

# 白头翁皂苷对 NCI-H460 细胞增殖、凋亡的影响 及其差异表达蛋白筛选

官紫祎<sup>1,2</sup>, 陈兰英<sup>1,2\*</sup>, 罗颖颖<sup>1,2</sup>, 崔亚茹<sup>1</sup>, 寿斌耀<sup>1,2</sup>, 周立芬<sup>2</sup>  
(1. 江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006;  
2. 江西中医药大学 药学院, 南昌 330004)

**[摘要]** **目的:**采用 nano LC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 技术筛选白头翁皂苷抑制人大细胞肺癌细胞 NCI-H460 增殖及诱导凋亡作用的差异表达蛋白,初步推测其作用机制。**方法:**通过体外培养 NCI-H460,人卵巢腺癌细胞 SK-OV-3,人胃腺癌细胞 SGC-7901,利用噻唑蓝 (MTT) 比色法检测白头翁皂苷的抗肿瘤活性;磷脂酰丝氨酸外翻分析-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶 (Annexin V-FITC/PI) 染色流式细胞术及 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 染色检测对细胞凋亡的影响;运用 nano LC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 技术对白头翁皂苷干预后 NCI-H460 细胞全蛋白进行分析与鉴定;利用 Thermo Proteome Discoverer 1.4 软件进行蛋白质鉴定, Sieve 2.1 软件对所有样本蛋白进行相对定量分析,筛选并鉴定差异表达蛋白后,通过 DAVID Bioinformatics Resources 6.8 和京都基因及基因组百科全书 (KEGG) 数据库对差异表达蛋白进行生物信息学分析。**结果:**白头翁皂苷对 NCI-H460, SK-OV-3 及 SGC-7901 细胞的增殖均有一定的抑制作用,且能诱导 NCI-H460 细胞的凋亡。白头翁皂苷主要通过调节核糖体的生物功能、糖酵解/糖异生、碳代谢、蛋白质的生物合成及 mRNA 的代谢等生物进程来影响 NCI-H460 细胞的增殖及凋亡,可能通过干预丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路和调控 Caspase 途径来诱导 NCI-H460 细胞的凋亡。**结论:**白头翁皂苷具有抑制 NCI-H460 细胞增殖及诱导其凋亡的作用,其作用机制可能与干预 MAPK 信号通路和调控 Caspase 途径等有关,为研究白头翁皂苷抗肿瘤的分子机制提供了新思路。

**[关键词]** 白头翁皂苷; 抗肿瘤; 凋亡; 蛋白质组学; 质谱检测; Caspase 途径; 丝裂原活化蛋白激酶

**[中图分类号]** R22;R24;R73;R28;C37;TS193;R96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)18-0049-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.sjfx.20191451

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190401.1153.005.html>

**[网络出版时间]** 2019-04-02 9:01

## Effect of Saponins in Pulsatillae Radix on Proliferation and Apoptosis of NCI-H460 Lung Cancer Cells and Screening of Its Differentially Expressed Proteins

GUAN Zi-yi<sup>1,2</sup>, CHEN Lan-ying<sup>1,2\*</sup>, LUO Ying-ying<sup>1,2</sup>, CUI Ya-ru<sup>1</sup>,  
SHOU Bin-yao<sup>1,2</sup>, ZHOU Li-fen<sup>2</sup>

(1. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation of Chinese Herbal Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330006, China;  
2. School of Pharmacy, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To screen the differentially expressed proteins of saponins in Pulsatillae Radix inhibiting the proliferation and induce apoptosis on NCI-H460 tumor cells based on proteome technology using nano LC-LTQ-Orbitrap-MS/MS, and preliminarily speculate the potential mechanism. **Method:** NCI-H460, SK-OV-3

**[收稿日期]** 20181031(024)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81460618,81860720)

**[第一作者]** 官紫祎, 硕士, 从事肿瘤药理学研究, Tel:0791-87119611, E-mail:347439774@qq.com

**[通信作者]** \* 陈兰英, 博士, 教授, 从事中药药理学研究, Tel:0791-87119611, E-mail:clyxy2513@163.com

and SGC-7901 tumor cells were cultured *in vitro*. Methylthiazole tetrazolium (MTT) assay was used to detect the inhibitory rate of saponins in Pulsatillae Radix on three tumor cell lines. Effect of saponins in Pulsatillae Radix on apoptosis was analyzed by Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) /propidium iodide (PI) staining flow cytometry and 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. Apoptosis was analyzed using flow cytometry and DAPI stain. Nano LC-LTQ-Orbitrap-MS/MS was used to investigate the changes in the protein profiles on NCI-H460 cells treated with saponins in Pulsatillae Radix. Proteins exhibiting differential expression were analyzed by DAVID Bioinformatics Resources 6.8 and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) database. The differentially expressed proteins were verified by Western blot. **Result:** Saponins in Pulsatillae Radix could inhibit the proliferation of NCI-H460, SK-OV-3 and SGC-7901 tumor cells and induce apoptosis of NCI-H460 tumor cells. Effect of Saponins in Pulsatillae Radix on the proliferation and apoptosis of NCI-H460 tumor cells was mainly related to the regulation of biological function of ribosome, glycolysis/gluconeogenesis and other biological processes. It was possible to induce apoptosis of NCI-H460 tumor cells by interfering mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway and regulating the Caspase pathway. **Conclusion:** Saponins in Pulsatillae Radix can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of NCI-H460 tumor cells, the mechanism may be related to the intervention of MAPK signaling pathway and the regulation of Caspase pathway. These findings are helpful to elucidate the molecular mechanism of the anti-tumor effect of saponins in Pulsatillae Radix.

