

## 五味子乙素对胰腺癌 Pan02 细胞增殖的抑制作用及其机制

傅家财<sup>1,2</sup>, 秦玲莎<sup>2</sup>, 杨露<sup>2</sup>, 宋美慧<sup>2</sup>, 张仙映<sup>2</sup>, 刘晓翠<sup>2</sup>, 李凤金<sup>2</sup>, 齐玲<sup>2</sup>

(1. 大理大学药学院, 云南 大理 671000; 2. 广东医科大学附属清远医院 广东省清远市人民医院, 广东 清远 511500)

**[摘要]** **目的:** 探讨五味子乙素对胰腺癌 Pan02 细胞增殖的抑制作用, 并阐明其作用机制。**方法:** 采用 CCK-8 法检测不同浓度 (0、0.78、1.56、3.12、6.25、12.50 和 25.00 mg·L<sup>-1</sup>) 五味子乙素作用下 Pan02 细胞增殖率, 以选择五味子乙素作用的最适浓度和最佳作用时间。小鼠胰腺癌 Pan02 细胞分为对照组 (0 mg·L<sup>-1</sup> 五味子乙素)、2.5 mg·L<sup>-1</sup> 五味子乙素组、5.0 mg·L<sup>-1</sup> 五味子乙素组和 10.0 mg·L<sup>-1</sup> 五味子乙素组。光学显微镜观察各组 Pan02 细胞形态表现, 5-乙基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (EdU) 染色法检测各组 Pan02 细胞中 EdU 阳性细胞率, 流式细胞术检测各组不同细胞周期 Pan02 细胞百分率和细胞凋亡率, Western blotting 法检测各组 Pan02 细胞周期和凋亡相关蛋白表达水平。**结果:** CCK-8 法, 五味子乙素作用 Pan02 细胞 48 和 72 h 后, 与 0 mg·L<sup>-1</sup> 五味子乙素比较, 其他浓度五味子乙素作用下 Pan02 细胞增殖率明显降低 ( $P < 0.01$ ), 72 h 时细胞抑制作用最明显。选择 0、2.5、5.0 和 10.0 mg·L<sup>-1</sup> 五味子乙素作用 Pan02 细胞, 作用时间为 72 h。对照组 Pan02 细胞呈长梭形, 状态良好, 紧密且贴壁生长, 细胞器和细胞质正常; 2.5 和 5.0 mg·L<sup>-1</sup> 五味子乙素组 Pan02 细胞体积减小, 细胞之间黏连消失, 细胞膜虽完整但通透性增强, 细胞质皱缩, 细胞内部产生空泡结构, 部分呈碎片状漂浮于溶液表面; 10.0 mg·L<sup>-1</sup> 五味子乙素组 Pan02 细胞有明显凋亡小体生成, 呈现凋亡状态。EdU 染色法, 与对照组比较, 2.5、5.0 和 10.0 mg·L<sup>-1</sup> 五味子乙素组 Pan02 细胞中 EdU 阳性细胞率均明显降低 ( $P < 0.01$ )。流式细胞术, 与对照组比较, 2.5、5.0 和 10.0 mg·L<sup>-1</sup> 五味子乙素组 Pan02 细胞 S 期细胞百分率明显升高 ( $P < 0.01$ ), G<sub>2</sub>/M 期细胞百分率明显降低 ( $P < 0.01$ ), 5.0 和 10.0 mg·L<sup>-1</sup> 五味子乙素组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞百分率明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与对照组比较, 2.5、5.0 和 10.0 mg·L<sup>-1</sup> 五味子乙素组 Pan02 细胞凋亡率明显升高 ( $P < 0.01$ )。Western blotting 法, 与对照组比较, 2.5 mg·L<sup>-1</sup> 五味子乙素组 Pan02 细胞中 p27、B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bax)、裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (cleaved Caspase-3) 和裂解的多聚二磷酸腺苷 (ADP) 核糖聚合酶 (cleaved PARP) 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 5.0 和 10.0 mg·L<sup>-1</sup> 五味子乙素组 Pan02 细胞中细胞周期蛋白 (Cyclin) A2、Cyclin E2 和 Bcl-2 蛋白表达水平均明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), p27、Bax、cleaved Caspase-3 和 cleaved PARP 蛋白表达水平均明显升高 ( $P < 0.01$ )。**结论:** 五味子乙素具有抑制胰腺癌 Pan02 细胞增殖的作用, 其作用机制可能与激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 通路诱导细胞凋亡和激活 p27 蛋白并诱导细胞周期 S 期阻滞有关。

**[关键词]** 五味子乙素; 胰腺肿瘤; Pan02 细胞; 细胞凋亡; 细胞周期

**[中图分类号]** R735.9 **[文献标志码]** A

**[收稿日期]** 2023-06-13

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (82203351); 广东省中医药局科研项目 (20231412, 20211458); 广东省卫健委医学科学技术研究基金项目 (A2022163)

**[作者简介]** 傅家财 (1998—), 男, 辽宁省沈阳市人, 在读硕士研究生, 主要从事胰腺炎癌转化机制及防治方面的研究。

**[通信作者]** 李凤金, 助理研究员 (E-mail: wklifengjin@163.com);

齐玲, 教授, 博士研究生导师 (E-mail: qiling1718@gzhmu.edu.cn)

## Inhibitory effect of Schisandrin B on proliferation of pancreatic cancer Pan02 cells and its mechanism

FU Jiakai<sup>1,2</sup>, QING Lingsha<sup>2</sup>, YANG Lu<sup>2</sup>, SONG Meihui<sup>2</sup>, ZHANG Xianying<sup>2</sup>, LIU Xiaocui<sup>2</sup>,  
LI Fengjin<sup>2</sup>, QI Ling<sup>2</sup>

