

# 光甘草定诱导小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞凋亡的机制研究

高彩霞<sup>1</sup>, 王艳明<sup>2</sup>, 李德芳<sup>1</sup>, 唐晓峰<sup>3</sup>, 郑秋生<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>滨州医学院中西医结合学院, 烟台 264003; <sup>2</sup> 博州人民医院药剂科, 新疆 833400; <sup>3</sup> 烟台大学生命科学学院, 烟台 264003

**摘要:**通过体外和体内模型研究光甘草定对小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞增殖的抑制作用及其分子机制。B16F10 细胞经光甘草定处理后可抑制其增殖, 且具有浓度依赖性; 诱导 B16F10 细胞凋亡, 观察到明显的细胞凋亡状态, 细胞内凋亡相关基因及蛋白 Bax 表达显著上升, Bcl-2 则表达下调。进一步的研究发现, 经光甘草定处理后的 B16F10 细胞中, 培养基中葡萄糖含量升高, 而 ATP 含量、乳酸生成均降低; 细胞内糖酵解相关基因及蛋白 HK2、Ldha 表达下调。同时, 经光甘草定处理后, 移植瘤小鼠的肿瘤组织生长受到明显抑制, 肿瘤组织内细胞凋亡率显著升高, Bax 表达明显上升, 而 Bcl-2、HK2 和 Ldha 则表达均下调。说明, 光甘草定在一定浓度范围内抑制了小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞的增殖, 诱导细胞凋亡, 而其诱导细胞凋亡的机制可能与调控糖酵解相关基因的表达相关。

**关键词:**光甘草定; B16F10 细胞; 糖酵解; 细胞凋亡

中图分类号: R965

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.021

## Glabridin Induces Apoptosis in Melanoma B16F10 Cells by Altering Glycolysis

GAO Cai-xia<sup>1</sup>, WANG Yan-ming<sup>2</sup>, LI De-fang<sup>1</sup>, TANG Xiao-feng<sup>3</sup>, ZHENG Qiu-sheng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Binzhou Medical University, Yantai 264003, China; <sup>2</sup>Department of Pharmacy,

the people's hospital of Bozhou, Xinjiang 833400, China;

<sup>3</sup>College of Life Science, Yantai University, Yantai 264003, China

**Abstract:** To explore the molecular mechanism of glabridin-induced B16F10 cell proliferation inhibition via *in vitro* and *in vivo* model of melanoma. Glabridin induced B16F10 cell proliferation inhibition and cell apoptosis in a dose-dependent manner. The Bax mRNA and protein expressions were up-regulated and the Bcl-2 was down-regulated in glabridin-treated B16F10 cells. Further studies showed that glabridin decreased the production of ATP and lactic acid in mouse melanoma B16F10 cells. Glabridin down-regulated the mRNA and protein expressions of glycolysis-related kinase genes (Hk2 and Ldha) in B16F10 cells. In addition, the animal model of mouse melanoma indicated that glabridin treatment suppressed tumor growth and induced tumor apoptosis. Both the mRNA and protein levels of glycolysis-related kinase genes (Hk2 and Ldha) and Bcl-2 in tumor tissue were also decreased and Bax was increased in glabridin treated mice. It was concluded that glabridin inhibited the proliferation and induced apoptosis of melanoma B16F10 cells in a dose-dependent manner, and the inhibition of glycolysis played a crucial role in the induction of apoptosis in glabridin-treated B16F10 cells.

**Key words:** glabridin; B16F10 cells; glycolysis; apoptosis

恶性黑色素瘤是一种恶性程度极高的肿瘤, 常见于皮肤粘膜和色素膜, 易经血液及淋巴管广泛转移, 因治疗手段有限, 放疗、化疗、生物及传统免疫治疗效果不佳, 患者的预后差<sup>[1]</sup>。因此, 寻求高效低毒的中药单体化合物提高黑色素瘤的疗效成为当今研究的热点。

光甘草定 (Glabridin), 是从甘草中提取的多酚黄酮类化合物, 具有抗炎、抗氧化、神经保护等多种药理活性, 特别是在心脑血管及化妆品领域广泛应用。目前, 相关研究表明光甘草定有显著的抑制酶活性及体外抗氧化作用, 这一作用可通过抑制黑色素生成的限速酶——酪氨酸酶和清除自由基来实现<sup>[2]</sup>, 因此, 光甘草定对抑制黑色素的生成具有重要作用。在前期实验中, 我们发现, 光甘草定可有效的抗肿瘤转移, 且细胞毒性较低, 在肿瘤细胞的生长、转移中发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。因此, 本实验中, 我

