

文章编号: 1674 - 7054(2020)04 - 0399 - 07

角果木内生真菌活性分子对 HeLa 细胞增殖凋亡的影响

孙梦宇¹, 周董董¹, 邓 勤², 徐 静¹

(1. 海南大学 化学工程与技术学院, 海口 570228; 2. 海南大学 园艺学院, 海口 570228)

摘要: 为了解红树林植物角果木 (*Ceriops tagal*) 内生壳孢属真菌 *Cytospora* sp. 提取物 WP-1 [(22E, 24R)-5, 8-epidioxy-5 α , 8 α -ergosta-6, 9(11), 22E-trien-3 β -ol] 抑制人宫颈癌 HeLa 细胞的效果, 笔者采用 MTT 比色法、克隆形成实验、Hoechst 33258 染色和蛋白免疫印迹法来研究 WP-1 对 HeLa 细胞增殖和凋亡的影响。结果表明, 随着 WP-1 浓度增加, HeLa 细胞的存活率显著降低, 而且该提取物能明显抑制 HeLa 细胞的克隆形成, 当其浓度达到 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, HeLa 细胞出现染色质浓缩以及核小体碎裂的凋亡现象。蛋白免疫印迹法结果显示, 随着 WP-1 剂量的增加, 与凋亡相关的蛋白 Caspase-3 及 Caspase-9 的表达下调, Cleaved Caspase-3, Cleaved Caspase-9 的表达明显上调。本实验结果显示, WP-1 可以抑制 HeLa 细胞的增殖, 并促进 HeLa 细胞发生凋亡。

关键词: 角果木; *Cytospora* sp.; (22E, 24R)-5, 8-epidioxy-5 α , 8 α -ergosta-6, 9(11), 22E-trien-3 β -ol; HeLa 细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号: Q 949.761.7; R 737.33

文献标志码: A

DOI: [10.15886/j.cnki.rdsxb.2020.04.002](https://doi.org/10.15886/j.cnki.rdsxb.2020.04.002)

宫颈癌是女性第 4 大最常见的癌症, 虽然它是一种可预防的癌症, 但全球每年约有 52.8 万名妇女被诊断患有宫颈癌, 死亡 26.6 万例, 其中 85% 的死亡病例发生在发展中国家^[1]。宫颈癌的发展是一个历时数年的缓慢过程, 因为宫颈癌在早期没有明显症状, 所以当检测出时大多已经到了晚期。人乳头瘤病毒 (HPV), 尤其是 16 和 18 HPV 的感染是发展为宫颈癌的主要危险因素^[2]。宫颈癌细胞 HeLa 是研究宫颈癌的典型细胞系, 它不同于人类的一般细胞, HeLa 细胞具有无限增殖的能力, 而且增殖速度异常迅速^[3]。细胞凋亡是一种程序性死亡, 与癌症的发生发展密切相关, 促进癌细胞发生凋亡是治疗癌症的主要方法之一^[4]。细胞死亡受体通路和线粒体通路是现阶段比较认同的 2 条引起细胞凋亡的途径^[5], 在线粒体凋亡通路中, Caspase-9 为凋亡的启动者, 其活化后产生 Cleaved Caspase-9 活化片段^[6], Caspase-3 是执行凋亡的因子^[7], 当其发生活化后会产生一个活性片段即 Cleaved Caspase-3, 它能够反映 Caspase-3 的活化程度以及细胞发生凋亡的程度^[8]。线粒体通路引起的凋亡首先是使线粒体膜电位丧失从而增加它的通透性, 这样细胞色素 C 等使细胞发生凋亡的物质就会从线粒体中释放出来。细胞色素 C 会和 Caspase-9 等因子相互作用, 使 Caspase-3 激活, 从而启动 Caspase 依赖的凋亡通路^[9]。

FINDLAY 等^[10]首次在海葵中分离得到 WP-1 [(22E, 24R)-5, 8-epidioxy-5 α , 8 α -ergosta-6, 9(11), 22E-trien-3 β -ol], 之后又先后在海南粗榧内生真菌 S26^[11]、可食用蘑菇^[12] 等中分离出该化合物。研究表明, WP-1 对肝癌细胞 Hep3B 有明显的细胞毒性, 可以使细胞 DNA 断裂和染色质浓缩从而诱导肝癌细胞 Hep3B 发生凋亡, 但是对正常细胞的毒性较低, 说明其具有一定的特异性^[13]。它还可以抑制白血病细胞

