 荧光显微镜检测计数并拍照。

AO/EB荧光双染检测细胞凋亡 取对数生长期的Ca ski细胞以每毫升 2×10^5 个的单细胞悬液1 mL接

种于24孔板中,待细胞贴壁后,设置对照组,用相应药液处理6、12和24 h后,收集细胞,用PBS冲洗2次, AO Stain Buffer (1×) 清洗细胞1次,加入适量的AO染色缓冲液 (1×) 重悬细胞,按照细胞悬液: AO染色液 = 19:1的比例混合,并加入适量AO、EB染色液,轻轻混匀,室温避光染色15 min,在荧光显微镜(激发滤光片波长488 nm,阻断滤光片波长515 nm)下观察细胞形态学变化,计数并拍照。

免疫共沉淀检测 Bcl-2-Beclin 1 复合体的相对含量 设置对照组将 Ca Ski 细胞用 RCE-4 (4 μmol·L⁻¹) 或 RCE-4 (4 μmol·L⁻¹) 和塞来昔布 (80 μmol·L⁻¹) 联合应用处理后,于5% CO₂饱和湿度、37 °C的孵箱中培养24 h。用RIPA裂解液裂解 Ca Ski 细胞,将全细胞裂解物用 protein A/G 琼脂糖珠预清除,然后加入 Bcl-2 或对照 IgG 在 4 °C 缓慢摇动抗原抗体混合物过夜或室温 1 h。免疫沉淀物捕获在 protein A/G 琼脂糖珠并分别通过蛋白质印迹分析抗 Bcl-2 或 Beclin 1 的抗体。

统计学分析 采用 GraphPad Prism 5.0 统计学软件,数据以均数 ± 标准差表示,采用单因素方差分析比较各组间差异。

结果

1 RCE-4 对 COX-2、NF-κB 和 NAG-1 等炎症相关蛋白的影响

RCE-4 作用 Ca Ski 细胞 24 h 后用 Western blot 法检测其对炎症相关蛋白 COX-2、NF-κB 和 NAG-1 的影响 (图2)。结果显示,RCE-4 能显著增加促炎因子 COX-2 和 NF-κB 蛋白的表达 (与正常组相比,具有极显著差异, $P < 0.001$),表明 RCE-4 在发挥抗肿瘤作用的同时可能激活了炎症通路。另外,RCE-4 能极显著增加非甾体抗炎药活化因子 NAG-1 蛋白的表达,表明 RCE-4 与非甾体抗炎药具有潜在的协同作用。因此,本实验将对 RCE-4 与非甾体抗炎药的协同抗肿瘤作用进行研究。

2 RCE-4 与非甾体抗炎药的协同抗肿瘤作用

应用 MTT 方法检测 RCE-4 与 4 种不同的非甾体抗炎药联用时对 Ca Ski 细胞增殖的抑制作用,应用 CalcuSyn V2.0 软件计算联合用药协同指数 (CI) 值。结果表明 (表1、图3), RCE-4 与双氯芬酸钠、布洛芬、吲哚美辛、塞来昔布联用时均有一定的协同效果,效果最好时的 CI 值分别为 0.87、0.76、0.63、0.32。其中,塞来昔布与 RCE-4 的协同用药效果最好,将 RCE-4 对 Ca Ski 的 IC₅₀ 值从 4.71 μmol·L⁻¹ 降至 0.86 μmol·L⁻¹, 80 μmol·L⁻¹ 塞来昔布与 RCE-4 的协同指数 CI 值为 0.32。因此,以下研究将以塞来昔布为模型药,工作浓度选定为 80 μmol·L⁻¹, 探讨 RCE-4 与非甾体抗炎药联

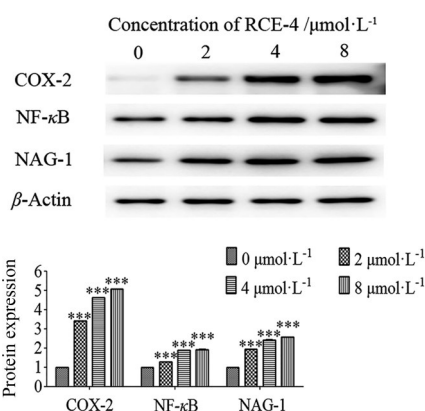


Figure 2 Effect of RCE-4 on inflammatory related proteins (COX-2, NF-κB, NAG-1) expression. Ca Ski cells were treated with RCE-4 (2, 4, 8 μmol·L⁻¹) for 24 h. $n = 3, \bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group. COX-2: Cyclooxygenase-2; NF-κB: Nuclear transcription factor kappa B; NAG-1: Non-steroidal anti-inflammatory drugs activity gene-1

