

# 重楼皂苷 VII 抑制肺癌 H460 细胞增殖和迁移能力研究

何昊\*, 钱小英, 靳曼菲, 王凯迪, 郑蕾, 成昭

西安医学院药学院, 西安 710021

**摘要:**为研究重楼皂苷 VII (polyphyllin VII) 抑制人肺癌 H460 细胞增殖、迁移能力和诱导凋亡的作用和机制。本实验采用 MTT 法检测重楼皂苷 VII 处理后 H460 细胞生长抑制率, Hoechst 33258 染色观察细胞形态, 细胞集落形成实验考察细胞的增殖能力, 划痕实验和 Transwell 小室实验研究 H460 细胞迁移和侵袭能力的改变, 并通过 western blot 法检测在重楼皂苷 VII 处理前后细胞蛋白表达变化情况。结果发现, 重楼皂苷 VII 可显著抑制 H460 细胞增殖, 影响其集落形成, 并使细胞形态发生变化, 抑制细胞体外的迁移和侵袭能力, 并可诱导凋亡的发生。重楼皂苷 VII 处理后, H460 细胞中基质金属蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 显著降低, 凋亡相关蛋白剪切型 caspase-3、Bax 表达增加, ICAD、Bcl-2 表达降低, 提示重楼皂苷 VII 体外可能通过调节基质金属蛋白酶抑制 H460 细胞迁移和侵袭, 同时诱导凋亡的发生。

**关键词:**重楼皂苷 VII; 肺癌细胞 H460; 细胞迁移; 细胞侵袭; 凋亡

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)3-0433-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.3.011

## Polyphyllin VII inhibited the proliferation and migration of lung cancer H460 cells

HE Hao\*, QIAN Xiao-ying, JIN Man-fei, WANG Kai-di, ZHENG Lei, CHENG Zhao

School of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China

**Abstract:** To study the inhibitory effects and mechanisms of polyphyllin VII on the proliferation and migration of human lung cancer H460 cells. MTT assay was used to detect the cell viability of H460 cells after treatment with polyphyllin VII. Cell morphology changes were observed by Hoechst 33258 staining. Cell colony formation assay was used to investigate the ability of cell proliferation ability. Cell migration and invasion ability were detected by wound scratch assay and Transwell chamber experiment. The expressions of proteins were detected by western blot analysis. The results showed that polyphyllin VII significantly inhibited the proliferation and colony formation of H460 cells, also inhibited cell migration and invasion *in vitro*, and finally induced apoptosis in H460 cells. After treatment with polyphyllin VII, MMP-2 and MMP-9 were significantly decreased in H460 cells. The expressions of apoptosis-associated proteins, such as cleaved caspase-3 and Bax were increased, in addition, ICAD and Bcl-2 were decreased, suggested that polyphyllin VII inhibited the migration and invasion of H460 cells by regulating matrix metalloproteinases, and finally induced apoptosis.

**Key words:** polyphyllin VII; H460; cell migration; cell invasion; apoptosis

肺癌为临床最常见的恶性肿瘤疾病之一, 肺癌的发病率和死亡率在绝大多数国家和地区中男性均高于女性。在中国等发展中国家, 由于烟草的使用持续增加等因素, 肺癌的发病率也在逐步增加<sup>[1]</sup>。研究表明, 非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer,

NSCLC) 在肺癌中比例超过 80%, 且 5 年生存率低于 15%<sup>[2]</sup>, 大细胞肺癌即为其中一种。中医药在治疗肺癌方面具有较为悠久的历史, 并积累了较为宝贵的临床应用经验, 中药能够通过提高免疫系统功能、降低血液黏度、影响肿瘤细胞周期以及诱导肿瘤细胞凋亡等方式来抑制肺癌细胞生长, 防止肺癌发生转移<sup>[3]</sup>。重楼为百合科植物云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand-Mazz. 或七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎<sup>[4]</sup>。主产于四