收稿日期: 2020 - 05 - 18

修回日期: 2020 - 06 - 03

基金项目: 海南省高层次人才项目(2019RC006); 国家自然科学基金项目(81973229/81660584); 海南省教育厅重点项目(Hnky2019ZD-6); 海南省研究生创新科研课题(Hys2018-64)

第一作者: 孙梦宇(1993-), 女, 海南大学化学工程与技术学院 2017 级硕士研究生. E-mail: summer@hainanu.edu.cn

通信作者: 徐静(1981-), 女, 教授, 博士生导师. 研究方向: 天然药物化学. E-mail: happyjing3@163.com

HL60 活力,并通过诱导 CDKN1A 表达来抑制结肠癌细胞 HT29 的生长,从而引起细胞周期停滞和凋亡^[14]。上述研究结果均表明 WP-1 具有一定的抗肿瘤活性,但其对宫颈癌的作用目前尚不清楚。本实验所用的 WP-1 是本课题组从红树林植物角果木 (*Ceriops tagal*) 内生真菌 *Cytospora* sp. 中分离鉴定的麦角甾醇类化合物^[15],笔者采用 MTT 比色法和克隆形成实验等来研究 WP-1 对 HeLa 细胞增殖、凋亡的影响,旨在为其临床应用及新药开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂 人宫颈癌细胞(HeLa)购自中国科学院上海细胞库,WP-1 [(22E,24R)5,8-epidioxy-5 α ,8 α -ergosta-6,22E-dien-3 β -ol] 由本课题组成员提取并纯化^[12],其结构如图 1A 所示。MEM 细胞培养基(中科迈晨);胎牛血清(Gibco);吉姆萨染料(合肥 Biosharp 生物);Hoechst33258 染色试剂盒(碧云天生物科技有限公司);噻唑蓝(MTT)(美国 Sigma 公司);磷酸盐缓冲溶液(PBS)、胰蛋白酶、PVDF 膜(0.22 μm), Anti-Caspase-3 Antibody, Anti-Cleaved Caspase-3 Antibody, Anti-Caspase-9 Antibody, Anti-Cleaved Caspase-9 Antibody, Anti- β -actin Antibody, Goat Anti-Mouse IgG, Goat Anti-Rabbit IgG 均购自武汉博士德生物;无水乙醇、二甲基亚砜(DMSO)等其他常用化学试剂购自广州化学试剂厂。

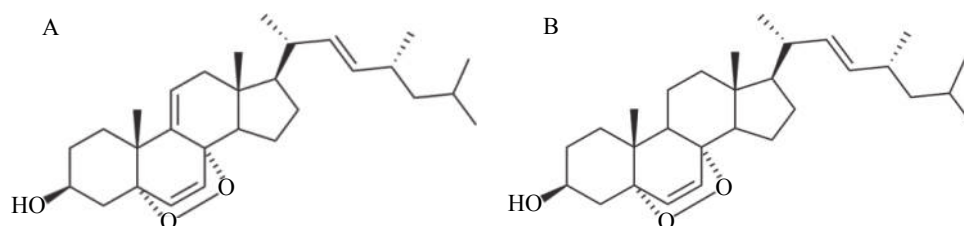


图 1 化合物的化学结构

A: WP-1 的化学结构, B: EP 的化学结构。

Fig. 1 Chemical structure of compounds

A: WP-1 chemical structure; B: EP chemical structure.

1.2 仪器 CO₂ 细胞培养箱(英国 RS Biotech 公司),高压灭菌锅(日本株式会社),酶标仪(上海科华公司),倒置荧光显微镜(日本 Olympus),超低温冰箱(日本 SANYO),制冰机(美国 Grant 公司),超净工作台(苏州净化设备有限公司),恒温水浴锅(上海精宏仪器设备有限公司)。

1.3 细胞培养 将宫颈癌细胞系 HeLa 和人正常肝细胞系 L02 分别放在含有 $w=10\%$ FBS+ $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素+ $0.1 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 青霉素的 MEM 培养基中,然后置于 37°C 含有 $\varphi=5\%$ CO₂ 的细胞培养箱培养。每天换液,隔天传代,冻存在液氮罐中保存备用^[16]。

