

黄芪中有效成分对人食道癌 HCE-4 细胞凋亡的影响

刘 阳¹, 刘 畅¹, 罗英花², 孙虎男¹, 臧延青³, 金成浩^{1*}

1. 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319

2. 黑龙江八一农垦大学动物科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319

3. 黑龙江八一农垦大学食品科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319

摘 要: 目的 研究黄芪有效成分芒柄花素与黄芪甲苷 IV 对人食道癌 HCE-4 细胞的凋亡作用及其分子机制。方法 MTT 法检测黄芪提取物(阳性对照药)、芒柄花素与黄芪甲苷 IV 对人食道癌 HCE-4 细胞的增殖抑制作用, Annexin V-FITC/PI 双染法检测 3 种药物诱导 HCE-4 细胞凋亡的能力, Western blotting 法检测凋亡相关蛋白的表达变化。结果 芒柄花素与黄芪甲苷 IV 对 HCE-4 细胞具有良好的生长抑制作用, 其效果呈浓度依赖性; 芒柄花素与黄芪甲苷 IV 能够诱导 HCE-4 细胞的凋亡且呈时间依赖性; 芒柄花素与黄芪甲苷 IV 处理 HCE-4 细胞后, 抗凋亡蛋白 p-AKT 的表达量明显减少, 促凋亡蛋白 cleaved-caspase-3 表达量增加。结论 黄芪有效成分芒柄花素与黄芪甲苷 IV 通过调控 AKT 信号转导途径诱导人食道癌 HCE-4 细胞凋亡。

关键词: 人食道癌 HCE-4 细胞; 芒柄花素; 黄芪甲苷 IV; 黄芪提取物; 细胞凋亡; AKT 信号途径

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2016)03-0377-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.03.009

Molecular mechanism of induction on apoptosis of human esophageal cancer HCE-4 cells by active components from *Astragalus membranaceus*

LIU Yang¹, LIU Chang¹, LUO Ying-hua², SUN Hu-nan¹, ZANG Yan-qing³, JIN Cheng-hao^{1*}

1. College of Life Science & Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China

2. College of Animal Science & Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China

3. College of food Science & Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China

Abstract: Objective To investigate the pharmacologic effects and apoptotic mechanism of active components from *Astragalus membranaceus* on human esophageal cancer HCE-4 cells. **Methods** The viabilities of HCE-4 cells were measured by MTT assay. The inhibition of active components from *A. membranaceus* on apoptosis of HCE-4 cells was detected by Annexin V-FITC/PI double staining. The apoptotic-related protein expression levels were determined by Western blotting. **Results** Formononetin and astragaloside IV suppressed the proliferation of HCE-4 cells in a dose-dependent manner. The Annexin V-FITC/PI double staining results showed that formononetin and astragaloside IV could induce HCE-4 cells apoptosis in a time-dependent manner. The Western blotting results showed that formononetin and astragaloside IV could significantly down-regulate p-AKT, Pro-caspase-9, and Pro-caspase-3 protein expression in HCE-4 cells. **Conclusion** Active components from *A. membranaceus* such as formononetin and astragaloside IV significantly inhibits the proliferation of human esophageal cancer HCE-4 cells by inducing mitochondrial dependent apoptosis via AKT signaling pathway.

Key words: human esophageal cancer HCE-4 cells; formononetin; astragaloside IV; *Astragalus* root extract; apoptosis; AKT signal pathway

食道癌是发生在食管上皮组织的恶性肿瘤, 占所有肿瘤的 2%。我国是食道癌的高发国家, 也是食道癌死亡率最高的国家, 死亡患者仅次于胃癌居第二位, 食道癌严重威胁着我国人民的健康和生命^[1]。

尽管目前有很多种抗癌药物, 但由于毒副作用和抗药性等诸多问题, 其效果还不太理想^[2]。因此, 寻找一种疗效好且毒副作用小的抗癌药物显得至关重要。黄芪, 又名黄耆, 是常用的中草药之一, 主要

收稿日期: 2016-01-31

基金项目: 黑龙江省大学生创新创业训练计划项目(201510223003); 黑龙江省自然科学基金资助项目(LC2015036); 黑龙江省博士后科研启动项目(LBH-Q13132); 学成、引进人才科研启动计划项目(XYB2013-24)

