

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.13.001

· 基础研究 ·

夏枯草诱导人甲状腺乳头状癌细胞 K1 增殖和凋亡的影响及其作用机制*

熊 燚¹ 赵 敏^{2△} 谭剑斌² 吴仕璇³ 杨 哲⁴ 张文娟¹ 杨杏芬^{2△}

(1 暨南大学医学院 广东 广州 510632; 2 广东省疾病预防控制中心 广东 广州 511430;

3 深圳市龙岗区第二人民医院 广东 深圳 518114; 4 中山大学公共卫生学院 广东 广州 510080)

摘要 目的:探索夏枯草对人甲状腺乳头状癌细胞(K1)增殖和诱导 K1 细胞凋亡的影响及其可能的作用机制。**方法:**采用 MTT 比色法测定 2~200 mg/mL 夏枯草作用 24 h 对 K1 细胞增殖的影响;采用 Hoechst 染色法和流式细胞术(Annexin V-FITC/PI 联合标记)观察 0.3、0.6、1.2、2.4、4.8 mg/mL 夏枯草作用 24 h K1 细胞凋亡的影响;采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)测定 1.2、2.4、4.8 mg/mL 夏枯草作用 24 h 对 K1 细胞凋亡相关蛋白表达的影响。**结果:**在 2~200 mg/mL 的浓度范围内夏枯草作用 24 h 对 K1 细胞增殖有明显抑制作用($P<0.05$), IC_{50} 值为 2.427 mg/mL。流式细胞术检测结果显示夏枯草可诱导 K1 细胞凋亡, 2.4、4.8 mg/mL 组 K1 细胞总凋亡率分别为 $(11.35\pm 0.92)\%$ 、 $(44.57\pm 3.07)\%$, 与对照组相比明显升高($P<0.05$);与对照组相比, 1.2、2.4、4.8 mg/mL 夏枯草作用 24 h 胞浆内凋亡蛋白 Bax、细胞色素 C(Cyto C)、Caspase-9、活化的 Caspase-3(Cleaved Caspase-3)表达增多。**结论:**夏枯草能抑制人甲状腺癌 K1 细胞增殖并诱导其凋亡, 其机制可能与活化线粒体凋亡通路有关。

关键词:夏枯草;人甲状腺乳头状癌细胞;凋亡;线粒体通路

中图分类号:R-33;R285;R736.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)13-2401-06

Effects and Mechanism of *Prunella Vulgaris* L. on the Proliferation and Apoptosis of Human Papillary Thyroid Cancer K1 Cells*XIONG Yi¹, ZHAO Min^{2△}, TAN Jian-bin², WU Shi-xuan³, YANG Zhe⁴, ZHANG Wen-juan¹, YANG Xing-fen^{2△}

(1 Medical College of Jinan University, Guangzhou, Guangdong, 510632, China; 2 Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, Guangdong, 511430, China; 3 The Second People's Hospital of Longgang District, Shenzhen, Guangdong, 518114, China; 4 School of Public Health, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong, 510080, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect and the possible mechanism of *Prunella vulgaris* L. on the cell proliferation and apoptosis in the human Papillary thyroid cancer K1 cells. **Methods:** The inhibition ratio of *Prunella vulgaris* L. on the human Papillary thyroid cancer cells K1 was tested by MTT assay, the influence of different concentrations of *Prunella vulgaris* L. on the apoptosis of human Papillary thyroid cancer K1 cells was observed by Hoechst staining method; the apoptotic rates were examined by flow cytometry analysis. The expression of apoptotic protein was detected by Western blotting. **Results:** *Prunella vulgaris* L. could obviously inhibit the proliferation of K1 cells in 2~200 mg/mL concentration range ($P<0.05$). The IC_{50} with 24 h of *Prunella vulgaris* L. on the K1 cell was 2.427 mg/mL. Flow cytometry analysis showed that: 2.4, 4.8 mg/mL *Prunella vulgaris* L. could induce the apoptosis of K1 cell, the apoptotic rates were $(11.35\pm 0.92)\%$ and $(44.57\pm 3.07)\%$ respectively. Western blotting showed that the expressions of apoptotic protein Bcl-2, Caspase-9, Caspase-3 of *Prunella vulgaris* L. were decreased and the expressions of Cleaved Caspase 3, Caspase-9, CytoC, Bax were increased compared with the control group. **Conclusions:** *Prunella vulgaris* L. could inhibit the cell proliferation and induce the apoptosis of human papillary thyroid cancer K1 cells, which might be related to the activation of mitochondrial pathway.