1.4 MTT 测定细胞活力 用胰蛋白酶消化处于对数生长期的 HeLa 或 L02 细胞,以每孔 5 000 的细胞密度接种在 96 孔板中。将细胞放在培养箱中培养 24 h 以粘附,然后用 $w=0.1\%$ DMSO(作为对照)或不同浓度的 WP-1($0.01, 0.10, 1.00, 5.00, 10.00, 20.00$ 和 $40.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理 24 h。除去培养基并用 PBS 洗涤,然后在室温下与 $100 \mu\text{L}$ 培养基和 $20 \mu\text{L}$ MTT 一起孵育 4 h。除去培养基,加入 $200 \mu\text{L}$ DMSO 溶解 MTT 甲瓩晶体。在摇床上轻轻摇动后,用酶标仪读取在 570 nm 下的吸光度^[16]。

1.5 克隆形成实验 将细胞(每孔 2×10^2 细胞)置于 6 孔板中,第 2 天,对贴壁细胞用不同浓度的 WP-1($5.00, 10.00$ 和 $20.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)或 $w=0.1\%$ DMSO 处理 24 h。在添加含有 $w=10\%$ FBS 的新鲜培养基之前,先去除含药的培养基。在培养期间的适当时间,用新鲜培养基替换旧培养基,约半个月后取出培养板。除去原始培养基,用 PBS 洗涤 2 次,然后向每个孔中加入 1 mL 甲醇,持续 15 min 以固定细胞。固定后将甲醇洗净,并用 PBS 轻轻冲洗,加入适量的吉姆萨染料染色 30 min ,最后用无菌水洗净并在空气中干燥,然后在显微镜下观察菌落。计数超过 50 个细胞的菌落,通过将无 WP-1 的菌落数定义为 100%,计算菌落形成的百分比^[17]。

1.6 细胞形态观察 将细胞以每孔 2×10^5 个细胞铺于 6 孔板中, 第 2 天至细胞贴壁后, 在细胞中加入不同浓度的 WP-1 (5.00, 10.00 和 $20.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 或 $w=0.1\%$ DMSO 处理 24 h。加药处理后, 将细胞放在普通倒置显微镜下观察细胞形态的变化, 并拍照^[18]。

1.7 Hoechst 33258 染色 将细胞密度控制为每孔 2×10^5 个, 接种在 6 孔板中, 培养过夜。用不同浓度 (5.00, $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 WP-1 或 $w=0.1\%$ DMSO 处理 HeLa 细胞 24 h, 然后用 0.5 mL 固定液固定 10 min。吸出固定液后, 将细胞用 PBS 洗涤 2 次, 并用 Hoechst 33258 染色 5 min。除去染色液后, 用 PBS 清洗 2 次。加入 1 滴荧光猝灭剂, 并在荧光显微镜下观察^[19]。

1.8 Western Blot 检测 用 WP-1 (5.00, 10.00 和 $20.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 或 $w=0.1\%$ DMSO 处理 24 h 后, 收集细胞用 PBS 洗涤 3 次。将细胞加入到 PMSF 裂解物中, 在冰上放置 15 min (每 5 min 涡旋振荡 30 s), 然后在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下以 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{m}^{-1}$ 离心 5 min。通过 BSA 蛋白质测定试剂盒对蛋白质浓度进行测定。将提取的蛋白质煮沸 5 min 后, 将蛋白质样品在 $w=10\%$ 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 凝胶上分离, 转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上, 并用 $w=5\%$ 脱脂奶粉封闭 1 h。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 稀释 Caspase-3, Cleaved Caspase-3, Caspase-9, Cleaved Caspase-9 或 β -actin 的一抗。在常温下, 将奶粉和 PVDF 膜覆盖在稀释的抗体上 2 h。用 TBST 洗涤 3 次后, 将膜与稀释的二抗在常温下孵育 1 h。将发光液体施加到膜上约 3 min, 并使用显影剂定影液在黑暗中显示条带^[19]。

1.9 数据处理 每个实验至少重复 3 次, 每次均为独立实验。采用 One-Way-ANOVA 分析 (SPSS 9.0 软件) 统计分析数据, 差异被认为在 $P \leq 0.05$ 水平上具有显著性, 数据表示为平均值 \pm 标准偏差 (SD)。