用的分子作用机制。

3 RCE-4 与塞来昔布联用对 Ca Ski 细胞炎症相关蛋白的调控

应用 Western blot 方法检测 RCE-4 (2、4 和 8 μmol·L⁻¹)

Table 1 Combination index (CI) value of RCE-4 in combination with celecoxib on proliferation of Ca Ski cells. Ca Ski cells were treated with RCE-4 (2, 4, 6, 8, 10, 12 μmol·L⁻¹) and celecoxib (20, 40, 60, 80, 100, 120 μmol·L⁻¹) separately or in combination for 48 h. $n = 3, \bar{x} \pm s$

RCE-4 / μmol·L ⁻¹	Celecoxib/μmol·L ⁻¹					
	20	40	60	80	100	120
2	1.34	1.11	0.83	0.53	0.67	0.94
4	0.96	0.85	0.65	0.41	0.60	0.99
6	0.81	0.74	0.41	0.39	0.81	0.87
8	0.93	0.83	0.61	0.32	1.01	1.27
10	1.12	1.02	0.56	0.56	1.04	1.20
12	1.09	1.23	0.92	0.60	1.19	1.12

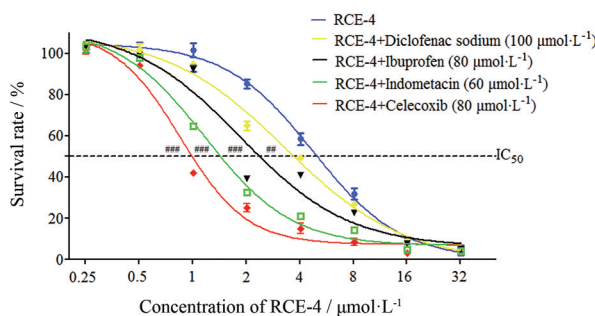


Figure 3 Effect of RCE-4 in combination with non-steroidal anti-inflammatory drugs on proliferation of Ca SKi cells. Ca Ski cells were treated with RCE-4 and non-steroidal anti-inflammatory drugs separately or in combination for 48 h. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs RCE-4 group

与塞来昔布 ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 联用时 COX-2、NF- κ B、NAG-1 三种蛋白的表达。结果显示 (图4), 与单用 RCE-4 相比, 高、中、低浓度的 RCE-4 与塞来昔布联用时, 均能极显著地抑制促炎因子 COX-2 和 NF- κ B 蛋白的表达 ($P < 0.001$), 同时能显著增加 NAG-1 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。

4 RCE-4与塞来昔布联用对Ca Ski细胞自噬的影响

在本课题组之前的研究中已经发现, RCE-4 能诱导 Ca Ski 细胞发生自噬, 但诱导的自噬对 Ca Ski 细胞是保护性的, 有利于 Ca Ski 细胞的存活^[13]。因此, 本研究主要考察当 RCE-4 与塞来昔布联用时, 是否可以抑制这种保护性自噬, 从而增强 RCE-4 的抗宫颈癌活性。Western blot 结果显示 (图5、6), 与单用 RCE-4 相比, 高、中、低浓度的 RCE-4 与塞来昔布联用时, 均能极显著地抑制自噬标志蛋白 LC3-II、自噬起始因子 Beclin 1、自噬底物 p62 及参与自噬过程的重要蛋白分子 ATG3、ATG5、ATG7、ATG4B 和 ATG14 的表达水平, 并增加了磷酸化的 Beclin 1 表达水平 ($P < 0.001$)。以上结果说明, RCE-4 与塞来昔布联用时抑制了 RCE-4 诱

导的 Ca Ski 细胞的保护性自噬。

5 RCE-4与塞来昔布联用对Ca Ski细胞凋亡的影响

5.1 RCE-4与塞来昔布联用对Ca Ski细胞Bcl-2家族蛋白的调控

前期研究已证实 RCE-4 可诱导 Ca Ski 细胞发生线粒体途径的凋亡^[3], 本研究旨在探究 RCE-4 与塞来昔布联用时能否增强 RCE-4 诱导的 Ca Ski 细胞线粒体途径的凋亡。鉴于 Bcl-2 家族蛋白可调节线粒体外膜的透化作用 (MOMP), 进而调控线粒体途径的凋亡, 本研究对 Bcl-2 家族蛋白以 Western blot 法进行了检测, 结果显示 (图7), 与单用 RCE-4 相比, 高、中、低浓度的 RCE-4 与塞来昔布联用均极显著上调促凋亡蛋白 Bax、Bad 的表达水平, 极显著下调抑凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-x1 的表达水平, Bax/Bcl-2 比值显著增大 ($P < 0.001$)。

5.2 RCE-4与塞来昔布联用对Ca Ski细胞caspase家族蛋白的调控

Bcl-2 家族蛋白调控线粒体通透性转变孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 不可逆地过度开放, 致使线粒体外膜的透化作用发生