[**Key words**] saponins in Pulsatillae Radix; anti-tumor; apoptosis; proteomics; mass spectrometric detection; Caspase pathway; mitogen-activated protein kinase

白头翁为毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* 的干燥根,功效清热解毒、凉血止痢、燥湿杀虫,临床常用于治疗肠道感染及其结肠炎等<sup>[1-2]</sup>。近年来研究发现三萜皂苷类化合物是白头翁中的主要有效成分之一,且此类成分对多种肿瘤细胞的生长有显著的抑制作用<sup>[3]</sup>。本课题组前期研究发现,白头翁皂苷具有良好的体内外抗肿瘤作用,其在体外能干预肿瘤细胞的增殖和诱导肿瘤细胞的凋亡<sup>[4-5]</sup>。但白头翁皂苷在抑制 NCI-H460 肿瘤细胞增殖的作用机制尚不明确。

蛋白质组学是一种高通量、系统化的研究某一类型细胞、组织或体液中所有蛋白质组成及其功能的新技术。利用蛋白质组学技术寻找中药作用靶点已成为中药研究的重要方法之一<sup>[6-7]</sup>。本实验拟考察白头翁皂苷对肿瘤细胞增殖的抑制作用,考察其对 NCI-H460 肿瘤细胞凋亡的影响,通过蛋白质组学技术在整体水平上初步揭示白头翁皂苷抑制 NCI-H460 肿瘤细胞增殖的作用机制,为研究白头翁抗肿瘤作用提供新思路。

## 1 材料

Orbitrap Elite 型质谱仪, EASY-nLC 1000 型超高效液相色谱仪, EASY-Spray C<sub>18</sub> 色谱柱, Acclaim PepMap 100 色谱柱, Pierce C<sub>18</sub> 旋转柱, 300 II -A 型生物安全柜(美国 Thermo Fisher 公司); MCO-20AIC 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(日本三洋公司), SpectraMax i3 型

多功能酶标仪(美国 MD 公司), DMI3000B 型荧光倒置显微镜(德国 Leica 公司), Gallios 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司), 5810R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司), Milli-Q 型超纯水仪(美国 Millipore 公司), LBC7310037 型离心浓缩仪(美国 Labconco 公司), ChemiDoc XRS + 型化学发光成像系统和 Image Lab 型凝胶分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1640 培养基, 4% 多聚甲醛(北京 Solarbio 公司, 批号分别为 20161201, 20170821); 噻唑蓝(MTT), 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI), 二硫苏糖醇(DTT), 吲哚乙酸(IAA), 碳酸氢铵(美国 Sigma 公司, 批号分别为 70580510, 097M4033V, 580672, SLBR5819V, BCBJ0213V); 胎牛血清(以色列 Biological Industries 公司, 批号 1552680), 磷脂酰丝氨酸外翻分析-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司, 批号 7347717), RIPA 高效裂解液和苯甲基磺酰氟(PMSF)(北京 Beyotime 公司, 批号分别为 111716170106, ST506), BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司, 批号 SE248351), 羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)和羊抗鼠 IgG(北京 TransGen 公司, 批号分别为 I31203, I31107),  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(美国 CST 公司, 批号 0007), 大鼠肉瘤蛋白(Ras)抗体(美国 Abcam 公司, 批号 GR244163-13),

测序级胰蛋白酶(美国 Promega 公司,批号 266553),白头翁皂苷(江西中医药大学中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,批号 20121126,经 HPLC 测定总皂苷质量分数 >90%),顺铂(江苏豪森药业股份有限公司,批号 150402),5-氟尿嘧啶(5-FU,上海旭东海普药业有限公司,批号 fa171104),实验用水为去离子水,甲酸、乙腈为质谱纯,其他试剂均为分析纯。

人大细胞肺癌细胞 NCI-H460,人卵巢腺癌细胞 SK-OV-3,人胃腺癌细胞 SGC-7901 细胞株均购自于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,由本室传代保种。

## 2 方法

**2.1 白头翁皂苷溶液的配制** 称取白头翁皂苷 3.0 mg,用二甲基亚砜(DMSO)使溶解(其最终体积分数不超过 0.1%),用相应 1640 培养基配制成  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  母液,经  $0.22 \mu\text{m}$  无菌过滤器过滤,取适量母液稀释成所需质量浓度,备用。