2 结果与分析

2.1 WP-1 对细胞存活率的影响 研究表明, WP-1 可以显著抑制 HeLa 细胞的增殖。HeLa 细胞存活率随着药物浓度的增加而降低, 当药物浓度分别为 0.01, 0.10, 1.00, 5.00, 10.00, 20.00, $40.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对 HeLa 细胞的抑制率分别为 1.04%, 5.66% ($P \leq 0.05$), 12.70% ($P \leq 0.01$), 17.56% ($P \leq 0.01$), 47.61% ($P \leq 0.01$), 56.38% ($P \leq 0.01$), 72.60% ($P \leq 0.01$)。WP-1 对 HeLa 细胞的半抑制浓度即 IC_{50} 值为 (10.67 ± 0.09) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 2A)。但是 WP-1 对正常细胞的毒性并不明显 (图 2B), 当药物浓度达到 $40.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对正常细胞的抑制率仅为 24.27% ($P \leq 0.01$)。

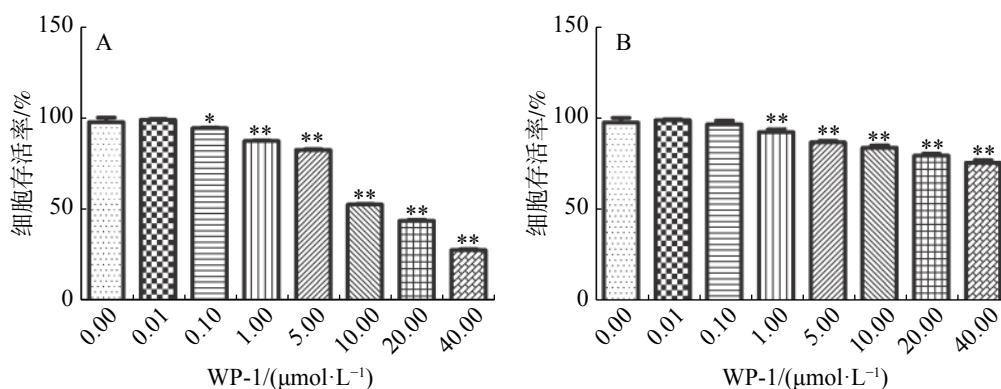


图 2 WP-1 对细胞存活率的影响

A: WP-1 对 HeLa 细胞存活率的影响, B: WP-1 对 L02 细胞存活率的影响。* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ 。

Fig. 2 Effects of WP-1 on cell viability

A: Effect of WP-1 on HeLa cell survival rate; B: Effect of WP-1 on L02 cell survival rate. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

2.2 WP-1 对克隆形成的影响 从图 3 可知, WP-1 对 HeLa 细胞的克隆形成能力具有明显的抑制作用, WP-1 浓度越高, 克隆形成率越低, 当药物浓度分别为 5.00, 10.00, $20.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 克隆形成率分别为 80.00%, 54.67% 和 42.00%。这表明 WP-1 对 HeLa 细胞的生长具有很强的长期抑制作用。

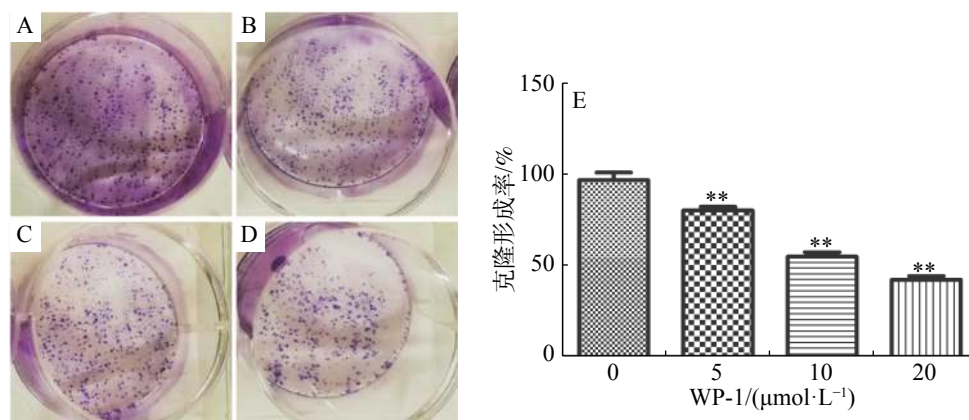


图3 WP-1对细胞克隆形成的影响

A: 空白对照组, B: $5.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, C: $10.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, D: $20.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, E: 克隆形成率柱形图。* $P\leq 0.05$, ** $P\leq 0.01$ 。

Fig. 3 Effects of WP-1 on cell clone formation

A: Control group; B: $5.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C: $10.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; D: $20.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; E: Histogram of colony formation rate. * $P\leq 0.05$, ** $P\leq 0.01$.

