

去甲斑蝥素通过诱导自噬体聚集促使 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡

夏 源^{1,2,3#}, 姜庆玲^{2,3#}, 王晓婷³, 李敏敬³, 郑秋生^{1,2,3*}, 李德芳^{1,2,3**}

(¹石河子大学药学院新疆植物药物资源与利用教育部重点实验室,石河子 832061; ²滨州医学院中西医结合学院
山东省高等学校-中药活性成分生物合成与靶点发现特色实验室,烟台 264003; ³滨州医学院中西医结合学院
烟台市肿瘤代谢中药药理重点实验室,烟台 264003)

摘要 探究去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖和凋亡的影响。采用 Western blot 实验检测 NCTD 对 MDA-MB-231 细胞中凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2、cleaved-PARP/PARP、cleaved-caspase-9、cleaved-caspase-3 和 MCL-1 表达水平的影响; 采用 Western blot 实验检测 NCTD 对 MDA-MB-231 细胞中自噬相关蛋白 LC3-II/LC3-I, Parkin 和 PINK1 表达水平的影响; 采用流式细胞术检测 NCTD 对 MDA-MB-231 细胞线粒体膜电位及线粒体活性氧(reactive oxygen species, ROS)变化情况的影响; 采用共聚焦显微镜检测 NCTD 对表达 mCherry-EGFP-LC3 的 MDA-MB-231 细胞自噬流的影响; 采用流式细胞术检测 NCTD 联合使用氯喹(chloroquine, CQ)或 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)后, 对 MDA-MB-231 细胞凋亡情况的影响。实验结果显示, NCTD 可显著上调 Bax/Bcl-2、cleaved-PARP/PARP、cleaved-caspase-9、cleaved-caspase-3 以及 LC3-II/LC3-I 蛋白的表达水平, 促进 Parkin 的线粒体易位, 阻断自噬流。此外, NCTD 联合使用 CQ 加剧了细胞凋亡, 而 NCTD 联合使用 3-MA 则减少了细胞凋亡。研究结果表明, NCTD 可以诱导自噬体积累并导致 MDA-MB-231 细胞凋亡。

关键词 乳腺癌; MDA-MB-231 细胞; 去甲斑蝥素; 凋亡; 自噬

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2023)06-0757-12

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023033004

引用本文 夏源, 姜庆玲, 王晓婷, 等. 去甲斑蝥素通过诱导自噬体聚集促使乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡[J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(6): 757-768.

Cite this article as: XIA Yuan, JIANG Qingling, WANG Xiaoting, et al. Norcantharidin induces apoptosis through autophagosome accumulation in breast cancer MDA-MB-231 cells[J]. J China Pharm Univ, 2023, 54(6): 757-768.

Norcantharidin induces apoptosis through autophagosome accumulation in breast cancer MDA-MB-231 cells

XIA Yuan^{1,2,3#}, JIANG Qingling^{2,3#}, WANG Xiaoting³, LI Minjing³, ZHENG Qiusheng^{1,2,3*}, LI Defang^{1,2,3**}

¹Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resource and Utilization (Ministry of Education), School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832061; ²Featured Laboratory for Biosynthesis and Target Discovery of Active Components of Traditional Chinese Medicine, School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Binzhou Medical University, Yantai 264003; ³Yantai Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine in Tumor Metabolism, School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

Abstract The aim of this study was to investigate the effect of norcantharidin (NCTD) on the proliferation and apoptosis of triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231. Western blot was used to detect the effect of NCTD on the expression levels of apoptosis-related proteins Bax/Bcl-2, cleaved-PARP/PARP, cleaved-caspase-9, cleaved-caspase-3 and MCL-1 in MDA-MB-231 cells. Also, the expression levels of autophagy-related

收稿日期 2023-03-30 通信作者 *Tel: 0535-6913186 E-mail: zqsy@sohu.com

**Tel: 0535-6916303 E-mail: lidefang@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81872162)

#夏源与姜庆玲为共同第一作者

proteins LC3-II/LC3-I, Parkin and PINK1 in MDA-MB-231 cells were measured by Western blot. Flow cytometry was used to measure the effect of NCTD on the changes of mitochondrial membrane potential and mitochondrial reactive oxygen species (ROS). The effect of NCTD on autophagy flow in cells expressing mCherry-EGFP-LC3 was detected by a confocal microscope. Moreover, the effects of NCTD combined with chloroquine (CQ) or 3-methyladenine (3-MA) on the apoptosis of MDA-MB-231 cells were detected by flow cytometry. The results showed that NCTD significantly increased the expression levels of Bax/Bcl-2, cleaved-PARP/PARP, cleaved-caspase-9, cleaved-caspase-3 and LC3-II/LC3-I proteins, and promoted the mitochondrial translocation of Parkin, and blocked the autophagic flow in MDA-MB-231 cells. Moreover, NCTD combined with CQ accelerated apoptosis, while NCTD combined with 3-MA decreased apoptosis. These results suggest that NCTD can induce autophagy accumulation and lead to apoptosis of MDA-MB-231 cells.

Key words breast cancer; MDA-MB-231 cells; norcantharidin; apoptosis; autophagy

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81872162)

*XIA Yuan and JIANG Qingling contributed equally to this work

乳腺癌是全球女性发病率较高的恶性肿瘤之一,年增长幅度约为3.1%^[1]。三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)是最严重的一种乳腺癌亚型,在乳腺癌患者中占15%~20%^[2]。与其他乳腺癌相比,TNBC患者发病年龄较小,且恶性程度高、侵袭性强,容易出现局部复发和远处转移,具有预后差、易复发、患者总体生存期短等特点,常见的内分泌治疗及针对HER2的分子靶向药物治疗对TNBC患者无效,并且患者也易对化疗耐受^[3-4]。因此寻找能有效治疗三阴性乳腺癌的药物是十分必要的。

细胞凋亡是机体发育过程中在某些因素的作用下通过基因调控而发生的一种程序性细胞死亡过程,旨在维持机体内环境稳定。细胞凋亡受多种蛋白调节,其中Bcl-2家族和半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶家族(caspases)最受关注。众所周知,Bcl-2家族包含两种类型的凋亡调节蛋白,即促凋亡蛋白(Bax、Bak、Bid或Bad)和抗凋亡蛋白(Mcl-1、Bcl-2和Bcl-xl)。其中,线粒体相关蛋白Bcl-2蛋白家族和半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(caspase)家族在众多凋亡调控基因中最受关注。其中,Bax是细胞对死亡信号反应所必需的,通过转位到线粒体形成同源二聚体或多聚体,引起线粒体膜通透性增加及促凋亡因子释放,并最终启动凋亡级联反应。相反,Bcl-2通过与其形成更稳定的Bcl-2和Bax异源二聚体来抑制细胞凋亡^[5]。

线粒体在细胞存亡机制中起着至关重要的作用。线粒体是细胞的动力源,参与细胞的基本功

能,包括ATP的产生、Ca²⁺的调节、ROS的产生和清除,此外,还参与了caspase蛋白家族的激活。因此,线粒体功能障碍和氧化应激在很大程度上也与肿瘤的发生发展有关^[6-7]。例如,erastin样化合物X1可通过诱导ROS增加,线粒体膜电位下降从而诱导肝癌细胞凋亡^[8];此外,pPolyHb通过调节PINK1-Parkin介导的线粒体自噬途径保护心肌H9C2细胞免受缺血再灌注损伤^[9];亦有报道称酮康唑可通过下调COX-2,诱导PINK1积累和Parkin的线粒体易位,最终激活肝癌细胞中的线粒体自噬^[10]。到目前为止,有越来越多的证据表明PINK1/Parkin可以通过调节线粒体自噬来清除受损或功能障碍的线粒体^[11-12]。因此,线粒体自噬是移除受损线粒体的质量控制方式。