收稿日期: 2016-11-14 接受日期: 2017-03-02

基金项目: 滨州医学院科研启动基金 (BY2014KYQD01); 国家自然科学基金 (31471338); 山东省高等学校优势学科人才团队培育计划

\* 通信作者 E-mail: zqsytt@sohu.com

们进一步深入探究光甘草定对黑色素瘤 B16F10 细胞的增殖抑制作用及其抗肿瘤的分子机制。

## 1 实验材料

### 1.1 细胞及动物

小鼠黑色素瘤细胞购自于中国典型培养物保藏中心,本实验室液氮冷冻保存。C57BL/6 小鼠购自新疆医科大学医学实验动物中心[SCXK(新)20140007]。

### 1.2 主要药品及试剂

光甘草定(成都普瑞法生物科技有限公司,纯度为 98%,货号 14022606);PRMI 1640 培养基(GIBCO 公司,货号 1458511);胰蛋白酶(美国 Sigma 公司,货号 509D043);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,货号 140710);二甲基亚砜(DMSO),磺基罗丹明 B(SRB)及 Hoechst 33258 均购自美国 Sigma 公司。Annexin V/FITC 凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,货号 20140614),ATP(货号 A095),乳酸(货号 A019-2)均为南京建成生物公司研究所产品;葡萄糖试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,货号 E1010)。RNA 提取试剂盒(上海生工生物技术有限公司,货号:13112605Y);cDNA 逆转录试剂盒(Thermo 公司,货号 00170212);实时荧光定量 SYBR Green 扩增试剂(凯杰公司,货号 148041276)。其他试剂均为市售国产分析纯。

### 1.3 仪器

CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(Thermo3131);多功能酶标仪(Thermo3001)及 PCR 扩增仪均为美国 Thermo 公司;超净工作台(ZHJH112B),上海智诚分析仪器有限公司;倒置荧光显微镜(MIC00266),德国 ZEISS 公司;倒置生物显微镜(BDS200-PH),重庆奥特光学仪器有限公司;流式细胞仪,美国 BD 公司;BMJ-1 型石蜡包埋机,天津爱华;Leica-RM 2235 型石蜡切片机,德国 Leica;T50 型匀浆机,德国 IKA。

## 2 实验方法

### 2.1 细胞培养

取生长状态良好 B16F10 细胞,用含 10% 的胎牛血清,青霉素(终浓度 100KU/L)及链霉素(终浓度 100 mg/L)的 1640 培养液(pH=7.5),在 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中培养,取对数生长期细胞进行各项实验。

### 2.2 SRB 法测定细胞增殖抑制率

取对数生长期的 B16F10 细胞,计数后制成细胞悬液,按  $1 \times 10^5$  个/孔细胞接种于 96 孔板中,每孔 100  $\mu$ L,培养过夜,分别加入 0、20、40、60、80 和 100  $\mu$ mol/L 的光甘草定继续培养 24 h,每孔加入 50% (质量/体积) 的三氯乙酸(TCA)50  $\mu$ L 固定细胞。4 °C 放置 1h 后,去离子水洗涤 5 遍。待孔板干燥后,加 0.4% 的 SRB 染液 100  $\mu$ L/孔,室温静置 20 min,弃染液,1% 乙酸洗涤 5 遍。空气中干燥后每孔加二甲基亚砜(DMSO)150  $\mu$ L,平板振荡器上振荡 5 min,Thermo3001 多功能酶标仪 490 nm 测量各孔的吸光值,计算抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组 OD 值} - \text{给药组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$$

### 2.3 Hoechst33258 荧光法观察细胞形态

取对数生长期细胞消化后制成细胞悬液,按每孔  $1 \times 10^5$  个置于盛有盖玻片的 6 孔板中,每孔加细胞悬液 2 mL,24 h 后,加入光甘草定(0、25、50 和 75  $\mu$ mol/L)孵育 24 h,弃培养液,PBS 洗两遍,每孔加入 1 mL 固定液(甲醇和冰醋酸按 3:1 配制),15 min 后,去除固定液,PBS 清洗两遍,将盖玻片放于载玻片之上,荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。

### 2.4 流式细胞技术检测细胞凋亡率

取对数生长期细胞消化制成细胞悬液,按  $1 \times 10^5$  个置于细胞培养瓶内,每瓶加细胞悬液 3 mL,待细胞贴壁状态良好时,加入不同浓度的光甘草定(0、25、50 和 75  $\mu$ mol/L),孵育 24 h 后收集细胞,用冰冷的 PBS 清洗 1 遍,置 0 °C 水浴中,加 500  $\mu$ L Binding Buffer 悬浮细胞,再加入 5  $\mu$ L AnnexinV 和 5  $\mu$ L PI,轻轻混匀细胞,10 min 后流式细胞仪检测。