**2.2 细胞培养** 从液氮罐中取出 NCI-H460,SK-OV-3,SGC-7901 细胞冻存管,迅速置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温水浴中解冻, $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,去除冻存液,分别加入已配制的含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中,吹打均匀并移至细胞培养瓶中,于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  的饱和湿度培养箱中静置培养。次日换液,3~4 d 传代,取对数生长期细胞用于实验。

**2.3 MTT 比色法检测细胞存活率** NCI-H460,SK-OV-3,SGC-7901 细胞株购进后用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  条件下培养,传 3 代后,取对数生长期细胞,调整密度为  $3 \times 10^4$  个/mL,按每孔  $100 \mu\text{L}$  接种于 96 孔板中,于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养 24 h 后对细胞进行分组,白头翁皂苷组和顺铂组(加入不同质量浓度含药 1640 培养基  $100 \mu\text{L}$ ,使每组药物终质量浓度分别为 3.125,6.25,12.5,25,50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),空白组(加入不含药物的 1640 培养基  $100 \mu\text{L}$ ),调零组(不加细胞只加 1640 培养基  $100 \mu\text{L}$ ),所有组均设 3 个复孔。将 96 孔板置  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 48 h,加入  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT  $20 \mu\text{L}$ ,继续培养 4 h 后弃去上清,加入 DMSO  $150 \mu\text{L}$ ,振荡溶解 10 min,于 490 nm 处测定各孔吸光度  $A$ ,实验重复 3 次。取其均值计算细胞抑制率和半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )。计算公式为抑制率 =  $[1 - (A_{\text{给药组}} - A_{\text{调零组}}) / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{调零组}})] \times 100\%$ 。

**2.4 DAPI 染色观察细胞凋亡形态学变化** 取对数生长期的 NCI-H460 肿瘤细胞,调整细胞密度为  $1 \times$

$10^5$  个/mL,每孔 2 mL 接种于 6 孔板中,于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养 48 h 后弃去 1640 培养基,对细胞进行分组,分别为白头翁皂苷组(终质量浓度为分别为 7.5,15,25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),5-FU 组(终质量浓度为 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )和空白组(加入等体积培养基),每组均设 3 个复孔,在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中继续培养 24 h,弃去培养基,用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.2~7.4)洗涤细胞 1 次,每孔加入 4% 多聚甲醛 2 mL 室温固定 30 min,再次用预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,加入  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  DAPI 染液,每孔 2 mL,室温避光反应 20 min,于荧光显微镜下观察并拍照<sup>[8]</sup>。

**2.5 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡率** 取对数生长期的 NCI-H460 细胞,按 2.4 项下方法培养、分组及给药后,收集各组上清于离心管中,用 PBS 洗涤培养板 2 次,用胰蛋白酶消化并收集细胞于同一离心管中, $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,加入 Annexin V 结合缓冲液  $500 \mu\text{L}$ ,计数,调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  个/mL,取  $1 \times 10^5$  个细胞于流式管中,加入 Annexin V-FITC  $5 \mu\text{L}$  和 PI  $5 \mu\text{L}$ ,混匀,室温避光孵育 15 min,加入 Annexin V 结合缓冲液  $400 \mu\text{L}$ ,混匀后利用流式细胞仪进行检测<sup>[9]</sup>。

## 2.6 蛋白质组学分析

**2.6.1 全蛋白的提取** 取对数生长期的 NCI-H460 细胞,调整细胞密度为  $2 \times 10^5$  个/mL,每孔 10 mL 接种于 10 cm 细胞培养皿中,于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养 48 h,弃去 1640 培养基,对细胞进行分组,包括白头翁皂苷组(终质量浓度  $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )及空白组(加入等体积 1640 培养基),每组均设 3 个复孔,在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中继续培养 48 h,弃去 1640 培养基,用预冷 PBS 洗涤细胞 2~3 次,每孔加入 RIPA 高效裂解液  $500 \mu\text{L}$ ,冰上摇晃 30 min,离心( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , $14\,000 \times g$ ,10 min,下同),取上清,按照 BCA 蛋白定量试剂盒的步骤测定蛋白浓度, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中保存备用。

**2.6.2 蛋白质变性、酶解及脱盐** 取蛋白样品  $250 \mu\text{g}$ ,加入适量 DTT 溶液,保证其终浓度为  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴反应 60 min。加适量 IAA 溶液,保证其终浓度为  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,避光反应 45 min。加入 5 倍量冰丙酮, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  沉淀 5 h 以上。离心,弃去上清液。加入丙酮 1 mL,涡旋混匀,离心,弃去上清液,反复 3 次以清洗蛋白质,短暂干燥 2~3 min。将蛋白质重悬于  $500 \mu\text{L}$  的  $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

碳酸氢铵溶液中,按照酶-蛋白质(1:50)加入测序级胰蛋白酶 25  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  水浴反应 12 h。将酶解后的肽段,按照 Pierce  $\text{C}_{18}$  旋转柱中的步骤进行脱盐处理,将洗脱液用离心浓缩仪进行真空干燥,-80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用<sup>[10]</sup>。