(1. School of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China; 2. Affiliated Qingyuan Hospital, Guangzhou Medical University, People's Hospital, Qingyuan City, Guangdong Province, Qingyuan 511500, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the inhibitory effect of Schisandrin B on the proliferation of pancreatic cancer Pan02 cells, and to clarify the mechanism. **Methods:** CCK-8 method was used to detect the proliferation rates of the Pan02 cells after treated with different concentrations (0, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.50, and 25.00 mg·L<sup>-1</sup>) of Schisandrin B to select the optimal concentration and treatment time of Schisandrin B. The mouse pancreatic cancer Pan02 cells were divided into control group (0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B), 2.5 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B group, 5.0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B group, and 10.0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B group. The morphology of Pan02 cells in various groups was observed with light microscope; 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining assay was used to detect the positive expression rates of the Pan02 cells in various groups; flow cytometry was used to detect the percentages of the Pan02 cells at different cell cycles and the apoptotic rates of the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of cell cycle and apoptosis-related proteins in the cells in various groups. **Results:** The CCK-8 method results showed that after treated with Schisandrin B for 48 and 72 h, compared with 0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B, the proliferation rates of the Pan02 cells after treated with different concentrations of Schisandrin B were decreased ( $P < 0.01$ ), especially at 72 h. 0.25, 5.0, and 10.0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B were selected to treat the Pan02 cells, and 72 h was the treatment time. In control group, the Pan02 cells had a spindle shape, with good condition, and grew closely adhered to the wall with normal organelles and cytoplasm, in 2.5 and 5.0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B groups, the cell volume was decreased, the intercellular adhesion was disappeared, and the cell membrane was intact but more permeable; the cytoplasm shrank and vacuolar structures appeared inside the cells, with some fragmented and floating on the surface of the solution; in 10.0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B group, the Pan02 cells exhibited notable apoptotic bodies, indicating an apoptotic state. The EdU staining results showed that compared with control group, the rates of EdU positive cells in 2.5, 5.0, and 10.0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B groups were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The flow cytometry results showed that compared with control group, the percentages of the cells at S phase in 2.5, 5.0, and 10.0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B groups were significantly increased ( $P < 0.01$ ), while the percentages of the cells at G<sub>2</sub>/M phase were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the percentages of the cells at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase in 5.0 and 1.0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin groups were decreased ( $P < 0.01$ ); compared with control group, the apoptotic rates of the cells in 2.5, 5.0, and 10.0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B groups were significantly increased ( $P < 0.01$ ). The Western blotting results showed that compared with control group, the expression levels of p27, B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) associated X protein (Bax), cleaved cysteine aspartic acid protease-3 (cleaved Caspase-3), and cleaved poly adenosine diphosphate (ADP) ribose polymerase (cleaved PARP) proteins in the cells in 2.5 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B group were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), the expression levels of cyclin A2, cyclin E2, and Bcl-2 proteins in the cells in 5.0 and 10.0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B groups were significantly decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), while the expression levels of p27, Bax, cleaved Caspase-3, and cleaved PARP proteins in the cells in 5.0 and 10.0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B groups were

significantly increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Schisandrin B has an inhibitory effect on proliferation of the pancreatic cancer Pan02 cells, and its mechanism may be related to the activation of the cysteine aspartic acid protease-3 (Caspase-3) pathway to induce the apoptosis and activating p27 protein to induce the arrest of cell cycle at S phase.

**KEYWORDS** Schisandrin B; Pancreas neoplasm; Pan02 cell; Apoptosis; Cell cycle

胰腺癌是癌症导致死亡的主要原因之一, 每年全世界有超过40万人因该疾病而死亡<sup>[1]</sup>。目前, 放疗、化疗、免疫抑制治疗和靶向制剂的应用在大部分肿瘤治疗中均取得了较好的效果, 但相关治疗方法在胰腺癌的治疗中效果较差<sup>[2]</sup>。由于胰腺癌具有高度纤维化的肿瘤微环境, 采用一般的癌症治疗方法治疗效果并不理想。手术清除不彻底、免疫抑制剂效果差、可应用化疗药物不良反应大且耐药严重等问题均阻碍了胰腺癌的治疗进展<sup>[3-5]</sup>。因此, 开发新型可增强化疗药效果、降低化疗药物毒性且减少药物耐药性的中药成分十分重要。五味子乙素具有抗炎、抗氧化、抗纤维化、调节免疫和保肝等药理作用<sup>[6-10]</sup>。同时, 五味子乙素对多种肿瘤细胞具有明显的增殖抑制作用, 可以通过抑制核因子 $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 信号通路和p38丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路, 抑制肺癌细胞间质转化进程和细胞干性, 进而抑制肺癌异种移植瘤的增殖; 通过调节HOX转录反义RNA (HOX transcript antisense intergenic RNA, HOTAIR) - 微小RNA (microRNA, miRNA)-125a-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路, 抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭<sup>[11-12]</sup>。本研究探讨五味子乙素对胰腺癌细胞增殖的抑制作用及其可能的作用机制, 为五味子乙素与化疗药物联合用药减轻化疗药物毒性的作用提供前期研究基础。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、主要试剂和仪器** 小鼠胰腺癌Pan02细胞 (上海富衡生物科技有限公司)。五味子乙素 (上海源叶生物科技有限公司), DMEM高糖培养基和青-链霉素 (美国Gibco公司), 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (澳大利亚ExCell Bio公司), 12% 预制胶 (南京艾思易生物科技有限公司), 快速转膜液 (20 $\times$ ) (广州佑佰生物制品有限公司), BCA蛋白浓度测定试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司), Super ECL Plus超敏发光液 (北京普利莱基因技术有限公司), CCK-8细胞增殖检测

