

硫化氢合成酶抑制剂金丝桃素的体内外抗结肠癌作用研究

尹春丽¹, 蹇婧², 王军², 牛卫宁^{2*}

¹西安文理学院生物与环境工程学院, 西安 710065; ²西北工业大学生命学院, 西安 710072

摘要: 为研究金丝桃素对硫化氢合成酶活性的影响, 探索金丝桃素作为胱硫醚- β -合成酶(CBS)抑制剂的体内外抗结肠癌作用。本研究通过亚甲蓝法测定金丝桃素和氨基氧乙酸(AOAA)对CBS产H₂S活性的抑制作用, 以HT29人结肠癌细胞和移植HT29细胞的裸鼠肿瘤模型为抗肿瘤研究对象, 测定金丝桃素体内外抗肿瘤作用。结果表明, 来源于贯叶连翘(*Hypericum perforatum* L.)的化合物金丝桃素是CBS的高效选择性抑制剂, 其IC₅₀为7.9 ± 1.42 μmol/L。金丝桃素能显著抑制HT29人结肠癌细胞的增殖, 其IC₅₀为22.2 ± 2.25 μmol/L。基因沉默实验表明CBS蛋白可能是金丝桃素在细胞内的潜在靶标之一。意外的是, 目前普遍使用的CBS抑制剂AOAA抑制HT29细胞增殖作用非常弱, 其IC₅₀为152.5 ± 35.68 μmol/L。此外, 不同剂量的金丝桃素(5~30 mg/kg·d)均能显著减少裸鼠肿瘤体积和重量, 30 mg/kg·d剂量皮下给药2周后, 和对照组相比肿瘤重量减少了68%。以上结果表明金丝桃素作为CBS的选择性抑制剂具有显著的抗结肠癌作用。

关键词: 硫化氢合成酶; 金丝桃素; 胱硫醚- β -合成酶; 硫化氢; 抗结肠癌作用

中图分类号: R284; R931.6

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)9-1602-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.9.018

Potent *in vitro* and *in vivo* antitumor effects of hydrogen sulfide producing enzyme inhibitor hypericin in colon cancer cells

YIN Chun-li¹, QIAN Jing², WANG Jun², NIU Wei-ning^{2*}

¹School of Biological and Environmental Engineering, Xi'an University, Xi'an 710065, China;

²School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China

Abstract: To investigate the effect of hypericin on the activity of hydrogen sulfide producing enzyme and explore the antitumor effects of hypericin as a cystathionine- β -synthase (CBS) inhibitor *in vitro* and *in vivo*, the inhibitory effect of hypericin and aminooxyacetic acid (AOAA) on CBS activity was determined by the methylene blue method. Further, HT29 human colon cancer cells and a HT-29 colon cancer xenograft mouse model were used to study the antitumor effect of hypericin *in vitro* and *in vivo*. The results indicated that hypericin, a photosensitizer in the diagnosis and photodynamic therapy of cancer isolated from medicinal herb *Hypericum perforatum*, was identified as a potent and selective inhibitor of CBS with an IC₅₀ value of 7.9 ± 1.42 μmol/L. Hypericin greatly suppressed the proliferation of HT29 human colon cancer cells with an IC₅₀ value of 22.2 ± 2.25 μmol/L, and CBS protein could be one of the targets of hypericin in mammalian cells, as evidenced by CBS knock-down analyses. Surprisingly, AOAA, a commonly used CBS inhibitor, displayed very weak inhibition of HT29 cancer cells with an IC₅₀ value of 152.5 ± 35.68 μmol/L. This could perhaps be attributed to limited cell membrane permeability of AOAA. Additionally, hypericin at a dose of 5-30 mg/kg·d significantly inhibited the growth of xenograft tumors compared to the control group. After subcutaneous administration of 30 mg/kg·d for two weeks, the weight of the tumors decreased by 68% compared with the control group. Collectively, these results show that hypericin as a selective inhibitor of CBS has significant anti-colon cancer activity.

