

人参皂苷 CK 抑制人结肠癌 SW480 细胞增殖的机制研究

孟 雪, 邱智东, 王 蕾, 刘 达*

长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117

摘 要:目的 研究人参皂苷 CK 对人结肠癌 SW480 细胞增殖及凋亡的影响, 并进一步探讨其作用机制。方法 采用 CCK-8 法检测细胞活力; 通过流式细胞术检测细胞周期、细胞凋亡、活性氧 (ROS) 水平和线粒体膜电位 (MMP) 变化; Hoechst 染色检测细胞凋亡; 蛋白免疫印迹法检测细胞色素 C (CytC) 释放以及凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 和 cleaved Caspase-3 等的表达。**结果** 人参皂苷 CK 对 SW480 细胞的增殖有显著抑制作用。人参皂苷 CK 诱导 SW480 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期, 促进细胞发生早期凋亡。人参皂苷 CK 可以显著增加细胞内 ROS 水平, 降低 MMP 水平; 人参皂苷 CK 促进 Bax 和 cleaved Caspase-3 的表达, 抑制 Bcl-2 的表达。此外, 人参皂苷 CK 使 SW480 细胞内 CytC 大量释放。**结论** 人参皂苷 CK 对 SW480 细胞的增殖具有显著的抑制作用, 其作用机制可能是通过促进线粒体超氧化物升高, 导致胞内 ROS 水平显著增加和 MMP 显著下降, 进而导致 CytC 释放, 上调 Bax 的表达, 下调 Bcl-2 的表达, 最终导致细胞发生凋亡。

关键词: 人参皂苷 CK; 人结肠癌 SW480 细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; 线粒体; 细胞色素 C

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)06-1567-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.06.025

Mechanism of ginsenoside CK inhibiting proliferation of human colon cancer SW480 cells

MENG Xue, QIU Zhi-dong, WANG Lei, LIU Da

School of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract: Objective To study the effects of ginsenoside CK on proliferation and apoptosis of human colon cancer cell line SW480, and further explore the mechanism. **Methods** Cell viability was measured by CCK-8 assay. Cell cycle, apoptosis, reactive oxygen species (ROS) levels and changes in mitochondrial membrane potential were measured by flow cytometry. Hoechst staining further detected apoptosis. Western blotting was used to detect the release of cytochrome C and the expression of apoptosis-related proteins such as Bcl-2, Bax and cleaved Caspase-3. **Results** Ginsenoside CK had a significant inhibitory effect on the proliferation of human colon cancer cell line SW480. Ginsenoside CK induced SW480 cells arrest in G₀/G₁ phase, promoted early apoptotic cells, significantly increased intracellular ROS levels and reduced the MMP level. Ginsenoside CK promoted the expression of Bax and cleaved-Caspase-3 and inhibited the expression of Bcl-2. In addition, ginsenoside CK released a large amount of cytochrome C in SW480 cells. **Conclusion** Ginsenoside CK has a significant inhibitory effect on the proliferation of human colon cancer cell line SW480. The mechanism may be through the promotion of mitochondrial superoxide elevation, resulting in a significant increase in intracellular ROS levels and a significant decrease in MMP level, further leading to the release of cytochrome C, the up-regulated expression of Bax, the down-regulated expression of Bcl-2, and ultimately leading to apoptosis of cells.

Key words: ginsenoside compound K; human colon cancer SW480 cells; cell proliferation; cell apoptosis; mitochondria; cytochrome C

结肠癌是一种常见的胃肠道恶性肿瘤, 是导致癌症相关死亡的第 4 大原因^[1]。在过去 10 年间, 尽管在诊断和治疗方面取得了很大进展, 但结肠癌患者的 5 年生存率仍仅为 50%~65%^[2-3]。已有研究证

实结肠癌的发病和死亡率增加与生活方式、饮食、年龄、肥胖、遗传和环境因素 (暴露于致癌物和吸烟等) 相互作用的变化有关^[4-5]。由于结肠癌的发病率高, 预后不良, 结肠癌是世界范围内主要的公

收稿日期: 2019-09-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81803680); 国家自然科学基金资助项目 (81973712); 吉林省科技发展规划项目 (20170307031YY); 吉林省科技发展规划项目 (20180520050JH)

作者简介: 孟 雪 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂学。E-mail: m15844124872@163.com

***通信作者** 刘 达, 男, 副教授, 研究方向为分子生物学。E-mail: liuda_1986@163.com

共卫生问题和临床挑战^[6]。据报道,许多信号传导途径和分子与结肠癌的发生和发展有关。然而,结肠癌致癌作用的分子机制在很大程度上仍然未知。因此,有必要更加深入地研究结肠癌的治疗靶点。

人参 *Panax ginseng* Meyer 是东方国家最知名的草药之一,因其具有促进健康和延长寿命的功效而闻名于全球。人参的主要活性成分人参皂苷被分为原人参二醇型(PPDs)和原人参三醇型(PPTs)皂苷,具有多种药理学特性。人参皂苷 CK(ginsenoside compound K)是 PPDs 型皂苷的肠道细菌代谢产物,具有广泛的药理作用,如抗癌、神经保护、抗炎、抗血管生成、抗过敏、抗糖尿病、抗衰老和保肝作用^[7-9]。人参皂苷 CK 因其抑制细胞增殖和诱导各种人类癌细胞(包括肝癌、肺癌、白血病、乳腺癌、前列腺癌和结直肠癌)的凋亡而受到特别关注^[10-13]。然而,关于其抗结肠癌的机制研究需要进一步深入,本研究旨在探索人参皂苷 CK 对人结肠癌 SW480 细胞增殖、周期及凋亡的影响,并探讨其作用机制,为临床应用及新药开发提供参考。

