

高良姜素促进胰腺癌PCNA-1细胞凋亡和自噬并抑制移植瘤生长

卢丹¹, 彭小兰¹, 熊珊¹, 郭小琴¹, 李婷²

(1. 鄂州市中心医院急诊科, 湖北鄂州 436000; 2. 湖北中医药大学附属鄂州市中医医院急诊科, 湖北鄂州 436000)

摘要:【目的】探讨高良姜素对胰腺癌PCNA-1细胞的抑制作用及机制。【方法】①体外研究: 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定细胞相对存活率, 确定高良姜素浓度与处理时间。先设置空白对照组, 阳性药物对照组(40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 顺铂), 高良姜素低、中、高剂量组(20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。再设置空白对照组、高良姜素高剂量组、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK) siRNA组(转染 MAPK siRNA)、高良姜素+MAPK siRNA组(转染 MAPK siRNA +80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高良姜素)。流式细胞术测定细胞凋亡情况; 蛋白免疫印迹法检测凋亡相关蛋白胱天蛋白酶(Caspase)-3、Caspase-9、B细胞淋巴瘤蛋白2(Bcl-2)、Bcl-2相关的X蛋白(Bax)、微管相关蛋白1轻链3(LC3) I/LC3 II、P62、液泡分选蛋白34(Vps34)、Beclin1, 自噬相关蛋白质 Atg7、Atg5, p-MAPK/MAPK的表达水平。②体内研究: 裸鼠皮下注射PCNA-1细胞构建移植瘤模型, 测量移植瘤体积和质量, 蛋白免疫印迹法检测Caspase-3、Caspase-9、Bax、Bcl-2、LC3 I/LC3 II、P62、Vps34、Beclin1、Atg7、Atg5的表达。【结果】后续细胞实验选择20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高良姜素处理PCNA-1细胞24 h。与空白对照组比较, 高良姜素高剂量组PCNA-1细胞凋亡率明显降低($P < 0.01$), Caspase-3、Caspase-9、Bax、LC3 I/LC3 II、Vps34、Beclin1、Atg7、Atg5、p-MAPK/MAPK蛋白表达明显上调($P < 0.01$), Bcl-2和P62蛋白表达水平明显下调($P < 0.01$), 而抑制MAPK后可逆转上述现象。高良姜素可减小裸鼠胰腺癌PCNA-1细胞移植瘤体积和质量, 各蛋白表达情况同细胞实验结果相一致。【结论】高良姜素可通过活化MAPK促进胰腺癌PCNA-1细胞的凋亡和自噬, 并抑制移植瘤生长。

关键词: 高良姜素; 胰腺癌; 凋亡; 自噬; 丝裂原活化蛋白激酶; PCNA-1细胞; 裸鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)09-1963-09

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.09.030

Galangin Promotes Apoptosis and Autophagy in Pancreatic Cancer PCNA-1 Cells and Inhibits Xenograft Growth

LU Dan¹, PENG Xiao-Lan¹, XIONG Shan¹, GUO Xiao-Qin¹, LI Ting²

(1. Dept. of Emergency, Ezhou Central Hospital, Ezhou 436000 Hubei, China; 2. Dept. of Emergency, Ezhou Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Ezhou 436000 Hubei, China)

Abstract: Objective To explore the inhibiting effect and mechanism of galangin for pancreatic cancer PCNA-1 cells. **Methods** ① *In vitro*: The relative survival rate of cells was detected by MTT assay to ascertain the concentration and treatment time. Firstly, we set up blank control group, positive drug control group(40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of cisplatin), and low-, middle- and high- dose galangin groups (20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Secondly, blank control group, positive drug control group(40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of cisplatin), mitogen-activated protein kinase (MAPK) siRNA group (transfected with MAPK siRNA), and galangin plus MAPK siRNA group (transfected with MAPK siRNA and cultured with 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of galangin). Cell apoptosis was detected by flow cytometry, expression levels of apoptosis-related protein Caspase-3, Caspase-9, B-cell lymphoma protein 2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) I/LC3 II, P62, vacuolar protein sorting 34 (Vps34), Beclin1, autophagy-related protein Atg7, Atg5, and phosphorylated MAPK/MAPK (p-MAPK/MAPK) were detected by Western blotting assay. ② *In vivo*: The transplanted tumor model in nude mice was constructed by subcutaneous injection of PCNA-1 cells. The volume and mass of transplanted tumor were measured, and expression levels of Caspase-3, Caspase-9, Bax, Bcl-2, LC3 I/LC3 II, P62, Vps34,

收稿日期: 2019-12-16

作者简介: 卢丹(1982-), 女, 主治医师; E-mail: ludanldzxc@163.com

基金项目: 湖北省自然科学基金资助项目(编号: 2017CFB357)

Beclin1, Atg7, and Atg5 were detected by Western blotting assay. **Results** We selected 20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of galangin for the 24-hour treatment of PCNA-1 cells. Compared with the blank control group, the apoptosis rate of PCNA-1 cells in the high-dose galangin group was significantly lowered ($P < 0.01$), the protein expression levels of Caspase-3, Caspase-9, Bax, LC3/LC3 II, Vps34, Beclin1, Atg7, Atg5, p-MAPK/MAPK were significantly up-regulated ($P < 0.01$), the protein expression levels of Bcl-2 and P62 were significantly down-regulated ($P < 0.01$), while the above effects were reversed by inhibition of MAPK. Galangin reduced the volume and mass of transplanted tumor of pancreatic cancer PCNA-1 cells, and the expression of each protein index was consistent with the results in the cell experiment. **Conclusion** Galangin is effective for promoting apoptosis and autophagy in pancreatic cancer PCNA-1 cells and inhibiting xenograft growth by activating MAPK.

