

虎眼万年青总皂苷诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡机制研究

邹翔,周林,张月,官甜,汲晨锋,曲中原*,刘学,李文兰

哈尔滨商业大学药学院 抗肿瘤天然药物教育部工程研究中心,哈尔滨 150076

摘要:为探讨虎眼万年青总皂苷(OCA-TS)诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的分子机制,本研究采用溴化四氮唑蓝(MTT)法检测 OCA-TS 对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用,并观察细胞凋亡形态、检测细胞膜电位及凋亡相关蛋白含量变化。实验表明,OCA-TS 可显著抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖(IC_{50} 为 93.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$),电镜下细胞呈现典型的凋亡形态;流式细胞仪检测结果显示不同浓度的 OCA-TS 作用 MCF-7 细胞 48 h 后,细胞内线粒体膜电位、 Ca^{2+} 浓度和 Cyt-C 的表达水平均无显著变化;细胞内 Caspase-8 和 Caspase-3 的活性显著升高,而 Caspase-12 的活性均未见显著改变,Western blot 检测细胞内 Fas、FasL 和 FADD 蛋白表达水平显著升高。综上说明 OCA-TS 诱导 MCF-7 细胞凋亡的作用可能是通过启动死亡受体途径而不是通过线粒体途径和内质网途径实现的。

关键词:虎眼万年青;总皂苷;人乳腺癌 MCF-7 细胞;凋亡;抗肿瘤机制

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)1-0032-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.1.005

Study on the apoptotic mechanisms of human breast cancer MCF-7 cells induced by total saponins of *Ornithogalum caudatum* ait.

ZOU Xiang, ZHOU Lin, ZHANG Yue, GONG Tian, JI Chen-feng, QU Zhong-yuan*, LIU Xue, LI Wen-lan

College of Pharmacy, Harbin University of Commerce Research Center of Natural Anticancer Drugs, Ministry of Education, Harbin 150076, China

Abstract: To investigate the molecular mechanism of apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells induced by total saponins of *Ornithogalum caudatum* Ait (OCA-TS), MTT assay was used to detect the inhibitory effect of OCA-TS on the proliferation of MCF-7 cells and the changes of apoptosis morphology, membrane potential and apoptosis related protein content were observed. The results showed that OCA-TS could significantly inhibit the proliferation of human breast cancer MCF-7 cells (IC_{50} was 93.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and the cells showed typical apoptotic morphology under electron microscopy. The results of flow cytometry showed that 48 hours after mca-7 cells were treated with different concentrations of OCA-TS, there was no significant change in mitochondrial membrane potential, Ca^{2+} concentration and Cyt-C expression level; the activities of Caspase-8 and Caspase-3 were significantly increased, but the activities of Caspase-12 were not significantly changed, and the expression levels of Fas, FasL and FADD protein were significantly increased by Western blot. In conclusion, the apoptosis of MCF-7 cells induced by OCA-TS may be realized by activating death receptor pathway rather than by mitochondrial pathway and endoplasmic reticulum pathway.

Key words: *Ornithogalum caudatum* Ait; total saponin; human breast cancer MCF-7 cells; apoptosis; antitumor mechanism

虎眼万年青为百合科多年生草本植物虎眼万年青(*Ornithogalum caudatum* Ait.)的干燥全草,又名海葱,原产于非洲南部,上世纪八十年代经朝鲜传入我国,目前在我国各地均有广泛栽培^[1,2]。早在公

元前 1500 年的埃及《埃伯氏古医典》就对其应用有记载。在我国民间多用于清热解毒、消坚散结,治疗癌症、胆囊炎等疾病并取得了良好的疗效^[3]。现代化学与药理学研究表明,皂苷类成分是虎眼万年青抗肿瘤作用的主要药效物质基础之一^[4],并证明其对乳腺癌、肝癌、白血病等都具有显著的抑制作用^[5],但其具体的分子作用机制尚未完全阐明。本论文以人乳腺癌 MCF-7 细胞为对象,探讨虎眼万年

收稿日期:2019-08-12 接受日期:2019-11-27

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81102858);黑龙江省博士后科研启动金资助项目(LBH-Q16130);哈尔滨商业大学一般项目(17XN062)

*通信作者 Tel:86-451-84838207;E-mail:qiuqiuqu@163.com

青总皂苷(OCA-TS)对乳腺癌细胞增殖抑制和凋亡诱导作用,并在此基础上探讨其诱导乳腺癌细胞凋亡的分子机制,为其药用开发和应用提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 实验材料