Key words: hydrogen sulfide producing enzyme; hypericin; cystathionine- β -synthase; hydrogen sulfide; anti-colon cancer

收稿日期: 2019-05-13

接受日期: 2019-08-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31471086; 31871145); 西安市科技计划(2017082CG/RC045(XAWL001))

* 通信作者 Tel: 86-29-88460543; E-mail: niuweining@nwpu.edu.cn

胱硫醚- β -合成酶(cystathionine- β -synthase, CBS)是体内催化合成气体信号分子硫化氢(H₂S)的三种酶之一^[1,2], 硫化氢在哺乳动物体内参与多

种生物学过程^[3,4]。近期研究表明在结肠癌、卵巢癌和乳腺癌中 CBS 来源 H₂S 浓度的升高促进了肿瘤细胞的增殖和迁移^[5-7]。通过 RNA 干扰或加入抑制剂降低 CBS 活性则抑制了肿瘤细胞的增殖,减少了体内肿瘤的生长^[8,9],这些发现表明 CBS 可能是一个潜在的抗肿瘤靶点。因此,研发高效的 CBS 选择性抑制剂具有重要的意义。

氨基氧乙酸(AOAA)是目前唯一被广泛使用的 CBS 抑制剂。AOAA 通过不可逆结合磷酸吡哆醛(pyridoxal 5'-phosphate, PLP)辅因子抑制酶活性,因此 AOAA 是 PLP 依赖酶的广谱性抑制剂^[10]。另外,在生理条件下抑制 CBS 活性需要高浓度的 AOAA(1~10 mmol/L),因此 AOAA 作为 CBS 抑制剂存在选择性差和抑制作用弱的不足^[11]。在作者实验室前期研究中,通过高通量筛选天然产物化合物文库获得几个 CBS 选择性抑制剂,其中来源于中草药贯叶连翘(*Hypericum perforatum* L.)的化合物金丝桃素(hypericin)对 CBS 活性具有强的抑制作用^[12]。金丝桃素是一种天然的光敏剂,经光激活产生单线态氧可以诱导肿瘤细胞凋亡并抑制其生长,同时金丝桃素对肿瘤组织具有特异的亲和力,也被广泛用于肿瘤的光动力学诊断中^[13-15]。然而,金丝桃素作为 CBS 抑制剂的抗肿瘤活性并不清楚。本论文研究了金丝桃素作为 CBS 抑制剂的体内外抗结肠癌活性。

1 材料与仪器

1.1 材料

金丝桃素(纯度≥98%)购自成都曼斯特生物科技有限公司;二甲基亚砜(DMSO)、同型半胱氨酸、氨基氧乙酸(AOAA)和炔丙基甘氨酸(PAG)购自美国 Sigma 公司;CCK-8 细胞活性检测试剂盒购自日本 Dojindo 公司;CBS 抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;人结肠癌细胞 HT29 购自美国典型菌种保藏中心(ATCC);亲和层析柱 GSTrap FF 和 HisTrap FF 购自美国 GE 公司;其他所有试剂均为分析纯。

1.2 仪器

多功能酶标仪(Synergy™ H1, Biotek, 美国);蛋白质转印系统(Bio-rad, 美国);化学发光成像系统(Tanon™ 5200, 北京原平皓生物技术有限公司, 中国);超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司, 中国);恒温震荡摇床(上海智城分析仪器制造有限公司, 中国);大容量高速冷冻离心机(湖

南湘仪离心机仪器有限公司, 中国);二氧化碳培养箱(Thermo, 美国)。

2 实验方法

2.1 人胱硫醚β-合成酶(CBS)和人胱硫醚γ-裂解酶(CSE)的表达纯化

人 CBS 的表达纯化根据作者以前发表的文献进行^[1,12]。重组大肠杆菌发酵液(6 L)经离心后得到菌体,然后将菌体重悬于 500 mL 裂解液中(50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH7.4)并使用超声波细胞破碎仪破碎。随后,在 4 °C 下 12 000 rpm 离心 30 min 获得上清液,上清液过预先平衡的 GSTrap FF 亲和层析柱,然后使用平衡缓冲液(50 mM Tris-HCl, pH8.0)洗脱除去杂蛋白。在层析柱中加入凝血酶(5 U/mg 重组蛋白)4 °C 柱上酶切 16 h,收集 CBS 蛋白储存于-80 °C 备用。聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测结果表明重组 CBS 纯度大于 90%。人胱硫醚γ-裂解酶(CSE)的表达纯化参照作者发表的文献进行^[12]。