Keywords: galangin; pancreatic cancer; apoptosis; autophagy; mitogen-activated protein kinase (MAPK); PCNA-1 cells; nude mice

胰腺癌(pancreatic cancer)是一种恶性程度很高、诊断和治疗都很困难的消化道恶性肿瘤。胰腺癌早期的确诊率不高,但手术死亡率却非常高,且治愈率非常低^[1]。尽管手术技术和辅助药物治疗均有所改善,但胰腺癌发病率和死亡率仍明显上升,且1年生存率仍不足30%,5年生存率仅为2%^[2]。因此,迫切需要开发新的抗胰腺癌药物。天然产物提取物作为新的治疗来源已广受关注。高良姜为姜科植物高良姜 *Alpinia officinarum* Hance 的根茎,味辛,性温,入脾胃经,具有温经、祛风、散寒、行气、止痛等功效,主治脾胃中寒、脘腹冷痛、呕吐泄泻、噎膈反胃、食滞、瘕病、冷癖等病证。高良姜素(galangin)是一种主要提取于高良姜中的黄酮醇类化合物,化学结构式如图1所示,具有抗菌、抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用^[3]。已有研究表明,高良姜素可抑制喉癌^[4]、鼻咽癌^[5]、视网膜母细胞瘤^[6]、宫颈癌^[7]、肺癌^[8]等肿瘤生长。Kwak等^[9]研究发现,高良姜素通过抑制细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)4活性来抑制 Smad3 接头磷酸化,从而诱导胰腺癌细胞的凋亡。因此,本研究进一步观察高良姜素对胰腺癌 PCNA-1 细胞的凋亡、自噬及对移植瘤的影响,探

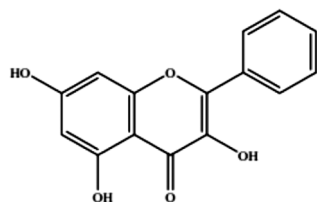


图1 高良姜素化学结构式

Figure 1 Galangin chemical structure

讨其抗胰腺癌机制,以期为胰腺癌的治疗提供参考数据,为高良姜素的开发利用提供理论基础,现将研究结果报道如下。

1 材料及方法

1.1 细胞及培养 胰腺癌 PCNA-1 细胞购自上海复祥生物科技有限公司。PCNA-1 细胞以含有体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基在 37 °C 体积分数为 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2 动物 24 只 SPF 级 4 ~ 6 周龄雌性 BALB/c 裸鼠,购自四川夏派森医药科技有限公司,动物质量合格证号: SYXK(川)2017-203。裸鼠在 25 °C 12 h 光照/12 h 黑暗循环的饲养室中饲养,自由饮水、饮食。在实验前 1 周开始适应性喂养。

1.3 药物、试剂与仪器 高良姜素(HPLC \geq 98%,上海同田生物技术股份有限公司产品,批号: 548-83-4); 顺铂(浙江联硕生物科技有限公司,批号: PHR1624)。RPMI-1640 培养液(上海栩冉生物科技有限公司); 四甲基偶氮唑盐(MTT)试剂盒(上海泽叶生物科技有限公司); 胱天蛋白酶(Caspase)-3 抗体、Caspase-9 抗体、B 细胞淋巴瘤蛋白 2(Bcl-2)抗体、Bcl-2 相关的 X 蛋白(Bax)抗体、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)抗体(武汉碧云天生物科技有限公司); P62 抗体、Beclin1 抗体(沈阳万类生物科技有限公司); 液泡分选蛋白 34(Vps34)抗体、Atg7 抗体、Atg5 抗体(上海艾博抗生物技术有限公司); 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)抗体、磷酸化 MAPK(p-MAPK)抗体(上海户实医药科技有限公司); MAPK siRNA 质粒由上海生工设计并合

成。Varioskan LUX 多功能酶标仪购自美国 ThermoFisher 公司; ChemiDoc™ XRS 凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司; CytoFLEX 流式细胞仪购自美国 Beckman 公司。

1.4 体外研究

1.4.1 MTT法检测细胞相对存活率 将PCNA-1细胞接种于96孔板上, 1×10^3 个/孔, 用含高良姜素(0、5、10、20、40、80、150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的培养基于37℃分别处理12、24、48 h后, 移除培养基, 用磷酸盐缓冲盐水洗涤细胞, 加入20 μL MTT(5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)温育4 h。每孔再加入150 μL 二甲苯亚砷在摇床低速振荡10 min, 用酶标仪测定各孔490 nm波长处的光密度值, 计算细胞相对存活率。细胞相对存活率 = 实验组光密度值/0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高良姜素组光密度值 $\times 100\%$ 。实验重复3次。

1.4.2 分组与处理 先设置空白对照组、阳性药物对照组、高良姜素低、中、高剂量组, PCNA-1细胞密度为 1×10^6 个/mL。其中: 空白对照组, PCNA-1细胞以含0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高良姜素的培养基正常培养24 h; 阳性药物对照组, 用含有40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 顺铂^[10]的培养基培养24 h; 高良姜素低、中、高剂量组分别用含有20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高良姜素的培养基培养24 h。

再设置空白对照组、高良姜素高剂量组、MAPK siRNA组、高良姜素+MAPK siRNA组, 其中: 空白对照组, PCNA-1细胞正常培养24 h; 高良姜素高剂量组, 用含有80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高良姜素的培养基培养24 h; MAPK siRNA组, 应用Lipofectamine 2000将MAPK siRNA(50 nmol/L)转染PCNA-1细胞后, 用正常培养基培养24 h; MAPK siRNA+高良姜素组, 用Lipofectamine 2000将MAPK siRNA(50 nmol/L)转染PCNA-1细胞后, 用含有80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高良姜素的培养基培养24 h。