Meta分析证实中医药治疗可有效提高TNBC患者5年生存率降低TNBC的复发转移率^[13]。NCTD是庖状甲虫中分离出的斑蝥素的合成去甲基类似物^[14]。与斑蝥素相比,NCTD降低了原有的毒性,基本消除了不良反应,抗肿瘤作用增强;此外,NCTD对癌肿瘤细胞的毒性明显高于正常细胞;因此,NCTD在肿瘤治疗中更具吸引力,目前已用于肝癌、食管癌、胃癌以及白血病的临床治疗^[15];此外,NCTD也可以通过靶向miR-873/CDK3调节ER α 信号抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭及转移达到治疗的目的^[16],然而NCTD在治疗乳腺癌方面鲜有报道。

本研究旨在证明NCTD通过PINK1/Parkin信号通路诱导线粒体自噬,引起自噬小体蓄积,最终

导致 MDA-MB-231 细胞的凋亡的机制, 以期为 NCTD 在治疗 TNBC 的应用中提供理论依据。

1 材 料

1.1 试 剂

NCTD(北京百灵威科技有限公司); 磷酸化 MEK1/2 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司); cyclin B1、p-21、CDK1、磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶、磷酸化 CDK1(英国 Abcam 公司); Jun、p-53、JNK、磷酸化 JNK、GAPDH、CDC25C、山羊抗兔 IgG 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司); 磷酸化 AMP-Ka1-T183/AMPKa2-T1728(武汉爱博泰克生物公司); 抗 p-ERK1/2 抗体, LC3 α / β 抗体(沈阳万类生物科技有限公司); Annexin V FITC/PI 试剂盒、JC-1 检测试剂盒、ROS 检测试剂盒, RIPA 高效裂解液、蛋白酶抑制剂 PMSF、1 \times 蛋白磷酸酶抑制剂、BCA 蛋白分析试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); Lipofectamine 3000(美国 Invitrogen 公司); 细胞线粒体提取试剂盒(中国碧云天生物技术有限公司)。

1.2 仪 器

酶标仪(奥地利 Tecan Austria GmbH 公司); 光学显微镜(意大利 Optika 公司); 荧光显微镜(德国 Leica Microsystems CMS GmbH 公司); FACSCanto II 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司); 共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司); 透射电子显微镜(日本 Jeol 公司); 凝胶成像分析系统(德国 Jena 公司)。

1.3 细 胞

三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞来源于(江苏凯基生物科技有限公司)。

2 方 法

2.1 细胞培养

三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞在含有 10% 血清以及 1% 双抗(最终浓度为青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 μ g/mL)的 L-15 完全培养基中, 置 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养, 当细胞密度达到 70% ~ 80% 时即可进行实验。

2.2 CCK-8 法检测细胞增殖

将处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞消化、离心重悬后进行细胞计数。用 L-15 完全培养基将细胞密度调整至每毫升 7.5 \times 10⁴ 个。取 96 孔板, 设置只有培养基的空白对照组、对照组和处理组,

每组 3 个复孔, 每孔加入细胞悬液 200 μ L, 培养箱中培养 24 h 至细胞完全贴壁。吸除培养基, 处理组细胞加入 NCTD 的终浓度为 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μ mol/L, 空白对照组和对照组分别加入新鲜的 L-15 完全培养基, 各孔均加入 200 μ L, 培养 48 h 后吸除培养基, 每孔加入含 10% CCK-8 试剂的完全培养基 100 μ L, 37 °C, 5% CO₂ 条件下继续孵育 2 h。使用酶标仪检测细胞在 450 nm 波长处的吸收度。计算去甲斑蝥素作用于细胞 48 h 后的各组的抑制率。抑制率 = $[1 - (A_{\text{test}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})] \times 100\%$ 。

2.3 平板克隆实验检测细胞集落形成能力

将处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞消化、离心重悬后进行细胞计数。用 L-15 完全培养基将细胞密度调整至每毫升 100 个。取 6 孔板, 设置对照组和处理组, 每孔加入细胞悬液 2 mL, 培养箱中培养 3 ~ 4 d, 每 2 天换液 1 次。吸除培养基, 处理组细胞加入 NCTD 的终浓度为 20, 50, 80 μ mol/L, 对照组则加入新鲜的 L-15 完全培养基, 各孔均加入 2 mL, 培养 48 h 后吸除培养基, 每孔加入新鲜培养基 2 mL, 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养 15 d 左右, 每 2 天换液 1 次。待细胞形成肉眼可见群落时, 吸弃培养基, PBS 清洗 2 次, 加入组织固定液, 每孔 700 μ L, 室温静置 15 min; 吸弃固定液, PBS 清洗 2 次, 加入 1% 结晶紫染色溶液, 每孔 1 mL, 室温静置 15 min; PBS 清洗至孔中无多余结晶紫染色液残留, 将 6 孔板置于阴凉通风处使之挥发多余水分, 待板底彻底干燥后即可拍照。进行 3 次平行实验。

2.4 Hoechst 33258 荧光染色观察细胞凋亡形态变化

将处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞消化、离心重悬后进行细胞计数。用 L-15 完全培养基将细胞密度调整至每毫升 1.0 \times 10⁴ 个。取 6 孔板, 设置对照组和处理组, 每孔加入细胞悬液 2 mL, 培养箱中培养 24 h 至细胞完全贴壁。吸除培养基, 处理组细胞加入 NCTD 的终浓度为 20, 50, 80 μ mol/L, 对照组加入新鲜的 L-15 完全培养基, 各孔均加入 2 mL, 培养 48 h 后吸除培养基。PBS 清洗 3 次, 固定液(甲醇-乙酸, 3:1)固定 15 min; 吸弃固定液, 于避光条件下用 Hoechst 33258(10 μ g/mL)染色 10 min; 吸除染液, PBS 清洗 3 次。最后用 PBS 1 mL 浸润细胞, 于荧光显微镜下观察细胞染色情况。

独立进行3次实验。

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

将处于对数生长期的MDA-MB-231细胞消化、离心重悬后进行细胞计数。用L-15完全培养基将细胞密度调整至每毫升 2.5×10^5 个。取6孔板,设置对照组和处理组,每孔加入细胞悬液2 mL,培养箱中培养24 h至细胞完全贴壁。吸除培养基,处理组细胞加入NCTD的终浓度为20、50、80 $\mu\text{mol/L}$,对照组加入新鲜的L-15完全培养基,各孔均加入2 mL,培养48 h后吸除培养基。胰酶消化,离心收集细胞沉淀,结合缓冲液重悬,每孔500 μL 。根据Annexin V-FITC/PI试剂盒说明书指示,各管先加入FITC(5 μL)孵育10 min,再加入PI(5 μL)孵育5 min。染色结束,立即上机进行流式检测。独立进行3次实验。

当用该试剂盒检测自噬抑制剂对凋亡的影响时,将细胞分为对照组、50 $\mu\text{mol/L}$ NCTD处理组、50 $\mu\text{mol/L}$ NCTD + 抑制剂组,其余操作步骤与上述相同。

