

·实验研究·

本文引用:吴源陶,邹译娴,张春虎,王理槐.菝葜皂苷元对结直肠癌细胞 HT-29 凋亡和自噬的影响[J].湖南中医药大学学报,2021,41(11):1645-1649.

## 菝葜皂苷元对结直肠癌细胞 HT-29 凋亡和自噬的影响

吴源陶<sup>1</sup>,邹译娴<sup>1</sup>,张春虎<sup>2</sup>,王理槐<sup>1\*</sup>

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007;2.中南大学湘雅医院中西医结合科,湖南长沙 410008)

**[摘要]** 目的 探讨菝葜皂苷元(sarsasapogenin, SAR)对人结直肠癌细胞 HT-29 增殖、凋亡和自噬的影响。方法 将 HT-29 细胞分为对照组(DMEM 培养液)和 SAR 组(DMEM 培养液+DMSO+10、20、30、40、50、60 mg/L SAR 溶液);分别采用 MTT 法、流式细胞术、TUNEL 染色及 MDC 染色检测细胞的增殖、凋亡及自噬的变化情况;用 Western blot 法检测细胞中 Caspase-3、Caspase-9、Beclin-1 及 LC3B 蛋白表达水平。结果 经 SAR 处理后,HT-29 细胞的增殖能力明显降低( $P<0.05$ ),凋亡和自噬水平明显增加( $P<0.05$ );与对照组相比,SAR 组细胞 Caspase-3、Caspase-9、Beclin-1 及 LC3B 蛋白表达水平显著上调( $P<0.05$ )。结论 SAR 能够抑制结直肠癌细胞增殖,诱导细胞凋亡和细胞自噬的发生,其机制可能与上调 Caspase-3、Caspase-9、Beclin-1 及 LC3B 蛋白表达水平有关。

**[关键词]** 菝葜皂苷元;结肠癌;大肠癌;细胞增殖;细胞凋亡;细胞自噬

**[中图分类号]**R273 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.11.001

### Effect of Sarsasapogenin on Apoptosis and Autophagy of Colorectal Cancer Lines HT-29

WU Yuantao<sup>1</sup>, ZOU Yixian<sup>1</sup>, ZHANG Chunhu<sup>2</sup>, WANG Lihuai<sup>1\*</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of sarsasapogenin (SAR) on the proliferation, apoptosis, and autophagy of human colorectal cancer cell HT-29. **Methods** HT-29 cells were divided into control group (DMEM medium) and SAR group (DMEM medium + DMSO + 10, 20, 30, 40, 50, 60 mg/L SAR solution). MTT, flow cytometry, TUNEL staining, and MDC staining were used to detect the changes of cell proliferation, apoptosis and autophagy; Western blot method was used to detect the expression levels of Caspase-3, Caspase-9, Beclin-1 and LC3B protein. **Results** After treatment with SAR, the proliferation ability of HT-29 cells was significantly reduced ( $P<0.05$ ), and the level of apoptosis and autophagy increased significantly ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, the expression levels of Caspase-3, Caspase-9, Beclin-1 and LC3B protein in SAR group were significantly increased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** SAR can inhibit the proliferation of colorectal cancer cells, induce apoptosis and autophagy. The mechanism may be related to the up-regulation of Caspase-3, Caspase-9, Beclin-1 and LC3B protein expression levels.

**[Keywords]** sarsasapogenin; colon cancer; colorectal cancer; cell proliferation; apoptosis; autophagy

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的消化 我国 CRC 的发病率和死亡率呈逐年升高趋势<sup>[2]</sup>。最  
道恶性肿瘤之一,居全球恶性肿瘤发病率的第三位<sup>[1]</sup>。 新的调查数据显示,CRC 在我国恶性肿瘤发病率中