2.3 WP-1对细胞形态的影响 使用 $5.00, 10.00, 20.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 WP-1 或 $w=0.10\%$ 的 DMSO 处理细胞, 然后在显微镜下观察细胞形态发生的变化。当细胞发生凋亡时, 其形态会出现明显的变化, 比如细胞会发生皱缩、变圆, 原本贴壁的细胞也会脱离壁而漂浮存在。从图4可见, 未加药的细胞背景很干净, 细胞呈透明的长条状, 而加药后细胞会呈现皱缩的球形, 细胞间的排列也变得松散, 透明度减弱, 贴壁的细胞也漂浮而存在。

2.4 WP-1诱导细胞凋亡 用 Hoechst 33258 核染色研究 WP-1 的凋亡诱导作用, 用不同浓度的 WP-1 ($5.00, 10.00, 20.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 或 $w=0.1\%$ DMSO 处理 HeLa 24 h, 并通过 Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡。如图5所示, 未处理的细胞可看到细胞核被染成均匀蓝色, 而处理后细胞核呈碎块状致密浓染。

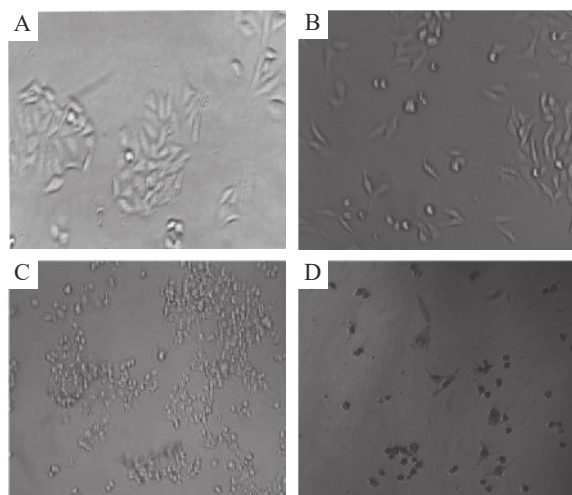


图4 WP-1对细胞形态的影响

A: 空白对照组, B: $5.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, C: $10.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, D: $20.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Fig. 4 Effects of WP-1 on cell morphology

A: Control group; B: $5.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C: $10.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; D: $20.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

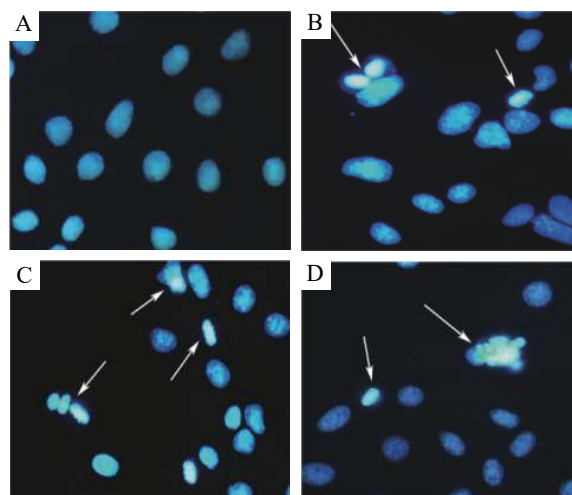


图5 WP-1诱导细胞凋亡

A: 空白对照组, B: $5.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, C: $10.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, D: $20.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Fig. 5 Cellular apoptosis induced by WP-1

A: Control group; B: $5.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C: $10.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; D: $20.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.5 WP-1对凋亡相关蛋白的影响 细胞凋亡或细胞自杀是细胞死亡的一种形式, 其在形态和生化上不同于坏死, Caspase 的激活在细胞凋亡的过程中起着核心作用, 它属于半胱氨酸蛋白酶家族, 生化激活后

是造成细胞凋亡的形态学变化的主要原因,包括线粒体损伤,核膜破裂,DNA片段化,染色质浓缩和凋亡小体形成^[10]。如图6所示,WP-1下调了Caspase-3和Caspase-9蛋白,而上调了Cleaved Caspase-3,Cleaved Caspase-9蛋白。该实验结果进一步的证明了WP-1能够促进HeLa细胞凋亡。