2.6 流式细胞仪检测线粒体膜电位变化

将处于对数生长期的MDA-MB-231细胞消化、离心重悬后进行细胞计数。用L-15完全培养基将细胞密度调整至每毫升 2.5×10^5 个。取6孔板,设置对照组和处理组,每孔加入细胞悬液2 mL,培养箱中培养24 h至细胞完全贴壁。吸除培养基,处理组细胞加入NCTD的终浓度为20、50、80 $\mu\text{mol/L}$,对照组加入新鲜的L-15完全培养基,各孔均加入2 mL,培养48 h后吸除培养基。胰酶消化,离心收集细胞沉淀,染料(完全培养基:1×JC-1染料缓冲液=1:1)重悬,每管500 μL ,37 °C避光孵育20 min。离心沉淀细胞,JC-1染色缓冲液洗涤2次,完全培养基500 μL 重悬,流式细胞仪检测线粒体膜电位的变化。每个样本中均收集10 000个细胞用于检测分析,红色/绿色荧光强度之比用于表示线粒体膜电位变化。

2.7 透射电子显微镜检测细胞自噬体变化

将处于对数生长期的MDA-MB-231细胞消化、离心重悬后进行细胞计数。

于100 mm培养皿中接种细胞,密度为每皿 6×10^5 个,设置对照组和处理组,培养箱中培养24 h至细胞完全贴壁。吸除培养基,处理组细胞用NCTD(终浓度为50 $\mu\text{mol/L}$)处理6 h,12 h;对照组加入

新鲜L-15完全培养基,各皿均加入5 mL。培养48 h后吸除液体,细胞刮刮取细胞,保证收集细胞数量为每组 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个。离心收集细胞沉淀,沿管壁缓慢加入固定液(注意防止将细胞团块吹散)1 mL,4 °C冰箱过夜。取出细胞,吸弃固定液,0.1 mol/L PBS清洗两遍,第1遍约15 min,第2遍于4 °C冰箱过夜。再次取出细胞,0.1 mol/L PBS清洗1遍,约15 min,吸弃PBS,加入适宜体积的1%锇酸,置4 °C冰箱固定90 min,每隔20 min晃动容器,使细胞充分接触细胞团块。固定完毕后,弃去固定液,0.1 mol/L PBS清洗3次,每次15 min。接着用50%乙醇脱水,4 °C处理15 min;70%乙醇脱水,4 °C处理3 h;80%乙醇脱水,室温处理15 min;95%乙醇脱水,室温处理15 min;无水乙醇脱水,室温处理15 min,重复3次。丙酮置换2次,共计15 min,注意避免组织暴露在空气中;丙酮-浸透剂(2:1),室温1 h;丙酮-浸透剂(1:2),室温2 h;纯浸透剂,35 °C恒温箱内开盖浸透(防止细胞团块漂浮在液面)。包埋样品;梯度升温37 °C,12 h;45 °C,12 h;60 °C,24 h。样品准备完毕后用透射电镜拍摄自噬小体即可。

2.8 转染mCherry-EGFP-LC3检测细胞自噬流变化

将处于对数生长期的MDA-MB-231细胞消化、离心重悬后进行细胞计数。

于40 mm培养皿中接种细胞,密度为每皿 6×10^5 个,培养箱中培养24 h至细胞完全贴壁,转染mCherry-EGFP-LC3质粒。具体操作如下。

准备转染混合液,A液:Opti-MEM 125 μL ,Lipofectamine 3000转染试剂7 μL ;B液:Opti-MEM 125 μL ,DNA 4 μg ,P3000试剂8 μL 。配制好A,B液以后,等体积混匀,室温静置15 min。将培养皿中的培养基吸除,加入无双抗培养基1.5 mL,再加入AB混合液,轻轻混匀,于培养箱(37 °C,CO₂)中培养12 h。转染完成后,将MDA-MB-231细胞消化、离心重悬后进行细胞计数。用L-15完全培养基将细胞密度调整至每毫升 1.0×10^5 个,接种到共聚焦小皿上(每皿1 mL),培养箱中培养24 h至细胞完全贴壁。吸除培养基,加入终浓度为50 $\mu\text{mol/L}$ NCTD,给药6 h或12 h后移除药液。PBS清洗2遍,加入适量4%细胞固定液,固定15 min。吸除固定液,PBS清洗2遍,加入DAPI染液,室温孵育6 min。吸除DAPI染液,PBS洗涤3

次, 每次 5 min。最后加入刚好没过细胞的少量 PBS, 置于激光共聚焦下拍片即可。

2.9 Western blot 检测凋亡相关蛋白和自噬相关蛋白的表达

将处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞消化、离心重悬后进行细胞计数。于 100 mm 培养皿中接种细胞, 密度为每皿 6×10^5 个, 设置对照组和处理组, 培养箱中培养 24 h 至细胞完全贴壁。

提取细胞总蛋白: 吸除培养基, 处理组细胞加入 NCTD(终浓度为 20、50、80 $\mu\text{mol/L}$), 对照组加入新鲜 L-15 完全培养基, 各皿均加入 5 mL。培养 48 h 后吸除液体, 加入蛋白裂解液, 冰上裂解 30 min; 细胞刮刮取细胞, 4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。

提取线粒体蛋白及胞浆蛋白: 吸除培养基, 处理组细胞加入 NCTD(终浓度 50 $\mu\text{mol/L}$), 对照组加入新鲜 L-15 完全培养基, 各皿均加入 5 mL。培养 48 h 后吸除液体, 消化、离心重悬后进行细胞计数。按照细胞线粒体提取试剂盒指示提取线粒体蛋白和胞浆蛋白。

根据 BCA 蛋白分析试剂盒检测蛋白浓度, 将各组蛋白浓度调节一致, 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 90 V, 30 min; 120 V, 1 h。电转 210 mA, 120 min。电转结束后, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h。TBST 清洗 2 遍, 4 °C 一抗孵育过夜; 一抗孵育结束后, TBST 洗膜 3 次, 二抗室温孵育 40 min; 结束后, TBST 洗膜 3 次, 使用凝胶成像分析系统对蛋白条带进行显影。

2.10 统计学分析

本研究实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示。使用 SPSS 25.0 统计软件进行分析, 采用了单因素方差分析(One-Way ANOVA)或 T 检验来计算统计差异, 并在采用单因素方差分析后, 进行 Tukey 事后检验, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

3 结 果

3.1 NCTD 对人 MDA-MB-231 细胞存在细胞毒性作用

为评估 NCTD 是否具有抗乳腺癌的作用, 用不同浓度 NCTD (10 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 MDA-MB-231 细胞, 检测 NCTD 对 MDA-MB-231 细胞毒性作用。如图 1-A 所示, NCTD 处理后 MDA-MB-231 细

胞的存活率降低。此外, 克隆形成减少也证实 NCTD 显著抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖(图 1-B), 提示 NCTD 对 MDA-MB-231 细胞的生长有抑制作用。为进一步检测 NCTD 诱导 MDA-MB-231 细胞生长抑制作用的机制, 用 Hoechst 33258 染色分析 NCTD 是否诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡。如图 1-C 所示, 细胞经 NCTD 处理后, 均出现典型的凋亡小体、染色质浓缩、核膜溶解、细胞质皱缩等特征, 这一现象初步表明 NCTD 可以诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡。随后, 使用流式细胞术进一步分析了 NCTD 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响。如图 1-D 所示: 不同浓度 NCTD 处理后, MDA-MB-231 细胞总凋亡比例分别为: 8.2%、18.1% 以及 22.7%。综上所述, NCTD 对 MDA-MB-231 细胞存在生长抑制作用, 且可诱导其凋亡。