1 材料

1.1 药物与细胞

SW480 细胞购自美国模式培养物集存库(ATCC);人参皂苷 CK(质量分数 $\geq 98\%$,批号 B21045),购自上海源叶生物公司。

1.2 试剂与仪器

DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司);PBS、胰蛋白酶、青霉素链霉素双抗(Hyclone 公司);胎牛血清(天津康源生物技术有限公司);Cell counting kit-8 试剂盒(博士德生物工程有限公司);Hoechst 33342 染色液、台盼兰、线粒体膜电位检测试剂盒(Solarbio 公司);BCA 蛋白定量试剂盒、细胞色素 C 释放检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);碘化丙啶(北京鼎国昌盛生物技术有限公司);FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit(BD PharmingenTM);抗体 GAPDH、Bax、Bcl-2、cleaved-Caspase3、goat anti-mouse IgG HRP、goat anti-rabbit IgG HRP(Cell Signaling Technology 公司)。

酶标仪(Molecular Devices 公司);蛋白质电泳仪(Wealtec 公司);自动细胞计数仪(Invitrogen CountessTM II FL 公司);Thermo 热电 371 型 CO₂ 培养箱;Thermo 1300 Series A2 生物安全柜、Precision GP 05 水浴锅、HERACUS MEGAFUGE 离心机、EVOS XL Core 显微镜(Thermo Fisher Scientific 公

司);流式细胞仪(Beckman Cytoflex 公司);iBright FL1500 多功能、凝胶成像系统、EVOS FL Auto 全自动细胞成像系统(Thermo ScientificTM invitrogen 公司)。

2 方法

2.1 CCK-8 法检测细胞增殖

SW480 细胞培养于含 10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中,37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养。取对数生长期的 SW480 细胞用胰蛋白酶消化,离心,重悬细胞,台盼兰染色计数。将细胞悬液稀释成 2×10^4 个/mL 密度,接种于 96 孔板中,每孔 200 μ L,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。培养 12 h 细胞贴壁后,开始加药处理。分别设置对照组(DMSO 溶剂)和人参皂苷 CK 组(10、20、30、40、50、60、70、80、100 μ mol/L),每组设置 6 个复孔。分别培养 6、12、24、48 h 后,每孔加入 20 μ L 的 CCK-8 溶液,避光孵育 30 min 后,采用酶标仪在 450 nm 波长下测定各个孔的吸光度(A)值,并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{药物}} / A_{\text{对照}}$$

2.2 光学显微镜下观察细胞形态

取对数生长期的 SW480 细胞,胰蛋白酶消化并收集细胞,按 4×10^4 个/mL 密度接种于 6 孔板中,继续培养 12 h 贴壁后,给予人参皂苷 CK(0、20、40、60 μ mol/L)处理细胞,培养 24 h 后,显微镜下观察细胞生长状态。

2.3 流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡

取对数生长期的 SW480 细胞,胰蛋白酶消化并收集细胞,按 4×10^4 个/mL 密度接种于 6 孔板中,继续培养 12 h 贴壁后,加入不同浓度的人参皂苷 CK(0、20、40、60 μ mol/L)处理细胞,培养 24 h 后,收集细胞。检测细胞凋亡时,每个样品加入 5 μ L 碘化丙啶(PI)染色液,5 μ L Annexin V 染色液和 200 μ L Buffer,混合均匀,室温避光孵育 15 min,采用流式细胞仪检测^[14]。检测细胞周期时,每个样品加入 PI 染液 1 mL,混合均匀后 37 °C 避光孵育 30 min,采用流式细胞仪检测^[15]。

2.4 Hoechst 染色观察细胞凋亡

细胞处理方法同“2.3”项,弃去各孔中培养基,加入少量 Hoechst 33342 工作液,加入工作液的体积宜覆盖住 6 孔板中的细胞即可,混匀。室温孵育 3~5 min。吸除 Hoechst 33342 染色液,用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。直接在荧光显微镜下观察^[16]。

2.5 细胞内活性氧 (ROS) 水平检测

用无血清 DMEM 培养基稀释 DCFH-DA, 终浓度为 $10\ \mu\text{mol/L}$ 。细胞处理方法同“2.3”项, 细胞培养结束后, 弃掉培养液, 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 稀释好的 DCFH-DA, 在 $37\ ^\circ\text{C}$ 的 CO_2 培养箱内孵育 $20\ \text{min}$ 。用无血清 DMEM 培养液轻轻洗涤细胞 3 次, 去除未进入细胞内的 DCFH-DA (注意不要将细胞吸出)。使用流式细胞仪检测, 使用激发波长 $488\ \text{nm}$, 发射波长 $525\ \text{nm}$, 检测药物作用前后荧光强度^[17]。