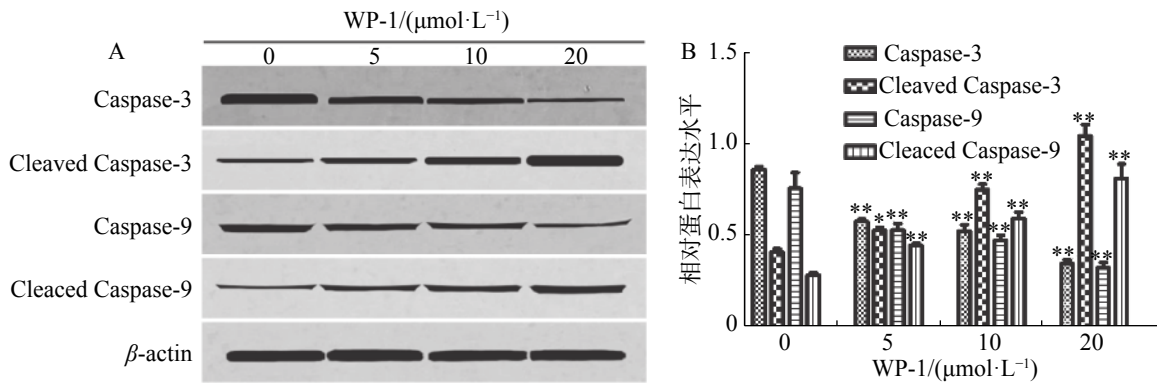


图6 WP-1对凋亡相关蛋白的影响

A: Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达情况, B: 蛋白的相对表达量。* $P\leq 0.05$, ** $P\leq 0.01$ 。

Fig. 6 Effect of WP-1 on apoptosis-related proteins

A: Western blot detection of the expression of apoptosis-related proteins; B: Relative expression of proteins.* $P\leq 0.05$, ** $P\leq 0.01$.

3 讨论

WP-1 是本实验室前期从红树林植物角果木内生真菌中提取的天然产物,属于麦角甾醇类化合物^[15]。麦角甾醇具有多种生物活性,如对细菌和肿瘤都有一定的抑制作用^[20-21]。EP[5 α ,8 α -epidioxy-(22E,24R)-ergosta-6,22-dien-3 β -ol]是WP-1的类似物,它比WP-1少1个双键,结构如图1B所示,先前确定为黄曲霉提取物中的主要凋亡诱导剂^[22]。据报道,EP是由麦角甾醇生物氧化合成的^[23],也可以通过单线态氧的光氧化而形成^[24]。KOBORI等^[25]报道EP通过抑制NF- κ B和C/EBP β 转录活性以及MARPK磷酸化来抑制LPS诱导的炎症反应,并抑制某些癌细胞的生长以诱导HL60人白血病细胞的凋亡^[26]。WP-1比EP多1个双键,据报道它具有比EP更高的生物活性,并通过诱导CDKN1A的表达抑制HT29细胞的生长,从而引起细胞凋亡周期阻滞与细胞凋亡^[14]。

本实验测定了WP-1对宫颈癌细胞HeLa的抑制作用,同时也测定了该化合物对HeLa细胞凋亡的影响。结果表明,WP-1对宫颈癌细胞HeLa具有显著的抑制效果,而且随着药物浓度的增加,HeLa细胞的存活率显著降低,当药物浓度达到(10.67 \pm 0.09) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其对细胞的抑制率为50.00%($P\leq 0.01$),但是其对正常细胞的毒性很小,当药物浓度达到40.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对正常细胞的抑制率仅为24.27%($P\leq 0.01$),这表明该化合物具有一定的特异性,与文献[13]报道的结果一致。同时,WP-1对HeLa细胞克隆率也有显著的影响,该药物能明显抑制细胞的克隆形成,当药物浓度为5.00, 10.00, 20.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,抑制率分别为20.00%($P\leq 0.01$), 45.33%($P\leq 0.01$)和58.00%($P\leq 0.01$),可以看出,随着药物浓度的增加,HeLa细胞的克隆形成率显著降低。为了研究WP-1对宫颈癌细胞HeLa凋亡的影响,通过直接观察法和Hoechst 33258核染色来研究细胞的形态变化,并通过蛋白免疫印迹法来检测相关凋亡蛋白的变化。本研究表明,加药后的细胞会呈现皱缩的球形,HeLa细胞核呈碎块状致密浓染。而且随着WP-1浓度的增加,与凋亡相关的蛋白Caspase-3及Caspase-9的表达下调,Cleaved Caspase-3, Cleaved Caspase-9的表达明显上调,这表明,WP-1可以抑制HeLa细胞的增殖,并通过下调Caspase-3, Caspase-9的表达和上调Cleaved Caspase-3, Cleaved Caspase-9的表达促进HeLa细胞发生凋亡,所以猜测该化合物使通过线粒体通路来引起细胞发生凋亡。以上证据均显示,WP-1可以抑制宫颈癌细胞的增殖以及促进其凋亡,这为该化合物开发研究宫颈癌药物提供了实验基础,其作用机理还有待深入研究。