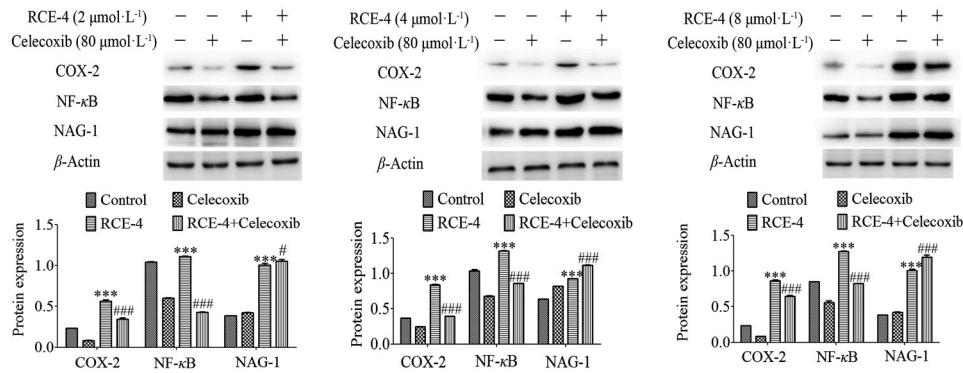


Figure 4 Effect of RCE-4 in combination with celecoxib on inflammatory related proteins (COX-2, NF- κ B, NAG-1) expression. Ca Ski cells were treated with RCE-4 (2, 4, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and celecoxib (80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) separately or in combination for 24 h. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs RCE-4 group

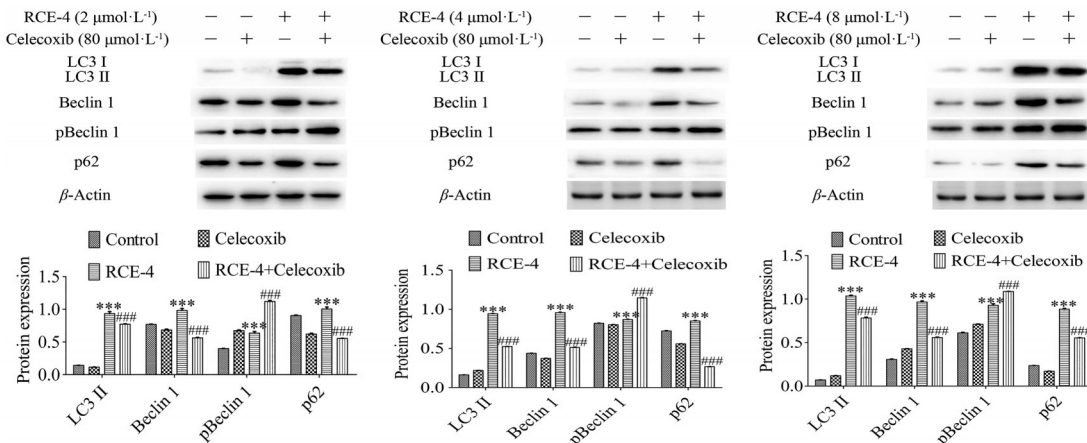


Figure 5 Effect of RCE-4 in combination with celecoxib on autophagy related proteins (LC3-II, Beclin 1, pBeclin 1, p62) expression. Ca Ski cells were treated with RCE-4 (2, 4, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and celecoxib (80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) separately or in combination for 24 h. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs RCE-4 group. LC3: Microtubule-associated protein 3

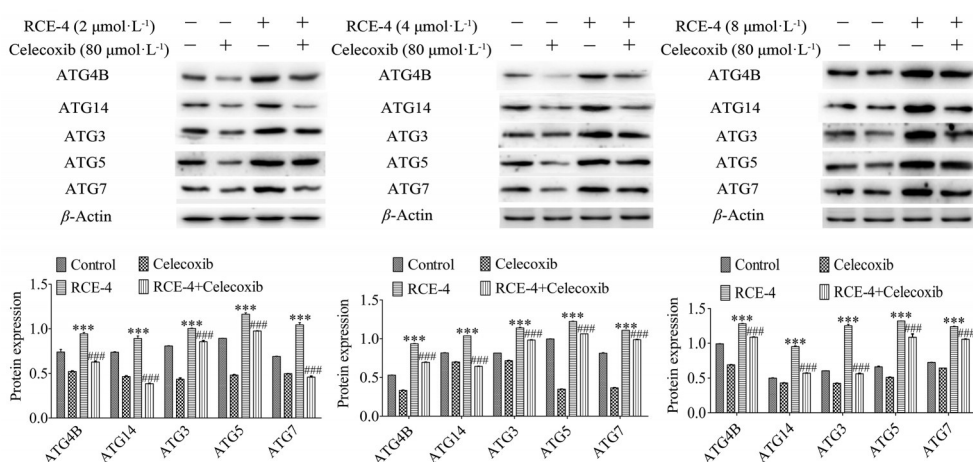


Figure 6 Effect of RCE-4 in combination with celecoxib on autophagy related gene proteins (ATG4B, ATG14, ATG3, ATG5, ATG7) expression. Ca Ski cells were treated with RCE-4 (2, 4, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and celecoxib (80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) separately or in combination for 24 h. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs RCE-4 group