作者简介: 刘 阳(1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向为抗肿瘤药物药理学。E-mail: 357087004@qq.com

***通信作者** 金成浩(1977—), 男, 博士, 教授/青年龙江学者特聘教授, 博导, 研究方向为抗肿瘤药物药理学。E-mail: jinchenghao3727@qq.com

由黄芪皂苷、黄酮类化合物、多糖、氨基酸和一些微量元素组成,具有抗炎、抗衰老、降血压、降血糖、保肝等作用^[3-4]。研究报道,黄芪中的主要成分芒柄花素与黄芪甲苷 IV 还具有抗肿瘤效果^[5-6],但是其对食道癌的药效及药理作用机制尚不清楚。本实验通过细胞生物学和分子生物学方法阐明芒柄花素与黄芪甲苷 IV 对人食道癌 HCE-4 细胞的杀伤作用,诱导细胞凋亡作用以及相关信号转导途径,为黄芪的有效利用以及治疗食道癌提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

人食道癌 HCE-4 细胞系,购于中国科学院细胞研究所。

1.2 药物与试剂

黄芪提取物,批号 JZ140081105,主要成分为黄芪甲苷和黄芪多糖,质量分数分别为 30%和 70%;芒柄花素(批号 JZ15072202,质量分数为 98%)和黄芪甲苷 IV(批号 JZ15091604,质量分数为 98%),均购自南京景竹生物科技有限公司。

MTT(美国 Amresco 公司);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);p-AKT、AKT、pro-caspase-3、cleaved-caspase-3、 β -actin 等抗体(美国 Santa Cruz 公司);ECL 化学发光试剂(美国 Thermo 公司),其他试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器

电泳仪及半干转印仪(美国 Bio-rad 公司);ELX 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);倒置显微镜(德国 Leica 公司);FACSCalibvr 型流式细胞仪(美国 BD 公司);MicroChemi 4.0 型化学发光型凝胶成像系统(以色列 DNR 成像系统有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

人食道癌 HCE-4 细胞用含有 10%胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液培养于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中。细胞贴壁程度达到 70%~80%时,进行传代培养。

2.2 MTT 法检测细胞存活率

将状态良好的 HCE-4 细胞以每孔 1×10^4 个的密度接种至 96 孔板,培养 24 h。用含有 1% FBS 的培养液饥饿预处理 2 h 后,加入不同浓度的药物处理 24 h,其中芒柄花素与黄芪甲苷 IV 的浓度为 6.3、25、50、100、200 μ mol/L,黄芪提取物的浓度为 16、25、50、100、200 μ mol/L(摩尔浓度以黄芪多糖计,

黄芪多糖分子式为 C₁₀H₇ClN₂O₂S,分子量为 254.69),对照组加入等体积的 DMSO。

每孔加入 15 μ L 的 MTT 溶液(5 mg/mL),在培养箱中避光孵育 2~4 h 后,磷酸缓冲液(PBS)洗涤 1~3 次(避免洗去甲瓞)。每孔加入 100 μ L 的 DMSO,在摇床上混匀 10 min,酶标仪检测 590 nm 处吸光度(A)值,计算细胞存活率和 IC₅₀ 值。设空白调零组,不接种细胞,加入 100 μ L 的 DMSO。每个实验组设定 8 个复孔,实验重复 3 次。

细胞存活率 = (实验组 A 值 - 空白调零组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白调零组 A 值)

2.3 Annexin V-FITC/PI 双染法观察细胞凋亡

将 HCE-4 细胞接种至 6 孔板(每孔 1.2×10^5 个),培养过夜。分别用 100 μ mol/L 的芒柄花素、黄芪甲苷 IV 及阳性药黄芪提取物处理细胞不同时间(0、3、6、12、24 h)。按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行染色,通过荧光显微镜观察并分析细胞凋亡情况。

2.4 Western blotting 法检测凋亡相关蛋白表达变化

将 HCE-4 细胞接种至 6 孔板(每孔 1.2×10^5 个),用终浓度为 100 μ mol/L 的黄芪甲苷 IV、芒柄花素及阳性药黄芪提取物处理细胞 0、3、6、12、24 h,裂解细胞,提取蛋白,SDS-PAGE 分离,转膜,5%脱脂牛奶封闭,一抗封闭过夜,二抗室温孵育 2 h,化学发光凝胶成像系统检测,Image J 1.42 软件对条带进行灰度分析,实验重复 3 次。