**[收稿日期]**2020-12-24

**[基金项目]**国家自然科学基金项目(81673951);湖南省卫健委资助项目(C2019092);湖南省教育厅资助项目(13C054)。

**[作者简介]**吴源陶,女,主治医师,研究方向:中西医结合防治内分泌疾病。

**[通信作者]**\*王理槐,男,副主任医师,E-mail:510236274@qq.com。

位列第三<sup>[3]</sup>。菝葜,又名金刚藤,为百合科植物菝葜 *Smilax china* L. 的干燥根茎,其主要成分是皂苷,且是以菝葜皂苷元(sarsasapogenin, SAR)为主要苷元所衍生的皂苷。研究<sup>[4]</sup>表明,SAR 具有抗衰老、抗炎、降血糖等作用。近年来研究<sup>[5]</sup>报道,SAR 还可用于抗肿瘤,如肝癌、胃癌等。但是,关于 SAR 对 CRC 的作用及其机制的研究报道甚少。因此,本研究拟以 CRC 细胞株 HT-29 为研究对象,通过观察菝葜提取物对 CRC 细胞株 HT-29 凋亡和自噬的影响,探讨菝葜提取物对 CRC 的作用及其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株

人 CRC 细胞 HT-29(批号:SCSP-5032)购于上海生物科学研究所,在含 10% 的胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中培养,其内加入双抗,置于培养箱内常规培养。

### 1.2 试剂与仪器

SAR(海亿欣生物科技公司,批号:B20025);DMEM 培养基(批号:12491015)、胎牛血清(批号:10099-141-FBS)均购自美国 GIBCO 公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(美国 Sigma 公司,批号:67-68-5);Caspase-3 抗体(批号:9669)、Caspase-9 抗体(批号:9504)、Beclin-1 抗体(批号:3738)、LC3B 抗体(批号:2775)均购自美国 CST 公司。

超净工作台(苏州净化公司,型号:SW-CJ-IFD);二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司,型号:Shellab 2306);流式细胞仪(美国 Beckman-Coulter Inc 公司,型号:Cytomics FC500);全自动酶标仪(深圳迈瑞公司,型号:MR-96A);实时定量 PCR 仪(美国 BioRad 公司,型号:S1000);离心机(美国 Thermo 公司,型号:Medifuge);荧光显微镜(日本 Olympus 公司,型号:BX-51)。

### 1.3 细胞分组

将 HT-29 细胞以  $1 \times 10^4$  个细胞/孔接种在 96 孔板培养 24 h。分为对照组(DEME 培养液)和 SAR 组(DEME 培养液+DMSO+10、20、30、40、50、60 mg/L SAR 溶液),各组培养 24 h 后进行后续实验。

### 1.4 MTT 法检测细胞增殖能力

取状态良好、生长旺盛的 HT-29 细胞,用胰酶

消化细胞;以  $1 \times 10^5$  孔细胞密度接种至 96 孔板,常规培养 4 h 后分别加入 10、20、30、40、50、60 mg/L 的 SAR,对照组不加药;药物处理 24、48、72 h 后,开始 MTT 反应,酶标仪 490 nm 检测 OD 值。根据 OD 值绘制细胞生长曲线。

### 1.5 流式细胞术测定细胞凋亡

将 50 mg/L SAR 加入细胞培养瓶中,培养 48 h 后,胰酶消化细胞,当细胞间隙变大、细胞变圆时,终止消化,依次以预冷的 D-Hanks 液及  $1 \times$  binding buffer 洗涤细胞。离心重悬成细胞悬液。添加 10  $\mu$ L Annexin V-APC 染色液,应用流式细胞仪检测不同组别细胞的凋亡率。

### 1.6 MDC 染色检测细胞自噬

取对数生长期的 HT-29 细胞,胰酶消化细胞,重悬成细胞悬液。加入 50 mg/L SAR 培养,2 h 后加入 6-OHDA,共培养 48 h,对照组不加药,常规培养。后按照 MDC 染色试剂盒操作说明进行染色,荧光显微镜下观察,计数并拍照。检测到的高亮点状荧光代表自噬泡。