1.4.3 流式细胞术检测细胞凋亡 各组PCNA-1细胞培养24 h后, 离心, 按 1×10^6 个/mL密度重悬。于细胞悬液中加入5 μL 膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin-V-FITC)和5 μL 碘化丙啶(PI), 在黑暗的房间内孵育15 min, 然后用流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

1.4.4 蛋白免疫印迹法检测PCNA-1细胞Caspase-3、Caspase-9、Bax、Bcl-2、LC3 II/LC3 I、P62、Vps34、Beclin1、Atg7、Atg5、p-MAPK/MAPK蛋白相对表达水平 收集细胞, 用放射免疫沉淀

分析(RIPA)裂解液提取细胞总蛋白, 并用二喹啉甲酸(BCA)试剂盒检测蛋白浓度。经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白后, 用半干转膜仪将蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜。再经过脱脂牛奶室温蛋白封闭2 h、一抗(1:1 000稀释)4℃封闭过夜、二抗(1:3 000稀释)室温封闭1 h等过程, 滴电化学发光(ECL)试剂曝光。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参, 使用Quantity One软件分析目标蛋白质的相对表达水平。

1.5 体内研究 将24只裸鼠随机分为模型对照组、高良姜素组、MAPK siRNA组、高良姜素+MAPK siRNA组, 每组6只。模型对照组和高良姜素组裸鼠右后肢腹侧皮下分别注射0.2 mL 1×10^7 个/mL培养24 h的PCNA-1细胞; MAPK siRNA组和高良姜素+MAPK siRNA组裸鼠右后肢腹侧皮下分别注射0.2 mL 1×10^7 个/mL⁻¹培养24 h的转染MAPK siRNA的PCNA-1细胞。然后, 继续在SPF条件下给予正常饮食饲养, 高良姜素组和高良姜素+MAPK siRNA组每天癌旁注射80 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 高良姜素溶液, 其余2组注射等体积生理盐水, 观察裸鼠皮下成瘤情况。30 d后, 颈椎脱位法处死裸鼠, 完整取出皮下移植瘤, 测定移植瘤体积, 称量瘤质量, 蛋白免疫印迹法检测瘤组织Caspase-3、Caspase-9、Bax、Bcl-2、LC3 II/LC3 I、P62、Beclin1、Atg7、Atg5、p-MAPK/MAPK的表达。

1.6 统计方法 采用SPSS 21.0统计软件处理数据, 图形使用GraphPad Prism 6.0构建。计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 数据呈正态分布, 方差齐, 多组比较采用单因素方差分析, 进一步两两组比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高良姜素对胰腺癌PCNA-1细胞存活的影响 表1结果显示, 在处理12 h时, 80 ~ 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高良姜素处理组PCNA-1细胞相对存活率明显降低($P < 0.05$); 在处理24 h时, 20 ~ 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高良姜素处理组PCNA-1细胞相对存活率明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 在处理48 h时, 10 ~ 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高良姜素处理组PCNA-1细胞相对存活率明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。综上, 后续细胞实验选择20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高

表1 各组胰腺癌PCNA-1细胞相对存活率比较
 Table 1 Comparison of the relative survival rate of PCNA-1 cells in various groups ($\bar{x} \pm s, \%$)

高良姜素浓度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	处理时间		
	12 h	24 h	48 h
0	100.00 \pm 1.21	100.00 \pm 1.04	100.00 \pm 1.13
5	97.54 \pm 1.14	94.46 \pm 1.18	87.52 \pm 1.34
10	95.72 \pm 1.32	91.23 \pm 1.07	72.45 \pm 1.19 ^①
20	90.63 \pm 1.01	82.17 \pm 1.15 ^①	61.03 \pm 1.04 ^②
40	84.97 \pm 1.18	65.16 \pm 1.26 ^①	54.73 \pm 1.12 ^②
80	73.19 \pm 1.11 ^①	55.68 \pm 1.06 ^②	46.64 \pm 1.15 ^②
160	64.28 \pm 1.15 ^①	48.86 \pm 1.14 ^②	36.18 \pm 1.24 ^②

① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$, 与0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高良姜素组(空白对照组)比较

良姜素处理PCNA-1细胞24 h。

2.2 高良姜素促进胰腺癌PCNA-1细胞凋亡 图2

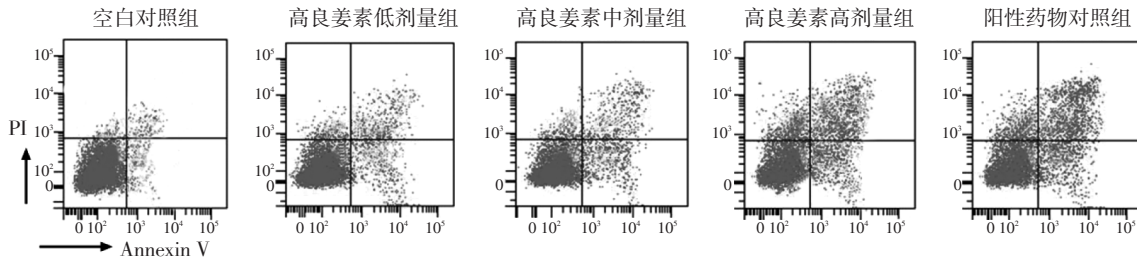


图2 各组胰腺癌PCNA-1细胞凋亡的流式细胞散点图

Figure 2 The flow cytometry scatter plots for the cell apoptosis rate of PCNA-1 cells in various groups

表2 各组胰腺癌PCNA-1细胞凋亡率比较
 Table 2 Comparison of the cell apoptosis rate of PCNA-1 cells in various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率(%)
空白对照组	4.59 \pm 0.94
高良姜素低剂量组	13.19 \pm 1.12
高良姜素中剂量组	21.67 \pm 1.05 ^①
高良姜素高剂量组	39.88 \pm 1.08 ^②
阳性药物对照组	41.21 \pm 1.11 ^②

