

ERK1/2 在黄芪多糖促进 HepG2 细胞凋亡中的作用

王宏艳*

(齐齐哈尔医学院第一附属医院, 黑龙江 齐齐哈尔 161041)

[摘要] 目的:阐明黄芪多糖与 ERK1/2 通路在 HepG2 细胞凋亡中的作用。方法:实验分为 4 组:空白对照组(control); B 组, 20 mg·L⁻¹黄芪多糖 3 个剂量处理组(AP, 20, 40, 80 mg·L⁻¹黄芪多糖处理组(AP, 40, 80 mg·L⁻¹), 药物处理 24 h 后检测各指标。应用 Western blot, MTT, TUNEL, 线粒体膜电势检测等方法检测黄芪多糖对 HepG2 细胞生存凋亡及细胞中 ERK1/2 表达量的影响。结果:MTT 与 TUNEL 表明黄芪多糖对 HepG2 细胞的凋亡具有促进作用, 增加 HepG2 细胞的 caspase-3 的活性, 降低(HepG2)细胞线粒体的膜电位, 降低 Bcl-2 表达;黄芪多糖可以降低 ERK1/2 的表达, 表明黄芪多糖的凋亡促进作用可能通过 ERK1/2 途径。结论:黄芪多糖可以通过抑制 ERK1/2 信号通路促进 HepG2 细胞的凋亡。

[关键词] 黄芪多糖; HepG2 细胞; ERK1/2; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0235-04

The Role of ERK1/2 in Astragalus Polysaccharide-induced Apoptosis in HepG2 Cell Line

WANG Hong-yan*

(The First Hospital of Qiqihar Medical School, Qiqihaer 161041, China)

[Abstract] **Objective:** Although astragalus polysaccharide (AP) is known to have apoptotic effect in many cancer cells, the mechanisms are still poorly understood. We aim to test whether apoptotic effect of astragalus polysaccharide is regulated by the ERK1/2 pathway in HepG2 cells. **Method:** Cells were divided into 4 groups and treated with different pharmaceuticals: control, group 20, 40, 80 mg·L⁻¹ AP. We studied the effect of AP on cell survival using Western blot, cell viability measurement, TUNEL assay and mitochondrial potential analysis, caspase-3 activity measurement. **Result:** Astragalus polysaccharide has apoptotic responses in HepG2 cells, including mitochondrial depolarization and the apoptosis-specific proteins up-regulation, Bcl-2 down-regulation. **Conclusion:** These results suggest that ERK1/2 pathway is necessary for the effects of astragalus polysaccharide in inhibiting cell proliferation of HepG2 cells.

[Key words] astragalus polysaccharide; HepG2; ERK1/2; apoptosis

原发性肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一,起病缓慢、发病率高、病情发展迅速,早期不易发现,临床发现后大部分患者已失去手术治疗机会^[1]。因此,药物治疗是其主要的治疗手段,并且一直是研究的热点。

黄芪多糖(astragalus polysaccharide, AP)是从黄芪根中提取的一类大分子活性成分,为中药黄芪抗

肿瘤的主要有效成分^[2]。现研究表明 APS 可抑制人肝癌细胞株的增殖,升高白蛋白含量,并降低肝癌细胞高水平分泌甲胎蛋白,诱导肝癌细胞凋亡。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂及主要仪器 黄芪多糖购自陕西中鑫生物技术有限公司,批号 20100204,多糖含量 50%。Bcl-2 抗体购自 Santa 公司,ERK 抗体购自 Santa 公司。线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)购自碧云天公司,caspase-3 活力试剂盒购自上海碧云天公司,HRP-山羊抗兔 IgG 购自 Jackson ImmunoResearch 公司。

[收稿日期] 2011-11-01

[通讯作者] *王宏艳,学士,主管药师,从事中药药理学研究,
Tel:15645229825, E-mail:244398459@qq.com

MCO-15ACO₂ 细胞培养箱 (SANYO 公司), IX70 倒置显微镜 (日本 olympus), 721 分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司), 680 型酶标仪 (Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 HepG2 细胞系 HepG2 细胞系为本实验室保存。