OCA-TS 由实验室自制(采用乙醇提取,正丁醇萃取后 AB8 大孔树脂纯化,30%~70%的乙醇洗脱部位。以薯蓣皂苷为对照品,采用香草醛-高氯酸显色,紫外可见分光光度法测定纯度为 55%)。注射用羟基喜树碱(HCPT,黄石飞云制药有限公司,批号:20130601),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号:20140507),RPMI 1640 培养液(Gibco 公司,批号:20140713),胰蛋白酶(Sigma 公司,批号:20140918),AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(碧云天公司,批号:20140921),Fluo-3/AM (Molecular probe 公司,批号:20140309),MTT(批号:20140108)、二甲基亚砜(DMSO,批号:20140226)和罗丹明 123(Sigma 公司,批号:20140912),小鼠抗人 Cyt-C 抗体和 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)(中杉金桥生物技术有限公司,批号:20140817,20140911),多聚甲醛(博士德生物技术有限公司,批号:20130912),TritonX-100(上海舜华生物工程有限公司,批号:20140606),BSA(美国 BioVision 公司,批号:20130604)。其他试剂均为分析纯。人乳腺癌 MCF-7 细胞株(哈尔滨商业大学抗肿瘤天然药物教育部工程研究中心提供)。

1.2 实验仪器

DL-CJ-1N 超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司),CO-150 CO₂ 培养箱(美国 NBS 公司),CKX 41 倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司),CX21 光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司),Mode l680 酶标仪(美国 Bio-rad 公司),JEM-1220 透射电子显微镜(日本电子公司),BD FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司),Microfuge 22R 台式微量冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司),Mini-PROTEIN 3 电泳系统(美国 Bio-rad 公司),GIS-2019 型凝胶成像系统(Tannon 公司),TCS-SP2 激光共聚焦扫描显微镜(德国 Leica 公司)。

2 实验方法

2.1 MCF-7 细胞培养

细胞生长至 90% 融合时吸去原培养液,用 PBS 洗涤细胞 2 次,加 1 mL 胰酶(0.25%)后,在倒置显微镜下观察。当一半的细胞呈现圆粒状时,弃胰酶,

加入 2 mL 含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液后将细胞从培养瓶壁吹下,并混合均匀,按 1:4 至 1:6 的比例转移至新培养瓶后,加适量含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,待对数生长期时进行实验研究。

2.2 MTT 法检测 OCA-TS 对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用

将对数生长期的 MCF-7 细胞消化后,以 4×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中。培养 24 h 后,每孔加入 OCA-TS 溶液,使其终浓度为 12.5、25、50、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$,阴性对照组加等体积的 RPMI1640 培养液,阳性对照组加入 HCPT,终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。每组设 6 个平行孔。将 96 孔板置培养箱中培养 72 h,而后弃上清液,并于每孔加入 100 μL MTT 溶液(0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),于培养箱中继续孵育 2~4 h,弃上清液,每孔加入 150 μL 的 DMSO,用酶标仪在检测波长 490 nm 处检测吸光度(OD 值),并计算细胞抑制率。

$$\text{细胞抑制率} = (\text{空白组平均 OD 值} - \text{给药组平均 OD 值}) / \text{空白组平均 OD 值} \times 100\%$$

2.3 透射电镜观察 OCA-TS 对 MCF-7 细胞超微结构的影响

将对数生长期的 MCF-7 细胞制成细胞悬液(2×10^5 个/mL),并按每孔 1 mL 将细胞接种于 6 孔培养板中,培养 24 h 后加入 OCA-TS,使其终浓度分别为 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,阳性对照组 HCPT 的终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,阴性对照组加等体积的 RPMI 1640 培养液,每个药物浓度设 3 个平行孔。继续培养 48 h 后,收集细胞,立即用预冷的 2% 戊二醛固定 24 h 以上,切片,制成样品,随后进行机器操作打开软件并检查电镜状态,装液氮随后装载样品与插入样品杆,加灯丝电流,完成以上准备即可开始操作,透射电镜下观察并摄影,结束操作后取出样品杆,卸载样品。

2.4 流式细胞仪检测 MCF-7 细胞凋亡率、线粒体膜电位、Cyt-C 蛋白的表达

将对数生长期的 MCF-7 细胞接种于 6 孔培养板中(同“2.3”项下方法),药物作用 48 h 后,收集细胞,用预冷的 PBS 溶液洗涤 3 次后,加入磷脂酰丝氨酸蛋白抗体(Annexin V-FITC)及碘化丙啶(PI)(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)染液,于室温避光染色后,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率,FL1 通道检测 FITC 阳性,FL2 检测 PI 阳性。FITC 激发波长为 488 nm,发射波长为 525 nm;PI 激发波长为 535 nm,发射波长为 615

nm,实验重复3次。

罗丹明123是一种线粒体跨膜电位的指示剂,正常细胞中能够依赖线粒体跨膜电位进入线粒体基质,荧光强度减弱或消失,而在线粒体膜完整性被破坏时,罗丹明123重新释放出线粒体,发出强黄绿色荧光。将对数生长期的MCF-7细胞接种于6孔培养板中(同“2.3”项下方法),药物作用48 h后,收集细胞,加入罗丹明123(Rhodamine123)染料,使其终浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,避光孵育,离心弃染料,PBS洗2次,加PBS重悬细胞,流式细胞仪检测。Rh123的激发波长为507 nm,最大发射波长为529 nm,实验重复3次。