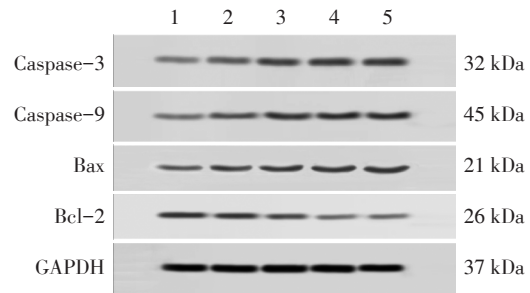
① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$, 与空白对照组比较

2.3 高良姜素促进胰腺癌PCNA-1细胞自噬 图4

和表4结果显示, 与空白对照组比较, 高良姜素低剂量组PCNA-1细胞LC3 II/LC3 I、Vps34、Beclin1、Atg7、Atg5蛋白表达水平上调, P62蛋白表达水平下调, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), 高良姜素中、高剂量组和阳性药物对照组PCNA-1细胞LC3 II/LC3 I、Vps34、Beclin1、Atg7、Atg5蛋白表达

和表2结果显示, 与空白对照组比较, 高良姜素低剂量组PCNA-1细胞凋亡率升高, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), 高良姜素中、高剂量组和阳性药物对照组PCNA-1细胞凋亡率明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 表明高剂量高良姜素具有类似顺铂的药效, 能诱导胰腺癌PCNA-1细胞凋亡。

图3和表3结果显示, 与空白对照组比较, 高良姜素低剂量组PCNA-1细胞Caspase-3、Caspase-9、Bax和Bcl-2蛋白表达水平上调, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), 高良姜素中、高剂量组和阳性药物对照组PCNA-1细胞Caspase-3、Caspase-9、Bax蛋白表达水平明显上调, Bcl-2蛋白表达水平明显下调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 进一步证明高剂量高良姜素具有类似顺铂的药效, 能诱导胰腺癌PCNA-1细胞凋亡。



1. 空白对照组; 2. 高良姜素低剂量组; 3. 高良姜素中剂量组; 4. 高良姜素高剂量组; 5. 阳性药物对照组

图3 各组胰腺癌PCNA-1细胞凋亡标记蛋白的蛋白免疫印迹电泳条带

Figure 3 The Western blotting strips of cell apoptosis-related proteins in PCNA-1 cells of various groups

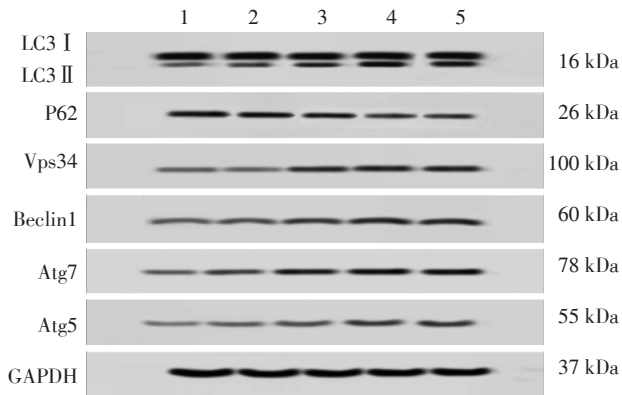
明显上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), P62蛋白表达明显下调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 进一步证明高剂量高良姜素具有类似顺铂的药效, 能诱导胰腺癌

表3 各组胰腺癌 PCNA-1 细胞凋亡标记蛋白相对表达比较

Table 3 Comparison of the expression levels of cell apoptosis-related proteins in PCNA-1 cells of various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	Caspase-3	Caspase-9	Bax	Bcl-2
空白对照组	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.63 ± 0.02
高良姜素低剂量组	0.17 ± 0.03	0.19 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.55 ± 0.03
高良姜素中剂量组	0.36 ± 0.05 ^①	0.41 ± 0.03 ^①	0.46 ± 0.04 ^①	0.43 ± 0.05 ^①
高良姜素高剂量组	0.54 ± 0.04 ^②	0.65 ± 0.05 ^②	0.58 ± 0.03 ^②	0.24 ± 0.04 ^②
阳性药物对照组	0.56 ± 0.05 ^②	0.68 ± 0.04 ^②	0.61 ± 0.05 ^②	0.19 ± 0.03 ^②

①P < 0.05, ②P < 0.01, 与空白对照组比较



1. 空白对照组; 2. 高良姜素低剂量组; 3. 高良姜素中剂量组; 4. 高良姜素高剂量组; 5. 阳性药物对照组

图4 各组胰腺癌自噬相关蛋白的蛋白印迹电泳条带
Figure 4 The Western blotting strips of autophagy-related proteins in PCNA-1 cells of various groups

PCNA-1 细胞自噬。

2.4 高良姜素使胰腺癌 PCNA-1 细胞 MAPK 活化 图5和表5结果显示, 与空白对照组比较, 高良姜素低剂量组 PCNA-1 细胞 p-MAPK/MAPK 蛋白表达水平上调, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 高良姜素中、高剂量组和阳性药物对照组 PCNA-1 细胞 p-MAPK/MAPK 蛋白表达水平明显上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 进一步证明高剂量高良姜素具有类似顺铂的药效, 能使胰腺癌 PCNA-1 细胞 MAPK 活化。