收稿日期: 2020-10-09

接受日期: 2020-12-30

基金项目: 陕西省创新人才推进计划-青年科技新星项目 (2019 KJXX-057); 陕西省高校青年杰出人才支持计划 (05041904); 国家自然科学基金青年项目 (81603265); 国家级大学生创新训练项目 (201911840017)

\* 通信作者 Tel: 86-29-86177545; E-mail: hehao313@163.com

川、云南、陕西等地,七叶一枝花亦为秦巴山区特色太白七药之一,为清热解毒类中药。现代药理研究发现,重楼中发挥主要药效作用的是其中的甾体皂苷类成分,即重楼皂苷。重楼皂苷 VII 即是其中之一,为具有偏诺皂苷元的皂苷类化合物,有研究显示其有抗肿瘤活性<sup>[5,6]</sup>。本研究以人大细胞肺癌 H460 细胞为研究对象,观察重楼皂苷 VII 作用后对细胞增殖、体外迁移、侵袭等的影响,为重楼皂苷应用于肺癌及相应的药物开发提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞

人大细胞肺癌 NCI-H460 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

#### 1.1.2 药品与试剂

重楼皂苷 VII 购自于成都普菲德生物技术有限公司(纯度  $\geq 98\%$ ,批号:76296-75-8);RPMI-1640 培养液、胎牛血清、青霉素、链霉素(美国 HyClone 公司);四甲基偶氮唑蓝噻唑蓝(MTT)、Hoechst 33258 染料(美国 Sigma 公司);Matrigel 基质胶(美国 BD 公司);Transwell 小室(美国 Corning 公司);MMP-2、MMP-9、caspase-3、ICAD、Bax、Bcl-2、GAPDH 抗体(美国 Proteintech 公司)。

#### 1.1.3 主要仪器设备

二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher 公司, Thermo 3111);倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司, IX73);自动全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司, Multiskan GO);分析电子天平(美国 OHAUS 公司, AX224ZH);化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司, ChemiDoc XRS<sup>+</sup>);western blot 系统(美国 Bio-Rad 公司, Universal);超纯水机(美国 Thermo Fisher 公司, MicroPure)。

## 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养及重楼皂苷 VII 储备液的配制

H460 细胞于 RPMI-1640 完全培养液(10% 血清和 1% 双抗)中贴壁生长,培养箱条件为 37 °C, 5% 二氧化碳,取对数生长期的细胞用于实验。重楼皂苷 VII 用 DMSO 溶解为 100 mmol/L 的浓度,分装保存于 -20 °C 冰箱,根据实验需要用完全培养液稀释成目标浓度,并保证 DMSO 的终浓度低于 0.05%,使其不会对研究产生显著影响。

#### 1.2.2 重楼皂苷 VII 对细胞增殖能力的影响

取对数生长期 H460 细胞,0.25% 胰蛋白酶消化,用 RPMI-1640 完全培养液配成单个细胞悬液,

稀释至  $8 \times 10^4$  个/mL,接种于 96 孔培养板中,每孔 100  $\mu$ L,放入培养箱,培养 24 h。吸出旧培养液,将重楼皂苷 VII 用完全培养液稀释成不同浓度(0、0.2、0.4、0.8、1.6  $\mu$ mol/L)作用于细胞,每孔 100  $\mu$ L。24 h 后,弃去原培养液,PBS 洗涤两次,每孔加入 MTT 溶液(MTT:培养液 = 1:9)100  $\mu$ L,37 °C 继续孵育 4 h 后,弃去上清液,加入 150  $\mu$ L DMSO 溶解甲臞,选择 490 nm 波长,在酶标仪上测定各孔光吸收值,记录结果。按照细胞抑制率 = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 对照组 OD 值  $\times 100\%$ ,计算重楼皂苷对肺癌细胞 H460 抑制率及 24 h 的 IC<sub>50</sub>。