**2.6.3 质谱分析** 用 0.1% 甲酸溶液 80  $\mu\text{L}$  溶解样品,离心,取上清液 60  $\mu\text{L}$ ,运用液质联用系统对蛋白样品进行检测。色谱条件为进样量 2  $\mu\text{L}$ ,流速 250  $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,柱温 20  $^{\circ}\text{C}$ ,EASY-Spray  $\text{C}_{18}$  色谱柱(75  $\mu\text{m}\times 15\text{ cm}$ ,3  $\mu\text{m}$ ),Acclaim PepMap 100 预柱( $\text{C}_{18}$ ,75  $\mu\text{m}\times 2\text{ cm}$ ,3  $\mu\text{m}$ ),流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~5 min,4%~7% B;5~85 min,7%~22% B;85~100 min,22%~32% B;100~110 min,32%~90% B;110~120 min,90% B)。质谱条件为电喷雾离子源(ESI),喷雾电压 1.9 kV,毛细管温度 250  $^{\circ}\text{C}$ ,一级图谱开启傅立叶变换质谱(FTMS)扫描模式,二级质谱线性离子阱(LTQ)为碰撞诱导解离(CID)碰撞,正离子模式,碰撞能量 35%,由 Xcalibur 2.2 控制软件根据数据依赖的自动模式实施一级和二级的切换,采用离子阱(ion trap)扫描模式,扫描范围  $m/z$  300~1 800。

**2.6.4 数据处理及生物信息学分析** 将 RAW 文件导入 Thermo Proteome Discoverer 1.4 软件,对数据进行检索,检索数据库为人种属的 UniProt 数据库。搜库参数为  $m/z$  350~5 000,碎片离子容忍度设定 0.8 Da,母离子容忍度  $1\times 10^{-5}$  Da,肽段和蛋白质鉴定的假发现率(FDR)均  $<1\%$ 。运用 Sieve 2.1 软件对不同组别的蛋白进行非标定量分析以寻找相关差异蛋白。白头翁皂苷组与空白组蛋白表达量差异比率  $>1.5$ ,且统计检验  $P < 0.05$ ,即为差异蛋白。运用 DAVID Bioinformatics Resources 6.8 对差异蛋白进行基因本体(GO)蛋白功能注释及生物学功能富集的分析,通过京都基因及基因组百科全书(KEGG)数据库对差异蛋白的信号通路进行分析<sup>[11]</sup>。

**2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)验证差异蛋白的表达** 取对数生长期的 NCI-H460 细胞,按 2.6.1 项下方法培养、分组、给药、抽提蛋白后,将蛋白调至等浓度,加一定量蛋白上样缓冲液(loading buffer)混匀,于沸水中加热 5 min 使蛋白变性,将各组样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,转膜,封闭,分别与用 TBST 缓冲液按一定比例稀释至适当浓度的一抗 Ras(1:1 万)和

$\beta$ -actin(1:1 000)4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,用 TBST 缓冲液洗 3 次,孵辣根过氧化物酶标记二抗(1:8 000),室温孵育 1.5 h,TBST 缓冲液洗 3 次,在凝胶成像仪中显色后对蛋白含量进行半定量分析。

**2.8 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),实验数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 白头翁皂苷对 NCI-H460,SK-OV-3 及 SGC-7901 细胞增殖的抑制作用** 与空白组比较,白头翁皂苷对 NCI-H460,SK-OV-3 和 SGC-7901 细胞增殖均具有明显的抑制作用,且随着白头翁皂苷的质量浓度逐渐增加,对 3 种细胞的抑制作用也逐渐增强,表现出了明显的量效关系,计算其对 NCI-H460,SK-OV-3 及 SGC-7901 细胞增殖的  $\text{IC}_{50}$  分别为 7.54,7.79,9.91  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;顺铂对这 3 种细胞增殖的  $\text{IC}_{50}$  分别为 3.14,9.43,4.68  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;提示白头翁皂苷具有良好的抗肿瘤活性,见图 1。

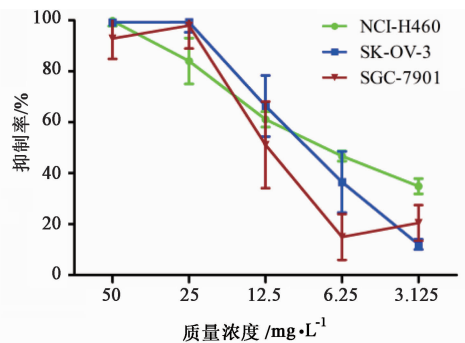
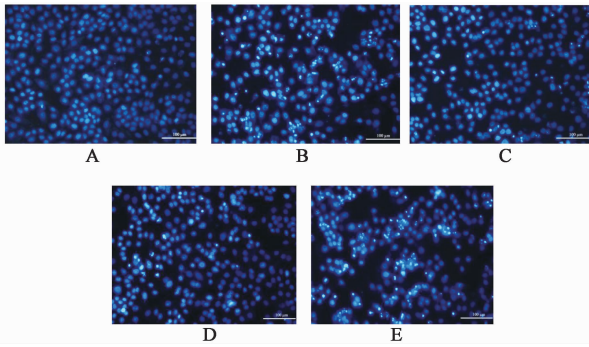