2.5 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件包分析,各处理组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 对人食道癌 HCE-4 细胞的生长抑制作用

芒柄花素与黄芪甲苷 IV 对人食道癌 HCE-4 细胞生长具有明显的抑制作用,且呈剂量相关性,IC₅₀ 分别为 91.2、55.0 μ mol/L。芒柄花素与黄芪甲苷 IV 对 HCE-4 细胞的生长抑制作用明显高于对照药黄芪提取物,差异显著($P < 0.01$),其中黄芪甲苷 IV 的抑制作用最为明显。结果见图 1。

3.2 对人食道癌 HCE-4 细胞的凋亡作用

对照组细胞生长贴壁较牢固,细胞间紧密相连,细胞边界清晰,细胞膜完整。随着芒柄花素与黄芪甲苷 IV 处理时间的增加,细胞形态发生明显变化,体积变小,形态逐渐变圆、不规则,细胞间接触松散,表现出细胞凋亡的典型特征。Annexin V-FITC

和 PI 的荧光强度也随着药物处理时间的增加而逐渐增加, 说明芒柄花素与黄芪甲苷 IV 对 HCE-4 细

胞具有良好的诱导凋亡作用, 并呈时间相关性, 其中黄芪甲苷 IV 的作用最为明显。结果见图 2、3。

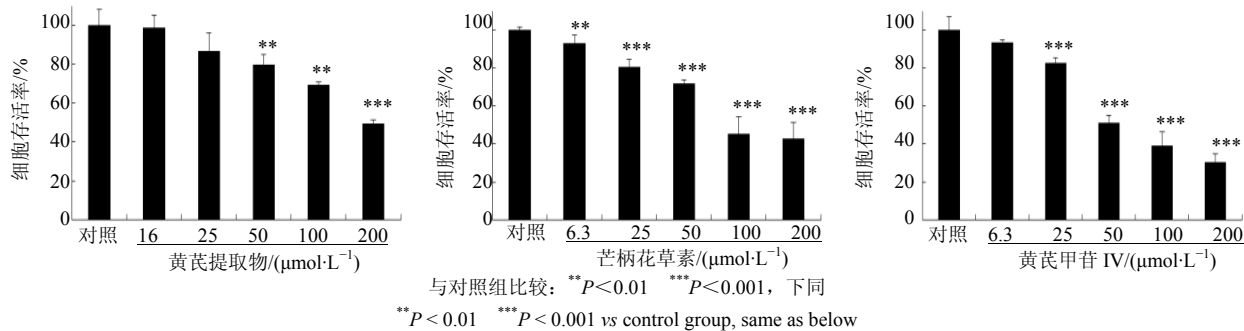


图1 黄芪提取物、芒柄花素及黄芪甲苷 IV 对 HCE-4 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.1 Cytotoxic activity of *Astragalus* root extract, formononetin, and astragaloside IV against HCE-4 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