Key words: *Prunella vulgaris* L.; Human papillary thyroid cancer cells; Apoptosis; Mitochondrial pathways

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R285; R736.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)13-2401-06

前言

甲状腺癌是人体内分泌系统最常见的恶性肿瘤之一,其治疗主要以外科手术为主,但术后仍有复发、转移的风险。中草药

* 基金项目:国家科技部“863”项目(2010AA023001);广东省自然科学基金项目(S2013010013289);

广东省科技计划项目(2013B010404033);广州市科技计划项目(201300000161);广东省中药局课题(20132108, 20121275)

作者简介:熊燚(1991-),硕士研究生,研究方向:食品安全性评价,电话:18520462986, E-mail: xiongyi5689@163.com

△ 通讯作者:杨杏芬,博士,教授,研究方向:应用毒理学,食品安全风险评估, E-mail: yangxingfen@21.cn.com;

赵敏,博士,主任医师,研究方向:应用毒理学,食品安全风险评估, E-mail: zhaomin72@126.com

(收稿日期:2016-11-23 接受日期:2016-12-19)

具有毒副作用低的特点,近年来在甲状腺癌的防治方面取得了迅猛发展。夏枯草(*Prunella vulgaris* L.,PV),唇形科植物,干燥果穗入药,主要产于河南、安徽、江苏、湖南等地^[1,2],应用于甲状腺疾病预防与治疗已有悠久的历史了。作为一味“软坚散结”常用的中药,《本草纲目》中记载其有治疗“瘰癧”之功效^[3],《神农本草经》记载夏枯草能“散瘰结气”^[4]。现代医学显示夏枯草临床上治疗甲状腺肿、亚急性甲状腺炎等疗效显著^[5-8],体外实验也显示夏枯草能抑制甲状腺肿瘤细胞生长,并诱导细胞凋亡^[9,10],但对诱导甲状腺肿瘤细胞凋亡的研究仍不够深入。因此,本研究拟探索夏枯草对人甲状腺乳头状癌细胞 K1 凋亡的影响及其机制,以期夏枯草应用于甲状腺癌的防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

夏枯草浸膏(广州王老吉公司,批号 151201)采用传统水提醇沉再浓缩的方法制备,1g 夏枯草浸膏相当于 6.95 g 夏枯草药材。中国测试分析中心依据传统标准方法和《中国药典》提供的方法,对送检的夏枯草浸膏主要成分进行了分析,分析方法采用酸碱滴定法、高效液相色谱分析系统(HPLC)、紫外-可见分光光度法(UV-Vis)、气相色谱质谱分析系统(GC-MS)。检测结果显示夏枯草浸膏中的总三萜、多糖、总黄酮、甾醇类、香豆素类、有机酸和挥发油的含量分别为 1.30%、1.20%、15.30%、7.33%、0.36%、3.70%、0.66% (w/w)。称取适量夏枯草浸膏以灭菌水溶解配置成 400 mg/mL 夏枯草溶液,经 22 μ m 孔径滤膜过滤后储存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱,使用时用 RPMI-1640 培养液稀释至所需浓度。文中夏枯草浓度均以生药浓度表示。

1.2 细胞培养

人甲状腺乳头状癌细胞(K1)购于上海赛百慷生物科技有限公司。K1 细胞培养于含 10%胎牛血清 RPMI-1640 培养液中。细胞在相对湿度为 95%,37 $^{\circ}$ C 含 5% CO₂ 的环境中单层生长,实验取对数生长期细胞。

1.3 试剂与仪器

1.3.1 试剂 噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购自美国 SIGMA 公司;青链霉素、0.25%EDTA-Trypsin、2.5%(10X)Trypsin、D-PBS 缓冲液、RPMI-1640 细胞培养基、澳洲胎牛血清(FBS)购自美国 GIBCO 公司;Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒购自美国 BD 公司;Hoechst 33258、十二烷基磺酸钠(SDS)、四甲基乙二胺(TEMED)、吐温(Tween)购自美国 SIGMA 公司;蛋白上样缓冲液、过硫酸铵、聚丙烯酰胺胶母液(29:1)、ECL 化学发光液、蛋白定量试剂盒、PVDF 膜、转膜滤纸购自美国 Bio-Rad 公司;甲醇、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、甘氨酸购自广州化学试剂厂;一抗稀释液购自碧云天生物技术研究;脱脂奶粉购自中国伊利公司; β -tubulin、Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9、Cyto C 一抗(美国 Cell Signaling 公司);HRP 标记羊抗兔二抗(美国 EarthOx 公司)。

1.3.2 仪器 全波长多功能酶标仪(美国 Thermo 公司);荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司);FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);恒温孵育器(美国 ABCON 公司);电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);空气恒温摇床(美国 Shellab 公司);凝胶成像分

析系统(法国 Vilber-Lourmat 公司)。

1.4 观察指标及检测方法

1.4.1 细胞生长抑制率 采用 MTT 法,取对数生长期的 K1 细胞,胰酶消化后计数,铺于 96 孔板中,细胞密度 1×10^5 /mL,待细胞贴壁后加入以 RPMI-1640 培养液配制的 2.5、10、20、40、80、160 和 200 mg/mL 浓度的夏枯草溶液,对照组仅加入相应体积的培养液,每个浓度组设 6 个平行孔。继续培养 24 h 后加入浓度 5 mg/mL 的 MTT(PBS 溶解)100 μ L,在 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 的环境中继续培养,4 h 后弃上清,以 DMSO 溶解结晶颗粒,摇床震荡 10 min 后,于酶标仪 490 nm 波长处测吸光值,计算细胞生长增殖率和抑制率。细胞增殖率(%)=实验组 OD 值 / 对照组 OD 值 $\times$ 100%,细胞抑制率(%)=1-细胞增殖率(%)。