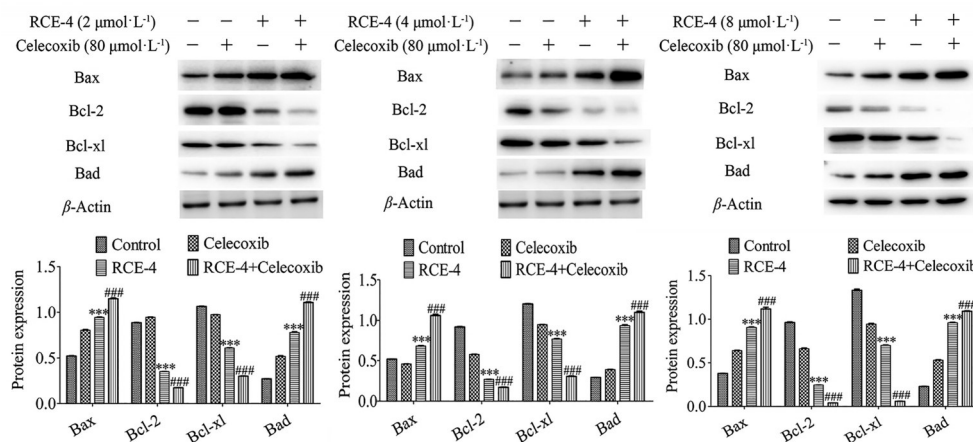


Figure 7 Effect of RCE-4 in combination with celecoxib on B-cell lymphoma-2 family proteins (Bax, Bcl-2, Bcl-xl, Bad) expression. Ca Ski cells were treated with RCE-4 (2, 4, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and celecoxib (80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) separately or in combination for 24 h. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs RCE-4 group. Bcl-2: B cell lymphoma-2; Bcl-xl: B cell lymphoma-xl; Bax: Bcl-2 associated X protein; Bad: Bcl-2/Bcl-xl-associated death promoter

后, 凋亡信号蛋白 caspase 9 被激活, 进而进一步激活凋亡执行蛋白 caspase 3、7 介导的 caspase 级联反应, 引起细胞凋亡。因此, 本研究以 Western blot 法对 caspase 家族蛋白进行检测, 结果显示 (图 8), 与单用 RCE-4 对比, 高、中、低浓度的 RCE-4 与塞来昔布联用极显著上调 cleaved-caspase 3、7 和 9 的表达水平 ($P < 0.001$)。

5.3 Jc-1 染色试剂盒检测 RCE-4 与塞来昔布联用 Ca Ski 细胞的线粒体膜电位

线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 去极化是细胞早期凋亡的标志, 由此, 本研究以 Jc-1 染色试剂盒检测线粒体膜电位, 并统计早期凋亡细胞比例, 结果显示 (图 9), 与单用 RCE-4 (4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对比, RCE-4 (4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与塞来昔布 (80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 联用时, 绿色荧光增强, 红色荧

光减弱, 表明线粒体膜电位的去极化程度更深, 早期凋亡的细胞比例增多 ($P < 0.001$)。

5.4 AO/EB 双荧光染色检测 RCE-4 与塞来昔布联用诱导的 Ca Ski 细胞的凋亡

AO/EB 双荧光染色结果 (图 10) 显示, 与单用 RCE-4 (4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对比, RCE-4 (4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与塞来昔布 (80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 联用时, 绿色荧光减弱, 红色荧光增强, 红/绿荧光比例变化显著, 凋亡细胞比例显著增加, 凋亡水平显著增强。