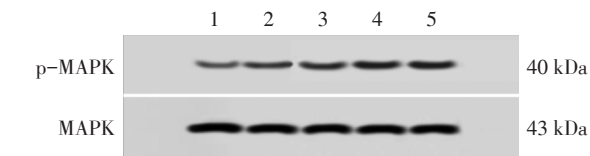
2.5 高良姜素通过活化 MAPK 促进胰腺癌 PCNA-1 细胞的凋亡和自噬 图6~8和表6~8结果显示: 与空白对照组和 MAPK siRNA 组比较, 高良姜素+MAPK siRNA 组细胞凋亡率, Caspase-3、Caspase-9、

表4 各组胰腺癌自噬相关蛋白的相对表达比较

Table 4 Comparison of the expression levels of autophagy-related proteins in PCNA-1 cells of various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	LC3 II/LC3 I	P62	Vps34	Beclin1	Atg7	Atg5
空白对照组	0.04 ± 0.02	0.75 ± 0.05	0.09 ± 0.03	0.11 ± 0.04	0.49 ± 0.05	0.08 ± 0.03
高良姜素低剂量组	0.11 ± 0.04	0.63 ± 0.06	0.18 ± 0.05	0.19 ± 0.04	0.61 ± 0.05	0.16 ± 0.03
高良姜素中剂量组	0.24 ± 0.03 ^①	0.41 ± 0.03 ^①	0.32 ± 0.03 ^①	0.35 ± 0.04 ^①	0.73 ± 0.04 ^①	0.30 ± 0.04 ^①
高良姜素高剂量组	0.38 ± 0.03 ^②	0.34 ± 0.04 ^②	0.53 ± 0.05 ^②	0.61 ± 0.05 ^②	0.85 ± 0.05 ^②	0.48 ± 0.03 ^②
阳性药物对照组	0.42 ± 0.04 ^②	0.32 ± 0.05 ^②	0.55 ± 0.04 ^②	0.63 ± 0.04 ^②	0.87 ± 0.04 ^②	0.51 ± 0.05 ^②

①P < 0.05, ②P < 0.01, 与空白对照组比较



1. 空白对照组; 2. 高良姜素低剂量组; 3. 高良姜素中剂量组; 4. 高良姜素高剂量组; 5. 阳性药物对照组

图5 PCNA-1 细胞 MAPK 的蛋白印迹电泳条带
Figure 5 The Western blotting strips of MAPK in PCNA-1 cells of various groups

表5 各组 PCNA-1 细胞 MAPK 蛋白活化水平比较

Table 5 Comparison of the activation level of MAPK in PCNA-1 cells of various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	p-MAPK/MAPK
空白对照组	0.15 ± 0.03
高良姜素低剂量组	0.29 ± 0.04
高良姜素中剂量组	0.41 ± 0.05 ^①
高良姜素高剂量组	0.56 ± 0.04 ^②
阳性药物对照组	0.52 ± 0.05 ^②

①P < 0.05, ②P < 0.01, 与空白对照组比较

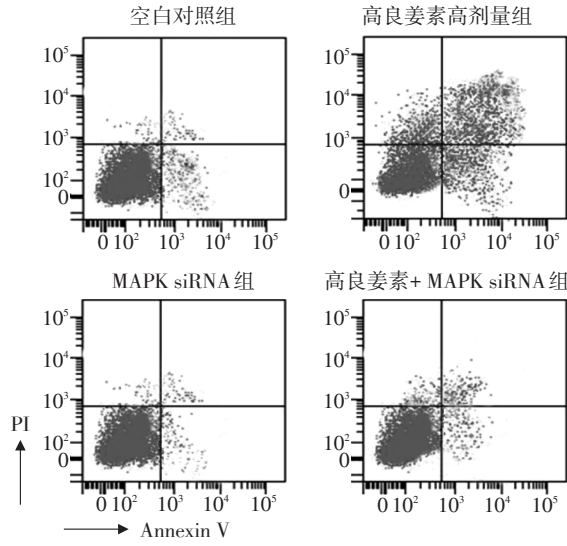


图6 各组胰腺癌PCNA-1细胞干扰MAPK后凋亡的流式细胞散点图

Figure 6 The flow cytometry scatter plots for the apoptosis of PCNA-1 cells in various groups after interfering MAPK

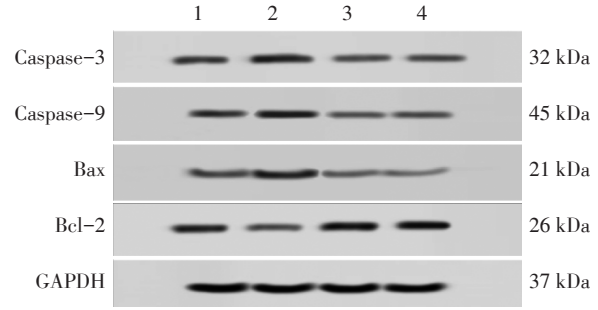
表6 各组PCNA-1细胞干扰MAPK后凋亡率比较

Table 6 Comparison of the apoptosis rate of PCNA-1 cells in various groups after interfering MAPK ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率(%)
空白对照组	5.33 ± 0.94
高良姜素高剂量组	40.67 ± 1.08 ^①
MAPK siRNA组	3.11 ± 1.09
高良姜素+ MAPK siRNA组	4.06 ± 0.89 ^②

①P < 0.01, 与空白对照组比较; ②P < 0.01, 与高良姜素高剂量组比较

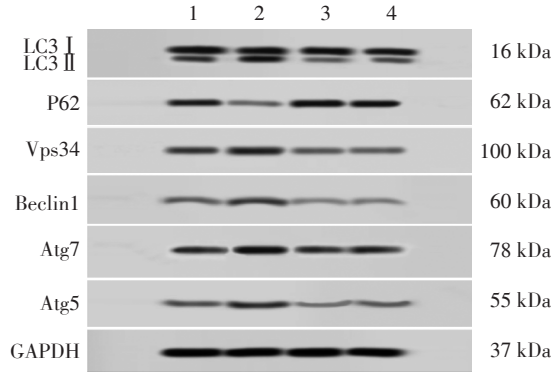
Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平, LC3 II/LC3 I、P62、Vps34、Beclin1、Atg7、Atg5 蛋白表达水平差异均无统计学意义(P > 0.05); 与高良姜素高剂量组比较, 高良姜素+ MAPK siRNA 组细胞凋亡率明显降