将对数生长期的MCF-7细胞接种于6孔培养板中(同“2.3”项下方法),药物作用48 h后,收集细胞,加入4 g/L多聚甲醛2 mL固定40 min,PBS洗2次,0.1% TritonX-100 2 mL打孔15 min,离心去TritonX-100,PBS洗2次,1% BSA 2 mL封闭1 h,离心弃去封闭液,加鼠抗人Cyt-C抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,加PBS洗1次,加FITC标记马抗小鼠IgG(H+L)抗体,室温避光孵育30 min,弃上清,重悬细胞,过滤后上流式细胞仪检测^[6],FITC激发波长为488 nm,发射波长为525 nm。

2.5 酶标仪检测 Caspase-8、Caspase-3 和 Caspase-12 的活性

不同浓度OCA-TS作用48 h后(同“2.3”项下方法),收集细胞,取 2×10^6 个细胞加入裂解液,重悬沉淀,冰浴裂解,离心,将上清转移到冰浴预冷的离心管中。遵循活性检测试剂盒说明书操作,建立硝基苯胺(pNA)标准曲线。同时,按要求对不同样品加入相应试剂和样品,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育至肉眼可见颜色变化即可测定,如果变化不明显可适当延长至24 h,采用酶标仪测定 A_{405} 。由于Caspase可催化底物(AC-DEVD-pNA)产生黄色的游离硝基苯胺,通过分光光度比色法测定pNA在400~410 nm处吸光值,从而间接获的Caspase的活性,进一步计算Caspase-8和Caspase-3的活性。Caspase-12按说明书要求操作后,采用酶标仪检测荧光强度。激发光波长488 nm,发射波长为530 nm。

2.6 激光共聚焦扫描显微镜检测细胞内 Ca^{2+} 浓度

不同浓度OCA-TS作用48 h后(同“2.3”项下方法),收集细胞,PBS重悬细胞,离心弃上清,加入4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Fluo-3/AM 200 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育1 h,PBS洗2次,而后加400 μL PBS轻轻重悬细胞,过

滤后用激光共聚焦扫描显微镜检测。

2.7 Western blot 检测 MCF-7 细胞中 Fas、FasL 和 FADD 蛋白的表达

不同浓度OCA-TS作用24 h后(同“2.3”项下方法),PBS洗2次,加50 μL 含PMSF裂解液裂解后,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下12 000 rpm离心10 min,取离心后的上清,采用考马斯亮蓝法进行蛋白定量后进行电泳并转移到NC膜上。将膜与 β -actin、Fas、FasL和FADD等I抗(1:200稀释)置4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵育过夜。而后用TBST缓冲液充分洗膜3次,每次振摇10 min。随后采用相应II抗(1:500稀释)室温孵育2 h,AP-NBT/BICP显色法显色后,采用Tannon凝胶成像系统拍照,并进行量化分析。

2.8 数据处理

采用SPSS15.0软件对数据进行统计学处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 OCA-TS 对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用

实验结果如图1所示。OCA-TS作用于MCF-7细胞72 h后,随着OCA-TS浓度的增加,对MCF-7细胞的增殖抑制率逐渐升高,且呈一定的剂量依赖性。经计算, IC_{50} 为 $(93.17 \pm 0.02) \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

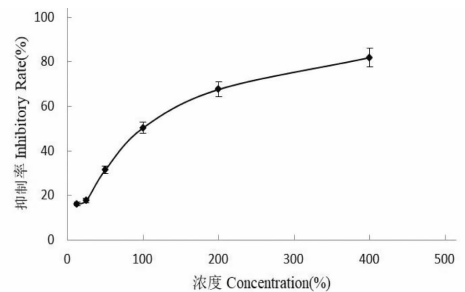


图1 OCA-TS 对人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖抑制作用

Fig. 1 The anti-proliferative effect of OCA-TS on the MCF-7 cells

3.2 OCA-TS 对 MCF-7 细胞超微结构的影响

实验结果如图2所示。阴性对照组细胞结构清晰,细胞器结构完整,细胞表面的微绒毛突起明显。经50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的OCA-TS作用MCF-7细胞48 h后,可见细胞表面的微绒毛减少、染色质固缩、有凋亡小体形成。HCPT作用MCF-7细胞48 h后,亦可见细胞表面的微绒毛消失,出现凋亡小体等凋亡特征。