1.4.2 细胞形态学观察 取对数生长期的 K1 细胞,胰酶消化后计数,铺于 6 孔板中,细胞密度 1×10^5 /mL,待细胞贴壁后加入以 RPMI-1640 培养液配制的 0、0.3、0.6、1.2、2.4、4.8 mg/mL 夏枯草溶液,继续培养 24 h 后直接将细胞放置于倒置显微镜下观察并拍照。

1.4.3 Hoechst 染色法检测细胞凋亡 取对数生长期的 K1 细胞,胰酶消化后计数,铺于 24 孔板中,细胞密度 2×10^5 /mL,待细胞贴壁后加入以 RPMI-1640 培养液配制的 0、0.3、0.6、1.2、2.4、4.8 mg/mL 夏枯草溶液,继续培养 24h 后,小心吸弃培养基;轻轻沿孔壁加入 500 μ L PBS 缓冲液,覆盖培养孔表面,轻轻晃动 24 孔板,吸弃 PBS;沿孔壁加入 200 μ L Hoechst 33258 染色工作液,覆盖接种面,轻轻晃动 24 孔板,混匀;将细胞置于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中 15 min;小心吸弃染液,加入适量 PBS 缓冲液清洗两遍,吸弃 PBS 后再加入 200 μ L PBS 缓冲液,覆盖细胞培养孔表面;即刻在倒置荧光显微镜下观察并拍照。激发波长为 350 nm。

1.4.4 流式细胞术(Annexin V-FITC/PI 联合标记)检测细胞凋亡率 用不含 EDTA 的胰酶消化后收集经 0、0.3、0.6、1.2、2.4、4.8 mg/mL 夏枯草作用 24 h 的 K1 细胞,于室温 2000 rpm 离心 5 min 后,收集细胞;用预冷的 PBS 重悬细胞 1 次,2000 rpm 离心 5 min,洗涤细胞;300 μ L 1x Binding Buffer 重悬后加入 5 μ L Annexin V-FITC 染色剂,混匀后避光,室温孵育 15 min,上机前 5 min 加入碘化丙啶(PI)染色剂,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.4.5 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测凋亡蛋白表达水平 本实验检测的蛋白是 Bcl-2、Bax、Cyto C、Caspase-9、Caspase-3、Cleaved Caspase-3。收集经 0、1.2、2.4、4.8 mg/mL 夏枯草处理 24 h 的 K1 细胞,提取胞浆蛋白;制备 12%分离胶和 5%浓缩胶;取 25 μ g 蛋白与上样缓冲液混合后置于 95 $^{\circ}$ C 恒温振荡器孵育 5 min,转移至上样孔;80 V,20 min;120 V,80 min 电泳,400 mA,125 V,90 min 转膜;将转膜后的 PVDF 膜浸于 5%脱脂牛奶摇床 1 h 封闭;一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;孵育二抗 1.5 h 后曝光,凝胶成像系统拍照保存图像。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 软件包进行统计学分析。采用 Probit 回归拟合 IC₅₀ 结果,对符合正态性和方差齐性的数据采用单因素方差分析法进行检验,组间差异的两两比较采用 Dunnett-t 法,方差不齐时采用变量转换,转换后方差仍不齐采用非参数检验,以

$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 夏枯草对人甲状腺癌 K1 细胞生长的影响

2.1.1 不同浓度夏枯草对人甲状腺癌 K1 细胞增殖的影响

由表 1 和图 1 可见,夏枯草作用 24 h,随着其浓度的增加,K1

细胞的增殖率逐渐降低。自 2 mg/mL 夏枯草浓度起,细胞增殖率与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$),其中 80 mg/mL 的夏枯草抑制 K1 细胞增殖作用最强,夏枯草对 K1 细胞 24 h 半数抑制浓度(IC_{50})为 2.427 mg/mL。结果提示 2~200 mg/mL 的夏枯草作用 24 h 能够明显抑制 K1 细胞增殖。

表 1 不同浓度夏枯草作用 24 h 对人甲状腺癌 K1 细胞增殖率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of different concentrations of PV on the cell proliferation rate of K1 cells for 24 h ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

PV concentration (mg/mL)	OD	Cell proliferation rate (%)
0	0.9951 $\pm$ 0.0980	100.00 $\pm$ 0.00
2	0.6505 $\pm$ 0.0170	69.72 $\pm$ 1.82*
5	0.3556 $\pm$ 0.0487*	38.11 $\pm$ 5.22*
10	0.1068 $\pm$ 0.0067*	11.44 $\pm$ 0.72*
20	0.0807 $\pm$ 0.0054*	8.65 $\pm$ 0.58*
40	0.0801 $\pm$ 0.0054*	8.58 $\pm$ 0.58*
80	0.0788 $\pm$ 0.0051*	8.34 $\pm$ 0.55*
160	0.1014 $\pm$ 0.0061*	10.87 $\pm$ 0.66*
200	0.1409 $\pm$ 0.0069*	15.10 $\pm$ 0.74*

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$.