### 2.5 光甘草定对细胞葡萄糖摄入的影响

取对数生长期的细胞,按  $1.5 \times 10^5$  个置于培养瓶内,待细胞贴壁状态良好时,加入光甘草定,使其终浓度分别为 0、25、50 和 75  $\mu$ mol/L,放入细胞培养箱中培养 24 h 后,胰蛋白酶消化细胞,离心,收集上清备用。按照北京利普莱基因技术有限公司试剂盒所示的说明书进行操作。

葡萄糖浓度(mmol/L) =

$$\frac{\text{测定 OD 值} - \text{空白 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times \text{标准品浓度}$$

### 2.6 光甘草定对 B16F10 细胞内 ATP 水平的影响

取对数生长期的细胞,蛋白酶消化后,收集细胞,按南京建成生物工程研究所 ATP 试剂盒所示的

说明书进行操作。

ATP 浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) = (测定 OD 值-空白 OD 值) / (标准 OD 值-空白 OD 值)  $\times$  标准品浓度  $\times$  样本稀释倍数  $\div$  待测样本蛋白浓度

## 2.7 光甘草定对细胞培养液中乳酸含量的影响

细胞处理方法同前,按照南京建成生物工程研究所乳酸试剂盒所示的说明书进行操作。

乳酸浓度 ( $\text{mmol/L}$ ) =  $\frac{\text{测定 OD 值}-\text{空白 OD 值}}{\text{标准 OD 值}-\text{空白 OD 值}} \times$   
标准品浓度  $\times$  样品稀释浓度

表 1 PCR 引物序列表

Table 1 PCR primer sequence table

mRNA	前引物 Forward primer	后引物 Reverse primer
Bax	5'-TGCTTCAGGGTTTCATCCAG-3'	5'-TGCTTCAGGGTTTCATCCAG-3'
Bcl-2	5'-GGAAATATGGCGCACGCT-3'	5'-TCACTTGTGGCCCA-3'
HK2	5'-CCTCAGCTGGTGAGCCATC-3'	5'-ACTGGTCAACCTTCTGCACT-3'
LDHA	5'-CTGTGTGGAGTGTGTAATGT-3'	5'-GCCCAGGATGTGTAACCTTTC-3'

## 2.9 Western blot 法检测凋亡相关基因 Bax、Bcl-2 及糖酵解相关基因 HK2、Ldha 的蛋白表达

将蛋白样品加入  $5 \times$  上样缓冲液后煮沸变性,每孔加入  $40 \mu\text{g}$  蛋白,  $70 \text{ V}$  恒压电泳至溴酚蓝指示剂至分离胶浓缩胶分界处,转为  $100 \text{ V}$  恒压电泳至指示剂接近凝胶的底部。将电泳完毕的凝胶按照从正极到负极依次为海绵垫-滤纸-膜-凝胶-滤纸-海绵垫的顺序夹好,  $250 \text{ mA}$  恒流转膜,冰浴,转膜时间  $1 \text{ h}$ 。用含  $5\%$  BSA 的 TBST 室温封闭  $1 \text{ h}$  后,分别加  $1:2000$  稀释的兔抗鼠 GAPDH,  $1:500$  稀释的兔抗鼠 BAX、BCL-2、HK2 和 Ldha,在室温下孵育  $1 \sim 2 \text{ h}$  或  $4^\circ\text{C}$  过夜,缓慢摇动。  $15 \text{ mL}$  TBS/T 洗 3 次 ( $5 \text{ min/T}$ );加入合适稀释度的碱性磷酸酶 (AP) 或辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗,室温孵育  $1 \text{ h}$ ,缓慢摇动。  $15 \text{ mL}$  TBS/T 洗 3 次 ( $5 \text{ min/T}$ )。采用 ECL 化学发光底物显色, UVP 化学发光成像系统获取图像信息。

## 2.10 C57BL/6 小鼠模型的建立

B16F10 细胞培养至对数生长期,胰蛋白酶消化后,生理盐水调整细胞浓度为  $2 \times 10^6/\text{mL}$  备用。小鼠腹部皮肤常规消毒后,于左侧上腹部皮下注入细胞悬液  $100 \mu\text{L}$ ,观察肿瘤形成情况。接种一周后,将小鼠随机分为 2 组,每组 10 只。实验组小鼠每天通过灌胃法给予  $100 \mu\text{L}$  光甘草定溶液,给药的剂量为  $20 \text{ mg/kg}$ ,对照组给予相同体积的生理盐水,两