2.2 硫化氢(H₂S)含量测定

使用亚甲蓝法测定反应液中 H₂S 的含量^[11]。当测定 CBS 重组蛋白催化合成 H₂S 的实验时,反应液(200 μL)包含 50 mmol/L HEPES 缓冲液(pH7.4)、0.4 mmol/L Pb(NO₃)₂、2 mmol/L 同型半胱氨酸和 5 μg CBS 蛋白。当测定 HT29 细胞裂解液催化产生 H₂S 的实验时,使用冰冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤培养的 HT29 细胞 3 次,然后将收获的细胞在液氮/水浴中冻融 5 次破碎,反应液 200 μL 包含 180 μL 细胞裂解液和 2 mmol/L 同型半胱氨酸。在反应液中加入 2 mmol/L 半胱氨酸底物开始反应,在 37 °C 孵育 30 min 后加入 25 μL 20 mmol/L 的 N,N-二甲基-1,4-苯二胺(溶解于 7.2 mol/L HCl)和 25 μL 30 mmol/L 的 FeCl₃(溶解于 1.2 mol/L HCl)终止反应。孵育 15 min 后反应液在 12 000 rpm 离心 10 min 获得上清液。转移上清液至 96 孔板中,在 670 nm 波长下测量吸光度。使用标准浓度的 Na₂S 溶液制作 H₂S 浓度与吸光度标准曲线图,根据标准曲线计算样品中 H₂S 浓度。

2.3 金丝桃素对 CBS 活性的影响

使用亚甲蓝法测定不同剂量金丝桃素对 CBS 活性的影响,金丝桃素抑制 CBS 活性的半抑制浓度(IC₅₀)被测定,反应混合物总体积为 200 μL,包括 2 mmol/L 半胱氨酸、2 mmol/L 同型半胱氨酸、5 μg CBS、0.4 mmol/L Pb(NO₃)₂ 和体积分数为 5% 的

DMSO。以未加金丝桃素的反应混合物作为对照。

2.4 小干扰 RNA (siRNA) 介导的 CBS 基因沉默

为了研究哺乳动物细胞中 CBS 蛋白是否是金丝桃素作用的靶标,通过 RNA 干扰技术抑制 CBS 基因的表达, siRNA 的序列如下所示。5'-GGAAGAAGUUCGGCCUGAATT-3', 5'-GGAACUACAUGACCAAGUUTT-3' 和 5'-CCAUUGACUUGCUGAACUUTT-3', 随机的 siRNA 被作为阴性对照。所有 siRNA 序列的设计和合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。当 HT29 细胞生长到 30% ~ 40% 融合度时,使用转染试剂 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司) 进行 siRNA 转染,转染后的细胞在 37 °C 继续培养 48 h。

2.5 细胞活力检测

HT29 细胞在 DMEM 培养基(Life Technologies 公司) 中 37 °C, $\varphi_B = 5\%$ CO₂ 进行培养,培养基包含 $\varphi_B = 10\%$ 的胎牛血清(Biological Industries 公司) 和青霉素-链霉素溶液(Sigma 公司)。使用 CCK-8 细胞活性检测试剂盒测定金丝桃素抑制 HT29 细胞增殖的 IC₅₀ 值。接种 HT29 细胞于 96 孔板中(每孔包含 1×10^4 个细胞),培养 24 h 后更换含有不同浓度金丝桃素的新鲜培养基继续培养 24 h,然后加入 CCK8 溶液在 37 °C 孵育 2 h,在 450 nm 测定吸光度。以不包含金丝桃素的样品作为对照,计算不同浓度金丝桃素存在条件下的细胞存活率。

2.6 体内抗肿瘤活性

BALB/c 裸鼠购自中国医学科学院实验动物科学研究所,动物实验由西北工业大学实验动物福利与伦理委员会批准进行(批准号: 2018017)。将 HT29 细胞(每毫升 1×10^7 个细胞, 100 μ L) 皮下接种于 5 周龄雌性小鼠的右前肢腋窝。使用游标卡尺每三天测定肿瘤的面积(肿瘤面积 = $0.5 \times \text{长} \times \text{宽}^2$),当肿瘤面积达到约 100 mm² 时,所有小鼠被随机分成 5 组(每组 6 只),分别为溶剂对照组(包含 $\varphi_B = 5\%$ 的 DMSO 和 $\rho_B = 5$ g/L 的羧甲基纤维素钠溶解于 PBS 缓冲液中)、阳性药物 AOAA 对照组(10 mg/kg · d)、金丝桃素低(5 mg/kg · d)、中(10 mg/kg · d) 和高剂量组(30 mg/kg · d),小鼠每周注射药物 6 次,连续给药 2 周。