2.1.2 不同浓度夏枯草对人甲状腺癌 K1 细胞形态的影响
正常 K1 细胞呈卵圆形,贴壁能力强。由图 2 可见,与对照组相比,随着夏枯草浓度的升高,细胞贴壁数目逐渐减少。0.3~0.6 mg/mL 夏枯草对 K1 细胞形态无明显影响;1.2 mg/mL 夏枯草处理组 K1 细胞减少;自 2.4 mg/mL 夏枯草浓度起,细胞贴壁数

目明显减少,细胞变圆,出泡,胞质密度不均;4.8 mg/mL 夏枯草作用下,细胞变圆、脱落,绝大部分细胞破裂。结果提示:2.4 mg/mL 和 4.8 mg/mL 夏枯草作用 24 h 可引起 K1 细胞存活数量明显减少,细胞形态学改变。

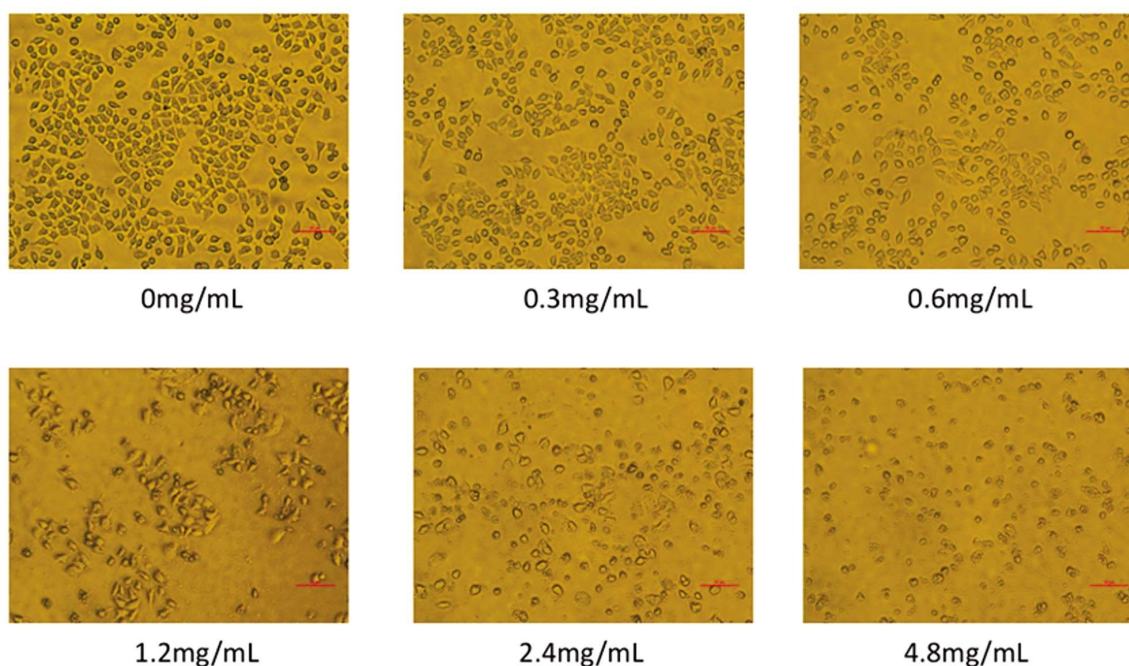


图 2 不同浓度夏枯草作用 24 h 对 K1 细胞形态的影响(100 $\times$)

Fig.2 Effect of PV on cell morphology in K1 within 24 h(100 $\times$)