试剂盒 (美国GLP BIO公司), 细胞周期检测试剂盒和细胞凋亡检测试剂盒 (江苏凯基生物技术有限公司), 5-乙基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 细胞增殖检测试剂盒 (广东锐博生物科技有限公司), RIPA裂解液 (江苏康为世纪生物科技有限公司), 细胞周期蛋白 (Cyclin) A2、Cyclin E2、p27、B细胞淋巴瘤2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3 (cysteine aspartic acid protease-3, Caspase-3)、聚磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP)、 $\beta$ -actin、山羊抗兔IgG偶联HRP抗体和马抗小鼠IgG偶联HRP抗体 (美国Cell Signaling公司)。CO<sub>2</sub>恒温培养箱和II级生物安全柜 (新加坡ESCO公司), 超纯水仪 (厦门锐思捷公司), 倒置荧光显微镜 (德国Zeiss公司), 光学显微镜 (宁波舜宇仪器有限公司), 电泳系统 (美国Bio-Rad公司), 流式细胞仪 (美国BD公司), 酶标仪 (瑞士Spectro公司), 离心机 (德国Eppendorf公司)。

**1.2 细胞培养** 小鼠胰腺癌细胞系Pan02细胞培养于含10% FBS和1%青-链霉素的DMEM高糖培养基中。待细胞融合度达到90%时, 采用胰蛋白酶消化制备为单细胞悬液备用。五味子乙素溶解于二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶剂中, 初始浓度为50 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>。

**1.3 CCK-8法检测不同浓度五味子乙素作用下Pan02细胞增殖率** 取对数生长期的Pan02细胞, 接种于96孔细胞培养板中, 每孔 $1 \times 10^3$ 个细胞。培养24 h后, 分别加入含0、0.78、1.56、3.12、6.25、12.50和25.00 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>五味子乙素无血清培养基。培养24、48和72 h后, 弃含药培养基。加入CCK-8溶液, 继续孵育2 h。采用酶标仪测定波长450 nm处的吸光度 (A) 值, 每组设置3个复孔, 计算不同浓度五味子乙素作用下Pan02细胞增殖率, 以选择五味子乙素作用的最适浓度和最佳作用时间。细胞增殖率 = (实验组A值 - 空白组A值) / (对照组A值 - 空白组A值)  $\times$  100%。

**1.4 细胞分组** 将处于对数生长期的 Pan02 细胞分为对照组 (0 mg·L<sup>-1</sup>五味子乙素)、2.5 mg·L<sup>-1</sup>五味子乙素组、5.0 mg·L<sup>-1</sup>五味子乙素组和 10.0 mg·L<sup>-1</sup>五味子乙素组。

**1.5 光学显微镜观察各组 Pan02 细胞形态表现**

取对数生长期的 Pan02 细胞, 接种于 3.5 cm 培养皿中, 每皿 1×10<sup>5</sup> 个细胞。培养 24 h 后, 分别加入含 0、2.5、5.0 和 10.0 mg·L<sup>-1</sup>五味子乙素无血清培养基。继续培养 72 h 后, 采用光学显微镜观察各组细胞形态表现并拍照。

**1.6 EdU 染色法检测各组 Pan02 细胞中 EdU 阳性细胞率**

将对数生长期的 Pan02 细胞接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 1×10<sup>3</sup> 个细胞。培养 24 h 后, 按 1:1000 稀释 EdU 溶液, 制备为 50 μmol·L<sup>-1</sup> EdU 无血清培养基, 并分别加入含 0、2.5、5.0 和 10.0 mg·L<sup>-1</sup>五味子乙素无血清培养基, 继续培养 72 h。经固定和透化后, 加入 EdU 反应复合物, 室温孵育 30 min, Hoechst33342 复染细胞核。采用荧光显微镜观察 Pan02 细胞并计数, 计算各组细胞中 EdU 阳性表达率。EdU 阳性细胞率 = (EdU 阳性细胞数/总细胞数) × 100%。

**1.7 流式细胞术检测各组不同细胞周期 Pan02 细胞百分率**

取对数生长期的 Pan02 细胞, 接种于 3.5 cm 培养皿中, 每皿 1×10<sup>5</sup> 个细胞。培养 24 h 后, 加入含 0、2.5、5.0 和 10.0 mg·L<sup>-1</sup>五味子乙素无血清培养基。继续培养 72 h, 胰酶消化, 离心收集细胞, 加入预冷的乙醇溶液中, 4℃ 孵育 30 min, 离心后加入 RNase 溶液重悬, 再次孵育 30 min, PBS 缓冲液离心重悬后, 加入 PI 染色液, 避光孵育 30 min。每组设置 3 个重复样品, 采用流式细胞仪和 Modfit 软件分析各组不同细胞周期 Pan02 细胞百分率。

**1.8 流式细胞术检测各组 Pan02 细胞凋亡率**

取对数生长期的 Pan02 细胞, 接种于 3.5 cm 培养皿中, 每皿 1×10<sup>5</sup> 个细胞。培养 24 h 后, 加入含 0、2.5、5.0 和 10.0 mg·L<sup>-1</sup>五味子乙素无血清培养基。继续培养 72 h 后, 胰酶消化, 离心并收集细胞, Binding Buffer 溶液重悬。加入 Annexin V-APC 和 PI 染色液, 室温孵育 10 min, 每组设置 3 个重复样品, 采用流式细胞仪和 FlowJo 软件分析各组细胞凋亡率。细胞凋亡率 = (早期凋亡细胞数 + 晚期凋亡细胞数) / 总细胞数 × 100%。