### 1.7 Western blot 检测蛋白表达量

用胰酶消化并收集处于对数生长期的 HT-29 细胞,加入 SDS 裂解液提取细胞总蛋白,后采用考马斯亮蓝法进行蛋白定量。取 30  $\mu$ g 蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,转膜至 PVDF 膜,封闭液室温封 1 h;用 TBST 洗膜 3 次后,加入用 TBST 稀释的一抗(Caspase-3 为 1:500;Caspase-9 为 1:1 000;Beclin-1 为 1:1 000;LC3B 为 1:1 000),4  $^{\circ}$ C 过夜;用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;经 TBST 漂洗后加入相应的二抗(1:1 000),室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次;加 ECL 显影剂,用自动凝胶成像分析仪检测,采用凝胶成像分析系统扫描分析。以  $\beta$ -actin 为内参计算目的蛋白的表达水平。

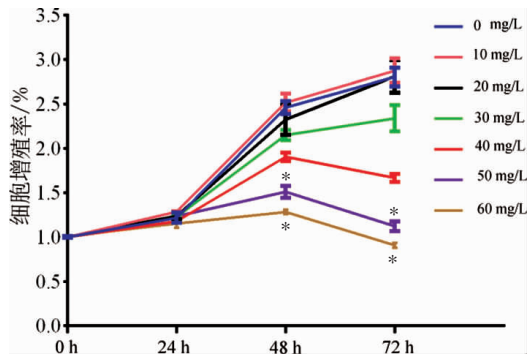
### 1.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行分析,所有数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。当数据符合正态分布时,组间比较采用 *one-way ANOVA* 分析。若方差齐,组间差异比较采用 *LSD* 法;若方差不齐,组间差异比较采用 *Tamhane* 法。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SAR 对 HT-29 细胞生长抑制的影响

SAR 能够抑制 HT-29 细胞的增殖,且对细胞增



注:与0 mg/L相比,\* $P < 0.05$

图1 各组细胞增殖情况

殖的抑制作用呈时间和浓度依赖性。与0 mg/L相比,用50 mg/L SAR干预48 h后,细胞增殖明显受到抑制( $P < 0.05$ )。因此选取50 mg/L SAR进行后续

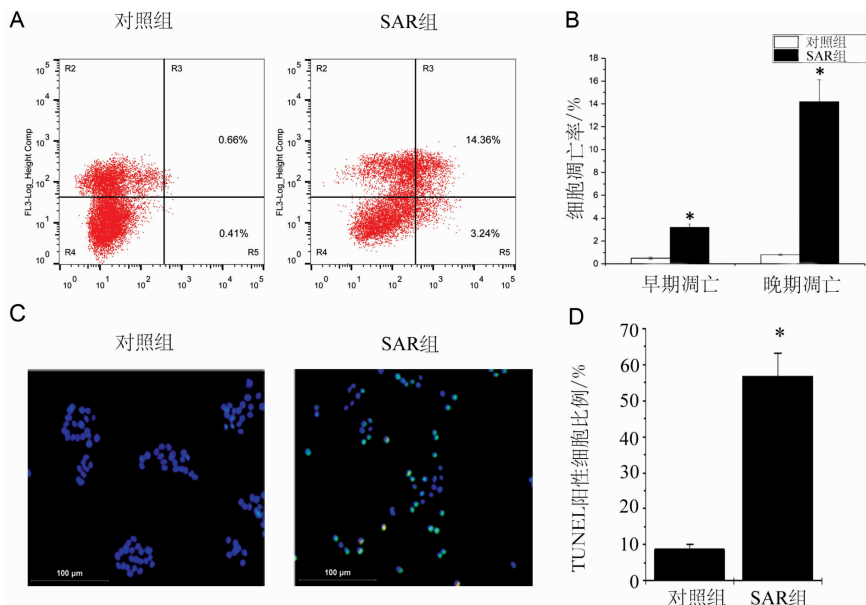
实验。见图1。

### 2.2 SAR对HT-29细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果显示,SAR组细胞早期凋亡率为3.24%,高于对照组细胞早期凋亡率的0.41% ( $P < 0.05$ );SAR组细胞晚期凋亡率为14.36%,高于对照组细胞晚期凋亡率的0.66% ( $P < 0.05$ )。TUNEL染色结果显示,与对照组相比,SAR组TUNEL阳性细胞数明显增多( $P < 0.05$ )。见图2。