1.2.2 分组及细胞培养 肝癌细胞株 HepG2 常规培养于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 2 d 换液 1 次。取对数生长期细胞给药, 根据实验要求分组换新鲜配制的含不同药物的培养液, 分为 4 组: 空白对照组 (control), 不含药物, 使用同体积的磷酸盐缓冲液 (PBS); 黄芪多糖 3 个剂量处理组 (AP, 20, 40, 80 mg·L⁻¹), 药物处理 24 h 后检测各指标。

1.2.3 噻唑蓝 (MTT) 测定 细胞接种于 96 孔培养板, 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 3 d, 细胞随机分组, 药物作用结束后, 取出 96 孔板, 每孔加 MTT 溶液 (5 g·L⁻¹) 20 μL, 铝箔包裹培养板, 37 °C 湿润环境中温育 4 h。弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 使结晶完全溶解。酶标仪选择 490 nm 波长, 测定各孔吸光度 (A)。

1.2.4 TUNEL 测定 细胞接种于六孔培养板, 37 °C、5% CO₂ 孵箱中孵育, 每孔加入相应浓度药物。PBS 洗涤一次, 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min。PBS 洗涤一次后, 加入 0.1% TritonX-100 的 PBS 洗涤液, 冰上孵育 2 min, PBS 洗涤 2 次。样品中加入 50 μL TUNEL 检测液, 37 °C 避光孵育 60 min。PBS 洗涤 3 次。波长 488 nm 及 530 nm 发射波长的荧光显微镜下成像, 每孔随机选择区域拍照。

1.2.5 Western blot 分析 取各实验分组细胞适量, 冰上 PBS 冲洗细胞后, 加入细胞裂解液, 裂解 30 min, 超声破碎, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后获得蛋白, 考马斯亮蓝法测定蛋白液浓度。100 °C 加热 5 min 后, 进行常规 SDS-PAGE 电泳, 蛋白用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。电泳结束后, 转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h; 加入鼠的抗体 (1:500) 4 °C 过夜; TBS-T 缓冲液洗膜 4 次, 10 min/次; 加入羊抗兔 IgG-HRP 抗体 (1:5 000 稀释), 室温孵育 1 h, TBS-T 洗膜 4 次, 10 min/次, ECL 法显色。照片用吸光度分析仪对特异性条带扫描。背景校正后, 测定每条条带的像素密度, 进行相对定量分析。

1.2.6 caspase-3 酶活性的检测 取适量 pNA 和

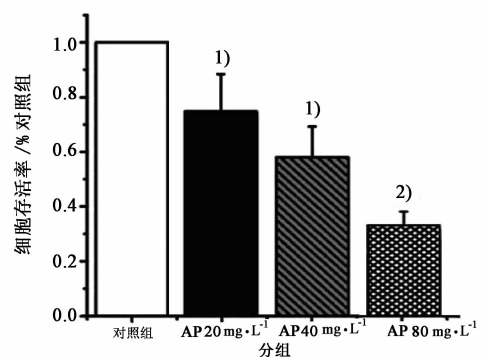
Ac-DEVD-pNA, 置于冰浴上备用。按照说明书设置反应体系, 加入 Ac-DEVD-pNA 后混匀, 37 °C 孵育 60 ~ 120 min, 颜色变化明显时测定 A₄₀₅。样品的 A₄₀₅ 扣除空白对照 A₄₀₅, 即为样品中 caspase-3 催化产生的 pNA 产生的吸光度。通过标准曲线计算样品中催化产生的 pNA。检测待测样品中的蛋白浓度, 计算一个样品单位蛋白中所含的 caspase-3 的酶活力单位。

