

柴胡皂苷 A 诱导鼻咽癌细胞凋亡及其机制研究

王薇

【摘要】 目的 初步研究不同浓度的柴胡皂苷 A (saikosaponin A, SSA) 对鼻咽癌细胞凋亡诱导作用及其机制。**方法** 体外常规培养人鼻咽癌 5-8F 细胞, 将 SSA 溶解于含 0.2% 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 高糖培养基中, 分别以 0 (对照组)、5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ SSA 作用于鼻咽癌细胞 48 小时, 之后用免疫印迹法检测不同浓度的 SSA 对鼻咽癌细胞总的细胞外调节蛋白激酶 (total extracellular signal regulated protein kinase, t-ERK) 及磷酸化的细胞外调节蛋白激酶 (phosphorylated extracellular signal regulated protein kinase, p-ERK) 蛋白表达量的影响, 并通过流式细胞仪检测细胞凋亡水平的变化。**结果** 与对照组相比, 10 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ SSA 作用 48 小时, 鼻咽癌细胞中 ERK 蛋白磷酸化水平明显降低, 差异有统计学意义; 而与对照组相比, 10 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ SSA 处理的鼻咽癌细胞凋亡细胞数明显增加, 差异有统计学意义, 且随着 SSA 浓度的增加, 凋亡细胞数也相应增多。**结论** 一定浓度的 SSA 可引起鼻咽癌细胞凋亡率的上升, 其机制可能与抑制 ERK 蛋白磷酸化表达有关。

【关键词】 细胞外信号调节激酶; 凋亡; 柴胡皂苷 A; 鼻咽癌细胞

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.08.002

Saikosaponin A inducing apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cell and its underlying mechanisms: an experimental study WANG Wei. Department of ear-nose-throat, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Huhhot 010059, China

Corresponding author: WANG Wei, E-mail: huangyongabc123@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of saikosaponin A (SSA) on p-ERK expressions and apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cell. **Methods** SH-SY5Y cells were established in vitro firstly, then SSA was dissolved in high glucose DMEM cultures which include 0.2% DMSO, and the cultures were pretreated individually with 0 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$ SSA for 48 hours, and then, the expressions of t-ERK and p-ERK were analyzed by western-blotting in the cells for different concentrations of SSA. At the same time, apoptosis levels of cells were analyzed flow cytometry. **Results** A significant inhibition of p-ERK was observed in 5-8F cells after treatment with SSA from 10 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ groups for 48 h. It also shows that SSA from 10 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ groups could also induce the apoptosis of 5-8F cells. **Conclusion** These results demonstrate that SSA can promote the apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells, and the mechanism may be related to the inhibition of ERK active expression.

【Keywords】 Extracellular signal regulated protein kinase; Apoptosis; Saikosaponin A; Nasopharyngeal carcinoma cell

柴胡的主要生物活性成分为柴胡皂苷 (saikosaponin, SS) 及挥发油, SS 根据其结构的不同, 又分

为柴胡皂苷 A、B、D、E、F 和 H (SSA、SSB1 ~ 4、SSD、SSE、SSF、SSH) 等。大量的研究结果显示, SS 具有抗炎、免疫系统调节、抗肝纤维化、抑制肿瘤生长等多种生物活性作用^[1-4]。对于 SS 抗癌作用机制的研究结果显示, SS 可通过活化 caspase-3 而启动肿瘤细胞的凋亡程序, 并可通过诱导瘤细胞分化而抑

作者单位: 010059 呼和浩特, 内蒙古医科大学附属医院耳鼻喉科 (王薇)

作者简介: 王薇 (1971 -), 女, 硕士, 副主任医师。研究方向: 鼻部肿瘤免疫调节。E-mail: huangyongabc123@163.com

制细胞增殖,改变细胞形态。SSA、SSD 可抑制细胞增殖,改变细胞形态,而且柴胡皂苷 A 可显著抑制谷氨酰胺合成酶和环核苷酸磷酸水解酶的活性。研究表明 SSA、SSD、SSE 可以降低抗实体肿瘤细胞分子黏附而达到显著抑制肿瘤的作用^[5-6]。