2.6 线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 分析

SW480 细胞接种于 6 孔培养板, 细胞处理方法同“2.3”项, 收集细胞, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 加入罗丹明 123 使其终浓度为 $2\ \mu\text{mol/L}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 避光孵育 $30\ \text{min}$, $1\ 200\ \text{r/min}$ 离心 $5\ \text{min}$, 弃上清, 加入 PBS 洗涤细胞 3 次, 最后加入 $200\ \mu\text{L}$ PBS 重悬细胞, 使用流式细胞仪检测, 激发波长 $507\ \text{nm}$, 最大发射波长 $529\ \text{nm}$, 检测药物作用前后荧光强度^[18]。

2.7 Western blotting 检测凋亡相关蛋白的表达

2.7.1 细胞线粒体蛋白的提取 细胞色素 C (CytC) 原定于线粒体中, 当线粒体功能发生障碍, 会导致线粒体膜通透性发生改变, 进而导致 CytC 从线粒体释放到细胞质, 因此提取线粒体蛋白用于后续 Western blotting 实验检测线粒体中内参蛋白 CoX IV 及目的蛋白 CytC 表达水平的变化。SW480 细胞接种于 6 孔培养板, 细胞处理方法同“2.3”项, 收集细胞, 加入适量临用前添加了 PMSF 的线粒体分离试剂至细胞中, 冰浴放置 $10\sim 15\ \text{min}$, 随后将细胞悬液转移到一适当大小的玻璃匀浆器中, 匀浆

$80\sim 90\ \text{s}$, 然后将细胞匀浆液在 $600\times g$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 $10\ \text{min}$, 取上清转移至另一离心管中, 在 $11\ 000\times g$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 $10\ \text{min}$, 弃上清, 沉淀即为分离得到的细胞线粒体蛋白。

2.7.2 细胞质蛋白的提取 SW480 细胞接种于 6 孔培养板, 细胞处理方法同“2.3”项, 收集细胞。加入适量的细胞裂解液, 吹悬混合均匀, 涡旋 4 次, 每次 $5\ \text{min}$ 。静置, 离心取上清, 用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白质量浓度。

2.7.3 分离目的蛋白 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品后, 转膜, 5% 牛奶封闭 $1.5\ \text{h}$ 。一抗 Bax ($1:1\ 000$)、Bcl-2 ($1:1\ 000$)、CytC ($1:1\ 000$)、CoX IV ($1:1\ 000$)、cleaved Caspase-3 ($1:1\ 000$) 孵育过夜, 次日二抗孵育 $1.5\ \text{h}$, 多功能凝胶成像仪显影^[19]。

2.8 统计学分析

除特殊说明外, 所有研究均进行至少 3 次的生物学重复实验, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示。统计学分析应用 GraphPad Prism6 (GraphPad Software, Inc.) 软件, 组间差异分析应用 One-way ANOVA 分析方法。

3 结果

3.1 对 SW480 细胞增殖的影响

人参皂苷 CK 对 SW480 细胞增殖的影响结果见图 1, 与对照组比较, 随着人参皂苷 CK 处理浓度的增加, 细胞存活率逐渐降低, 具有显著的浓度依赖性, 并且通过计算得出人参皂苷 CK 作用 $24\ \text{h}$ 对 SW480 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $55.17\ \mu\text{mol/L}$, 因此后续实验选择 20 、 40 、 $60\ \mu\text{mol/L}$ 作为人参皂苷 CK 处理浓度。

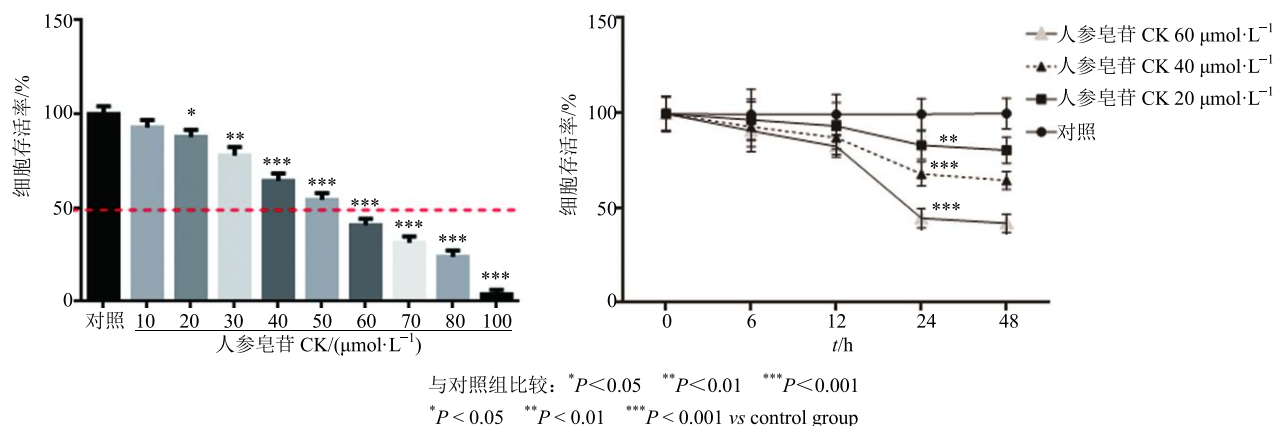


图 1 人参皂苷 CK 对 SW480 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Fig. 1 Effect of ginsenoside CK on proliferation of SW480 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