#### 1.2.3 细胞集落形成实验

收集对数生长期的 H460 细胞,调整细胞浓度至  $3 \times 10^3$  个/mL,6 孔板中每孔加入 2 mL 细胞液,培养 24 h。弃去旧培养液,加入 2 mL 不同浓度的重楼皂苷 VII(0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8  $\mu$ mol/L),连续培养 20 天。20 天后除去培养液,每孔用 500  $\mu$ L 甲醇固定 15 min,PBS 清洗 2 次,加入 500  $\mu$ L 0.1% 结晶紫染色 5 min,PBS 清洗后拍照。

#### 1.2.4 细胞划痕实验

将 H460 细胞悬液接种于 6 孔板内,待细胞贴壁生长后,在各孔细胞贴壁底部划痕,并在实验组各孔分别加入不同浓度的重楼皂苷 VII(0.2、0.4、0.8  $\mu$ mol/L)空白对照孔加入完全培养液。并于 0、12、24、48 h 在倒置显微镜下对划痕拍照,观察划痕内细胞迁移情况。

#### 1.2.5 细胞迁移和侵袭能力

Transwell 迁移实验:取对数生长期的 H460 细胞,消化重悬,调整浓度至  $2 \times 10^5$  个/mL。Transwell 小室中每孔接种 200  $\mu$ L 细胞悬液,并在下室内每孔加入 600  $\mu$ L 含 20% 血清的培养液,其中含有不同终浓度的重楼皂苷 VII(0、0.1、0.2、0.4  $\mu$ mol/L),置于培养箱中。24 h 后,弃去小室中培养液,PBS 清洗后甲醇固定 20 min,结晶紫染色 3 min,棉签擦去小室内细胞,显微镜下随机 5 个视野观察细胞。

Transwell 侵袭实验:将 Matrigel 胶用预冷的无血清培养液按 1:3 稀释后,均匀铺于小室底部,于 37 °C 培养箱中,孵育 5 h,洗出小室内残余液体,后续操作同 Transwell 迁移实验。

#### 1.2.6 Western blot 检测蛋白表达

取对数生长期的 H460 细胞,接种于 T25 培养瓶中,24 h 后,弃去旧培养液,使用含有 0.4  $\mu$ mol/L 重楼皂苷 VII 的完全培养液,分别作用 0、12、24、48

h 后,收集细胞,裂解提取蛋白。用 12% 的 SDS-PAGE 电泳分离,之后转移至 PVDF 膜,用 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h,洗涤后,使用不同浓度的一抗分别进行孵育,过夜。次日洗涤后,使用二抗继续孵育 1 h,洗涤后使用 ECL 发光液进行化学发光后,成像曝光条带,以 GAPDH 为内参进行分析。

1.2.7 统计学分析

试验结果以( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为具有统计学差异。

2 结果

2.1 重楼皂苷 VII 抑制 H460 细胞生长

不同浓度的重楼皂苷 VII 作用于 H460 细胞 24 h 后,与空白对照组对比,重楼皂苷 VII 处理组的细

胞存活率显著受到抑制,随着浓度增加,细胞生长抑制作用也逐渐增强,其 24 h 的  $IC_{50}$  值为  $0.98 \pm 0.24 \mu\text{mol/L}$  (图 1)。

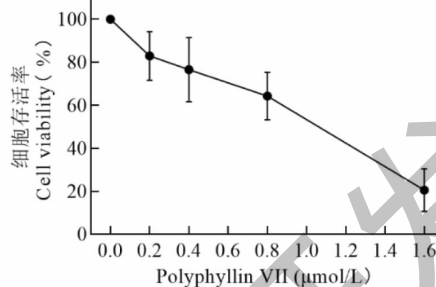


图 1 重楼皂苷 VII 抑制 H460 细胞生长 ( $n = 3$ )

Fig. 1 Polyphyllin VII decreases the viability of H460 cells ( $n = 3$ )