2.7 Western blot 法检测细胞 CBS 蛋白表达水平

使用冰冷的 PBS 溶液洗涤细胞 3 次,然后加入裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH7.4, 150 mmol/L NaCl, $\rho_B = 5$ g/L 的脱氧胆酸钠, $\varphi_B = 1\%$ 的 NP40 和

蛋白酶抑制剂) 裂解细胞,在 4 °C 下 12 000 rpm 离心 10 min 获得上清液,BCA 法测定蛋白浓度并进行 SDS-PAGE 电泳,然后进行转膜,封闭。加入兔源 CBS 一抗(1:1 000) 4 °C 过夜孵育,加二抗孵育 2 h (1:5 000),使用天能 Tanon™ 化学发光成像系统进行分析拍照,使用 Image J 软件分析 Western-blot 条带灰度值进行相对定量。

2.8 数据分析

采用 GraphPad Prism version 6.0 软件对数据进行统计学分析,数据表示为平均值 \pm 标准偏差 (SD), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 金丝桃素选择性抑制 CBS 活性

作者实验室前期通过高通量筛选天然产物文库获得了几种 CBS 抑制剂,其中金丝桃素(图 1A) 对 CBS 活性的抑制作用最强^[12]。本研究中使用亚甲蓝方法测定不同浓度金丝桃素对 CBS 和 CSE 活性的影响,结果如图 1B 所示。在底物 2 mmol/L 半胱氨酸和 2 mmol/L 同型半胱氨酸存在的条件下,金丝桃素抑制 CBS 活性的 IC₅₀ 为 7.9 ± 1.42 μ mol/L。另外,测定了 AOAA(目前普遍使用的 CBS 抑制剂) 对 CBS 产 H₂S 活性的影响,结果如图 1C 所示, IC₅₀ 为 8.2 ± 1.14 μ mol/L,表明金丝桃素对 CBS 活性的抑制效果和 AOAA 基本一致。另外,为了评估金丝桃素抑制 CBS 的选择性,分别测定了不同浓度金丝桃素对 CSE(另一种 H₂S 合成酶) 活性的影响,结果表明金丝桃素对 CSE 仅有非常微弱的抑制活性, IC₅₀ 为 83.0 ± 16.68 μ mol/L(图 1D),以上结果表明金丝桃素对 CBS 活性的抑制具有较高的选择性(相对于 CSE)。

3.2 金丝桃素抑制 HT29 细胞的增殖

作者前期研究表明在 HT29 细胞中 CBS 蛋白存在高表达,而另一种 H₂S 合成酶 CSE 表达量则非常低^[16]。在本研究中使用亚甲蓝法测定 HT29 细胞裂解液中 CBS 和 CSE 蛋白的产 H₂S 活性,反应液中加入 PAG(普遍使用的 CSE 特异性抑制剂) 或 AOAA(CBS 和 CSE 的抑制剂)。结果如图 2A 所示,未加抑制剂的 HT29 细胞裂解液产 H₂S 活性为 36.6 ± 1.13 nmol/h · mg 蛋白,当在细胞裂解液中加入 2 mmol/L PAG 或 1 mmol/L AOAA 后, H₂S 产生活性分别为 33.1 ± 1.04 nmol/h · mg 蛋白和 6.3 ± 0.35 nmol/h · mg 蛋白。因此,计算得知 CSE 来源的 H₂S 产率为 3.5 nmol/h · mg 蛋白, CBS 来源