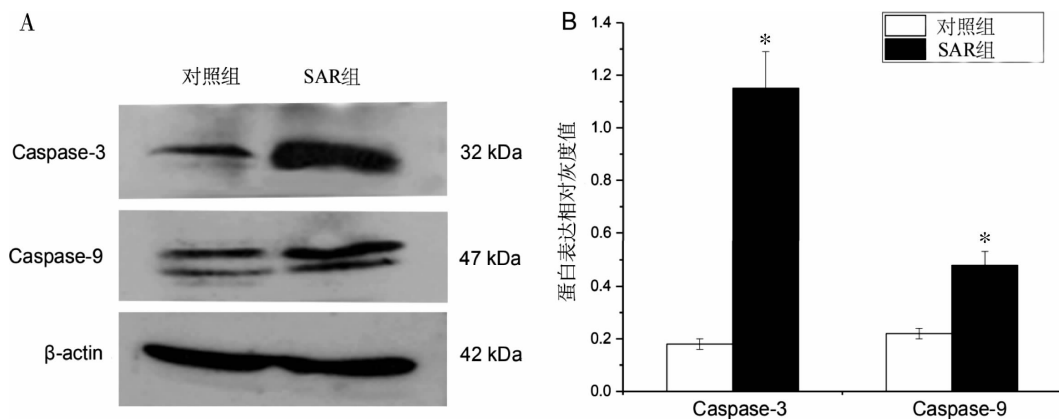
### 2.3 SAR对HT-29细胞凋亡相关蛋白的影响

与对照组相比,SAR组Caspase-3和Caspase-9蛋白表达上调( $P < 0.05$ )。见图3。



注:A.细胞凋亡流式细胞术检测结果图;B.细胞凋亡率;C.TUNEL阳性细胞免疫荧光图( $\times 400$ );D.TUNEL阳性细胞表达情况。与对照组相比,\* $P < 0.05$

图2 各组细胞凋亡情况



注:A.细胞凋亡相关蛋白条带图;B.细胞凋亡相关蛋白表达水平。与对照组比较,\* $P < 0.05$

图3 各组细胞凋亡相关蛋白表达水平

## 2.4 SAR 对 HT-29 细胞自噬的影响

与对照组相比,SAR 组可见到明显的自噬囊泡形成。见图 4。

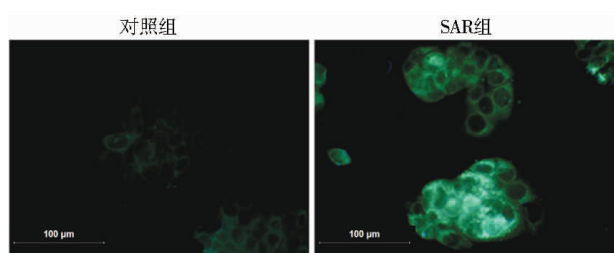
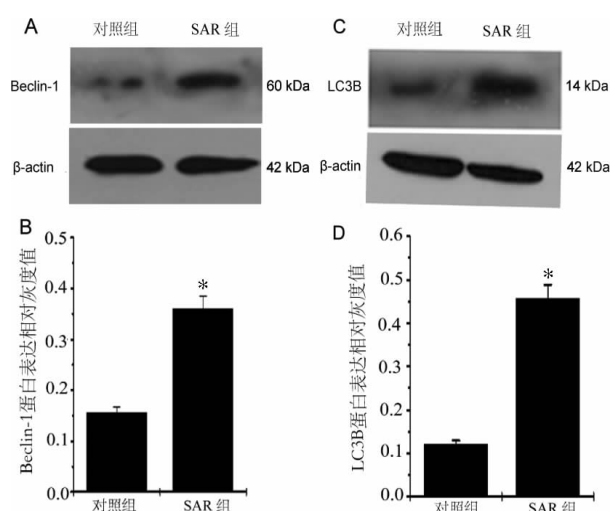