1. 空白对照组; 2. 高良姜素高剂量组; 3. MAPK siRNA组; 4. 高良姜素+ MAPK siRNA组

图7 各组胰腺癌PCNA-1细胞干扰MAPK后凋亡标记蛋白的蛋白免疫印迹电泳条带

Figure 7 The Western blotting strips of apoptosis-related proteins in PCNA-1 cells of various groups after interfering MAPK



1. 空白对照组; 2. 高良姜素高剂量组; 3. MAPK siRNA组; 4. 高良姜素+ MAPK siRNA组

图8 各组胰腺癌干扰MAPK后细胞自噬相关蛋白的蛋白免疫印迹电泳条带

Figure 8 The Western blotting strips of autophagy-related proteins in PCNA-1 cells of various groups after interfering MAPK

低(P < 0.01), Caspase-3、Caspase-9、Bax 蛋白表达水平明显上调(P < 0.01), Bcl-2 蛋白表达水平明显下调(P < 0.01), LC3 II/LC3 I、Vps34、Beclin1、

表7 各组PCNA-1细胞干扰MAPK后凋亡标记蛋白相对表达比较

Table 7 Comparison of the expression levels of apoptosis-related proteins in PCNA-1 cells of various groups after interfering MAPK ($\bar{x} \pm s$)

组别	Caspase-3	Caspase-9	Bax	Bcl-2
空白对照组	0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.62 ± 0.02
高良姜素高剂量组	0.56 ± 0.03 ^①	0.67 ± 0.03 ^①	0.61 ± 0.04 ^①	0.21 ± 0.04 ^①
MAPK siRNA组	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.03	0.79 ± 0.04
高良姜素+ MAPK siRNA组	0.04 ± 0.02 ^②	0.03 ± 0.02 ^②	0.12 ± 0.04 ^②	0.68 ± 0.05 ^②

①P < 0.01, 与空白对照组比较; ②P < 0.01, 与高良姜素高剂量组比较

表8 各组PCNA-1细胞干扰MAPK后胰腺癌自噬相关蛋白的相对表达比较
Table 8 Comparison of the expression levels of autophagy-related proteins in PCNA-1 cells of various groups after interfering MAPK

组别	LC3 II/LC3 I	P62	Vps34	Beclin1	Atg7	Atg5
空白对照组	0.05 ± 0.02	0.76 ± 0.05	0.09 ± 0.02	0.13 ± 0.04	0.48 ± 0.03	0.09 ± 0.04
高良姜素高剂量组	0.39 ± 0.04 ^①	0.34 ± 0.03 ^①	0.52 ± 0.05 ^①	0.62 ± 0.04 ^①	0.87 ± 0.03 ^①	0.47 ± 0.04 ^①
MAPK siRNA组	0.02 ± 0.02	0.88 ± 0.05	0.04 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.34 ± 0.05 ^①	0.03 ± 0.02 ^①
高良姜素+ MAPK siRNA组	0.04 ± 0.03 ^②	0.79 ± 0.05 ^②	0.06 ± 0.03 ^②	0.11 ± 0.04 ^②	0.41 ± 0.03 ^②	0.07 ± 0.03 ^②

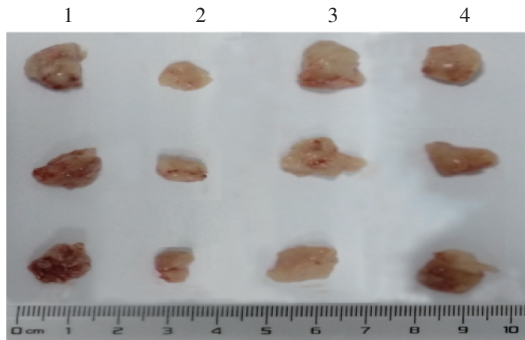
①P < 0.01, 与空白对照组比较; ②P < 0.01, 与高良姜素高剂量组比较

Atg7、Atg5蛋白表达水平明显上调(P < 0.01), P62蛋白表达水平明显下调(P < 0.01)。说明高良姜素通过活化MAPK促进胰腺癌PCNA-1细胞的凋亡和自噬。

2.6 高良姜素通过活化MAPK抑制胰腺癌PCNA-1移植瘤生长 图9和表9结果显示, 与模型对照组比较, 高良姜素组胰腺癌PCNA-1移植瘤的体积和质量均明显减小(P < 0.01); 与高良姜素组比较, 高良姜素+ MAPK siRNA组胰腺癌PCNA-1移植瘤

的体积和质量均明显增加(P < 0.01); 与MAPK siRNA组比较, 胰腺癌PCNA-1移植瘤的体积和重量无明显变化(P < 0.01)。说明高良姜素通过活化MAPK抑制胰腺癌PCNA-1移植瘤生长。