2.2 夏枯草对人甲状腺癌 K1 细胞凋亡的影响

2.2.1 Hoechst 染色法检测细胞凋亡
Hoechst 染色结果(图 3)显示,夏枯草作用 24 h,0.3、0.6、1.2 mg/mL 对 K1 细胞凋亡无

明显影响;2.4 和 4.8 mg/mL 夏枯草作用下,致密浓染亮蓝色细胞增加,发生核固缩现象的凋亡细胞增多,表明随着夏枯草浓度的增加,K1 细胞凋亡数目增多。

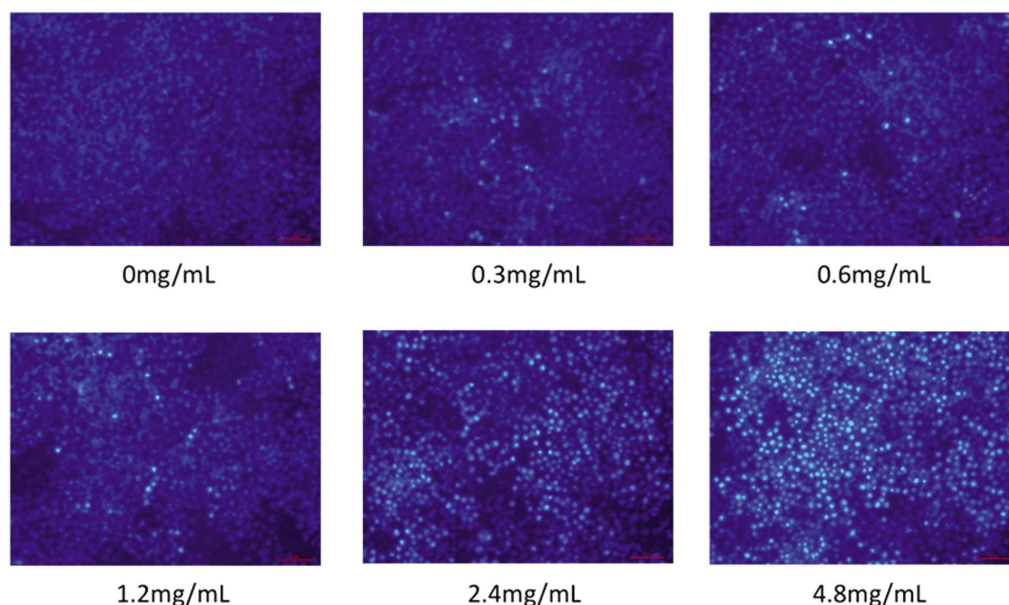


图3 夏枯草作用 24 h 对 K1 细胞凋亡的影响(Hoechst 染色, 40×)

Fig.3 Effect of different concentrations of PV on the cell morphology in K1 within 24 h(Hoechst staining, 40×)

2.2.2 流式细胞术检测细胞凋亡率 由表 2 可见,随着夏枯草浓度的增高,K1 细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率、总凋亡率也逐渐升高,其中 2.4 和 4.8 mg/mL 的夏枯草作用 24 h K1 细胞的凋亡率与对照组相比显著增加,差异具有统计学意义($P<0.05$),且早期凋亡率升高尤为明显。以夏枯草浓度对细胞总凋亡率进行线性回归分析,回归方程为 $Y=-2.120+9.086X$, $R^2=0.893$ 。图 4 可见,当夏枯草浓度增加到 2.4 mg/mL 时,Q3(存活)区域内细胞明显减少,Q4(早期凋亡)区域内细胞明显增多,提示早期凋亡细胞明显增多。

表 2 不同浓度夏枯草作用 24 h 对 K1 细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of different concentrations of PV on the cell apoptosis rate of K1 for 24 h($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

PV concentration (mg/mL)	Cell survival rate(%)	Cell early apoptosis rate(%)	Cell end stage apoptosis rate (%)	Cell apoptosis rate(%)
0	97.63± 0.23	1.30± 0.09	0.47± 0.13	1.77± 0.13
0.3	97.47± 0.32	1.40± 0.17	0.30± 0.10	1.70± 0.10
0.6	96.50± 0.56	1.93± 0.31	0.30± 0.10	2.23± 0.25
1.2	97.87± 0.35	1.13± 0.23	0.33± 0.15	1.47± 0.38
2.4	87.75± 1.20*	9.70± 0.14*	1.65± 1.06*	11.35± 0.92*
4.8	55.03± 2.97*	43.63± 2.97*	0.93± 0.12*	44.57± 3.07*

Note: Compared with the control group, * $P<0.05$.

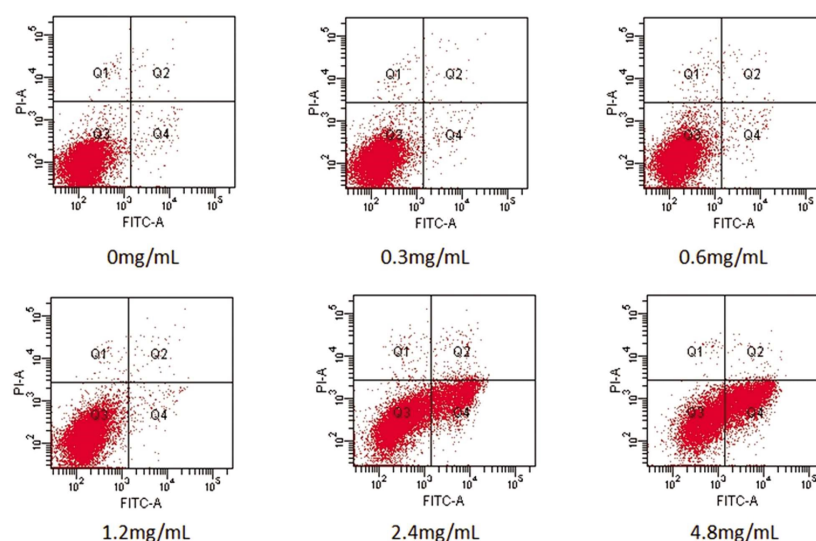


图 4 不同浓度夏枯草作用 24 h 对 K1 细胞凋亡的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of PV on the cell apoptosis rate of K1 for 24 h