图 1 白头翁皂苷对 NCI-H460,SK-OV-3 及 SGC-7901 细胞增殖的抑制作用( $\bar{x}\pm s,n=3$ )

Fig.1 Inhibitory effect of saponins in Pulsatillae Radix on NCI-H460,SK-OV-3 and SGC-7901 cells( $\bar{x}\pm s,n=3$ )

**3.2 白头翁皂苷对 NCI-H460 细胞凋亡形态的影响** DAPI 染色结果显示,空白组细胞染色较浅且均匀,形态清晰。与空白组相比,白头翁皂苷组的细胞数量明显减少、细胞形态不规则及出现不同程度的蓝色荧光,且随着质量浓度的增加,细胞数量逐渐减少,而蓝色荧光数量更多且更明亮,表明白头翁皂苷可以诱导 NCI-H460 细胞凋亡。见图 2。

**3.3 白头翁皂苷对 NCI-H460 细胞凋亡率的影响** 与空白组比较,白头翁皂苷组的凋亡率均显著升高( $P < 0.01$ ),白头翁皂苷 7.5,15,25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组的凋亡率分别为 19.66%,26.1%,14.4%,表明白头翁皂苷可以诱导 NCI-H460 细胞凋亡,见图 3。



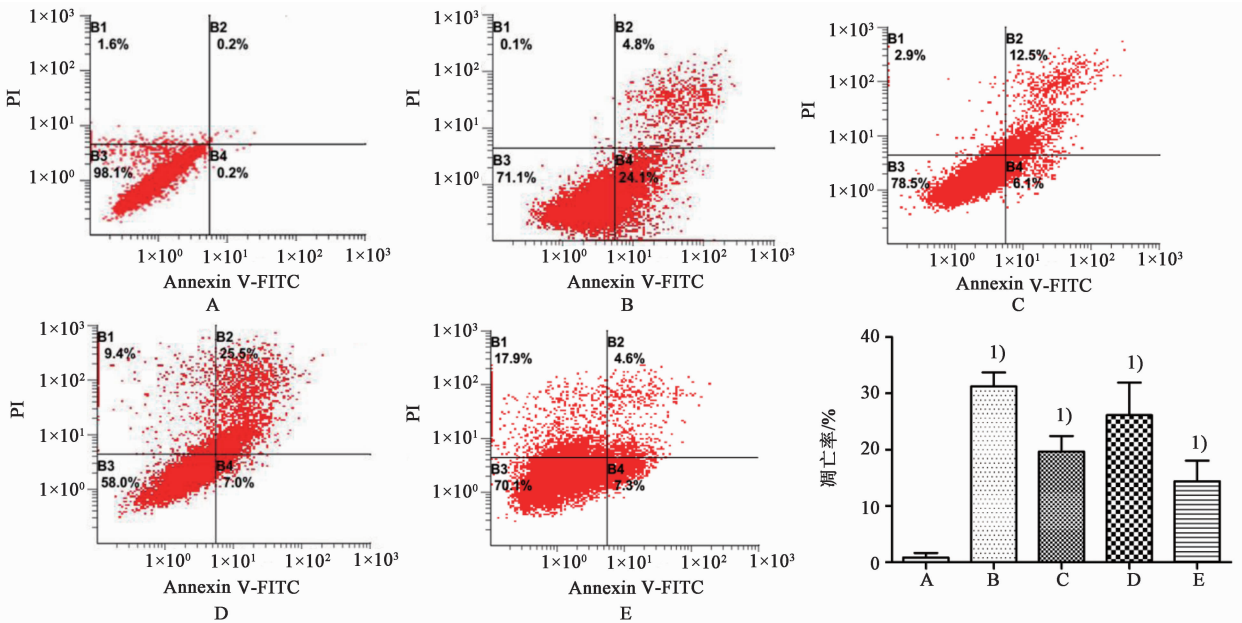
A. 空白组; B. 5-FU 组; C ~ E. 不同质量浓度 (7.5, 15, 25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 白头翁皂苷组 (图 3 同)

图 2 白头翁皂苷对 NCI-H460 细胞凋亡形态的影响

Fig. 2 Effect of saponins in Pulsatillae Radix on apoptosis of NCI-H460 cells

3.4 白头翁皂苷对 NCI-H460 细胞蛋白表达的影响 各组样品经液相分离后进行质谱分析, 得总离子流图 (TIC), 见图 4。

通过质谱数据处理和生物信息分析, 与空白组相比, 白头翁皂苷组主要涉及 495 个差异蛋白。通过 DAVID 数据库对这些蛋白进行 GO 注释, 结果表明这些蛋白主要参与信使 RNA (mRNA) 分解代谢过程 (mRNA catabolic process), 翻译起始 (translational initiation), 蛋白质定位于内质网 (protein localization to endoplasmic reticulum) 等生物进程 (biological process); 这些蛋白组成的细胞成分 (cellular component) 主要有粘着斑 (focal adhesion), 细胞 - 基质黏附连接 (cell - substrate adherens