不同浓度的人参皂苷 CK 处理 SW480 细胞 6、12、24、48 h, 与对照组比较, 不同浓度的人参皂苷 CK 处理 6、12 h 无显著性差异, 处理 24、48 h, 细胞存活率与对照组比较显著降低 ($P < 0.05$), 其中处理 48 h 与处理 24 h 比较差异无显著性, 所以后续实验选择人参皂苷 CK 处理 24 h。

3.2 对 SW480 细胞形态的影响

人参皂苷 CK 对 SW480 细胞形态的影响结果见图 2, 与对照组比较, SW480 细胞经不同浓度人参皂苷 CK 处理后, 其增殖受到明显抑制, 且随着人参皂苷 CK 浓度的增大, 其抑制作用越显著, 即细胞数量显著减少, 细胞形态发生改变, 呈显著的凋亡形态。

3.3 对 SW480 细胞周期的影响

人参皂苷 CK 对 SW480 细胞周期的影响结果见图 3 和表 1, 与对照组比较, 20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 CK 可将 SW480 细胞阻滞于 G_0/G_1 期, 导致 G_0/G_1 期的细胞比例明显增加 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), S 期、 G_2/M 期的细胞数明显减少, 细胞分裂受到明显抑制。

3.4 对 SW480 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测细胞凋亡结果见图 4 和表 2, 与对照组比较, 不同浓度的人参皂苷 CK (20、40、60 $\mu\text{mol/L}$) 处理 SW480 细胞 24 h 后, 可以明显诱导细胞发生早期凋亡, 随着人参皂苷 CK 浓度的增大, 细

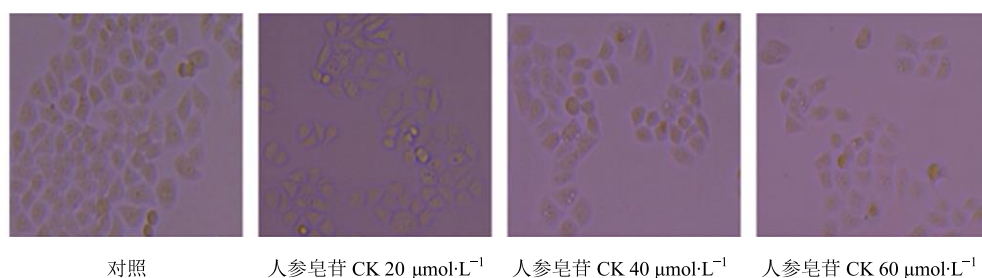


图 2 人参皂苷 CK 对 SW480 细胞形态的影响

Fig. 2 Effect of ginsenoside CK on morphology of SW480 cells

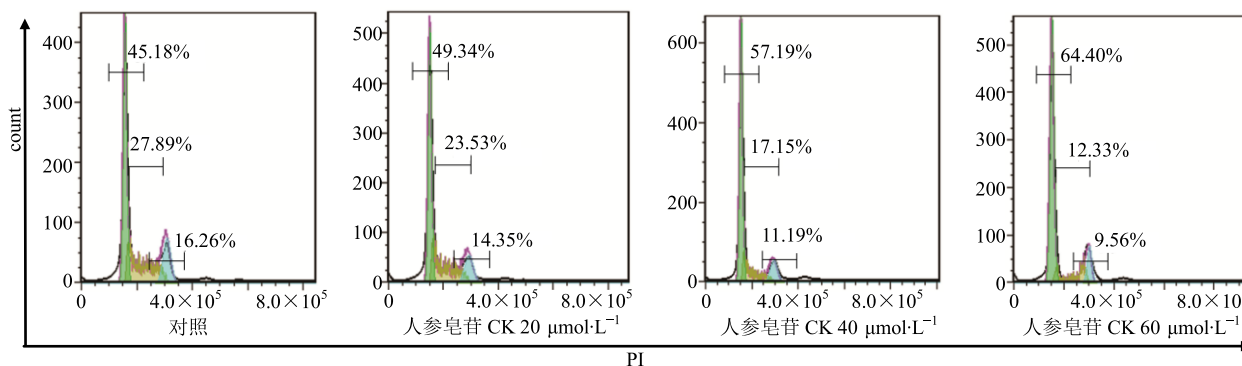


图 3 人参皂苷 CK 对 SW480 细胞周期的影响

Fig. 3 Effect of ginsenoside CK on cell cycle of SW480 cells

表 1 人参皂苷 CK 对 SW480 细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effect of ginsenoside CK on cell cycle distribution of SW480 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	$C/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	细胞占比/%		
		G_0/G_1	S	G_2
对照	—	45.18 ± 1.41	27.89 ± 2.82	16.26 ± 1.10
人参皂苷 CK	20	$49.34 \pm 2.12^*$	$23.53 \pm 2.12^*$	14.35 ± 0.98
	40	$57.91 \pm 1.79^{**}$	$17.15 \pm 3.53^{**}$	$11.19 \pm 1.32^*$
	60	$64.40 \pm 2.10^{***}$	$12.33 \pm 2.76^{***}$	$9.56 \pm 0.76^*$

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下表同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as following tables