## 2.8 PCR 检测凋亡相关基因 Bax, Bcl-2 及糖酵解相关基因 HK2 的 mRNA 表达

小鼠剥离肿瘤组织匀浆后,离心,并取上层组织液备用。根据试剂盒说明书操作,先提取总 RNA,定量后进行逆转录反应,PCR 扩增仪进行扩增反应。扩增条件: $95^\circ\text{C}$  预变性  $5 \text{ min}$ ,  $95^\circ\text{C}$  预变性  $10 \text{ s}$ ,  $60^\circ\text{C}$  退火和延伸  $30 \text{ s}$ ,不同引物选择不同温度退火,退火  $40 \text{ s}$ ,循环数为  $50 \sim 60$  次,最后得 PCR 产物并分析数据。PCR 引物序列见表 1。

周后处死小鼠,剥离肿瘤,称量肿瘤重量。

## 2.11 凋亡细胞原位末端标记法 (TUNEL 染色法)

剥离后的肿瘤组织用  $4\%$  的多聚甲醛固定  $12 \text{ h}$ ,石蜡包埋,切片,参考原位细胞凋亡检测试剂盒操作。封片后,荧光显微镜下分析样本。

## 2.12 数据统计分析

所有细胞实验均设 3 个平行孔并重复 3 次,结果以平均值  $\pm$  标准差来表示,以  $t$  检验进行组间比较。 $P < 0.05$  差异具有统计学意义, $P < 0.01$  为差异具有显著性差异。

## 3 实验结果

### 3.1 光甘草定抑制了 B16F10 细胞增殖

实验通过 SRB 法检测光甘草定对 B16F10 细胞增殖抑制作用,从图 1 中可以看出,细胞的抑制率随着给药浓度 ( $20$ 、 $40$ 、 $60$ 、 $80$  和  $100 \mu\text{mol/L}$ ) 的增加而升高,  $\text{IC}_{50}$  浓度为  $48 \mu\text{mol/L}$ ,因此,我们选取  $25$ 、 $50$  和  $75 \mu\text{mol/L}$  作为实验浓度。为了进一步证实光甘草定对 B16F10 细胞的促凋亡作用,我们通过 Hoechst 染色和流式细胞技术进行了验证。在图 2A 中,经 Hoechst 染色后,对照组细胞染色均匀,细胞大而饱满,染色均匀;而在光甘草定处理后的细胞中,可见浓染致密的颗粒荧光,细胞变小,染色质浓缩,形成染色质边集,细胞核皱缩、碎裂,且随着药物浓度的增加,凋亡特征更加明显。而在图 2B 中,我

们通过 AnnexinV/PI 双染法检测凋亡细胞,与对照组( $2.30 \pm 1.63$ )% 相比,25、50 和 75  $\mu\text{mol/L}$  的总凋亡率分别为:( $32.25 \pm 2.72$ )%、( $43.58 \pm 2.94$ )%、( $54.61 \pm 2.85$ )%,上述实验结果与荧光显微镜下观察相一致,与对照组相比具有显著性差异( $P < 0.01$ )(图 2C)。