**1.9 Western blotting 法检测各组 Pan02 细胞周期和凋亡相关蛋白表达水平**

取对数生长期的 Pan02 细胞, 接种于 10 cm 培养皿中, 每皿 7×10<sup>5</sup> 个细胞。培养 24 h 后, 加入含 0、2.5、5.0 和 10.0 mg·L<sup>-1</sup>五味子乙素无血清培养基。继续培养 72 h 后, 胰酶消化, 离心并收集细胞, 加入 1 mL 蛋白裂解液 (含蛋白酶抑制剂和蛋白磷酸酶抑制剂)。经超声裂解 1 min, 收集上清。测定各组蛋白浓度, 4%~12% 预制胶 160 V、40 min 上样, 350 mA、35 min 快速恒流转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 4℃ 孵育一抗 (1:1000) 过夜, TBST 溶液洗膜 3 次, 每次 5 min, 对应二抗 (1:1500) 室温孵育 2 h。TBST 溶液洗膜 3 次, ECL 化学发光显色, 凝胶成像系统记录各蛋白条带。采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以 β-actin 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 / β-actin 蛋白条带灰度值。

**1.10 统计学分析**

采用 Graphpad Prism 9.5.0 统计软件进行统计学分析并绘制图像。不同浓度五味子乙素作用下 Pan02 细胞增殖率, 各组 Pan02 细胞中 EdU 阳性细胞率、不同细胞周期细胞百分率、细胞凋亡率和细胞周期及凋亡相关蛋白表达水平均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 Dunnett's *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同浓度五味子乙素作用下 Pan02 细胞增殖率**

不同浓度五味子乙素作用 Pan02 细胞 48 和 72 h 后, 与 0 mg·L<sup>-1</sup>五味子乙素比较, 其他浓度五味子乙素作用下 Pan02 细胞增殖率均明显降低 ( $P < 0.01$ ), 作用 72 h 时细胞抑制作用最明显。因此, 选择 0、2.5、5.0 和 10.0 mg·L<sup>-1</sup>五味子乙素作用 Pan02 细胞, 作用时间为 72 h。见表 1。

**2.2 各组 Pan02 细胞形态表现**

对照组 Pan02 细胞呈长梭形, 状态良好, 紧密且贴壁生长, 细胞器和细胞质正常。2.5 和 5.0 mg·L<sup>-1</sup>五味子乙素组 Pan02 细胞体积减小, 细胞之间黏连消失, 细胞膜虽完整但通透性增强, 细胞质皱缩, 细胞内部产生空泡结构, 部分呈碎片状漂浮于溶液表面。10.0 mg·L<sup>-1</sup>五味子乙素组 Pan02 细胞有明显凋亡小体生成, 呈现凋亡状态。见图 1。

**2.3 各组 Pan02 细胞中 EdU 阳性细胞率**

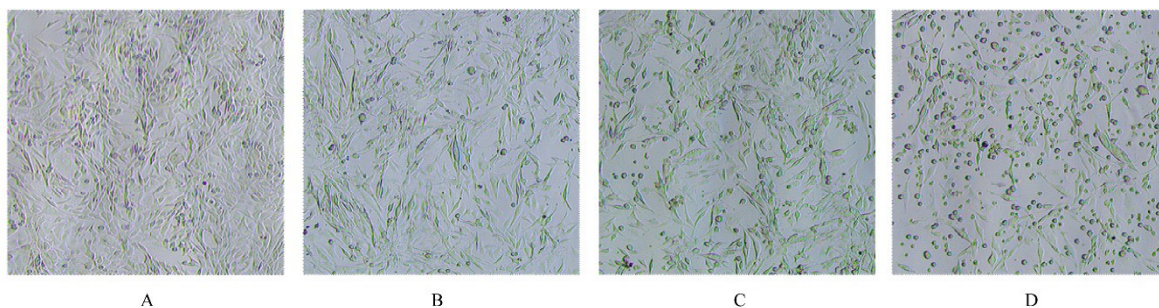
与对照组 (89.64% ± 0.03%) 比较, 2.5 mg·L<sup>-1</sup>五味子

表1 CCK-8法检测不同浓度五味子乙素作用下Pan02细胞增殖率

Tab. 1 Proliferation rates of Pan02 cells after treated with different concentrations of Schisandrin B detected by CCK-8 method ( $n=6, \bar{x} \pm s, \eta/\%$ )

Group	Proliferation rate		
	(t/h) 24	48	72
Concentration of Schisandrin B ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )			
0	52.0±0.5	77.8±3.4	75.8±1.4
0.78	52.0±0.6	77.6±1.1	67.2±3.3*
1.56	50.9±1.3	76.6±2.3	58.3±1.4*
3.12	51.1±1.3	72.2±0.8	47.3±2.6*
6.25	51.8±0.8	70.4±0.7*	44.8±1.3*
12.50	52.1±1.0	66.9±0.9*	38.7±0.9*
25.00	52.0±0.4	66.7±3.3*	37.3±1.5*

\* $P<0.01$  compared with  $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Schisandrin B group.



A: Control group; B:  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Schisandrin B group; C:  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Schisandrin B group; D:  $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Schisandrin B group.