胞的凋亡率显著升高 ($P<0.01$), 其中高浓度人参皂苷 CK 组凋亡率达到 65.93%, 具有显著的浓度依赖性。

Hoechst 荧光染料检测细胞凋亡结果见图 5, 当给予不同浓度的人参皂苷 CK 处理后, 随着人参皂苷 CK 浓度的增大, 细胞形态发生染色质固缩, 细

胞核呈致密浓染, 或呈碎块状致密浓染的比例显著增多, 即凋亡的细胞显著增加, 与流式细胞仪定量检测结果相一致。

3.5 对 SW480 细胞内 ROS 水平的影响

细胞内 ROS 水平变化结果见图 6 和表 3, 当给

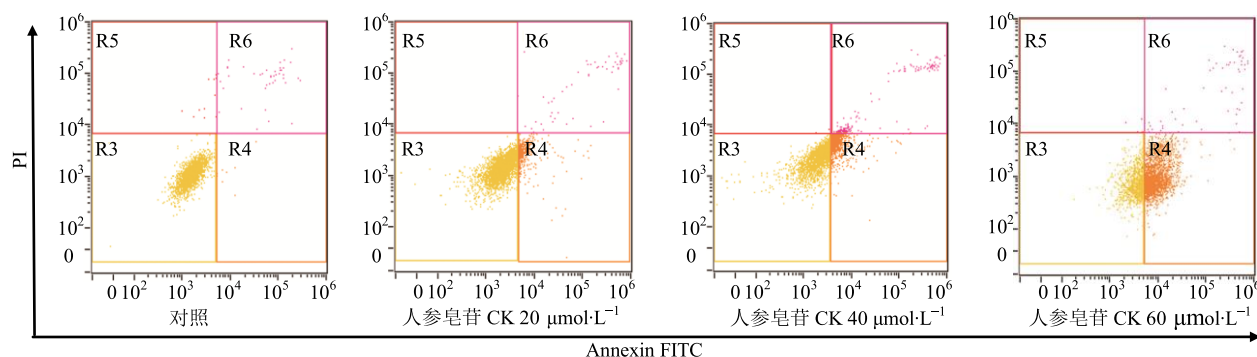


图 4 人参皂苷 CK 对 SW480 细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effect of ginsenoside CK on apoptosis of SW480 cells

表 2 人参皂苷 CK 对 SW480 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of ginsenoside CK on apoptosis of SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	C/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	早期凋亡率/%	晚期凋亡率/%	总凋亡率/%
对照	—	0.45 ± 0.04	1.59 ± 0.35	2.04 ± 0.01
人参皂苷 CK	20	$9.19 \pm 0.02^{**}$	1.17 ± 0.07	$10.36 \pm 0.02^{**}$
	40	$24.80 \pm 0.03^{***}$	4.16 ± 1.41	$28.96 \pm 0.02^{***}$
	60	$64.30 \pm 0.02^{***}$	1.63 ± 0.42	$65.93 \pm 0.03^{***}$

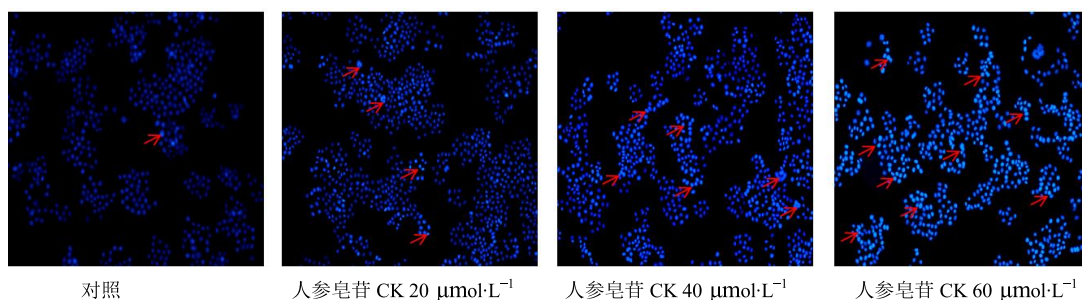


图 5 人参皂苷 CK 对 SW480 细胞凋亡的影响 (Hoechst 染色)

Fig. 5 Effect of ginsenoside CK on apoptosis of SW480 cells (Hoechst straining)