SSA 具有抗炎、抗病毒、抗癌的作用,本实验通过研究 SSA 对鼻咽癌细胞细胞外调节蛋白激酶(extracellular signal regulated protein kinase, ERK)蛋白磷酸化及细胞凋亡水平的影响,以期对 SSA 诱导肿瘤细胞鼻咽癌增殖抑制的相应机制进行进一步的探讨。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

鼻咽癌细胞 5-8F 细胞株来源于中国科学院上海生命科学研究院;胎牛血清购自北京中杉生物科技股份有限公司产品(批号:20110628011);Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)高糖培养基为美国 Hyclone 公司产品(批号:12100046);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)为天津市大茂化学试剂厂产品(批号:201010036);二辛可酸(bicinchoninic acid, BCA)法蛋白定量试剂盒购自碧云天生物制品有限公司;SSA 购自于中国药品生物制品检定所(批号:20736-09-8);ERK 及 p-ERK 抗体为美国 Abcam 公司产品(#4376)。

1.2 仪器

超净台为苏州净化仪器厂产品;细胞培养箱购自于北京安若生化科技有限公司;低温高速离心机,美国贝克曼库尔特公司生产;电泳仪及转印槽为北京六一仪器厂产品;24 孔板为美国 CORNING 公司产品。

1.3 细胞培养及传代

鼻咽癌 5-8F 细胞株接种于无菌细胞培养瓶中,置于 5% CO₂ 的恒温培养箱中 37℃ 常规培养,至培养瓶底面积 80% 之后进行传代,0.25% 胰蛋白酶消化约 2 分钟,加入 DMEM 高糖培养基(含 10% 的灭活胎牛血清,100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素),制成单细胞悬液,重新接种于无菌培养瓶,常规培养。

1.4 SSA 药物配制

研究显示,当体积分数为 0.1% ~ 0.4% 时,DM-SO 对癌细胞的形态及增殖能力没有明显影响^[7],故本研究中将 SSA 标准品粉末溶于含 0.2% DMSO 的

DMEM 培养基,按照 SSA 终浓度分为不同处理组,分别为 0 (对照组)、5 μmol/L 组、10 μmol/L 组、20 μmol/L 组。

1.5 流式细胞术检测鼻咽癌细胞凋亡水平

鼻咽癌细胞常规培养并给予 0、5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L SSA 不同浓度的 SSA,继续作用 48 小时,0.25% 的胰酶消化 2 分钟,制成单细胞悬液,进行膜联蛋白 V (Annexin V)-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)双染色流式细胞术检测,测定存活细胞(Live)、早期凋亡细胞(Early Apop.)、晚期凋亡或死亡细胞(Late Apop./Dead)、死亡细胞(Dead),每组重复检测 6 次。绘制不同浓度 SSA 干预鼻咽癌细胞后细胞凋亡情况的二维点图。

1.6 免疫印迹法检测 t-ERK 及 p-ERK 蛋白表达水平

鼻咽癌细胞以含 0、5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L SSA 的 DMEM 培养基培养 48 小时后,吹打收集细胞,4℃ 预冷的裂解液裂解 10 分钟,BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白含量,之后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,4℃ 低温条件下进行半干法电转。50 g/L 脱脂奶粉封闭,ERK 及 p-ERK 一抗分别用封闭液按 1:1000 稀释后孵育,4℃ 过夜。后用 TBST 液洗膜 3 次 × 5 分钟,将二抗用封闭液按比例稀释后滴加于硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane, NC)上,37℃ 孵育 1 小时,TBS 洗膜 3 次 × 5 分钟。在膜上滴加 1 ml 化学荧光液反应 1 分钟,在暗盒中用 X 光胶片压片成像。内参为甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)。图像扫描形成 *.tif 电子文件,经 Gel Pro 凝胶成像分析系统进行分析蛋白含量。每组重复检测 6 次。

1.7 统计学分析

实验数据均以表示,使用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。细胞凋亡率,p-ERK、t-ERK 蛋白表达的校正光密度值,以及这两个光密度值间的比值,均采用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测细胞凋亡率