图1 光学显微镜观察各组Pan02细胞形态表现( $\times 10$ )

Fig. 1 Morphology of Pan02 cells in various groups observed by light microscope ( $\times 10$ )

## 2.6 各组Pan02细胞中周期相关蛋白表达水平

与对照组比较,  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 五味子乙素组Pan02细胞中p27蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$ ), Cyclin A2和Cyclin E2蛋白表达水平差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ );  $5.0$ 和 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 五味子乙素组Pan02细胞中Cyclin A2和Cyclin E2蛋白表达水平均明显降低 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), p27蛋白表达水平均明显升高 ( $P<0.01$ )。见图5。

## 2.7 各组Pan02细胞中凋亡相关蛋白表达水平

与对照组比较,  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 五味子乙素组Pan02细胞中Bax、裂解的Caspase-3 (cleaved Caspase-3)和裂解的PARP (cleaved PARP)蛋白表达水平均明显升高 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), Bcl-2蛋白表达水平差异无统计学意义 ( $P>0.05$ );  $5.0$ 和 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 五味子乙素组Pan02细胞中Bcl-2蛋白

乙素组 ( $73.82\% \pm 0.01\%$ )、 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 五味子乙素组 ( $47.91\% \pm 0.28\%$ )组和 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 五味子乙素组 ( $44.74\% \pm 0.05\%$ ) Pan02细胞中EdU阳性细胞率均明显降低 ( $P<0.01$ )。见图2。

2.4 各组不同细胞周期Pan02细胞百分率 与对照组比较,  $2.5$ 、 $5.0$ 和 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 五味子乙素组Pan02细胞S期细胞百分率明显升高 ( $P<0.01$ ),  $G_2/M$ 期细胞百分率明显降低 ( $P<0.01$ );  $5.0$ 和 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 五味子乙素组 $G_0/G_1$ 期细胞百分率明显降低 ( $P<0.01$ )。见图3和表2。

2.5 各组Pan02细胞凋亡率 与对照组 ( $12.43\% \pm 2.02\%$ )比较,  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 五味子乙素组 ( $21.47\% \pm 1.41\%$ )、 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 五味子乙素组 ( $25.70\% \pm 0.57\%$ )和 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 五味子乙素组 ( $30.37\% \pm 0.59\%$ ) Pan02细胞凋亡率均明显升高 ( $P<0.01$ )。见图4。

表达水平明显降低 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), Bax、cleaved Caspase-3和cleaved PARP蛋白表达水平均明显升高 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。见图6。

## 3 讨论

五味子乙素是从中药五味子中提取的木脂素类化合物,具有抗氧化和抗应激等作用,对多种肿瘤细胞表现出明显的细胞毒性<sup>[13]</sup>。本研究结果显示:五味子乙素可以明显降低胰腺癌细胞活性,诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡。

细胞周期阻滞是常见的肿瘤治疗方法,临床上常用的化疗药物(甲氨蝶呤、氟尿嘧啶和阿糖胞苷等)均是通过诱导细胞周期S期阻滞发挥抗癌作用<sup>[14]</sup>。Cyclin蛋白能够正向调控细胞周期依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDK),从而调节细

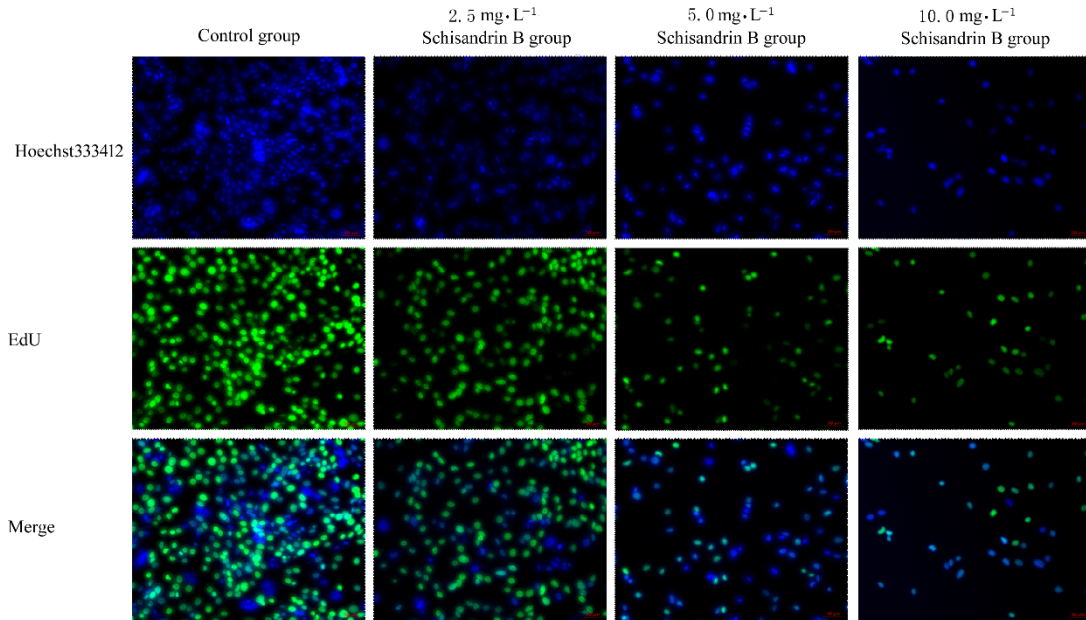
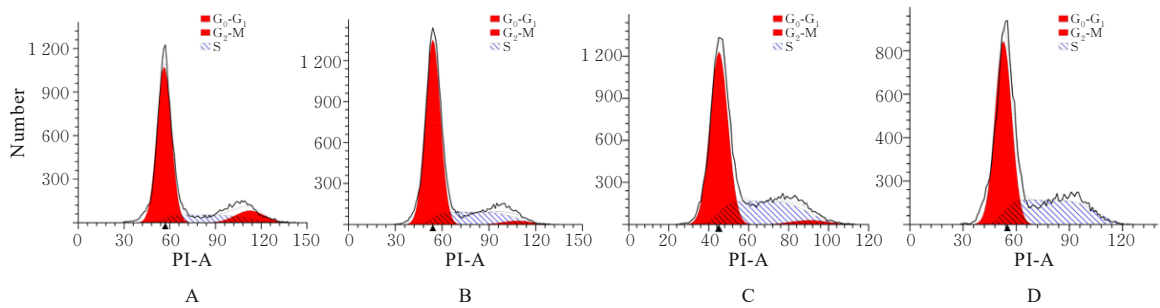