### 3.2 光甘草定通过抑制糖酵解相关 ATP、乳酸的生成和葡萄糖的摄取,诱导 B16F10 细胞凋亡

ATP 和乳酸是糖酵解过程的主要产物,而葡萄糖则是肿瘤细胞进行糖酵解的主要原料。因此我们

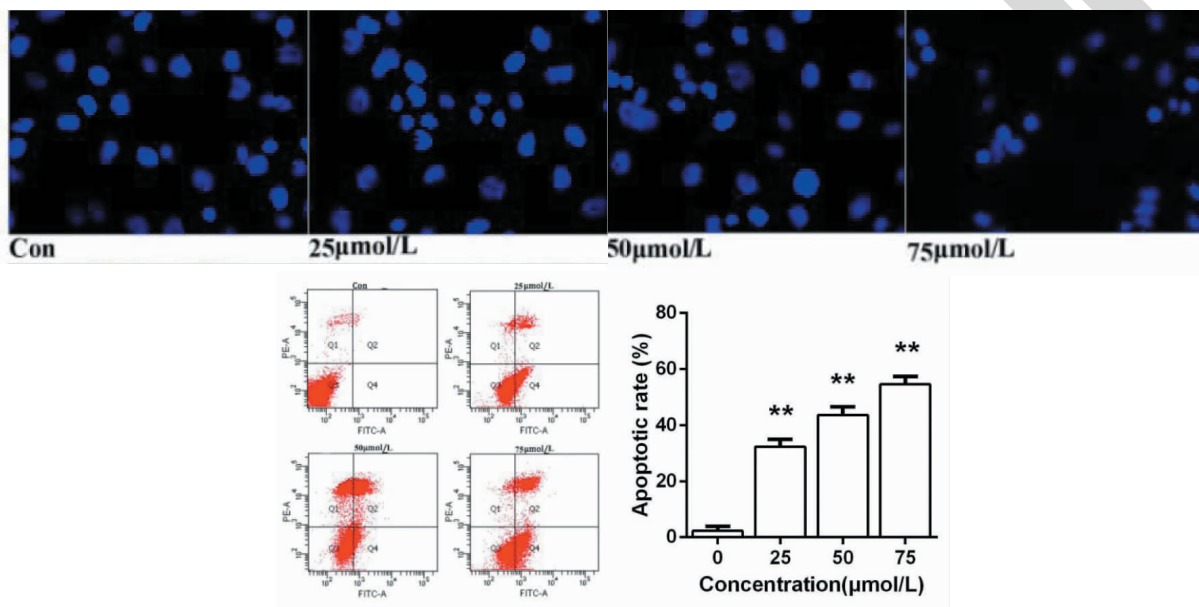


图 2 (A)Hoechst 染色法观察光甘草定对 B16F10 细胞凋亡形态影响、(B)流式细胞技术检测细胞凋亡及(C)光甘草定对 B16F10 细胞凋亡率的影响

Fig. 2 (A)Morphologic measurements in B16F10 cells carried out via Hoechst fluorescence staining;(B) Evaluation of apoptosis in B16F10 cell by FACS analysis and(C) the apoptotic rates of B16F10 cells after glabridin treatment.

Note: Data was represented in three separate experiments, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group.

检测了细胞中 ATP 和培养液中乳酸及葡萄糖的含量,以探讨光甘草定是否通过调控糖酵解来诱导凋亡。结果发现,经光甘草定(25、50 和 75  $\mu\text{mol/L}$ )处理 B16F10 细胞 24 h 后,其细胞中 ATP 的含量明显降低,且呈浓度依赖性(图 3A),并可降低细胞培养基中乳酸的水平(图 3B),而培养基中葡萄糖的摄入量随着药物浓度的增加而降低(图 3C)。在上述实验中,当给药浓度为 50 或 75  $\mu\text{mol/L}$  时,与对照组相比,实验结果差异具有显著性( $P < 0.01$ )。

### 3.3 光甘草定通过抑制糖酵解相关基因及蛋白的表达诱导 B16F10 细胞凋亡

HK 及 Ldha 作为糖酵解过程中的限速酶,在糖

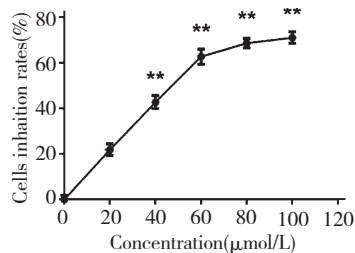


图 1 光甘草定对 B16F10 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect of glabridin B16F10 cell inhibition rate

Note: Data represent three separate experiments, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group.

酵解过程中发挥着重要作用,因此,抑制其表达可以降低肿瘤细胞的糖酵解速率。B16F10 细胞随着给药浓度的增加,HK2、Ldha 的 mRNA(图 4A)及蛋白表达(图 4C)均下降。促凋亡基因 Bax 随着给药浓度的增加,其基因及蛋白表达逐渐上升,而 Bcl-2 作为抗凋亡基因,其 mRNA 的表达则随着给药浓度的增大而逐渐下降(图 4B、C)。

### 3.4 光甘草定抑制 C57BL/6 荷瘤小鼠肿瘤生长

小鼠处死后,剥离肿瘤,称重并拍照。图 5A 中,对照组平均瘤重为( $4.5 \pm 0.29$ )g,光甘草定组为( $2.46 \pm 0.43$ )g,差异具有统计学意义,表明光甘草定可以明显抑制体内肿瘤生长。为了明确光甘草

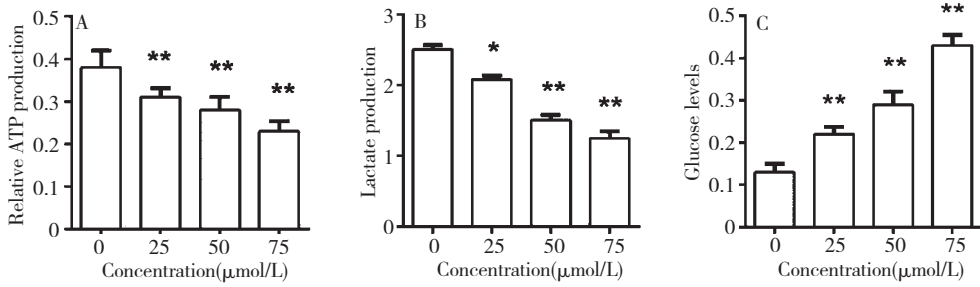


图3 光甘草定对 B16F10 细胞葡萄糖摄取量 (A)、B16F10 细胞内 ATP 生成 (B) 及细胞培养液中乳酸生成 (C) 的影响

Fig. 3 The effect of glabridin on glucose level (A), intracellular ATP production (B) and lactic acid content (C) in B16F10 cells

Note: Data was represented in three separate experiments, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group.