3.2 NCTD 诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡相关蛋白表达改变

为了探究 NCTD 诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡的分子机制, 本实验进一步分析了凋亡途径相关蛋白的表达情况。如图 2-A 所示, MDA-MB-231 细胞在用 NCTD 处理 48 h 以后, Bcl-2, MCL-1 表达降低, 促凋亡蛋白 Bax 表达升高, 且呈剂量依赖性。此外, 经 NCTD 处理以后, 凋亡相关蛋白 cleaved-caspase-9, cleaved-caspase-3 以及 cleaved-PARP/PARP 表达水平升高(图 2-B)。蛋白免疫印迹法证明 NCTD 通过改变凋亡相关蛋白的表达, 促进 MDA-MB-231 细胞凋亡。

3.3 NCTD 诱导 MDA-MB-231 细胞线粒体功能障碍

线粒体膜电位丢失是细胞死亡过程中的关键步骤, 本实验通过 JC-1 染色和流式细胞术检测了不同浓度 NCTD 对 MDA-MB-231 细胞线粒体膜电位的影响。

凋亡引发的线粒体膜电位的降低表现为红色/绿色荧光强度的降低。如图 3-A 所示: 与对照组相比, MDA-MB-231 细胞经不同浓度 NCTD 处理 48 h 后, 细胞出现高绿色和低橙色的荧光, 初步表明 NCTD 可以降低 MDA-MB-231 细胞的线粒体膜电位。此外, 如图 3-B 所示, 流式细胞术进一步证明 NCTD 诱导 MDA-MB-231 细胞线粒体膜电位降低, 且呈剂量依赖性。NCTD 引起线粒体膜电位的去极化, 提示其可能与 MDA-MB-231 细胞凋亡有关。

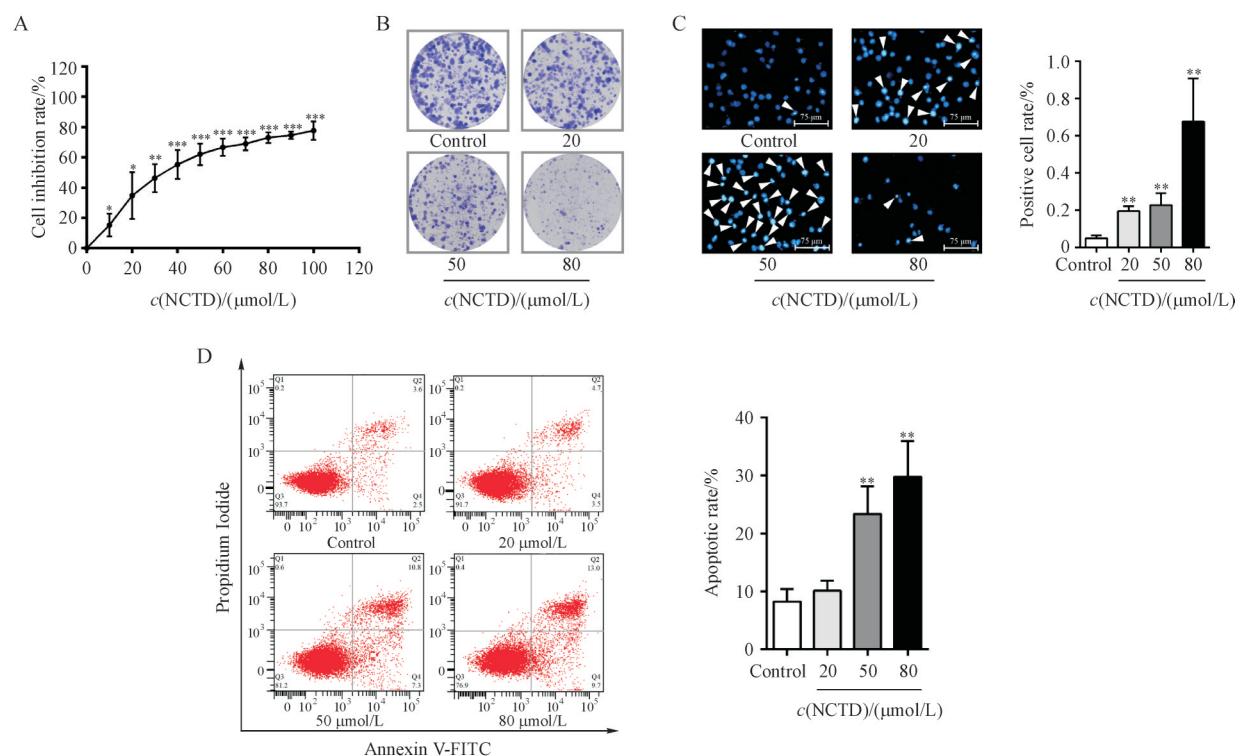


Figure 1 Toxicity of norcantharidin (NCTD) on MDA-MB-231 cells

A: Inhibition of NCTD on the cell viability determined by CCK-8 assay ($\bar{x} \pm s, n = 3$); B: Inhibition of NCTD on cell colony formation capacity was detected by plate cloning experiments; C: Apoptosis morphological changes of NCTD-treated cells tested by Hoechst 33258 fluorescent staining; D: Flow cytometry was applied to assay the apoptosis of NCTD-treated cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

** $P < 0.01$ vs control group

为了探究 NCTD 对 MDA-MB-231 细胞线粒体功能的影响, 本研究进一步测量了 NCTD 处理的 MDA-MB-231 细胞的线粒体 ROS 水平。结果显示, 与对照组相比, NCTD 处理组细胞的线粒体产生更多的 ROS(图 3-C)。综上所述, 该实验证明 NCTD 能够引发 MDA-MB-231 细胞的线粒体功能损害。

3.4 NCTD 通过 PINK1/Parkin 信号通路诱导线粒体自噬

本研究通过透射电镜观察各组细胞中自噬特异性结构的数量及超微结构, 发现 MDA-MB-231 细胞经 50 μmol/L NCTD 分别处理 12 h 后, 与对照组相比, 细胞质中可以观察到清晰的自噬泡(图 4-A)。随后, 本研究分析了自噬相关蛋白的表达情况, 发现 NCTD 显著促进 LC3-I 转化为 LC3-II, 同时自噬体形成相关蛋白 Atg5 的表达也升高(图 4-B), 提示 NCTD 处理后的细胞可能发生自噬。已有研究表明 Parkin 的线粒体易位是线粒体自噬的标志^[17], 因此本研究检测了 NCTD 处理的细胞中 Parkin 的线粒体

易位情况, 观察到 NCTD 处理的 MDA-MB-231 细胞的线粒体富含 Parkin 蛋白(图 4-C)。鉴于 PINK1/Parkin 信号通路在哺乳动物细胞线粒体自噬中的关键调控作用^[18], 本研究进一步检测了 NCTD 处理对 MDA-MB-231 细胞中 PINK1 表达的影响, 如图 4-D 所示, NCTD 处理增加了 MDA-MB-231 细胞中 PINK1 的表达。综上所述, 本研究提出 NCTD 增强线粒体 Parkin 募集, 通过 PINK1/Parkin 信号通路促进线粒体自噬诱导 MDA-MB-231 凋亡。

3.5 NCTD 诱导 MDA-MB-231 细胞自噬流阻滞

NCTD 已被证明能诱导 MDA-MB-231 细胞发生自噬, 本研究旨在通过 mCherry-EGFP-LC3 报告质粒进一步观察 NCTD 处理的 MDA-MB-231 细胞中自噬流的状态。该融合蛋白在自噬小体阶段呈 mCherry⁺EGFP⁺, 在自噬溶酶体阶段中呈 mCherry⁺EGFP⁻。如图 5-A 所示, 随着 NCTD 处理时间的延长, 细胞中自噬小体数量明显增加, 而自噬溶酶体数量逐渐减少, 表明 NCTD 可能通过促进自噬小