6 RCE-4 与塞来昔布联用对 Ca Ski 细胞中 Bcl-2-Beclin 1 复合体的调控

Bcl-2-Beclin 1 复合体是细胞自噬与凋亡的“分子调控开关”, 该复合体对肿瘤细胞自噬与凋亡的调控机制已成为当前肿瘤防治的研究热点, 本研究旨在考察

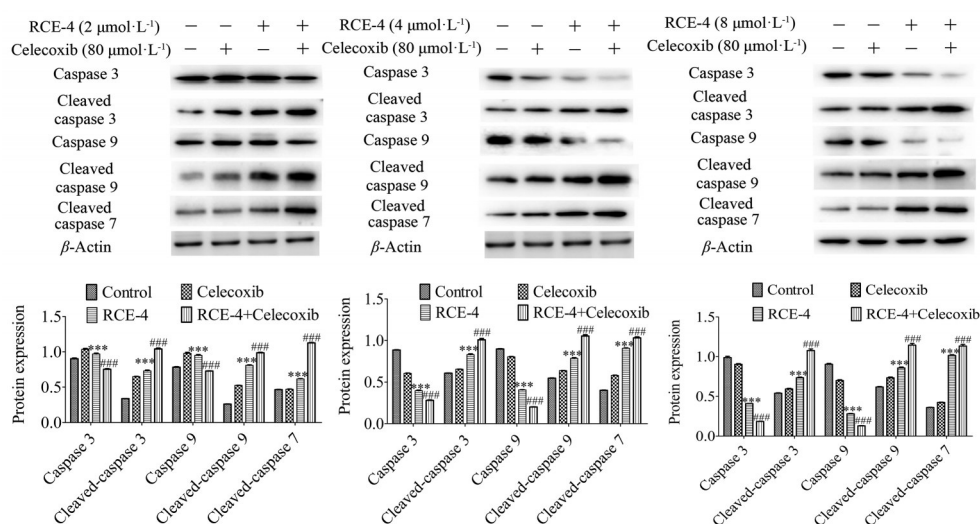


Figure 8 Effect of RCE-4 in combination with celecoxib on cysteinyl aspartate specific proteinase (caspase) family proteins (caspase 3, caspase 9, cleaved-caspase 3, cleaved-caspase 7, cleaved-caspase 9) expression. Ca Ski cells were treated with RCE-4 (2, 4, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and celecoxib (80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) separately or in combination for 24 h. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $***P < 0.001$ vs control group; $###P < 0.001$ vs RCE-4 group

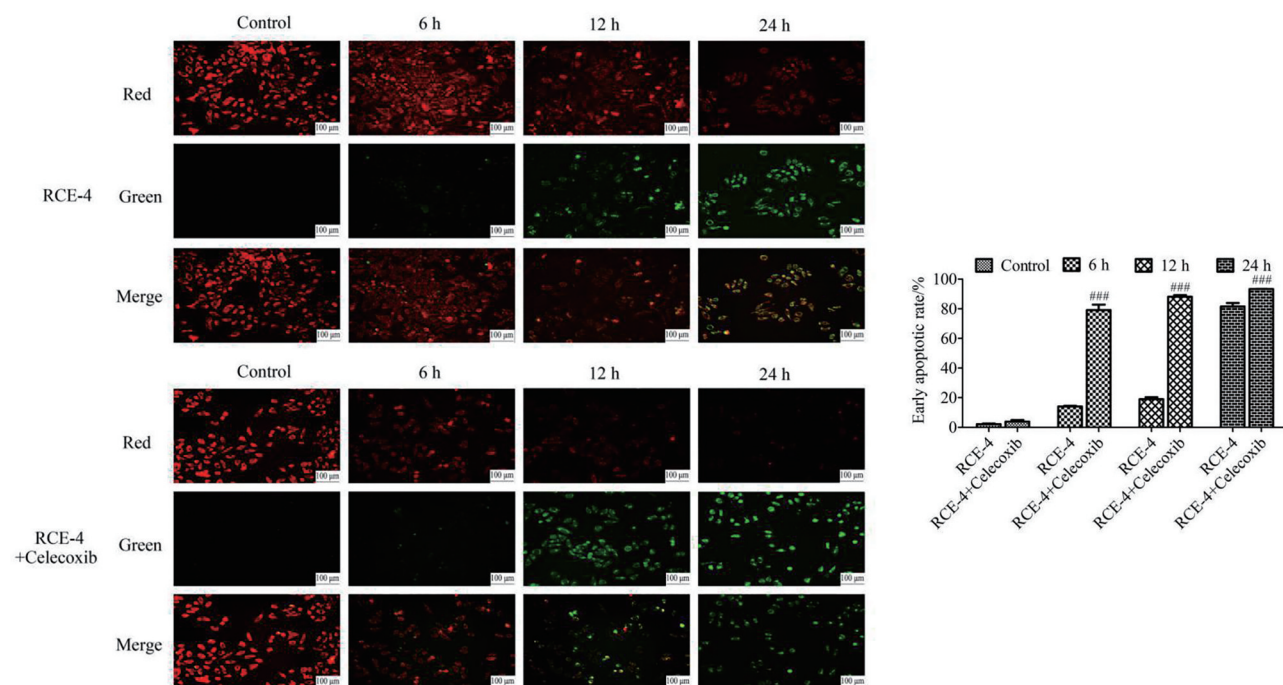


Figure 9 Effect of RCE-4 in combination with celecoxib on mitochondrial membrane potential (MMP) of Ca Ski cells. Ca Ski cells were treated with RCE-4 (4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and celecoxib (80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) separately or in combination for 6, 12, or 24 h. Scale bar: 100 μm . $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $###P < 0.001$ vs RCE-4 group