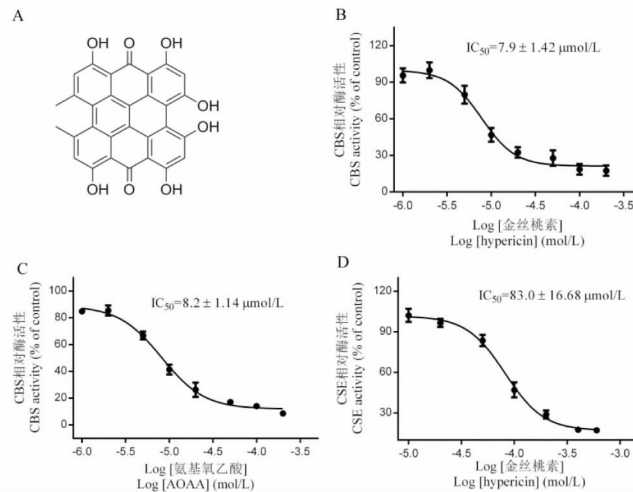


图1 金丝桃素和 AOAA 剂量依赖性地抑制 CBS 活性

Fig. 1 Dose-dependent inhibition of CBS activity by hypericin and AOAA

注: A. 金丝桃素的化学结构; B. 不同浓度金丝桃素对 CBS 活性的抑制曲线及其 IC_{50} 值; C. 不同浓度 AOAA 对 CBS 活性的抑制曲线及其 IC_{50} 值; D. 不同浓度金丝桃素对 CSE 活性的抑制曲线及其 IC_{50} 值。Note: A. Chemical structure of hypericin; B and C. Dose-response curves of hypericin and AOAA versus CBS activity; D. Dose-response curves of hypericin versus CSE activity.

的 H_2S 产率为 $26.8 \text{ nmol/h} \cdot \text{mg}$ 蛋白, CBS 来源 H_2S 产率超过 CSE 来源 H_2S 产率的 8 倍, 以上结果表明 CBS 是 HT29 细胞中催化合成 H_2S 的主要酶。另外, 当在细胞裂解液中加入 0.5 mmol/L 金丝桃素后, H_2S 产生活性为 $7.7 \pm 0.62 \text{ nmol/h} \cdot \text{mg}$ 蛋白, 表明金丝桃素和 AOAA 均能显著抑制细胞裂解液中 CBS 的产 H_2S 活性。

Szabo 等研究表明 CBS 蛋白的高表达在促进结肠癌细胞增殖过程中起关键作用^[5], 因此本研究测定了金丝桃素和 AOAA 对 HT29 细胞增殖的影响。结果如图 2B 所示, 金丝桃素抑制 HT29 细胞增殖的 IC_{50} 值为 $22.2 \pm 2.25 \mu\text{mol/L}$ 。然而, 目前普遍使用的 CBS 抑制剂 AOAA 对 HT29 细胞增殖的抑制作用非常微弱, 其 IC_{50} 值为 $152.5 \pm 35.68 \mu\text{mol/L}$ 。

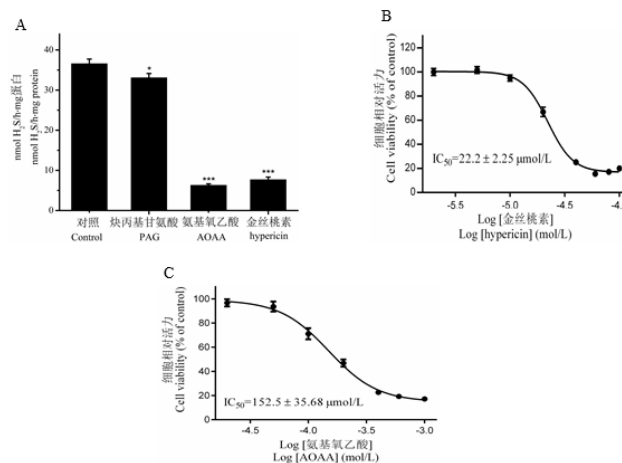


图2 金丝桃素和 AOAA 对 HT29 人结肠癌细胞活力的影响

Fig. 2 Effects of hypericin and AOAA on the viability of HT29 human colon cancer cells

注: A. 不同抑制剂对 HT29 细胞裂解液催化合成 H_2S 的影响; B. 不同浓度金丝桃素对 HT29 细胞活力的影响; C. 不同浓度 AOAA 对 HT29 细胞活力的影响。Note: A. The H_2S -producing activities of CBS and CSE in the HT29 cell lysate were measured in the presence of PAG, AOAA or hypericin. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; B. Effect of hypericin on the viability of HT29 colon cancer cells; C. Effect of AOAA on the viability of HT29 colon cancer cells.

AOAA 作为一种极性小分子,细胞膜透性可能较差,这可能是导致 AOAA 对 HT29 细胞增殖抑制作用较弱的原因。

3.3 细胞内 CBS 可能是金丝桃素的靶标之一

为了研究在哺乳动物细胞中 CBS 蛋白是否作为金丝桃素作用的潜在靶标,利用 siRNA 干扰 HT29 细胞内 CBS 蛋白的表达,结果如图 3A 所示。Western blot 结果表明与对照组相比 siRNA 干扰后细胞