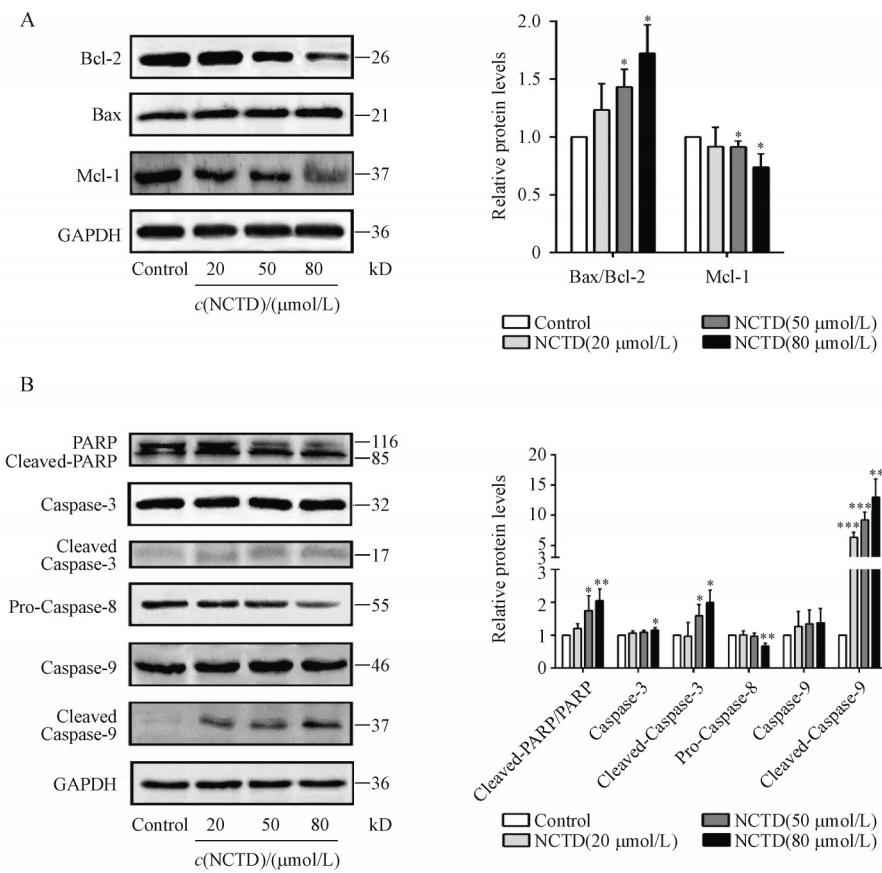


Figure 2 Effects of NCTD on the expression of apoptosis-related proteins

A: Ratio of Bcl-2, Mcl-1 and Bax in cells exposed to NCTD ($\bar{x} \pm s, n = 3$); B: Expression of the above indicated proteins in NCTD-treated cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$). GAPDH was regarded as the internal reference

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

体的形成调控 MDA-MB-231 细胞自噬。考虑到与自噬特异性底物 p62 结合的泛素化蛋白可通过自噬小体-自噬溶酶体途径降解^[19-21],因此,本研究检测了 p62 和泛素化蛋白的表达水平。结果发现与 LC3-II 表达积累相一致, p62 表达水平和线粒体蛋白的泛素化水平在 NCTD 处理的 MDA-MB-231 细胞中升高(图 5-B, 图 5-C), 进一步证明自噬溶酶体数量减少, MDA-MB-231 细胞自噬通量受损。综合以上实验结果, 本研究提出 NCTD 通过促进自噬小体的形成和抑制自噬溶酶体形成的来调控 MDA-MB-231 细胞自噬。

3.6 NCTD 引发自噬小体积累导致 MDA-MB-231 细胞凋亡

为了进一步探究 NCTD 诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡的自噬调控机制, 本研究选取自噬抑制剂 CQ 和 3-MA, 联合应用 NCTD, 检测它们对细胞凋

亡的影响。CQ 能够破坏自噬小体与溶酶体融合并导致自噬小体积累, 而 3-MA 主要抑制自噬启动和自噬小体形成。MDA-MB-231 细胞凋亡的流式分析结果显示 NCTD 联合使用 CQ 可以显著加重 NCTD 诱导的细胞凋亡(图 6-A); 相反, NCTD 联合使用 3-MA 显著降低了 NCTD 处理后 MDA-MB-231 细胞的凋亡(图 6-B); 该结果进一步证明了自噬小体的积累在 NCTD 诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡过程中的调控作用。综上所述, NCTD 通过启动线粒体自噬和阻止自噬小体-溶酶体融合诱导自噬小体积累, 导致 MDA-MB-231 细胞凋亡。

4 讨 论

本研究证实 NCTD 可诱导 MDA-MB-231 细胞自噬小体蓄积, 并最终诱导其凋亡。本研究首次分析了 NCTD 处理后细胞自噬依赖性凋亡的分子

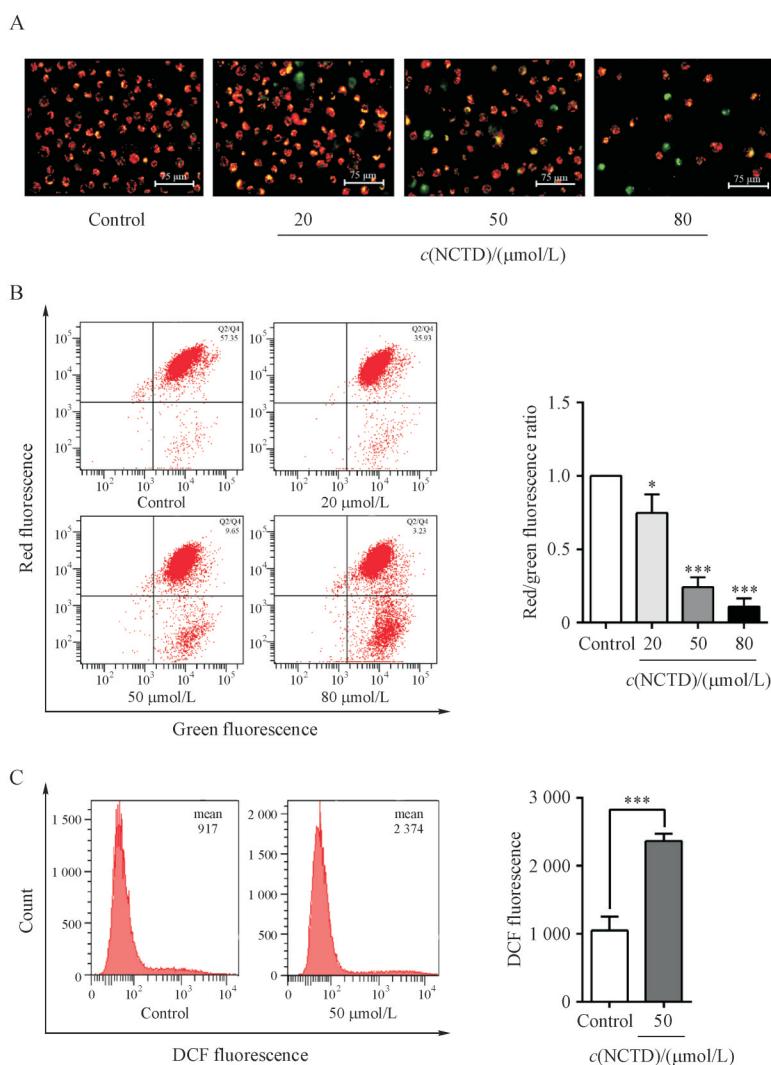


Figure 3 Effects of NCTD on mitochondrial dysfunction

A: Mitochondrial membrane potential of NCTD-tested cells determined by JC-1 fluorescent staining; B: Mitochondrial membrane potential of NCTD-tested cells determined by flow cytometry ($\bar{x} \pm s, n = 3$); C: Mitochondrial ROS of NCTD-treated cells determined by flow cytometry ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control group