图2 各组 Pan02 细胞中 EdU 表达情况(Hoechst33342, ×10)

Fig. 2 Expression of EdU in Pan02 cells in various groups (Hoechst33342, ×10)



A: Control group; B: 2.5 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B group; C: 5.0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B group; D: 10.0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B group.

图3 流式细胞术检测各组不同细胞周期 Pan02 细胞百分率

Fig. 3 Percentages of Pan02 cells in various groups at different cell cycles detected by flow cytometry

表2 各组不同细胞周期 Pan02 细胞百分率

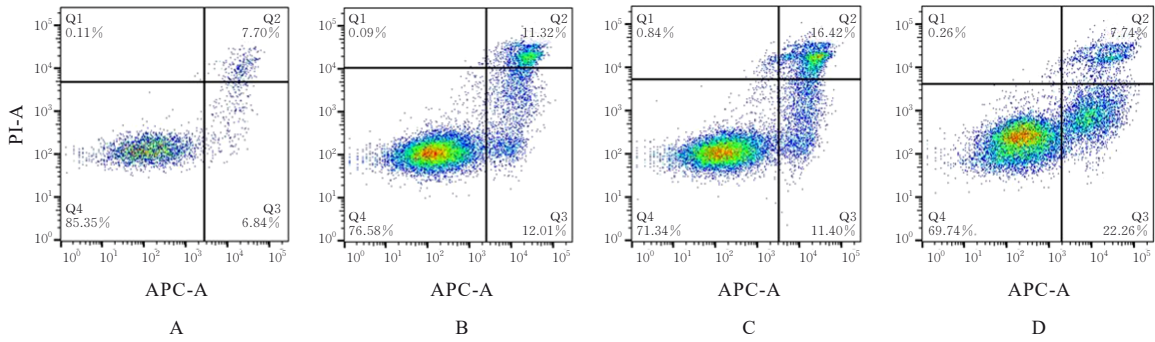
Tab. 2 Percentages of Pan02 cells in various groups at different cell cycles (n=3,  $\bar{x} \pm s$ ,  $\eta/\%$ )

Group	Percentage of Pan02 cells		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> /M	S
Control	71.61±0.81	9.90±0.88	18.50±1.57
Schisandrin B(mg·L <sup>-1</sup> )			
2.5	73.15±1.20	4.48±1.05*	22.34±0.83*
5.0	62.13±0.79*	2.38±1.23*	35.49±0.91*
10.0	63.14±0.62*	1.55±1.83*	35.31±1.83*

\*P<0.01 compared with control group.

胞周期进程。Cyclin A 与 CDK 2 结合促进细胞周期由 S 期进入 G<sub>2</sub> 期，与 CDK 1 结合促进细胞增殖进入 M 期；Cyclin B 主要在细胞周期 G<sub>2</sub> 期表达并与

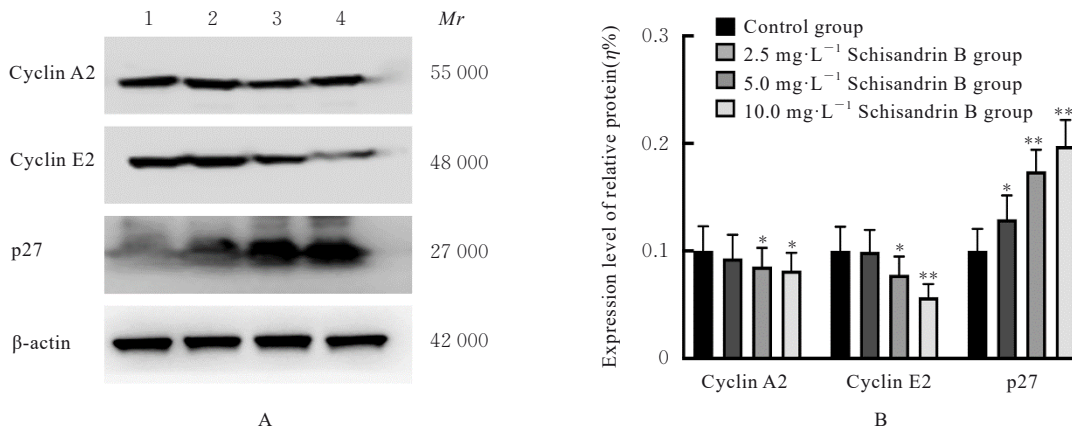
CDK 1 结合发挥作用；Cyclin D 与 CDK 2 结合可在细胞周期 G<sub>1</sub> 期发挥作用，与 CDK 4/6 结合加速细胞由 G<sub>1</sub> 期进入 S 期；Cyclin E 与 CDK 2 的结合也可促进细胞周期由 S 期进入 G<sub>2</sub> 期<sup>[15]</sup>。细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子（cyclin-dependent kinases inhibitor, CKI）中 CDK 相互作用蛋白/激酶抑制蛋白（Cip/Kip）家族是 CDK 活性调控的重要机制之一，广泛抑制各种细胞周期蛋白和激酶活性<sup>[16]</sup>。p21 和 p27 蛋白是主要的负调控因子，存在于细胞核内，可与 CDK 蛋白结合并抑制激酶活性，其中 p21 抑制作用的最适底物为 Cyclin E 和 Cyclin A，p27 蛋白抑制的最适底物为 Cyclin E 和 Cyclin D。共同阻滞细胞由 S 进入 G<sub>2</sub> 期<sup>[17-18]</sup>。本研究结果显示：五味子乙素作用 72 h，Pan02 细胞发生 S 期阻



A: Control group; B: 2.5 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B group; C: 5.0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B group; D: 10.0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B group.