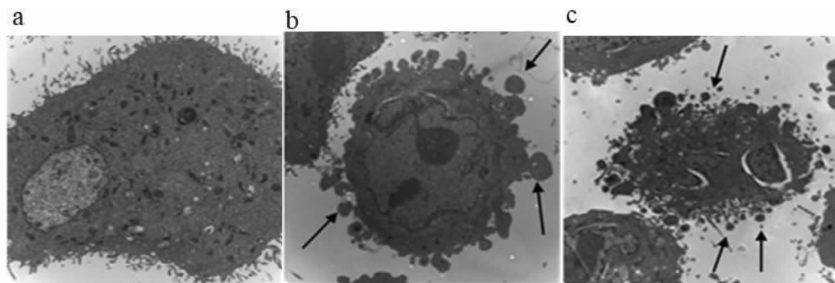


图2 OCA-TS 对人乳腺癌 MCF-7 细胞超微结构的影响(1000 ×)

Fig. 2 Effect of OCA-TS on the morphological appearance of MCF-7 cells (1000 ×)

注:(a)MCF-7 细胞空白对照组;(b)50 μg/mL OCA-TS 处理 MCF-7 细胞 48 h;(c)50 μg/mL HCPT 处理 MCF-7 细胞 48 h。Note:(a) Control;(b) MCF-7 cells were treated with 50 μg/mL OCA-TS for 48 h;(c) MCF-7 cells were treated with 5 μg/mL HCPT for 48 h.

3.3 OCA-TS 诱导 MCF-7 细胞凋亡的凋亡率、线粒体膜电位、Cyt-C 蛋白的表达

凋亡率测定结果如图 3 所示。在双变量流式细胞仪的散点图上下左象限显示阴性对照的正常细胞 (FITC-/PI⁻), 下右象限为早期凋亡细胞 (FITC⁺/PI⁻), 上右象限是晚期凋亡及坏死细胞 (FITC⁺/PI⁺), 上左象限为破碎及损伤细胞。研究结果表

明,25、50、100 μg/mL 浓度的 OCA-TS 作用 MCF-7 细胞 48 h 后,凋亡早期和凋亡晚期细胞比率均呈上升趋势,具有一定的剂量依赖性。OCA-TS 各组细胞的总凋亡率(早期及晚期凋亡细胞合计)分别为 (15.96 ± 1.69)%、(20.64 ± 1.78)% 和 (30.6 ± 1.05)% ,与阴性对照组 (5.74 ± 0.47)% 比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

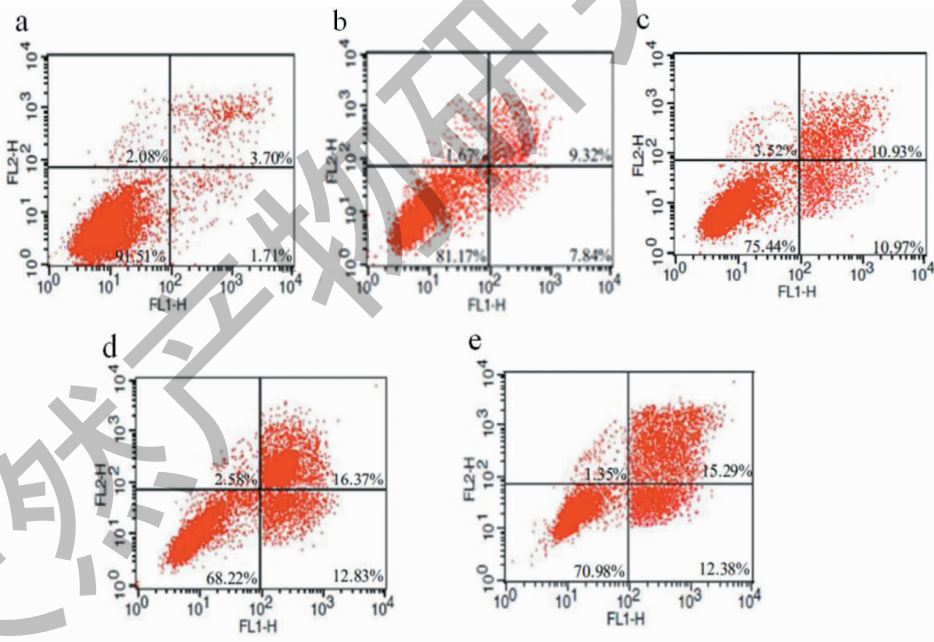


图3 OCA-TS 对人乳腺癌 MCF-7 细胞的凋亡率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of OCA-TS on the apoptotic rates of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:(a)MCF-7 细胞空白对照组;(b)5 μg/mL OCA-TS 处理 MCF-7 细胞;(c)50 μg/mL OCA-TS 处理 MCF-7 细胞;(d)100 μg/mL OCA-TS 处理 MCF-7 细胞;(e)5 μg/mL HCPT 处理 MCF-7 细胞。Note:(a) Control;(b) 5 μg/mL OCA-TS treated MCF-7 cell;(c) 50 μg/mL OCA-TS treated MCF-7 cell;(d) 100 μg/mL OCA-TS treated MCF-7 cell;(e) 5 μg/mL HCPT treated MCF-7 cell.