图10和表10结果显示, 体内移植瘤中各凋亡及自噬相关蛋白变化同体外一致, 说明在体内, 高良姜素通过活化MAPK促进胰腺癌PCNA-1细胞的凋亡和自噬。



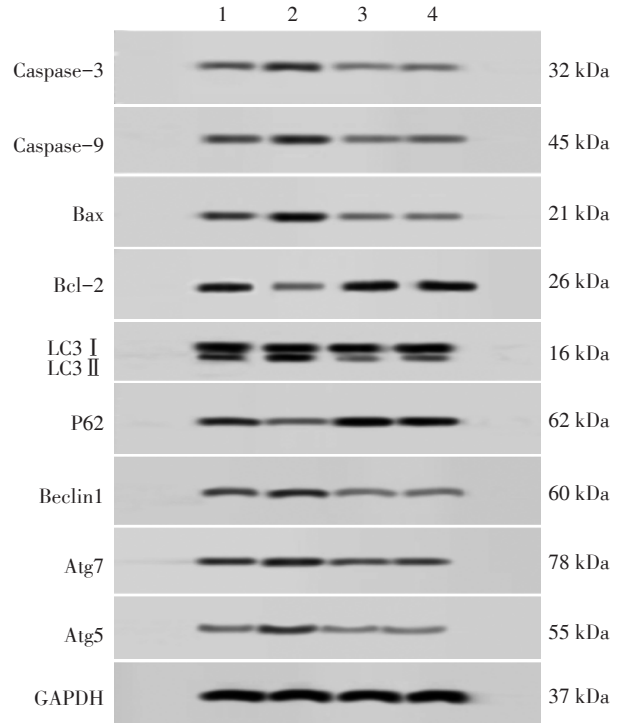
1. 模型对照组; 2. 高良姜素组; 3. MAPK siRNA组; 4. 高良姜素+ MAPK siRNA组

图9 各组胰腺癌PCNA-1移植瘤大小肉眼比较
Figure 9 Comparison of the macroscopic sizes of xenografts in various groups

表9 各组裸鼠移植瘤体积和质量比较
Table 9 Comparison of the volume and mass of xenografts of nude mice in various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	体积(mm ³)	质量(g)
模型对照组	2 132.25 ± 21.38	1 672.34 ± 15.32
高良姜素组	931.97 ± 18.86 ^①	698.48 ± 11.52 ^①
MAPK siRNA组	2 476.45 ± 20.57	1 784.22 ± 14.67
高良姜素+ MAPK siRNA组	2 247.64 ± 19.95 ^②	1 709.23 ± 13.92 ^②

①P < 0.01, 与模型对照组比较; ②P < 0.01, 与高良姜素组比较



1. 模型对照组; 2. 高良姜素组; 3. MAPK siRNA组; 4. 高良姜素+ MAPK siRNA组

图10 各组胰腺癌移植瘤中凋亡及自噬相关蛋白的蛋白免疫印迹电泳条带

Figure 10 The Western blotting strips of apoptosis-, autophagy-related proteins in nude mice of various groups after interfering MAPK

表10 各组胰腺癌移植瘤中凋亡及自噬相关蛋白的相对表达比较

Table 10 Comparison of the expression levels of apoptosis-, autophagy-related proteins in nude mice

组别	Caspase-3	Caspase-9	Bax	Bcl-2	LC3 II/LC3 I	P62	Beclin1	Atg7	Atg5
模型对照组	0.08 ± 0.03	0.09 ± 0.03	0.23 ± 0.04	0.61 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.78 ± 0.04	0.15 ± 0.05	0.46 ± 0.04	0.10 ± 0.03
高良姜素组	0.62 ± 0.04 ^①	0.68 ± 0.05 ^①	0.73 ± 0.05 ^①	0.22 ± 0.04 ^①	0.41 ± 0.05 ^①	0.33 ± 0.04 ^①	0.66 ± 0.05 ^①	0.86 ± 0.04 ^①	0.51 ± 0.03 ^①
MAPK siRNA	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.11 ± 0.04	0.81 ± 0.05	0.03 ± 0.02	0.87 ± 0.04	0.09 ± 0.03	0.34 ± 0.04 ^①	0.04 ± 0.03 ^①
高良姜素+ MAPK siRNA	0.06 ± 0.03 ^②	0.06 ± 0.02 ^②	0.18 ± 0.05 ^②	0.74 ± 0.04 ^②	0.05 ± 0.03 ^②	0.81 ± 0.04 ^②	0.12 ± 0.05 ^②	0.39 ± 0.04 ^②	0.07 ± 0.04 ^②

① $P < 0.01$, 与模型对照组比较; ② $P < 0.01$, 与高良姜素组比较

3 讨论

凋亡作为程序性细胞死亡的主要机制, 由各种抗细胞凋亡蛋白和促凋亡蛋白调节, 被认为是癌症治疗的有效指标^[11]。Bcl-2蛋白家族, 包括促凋亡蛋白(如Bax)和抗凋亡蛋白(如Bcl-2), 在调节线粒体凋亡途径中起着重要的作用^[12]。Bcl-2表达的降低和Bax表达的增强会导致线粒体膜完整性的破坏, 导致细胞色素C的释放, 随后诱导Caspase-9的活化效应切割Caspase-3, 从而最终激活共同的下游细胞凋亡^[13]。本研究结果显示, 高良姜素能明显上调胰腺癌PCNA-1细胞Caspase-3、Caspase-9、Bax蛋白表达, 下调Bcl-2蛋白表达, 表明高良姜素通过线粒体依赖性途径对胰腺癌PCNA-1细胞发挥凋亡诱导作用。

自噬是一种不依赖胱天蛋白酶的诱导细胞死亡的途径^[14], 被认为是抑制癌症恶性转化和抗癌免疫监视所必需的^[15]。微管相关蛋白1轻链3(LC3) II是LC3 I的脂质结合形式, 是自噬最常用的标记物^[16]。p62具有一个与LC3相互作用的区域, 与自噬密切相关^[17], 表达量越少, 自噬活动越多^[18]。自噬相关蛋白Atg5、Atg7、Beclin1和Vps34均在自噬过程中发挥了重要的作用, 可作为自噬发生的关键标志物^[19-20]。Li等^[21]研究表明, 高良姜素可抑制肝细胞癌细胞的增殖并诱导其凋亡和自噬。本研究结果显示, 高良姜素明显上调胰腺癌PCNA-1细胞自噬相关蛋白LC3 II/LC3 I、Vps34、Beclin1、Atg7、Atg5蛋白表达, 下调P62蛋白表达, 表明高良姜素通过诱导胰腺癌PCNA-1细胞发生自噬促进癌细胞的死亡。