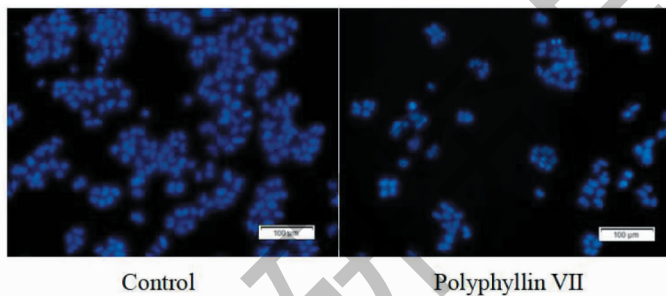


图 2 重楼皂苷 VII 处理 H460 细胞前后形态对比

Fig. 2 The morphology change of H460 cells after treatment of polyphyllin VII

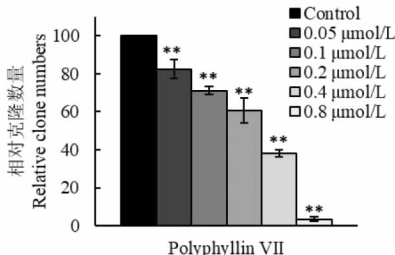
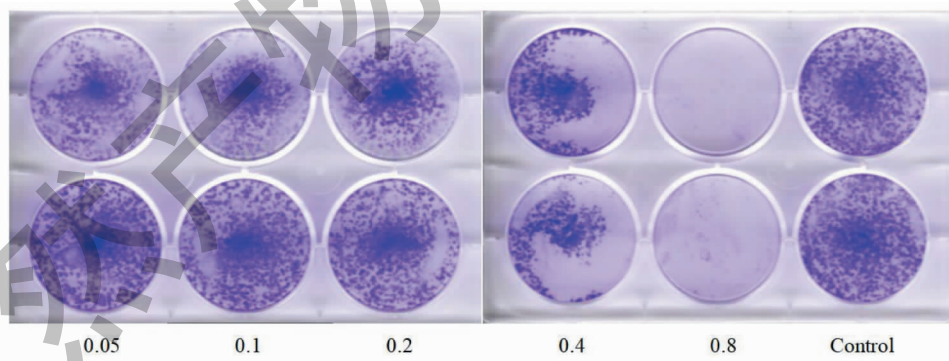


图 3 重楼皂苷 VII 对 H460 细胞集落形成的影响

Fig. 3 The effect of polyphyllin VII on colony formation of H460 cells

注:与对照组相比, \*\*  $P < 0.01$ 。Note: Compared with control group, \*\*  $P < 0.01$ 。

## 2.2 重楼皂苷 VII 对 H460 细胞形态和集落形成的影响

重楼皂苷 VII (0.8  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理细胞 24 h, 与空白组相比, 采用 Hoechst 33258 染色观察发现, 细胞存活率显著下降, 且细胞形态发生了变化(图 2)。此外, 由图 3 可见, 随着重楼皂苷 VII 浓度增大, H460 细胞形成集落能力越弱, 表明 H460 细胞集落的形成与重楼皂苷 VII 浓度呈负相关。

## 2.3 重楼皂苷 VII 对 H460 细胞迁移能力的影响

细胞划痕实验结果如图 4 所示, 不同浓度的重楼皂苷 VII 处理 H460 细胞以后, 在 0、12、24、48 h 进行观察, 与空白对照组比较, 处理组的细胞明显跨越划痕区域的速度变慢, 划痕愈合速度降低, 说明重楼皂苷 VII 体外抑制 H460 细胞迁移具有浓度和时间依赖性。