与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$

图 3 白头翁皂苷对 NCI-H460 细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect of saponins in Pulsatillae Radix on apoptosis rate of NCI-H460 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

junction), 细胞-基底连接细胞质部分 (cell-substrate junction) 等; 分子功能 (molecular function) 主要是参与核苷结合 (nucleoside binding), 核糖体的结构组成 (structural constituent of ribosome), 三磷酸鸟苷结合 (GTP binding) 等, 见图 5。使用 KEGG 数据库对差异蛋白质可能参与的信号通路进行分析后发现, 这些蛋白主要参与了核糖体 (ribosome), 糖酵解/糖异生 (glycolysis/gluconeogenesis), 碳代谢 (carbon metabolism) 等信号通路, 见图 6。其中 Harvey 大鼠肉瘤蛋白 (HRAS), Kirsten 大鼠肉瘤蛋白 (KRAS), 神经母细胞瘤蛋白 (NRAS) 等蛋白可能与白头翁诱

导细胞凋亡有关, 见表 1。采用 Western blot 对 Ras 表达进行验证, 结果发现与空白组相比, 白头翁皂苷组 Ras 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), 与质谱检测结果一致, 见图 7。

#### 4 讨论

白头翁作为寒凉中药的代表之一, 主治温症狂易寒热、癥瘕积聚、瘰疬、金疮, 说明白头翁在古代就已经被中医药学家用于肿瘤的治疗。前期研究表明, 三萜皂苷类作为白头翁中一类重要的化学成分, 具有良好的抗肿瘤活性<sup>[12]</sup>。本研究发现, 白头翁皂苷对 NCI-H460, SK-OV-3 及 SGC-7901 细胞增殖

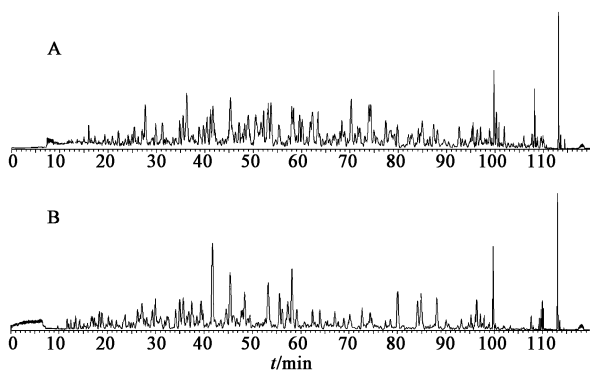


图 4 空白组 (A) 和白头翁皂苷组 (B) 样品溶液的 TIC  
Fig. 4 Total ion currency (TIC) of sample solution from blank group (A) and saponins in Pulsatillae Radix group (B)

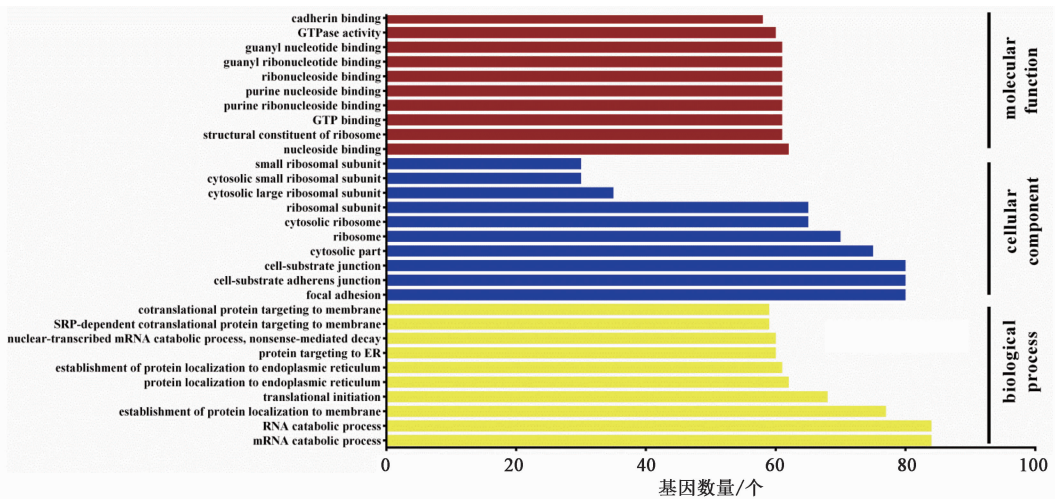


图 5 差异蛋白涉及的生物学进程、细胞成分、分子功能分析  
Fig. 5 Analysis of biological processes, cellular components and molecular functions involved in differential proteins