参考文献:

- [1] SCHWALBE N. Human papillomavirus (HPV) and related cancers in the global alliance for vaccines and immunization (GAVI) countries. A WHO/ICO HPV information centre report foreword [J]. *Vaccine*, 2012, 30(4): 1 – 83.
- [2] COMPARETTO C, BORRUTO F. Cervical cancer screening: a never-ending developing program [J]. *World Journal of Clinical Cases*, 2015, 3(7): 82 – 92.
- [3] 裘伟廷. 海里埃塔·拉克丝: 缔造“永生”传奇[J]. *世界文化*, 2017(6): 54 – 56.
- [4] DILLON C P, GREEN D R. Molecular cell biology of apoptosis and necroptosis in cancer [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016, 930: 1 – 23.
- [5] XIONG Y, LU Q J, ZHAO J, et al. Metformin inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells by inducing apoptosis via mitochondrion-mediated pathway [J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2012, 13(7): 3275 – 3279.
- [6] 尤良震, 吴袁元, 尹昀东, 等. 丹蛭降糖胶囊对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡及线粒体途径与死亡受体途径的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2019(8): 3675 – 3680.
- [7] TSAI Y H, LIN J J, MA Y S, et al. Fisetin inhibits cell proliferation through the induction of G0/G1 phase arrest and Caspase-3-mediated apoptosis in mouse leukemia cells [J]. *American Journal of Chinese Medicine*, 2019, 47(4): 1 – 23.
- [8] JOHANNA B, BROCK H, KATHRYN L, et al. A Caspase-3 reporter for fluorescence lifetime imaging of single-cell apoptosis [J]. *Cells*, 2018, 7(6): 1 – 20.
- [9] YAN S L, HUANG C Y, WU S T, et al. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines [J]. *Toxicology in Vitro*, 2010, 24(3): 842 – 848.
- [10] FINDLAY J A, PATIL A D. A novel sterol peroxide from the sea anenome *Metridium senile* [J]. *Steroids*, 1984, 44(3): 261 – 265.
- [11] 陈苹, 吴娇, 戴好富, 等. 海南粗榧内生真菌 S26 化学成分研究[J]. *中国药物化学杂志*, 2008, 18(4): 279 – 283.
- [12] NIUE A W, OMOLO J O, CHEPLOGOI P K, et al. Cytotoxic ergostane derivatives from the edible mushroom *Termitomyces microcarpus* (Lyophyllaceae) [J]. *Biochemical Systematics & Ecology*, 2018, 76: 12 – 14.
- [13] CHEN Y K, KUO Y H, CHIANG B H, et al. Cytotoxic activities of 9,11-dehydroergosterol peroxide and ergosterol peroxide from the fermentation mycelia of *Ganoderma lucidum* cultivated in the medium containing leguminous plants on Hep3B cells [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2009, 57(13): 5713 – 5719.
- [14] MASUKO K, MITSURU Y, MAYUMI O K, et al. 5 α ,8 α -Epidioxy-22E-ergosta-6,9(11),22-trien-3 β -ol from an edible mushroom suppresses growth of HL60 leukemia and HT29 colon adenocarcinoma cells [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 29(4): 755 – 759.
- [15] DENG Q, LI G, SUN M Y, et al. A new antimicrobial sesquiterpene isolated from endophytic fungus *Cytospora* sp. from the Chinese mangrove plant *Ceriops tagal* [J]. *Natural Product Research*, 2020, 34(10): 1404 – 1408.
- [16] YANG H C, WANG J Y, BU X Y, et al. Resveratrol restores sensitivity of glioma cells to temozolamide through inhibiting the activation of Wnt signaling pathway [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(5): 6783 – 6800.
- [17] 宁晓燕. RNA 干扰抑制 h POT1 表达对人胃癌细胞生物学特性的影响[D]. 上海: 第三军医大学, 2007.
- [18] 罗凤仙, 解静, 钱颖艳, 等. 辣木生物碱抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖和诱导其凋亡的作用[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(2): 18 – 24.
- [19] YANG Y, JIA G, WANG Q, et al. Tubeimoside-1 induces glioma apoptosis through regulation of Bax/Bcl-2 and the ROS/Cytochrome C/Caspase-3 pathway [J]. *Oncotargets & Therapy*, 2015, 8: 303 – 311.
- [20] 郭玮, 罗琼, 刘帅, 等. 麦角甾醇对 S180 荷瘤小鼠抑瘤作用及机制[J]. *中国公共卫生*, 2015, 31(12): 1606 – 1608.
- [21] LIN M Z, LI H J, ZHAO Y, et al. 2-Naphthoic acid ergosterol ester, an ergosterol derivative, exhibits anti-tumor activity by promoting apoptosis and inhibiting angiogenesis [J]. *Steroids*, 2017, 122: 9 – 15.
- [22] LIN C N, KUO S H, WON S J. Steroids of formosan *Ganoderma amboinense* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 32(6): 1549 – 1551.
- [23] BATES M L, REID W W, WHITE J D. Duality of pathways in the oxidation of ergosterol to its peroxide *in vivo* [J]. *Journal of the Chemical Society Chemical Communications*, 1976(2): 44 – 45.
- [24] TRIGOS A, ORTEGA-REGULES A. Selective destruction of microscopic fungi through photo-oxidation of ergosterol [J]. *Mycologia*, 2002, 94(4): 563 – 568.
- [25] KOBORI M, YOSHIDA M, OHNISHI-KAMEYAMA M, et al. Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells [J]. *British Journal of*