图4 流式细胞术检测各组 Pan02 细胞凋亡率

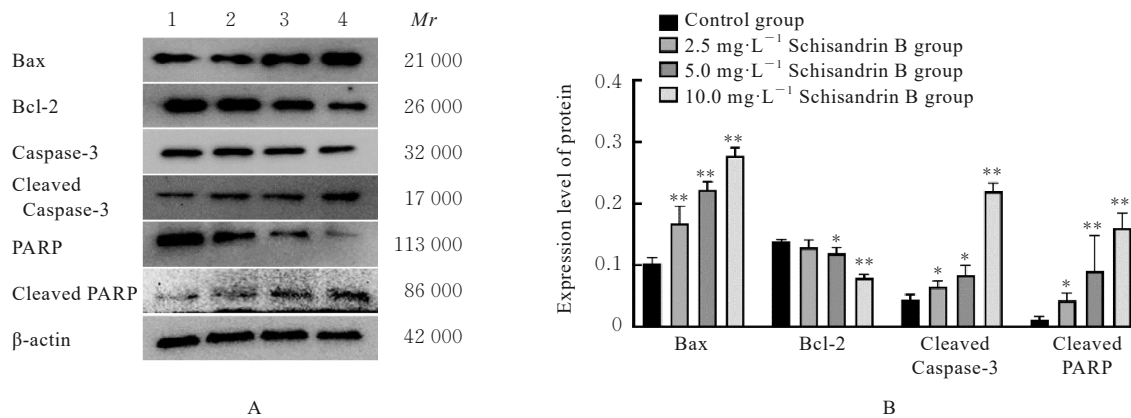
Fig. 4 Apoptotic rates of Pan02 cells in various groups detected by flow cytometry



Lane 1: Control group; Lane 2: 2.5 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B group; Lane 3: 5.0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B group; Lane 4: 10.0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B group. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 compared with control group.

图5 Western blotting法检测各组 Pan02 细胞中 Cyclin A2、Cyclin E2 和 p27 蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 5 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of Cyclin A2, Cyclin E2, and p27 proteins in Pan02 cells in various groups detected by Western blotting method



Lane 1: Control group; Lane 2: 2.5 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B group; Lane 3: 5.0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B group; Lane 4: 10.0 mg·L<sup>-1</sup> Schisandrin B group. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 compared with control group.

图6 Western blotting法检测各组 Pan02 细胞中 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3 和 cleaved PARP 蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 6 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3, and cleaved PARP proteins in Pan02 cells in various groups detected by Western blotting method

滞。进一步检测蛋白表达水平, 结果显示: p27 蛋白表达水平明显升高, 而 Cyclin A2 和 Cyclin E2 蛋白表达水平明显降低。提示五味子乙素能够通过上调 p27 蛋白表达, 使胰腺癌细胞由细胞周期 S 期进入 G<sub>2</sub> 期过程受阻, 从而发挥抑制细胞增殖的作用。

细胞凋亡是特定基因调控后的主动性死亡过程<sup>[19]</sup>。Bcl-2 家族是细胞凋亡信号转导途径中关键的凋亡调节因子, 共同参与复杂的相互作用以调控细胞凋亡<sup>[20]</sup>。B 细胞淋巴瘤 (B-cell lymphoma, Bcl) 蛋白是一种膜整合蛋白, 主要存在于线粒体外膜、核膜和部分内质网中, 其家族中细胞死亡相关的 Bcl-2 激动剂 (Bcl-2-associated agonist of cell death, Bad)、Bax 和 BH3 结构域凋亡诱导蛋白 (BH3 interacting domain death agonist, Bid) 具有促凋亡作用, 而 Bcl-2 和特大型 Bcl 蛋白 (Bcl-extra large, Bcl-XL) 具有抗凋亡的作用。促凋亡 Bax 蛋白和抗凋亡 Bcl 蛋白之间的平衡决定了细胞对凋亡刺激的敏感性<sup>[21]</sup>。当接受凋亡分子信号刺激时, 位于线粒体中的促凋亡 Bax 蛋白表达上调, 促进线粒体外膜通透复合物 (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) 形成, 导致细胞色素 C 由线粒体间隙释放至胞浆中, 激活下游 Caspase-3 蛋白的级联反应, 诱导细胞凋亡发生<sup>[22]</sup>。抗凋亡蛋白 Bcl-2 主要存在于线粒体膜上, 通过抑制胞浆钙离子跨膜流动, 减少线粒体钙超载并抑制线粒体膜电位变化, 维持线粒体膜稳定性, 减少线粒体通透性改变, 以此抑制细胞色素 C 的释放和功能, 发挥抗凋亡的作用<sup>[23-24]</sup>。PARP 是细胞的骨架蛋白, 在凋亡过程中 Caspase-3 家族蛋白降解 PARP, 导致凋亡细胞的形态和功能发生变化<sup>[25]</sup>。本研究结果显示: 五味子乙素能够诱导 Pan02 细胞发生凋亡。进一步检测蛋白表达水平, 结果显示: 五味子乙素作用 72 h, Bax、cleaved Caspase-3 和 cleaved PARP 蛋白表达水平明显升高, Bcl-2 蛋白表达水平明显降低。提示五味子乙素能够通过上调 Bax/Bcl-2 比值, 激活 Caspase-3 依赖的凋亡途径, 诱导细胞凋亡。