定对肿瘤组织细胞凋亡的影响,采用 TUNEL 染色法观察对凋亡影响。如图 5B 所示,对照组组织中几

乎无 TUNEL 阳性细胞,而光甘草定组则出现大量浓染的 TUNEL 阳性细胞。

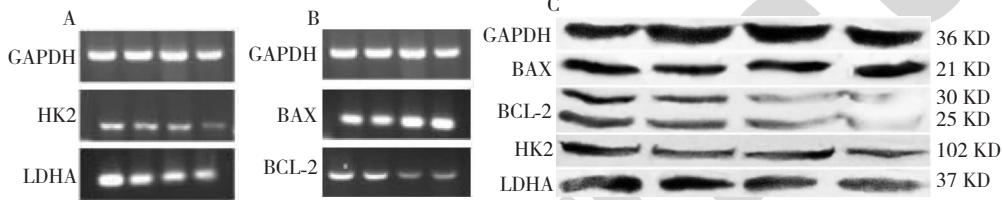


图4 光甘草定影响 B16F10 细胞凋亡及糖酵解相关基因的表达: (A) PCR 检测光甘草定对 B16F10 细胞凋亡相关基因 BAX 及 BCL-2 的表达; (B) PCR 检测光甘草定对 B16F10 细胞糖酵解相关基因 HK2 及 Ldha 的表达; (C) Western blot 检测光甘草定对 B16F10 细胞凋亡及糖酵解相关蛋白 BAX、BCL-2、HK2 及 Ldha 的表达

Fig. 4 Effects of glabridin on the mRNA expression of apoptosis-related and glycolysis-related genes in B16F10 cells. (A) The mRNA expression levels of Bax and Bcl-2 analyzed by PCR; (B) The mRNA expression levels of glycolysis-related genes HK2 and Ldha in B16F10 cells treated with different concentrations of glabridin; (C) The protein expression levels of Bax, Bcl-2, HK2 and Ldha analyzed by Western blot.

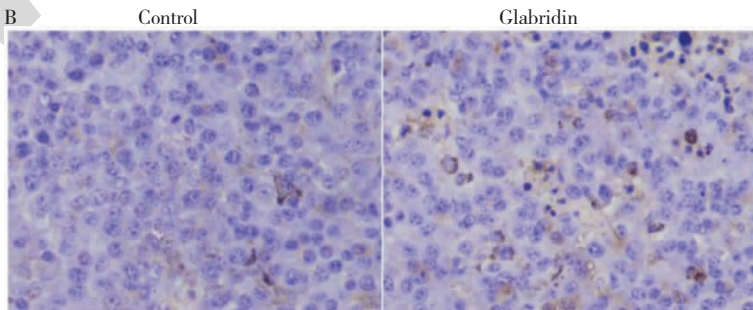
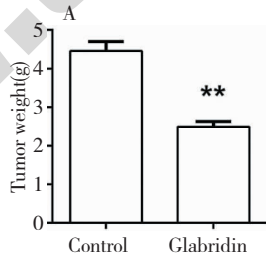


图5 光甘草定抑制 C57 小鼠黑色素瘤的生长 (A) 及 TUNEL 染色法标记肿瘤组织凋亡细胞 (B)

Fig. 5 The values of tumor weight showing the inhibition effect of glabridin on tumor growth and (B) cell apoptosis analyzed using TUNEL staining in tumor tissues

Note: Data was represented in three separate experiments, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group.



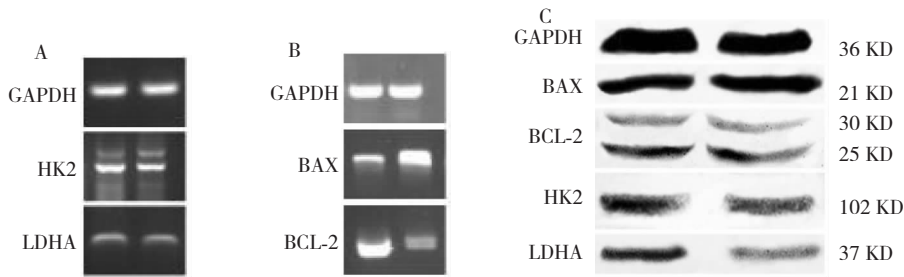


图6 光甘草定影响肿瘤组织凋亡及糖酵解相关基因的表达:(A)PCR检测光甘草定对肿瘤组织内凋亡相关基因BAX及BCL-2的表达;(B)PCR检测光甘草定对肿瘤组织内糖酵解相关基因HK2及Ldha A的表达;(C)Western blot检测光甘草定对B16F10细胞凋亡及糖酵解相关蛋白BAX、BCL-2、HK2及Ldha的表达