机制,为MDA-MB-231细胞的治疗提供了理论依据。

以往研究发现,NCTD可抑制人肾小球系膜细胞、人肝癌细胞和人口腔鳞状癌细胞等多种肿瘤细胞的增殖和生长^[22–24]。为评价NCTD是否具有抗乳腺癌的作用,本实验首先分析了NCTD对MDA-MB-231细胞生长的影响。本研究发现NCTD处理后MDA-MB-231细胞的存活率降低,克隆形成减少,证实NCTD可以显著抑制MDA-MB-231细胞的增殖。诱导细胞凋亡是抗肿瘤药物抑制细胞生长的潜在因素之一^[25]。在本研究中,MDA-MB-231细胞经NCTD处理后凋亡细胞比例增加,并且凋亡相

关蛋白表达水平变化明显,提示NCTD可以诱导MDA-MB-231细胞凋亡。

线粒体是细胞的动力源,参与细胞的基本功能,包括ROS的产生和清除、细胞凋亡以及caspase家族的激活等,对细胞的存活起着至关重要的作用。因此,线粒体功能障碍在很大程度上与衰老、肿瘤、年龄相关的神经退行性和代谢综合征的发生发展有关^[26]。同时研究表明,ROS的增加会导致线粒体的破坏,线粒体膜电位降低,最终导致细胞凋亡^[27–28]。在本实验中,NCTD处理的MDA-MB-231细胞中线粒体膜电位下降,并伴有线粒体ROS生成增加,该结果提示NCTD诱导MDA-MB-231细

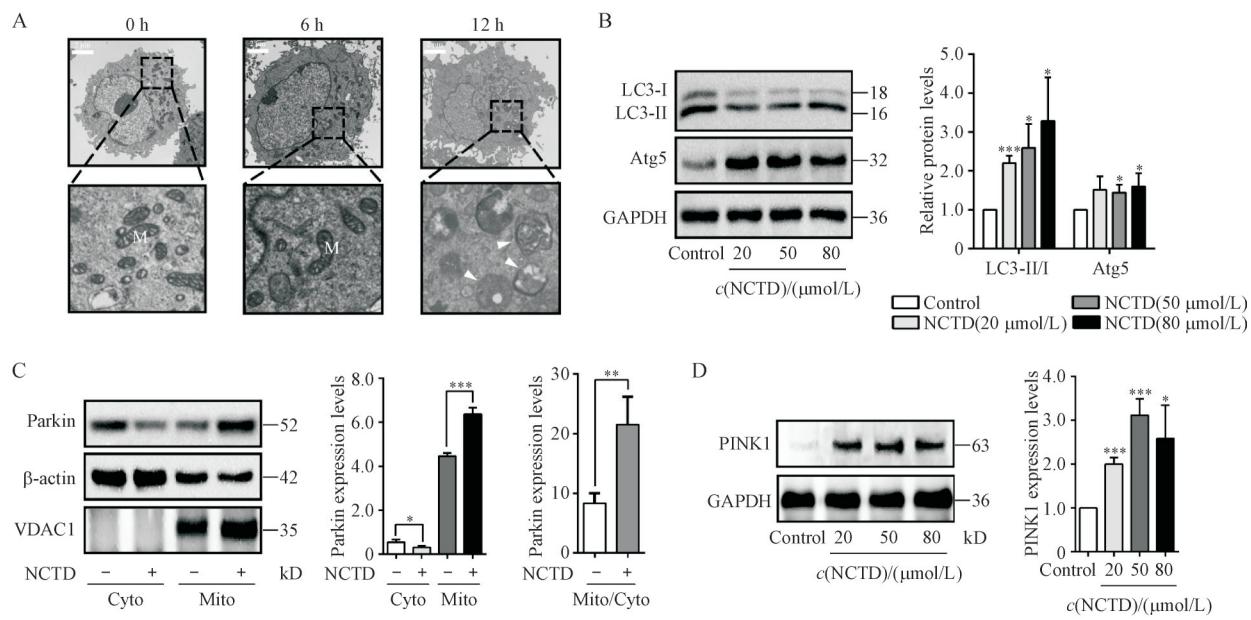


Figure 4 Mitochondrial autophagy induced by NCTD via PINK1/Parkin signaling pathway

A: Autophagy-specific structures were analyzed by transmission electron microscopy in NCTD-treated cells. M, mitochondria; Arrows, autophagosomes; B: Immunoblotting analysis of LC3-I, LC3-II, and Atg5 in cells exposed to NCTD; GAPDH was regarded as internal reference ($\bar{x} \pm s, n = 3$); C: Immunoblotting analysis of Parkin within the cytoplasm (Cyto) and mitochondria (Mito) in NCTD-treated cells. VDAC1 and β -actin were used as the internal reference in mitochondria and cytoplasm, respectively ($\bar{x} \pm s, n = 3$); D: Immunoblotting analysis of PINK1. GAPDH was regarded as internal reference ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

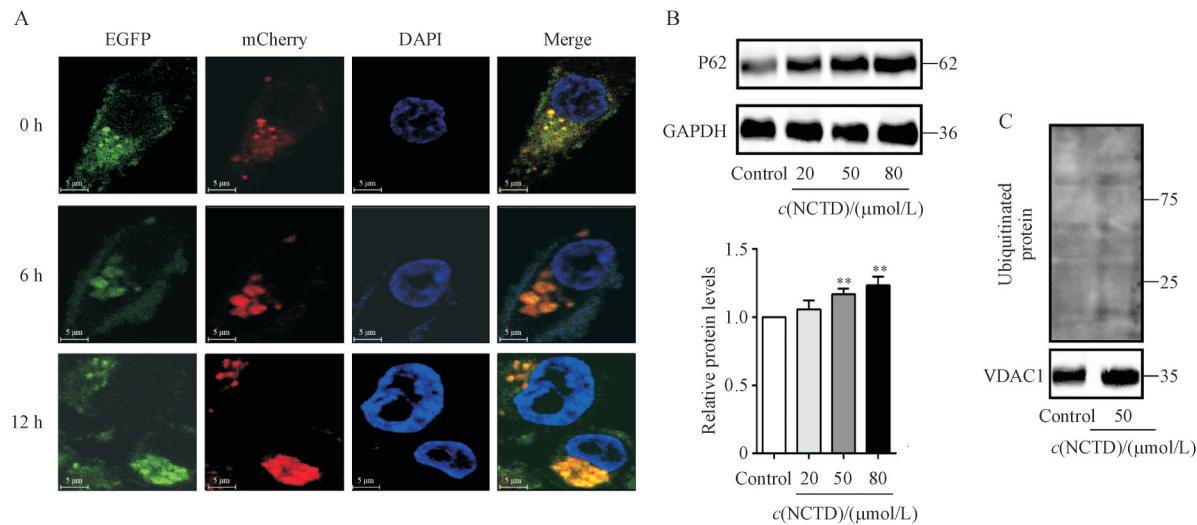


Figure 5 Effect of NCTD on autophagy flow in MDA-MB-231 cells

A: Changes in autophagy flow of cells after co-transfected of mCherry-EGFP-LC3 with NCTD are detected by confocal microscopy (EGFP (green): autophagosome, mCherry (red): autolysosome, DAPI (blue): nucleus); B: Immunoblotting analysis of P62 in NCTD-treated cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$); C: Expression of ubiquitinylated protein in NCTD-treated cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