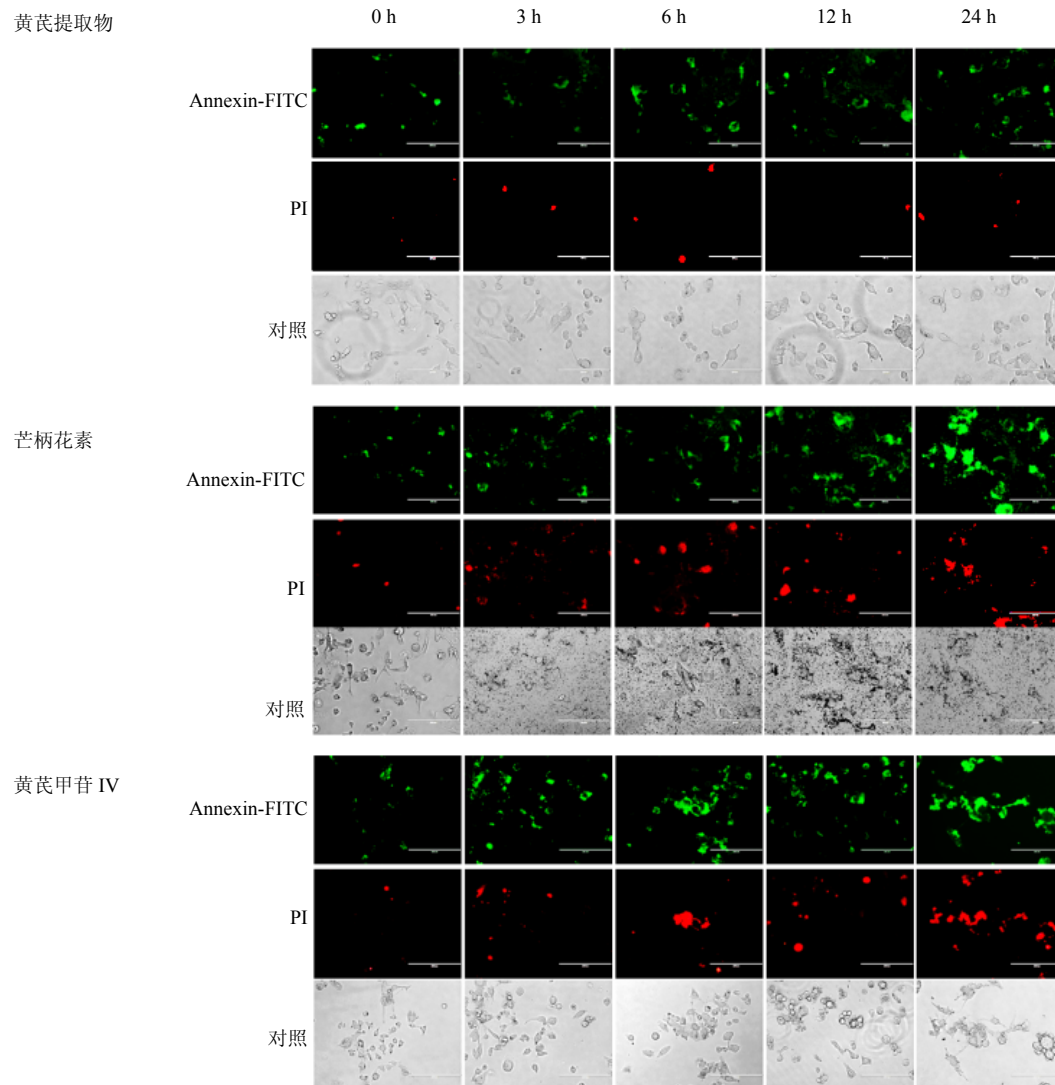
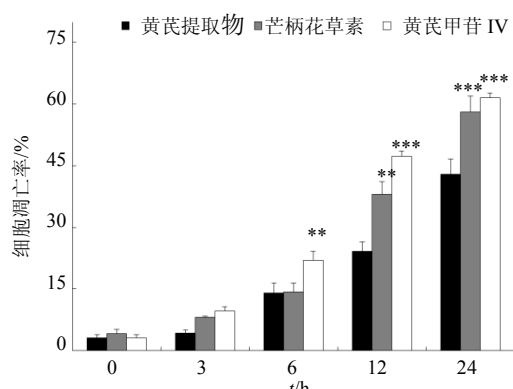


图2 Annexin V-FITC/PI 双染检测黄芪有效成分对 HCE-4 细胞的诱导凋亡作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Induction on apoptosis of HCE-4 cells by active components from *A. membranaceus* using Annexin V-FITC/PI double staining ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与黄芪提取物组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
 ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs Astragalus Root Extract group

图3 Annexin V-FITC/PI 双染定量分析检测黄芪有效成分对 HCE-4 细胞的诱导凋亡作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