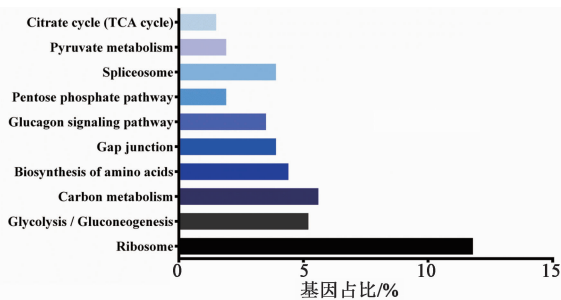


Fig. 6 Analysis of KEGG pathway involved in differentially expressed proteins  
biosynthesis of amino acids. 氨基酸的生物合成; gap junction. 间隙连接; glucagon signaling pathway. 胰高血糖素信号通路; pentose phosphate pathway. 磷酸戊糖途径; spliceosome. 剪接体; pyruvate metabolism. 丙酮酸代谢; citrate cycle. 柠檬酸循环

图 6 差异蛋白涉及的 KEGG 信号通路分析  
Fig. 6 Analysis of KEGG pathway involved in differentially expressed proteins

本研究通过 nano LC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 技术鉴定

具有抑制作用,显示出了良好的抗肿瘤作用。通过 Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞术及 DAPI 染色,也进一步证实了白头翁皂苷能诱导 NCI-H460 细胞的凋亡,但白头翁皂苷抗 NCI-H460 细胞增殖及诱导其凋亡的分子机制尚不明确。因此,本研究进一步利用蛋白质组学技术结合生物信息系统分析,从分子水平揭示白头翁干预 NCI-H460 细胞生长的作用机制。

蛋白质组学从生物体或者细胞的整体水平上研究蛋白质组成及其活动规律。以疾病为基础,经过中药体系的治疗,再通过蛋白质组学技术研究中药作用机制,这是目前中药蛋白质组学的研究思路<sup>[13]</sup>。

后表明,空白组和白头翁皂苷组的差异蛋白有 495 个,对这些差异蛋白进行生物信息分析后发现,这些蛋白主要涉及核糖体的生物功能、糖酵解/糖异生、碳代谢、蛋白质的生物合成及 mRNA 的代谢等生物进程。推测白头翁皂苷诱导 NCI-H460 细胞的凋亡机制与干预丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号级联通路和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (Caspase) 途径相关。

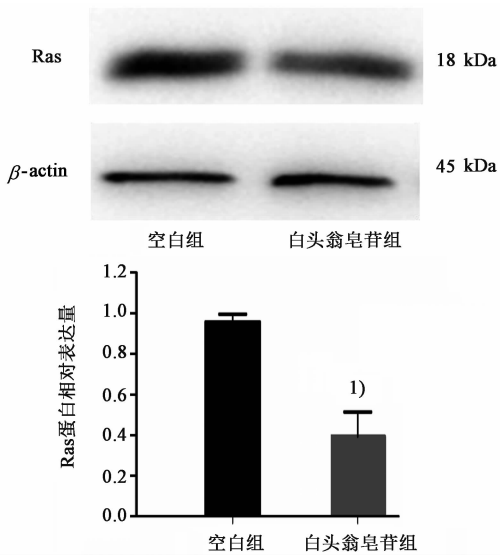
MAPK 信号通路在细胞外刺激信号从细胞表面传导到细胞核内部的过程中发挥重要作用,与细胞的增殖、凋亡等生理过程密切相关。MAPK 信号通路由以下成员构成:受体酪氨酸激酶 (RTKs)-Ras-丝/苏氨酸蛋白激酶 (Raf)-MAPK 激酶 (MAPKK, 即 MEK)-细胞外调节蛋白激酶 (ERK)-原癌基因 (c-Myc) 转录因子-DNA 合成。其中 Ras 是一种小的鸟

表 1 白头翁皂苷诱导 NCI-H460 细胞凋亡的相关差异表达蛋白

Table 1 Differentially expressed proteins of saponins in Pulsatillae Radix induced apoptosis of NCI-H460 cells

蛋白编号	名称	蛋白描述	差异倍数
P01112	HRAS	Harvey 大鼠肉瘤病毒致癌基因同源物,参与 Ras 蛋白信号转导的激活,Ras 蛋白结合二磷酸鸟苷(GDP)/GTP 并具有内在的 GTP 酶活性	0.22
H1SRC5	KRAS	Kirsten 大鼠肉瘤病毒致癌基因同源物	0.32
P01111	NRAS	神经母细胞瘤 Ras 病毒(v-ras)致癌基因同源物,Ras 蛋白结合 GDP/GTP 并具有内在的 GTP 酶活性	0.23
Q15056	真核翻译起始因子( EIF)4H	刺激翻译起始复合物中 EIF4A 的 RNA 解旋酶活性	0.10
P05198	EIF2 亚基 1 $\alpha$ (EIF2S1)	通过与 GTP 和引发剂 tRNA 形成三元复合物,在蛋白质合成的早期发挥作用	0.30
H3BM67	核仁蛋白 3(NOL3)	细胞凋亡过程的调节	0.37

注:趋势均为下调。



与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$

图 7 白头翁皂苷对 NCI-H460 细胞中 Ras 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig.7 Effect of saponins in Pulsatillae Radix on expression of Ras in NCI-H460 cell ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