2.3 夏枯草对人甲状腺癌 K1 细胞凋亡蛋白表达的影响

由图 5 和图 6 可见,与对照组相比,不同浓度夏枯草处理组抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平减少,凋亡蛋白 Bax 表达增多,线粒体毒性损伤分子 Cyto C 和 Caspase-9 表达明显增多;凋亡启动蛋白 Caspase-3 在夏枯草作用下表达水平减少,但活化的 Caspase-3(Cleaved Caspase-3)蛋白表达水平增加。

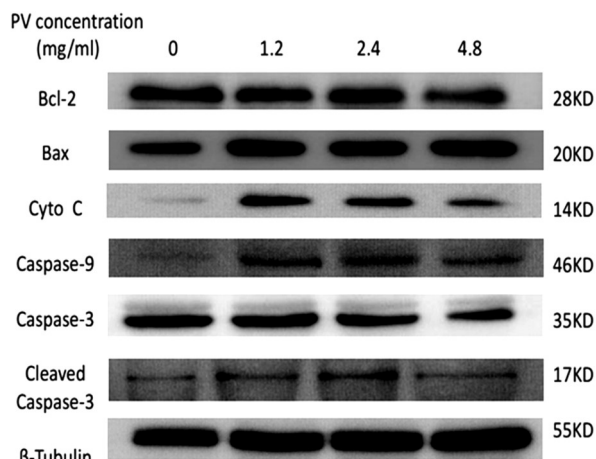


图 5 不同浓度夏枯草作用 24 h 对 K1 细胞凋亡蛋白表达的影响
Fig.5 Effect of different concentrations of PV on the expressions of cell apoptosis related proteins in K1 cells for 24 h

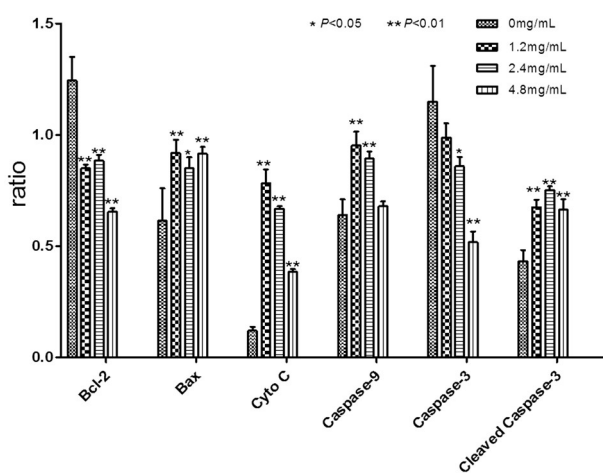


图 6 不同浓度夏枯草作用 24 h 对 K1 细胞凋亡蛋白表达的影响
Fig.6 Effect of different concentrations of PV on the expressions of cell apoptosis related proteins in K1 cells for 24 h

3 讨论

本研究采用 MTT 法观察了 2~200 mg/mL 夏枯草对体外培养的人甲状腺乳头状癌细胞 K1 的生长影响。实验结果显示 2~200 mg/mL 夏枯草作用 24 h 对 K1 细胞增殖具有明显的抑制作用,其中 80 mg/mL 的夏枯草对 K1 细胞的抑制作用最显著,夏枯草作用 24 h 对 K1 细胞的 IC_{50} 为 2.427 mg/mL,低于夏枯草作用 24 h 对正常甲状腺滤泡上皮细胞 HUM-CELL-0097 的 IC_{50} 值 12.908 mg/mL (本实验室结果) 和甲状腺鳞癌细胞 SW579(IC_{50} 为 65 mg/mL)^[10],提示夏枯草在对 K1 细胞有明确抑制作用的浓度下,对人正常甲状腺滤泡上皮细胞的生长无明显影响,且对甲状腺肿瘤中发生率最高的乳头状癌细胞有较好的靶向性,表明夏枯草具有抗甲状腺肿瘤药物开发的潜力。

研究表明夏枯草对多种肿瘤细胞有明显抑制作用^[11],而诱导肿瘤细胞凋亡被认为是夏枯草抗肿瘤作用最重要的机制之一^[12-15]。郑学芝等用不同浓度夏枯草作用于人食管癌 Eca-109 细胞 48 h,流式细胞术检测细胞凋亡率发现夏枯草提取物能促进 Eca-109 细胞凋亡^[16];张可杰等采用流式细胞仪 PI 染色法观察夏枯草注射液作用 48 h 对人红白血病 K562 细胞的促凋亡活性,发现夏枯草可通过诱导 K562 细胞凋亡明显抑制细胞增殖^[17];Tan JA 等发现夏枯草提取物能诱导胃癌细胞 SGC 7901 凋亡^[18];还有研究表明夏枯草及其提取物对非小细胞型肺癌、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、宫颈癌细胞有诱导凋亡的作用^[19-23]。本研究 Hoechst 染色观察到,随着夏枯草浓度的升高,致密浓染亮蓝色的细胞增多,说明 K1 细胞出现凋亡且随着夏枯草浓度升高凋亡细胞增多;流式细胞术检测结果显示夏枯草的促凋亡作用随浓度的增加而增强,2.4 和 4.8 mg/mL 夏枯草能明显诱导 K1 细胞凋亡,说明夏枯草可以通过诱导细胞凋亡来抑制 K1 细胞的生长,发挥其抗甲状腺肿瘤的作用。