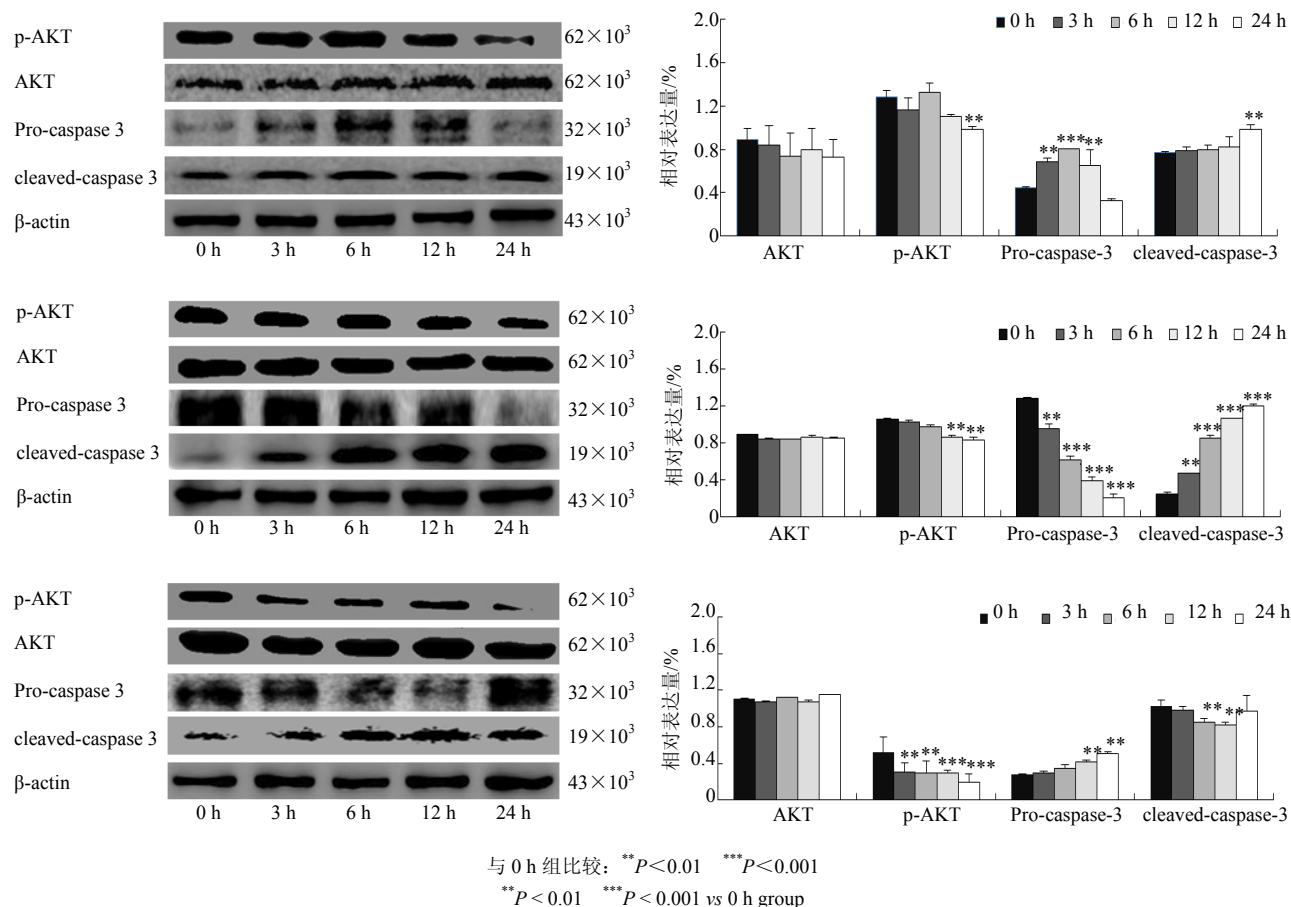
Fig. 3 Induction on apoptosis of HCE-4 cells by active components from *A. membranaceus* using quantification of Annexin V-FITC/PI double staining fluorescence intensity ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 对 AKT 信号通路相关蛋白表达的影响

随着芒柄花素与黄芪甲苷 IV 处理时间的增加, 抗凋亡因子 p-AKT 蛋白表达量逐渐降低, 促凋亡因子 cleaved-caspase-3 蛋白表达量逐渐增加。与黄芪提取物组比较, 差异显著 ($P < 0.05$), 结果见图 4。