综上所述, 五味子乙素具有抑制胰腺癌 Pan02 细胞增殖的作用, 其作用机制可能与激活 Caspase-3 通路诱导细胞凋亡和激活 p27 蛋白并诱导细胞周期 S 期阻滞有关。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

傅家财参与文献检索、数据分析和论文撰写, 秦玲莎和杨露参与文献检索及论文撰写, 宋美慧参与数据整理和分析, 张仙映和刘晓翠参与论文结果分析及讨论, 李凤金和齐玲参与实验设计指导及论文审校。

#### [参考文献]

- [1] KLEIN A P. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(7): 493-502.
- [2] TORPHY R J, FUJIWARA Y, SCHULICK R D. Pancreatic cancer treatment: better, but a long way to go[J]. *Surg Today*, 2020, 50(10): 1117-1125.
- [3] MCGUIGAN A, KELLY P, TURKINGTON R C, et al. Pancreatic cancer: a review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(43): 4846-4861.
- [4] JAAKS P, COKER E A, VIS D J, et al. Effective drug combinations in breast, colon and pancreatic cancer cells[J]. *Nature*, 2022, 603(7899): 166-173.
- [5] HO W J, JAFFEE E M, ZHENG L. The tumour microenvironment in pancreatic cancer—clinical challenges and opportunities [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17: 527-540.
- [6] HU Y W, LI H T, LI R L, et al. Protective effects of Schisandrin B against D-GalN-induced cell apoptosis in human hepatocyte (L02) cells via modulating Bcl-2 and Bax[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 7205-7214.
- [7] LUO W, LIN K, HUA J Y, et al. Schisandrin B attenuates diabetic cardiomyopathy by targeting MyD88 and inhibiting MyD88-dependent inflammation [J]. *Adv Sci*, 2022, 9(31): e2202590.
- [8] YAN L S, ZHANG S F, LUO G, et al. Schisandrin B mitigates hepatic steatosis and promotes fatty acid oxidation by inducing autophagy through AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Metabolism*, 2022, 131: 155200.
- [9] LI Z M, ZHAO L J, XIA Y S, et al. Schisandrin B attenuates hepatic stellate cell activation and promotes apoptosis to protect against liver fibrosis [J]. *Molecules*, 2021, 26(22): 6882.
- [10] TAN S R, ZHENG Z, LIU T Q, et al. Schisandrin B induced ROS-mediated autophagy and Th1/Th2 imbalance via selenoproteins in Hepa1-6 cells [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 857069.
- [11] LI S P, WANG H, MA R D, et al. Schisandrin B inhibits epithelial-mesenchymal transition and stemness of large-cell lung cancer cells and tumorigenesis in

- xenografts via inhibiting the NF- $\kappa$ B and p38 MAPK signaling pathways[J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(6): 115.
- [12] JIANG Y, ZHANG Q L, BAO J S, et al. Schisandrin B inhibits the proliferation and invasion of glioma cells by regulating the HOTAIR-miRNA-125a-mTOR pathway[J]. *Neuroreport*, 2017, 28(2): 93-100.
- [13] NASSER M I, HAN T Y, ADLAT S, et al. Inhibitory effects of Schisandrin B on human prostate cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(1): 677-685.
- [14] PFAB C, ABGARYAN A, DANZER B, et al. Cefazidime and cefepime antagonize 5-fluorouracil' s effect in colon cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1): 125.
- [15] ICARD P, FOURNEL L, WU Z R, et al. Interconnection between metabolism and cell cycle in cancer[J]. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44(6): 490-501.
- [16] JR R R. Cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitors as anticancer drugs[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 139: 471-488.
- [17] LIU Y X, DONG Y Y, ZHAO L P, et al. TRIM59 overexpression correlates with poor prognosis and contributes to breast cancer progression through AKT signaling pathway [J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57 (12) : 1792-1802.
- [18] KUMARI S, KUMAR P, KUMAR M, et al. Expression of p27 and p16 and their clinical significance in gastric cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2021, 23(4) : 856-865.
- [19] SINGH R, LETAI A, SAROSIEK K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(3): 175-193.
- [20] WARREN C F A, WONG-BROWN M W, BOWDEN N A. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(3): 177.
- [21] SONG L J, CHEN X, MI L, et al. Icarin-induced inhibition of SIRT6/NF- $\kappa$ B triggers redox mediated apoptosis and enhances anti-tumor immunity in triple-negative breast cancer[J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(11): 4242-4256.
- [22] ABARIKWU S O, FAROMBI E O. Atrazine induces apoptosis of SH-SY5Y human neuroblastoma cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3-dependent pathway [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2015, 118: 90-98.
- [23] WAGNER A K, AMIN K B, NIYONKURU C, et al. CSF Bcl-2 and cytochrome C temporal profiles in outcome prediction for adults with severe TBI[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(9): 1886-1896.
- [24] PEÑA-BLANCO A, GARCÍA-SÁEZ A J. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis[J]. *FEBS J*, 2018, 285(3): 416-431.
- [25] SIDDIQUI W A, AHAD A, AHSAN H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update[J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(3): 289-317.