内 CBS 蛋白表达量减少到 44%。接下来测定了金丝桃素对 siRNA 干扰后 HT29 细胞增殖的影响,结果如图 3B 所示。金丝桃素抑制细胞增殖的 IC_{50} 为 $55.8 \pm 5.30 \mu\text{mol/L}$,是金丝桃素抑制未处理 HT29 细胞增殖 IC_{50} 值的 2.5 倍。同时,AOAA 抑制 siRNA 干扰后 HT29 细胞增殖的 IC_{50} 值增加到 $304.5 \pm 63.01 \mu\text{mol/L}$ (图 3C)。这些结果表明在哺乳动物细胞内 CBS 蛋白可能是金丝桃素的靶标之一。

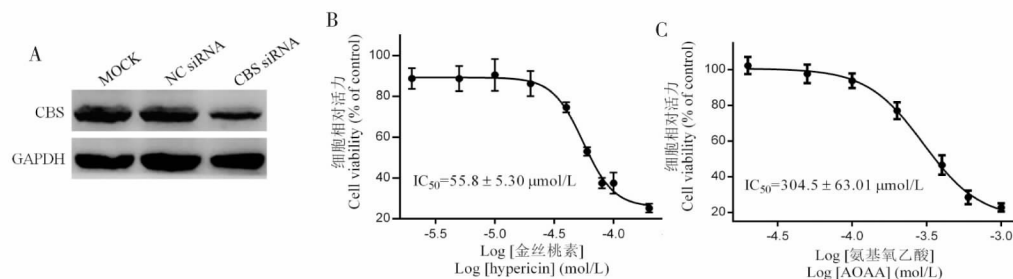


图3 金丝桃素对 siRNA 干扰后 HT29 细胞活力的影响

Fig. 3 Effects of hypericin on the viability of HT29 cells with siRNA-mediated knockdown of CBS.

注: A. 使用阴性对照 siRNA(NC siRNA) 或 CBS 靶向的 siRNA(CBS siRNA) 转染 HT29 细胞,细胞裂解液进行 western blot 分析,使用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH) 作为内参; B. 不同浓度金丝桃素对 siRNA 干扰 HT29 细胞活力的影响; C. 不同浓度 AOAA 对 siRNA 干扰 HT29 细胞活力的影响。Note: A. HT29 cells were transfected with a negative control siRNA (NC siRNA) or a CBS targeted siRNA (CBS siRNA) for 48 h; then, cell lysates were used for immunoblotting analysis. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the loading control; B. The IC_{50} value of hypericin against HT29 cells after the siRNA mediated knockdown of CBS was determined using the CCK-8 assay; C. The IC_{50} value of AOAA against HT29 CBS knockdown cells.

3.4 金丝桃素体内抗肿瘤活性

为了研究金丝桃素体内抗肿瘤活性,本研究建立了人结肠癌裸鼠原位移植瘤模型。当肿瘤体积达到约 100 mm^3 时,注射高($30 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$)、中($10 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$)、低剂量($5 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$) 金丝桃素和 AOAA(阳性药物对照组) 进行 2 周给药。实验结果

表明和溶剂对照组相比 AOAA 处理组($10 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$) 的小鼠体重显著性降低,说明目前普遍使用的 CBS 抑制剂 AOAA 对小鼠具有一定的毒副作用,但是各种剂量金丝桃素处理组($5 \sim 30 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$) 的小鼠体重与溶剂对照组相比均无显著性变化(表 1)。

表 1 不同药物处理对小鼠体重的影响

Table 1 Body weight of mice (n = 6) subjected to different treatments.

实验分组 Group	药物剂量 Dose (mg/kg · d)	起始体重 Starting weight (g)	最终体重 Final weight (g)
对照 Control	-	18.20 ± 0.38	20.09 ± 0.90
金丝桃素 低剂量 Hypericin-L	5	18.14 ± 0.44	20.30 ± 0.98
金丝桃素 中剂量 Hypericin-M	10	18.07 ± 0.43	19.96 ± 0.79
金丝桃素 高剂量 Hypericin-H	30	17.96 ± 0.68	18.82 ± 1.28
氨基氧乙酸 AOAA	10	18.19 ± 0.44	$15.96 \pm 3.87^*$

注: * $P < 0.05$ 表示和对照组相比,体重差异有统计学意义。

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

小鼠给药 2 周后被处死,剥离瘤体并称重。结果表明与溶剂对照组相比不同剂量的金丝桃素($5 \sim 30 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$) 与 AOAA 处理组均显著地抑制了