** $P < 0.01$ vs control group

胞凋亡与线粒体功能障碍密切相关。

线粒体自噬是线粒体质量控制的一种形式，

用于去除功能不佳的线粒体^[29]。有研究发现，PINK1/Parkin 信号通路是介导哺乳动物细胞线粒

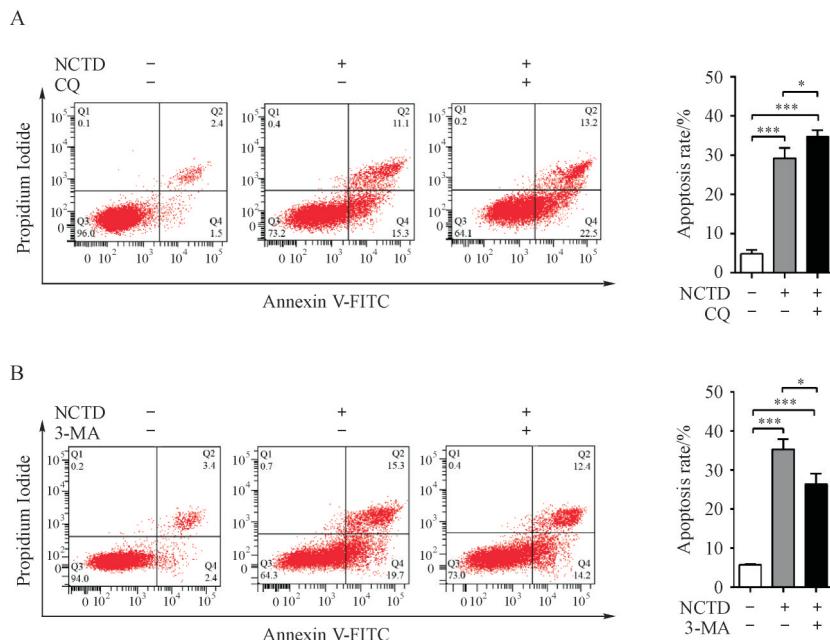


Figure 6 NCTD leads to apoptosis by inducing the accumulation of autophagosomes

A: Apoptosis rates of cells after NCTD combined with/without chloroquine (CQ) are detected by flow cytometry ($\bar{x} \pm s, n = 3$); B: Apoptosis rates of cells after NCTD combined with/without 3-methyladenine (3-MA) are detected by flow cytometry ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control group

体自噬的关键信号通路^[18]。其中,活化的 Parkin 作为线粒体自噬信号的“增强子”,扩大自噬信号,促进受损线粒体的降解;PINK1作为受损线粒体的分子传感器,触发线粒体自噬的起始信号,并将 Parkin 向受损的线粒体募集^[17]。本研究发现 MDA-MB-231 细胞经 NCTD 处理后,细胞质中出现大量自噬特异性结构;此外,高表达的自噬相关标志物 (LC3-II/LC3-I, Atg5 和 PINK1) 以及 Parkin 的线粒体易位进一步证实了 NCTD 诱导 MDA-MB-231 细胞的线粒体自噬。

自噬的诱导通常被认为是营养物再循环和细胞毒性物质清除的适应性和细胞保护性机制,在不同生理状态下可以抑制或刺激细胞凋亡^[30]。通常情况下,自噬通量的形成是实现自噬的必要前提^[31-32]。而自噬通量阻断诱导的自噬小体蓄积可作为一种新的调节方式参与细胞凋亡,其典型特征是 P62 和泛素化蛋白表达增加^[33-35]。本研究发现 MDA-MB-231 细胞经 NCTD 处理后,自噬通量阻断,自噬小体蓄积,并且出现较高的凋亡率。此外, P62 的表达水平和线粒体蛋白的泛素化水平也升高。结合上述结果说明 NCTD 可以抑制 MDA-

MB-231 细胞中自噬小体与溶酶体的融合,并最终导致自噬小体蓄积。

然而,本研究还存在一定的研究局限性。本研究所使用的 mCherry-GFP-LC3 报告质粒不能指示线粒体自噬流水平,故无法明确 NCTD 诱导的线粒体自噬与自噬体累积之间的联系。此外,对于 NCTD 在三阴性乳腺癌中的抗肿瘤作用,仅在一种人 TNBC 细胞 MDA-MB-231 中进行了评价;同时,该研究缺少 NCTD 的动物体内抗肿瘤活性评价,因此,本课题组将在后续同类型研究中进一步完善实验方案。基于上述发现,本研究认为 NCTD 是通过引起细胞中自噬小体积累从而诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡。随后,通过联合使用自噬抑制剂来验证假设。3-MA 能抑制自噬启动和自噬小体形成,而 CQ 能够破坏自噬小体与溶酶体融合并导致自噬小体积累。在本研究中,3-MA 降低了 NCTD 诱导的凋亡,而 CQ 的联合使用显著促进了 NCTD 诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡与自噬小体的积累相关。该研究结果为 NCTD 在 TNBC 治疗中的应用提供了理论依据。