嘌呤核苷酸结合蛋白,由 HRAS, NRAS, KRAS 组成。Ras 被 RTKs 激活后,召集细胞浆内 Raf-1 至细胞膜上,Raf 磷酸化 MAPK (MAPKK, 即 MEK), MAPKK 激活 MAPK(即 ERK)。MAPK 被激活后,转至细胞核内直接激活转录因子,启动 c-Myc 的转录,从而诱导激活多种蛋白转录和翻译<sup>[14]</sup>。EIF4H 和 EIF2S1 是重要的真核生物翻译起始因子,能够在蛋白质翻译的起始阶段促进核糖体向起始密码子扫描,从而加速蛋白质的合成。本研究通过对筛选得到的靶点蛋白进行分析,发现 HRAS, NRAS, KRAS, EIF4H 和 EIF2S1 蛋白表达均显著下调。且通过 Western blot 验证,给予白头翁皂苷后,NCI-H460 细胞中 Ras 表达也显著降低,与生物学分析预测结果一致。

细胞凋亡通常可以分为死亡受体(外源性)和

线粒体(内源性)2 条途径。Caspase 途径因参与凋亡的启动和执行过程,在诱导细胞凋亡的过程中起着关键的作用<sup>[15-16]</sup>。NOL3 是一种内源性细胞凋亡通路的抑制因子,其对内源性通路和外源性凋亡通路都存在抑制作用,在内源性凋亡通路中,NOL3 能与促凋亡因子 Bax 相互作用,从而抑制 Bax 在凋亡激活后异构而转移至线粒体内;NOL3 还能直接与死亡结构域相关蛋白(FADD)及 Caspase-8 结合,阻断死亡结构域间的反应,抑制死亡诱导信号复合体(DISC)的形成,从而参与外源性凋亡通路<sup>[17]</sup>。本文研究结果表明,给予白头翁皂苷后,NOL3 蛋白表达显著下降,表明 NOL3 蛋白有可能是白头翁诱导 NCI-H460 细胞凋亡的潜在靶点。

综上所述,白头翁皂苷对 NCI-H460 细胞增殖有明显的抑制作用,其机制可能与通过 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路及 Caspase 途径诱导 NCI-H460 细胞凋亡相关,为深入研究白头翁皂苷抑制肿瘤细胞增殖及诱导其凋亡的作用靶标提供了新思路。

[参考文献]

[1] 姜峰玉,陈定法,孙抒. 白头翁的研究现状和临床应用[J]. 医学综述,2009,15(24):3785-3787.  
 [2] 钟长斌,李祥. 白头翁的化学成分及药理作用研究述要[J]. 中医药学刊,2003,21(8):1338-1339.  
 [3] 石宝俊,李茜,张晓晓,等. 中药白头翁地上部分的三萜皂苷成分[J]. 药学学报,2007,42(8):826-866.  
 [4] 罗颖颖,陈兰英,崔亚茹,等. 白头翁皂苷抑制人 HT29 结肠癌细胞增殖及诱导凋亡作用研究[J]. 中药药理与临床,2013,29(5):52-56.  
 [5] 罗颖颖,陈兰英,简晖,等. 白头翁皂苷调节 Bel-7402 人肝癌异体移植瘤小鼠能量代谢的研究[J]. 中草药,2014,45(7):973-977.

- [ 6 ] Santos R, Ursu O, Gaulton A, et al. A comprehensive map of molecular drug targets[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016,16(1):19-34.
- [ 7 ] LU C L, QU X Y, JIANG J G. Proteomics and syndrome of Chinese medicine [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14 (12):2721-2728.
- [ 8 ] 林满遍,陈亮,吴水生. 钩吻总碱对人结肠癌细胞增殖、凋亡的影响及其机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018,24(4):149-153.
- [ 9 ] 李红蓉,常丽萍,秘红英,等. 巨噬细胞对内皮细胞凋亡的影响及通心络的干预作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017,23(13):121-127.
- [10] Wiśniewski J R, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis [J]. *Nat Methods*, 2009,6(5):359-362.
- [11] HUANG D W, Sherman B T, Lempicki R A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009,37(1):1-13.
- [12] 王征,张宁,孙艳妮,等. 白头翁寒热药性的细胞评价 [J]. *药物评价研究*, 2013,36(5):359-362.
- [13] ZHAO L, Nicholson J K, LU A, et al. Targeting the human genome-microbiome axis for drug discovery: inspirations from global systems biology and traditional Chinese medicine [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11 (7): 3509-3519.
- [14] WANG C, Maass T, Krupp M, et al. A systems biology perspective on cholangiocellular carcinoma development: focus on MAPA-signaling and the extracellular environment[J]. *J Hepatol*, 2009,50(6):1122-1131.
- [15] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy [J]. *Oncogene*, 2007, 26(9): 1324-1337.
- [16] Roderick H L, Cook S J. Ca<sup>2+</sup> signalling checkpoints in cancer; remodelling Ca<sup>2+</sup> for cancer cell proliferation and survival [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008,8(5):361-375.
- [17] Stanley R F, Piszczatowski R T, Bartholdy B, et al. A myeloid tumor suppressor role for NOL3 [J]. *J Exp Med*, 2017,214(3):753-771.

[责任编辑 刘德文]