Fig. 6 Effects of glabridin on the mRNA expression of apoptosis-related and glycolysis-related genes in tumor tissues. (A) The mRNA expression levels of glycolysis-related genes examined by PCR in tumor tissues; (B) The mRNA expression levels of apoptosis-related genes examined by PCR in tumor tissues; (C) The protein expression levels of Bax, Bcl-2, HK2 and Ldha analyzed by Western blot

### 3.5 光甘草定可调节肿瘤组织中糖酵解相关基因及蛋白的表达并诱导细胞凋亡

为进一步探讨小鼠肿瘤组织中糖酵解基因及蛋白的表达是否与B16F10细胞相一致,我们对肿瘤组织中HK2、Ldha进行相关检测,结果提示其基因及蛋白表达均呈下降趋势(图6A、C),同时,与空白对照组相比,小鼠肿瘤组织中的Bax的基因及蛋白表达增加,而Bcl-2的表达则下降(图6B、C),这一结果与光甘草定处理后B16F10细胞内相关基因及蛋白的表达趋势一致。

## 4 讨论与结论

光甘草定是甘草提取物疏水部位的主要成分,广泛应用于镇痛、抗炎、抗过敏等方面<sup>[4]</sup>。同时,光甘草定可以通过抑制miR-200c抑制乳腺癌侵袭转移<sup>[5]</sup>,但其调控肿瘤细胞的凋亡机制目前尚不明确。在本实验中,我们首先通过Hoechst33258染色法观察细胞形态,发现随着给药浓度的增高,B16F10细胞出现了典型的核固缩破裂的凋亡特征。我们还通过流式细胞仪检测细胞凋亡情况,结果显示:光甘草定能浓度依赖性诱导B16F10细胞凋亡,其凋亡率分别为 $(32.25 \pm 2.72)\%$ 、 $(43.58 \pm 2.94)\%$ 、 $(54.61 \pm 2.85)\%$ 。进一步的体内实验也得到相同的结果,经过光甘草定给药处理后的C57BL/6荷瘤小鼠,其肿瘤生长明显减缓,抑瘤率达到了54.4%,而经光甘草定处理后的肿瘤组织,TUNEL染色中凋亡细胞的阳性率显著提高。此外,在B16F10细胞和肿瘤组织中,促凋亡相关的Baxm-

RNA及蛋白表达升高,而作为抗凋亡的Bcl-2表达则降低。因此,光甘草定可通过诱导B16F10细胞凋亡抑制了肿瘤细胞的增殖。

糖酵解是生物体内普遍存在的能量代谢形式,指机体在氧气不充分的条件下,胞外葡萄糖经葡萄糖转运体进入胞浆,经过一系列的酶促反应生成ATP和乳酸的过程<sup>[6]</sup>。肿瘤细胞依赖糖酵解获取大量能量,以满足细胞快速增殖的需求。糖酵解过程中,HK和LDH作为关键酶,在能量代谢和调节细胞增殖和凋亡方面起着重要的作用<sup>[7]</sup>。其中,HK2作为HK的亚型之一,可以结合在线粒体外膜电压依赖性阴离子通道(VDAC)上,优先利用线粒体生成ATP,同时抑制细胞内活性氧(ROS)的产生,从而促进肿瘤细胞的增殖<sup>[8,9]</sup>。因此,抑制HK2的基因表达,提高ROS的水平,使细胞内氧化压力增加,致使线粒体膜电势发生改变,损害线粒体功能<sup>[10]</sup>,从而促进凋亡基因Bax的高表达,通过线粒体途径诱导肿瘤细胞凋亡。同时,在糖代谢过程中,Ldh可以催化丙酮酸转化成乳酸,为肿瘤细胞提供弱酸性的生长环境,对促进恶性肿瘤细胞快速增殖发挥着重要的作用<sup>[11]</sup>。因此,可以通过抑制肿瘤细胞糖酵解相关基因的表达,降低葡萄糖的摄取,减少ATP的生成,最终诱导细胞凋亡。

在本实验中,我们发现,光甘草定可抑制B16F10细胞的糖酵解发生,通过对糖酵解相关葡萄糖摄取量,ATP生成及乳酸产生等进行检测,在研究浓度范围内,随着给药浓度的增加,培养基中葡萄糖的含量升高,乳酸含量降低,细胞中ATP的含量呈