Pharmacology, 2007, 150(2): 209 – 219.

- [26] TAKEI T, YOSHIDA M, OHNISHI-KAMEYAMA M, et al. Ergosterol peroxide, an apoptosis-inducing component isolated from *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito [J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2005, 69(1): 212 – 215.

Effects of Bio-active Molecules Isolated from Endophytic Fungi of *Ceriops tagal* on the Proliferation and Apoptosis of HeLa Cells

SUN Mengyu¹, ZHOU Dongdong¹, DENG Qin², XU Jing¹

(1. School of Chemical Engineering and Technology, Hainan University, Haikou, Hainan 570228;

2. College of Horticulture, Hainan University, Haikou, Hainan 570228)

Abstract: In order to understand the effect of WP-1 [(22E, 24R)-5, 8-epidioxy-5 α , 8 α -ergosta-6, 9(11), 22E-trien-3 β -ol] isolated from *Cytospora* sp., an endophytic fungus from the mangrove plant *Ceriops tagal* on human cervical cancer HeLa cells, the proliferation and apoptosis of HeLa cells treated with WP-1 was determined and analyzed by using MTT colorimetry, clone formation, Hoechst 33258 staining and Western blot. It was found that with the increase of WP-1 concentration the survival rate of the HeLa cells decreased significantly, and that the WP-1 significantly inhibited the colony formation of cells. When treated with WP-1 at a concentration of 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ the HeLa cells showed chromatin condensation and nucleosome fragmentation, which were characteristic of apoptosis. Western blot analysis showed that with the increase of WP-1 dose, the expressions of apoptosis-related proteins Caspase-3 and Caspase-9 were down-regulated in the HeLa cells, while the expressions of Cleaved Caspase-3 and Cleaved Caspase-9 were significantly up-regulated. The results show that WP-1 can inhibit the proliferation of HeLa cells and promote apoptosis of HeLa cells.

Keywords: *Ceriops tagal*; *Cytospora* sp.; (22E, 24R)-5, 8-epidioxy-5 α , 8 α -ergosta-6, 9(11), 22E-trien-3 β -ol; HeLa cells; proliferation; apoptosis

(责任编辑:潘学峰)