肿瘤的生长(图 4A-C), 并且金丝桃素剂量依赖性抑制肿瘤的生长。相对于溶剂对照组 $30 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$ 剂量的金丝桃素以及 AOAA 处理分别使肿瘤重

量减少了 68% 和 86% (图 4D), 表明金丝桃素和 AOAA 均具有显著的抗结肠癌作用。然而, 需要指出的是 AOAA 的体内抗肿瘤活性可能并不完全归因于其作为 CBS 的抑制剂。首先, CBS 蛋白主要在细胞质中表达, AOAA 必须透过细胞膜才能抑制 CBS 活性, 继而抑制肿瘤生长。然而本研究表明

AOAA 仅有非常弱的抑制 HT29 结肠癌细胞增殖活性, 其 IC_{50} 值为 $152.5 \pm 35.68 \mu\text{mol/L}$ (图 2C)。其次, AOAA 是 PLP 依赖酶的广谱性抑制剂, 对 CBS 的选择性较差^[10,11], AOAA 在体内可能还有其它的靶标。综上所述, 本研究结果表明金丝桃素在体内外均具有显著的抗结肠癌活性。

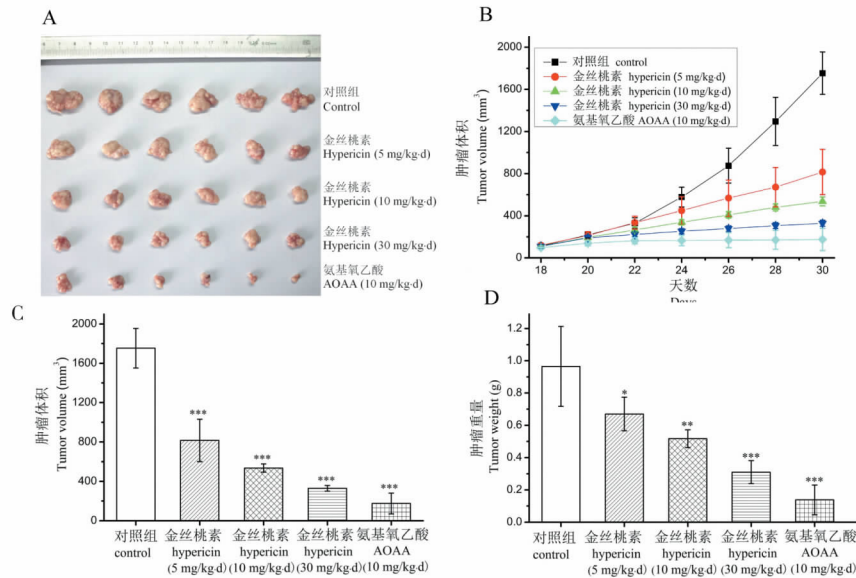


图 4 金丝桃素抑制人结肠癌裸鼠移植瘤生长

Fig. 4 Hypericin inhibits tumor growth in human colon cancer xenograft models.

注: A. 不同给药处理 2 周的肿瘤外观(每组 6 只小鼠); B. 不同给药处理肿瘤体积的变化情况; C. 不同给药处理 2 周肿瘤的体积; D. 不同给药处理 2 周肿瘤的重量。Note: A. The macroscopic appearance of tumors in BALB/c nude mice 14 days after treatment ($n=6$ per group); B and C. Hypericin treatment significantly reduced the tumor volume after the s. c. injection of HT29 cells in human tumor xenograft models. Each data point represents the mean \pm SD ($n=6$); D. Mean tumor weight (\pm SD). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

AOAA 是目前唯一一种被广泛使用的 CBS 抑制剂,但其存在抑制作用弱和选择性差的不足,抑制 HT29 细胞增殖的 IC_{50} 值高达 $152.5 \pm 35.68 \mu\text{mol/L}$ 。同时,本研究发现 $10 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$ 剂量的 AOAA 对小鼠也具有一定的毒副作用,因此急需获得高效的 CBS 选择性抑制剂。金丝桃素是从金丝桃属植物中分离得到的一种天然光敏剂^[17],被广泛用于肿瘤的诊断和光动力学治疗研究中^[18,19],金丝桃素介导的光动力学治疗可以增强化疗药物顺铂对结肠癌细胞的抑制作用^[20]。然而,金丝桃素作为硫化氢合成酶抑制剂的抗肿瘤活性未见报道。本研究结果表明金丝桃素作为 CBS 的选择性抑制剂在体内外均具有显著的抗结肠癌活性。综上所述,金丝桃素能作为 CBS 的选择性抑制剂用于结肠癌的治疗研究中。