线粒体膜电位检测结果如图 4 所示。研究结果表明,25、50、100 μg/mL 浓度的 OCA-TS 作用 MCF-7 细胞 48 h 后,线粒体膜电位分别为 (69.77 ±

0.36)%、(63.20 ± 0.75)% 和 (68.13 ± 0.25)% ,与阴性对照组 (68.40 ± 0.17)% 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。HCPT 组细胞线粒体膜电位为

(27.63 ± 1.95)%, 显著低于阴性对照组 ($P < 0.01$)。

表 1 OCA-TS 对 MCF-7 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effects of OCA-TS on the apoptotic rate of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 Group	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	FITC ⁺ /PI ⁻ LR (%)	FITC ⁺ /PI ⁺ UR (%)	FITC ⁻ /PI ⁻ LL (%)	凋亡率 Apoptosis (%)
空白对照 Control	-	2.45 ± 1.05	3.29 ± 0.58	91.99 ± 0.73	5.74 ± 0.47
虎眼万年青总皂苷 OCA-TS	25	$6.86 \pm 1.39^{**}$	$9.10 \pm 0.30^{**}$	$81.46 \pm 0.41^{**}$	$15.96 \pm 1.69^{**}$
	50	$10.61 \pm 0.51^{**}$	$10.13 \pm 1.27^{**}$	$76.27 \pm 1.30^{**}$	$20.64 \pm 1.78^{**}$
	100	$12.97 \pm 0.20^{**}$	$17.73 \pm 1.92^{**}$	$66.58 \pm 1.33^{**}$	$30.6 \pm 1.05^{**}$
羟基喜树碱 HCPT	5	$12.76 \pm 0.54^{**}$	$14.27 \pm 1.44^{**}$	$70.82 \pm 0.23^{**}$	$27.03 \pm 0.90^{**}$

注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$, 下同。

Note: Compared with control, ** $P < 0.01$, the same below.

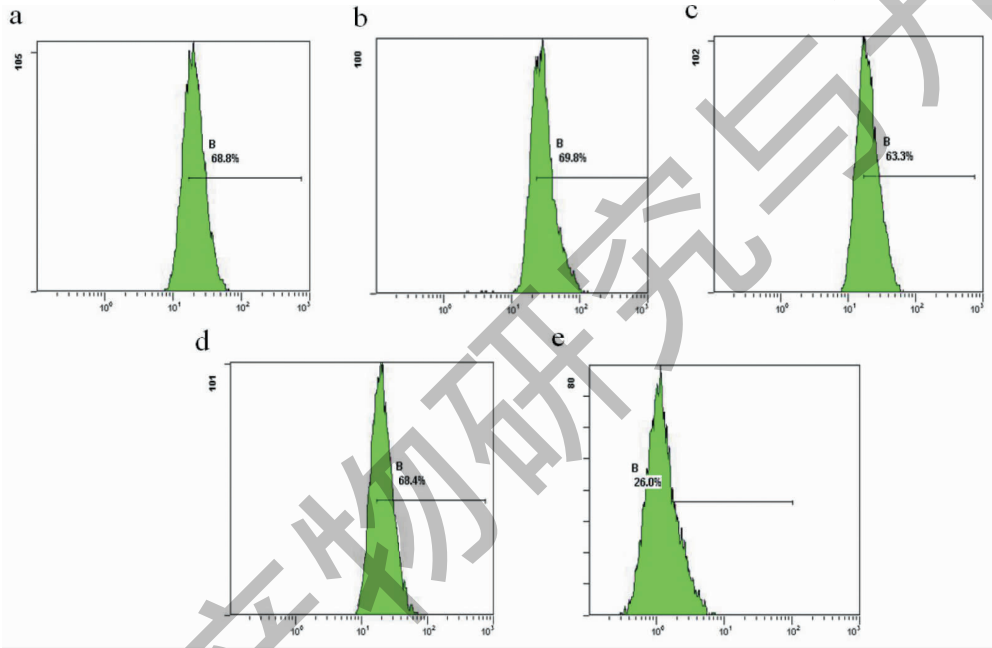


图 4 OCA-TS 对人乳腺癌 MCF-7 细胞线粒体膜电位的影响

Fig. 4 Effect of OCA-TS on mitochondrial transmembrane potential of MCF-7 cells

注:(a) MCF-7 细胞空白对照组;(b) 5 $\mu\text{g/mL}$ OCA-TS 处理 MCF-7 细胞;(c) 50 $\mu\text{g/mL}$ OCA-TS 处理 MCF-7 细胞;(d) 100 $\mu\text{g/mL}$ OCA-TS 处理 MCF-7 细胞;(e) 5 $\mu\text{g/mL}$ HCPT 处理 MCF-7 细胞。Note: (a) Control; (b) 5 $\mu\text{g/mL}$ OCA-TS treated MCF-7 cell; (c) 50 $\mu\text{g/mL}$ OCA-TS treated MCF-7 cell; (d) 100 $\mu\text{g/mL}$ OCA-TS treated MCF-7 cell; (e) 5 $\mu\text{g/mL}$ HCPT treated MCF-7 cell.