References

- [1] Xu SL. *Inhibitory effect of microRNA-100 on malignant transformation of breast cells and its mechanism* (MicroRNA-100 对乳腺细胞恶性转化的抑制作用及其机制研究)[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2019.
- [2] Song X, Yu ZY. Progression of anti-EGFR targeted therapy for triple negative breast cancer[J]. *Chin J Cancer Prev Treat* (中华肿瘤防治杂志), 2018, **25**(3): 215-220.
- [3] Lou LP. Local recurrence risk and survival analysis of breast cancer patients with T1-2 and one to three positive axillary lymph nodes without postmastectomy radiotherapy (T1-2 期伴 1-3 个腋窝淋巴结转移术后未行放射治疗的乳腺癌患者局部复发风险及生存分析)[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2019.
- [4] Chen XK, Tian HQ. Therapeutic status and progress of triple negative breast cancer[J]. *West J Tradit Chin Med* (西部中医药), 2018, **31**(11): 135-140.
- [5] Wang JQ, Chen J, Sun XY, et al. A mechanism research of novel inhibitor of PAK1 inducing colorectal cancer DLD-1 apoptosis[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2018, **49**(2): 229-237.
- [6] Yi HW, Liu GQ. Inhibition of hydrogen peroxide-induced PC12 cell apoptosis by modafinil[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2004, **35**(3): 271-275.
- [7] Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, **1863**(5): 1066-1077.
- [8] Heslop KA, Rovini A, Hunt EG, et al. JNK activation and translocation to mitochondria mediates mitochondrial dysfunction and cell death induced by VDAC opening and sorafenib in hepatocarcinoma cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, **171**: 113728.
- [9] Zhu WJ, Liu F, Wang L, et al. pPolyHb protects myocardial H9C2 cells against ischemia-reperfusion injury by regulating the Pink1-Parkin-mediated mitochondrial autophagy pathway [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, **47**(1): 1248-1255.
- [10] Chen Y, Chen HN, Wang K, et al. Ketoconazole exacerbates mitophagy to induce apoptosis by downregulating cyclooxygenase-2 in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2019, **70**(1): 66-77.
- [11] Green DR, Levine B. To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate[J]. *Cell*, 2014, **157**(1): 65-75.
- [12] Lyamzaev KG, Tokarchuk AV, Panteleeva AA, et al. Induction of autophagy by depolarization of mitochondria[J]. *Autophagy*, 2018, **14**(5): 921-924.
- [13] Mao JY. Chinese medicine on the treatment of tri-negative breast cancer: meta-analysis and clinical research (中医药治疗三阴性乳腺癌的 Meta 分析及临床研究)[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2018.
- [14] Li XY, Guan QX, Shang YZ, et al. Metal-organic framework IRMOFs coated with a temperature-sensitive gel delivering norcantharidin to treat liver cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2021, **27**(26): 4208-4220.
- [15] Deng LP, Dong J, Cai H, et al. Cantharidin as an antitumor agent: a retrospective review[J]. *Curr Med Chem*, 2013, **20**(2): 159-166.
- [16] Zhang XM, Zhang BF, Zhang PH, et al. Norcantharidin regulates ER α signaling and tamoxifen resistance via targeting miR-873/CDK3 in breast cancer cells[J]. *PLoS One*, 2019, **14**(5): e0217181.
- [17] Liu WH, Chen CG, Gu XJ, et al. AM1241 alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by enhancing Pink1/Parkin-mediated autophagy[J]. *Life Sci*, 2021, **272**: 119228.
- [18] Barazzuol L, Giamogante F, Brini M, et al. PINK1/parkin mediated mitophagy, Ca²⁺ signalling, and ER-mitochondria contacts in Parkinson's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(5): 1772.
- [19] Jeong SJ, Zhang XY, Rodriguez-Velez A, et al. p62/SQSTM1 and selective autophagy in cardiometabolic diseases[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, **31**(6): 458-471.
- [20] Deng ZQ, Lim J, Wang Q, et al. ALS-FTLD-linked mutations of SQSTM1/p62 disrupt selective autophagy and NFE2L2/NRF₂ anti-oxidative stress pathway[J]. *Autophagy*, 2020, **16**(5): 917-931.
- [21] Lin XL, Li S, Zhao Y, et al. Interaction domains of p62: a bridge between p62 and selective autophagy[J]. *DNA Cell Biol*, 2013, **32**(5): 220-227.
- [22] Ye K, Wei QY, Gong ZF, et al. Effect of norcantharidin on the proliferation, apoptosis, and cell cycle of human mesangial cells [J]. *Ren Fail*, 2017, **39**(1): 458-464.
- [23] Yan ZJ, Yang K, Tang X, et al. Norcantharidin nanostructured lipid carrier (NCTD-NLC) suppresses the viability of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and accelerates the apoptosis[J]. *J Immunol Res*, 2022, **2022**: 3851604.
- [24] Ahn CH, Hong KO, Jin B, et al. Contribution of p38 MAPK pathway to norcantharidin-induced programmed cell death in human oral squamous cell carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(14): 3487.
- [25] Wang JS, Xiao XS, Zhang Y, et al. Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells [J]. *J Pineal Res*, 2012, **53**(1): 77-90.
- [26] Liu JL, Zhang LC. Correlation of mitochondrial dysfunction and inflammation with aging[J]. *Chin J Multi Organ Dis Elder* (中华老年多器官疾病杂志), 2019, **18**(6): 469-472.
- [27] Liu X, Wu J, Wang J, et al. Mitochondrial dysfunction is involved in aristolochic acid I-induced apoptosis in renal proximal tubular epithelial cells[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2020, **39**

- (5): 673-682.
- [28] Li LZ, Zhao ZM, Zhang L, et al. Atorvastatin induces mitochondrial dysfunction and cell apoptosis in HepG2 cells via inhibition of the Nrf2 pathway[J]. *J Appl Toxicol*, 2019, **39**(10): 1394-1404.
- [29] Hynes J, Nadanaciva S, Swiss R, et al. A high-throughput dual parameter assay for assessing drug-induced mitochondrial dysfunction provides additional predictivity over two established mitochondrial toxicity assays[J]. *Toxicol In Vitro*, 2013, **27**(2): 560-569.
- [30] Sun Y, Jiang YM, Huang JT, et al. CISD2 enhances the chemosensitivity of gastric cancer through the enhancement of 5-FU-induced apoptosis and the inhibition of autophagy by AKT/mTOR pathway[J]. *Cancer Med*, 2017, **6**(10): 2331-2346.
- [31] Hu P, Gou XQ, Cheng Y, et al. Effects of DENV-2 infection on autophagosome formation, autophagy-lysosome fusion, and lyso-
- somal degradation pathway in HUVECs[J]. *J Guizhou Med Univ* (贵州医科大学学报), 2022, **47**(11): 1274-1280, 1287.
- [32] Tang Y, Wu H, Shao BZ, et al. Celosins inhibit atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice and promote autophagy flow[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, **215**: 74-82.
- [33] Tanaka S, Hikita H, Tatsumi T, et al. Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice[J]. *Hepatology*, 2016, **64**(6): 1994-2014.
- [34] Vera-Ramirez L, Vodnala SK, Nini R, et al. Autophagy promotes the survival of dormant breast cancer cells and metastatic tumour recurrence[J]. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 1944.
- [35] Dolma S, Selvadurai HJ, Lan XY, et al. Inhibition of dopamine receptor D4 impedes autophagic flux, proliferation, and survival of glioblastoma stem cells[J]. *Cancer Cell*, 2016, **29**(6): 859-873.

·本刊讯·

《中国药科大学学报》首届青年编委会暨 期刊发展战略研讨会成功召开

2023年11月24日,《中国药科大学学报》青年编委会成立暨期刊发展战略研讨会在“兴药为民·2023生物医药创新发展大会”期间于杭州成功召开,标志着该期刊在青年编委队伍建设与期刊战略发展方面迈出了重要的一步。常务副主编尤启冬教授、来自全国高校和科研院所的50余位青年学者共同出席了会议。中国药科大学期刊编辑部主任张静编审主持本次会议。

在欢迎辞中,期刊编辑部张静主任强调了首届青年编委会的开创性使命和责任,强调每一位成员的参与对于期刊的发展至关重要。随后,编辑部主任陈玲编审汇报了《中国药科大学学报》的基本情况,包括刊物的发展历程、目前的学术地位以及在编辑出版方面的努力。她特别介绍了首届青年编委会的遴选和产生办法,以及青年编委的职责和权利,为新一届青年编委会的工作打下了坚实基础。

在隆重的首届青年编委聘任仪式上,常务副主编尤启冬教授为到会的青年编委颁发了《中国药科大学学报》首届青年编委会委员聘书。聘任仪式之后,尤启冬副主编对青年编委表示祝贺,并强调了青年编委在期刊发展中的重要角色。尤启冬副主编鼓励青年编委们在本次会议中充分交流,提出建议,为期刊的发展献计献策,共同推动期刊朝着高质量发展的目标迈进。

在座谈环节,青年编委们一致表示将积极履行青年编委的职责,将期刊的学术水平提升至更高的高度。与会者们自由而深入的交流和讨论,为编辑部未来办刊提供了丰富的思路和宝贵的建议。会议的最后阶段,常务副主编尤启冬教授对各位青年编委在会上的讨论和发言进行了总结,回应了青年编委们提出的关于杂志发展的各类问题。他表示,会后编辑部将深度思考青年编委们提出的意见和建议,力求采纳大部分意见并做出改进。

这次会议的成功举办将进一步推动《中国药科大学学报》提升稿件质量、拓宽办刊思路和优化办刊模式。编辑部将与编委、青年编委共同努力,集思广益,共同助力期刊在高质量稿源、多维度宣传、多层次交流和组织建设等方面取得更为显著的成绩。

(本刊编辑部)