RCE-4与塞来昔布联用对该复合体的影响。免疫共沉淀结果(图11)显示,与单用RCE-4对比,RCE-4与塞来昔布联用Bcl-2-Bcl-1复合体含量显著降低,说明RCE-4与塞来昔布联用后进一步抑制了Bcl-2-Bcl-1复合体的形成($P < 0.001$)。

讨论

探索化疗药物的减毒增效途径及机制一直是肿瘤

研究人员重点关注的领域之一。基于炎症在肿瘤发生、发展和转移等进程中扮演的重要作用^[20],将NSAIDs与细胞毒类抗肿瘤药物联合的用药方案,可以增强其化疗效果、降低其毒副作用,且已在科研及临床实践中取得了较好的效果^[5-8]。越来越多的研究表明,NSAIDs不仅通过抑制环氧合酶发挥协同增效作用,还可以通过NF- κ B、NAG-1和PI3K等多个靶点介导的非COX依赖途径发挥重要作用^[21-23]。NAG-1蛋白作为非甾体

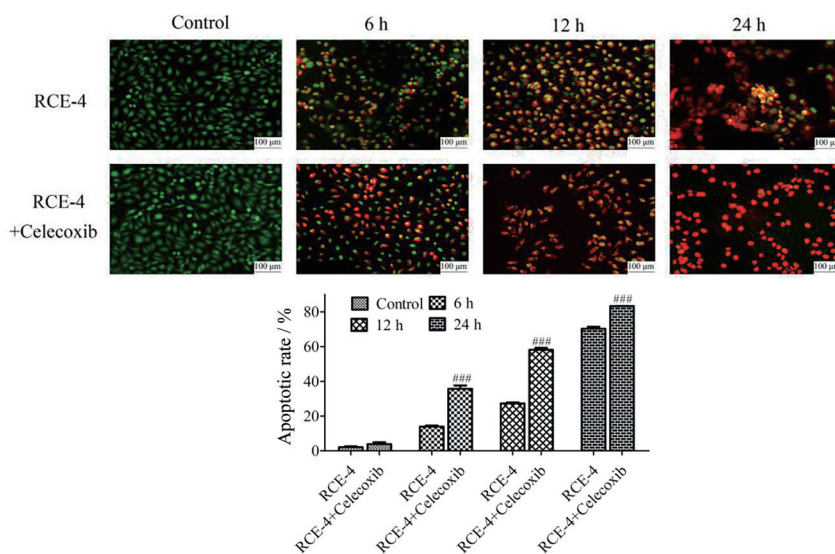


Figure 10 Effect of RCE-4 in combination with celecoxib on apoptosis of Ca Ski cells. Ca Ski cells were treated with RCE-4 ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and celecoxib ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) separately or in combination for 6, 12, or 24 h. Scale bar: 100 μm . $n = 3, \bar{x} \pm s$. ### $P < 0.001$ vs RCE-4 group

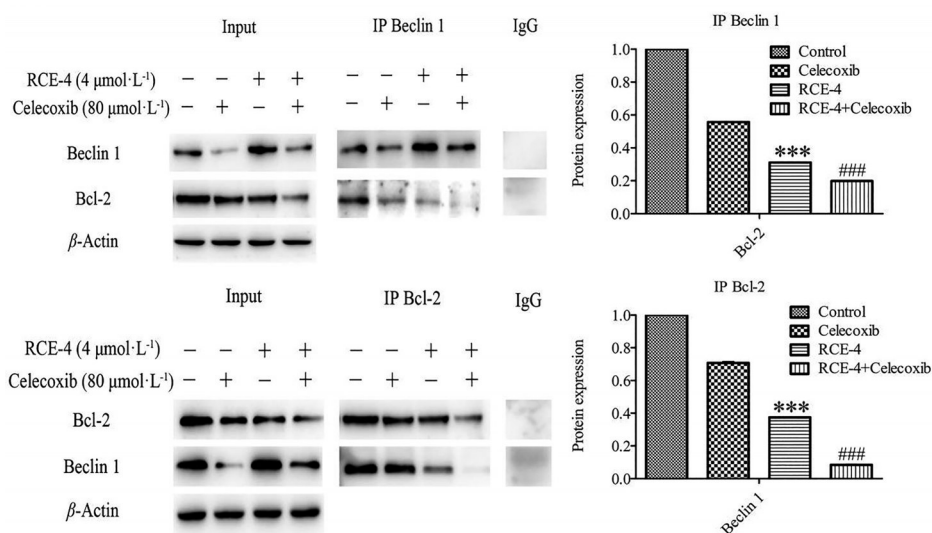


Figure 11 Effect of RCE-4 in combination with celecoxib on Bcl-2-Beclin 1 complex. Ca Ski cells were treated with RCE-4 ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and celecoxib ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) separately or in combination for 24 h. $n = 3, \bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs RCE-4 group