表 2 OCA-TS 对 MCF-7 细胞线粒体膜电位、Cyt-C 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of OCA-TS on mitochondrial transmembrane potential and Cyt-C in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 Group	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	线粒体跨膜电位 Mitochondrial transmembrane potential (%)	Cyt-C 蛋白表达量 Expression of Cyt-C protein (%)
空白对照组 Control	-	68.40 ± 0.17	50.72 ± 1.40
	25	69.77 ± 0.36	$97.91 \pm 1.79^{**}$
	50	63.20 ± 0.75	49.61 ± 2.52
虎眼万年青总皂苷 OCA-TS	100	68.13 ± 0.25	51.65 ± 1.17
	5	$27.63 \pm 1.95^{**}$	51.43 ± 1.48
羟基喜树碱 HCPT	5	$27.63 \pm 1.95^{**}$	51.43 ± 1.48

OCA-TS 对 MCF-7 细胞 Cyt-C 表达实验结果如表 2 所示。不同浓度的 OCA-TS 作用 MCF-7 细胞 48 h 后,细胞内 Cyt-C 表达水平与阴性对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3.4 OCA-TS 对 MCF-7 细胞 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-12 活性的影响

实验结果如表 3 所示。不同浓度的 OCA-TS 作

表 3 OCA-TS 对人乳腺癌 MCF-7 细胞 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-12 活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of OCA-TS on the activity of Caspase-3, Caspase-8, Caspase-12 in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 Group	剂量 Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Caspase-3 活力 Caspase-3 activity (%)	Caspase-8 活力 Caspase-8 activity (%)	Caspase-12(荧光强度) Caspase-12 (Fluorescence intensity)
空白对照组 Control	-	-	-	5816.31 \pm 331.27
羟基喜树碱 HCPT	5	631.82	1714.29	7480.70 \pm 732.04 **
虎眼万年青总皂苷 OCA-TS	25	146.88	348.15	5932.05 \pm 394.29
	50	301.58	685.19	5884.98 \pm 322.59
	100	598.52	1238.62	5915.58 \pm 340.73

3.5 OCA-TS 对 MCF-7 细胞 Ca^{2+} 浓度的影响

实验结果如表 4 所示。研究表明,不同浓度的 OCA-TS 作用 MCF-7 细胞 48 h 后,细胞内 Ca^{2+}

浓度与阴性对照组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 4 OCA-TS 对 MCF-7 细胞内钙离子浓度的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effects of OCA-TS on the concentration of $[\text{Ca}^{2+}]$ in the MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 Group	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	细胞数 Cell number (n)	$[\text{Ca}^{2+}]$ 变化(荧光强度) Variation of $[\text{Ca}^{2+}]$ (fluorescent intensity)
空白对照组 Control	-	20	7.97 \pm 0.35
羟基喜树碱 HCPT	5	20	28.66 \pm 1.77 **
虎眼万年青总皂苷 OCA-TS	25	20	8.91 \pm 0.50
	50	20	9.26 \pm 0.47
	100	20	9.32 \pm 1.03

3.6 OCA-TS 对 MCF-7 细胞 Fas、FasL 和 FADD 蛋白表达的影响

实验结果如图 5,图 6 所示,不同浓度的 OCA-TS 作用于 MCF-7 细胞 48 h 后,MCF-7 细胞内 Fas、FasL 和 FADD 蛋白表达均显著增加,与对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

4 讨论与结论

乳腺癌是全世界女性中最为常见的恶性肿瘤,高居女性恶性肿瘤发病率第一位,且发病率呈逐年升高的态势^[7-10]。乳腺癌的主要治疗手段有手术、放疗、化疗和内分泌与中药治疗^[11]。但目前尚无有效的治疗药物,发现高效低毒的治疗药物仍然是攻克乳腺癌的主要途径之一。从天然药物中发现抗乳

腺癌的活性物质一直是该领域的研究热点。众多研究表明,虎眼万年青具有明确的抗肿瘤作用,以虎眼万年青为君药的复方万年青胶囊已成为用于抑制乳腺癌,肺癌等转移的中成药。研究发现皂苷类成分是其药效物质基础之一,对多种肿瘤细胞表现出良好的增殖抑制作用^[5]。本课题组在前期研究了 OCA-TS 对肝癌细胞 HepG-2 凋亡的影响,发现 OCA-TS 可降低 HepG-2 细胞线粒体膜电位,上调 Cyt-C 蛋白的表达水平,升高 Caspase-3 的酶活性,从而通过启动线粒体途径诱导人肝癌 HepG-2。而在研究 OCA-TS 抑制乳腺癌细胞增殖及诱导凋亡作用及其机制过程中发现 OCA-TS 可诱导 MCF-7 细胞凋亡,但并未通过线粒体途径^[12]。为此,进行了