1.2.7 线粒体膜电位检测法 细胞接种于六孔培养板, 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养, 向每孔加入相应浓度药物。加入 1 mL JC-1 染色工作液, 充分混匀。37 °C 孵育 20 min, 孵育结束后, 吸除上清, 用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次。加入 2 mL 细胞培养液, 488 nm 激发光荧光显微镜下获取电子相片, 每孔随机选择镜头拍照。

1.2.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件处理, 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组内比较采用配对样本 *t* 检验, 组间计量资料均数比较用方差分析和 *q* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪多糖降低 HepG2 细胞存活率 如图 1 所示, 黄芪多糖可以降低细胞存活率, 与对照组相比, 20 mg·L⁻¹ 黄芪多糖处理组细胞存活率下降 24.2%; 40 mg·L⁻¹ 黄芪多糖处理组与对照组相比细胞存活率下降 39.8%; 80 mg·L⁻¹ 黄芪多糖处理组与对照组相比细胞存活率下降 62.5%。



与对照组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01 (图 2 ~ 5 同)

图 1 黄芪多糖对 HepG2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

2.2 黄芪多糖增加 HepG2 线粒体膜电位的降低并降低 Bcl-2 表达 线粒体膜电位降低是细胞凋亡的一个重要指征。结果表明, 与对照组相比, 20 mg·L⁻¹ 黄芪多糖处理组细胞线粒体膜电位降低, 40, 80 mg·L⁻¹ 黄芪多糖处理组与对照组相比 caspase-3 线粒体膜电位显著降低。Bcl-2 蛋白表达

结果显示,黄芪多糖可以下调 Bcl-2 蛋白表达量,20 mg·L⁻¹黄芪多糖处理组与对照组相比 Bcl-2 表达量下降 23.1%,40 mg·L⁻¹黄芪多糖处理组与对照组相比 Bcl-2 表达量下降 34.2%,80 mg·L⁻¹黄芪多糖处理组与对照组相比 Bcl-2 表达量下降 39.5%。见图 2。

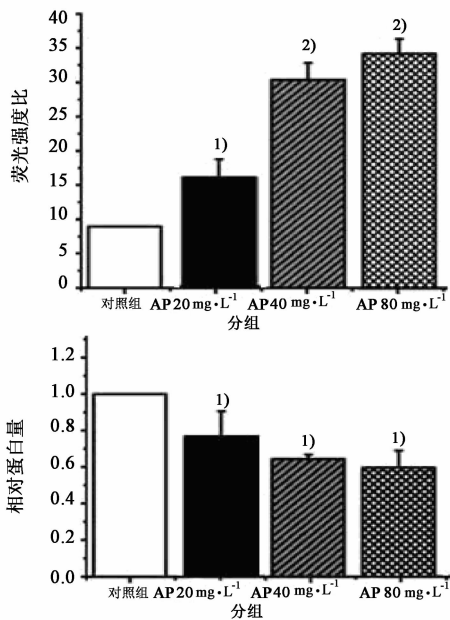


图2 黄芪多糖对 HepG2 细胞线粒体膜电位 (A), Bcl-2 (B) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

2.3 黄芪多糖增加 caspase-3 蛋白活性 caspase-3 在细胞凋亡中起着重要的作用。黄芪多糖可以增加 caspase-3 蛋白活性,与对照组相比,20 mg·L⁻¹黄芪多糖处理组细胞 caspase-3 蛋白活性无统计学差异;40 mg·L⁻¹黄芪多糖处理组,80 mg·L⁻¹黄芪多糖处理组与对照组相比细胞 caspase-3 蛋白活性上升 103% 与 124%。如图 3 所示。

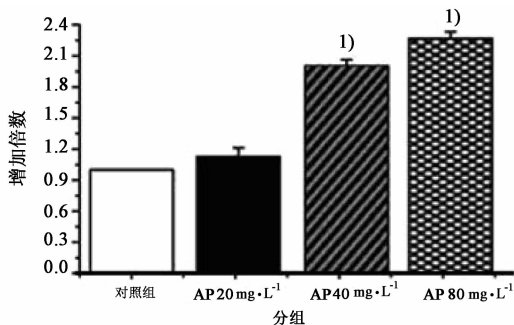


图3 黄芪多糖对 HepG2 细胞 caspase-3 蛋白活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