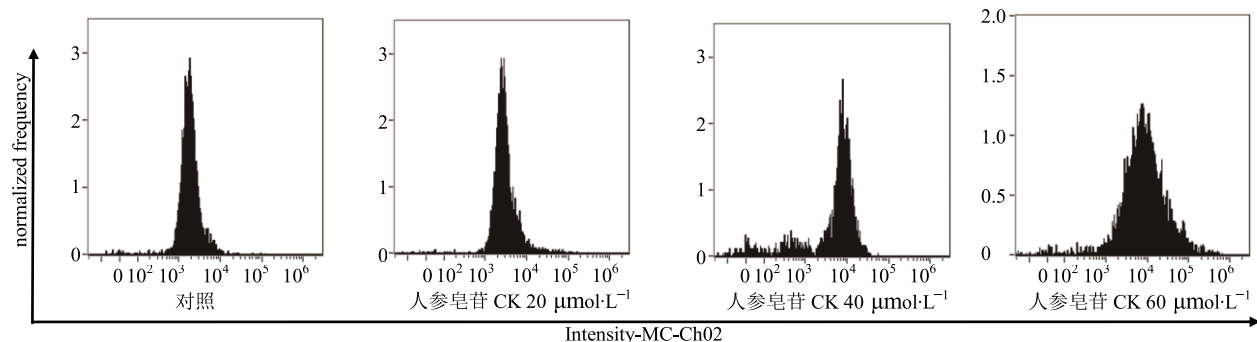


图 6 人参皂苷 CK 对 SW480 细胞内 ROS 水平的影响

Fig. 6 Effect of ginsenoside CK on ROS level in SW480 cells

表 3 人参皂苷 CK 对 SW480 细胞 ROS 和 MMP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of ginsenoside CK on ROS and MMP levels in SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	荧光强度	
		ROS	MMP
对照	—	2 202 $\pm$ 505	52 917 $\pm$ 2 828
人参皂苷 CK	20	4 075 $\pm$ 710*	49 414 $\pm$ 3 536*
	40	7 583 $\pm$ 603***	35 325 $\pm$ 2 800**
	60	17 690 $\pm$ 512***	12 767 $\pm$ 2 795***

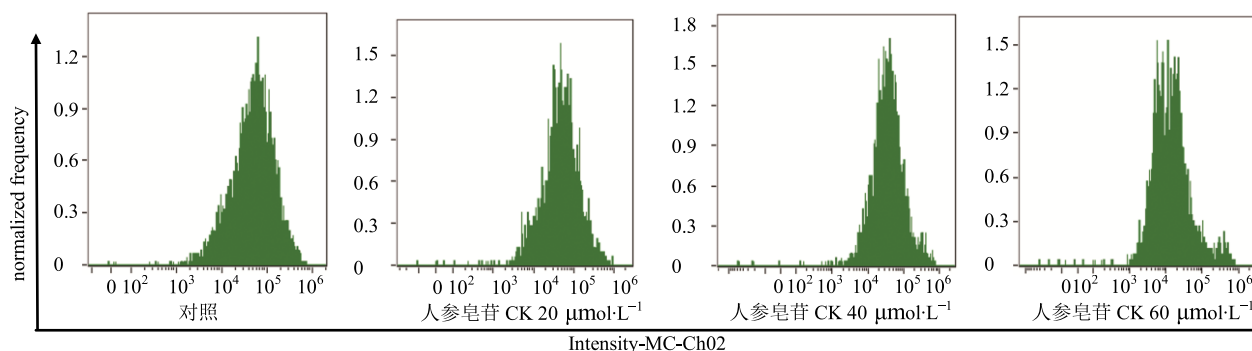


图 7 人参皂苷 CK 对 SW480 细胞内 MMP 水平的影响

Fig. 7 Effect of ginsenoside CK on MMP level in SW480 cells

3.7 对 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3、CytC 等蛋白表达的影响

在凋亡过程中, 抗细胞凋亡调节因子 Bcl-2 可阻止线粒体膜孔的开放, 而促凋亡调节因子 Bax 诱导其开放, 线粒体膜孔开放可促进 CytC 从线粒体释放入细胞质中, 从而诱发细胞凋亡。人参皂苷 CK 对线粒体凋亡信号途径关键蛋白表达的影响结果见图 8, 与对照组比较, 人参皂苷 CK 干预组线粒体中 CytC 蛋白表达量显著下调, 细胞质中 CytC 蛋白表达量显著上调, 说明人参皂苷 CK 可增加 CytC 从线粒体向胞质中的释放, 进而导致抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平显著下调, 同时促凋亡蛋白 Bax 表达水平显著上调, 最终导致 cleaved Caspase-3 表达水平显著上调。

4 讨论

结肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 近几年来, 随着人们生活水平的提高和饮食习惯的改变, 结肠癌的发病率呈上升趋势。在 20 世纪 80 年代起, 作为肿瘤的第 4 种治疗方法——生物治疗问世, 其中的免疫治疗是一种常用的方法, 免疫学疗法就是采用免疫学方法和途径, 增强人的免疫能力, 调整身体的抗肿瘤能力, 从而达到抑制肿瘤生长、

予不同浓度人参皂苷 CK 处理后, 与对照组比较, 细胞内 ROS 水平显著上调 ($P < 0.05, 0.001$), 且呈现出明显的浓度依赖性。

3.6 对 SW480 细胞内 MMP 水平的影响

细胞内 MMP 水平变化结果见图 7 和表 3, 当给予不同浓度人参皂苷 CK 处理后, 与对照组比较, 细胞内 MMP 水平显著下调 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 且呈现出明显的浓度依赖性。

发展, 消灭肿瘤的目的^[20-21]。

人参皂苷 CK 是人参在体内发挥活性的化合物, 是天然的 PPDs 在人肠道内的代谢产物, 生物活性研究表明人参皂苷 CK 是一个多靶点、高活性化合物, 在抗肿瘤、抗炎及免疫系统方面都具有较好的调节作用。体外研究表明人参皂苷 CK 可以进入细胞核内, 诱导黑色素瘤细胞 (B16) 凋亡, Lee 等^[22]研究表明, 人参皂苷 CK 可使促凋亡体的产生及 DNA 片段化, 使 CytC 释放增加, 同时诱导促凋亡蛋白 Bax 表达增加, 共同促使癌细胞凋亡^[23]。以上研究结果证明了人参皂苷 CK 具有潜在的抗肿瘤的作用, 可成为防治肿瘤的有效候选药物。因此, 本研究探索了人参皂苷 CK 对 SW480 细胞增殖及凋亡的影响, 并对其作用机制进行深入探讨。