抗炎药活化基因的表达产物, 国内外细胞实验和裸鼠移植瘤模型均证实其具有良好的促凋亡、抑制肿瘤细胞生长增殖的作用, 在使用NSAIDs刺激后, 肿瘤细胞内的NAG-1表达上调, 且与细胞凋亡呈正相关^[9-11]。塞来昔布作为一种高选择性COX-2抑制剂, 其本身不具有明显的细胞毒性($\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 但在与多种抗肿瘤药物联合应用时展现了较好的减毒增效作用^[5-8]。

虽有文献报道不少甾体皂苷作用肿瘤细胞之后, 能抑制COX-2和NF- κ B的表达, 但本课题组反复验证的实验结果显示RCE-4可能具有一定特殊性, 其对COX-2和NF- κ B并非抑制而是诱导作用, 这给了研究人员将RCE-4与非甾体抗炎药联合应用的启示。在本

实验中, 塞来昔布与RCE-4的协同效果要好于布洛芬、吲哚美辛和双氯芬酸钠等非甾体抗炎药, IC_{50} 值降低了约80%。正如预期, 塞来昔布与RCE-4联用之后极显著地抑制了COX-2和NF- κ B等炎症关键蛋白的表达, 削弱了RCE-4作用于Ca Ski细胞后COX-2蛋白上调及相关炎症信号通路激活而导致的细胞耐药性。另外, 二者联用后极显著上调了NAG-1的表达, 从而通过非COX-2途径增强了NSAIDs与RCE-4的协同抗肿瘤活性。

应用Western blot、Jc-1染色和AO/EB双荧光染色等实验对Ca Ski细胞内的凋亡及自噬相关指标分析结果显示, RCE-4与塞来昔布联用后抑制了其诱导的Ca Ski细胞的保护性自噬, 增强了其诱导的Ca Ski细胞凋

亡,从而改变了RCE-4对Ca Ski细胞程序性死亡的综合调控。凋亡和自噬作为细胞程序性死亡的两种方式,并不是孤立存在的,细胞内一些分子如Beclin 1、Bcl-2、caspase 3/7/9、ATG等在二者之间的频繁交叉出现证实凋亡与自噬之间存在串扰、反馈等复杂的调控机制^[18,24,25]。在ATG家族成员(ATG4B、ATG14等)的参与下,Beclin 1通过BH3结构域与Bcl-2结合成Bcl-2-Beclin 1大分子复合体,复合体解离时则释放出Bcl-2和Beclin 1蛋白,二者分别进入线粒体和自噬前体,调控凋亡和自噬的进程^[15-18]。应用免疫共沉淀技术对Ca Ski细胞内Bcl-2-Beclin 1复合体分析结果显示,与单用RCE-4相比,RCE-4与塞来昔布联用后,Bcl-2-Beclin 1复合体的相对含量显著减少。这说明RCE-4与塞来昔布联用后,显著抑制了Bcl-2-Beclin 1复合体的形成,同时通过下调Beclin 1、Bcl-2的表达从而抑制RCE-4诱导的Ca Ski细胞保护性自噬,增强RCE-4诱导的Ca Ski细胞凋亡。

综上,RCE-4可能通过对Bcl-2-Beclin 1复合体分子的调控诱导Ca Ski细胞发生显著自噬和凋亡。RCE-4与塞来昔布联合用药可能通过进一步抑制Bcl-2-Beclin 1复合体分子的形成,抑制自噬起始因子Beclin 1及抑制凋亡蛋白Bcl-2的表达,从而抑制RCE-4诱导的Ca Ski细胞保护性自噬,增强RCE-4诱导的Ca Ski细胞凋亡,使得RCE-4对Ca Ski的选择性细胞毒活性增强,临床用药量有望降低。但是,RCE-4与塞来昔布联合用药对Bcl-2-Beclin 1复合体分子的具体调控机制,及其对炎症、自噬、凋亡相关蛋白通路调控的上下游关系值得进一步研究,为将来RCE-4的临床应用提供理论依据。

作者贡献:甄虹恒完成实验内容及论文撰写工作;游芳芳辅助完成部分实验内容及论文撰写工作;程凡完成吉祥草的采样及RCE-4的分离工作;邹坤指导了RCE-4的分离及鉴定工作;陈重旭辅助完成部分实验工作;陈剑锋设计实验并指导了论文的撰写及修改。