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路能够通过促进对p38蛋白的磷酸化, 上调抑癌基因p53蛋白的磷酸化, 从而抑制细胞的增殖, 诱导细胞凋亡^[22]。本研究结果显示, 抑制MAPK明显逆转高良

姜素对胰腺癌PCNA-1细胞凋亡和自噬的诱导作用, 表明高良姜素通过激活MAPK通路促进胰腺癌PCNA-1细胞的凋亡和自噬。

综上所述, 高良姜素可以通过诱导凋亡和自噬来有效抑制胰腺癌PCNA-1细胞的生长和增殖, 该过程可能受到MAPK通路活性的调节。另外, 在体内的胰腺癌异种移植模型中, 高良姜素亦表现出明显的抗癌活性。据此, 推测高良姜素可能是一种新型且有效的胰腺癌治疗药物。

参考文献:

- [1] TOESCA D A S, JEFFREY R B, VON EYBEN R, et al. Predicting pancreatic cancer resectability and outcomes based on an objective quantitative scoring system[J]. *Pancreas*, 2019, 48(5): 622-628.
- [2] 刘鲁明. 中西医结合治疗胰腺癌的机遇与挑战[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(1): 18-20.
- [3] ALOUD A A, CHINNADURAI V, GOVINDASAMY C, et al. Galangin, a dietary flavonoid, ameliorates hyperglycaemia and lipid abnormalities in rats with streptozotocin-induced hyperglycaemia[J]. *Pharm Biol*, 2018, 56(1): 302-308.
- [4] WANG H X, TANG C. Galangin suppresses human laryngeal carcinoma via modulation of caspase-3 and AKT signaling pathways[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(2): 703-714.
- [5] LEE C C, LIN M L, MENG M, et al. Galangin induces p53-independent S-phase arrest and apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells through inhibiting PI3K-AKT signaling pathway[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(3): 1377-1389.
- [6] ZOU W W, XU S P. Galangin inhibits the cell progression and induces cell apoptosis through activating PTEN and caspase-3 pathways in retinoblastoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 97(1): 851-863.
- [7] 陈淑梅. 高良姜素诱导人乳头瘤病毒阳性的宫颈癌细胞凋亡实验研究[J]. *中草药*, 2017, 48(5): 941-945.
- [8] YU S, GONG L S, LI N F, et al. Galangin(GG) combined with cisplatin(DDP) to suppress human lung cancer by inhibition of STAT3-regulated NF-κB and Bcl-2/Bax signaling pathways[J].

- Biomed Pharmacother, 2018, 97(1): 213-224.
- [9] KWAK M K, YANG K M, PARK J, et al. Galangin enhances TGF- β 1-mediated growth inhibition by suppressing phosphorylation of threonine 179 residue in Smad3 linker region [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 494(3-4): 706-713.
- [10] FUKUSHIMA K, TAKAHASHI K, YAMASAKI E, et al. Lysophosphatidic acid signaling via LPA1 and LPA3 regulates cellular functions during tumor progression in pancreatic cancer cells[J]. *Exper Cell Res*, 2017, 352(1): 139-145.
- [11] 伍丹丹, 董卫国, 马静静, 等. 陈皮素对胰腺癌PANC-1细胞增殖和凋亡影响及机制探讨[J]. *医学分子生物学杂志*, 2018, 3(1): 125-130.
- [12] BIRKINSHAW R W, CZABOTAR P E. The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 72(1): 152-162.
- [13] RENAULT T T, DEJEAN L M, 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] LIU B, DING L, ZHANG L, et al. Baicalein induces autophagy and apoptosis through AMPK pathway in human glioma cells[J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47(6): 1405-1418.
- [15] 刘发英, 邹阳, 杨必成, 等. 莪术醇对人宫颈癌SiHa和HCC94细胞增殖、自噬及凋亡的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(1): 62-66.
- [16] BANSAL M, MOHARIR S C, SWARUP G. Autophagy receptor optineurin promotes autophagosome formation by potentiating LC3- II production and phagophore maturation [J]. *Commun Integr Biol*, 2018, 11(2): 1-4.
- [17] 徐敬轩, 栾新平. miR-185对胶质瘤细胞增殖、凋亡及自噬的影响[J]. *医学分子生物学杂志*, 2020, 17(3): 173-180.
- [18] ZAFFAGNINI G, SAVOVA A, DANIELI A, et al. P62 filaments capture and present ubiquitinated cargos for autophagy[J]. *EMBO J*, 2018, 37(5): e98308.
- [19] WANG R, ZHANG Q, PENG X, et al. Stelletin B induces G1 arrest, apoptosis and autophagy in human non-small cell lung cancer A549 cells via blocking PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 27071.
- [20] 张晓田, 金李, 李慧贤, 等. TLR4信号通路在HBV感染肾小管上皮细胞自噬调控中的作用研究[J]. *解放军医药杂志*, 2018, 30(11): 6-9.
- [21] LI X, WANG Y, XIONG Y, et al. Galangin induces autophagy via deacetylation of LC3 by sirt1 in HepG2 cells[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30496.
- [22] 曹少祥, 李华顺, 谭海洋, 等. p38 MAPK信号转导通路在COX-2抑制剂联合顺铂诱导人胃癌SGC7901细胞凋亡中的作用机制[J]. *解放军医药杂志*, 2019, 31(9): 12-17, 21.

【责任编辑：侯丽颖】