参考文献

1 Niu WN, Wang J, Qian J, et al. Allosteric control of human

- cystathionine- β -synthase activity by a redox active disulfide bond [J]. J Biol Chem, 2018, 293: 2523-2533.
- 2 Kabil O, Banerjee R. Enzymology of H₂S biogenesis, decay and signaling [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20: 770-782.
- 3 Kimura H. Production and physiological effects of hydrogen sulfide [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20: 783-793.
- 4 Kimura H. Hydrogen sulfide: from brain to gut [J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 12: 1111-1123.
- 5 Szabo C, Coletta C, Chao C, et al. Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine- β -synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110: 12474-12479.
- 6 Bhattacharyya S, Saha S, Giri K, et al. Cystathionine- β -synthase (CBS) contributes to advanced ovarian cancer progression and drug resistance [J]. PLoS One, 2013, 8: e79167.

(下转第 1566 页)

- es with HPLC [J]. J Chin Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2014, 29: 2469.
- 10 Fu Y, Zhang Y, Tao ZW. Study on optimization of total flavanone-assisted extraction technology of guava leaves by box-behken effect surface method [J]. J Chin Med Mat(中药材), 2017, 40: 2145-2149.
- 11 Zhao YJ, Li JK, Zhang X, et al. Study on antioxidant activity of flavonoids from leaves of *Psidium guajava* [J]. J Chin Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43: 760.
- (上接第 1607 页)
- 7 Sen S, Kawahara B, Gupta D, et al. Role of cystathionine- β -synthase in human breast cancer [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 86: 228-238.
- 8 Hellmich M, Coletta C, Chao C, et al. The therapeutic potential of cystathionine- β -synthetase/hydrogen sulfide inhibition in cancer [J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 22: 424-448.
- 9 Szabo C. Gasotransmitters in cancer: from pathophysiology to experimental therapy [J]. Nat Rev Drug Dis, 2016, 15: 185-203.
- 10 Whiteman M, Le Trionnaire S, Chopra M, et al. Emerging role of hydrogen sulfide in health and disease: critical appraisal of biomarkers and pharmacological tools [J]. Clin Sci, 2011, 121: 459-488.
- 11 Asimakopoulou A, Panopoulos P, Chasapis CT, et al. Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine- β -synthase (CBS) and cystathionine- γ -lyase (CSE) [J]. Br J Pharmacol, 2013, 169: 922-932.
- 12 Niu WN, Wu P, Chen F, et al. Discovery of selective cystathionine- β -synthase inhibitors by high-throughput screening with a fluorescent thiol probe [J]. Med Chem Commun, 2017, 8: 198-201.
- 13 Jendželovská Z, Jendželovsky R, Kuchárová B, et al. Hypericin in the light and in the dark: two sides of the same coin [J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 1-20.
- 14 Zhang CL, Fan J. Application of hypericin in cancer therapy and diagnosis [J]. J Int Pharm Res (国际药学研究杂志), 2012, 39: 402-404.
- 15 Mirmalek SA, Azizi MA, Jangholi E, et al. Cytotoxic and apoptogenic effect of hypericin, the bioactive component of *Hypericum perforatum* on the MCF-7 human breast cancer cell line [J]. Cancer Cell Int, 2016, 16: 1-9.
- 16 Niu WN, Chen F, Wang J, et al. Antitumor effect of sikokianin C, a selective cystathionine- β -synthase inhibitor, against human colon cancer in vitro and in vivo [J]. Med Chem Commun, 2018, 9: 113-120.
- 17 Xiao ZY, Mu Q. Advances on chemical investigation of Hypericum [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2007, 19: 344-355.
- 18 Gonçalves JLDS, Bernal C, Imasato H, et al. Hypericin cytotoxicity in tumor and non-tumor cell lines: a chemometric study [J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2017, 20: 86-90.
- 19 Huntosova V, Stroffekova K. Hypericin in the dark: foe or ally in photodynamic therapy [J]. Cancers, 2016, 8(10): 93.
- 20 Lin SC, Lei KC, Du WP, et al. Enhancement of oxaliplatin sensitivity in human colorectal cancer by hypericin mediated photodynamic therapy via ROS-related mechanism [J]. Int J Biochem Cell B, 2016, 71: 24-34.