下降趋势。同时,我们对糖酵解过程中关键酶 HK2 和 Ldha 的 mRNA 及蛋白水平进行了检测,结果表明在 B16F10 细胞和小鼠肿瘤组织中二者的基因及蛋白水平表达均呈浓度依赖性降低,这一结果说明光甘草定可以降低细胞对葡萄糖的摄取,减少能量的生成和乳酸堆积,使肿瘤细胞赖以生存的糖酵解途径受到抑制,从而诱导了肿瘤细胞的凋亡。

综上,本实验表明,光甘草定在抑制糖酵解途径在诱导肿瘤细胞凋亡中发挥着重要作用,可通过减少肿瘤细胞线粒体对葡萄糖的磷酸化,降低 ATP 和乳酸的生成,阻碍糖酵解关键酶 HK 及 LDHA 的表达,从而诱导凋亡产生。

### 参考文献

- 1 Guo J(郭军). Research progress in the treatment of melanoma. *Sci Technol Rev*(科技导报),2014,26:15-21.
- 2 Zhang MF(张明发),Shen Y(沈雅琴),Zhang Y(张艳霞). Dermatopharmacology and clinic application of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* and its active components. *Drug Evalu Res*(药物评价研究),2010,11:1776-1780.
- 3 Liu LL(刘亮亮),Chen J(陈姬),Zhan B(张波),*et al.* Comparison of the anti-metastasis effect of isoliquiritigenin and glabridin. *Chin J Exp Tradit Med Formul*(中国实验方剂学),2013,18:245-250.
- 4 Zhang M(张明发),Shen Y(沈雅琴). Anticancer activities of crude extracts of licorice and its flavonoids. *Drugs Clinic*

(药物与临床),2010,2:124-129.

- 5 Jen SH,Wei MP,Yin AC. The combinatory effects of glabridin and tamoxifen on ishikawa and MCF-7 cell lines. *Nat Prod Commun*,2015,10:1573-1576.
- 6 Hasanpourghadi M,Looi CY,Pandurangan AK,*et al.* Phyto-metabolite targeting warbugeffect in cancer cells; A mechanistic review. *Current Drug Targets*,2016, Accepted.
- 7 Tsuruda T,Hatakeyama K,Nagamachi S,*et al.* Inhibition of development of abdominal aortic aneurysm by glycolysis restriction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2012,32:1410-1417.
- 8 Gottlob K,Majewski N,Kennedy S,*et al.* Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev*,2001,15:1406-1418.
- 9 Courtney,R,Ngo DC,Malik N,*et al.* Cancer metabolism and the Warburg effect; the role of HIF-1 and PI3K. *Molecular Biol Reports*,2015,42:841-851.
- 10 Pantic B,Trevisan E,Citta A,*et al.* Myotonic dystrophy protein kinase(DMPK) prevents ROS-induced cell death by assembling a hexokinase II-Src complex on the mitochondrial surface. *Cell Death Dis*,2013,4:385.
- 11 ZhangX,Zhang S,Shi Y,*et al.* A new high phenyl lactic acid-yielding *Lactobacillus plantarum* IMAU10124 and a comparative analysis of lactate dehydrogenase gene. *FEMS MicrobiolLett*,2014:89-96.

(上接第 804 页)

- 9 Hao GT(郝桂堂),Chen SW(陈尚卫),Zhu S(朱松),*et al.* Analysis of monosaccharides and uronic acids in polysaccharides by pre-colmon derivatization with p-Am inobenzoic acid and high performance liquid chromatography. *Chin J Chromatogr*(色谱),2007,25(1):75-79.
- 10 Li J(李静),Li RY(李仁勇),Liang LN(梁立娜). Determination of monosaccharide constituents in *Lycium barbarum* polysaccharide using capillary ion chromatography with pulsed amperometric detection. *Chin J Anal Chem*(分析化学),2012,40:1415-1420.

- 11 Jia PY(贾鹏禹),Sun R(孙蕊),Li CY(李朝阳),*et al.* Analysis of glucose and xylose in corn straw saccharification solution by Pb-LEX-HPLC. *J Heilongjiang Bayi Agric Univ*(黑龙江八一农垦大学学报),2014,26(2):69-72.
- 12 Zhu YC(祝耀初),Hu DH(胡德骅),Zhang Q(张奇). Progress in ion chromatography analysis of sugar. *J Wuxi Instit Light Ind*(无锡轻工业学院学报),1992,11:176-183.
- 13 Shi JX(史静霞). Separation & detection of sugars in dispensing wine. *Liquor-making Sci Technol*(酿酒科技),2005,7:112-113.