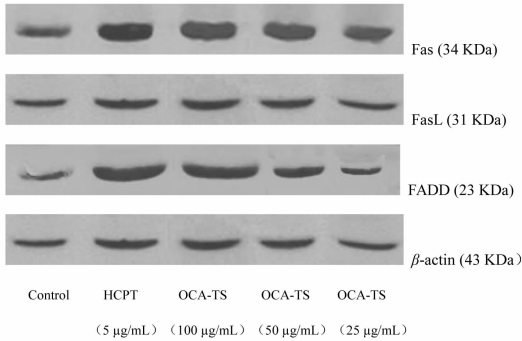


图5 OCA-TS 对人乳腺癌 MCF-7 细胞 Fas、FasL 和 FADD 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of OCA-TS on the expressions of Fas, FasL and FADD proteins in MCF-7 cells

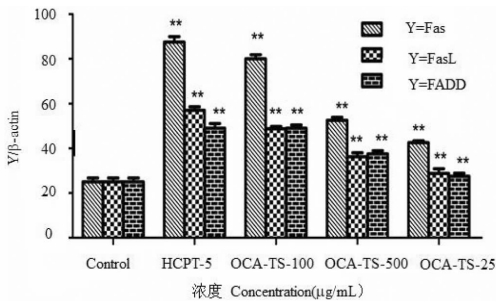


图6 OCA-TS 对人乳腺癌 MCF-7 细胞 Fas、FasL 和 FADD 蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of OCA-TS on the expression of Fas, FasL and FADD proteins in MCF-7 cells

注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with control, ** $P < 0.01$ 。

OCA-TS 诱导 MCF-7 细胞凋亡的线粒体途径、死亡受体途径和内质网三条经典途径的探索,确定具体的靶点^[13]。

线粒体途径是细胞凋亡经典途径之一,也是很多抗肿瘤药物诱导肿瘤细胞凋亡的主要作用途径和机制^[14,15]。因此,本研究首先检测了 OCA-TS 对 MCF-7 细胞线粒体膜电位和 Cyt-C 的表达水平的影响。结果表明,不同浓度的 OCA-TS 作用 MCF-7 细胞 48 h 后,细胞线粒体膜电位、细胞内 Cyt-C 表达水平与空白对照组相比没有显著改变 ($P > 0.05$),而阳性对照组 HCPT 呈现显著性差异 ($P < 0.01$)^[16],说明 OCA-TS 作用于细胞后,并没有通过影响线粒体膜电位使线粒体孔道开放而导致线粒体内 Cyt-C 向胞浆的释放,提示 OCA-TS 诱导 MCF-7 细胞凋亡作用并不是通过启动线粒体凋亡途径实现的。

内质网途径是细胞凋亡的又一条经典途径。钙

离子失衡等多种因素均可破坏内质网的正常运转,造成大量未折叠或错误折叠蛋白的聚集,引发内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 反应^[17]。一旦这种应激程度过大,时间过长,内质网稳态得不到恢复,就会激活内质网的凋亡信号,促使细胞凋亡。研究表明,内质网应激与 Ca^{2+} 稳态密切相关,破坏内质网内 Ca^{2+} 的稳态可以诱发内质网应激,引发内质网超负荷反应和 UPR 反应,导致大量 Ca^{2+} 释放,进而激活 Caspase-12,触发 Caspase 级联反应引起细胞凋亡^[18]。本论文进一步研究了 OCA-TS 对细胞内 Ca^{2+} 浓度和 Caspase-12 的活性的影响,结果表明 OCA-TS 作用细胞后,细胞内 Ca^{2+} 浓度和 Caspase-12 的活性没有显著升高,而阳性对照组 HCPT 呈现显著性差异 ($P < 0.01$)^[19],提示内质网途径不是 OCA-TS 诱导 MCF-7 细胞凋亡的途径和机制。

死亡受体途径是诱导细胞凋亡的外源途径,其中 Fas/FasL 系统在介导细胞凋亡过程中起着重要的信号传递作用^[20,21]。本论文进一步研究发现,OCA-TS 可上调细胞内 Fas、FasL 和 FADD 蛋白的表达,增加 Caspase-3 和 Caspase-8 的酶活性,阳性对照组 HCPT 也具有显著性差异 ($P < 0.01$)^[22]。说明 OCA-TS 可能是通过上调 Fas 和 FasL 的表达,促进 Fas 与三聚体的 FasL 相结合,Fas 通过胞内段的 DD 募集胞质中的 FADD,FADD 进一步将 Caspase-8 募集到 Fas 区域,从而形成死亡诱导信号复合体。Caspase-8 酶原自我剪切活化成活性 Caspase-8,活化的 Caspase-8 进一步激活下游的 Caspase-3,最终诱导 MCF-7 细胞发生凋亡。