结果显示,鼻咽癌 5-8F 细胞给予不同浓度 SSA 作用 48 小时后,对照组凋亡细胞数达 $(8.28 \pm 0.87)\%$,5 μmol/L SSA 组凋亡细胞数为 $(10.16 \pm$

0.96)% ,10 $\mu\text{mol/L}$ SSA 组凋亡细胞数达 $(29.87 \pm 3.01)\%$,20 $\mu\text{mol/L}$ SSA 组凋亡细胞则达 $(62.95 \pm 6.79)\%$,非参数检验分析结果显示各组凋亡率不完全相同($P=0.000$) ,结果显示,5 $\mu\text{mol/L}$ SSA 组与对照组相比无显著差异($P=0.214$) ,而 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ SSA 组与对照组相比均有显著差异($P=0.000$) ;且随着 SSA 浓度增加,凋亡细胞数逐渐增多,二者呈明显的剂量效应关系。见表 1,图 1。图 1 横、纵坐标为两种染色在流式细胞仪中测得荧光信号的 lg 值。

表 1 不同浓度 SSA 对鼻咽癌细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	凋亡率(%)
对照组	8.28 ± 0.87
5 $\mu\text{mol/L}$	10.32 ± 1.31
10 $\mu\text{mol/L}$	29.96 ± 2.35
20 $\mu\text{mol/L}$	62.53 ± 3.20

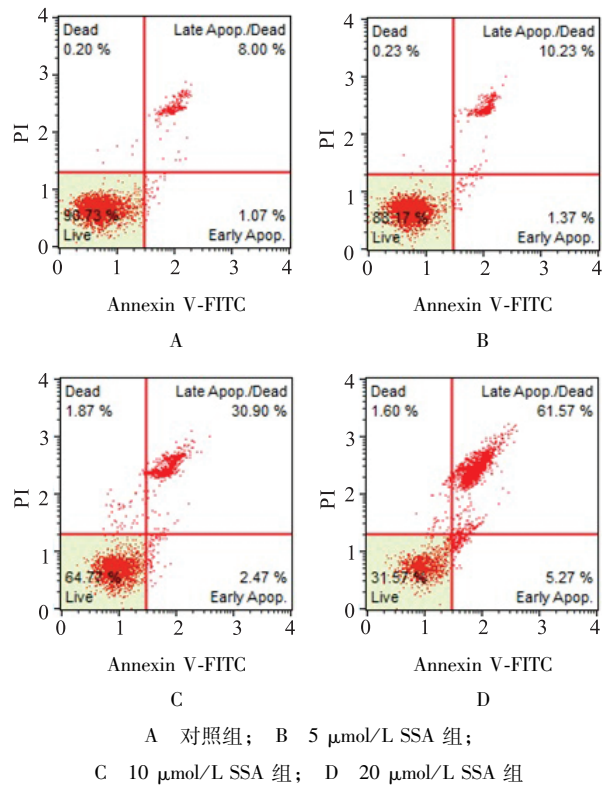


图 1 SSA 干预鼻咽癌细胞后细胞凋亡情况的二维点图

2.2 SSA 对鼻咽癌细胞 t-ERK 及 p-ERK 蛋白表达光密度值的影响

免疫印迹结果如图 2。鼻咽癌细胞给予 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ SSA 作用 48 小时后,非参数检验分析,对照组,5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 及 20 $\mu\text{mol/L}$ SSA

组,t-ERK 蛋白表达光密度值水平未见显著改变($P=0.43$)。

而随着 SSA 浓度的增加,鼻咽癌细胞 p-ERK 表达量逐渐减少,各组间 p-ERK/t-ERK 比值有显著差异($P=0.000$) ,其中 10 $\mu\text{mol/L}$ 及 20 $\mu\text{mol/L}$ SSA 组比值与对照组相比显著降低($P<0.05$,表 2)。