细胞凋亡主要存在三条通路:线粒体通路、死亡受体通路和内质网通路,三条通路密切相关。线粒体(Mitochondrion)作为细胞的 "power house",其参与的线粒体通路是细胞凋亡的研究热点。线粒体通路始于凋亡信号刺激 Bax 蛋白移位到线粒体外膜刺激线粒体释放 Cyto C,Cyto C 与凋亡相关因子结合,形成多聚体并与 Caspase-9 结合形成凋亡小体,被激活的 Caspase-9 则继续激活其它的 Caspase 蛋白酶如 Caspase-3,诱导细胞凋亡^[24]。Bcl-2 和 Bax 主要存在于胞浆和细胞内膜上,Bax 是公认的促凋亡蛋白,Bcl-2 是抗凋亡蛋白,在正常细胞中,Bcl-2 能阻止 Bax 易位到线粒体而阻止线粒体外膜的透化。Bcl-2/Bax 影响着细胞对凋亡刺激因子的敏感性和抵抗性。线粒体毒性损伤分子 Cyto C 存在于线粒体内膜和外膜之间的腔中,当线粒体收到凋亡信号的刺激就会将其释放至胞浆内^[25],胞浆中的 Cyto C 会结合复合体并与 Caspase-9 蛋白聚合成凋亡小体,Caspase-3 是最重要的凋亡启动蛋白,细胞内一旦确定会发生凋亡,Caspase-3 原蛋白就会被剪切成活化的 Caspase-3。本研究 Western Blotting 实验发现夏枯草处理组 K1 细胞胞浆内 Bax、Cyto C、Caspase-9、活化的 Caspase-3 蛋白表达与对照组相比增多,Bcl-2 蛋白表达水平减少,Bcl-2/Bax 比值降低。结果表明夏枯草作用 K1 细胞 24 h 因 Bcl-2/Bax 比值降低导致线粒体膜的通透性增加,Cyto C 从线粒体释放,与下游凋亡蛋白聚合形成凋亡小体,引起 Caspase-9、活化的 Caspase-3 蛋白表达增加。

综上所述,夏枯草能抑制人甲状腺癌 K1 细胞增殖并诱导其凋亡,其机制可能与活化线粒体凋亡通路有关。

参考文献(References)

- [1] Ru M, An YY, Wang KR, et al. *Prunella vulgaris* L. hairy roots: Culture, growth, and elicitation by ethephon and salicylic acid [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2016, 16(5): 494-502
- [2] Chen Lie, Zhou Qian. Modern research progress about selfheal [J]. *Strait Pharmaceutical Journal*, 2015, 27(12): 9-12
- [3] Li Shi-zhen. *Bencao Gangmu* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1979: 9571
- [4] Sun Xing-yan. *Shennong BencaoJing* [M]. Beijing: Scientific and Technical Documentation Press, 1999: 68