图 4 各组细胞自噬情况(MDC,×400)

## 2.5 SAR 对 HT-29 细胞自噬相关蛋白的影响

与对照组相比,SAR 组细胞 Beclin-1 和 LC3B 蛋白表达增多( $P<0.05$ )。见图 5。



注:A.Beclin-1 蛋白条带图;B.Beclin-1 蛋白表达水平;C.LC3B 蛋白条带图;D.LC3B 蛋白表达水平。与对照组比较,\* $P<0.05$

图 5 各组细胞自噬相关蛋白表达水平

## 3 讨论

据世界卫生组织统计,CRC 已成为全球第四大致命癌症<sup>[6]</sup>。根据中国国家癌症中心发布的《2018 年国家癌症报告》显示,CRC 在中国癌症发病率中排名第三<sup>[3]</sup>。因此,迫切需要寻找一种有效治疗 CRC 的临床药物<sup>[7]</sup>。SAR 可通过多种途径发挥抗肿瘤作用,且由于其较高的安全性,使 SAR 的抗 CRC 癌活性已成为国内外研究的热点之一<sup>[5]</sup>。

凋亡是细胞为清除体内异常或受损细胞自发启动的程序性保护机制,在细胞发育和代谢中起着至关重要的作用<sup>[8-9]</sup>。临床上通过外部干预诱导肿瘤细胞凋亡成为治疗肿瘤的重要途径。有学者探讨了 SAR 对肝癌细胞 HepG2 凋亡的影响,发现 SAR 能

够诱导 HepG2 凋亡<sup>[9-10]</sup>。廖子君等<sup>[10-12]</sup>研究发现,SAR 能够诱导胃癌细胞 BGC-823 凋亡,而不会影响健康细胞的生长,同时能够上调 Bax 蛋白、下调 Bcl-2 蛋白的表达水平。在本研究中,流式细胞术结果发现,与对照组相比,SAR 组 HT-29 细胞凋亡率显著增加( $P<0.05$ )。TUNEL 染色结果同样提示 SAR 可以诱导人 CRC HT-29 细胞凋亡( $P<0.05$ )。进一步对细胞凋亡相关蛋白进行测定发现,SAR 干预可上调 HT-29 细胞中凋亡相关蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达( $P<0.05$ )。凌博凡等<sup>[13]</sup>研究发现,SAR 干预人结肠癌 LoVo 细胞 48 h 后能够诱导该细胞凋亡,该效应发生的同时线粒体膜电位会出现下调改变,提示诱导凋亡的机制可能与线粒体通路的调控有关。

自噬是真核生物体细胞内重要的自我降解和再循环机制。生理状态下,自噬通过清除自身有害物质(老化及死亡的蛋白质和细胞器)而维持细胞内稳态,对机体细胞发挥着保护作用<sup>[14-15]</sup>。当自噬发生异常时,细胞内原有的稳态会被打破,而促进肿瘤发生与发展<sup>[16-17]</sup>。Beclin-1 基因是自噬的特异性相关基因,由其编码的 Beclin-1 蛋白被认为是肿瘤抑制蛋白,能够调节自噬过程,其机制可能是与 Class III PI3K 相结合参与自噬泡的形成<sup>[18]</sup>。LC3B 作为细胞自噬的特异性蛋白,其含量与自噬小体数量呈正相关,因而被广泛运用于自噬研究<sup>[19-20]</sup>。本研究运用 MDC 染色法研究 SAR 对细胞自噬的影响,结果显示,与对照组相比,SAR 组可见到明显的自噬囊泡,且经 SAR 处理的 HT-29 细胞中,自噬相关蛋白 Beclin-1 和 LC3B 显著增多( $P<0.05$ ),提示 SAR 可激活 HT-29 细胞的自噬。