2.4 黄芪多糖增加 HepG2 细胞中 DNA 的片段化 黄芪多糖显著增加 TUNEL 阳性细胞数,与对照组相比,20 mg·L⁻¹黄芪多糖处理组细胞 TUNEL 阳性

细胞数增加 4.3 倍,40 mg·L⁻¹黄芪多糖处理组 TUNEL 阳性细胞数增加 9.3 倍,80 mg·L⁻¹黄芪多糖处理组增加 11.4 倍。如图 4 所示。

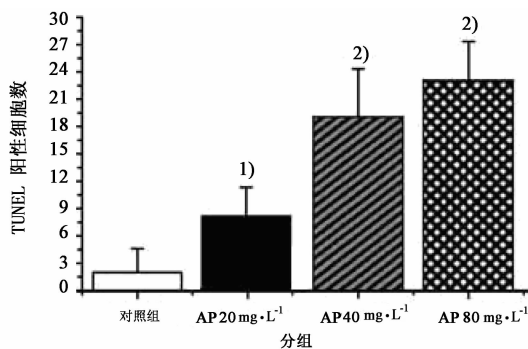


图4 黄芪多糖对 HepG2 细胞中 DNA 的片段化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

2.5 黄芪多糖下调 ERK1/2 蛋白表达量 为了证实黄芪多糖是否通过降低 ERK1/2 通路来促进细胞凋亡,采用 Western blot 的方法检测黄芪多糖对 ERK1/2 表达的影响。结果显示,黄芪多糖可以下调 ERK1/2 蛋白表达量,20 mg·L⁻¹黄芪多糖处理组表达量下降 17.6%,40 mg·L⁻¹黄芪多糖表达量下降 24.2%,80 mg·L⁻¹黄芪多糖处理组表达量下降 51.2%。如图 5 所示。

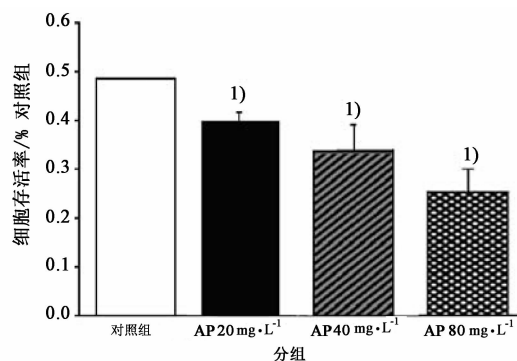


图5 黄芪多糖下调 HepG2 细胞的 ERK1/2 表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

3 讨论

细胞外信号调节激酶 (ERK1/2) 是细胞内重要的信号转导途径,属于 MAPK (有丝分裂原激活蛋白激酶) 家族一员,是一类丝/苏氨酸蛋白激酶。ERK1/2 参与细胞的生长、发育、分裂等一系列生理过程,其异常表达在细胞的恶性转化和肿瘤的发生发展中起重要作用^[3-4]。

Bcl-2 是 Bcl 凋亡抑制基因家族中的一员。Bcl 凋亡抑制基因家族能促进细胞长期存活、抑制细胞凋亡。与正常组织细胞相比,分化差、体积大的癌细胞中 Bcl-2 蛋白表达增强。因此,降低 Bcl-2 蛋白表