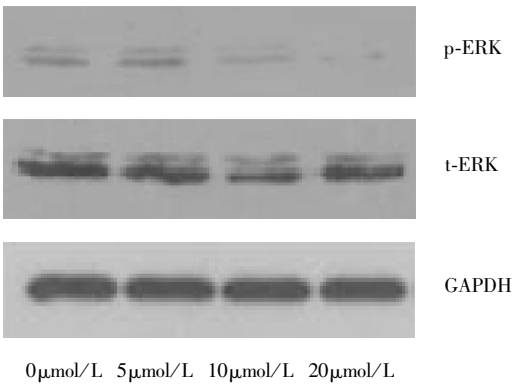


图 2 免疫印迹法检测 SSA 对鼻咽癌细胞 p-ERK、t-ERK 的影响

表 2 不同浓度 SSA 对鼻咽癌细胞 p-ERK、t-ERK 蛋白表达光密度值影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	校正光密度值		p-ERK/t-ERK
	p-ERK	t-ERK	
对照组	0.31 ± 0.05	0.82 ± 0.08	0.379 ± 0.080
5 $\mu\text{mol/L}$	0.27 ± 0.04	0.87 ± 0.09	0.323 ± 0.039
10 $\mu\text{mol/L}$	0.14 ± 0.03	0.79 ± 0.11	0.166 ± 0.031
20 $\mu\text{mol/L}$	0.05 ± 0.01	0.81 ± 0.12	0.070 ± 0.016

3 讨论

柴胡根中主要成分为 SS,其次含有植物甾醇、侧金盏花醇,以及少量挥发油、多糖。至今为止,共研究了该属 20 多种柴胡,从柴胡属植物已分离出 90 多种皂苷类成分,发现了 30 多种新化合物。近年来,分离鉴定的皂苷为 40 余个,文献报道较多的是 SSA、SSB、SSC、SSD 等^[7-8]。

SS 具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤、调节内分泌及免疫系统等作用。Motoo 等^[9]研究了 SS 不同组分对肝、胰腺肿瘤细胞的作用,发现 SSA 的浓度为 50 mg/ml 或者 1000 mg/ml SSB、SSC,可抑制 50% 肝肿瘤细胞,50 mg/ml SSA 还可抑制肿瘤细胞的生长和 DNA 的合成。Chiang 等^[10]的研究还发现 SS 还可通过活化 Caspase3, Caspase7 诱导 HepG2 人类肝肿瘤细胞凋亡,从而实现抗肿瘤的作用。Tsai 等^[11]研究还证实,SSA、SSB、SSB2、SSC、SSD 可诱导小鼠胶

质瘤细胞分化。

丝裂原活化的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是真核生物中的重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在细胞的生长、增殖、存活、死亡相关信号通路中发挥重要作用。在哺乳动物细胞中,MAPK 家族中最重要的有 ERK, JNK/SAPK (c-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase) 以及 P38-MAPK 三个亚家族成员。目前认为,ERK 在细胞增殖和分化信号转导网络中处于关键地位。研究显示,ERK 蛋白失活可使细胞停滞于 G1 期,从而抑制了细胞增殖。而 ERK 蛋白的过度磷酸化活化则可加速细胞的有丝分裂进程,促进细胞增殖^[12]。本研究结果表明,一定浓度的 SSA 可引起鼻咽癌细胞中 p-ERK 表达量的明显降低,且随着 SSA 浓度的增加,ERK 磷酸化水平呈逐渐下降趋势,提示 ERK 信号转导通路的抑制作用可能参与了 SSA 诱导的肿瘤细胞生长增殖抑制。

ERK 生物活性具有多样性和复杂性,在不同的条件下对不同的细胞可以表现出促进或抑制凋亡的双重作用。如 Zhao 等^[13]研究发现,依达拉奉可通过抑制 ERK 的磷酸化激活而减轻 H₂O₂ 引起的细胞凋亡;而 Zhuang 等^[14]经实验证实氧化应激、毒物及生长因子缺乏等刺激因素可激活 ERK1/2,并进一步诱发神经细胞和肾上皮细胞凋亡,说明 ERK 信号转导通路的活化可促进相应细胞的凋亡。Kim 等^[15]证实酪氨酸蛋白酶抑制剂可通过抑制 ERK 磷酸化而使细胞周期停滞于 G1 期,从而诱导细胞凋亡,Karimian 等^[16]也证实血管紧张素 II 可通过增强 ERK 的磷酸化活性而减轻胆汁酸盐引起的细胞凋亡,而且这一过程可能与内质网引起的细胞凋亡途径活化有关。本研究表明,一定浓度的 SSA 在引起鼻咽癌细胞中 ERK 蛋白磷酸化抑制的同时,细胞的凋亡率也随着 SSA 浓度的增加而升高,提示 ERK 信号转导通路的抑制作用可能参与了 SSA 诱导的肿瘤细胞生长增殖抑制及凋亡过程。