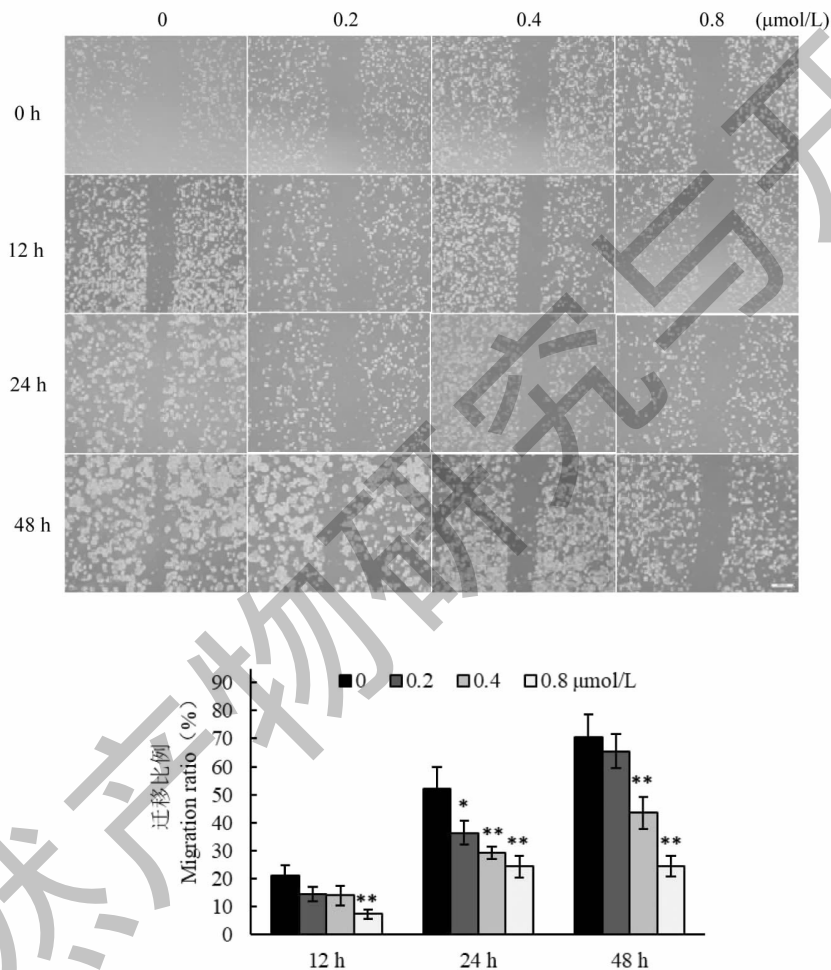


图 4 重楼皂苷 VII 对 H460 细胞划痕实验的影响

Fig. 4 Effect of polyphyllin VII on H460 cell wound scratch assay

注: 与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 下同。Note: Compared with control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , the same below.

## 2.4 重楼皂苷 VII 对 H460 细胞侵袭能力的影响

细胞 Transwell 小室迁移实验结果显示, 用不同浓度的重楼皂苷 VII 处理细胞 24 h 后, 从小室上层通过聚碳酸酯膜进入下室的细胞数量随重楼皂苷 VII 浓度的增加而减少(图 5)。侵袭实验结果同样显示, 用不同浓度的重楼皂苷 VII 处理细胞 24 h 后, 从小室上层透过基质胶进一步通过聚碳酸酯膜进入

下室的细胞数量也随重楼皂苷 VII 浓度增加而减少(图 6)。

## 2.5 重楼皂苷 VII 对 H460 细胞凋亡和迁移相关蛋白的影响

Western blot 检测结果显示, 随着重楼皂苷 VII 作用时间的增加, 基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs) MMP-2 和 MMP-9 表达显著降低,