大蒜 3 个有效部位配伍对 3 种人胃癌细胞的杀伤作用

薛欣, 张立石, 王瑞海, 柏冬, 鞠大宏, 刘丽梅*

(中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 观察大蒜 3 个有效部位组合物对 3 种人胃癌细胞的杀伤作用, 筛选有效部位组合物最佳配伍比例。方法: 以大蒜 3 个有效部位(大蒜油、大蒜总多糖、大蒜总皂苷)为研究对象, 选用 $L_{16}(4^5)$ 正交表设计分组、给药, 以胃癌细胞代谢 MTT 活力(抑瘤百分率)作为考察指标, 采用 SPSS 软件对实验数据进行处理。结果: 大蒜 3 个有效部位对 MKN45 细胞杀伤作用的主次顺序为大蒜油(1[#]) > 大蒜总多糖(2[#]) > 大蒜总皂苷(5[#]), 其最佳配比为 1[#]: 2[#]: 5[#] = 1: 20: 10。大蒜 3 个有效部位对 AGS 细胞抑制率影响无明显差别, 其最佳配比为 1[#]: 2[#]: 5[#] = 1: 13. 3: 3. 3。大蒜总皂苷对人胃癌 HGC-27 细胞抑制率的影响显著($P < 0.01$), 影响的主次顺序为大蒜总皂苷 > 大蒜油 > 大蒜总多糖, 其最佳配比为 1[#]: 2[#]: 5[#] = 1: 200: 50。结论: 3 种人胃癌细胞对大蒜 3 个有效部位组合物的杀伤作用的敏感性不同, 3 个有效部位组合对 3 种人胃癌细胞杀伤作用的最佳配比浓度亦不相同。

[关键词] 大蒜油; 大蒜总多糖; 大蒜总皂苷; 人胃癌细胞; 正交试验

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0238-04

Cytotoxic Effect of Components Formula of Three Garlic Components on Three Human Gastric Carcinoma Cells

XUE Xin, ZHANG Li-shi, WANG Rui-hai, BAI Dong, JU Da-hong, LIU Li-mei*

(Institute of Basic Theory of Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China)

[收稿日期] 2011-11-28

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项平台子课题(2009ZX09301-005-11)

[第一作者] 薛欣, 博士, 副研究员, 从事肿瘤免疫研究, Tel: 010-64014411-2556, E-mail: xuexinmed@163.com

[通讯作者] *刘丽梅, 学士, 研究员, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 010-64014411-2592, E-mail: liulimeihrb@sina.com

达可以有效促进肝癌细胞凋亡。

目前认为, 肿瘤发病的一个途径是细胞过度增殖, 另一途径是凋亡受阻或细胞死亡不足, 导致病变组织内肿瘤细胞存活延长, 细胞群体存活与死亡的平衡破坏, 存活大于死亡, 肿瘤细胞净增长数目加大。凋亡相关基因的表达异常导致细胞增殖过多和凋亡减少^[5]。因此, 抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡已成为肿瘤治疗的重要手段之一。

本研究结果表明, 黄芪多糖对 HepG2 细胞的凋亡具有促进作用。增加 caspase-3 的活性, 增加线粒体膜电位的降低, 并降低 Bel-2 表达; 黄芪多糖可以降低 ERK1/2 的表达从而促进 HepG2 细胞的凋亡。本实验初步探讨了黄芪多糖促进 HepG2 细胞凋亡的机制, 为进一步研究黄芪多糖影响肿瘤细胞生长的机制奠定了一定的基础。

[参考文献]

- [1] Altaca G, Demiralay E, Kalayci S A, et al. Giant malignant gastrointestinal stromal tumor presenting as an intraabdominal abscess [J]. J Gastrointest Liver Dis, 2009, 18(4): 515.
- [2] Lee K Y, Jeon Y J. Macrophage activation by polysaccharide isolated from Astragalus membranaceus [J]. Int Immunopharmacol, 2005, 5(7/8): 1225.
- [3] Webb C P, Van A L, Wigler M H, et al. Signaling pathways in Ras-mediated tumorigenicity and metastasis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(15): 8773.
- [4] Widmann C, Gibson S, Jarpe M B, et al. Mitogen activated protein kinase: conservation of a three kinase module from yeast to human [J]. Physiol Rev, 1999, 79(1): 143.

[责任编辑 古云侠]