4 讨论

食道癌是一种多因素、多阶段、多基因变异积累及相互作用的恶性肿瘤, 在分子水平上涉及众多原癌基因、抑癌基因以及蛋白质的改变。黄芪是具有多种功效的我国优良中药材之一, 但针对黄芪有效成分的药理研究并不多。本研究结果显示, 黄芪有效成分芒柄花素与黄芪甲苷 IV 对人食道癌 HCE-4 细胞具有良好的杀伤作用, 其中黄芪甲苷 IV 的杀伤效果尤为突出。有研究报道, 肿瘤的发生主要是由于细胞的无限增殖和细胞凋亡受到抑制而引起的^[7]。本实验中 Annexin V-FITC/PI 双染检测结果表明, 芒柄花素与黄芪甲苷 IV 均可诱导 HCE-4 细



与 0 h 组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
 ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs 0 h group

图4 黄芪有效成分黄芪提取物(A)、芒柄花素(B)及黄芪甲苷 IV(C)对细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of active components from *A. membranaceus* such as *Astragalus* root extract (A), formononetin (B), and astragaloside IV (C) against apoptosis related protein expression levels ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

胞凋亡, 且黄芪甲苷IV的诱导凋亡效果更显著。肿瘤细胞的凋亡过程是由多种凋亡相关蛋白参与的。如 AKT、Caspase 家族在凋亡相关的信号通路中起非常重要的作用^[8-9]。有研究报道, 芒柄花素和黄芪甲苷 IV 可通过 AKT 信号通路调节 caspase-3 的活性进一步诱导一些癌细胞发生凋亡^[10-12]。本实验中 Western blotting 结果表明, 芒柄花素与黄芪甲苷 IV 可下调抗凋亡因子 p-AKT 蛋白表达, 上调促凋亡因子 cleaved-caspase-3 蛋白表达, 进而诱导 HCE-4 细胞的凋亡, 验证了黄芪有效成分是通过调控 AKT 介导的线粒体凋亡信号转导途径调控细胞凋亡的。

目前, 对于黄芪的有效成分、药理作用及其制剂的临床应用方面的研究还尚未完善, 今后应对黄芪的有效成分, 尤其是单体成分进行深入的研究, 进一步使黄芪发挥出更高的药用价值和经济价值。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al.* Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] 白海鹏, 孙维敏, 康 娜. 食道癌及其治疗的研究进展 [J]. 包头医学院学报, 2014, 30(3): 134-136.
- [3] 陈虎虎, 龚苏晓, 王思路, 等. 黄芪茎、叶的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(2): 134-137.
- [4] 杨 珍, 周惠芬, 周 鹏, 等. 川芎、黄芪有效成分配伍对缺氧脑微血管内皮细胞的影响 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1326-1332.
- [5] 张 幸, 梁梅花, 黄文君, 等. 芒柄花黄素诱导膀胱癌细胞凋亡作用 [J]. 中国公共卫生, 2015, 31(3): 314-317.
- [6] Wang P P, Xu D J, Huang C. Astragaloside IV reduces the expression level of P-glycoprotein in multidrug-resistant human hepatic cancer cell lines [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(6): 2131-2137.
- [7] 李 娜, 高俊岩, 刘 敏. 细胞凋亡和肿瘤的关系研究进展 [J]. 当代医学, 2009, 15(16): 13-14.
- [8] 黄秀兰, 崔国辉, 周克元. PI3K-AKT 信号通路 with 肿瘤细胞凋亡关系的研究进展 [J]. 癌症, 2008, 27(3): 331-336.
- [9] Hensley P, Mishra M, Kyprianou N. Targeting caspases in cancer therapeutics [J]. *Biol Chem*, 2013, 394(7): 831-843.
- [10] 邓 樱, 陈红凤. 黄芪注射液及其有效成分对乳腺癌细胞增殖和 Akt 磷酸化的影响 [J]. 中西医结合学报, 2009, 7(12): 1174-1180.
- [11] Zhang X, Bi L, Ye Y, *et al.* Formononetin induces apoptosis in PC-3 prostate cancer cells through enhancing the Bax/Bcl-2 ratios and regulating the p38/Akt pathway [J]. *Nutr Cancer*, 2015, 66(4): 656-661.
- [12] Li T, Zhao X, Mo Z, *et al.* Formononetin promotes cell cycle arrest via down regulation of Akt/Cyclin D1/CDK4 in human prostate cancer cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 34(4): 1351-1358.