上述实验结果表明, 人参皂苷 CK 对 SW480 细胞的增殖有明显的抑制作用, 其作用机制可能是通过诱导线粒体超氧化物升高进而诱发细胞产生过量的 ROS, 增加氧化应激, 导致线粒体功能障碍, 同时促进线粒体释放凋亡相关因子, 诱发线粒体相关凋亡途径, 引起细胞凋亡。研究考察人参皂苷 CK 对 MMP 水平的影响作用, 可见人参皂苷 CK 能够显著降低细胞内 MMP 水平, 引起的线粒体功能的

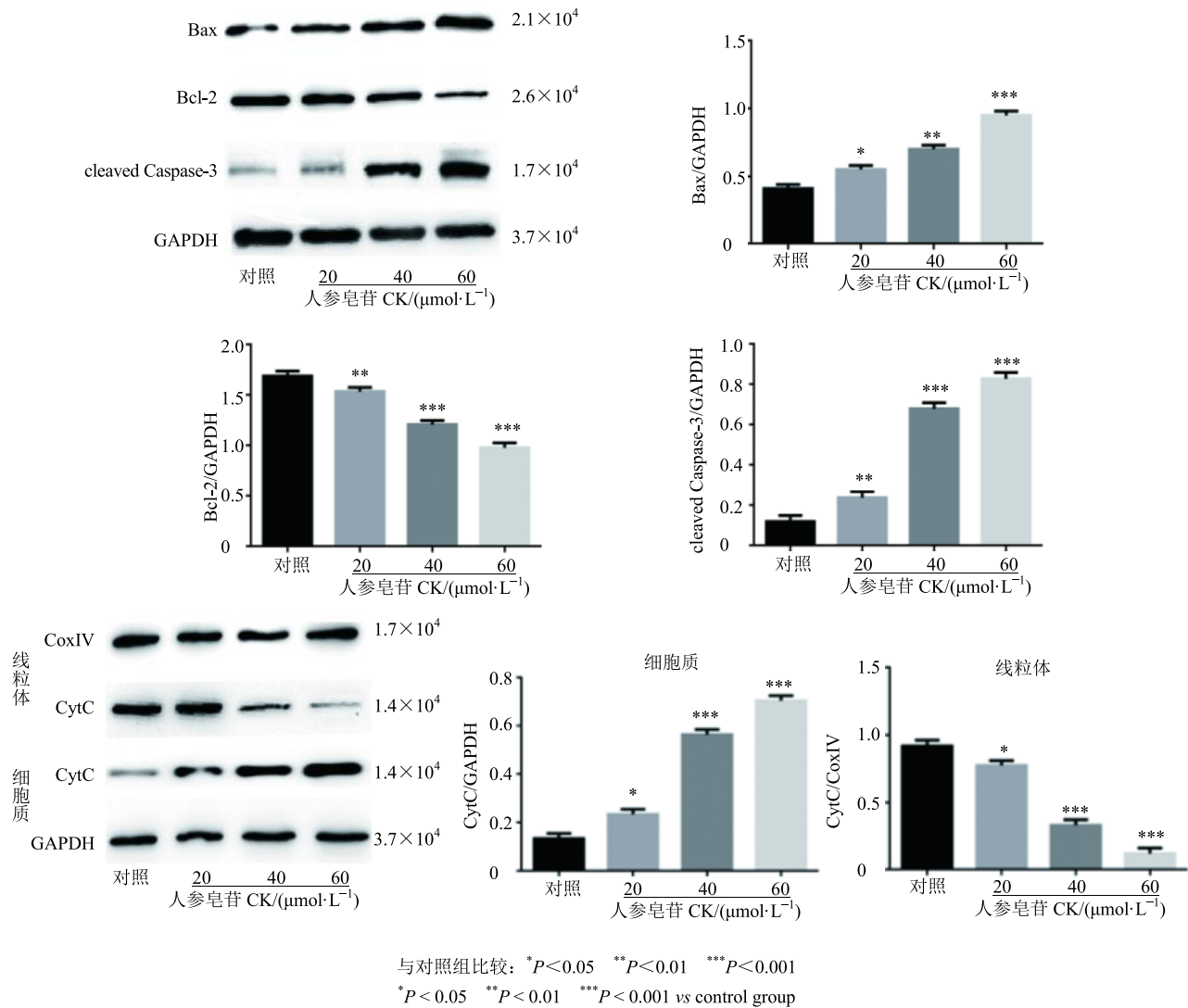


图 8 人参皂苷 CK 对 SW480 细胞线粒体凋亡信号途径关键蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 8 Effect of ginsenoside CK on expression of key proteins in mitochondrial apoptosis signaling pathway in SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