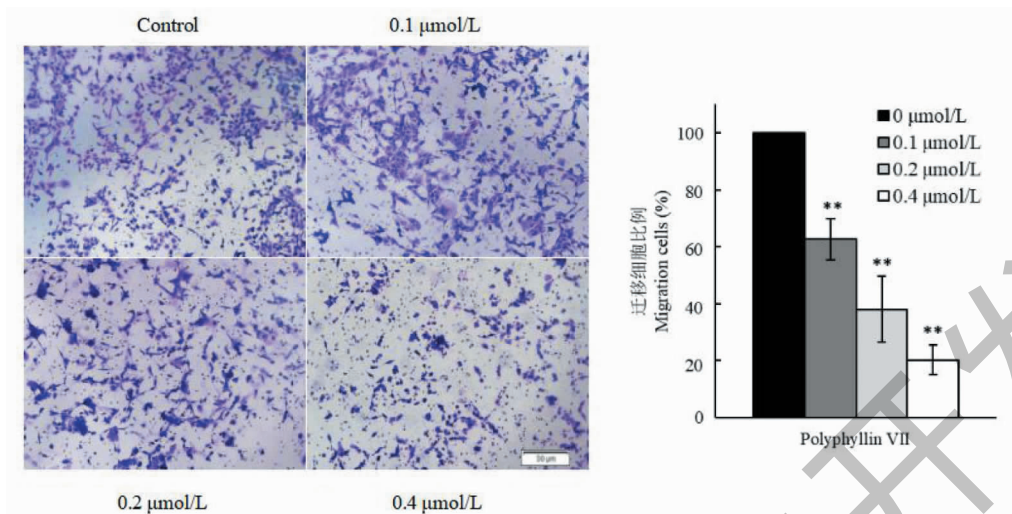


图 5 重楼皂苷 VII 对 H460 细胞小室迁移作用的影响

Fig. 5 Effect of polyphyllin VII on H460 cell migration chamber assays

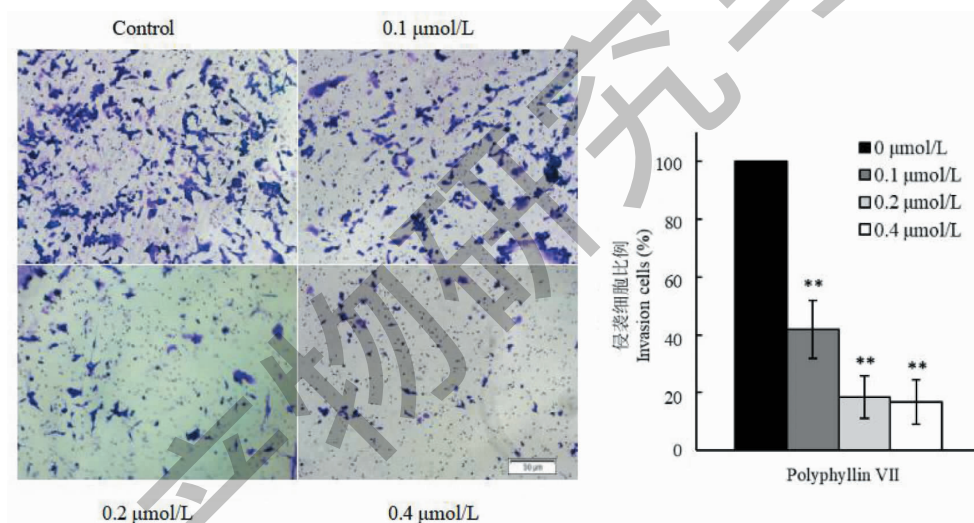


图 6 重楼皂苷 VII 对 H460 细胞小室侵袭作用的影响

Fig. 6 Effect of polyphyllin VII on H460 cell invasion chamber assays

提示其可能通过影响基质金属蛋白酶从而干预细胞的迁移侵袭过程(图 7)。此外,凋亡相关蛋白剪切型 caspase-3、Bax 表达均升高,ICAD、Bcl-2 表达含量降低,提示重楼皂苷 VII 可能诱导 H460 细胞发生了凋亡(图 8)。

### 3 讨论

据统计,约有 50% 以上的抗肿瘤药物基于天然产物研究而来,多种天然来源的单体或提取成分都被证实具有抗肿瘤或诱导肿瘤细胞凋亡等作用<sup>[7,8]</sup>,因此,对于中药和天然药物开展研究,寻找具有抗肿瘤作用的单体或成分,具有十分重要的意

义。重楼皂苷是提取自中药重楼的有效成分,本课题组前期研究发现其具有较好的抗肺癌作用效果,能通过抑制 PI3K-Akt 和 NF- $\kappa$ B 通路诱导肺癌细胞凋亡<sup>[6]</sup>。本研究进一步表明,重楼皂苷 VII 具有抑制肺癌细胞生长的作用,并且能够体外抑制其迁移和侵袭,还可能诱导凋亡的发生,同时,重楼皂苷 VII 调控细胞迁移和侵袭能力可能与其抑制基质金属蛋白酶 MMPs 相关。MMPs 是一类细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解酶,在多种恶性肿瘤中均过表达,其具有促进肿瘤细胞生长、迁移、侵袭,以及促进肿瘤血管新生等作用<sup>[9]</sup>。MMP-2 和 MMP