- [5] Dou Jing-yun, Yu Jun-sheng. *Prunella vulgaris* L. Pharmacological Action and Clinical Application Research Progress [J]. Journal of Modern Medicine & Health, 2013, 07: 1039-1041
- [6] Liu Jing-ru. Impact of Selfheal Capsule on autoantibodies and T helper 17 cells in patients with Hashimoto's thyroditis [D]. Jilin University, 2012
- [7] Wang Zhen-qian, Shen Wen-wen, Jiang Xiao, et al. Application of Xiakucao Oral Liquid in the Treatment of Cystic Thyroid Disease[J]. Chinese Medicine Modern Distance Education of China, 2016, 14 (20): 58-59
- [8] Jiang De-you, Qu Xiao-xue. Treatment of Goiter with Chinese Medicine [J]. Henan Traditional Chinese Medicine, 2016, 36 (7): 1237-1239
- [9] Zhang Jing, Wang Ying, Zhan Hua-dong, et al. Effects of Traditional Chinese Medicine *Prunella Vulgaris* on Proliferation Cycle and Apoptosis of Human Thyroid Cancer Cell Line SW579 [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(23): 4434-4436
- [10] Du Hong-dao, Fu Qiang, Wang Qiang-wei, et al. Traditional chinese medicine *Prunella vulgaris* can accelerate the apoptosis of human thyroid cancer cell line SW 579 in vitro [J]. Modern Oncology, 2009, 17 (2): 212-214
- [11] Liu ZZ, Chen SY, Cai J, et al. Traditional Chinese Medicine syndrome-related herbal prescriptions in treatment of malignant tumors [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2013, 01:19-26
- [12] Yan Dong, Xie Wen-jian, Li Chun, et al. Chemical Components from *Prunellae Spica* and Their Anti-tumor Activities in Vitro [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2016, 11: 49-54
- [13] Wu Yuan-zhao, Zeng Yong, Zheng Ke-si, et al. Apoptotic Effect of the Extract of *Xiakucao* Oral Solution on Estrogen Receptor-positive Human Breast Cancer Cells [J]. Acta Universitatis Traditionis Medicinalis Sinensis Pharmacologiaeque Shanghai, 2016, 30(2): 78-81
- [14] Jiang Qiong, Xia song-bo, Mei Tong-he, et al. Inhibitory effects and mechanism of *Ajuga Decumbens* Thunb extracts on proliferation of liver carcinoma cells[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2016, 36(20): 1770-1773
- [15] Ma Yao-zhen, Sun Zhen-chang, Fu Xiao-rui, et al. Effects of Selfheal Extract on Jurkat Cell Apoptosis[J]. Journal of Basic and Clinical Oncology, 2016, 29(2): 106-109
- [16] Zheng Xue-zhi, Zheng Xue-hai, Li Jia, et al. Effects of *Prunella vulgaris* on Proliferation and Apoptosis in Esophageal Cancer Eca-109 Cells[J]. Food and Nutrition in China, 2012, 18(11): 74-76
- [17] Zhang Ke-jie, Zhang Ming-zhi, Wang Qing-duan. Inductive effect of *Prunella vulgaris* Injection on K562 cells apoptosis[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2005, 36(7): 1031-1035
- [18] Tan JA, Qi HZ, Ni JD. Extracts of endophytic fungus xkc-s03 from *Prunella vulgaris* L. spica inhibit gastric cancer in vitro and in vivo[J]. Oncology Letters, 2015, 9(2): 945-949
- [19] Fang Yi, Zhang Ling, Lin Wei, et al. *Prunella vulgaris* L. induced apoptosis of colon cancer cells HCT-8[J]. Journal of Fujian University of TCM, 2014, 3(03): 46-48
- [20] Song Wei. Apoptotic influence and Mechanism Research of Injection of *Prunella Vulgaris* on Pancreatic Cancer Cells PANC-1 [D]. Shanxi medical university, 2012
- [21] Weng Jin-yue, Zheng Liang-pu, Zhang Chun-chun. Experimental observation of *Prunella vulgaris* L. on human colon cancer cell apoptosis [J]. Zhejiang Journal of Traditional Chinese Medicine, 2014, 10: 772-774
- [22] Bai Yu-Bing, Li Chun, Zhou Ya-min, et al. Chemical constituents of triterpenoids from *Prunella vulgaris* and their antitumor activities[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2015, 46(24): 3623-3629
- [23] Fan Peng-ying. Apoptotic effect of extract from *Prunella vulgaris* on human papilloma virus positive cervical cancer cells[J]. Drug Evaluation Research, 2016, 39(3): 388-393
- [24] Brenner C, Kroemer G. Mitochondria-the Death Signal Integrators[J]. Science, 2000, 289(5482): 1150-1151
- [25] Zou Xun-feng, Yan Ye-hong. Study Progress of Mitochondria or Cytochrome C-mediated Apoptosis Pathway [J]. Medical Recapitulate, 2007, 01: 16-19

(上接第 2430 页)

- [19] 邱丽双,王德华,高阳. Maspin 和 Caspase-3 在宫颈癌中的表达及相关性[J]. 天津医科大学学报, 2009, 15(1): 77-80
Di Li-shuang, Wang De-hua, Gao Yang. The expression and correlation of Maspin and Caspase-3 in cervical carcinoma [J]. Journal of Tianjin Medical University, 2009, 15(1): 77-80
- [20] Wong B, Arron J, Choi Y. T cell receptor signals enhance susceptibility to fas-mediated apoptosis [J]. J Exp Med, 1997. 186 (11): 1939-1944
- [21] Cheng C H, Cheng Y P, Chang I L, et al. Dodecyl gallate induces apoptosis by upregulating the caspase-dependent apoptotic pathway and inhibiting the expression of anti-apoptotic bcl-2 family proteins in human osteosarcoma cells[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(2): 1495-1500
- [22] Cunha K S, Caruso A C, Faria P A, et al. Evaluation of bcl-2, bcl-x and cleaved caspase-3 in malignant peripheral nerve sheath tumors and neurofibromas[J]. An Acad Bras Cienc, 2013, 85(4): 1497-1511
- [23] Krystyna G, Marcin O, Wiesława W, et al. The immunohistochemical analysis of antigens such as RCAS1 and B7-H4 in the cervical cancer nest and within the fibroblasts and macrophages infiltrating the cancer microenvironment[J]. Am J Reprod Immunol, 2012, 68(1): 85-93