紊乱。CytC 是线粒体电子传递链的重要组成。正常情况下,其位于线粒体的膜间隙,在凋亡过程中则从线粒体外膜释放入细胞质中,CytC 向胞质的释放是引发凋亡的关键步骤。MMP 降低和 ROS 水平的升高均可通过不同作用途径诱导 CytC 向胞质的释放。除此之外,其向胞质的释放还依赖于线粒体外膜特异性通道的调控,该通道主要由 Bcl-2 家族成员形成。其中,Bcl-2(抗凋亡蛋白)和 Bax(促凋亡蛋白)是 Bcl-2 家族的核心成员,Bcl-2 的上调可以稳定线粒体外膜,阻断 CytC 自线粒体释放入胞质,从而抑制细胞凋亡;而 Bax 的上调则可以促进 CytC 向胞质的释放,诱发凋亡。

综上所述表明,人参皂苷 CK 是通过调控线粒

体中的半胱天冬酶依赖性途径而诱导细胞凋亡的,其中,人参皂苷 CK 介导的 ROS 的产生可以靶向膜磷脂,导致 CytC 的解离,激活 Caspase-3 (19 000 和 17 000) 凋亡途径,从而达到抑制 SW480 细胞增殖的效果,本研究结果为进一步探索肿瘤的病因提供了大力支持,为预防和治疗肿瘤提供了重要的科学依据。

参考文献

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, *et al.* Global cancer statistics [J]. *A Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] László L. Predictive and prognostic factors in the complex treatment of patients with colorectal cancer [J]. *Magyar Onkol*, 2010, 54(4): 383-394.

- [3] Aaltonen L, Peltomäki P, Leach F, *et al.* Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer [J]. *Science*, 1993, 260(5109): 812-816.
- [4] Sung J J, Lau J Y, Goh K L. *et al.* Increasing incidence of colorectal cancer in Asia: Implications for screening [J]. *Lancet Oncol*, 2005, 6(11): 871-876.
- [5] Vargas A J, Thompson P A. Diet and nutrient factors in colorectal cancer risk [J]. *Nutr Clin Pract*, 2012, 27(5): 613-623.
- [6] Gaedcke J, Grade M, Camps J. *et al.* Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer [J]. *Nature*, 2012, 487(74): 330-335.
- [7] Ahuja A, Kim J H, Kim J H. *et al.* Functional role of ginseng-derived compounds in cancer [J]. *J Ginseng Res*, 2018, 42(3): 248-254.
- [8] Muthukumar T, Aravinthan A, Sharmila J. *et al.* Collagen/chitosan porous bone tissue engineering composite scaffold incorporated with ginseng compound K [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 15(2): 566-574.
- [9] Yang L, Zhang Z, Hou J. *et al.* Targeted delivery of ginsenoside compound K using TPGS/PEG-PCL mixed micelles for effective treatment of lung cancer [J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12(7): 653-656.
- [10] Li Y, Zhou T, Ma C. *et al.* Ginsenoside metabolite compound K enhances the efficacy of cisplatin in lung cancer cells [J]. *J Thoracic Dis*, 2015, 7(3): 398-400.
- [11] Wei S, Li W, Yu Y. *et al.* Ginsenoside Compound K suppresses the hepatic gluconeogenesis via activating adenosine-5' monophosphate kinase: A study *in vitro* and *in vivo* [J]. *Life Sci*, 2015, 13(9): 8-15.
- [12] Yang L, Xin J, Zhang Z. *et al.* TPGS-modified liposomes for the delivery of ginsenoside compound K against non-small cell lung cancer: Formulation design and its evaluation *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2016, 68(9): 1109-1118.
- [13] Zhang K, Li Y. Effects of ginsenoside compound K combined with cisplatin on the proliferation, apoptosis and epithelial mesenchymal transition in MCF-7 cells of human breast cancer [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(4): 561-568.
- [14] Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis [J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1309-1312.
- [15] Rosenkranz A R, Schmaldienst S, Stuhlmeier K M, *et al.* Amicroplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate [J]. *Immunol Methods*, 1992, 15(6): 39-45.
- [16] Mizuki H. In situ staining with DNA-binding fluorescent dye, Hoechst 33258, to detect microorganisms in the epithelial cells of oral leukoplakia [J]. *Oral Oncol*, 2001, 37(6): 650-655.
- [17] Zamzami N, Marchetti P, Castedo M. *et al.* Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo* [J]. *Exp Med*, 1995, 18(1): 1661-1672.
- [18] Zamzami N, Susin S A, Marchetti P. *et al.* Mitochondrial control of nuclear apoptosis [J]. *Exp Med*, 1996, 18(3): 1533-1544.
- [19] Chen K C, Chang L S. Arachidonic acid-induced apoptosis of human neuroblastoma SK-N-SH cells is mediated through mitochondrial alteration elicited by ROS and Ca^{2+} -evoked activation of p38 α MAPK and JNK1 [J]. *Toxicology*, 2009, 26(2): 199-206.
- [20] 汪晶, 杨蕾, 金鑫, 等. 黄芪甲苷对人参皂苷 CK 肿瘤细胞摄取及抗肿瘤作用的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2308-2312.
- [21] 邓晶, 蒋永新. 人参皂苷 CK 抗肿瘤活性研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(11): 2234-2236.
- [22] Lee S J, Ko W G, Kim J H. *et al.* Induction of apoptosis by a novel intestinal metabolite of ginseng saponin via cytochrome mediated activation of caspase-3 protease [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60(5): 677-685.
- [23] Kang K A, Lim H K. Induction of apoptosis by ginseng saponin metabolite in U937 human monocytic leukemia cell [J]. *Food Biochem*, 2005, 29(2): 27-40.