综上,OCA-TS 诱导 MCF-7 细胞发生凋亡作用可能是以 Fas、FasL 和 FADD 蛋白为靶点,启动死亡受体途径而不是通过线粒体途径和内质网途径实现的。

参考文献

- Li XD, Gao L. Research progress on chemical composition and pharmacological activities of *Ornithogalum caudatum* ait [J]. Asia-pacific Tradit Med (亚太传统医药), 2016, 12 (22):52-54.
- Zou X, Lin L, Qu ZY, et al. Extraction process of total saponins from *Ornithogalum caudatum* [J]. Heilongjiang Med J (黑龙江医药), 2014, 27:322-325.
- Qu ZY, Zhang YQ, Zou X, et al. Purification of total saponins from *Ornithogalum caudatum* and its antioxidant activity [J].

- Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2016,28:404-408.
- 4 Liang JC, Jin JC, Qian CS, et al. Effects of saponins extract of *Ornithogalum saundersiae* on gene expression and signal transduction pathway of hepatocellular carcinoma cells[J]. J Med Sci Yanbian Univ(延边大学医学学报), 2018, 41: 238-242.
 - 5 Yu YH, Gao L, Shi J, et al. Antitumor analgesic and anti-inflammatory effects of *Ornithogalum caudatum* extracts[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2013, 44:2282-2284.
 - 6 Chen J, Xu ZJ, Xiao MX, et al. The inhibition effect of P-glycoprotein on cytochrome c release and caspase-3 activation by X-ray irradiation[J]. Chin J Radiol Med Protect(中华放射医学与防护杂志), 2006, 26:118-120.
 - 7 Zheng Y, Wu CX, Zhang ML. The epidemic and characteristics of female breast cancer in China[J]. Chin Oncol(中国癌症杂志), 2013, 23:561-569.
 - 8 Li XB, Gao Q, Tang F, et al. Inhibitory effects of 37 plant extracts on human breast cancer cells and fatty acid synthase[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29: 641-647.
 - 9 Wang HC, Liu JJ, Guo YR, et al. Oxidative stress is involved in the apoptosis of human breast cancer MCF-7/ADR cells induced by valdecoxib[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2015, 50:954-959.
 - 10 Engel C, Fischer C. Breast cancer risks and risk prediction models[J]. Breast Care(Basel), 2015, 10(1):7-12.
 - 11 Zheng Y, Wu CX, Zhang ML. The epidemic and characteristics of female breast cancer in China[J]. Chin Oncol(中国癌症杂志), 2013, 23:561-569.
 - 12 Qu ZY, Shi X, Zou X, et al. Study on the apoptotic mechanisms of human liver cancer HepG-2 Cells induced by total saponins of *Ornithogalum caudatum* [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2016, 39:867-871.
 - 13 Lopez J, Tait SW. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within[J]. Br J Cancer, 2015, 112:957-962.
 - 14 Shen WH, Ji XM, Shu Z, et al. Alkali hydrolysate of total saponins from *Pulsatilla chinensis* inhibits hepatic carcinoma cell growth by inducing apoptosis through mitochondrial pathway [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50:895-902.
 - 15 Li YF, Wang SW, Mo FR, et al. Endoplasmic reticulum stress and its relationship with apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. Shandong Med J(山东医药), 2019, 59(1):79-81.
 - 16 Fu YR, Yi ZJ, Yan YR, et al. Hydroxycamptothecin-induced apoptosis in hepatoma SMMC-7721 cells and the role of mitochondrial pathway [J]. Mitochondrion, 2006, 6(4):211-217.
 - 17 Gu S, Yang XC, Xiang XY, et al. Sanguinarine-induced apoptosis in lung adenocarcinoma cells is dependent on reactive oxygen species production and endoplasmic reticulum stress [J]. Oncol Rep, 2015, 34:913-919.
 - 18 Yoon MJ, Lee AR, Jeong SA, et al. Release of Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum and its subsequent influx into mitochondria trigger celastrol-induced paraptosis in cancer cells [J]. Oncotarget, 2014, 5:6816-6831.
 - 19 Li X, Chen H, Sun Y, et al. Hydroxycamptothecin prevents intraarticular scar adhesion by activating the PERK signal pathway[J]. European J Pharm, 2017, 810:36-43.
 - 20 Song J, Yao H, Wang YJ, et al. Effects of sijnunziwan on expression of Bax and Bcl2 in lewis lung cancer mouse[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29:648-652.
 - 21 Pang XB, Xie XM, Zhao QH. Effects of salidroside on cell proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2014, 49:195-198.
 - 22 Yang Y, Hui Z, Sun Y, et al. Combined chemotherapy of hydroxycamptothecin with oxaliplatin as an adjuvant treatment for human colorectal cancer [J]. Tohoku J Exp Med, 2008, 215:267-278.