利益冲突:所有作者申明不存在利益冲突。

References

- [1] Yang FM, Liu SB. Introduction to Tujia Medicine (土家族药物概论) [M]. Wuhan: China Science and Technology, 2015: 54.
- [2] Fu TC, Wang YT, Chen WX, et al. Quality Standard of Chinese Medicinal Materials in Hubei Province (湖北省中药材质量标准) [M]. Wuhan: Hubei Science and Technology, 2009: 147.
- [3] Wang G, Huang W, He H, et al. Growth inhibition and apoptosis-inducing effect on human cancer cells by RCE-4, a spirostanol saponin derivative from natural medicines [J]. Int J Mol Med, 2013, 31: 219-224.
- [4] Yang XJ, Bai CH, Zou K, et al. Steroidal saponin RCE-4 from *Reineckia carnea* (Andr.) Kunth inhibits growth of human cervical cancer xenograft in nude mice [J]. J Third Mil Med (第三军医大学学报), 2016, 38: 476-482.
- [5] Li S, Jiang M, Wang L, et al. Combined chemotherapy with cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in treating human cancers: recent advancement [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110389.
- [6] Velmurugan BK, Hua C, Tsai M, et al. Combination of celecoxib and calyculin-A inhibits epithelial-mesenchymal transition in human oral cancer cells [J]. Biotech Histochem, 2020, 95: 1-8.
- [7] Tołoczko-Iwaniuk N, Dziemiańczyk-Pakiela D, Nowaszewska BK, et al. Celecoxib in cancer therapy and prevention-review [J]. Curr Drug Targets, 2019, 20: 302-315.
- [8] Li B, Li X, Xiong H, et al. Inhibition of COX-2 enhances the chemosensitivity of dichloroacetate in cervical cancer cells [J]. Oncotarget, 2017, 8: 51748-51757.
- [9] Yang MH, Kim J, Khan IA, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene-1 (NAG-1) modulators from natural products as anti-cancer agents [J]. Life Sci, 2014, 100: 75-84.
- [10] Jin HX, Meng Z, Shun XH, et al. RINT1 is a new suppression target to reduce colon cancer cell growth, migration and invasion through regulating ZW10/NAG-1 expression [J]. Mol Cell Biochem, 2020. DOI: 10.1007/s11010-020-03858-9.
- [11] Liggett JL, Zhang X, Eling TE, et al. Anti-tumor activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase-independent targets [J]. Cancer Lett, 2014, 346: 217-224.
- [12] Ren CX, Zhu LF, Yu ZC, et al. The inhibitory effect of calcium dobesilate on cisplatin induced HK-2 cell apoptosis and its mechanism [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2020, 55: 1830-1835.
- [13] Xiang W, Zhang RJ, Jin GL, et al. RCE4, a potential anticervical cancer drug isolated from *Reineckia carnea*, induces autophagy via the dual blockade of PI3K and ERK pathways in cervical cancer Ca Ski cells [J]. Int J Mol Med, 2020, 45: 245-254.
- [14] Bai C, Yang X, Zou K, et al. Anti-proliferative effect of RCE-4 from *Reineckia carnea* on human cervical cancer HeLa cells by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and NF- κ B activation [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2016, 389: 573-584.
- [15] Pattingre S, Tassa A, Qu X, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy [J]. Cell, 2005, 122: 927-939.
- [16] Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis [J]. Cell Death Differ, 2011, 18: 571-580.
- [17] Lian J, Wu X, He F, et al. A natural BH3 mimetic induces autophagy in apoptosis-resistant prostate cancer via modulating Bcl-2-Beclin1 interaction at endoplasmic reticulum [J]. Cell Death Differ, 2011, 18: 60-71.

- [18] Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon H, et al. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them [J]. *Curr Drug Targets*, 2009, 16: 966-975.
- [19] Wu J, Ye J, Kong W, et al. Programmed cell death pathways in hearing loss: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53: e12915.
- [20] Demaria S, Pikarsky E, Karin M, et al. Cancer and inflammation: promise for biologic therapy [J]. *J Immunother*, 2010, 33: 335-351.
- [21] He R, Hua K, Zhang S, et al. COX-2 mediated crosstalk between Wnt/ β -catenin and the NF- κ B signaling pathway during inflammatory responses induced by *Haemophilus parasuis* in PK-15 and NPTr cells [J]. *Dev Comp Immunol*, 2020, 105: 103588.
- [22] Moon H, White AC, Borowsky AD. New insights into the functions of COX-2 in skin and esophageal malignancies [J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52: 538-547.
- [23] Zhang C, Li C, Jia X, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of polyphyllin VII through downregulating MAPK and NF- κ B pathways [J]. *Molecules*, 2019, 24: 875.
- [24] Li ZG, Li QJ, Lv W, et al. The interaction of ATG4B and Bcl-2 plays an important role in Cd-induced crosstalk between apoptosis and autophagy through disassociation of Bcl-2-Becclin1 in A549 cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 130: 576-591.
- [25] Fernández ÁF, Sebtí S, Wei Y, et al. Disruption of the Beclin 1-Bcl-2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice [J]. *Nature*, 2018, 558: 136-140.