参 考 文 献

- [1] Jia X, Dang S, Cheng Y, et al. Effects of saikosaponin-d on syndecan-2, matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in rats with hepatocellular carcinoma[J]. J Tradit Chin Med, 2012, 32(3): 415-422.
- [2] 薛冬英,刘光伟,陈一奕,等. 干扰素- α 联合柴胡皂苷对免疫性肝损伤小鼠血清 T 淋巴细胞亚群和肝组织细胞因子的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(1): 68-71.
- [3] Lu CN, Yuan ZG, Zhang XL, et al. Saikosaponin a and its epimer saikosaponin d exhibit anti-inflammatory activity by suppressing activation of NF- κ B signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2012, 14(1): 121-126.
- [4] Wu SJ, Lin YH, Chu CC, et al. Curcumin or saikosaponin a improves hepatic antioxidant capacity and protects against CCl₄-induced liver injury in rats[J]. J Med Food, 2008, 11(2): 224-229.
- [5] Wang Q, Zheng XL, Yang L, et al. Reactive oxygen species-mediated apoptosis contributes to chemosensitization effect of saikosaponins on cisplatin-induced cytotoxicity in cancer cells[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29: 159.
- [6] 任牡丹,卢新兰,和水祥,等. 柴胡皂甙 d 对人肝癌细胞 COX-2 表达及细胞内钙离子的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(29): 3587-3594.
- [7] 贾琦,张如益. 柴胡属植物中皂苷化学研究进展[J]. 药学学报, 1989, 24(12): 961-964.
- [8] 刘沁舫,谭利,白焱晶,等. 柴胡属植物皂苷近 10 年研究概况[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(1): 7-9.
- [9] Motoo Y, Sawabu N. Antitumor effects of saikosaponins, baicalin and baicalein on human hepatoma cell lines[J]. Cancer Lett, 1994, 86(1): 91-96.
- [10] Chiang LC, Ng LT, Liu LT, et al. Cytotoxicity and antihepatitis B virus activities of saikosaponins from Bupleurum species[J]. Planta Med, 2003, 69(8): 705-709.
- [11] Tsai YJ, Chen IL, Homg LY, et al. Induction of differentiation in rat C6 glioma cells with Saikosaponins[J]. Phytother Res, 2002, 16(2): 117-121.
- [12] Chen TJ, Gao F, Yang T, et al. CDK-associated Cullin 1 promotes cell proliferation with activation of ERK1/2 in human lung cancer A549 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 437(1): 108-113.
- [13] Zhao ZY, Luan P, Huang SX, et al. Edaravone protects HT22 neurons from H₂O₂-induced apoptosis by inhibiting the MAPK signaling pathway[J]. CNS Neurosci Ther, 2013, 19(3): 163-169.
- [14] Zhuang S, Schnellmann RG. A death-promoting role for extracellular signal-regulated kinase[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 319(3): 991-997.
- [15] Kim HJ, Kim HP, Yoon YK, et al. Antitumor activity of HM781-36B, a pan-HER tyrosine kinase inhibitor, in HER2-amplified breast cancer cells[J]. Anticancer Drugs, 2012, 23(3): 288-297.
- [16] Karimian G, Buist-Homan M, Mikus B, et al. Angiotensin II protects primary rat hepatocytes against bile salt-induced apoptosis[J]. PLoS One, 2012, 7(12): 526-547.

(收稿日期:2013-10-24)

(本文编辑:黄凡)