综上所述,SAR 可能通过调控 Caspase-3、Caspase-9、Beclin-1 及 LC3B 蛋白的表达水平发挥抑制 HT-29 细胞增殖,诱导细胞凋亡和自噬的作用。但是其具体深层机制需后续实验进一步进行研究。本研究为菝葜皂苷的进一步开发和为 CRC 的临床治疗提供了有力的实验证据。

## 参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2020, 70(1): 7-30.

- [2] 曹文,周小青.湿热-痰结-瘀毒型小鼠肠癌模型的建立[J].湖南中医药大学学报,2020,40(1):38-41.
- [3] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018, 68(6): 394-424.
- [4] 王江威,苏晓琳,郑秀茜,等.中药菝葜的化学成分及药理作用研究进展[J].化学工程师,2020,34(2):50-53.
- [5] 宋宇,梁长青,何忠梅,等.薯蓣皂苷元体外抗肿瘤作用的研究[J].中国肿瘤,2004,13(10):41-43.
- [6] CHENG L, ENG C, NIEMAN L Z, et al. Trends in colorectal cancer incidence by anatomic site and disease stage in the United States from 1976 to 2005[J]. American Journal of Clinical Oncology, 2011, 34(6): 573-580.
- [7] DEKKER E, TANIS P J, VLEUGELS J L A, et al. Colorectal cancer[J]. The Lancet, 2019, 394(10207): 1467-1480.
- [8] FERNALD K, KUROKAWA M. Evading apoptosis in cancer[J]. Trends in Cell Biology, 2013, 23(12): 620-633.
- [9] XU X B, LAI Y Y, HUA Z C. Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials [J]. Bioscience Reports, 2019, 39(1): BSR20180992.
- [10] BAO W N, PAN H F, LU M, et al. The apoptotic effect of sarsasapogenin from Anemarrhena asphodeloides on HepG2 human hepatoma cells[J]. Cell Biology International, 2007, 31(9): 887-892.
- [11] 倪源.菝葜皂苷元致肝癌 HepG2 细胞凋亡作用机理的研究[D].杭州:浙江大学,2008.
- [12] 廖子君,郑琪,赵征,等.菝葜皂苷对胃癌 BGC-823 细胞 Bcl-2、Bax 凋亡蛋白表达影响的实验研究[J].中国医药指南,2018,16(18):1-2.
- [13] 凌博凡,邹玺,吴坚,等.菝葜皂苷元对人结肠癌细胞 LoVo 凋亡的影响[J].南京中医药大学学报,2012,28(3):256-258.
- [14] NODA N N, INAGAKI F. Mechanisms of autophagy[J]. Annual Review of Biophysics, 2015, 44: 101-122.
- [15] RAVANAN P, SRIKUMAR I F, TALWAR P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses [J]. Life Sciences, 2017, 188: 53-67.
- [16] ONORATI A V, DYCZYNSKI M, OJHA R, et al. Targeting autophagy in cancer[J]. Cancer, 2018, 124(16): 3307-3318.
- [17] MARINKOVI M, PRUNG M, BULJUBA I M, et al. Autophagy modulation in cancer: Current knowledge on action and therapy[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018, 2018: 8023821.
- [18] DU H L, CHE J M, SHI M M, et al. Beclin 1 expression is associated with the occurrence and development of esophageal squamous cell carcinoma [J]. Oncology Letters, 2017, 14 (6): 6823-6828.
- [19] GIATROMANOLAKI A, KOUKOURAKIS M I, GEORGIU I, et al. LC3A, LC3B and beclin-1 expression in gastric cancer[J]. Anticancer Research, 2018, 38(12): 6827-6833.
- [20] CERULLI R A, SHEHAJ L, BROWN H, et al. Stapled peptide inhibitors of autophagy adapter LC3B [J]. ChemBioChem, 2020, 21(19): 2777-2785.

(本文编辑 匡静之 周旦)