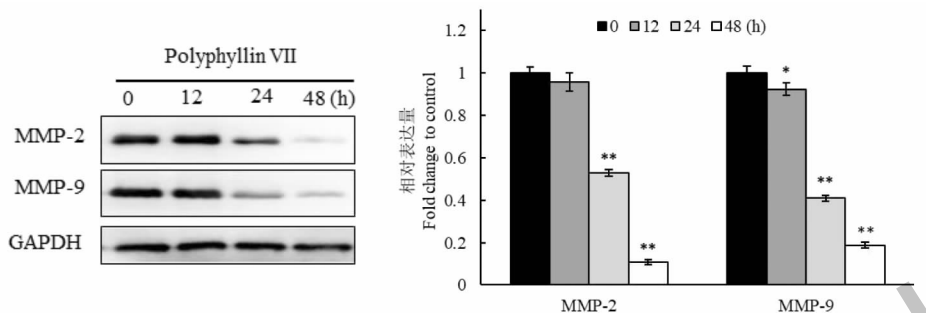


图7 重楼皂苷 VII 对基质金属蛋白酶的影响

Fig. 7 Effect of polyphyllin VII on MMPs

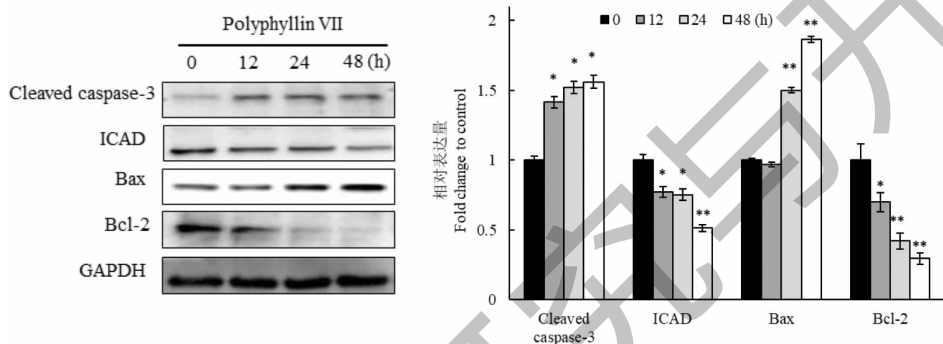


图8 重楼皂苷 VII 对凋亡相关蛋白的影响

Fig. 8 Effect of polyphyllin VII on apoptosis-associated proteins

-9 是两种主要的 MMPs, 同样具有降解 ECM, 促进肿瘤迁移侵袭的作用<sup>[10]</sup>。本研究表明, 重楼皂苷 VII 抑制肺癌细胞迁移和侵袭的作用与其调节 MMP-2 和 MMP-9 的表达相关, 同时, 重楼皂苷 VII 还能够调节凋亡相关蛋白。CAD (caspase-activated deoxyribonuclease) 是凋亡过程中使细胞核中 DNA 降解的一种酶, ICAD (inhibitor of CAD) 则对其发挥抑制作用, 在正常状态下两者均存在于胞浆中, 维持细胞的正常生理活动<sup>[11]</sup>。重楼皂苷 VII 作用后, ICAD 表达降低, 从而使 CAD 抑制作用被减弱, 发挥诱导凋亡的作用。Bcl-2 家族是凋亡过程的重要参与者, 其中 Bax 可促进凋亡的发生, Bcl-2 则抑制凋亡的发生<sup>[12]</sup>。重楼皂苷 VII 作用后, Bcl-2 表达降低, Bax 表达升高, 最终达到活化 caspase 家族蛋白并启动凋亡程序的目的。Caspase-3 是最终的凋亡执行蛋白, 其被活化剪切后, 诱导了凋亡的发生<sup>[13]</sup>。综上所述, 重楼皂苷 VII 能够显著抑制肺癌 H460 细胞的增殖、迁移、侵袭, 其机制与调节 MMPs 家族蛋白并最终诱导凋亡相关, 本研究丰富了重楼皂苷抗肿瘤研究的相关基础, 为重楼皂苷的进一步研究开发提供了参考。

#### 参考文献

- Lindsey AT, Rebecca LS, Ahmedin J. Lung cancer statistics [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 893: 1-19.
- Rebecca LS, Kimberly DM, Ahmedin J. Cancer statistics, 2020 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(1): 7-30.
- Cheng YT, Tian CW, Ren T, et al. Research progress on clinical application and action mechanism of Chinese materia medica in treatment of non small cell lung cancer [J]. *Drug Eval Res (药物评价研究)*, 2016, 39: 293-299.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 5.
- Pang DJ, Li C, Yang CC, et al. Polyphyllin VII promotes apoptosis and autophagic cell death via ROS-inhibited AKT activity, and sensitizes glioma cells to temozolomide [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 14, 2019: 1805635.
- He H, Xu C, Zheng L, et al. Polyphyllin VII induces apoptotic cell death via inhibition of the PI3K/Akt and NF- $\kappa$ B pathways in A549 human lung cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21: 597-606.
- Wang Y, Zhong J, Bai J, et al. The application of natural

- products in cancer therapy by targeting apoptosis pathways [J]. *Curr Drug Metab*, 2018, 19:739-749.
- 8 Jin LM, Xu X, Bao YC. New research progress on antitumor natural products from marine-derived fungi [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29:152-158.
- 9 Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 7, 93:178-193.
- 10 Wu Z, He D, Zhao S, et al. IL-17A/IL-17RA promotes invasion and activates MMP-2 and MMP-9 expression via p38 MAPK signaling pathway in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 455(1-2):195-206.
- 11 Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis [J]. *Nature*, 1998, 391(6662):96-99.
- 12 Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis: recent insights and unknowns [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(1):26-34.
- 13 Kirsch DG, Doseff A, Chau BN, et al. Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274:21155-21161.

## 利用蓝细菌生产可降解塑料

德国蒂宾根大学的研究人员在最近的 *Microbial Cell Factories* 和 *PNAS* 上发表的几项研究中,介绍了他们成功地改变了蓝细菌的代谢通路,生产出了具有良好生物降解特性的有前途的生物塑料替代品——PHB。该方法有望在工业上大量使用,与对环境有害的石油基塑料竞争。蓝细菌,又称微藻或蓝藻,是地球上最不起眼但功能最强大的细菌之一。研究者发现有一种蓝细菌(*Synechocystis* sp. PCC 6803)可以产生多羟基丁酸酯(poly-hydroxy-butyrate, PHB),一种天然形式的塑料。PHB的使用方式与塑料聚丙烯类似,但PHB在环境中可以快速降解,其降解产物无污染,是有前景的环境友好材料。

通常情况下,蓝细菌产生PHB的数量很小。研究小组成功地明确了细菌的生产PHB的关键路径和限制因素,通过去除相应的阻遏蛋白(调节蛋白PIRC),并进一步优化遗传回路(过表达基因PHAA和PHAB),使得细菌产生的PHB产量极大增加,可以占细胞总质量的80%以上,最终产生的聚合物由高度规整的纯PHB组成。研究者将继续优化细菌的碳利用效率使其生产规模进一步增加,该研究有望彻底改变塑料生产方式。

吴晓燕编译自 <https://phys.org/news/2021-02-cyanobacteria-revolutionize-plastic-industry.html>

原文链接:<https://www.pnas.org/content/118/6/e2019988118>

原文标题:The novel PII-interactor PirC identifies phosphoglycerate mutase as key control point of carbon storage metabolism in cyanobacteria