

## 绞股蓝次级皂苷H诱导人乳腺癌MCF-7细胞凋亡的作用研究

刘明兵<sup>1</sup>, 石国慧<sup>2</sup>, 张宏宇<sup>2</sup>, 张晓书<sup>1\*</sup>, 赵余庆<sup>1, 2\*</sup>

1. 沈阳药科大学功能食品与葡萄酒学院, 辽宁本溪 117004

2. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁沈阳 110016

**摘要:** 目的 探讨绞股蓝次级皂苷H (Gypensapogenin H, GH) 对人乳腺癌MCF-7细胞的诱导凋亡作用。方法 采用5、10、20、40、60、80 μmol/L的GH处理人乳腺癌MCF-7细胞48 h后, MTT法测定GH对细胞增殖的影响; 20 μmol/L的GH作用细胞24 h后, 相差显微镜下观察细胞的形态学变化, DAPI染色, 荧光显微镜下观察凋亡小体的形成; GH作用细胞6、12、24 h后, 流式细胞仪测定细胞凋亡率; 免疫印迹法检测GH对Bcl-2、Bax、Cytochrome C、Caspase 3等蛋白表达的影响。结果 GH抑制细胞增殖作用呈明显的浓度相关性, 半数抑制浓度( $IC_{50}$ )为(8.67±1.22) μmol/L; GH组细胞形态与对照组比较发生显著变化, 主要表现为细胞皱缩、染色质浓缩、细胞核变形; 细胞经DAPI染色后在荧光显微镜下可观察到有凋亡小体形成; 随GH作用时间延长, 细胞凋亡率明显上升, 与对照组比较, GH作用12、24 h细胞早期凋亡率显著升高 ( $P<0.05$ 、0.01); 蛋白免疫印迹显示, 与对照组比较, GH作用6、24 h Bax, 6、12、24 h Cleaved Caspase 3和Cytochrome C蛋白水平显著增加 ( $P<0.05$ 、0.01); 6、12、24 h Bcl-2和12、24 h Caspase 3蛋白表达量显著减少 ( $P<0.05$ 、0.01)。结论 GH通过线粒体通路诱导乳腺癌MCF-7细胞凋亡。

**关键词:** 绞股蓝次级皂苷H; 乳腺癌; MCF-7细胞; 凋亡; 线粒体通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2019) 05-0828-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.05.004

## Apoptosis of MCF-7 cells induced by gypensapogenin

LIU Mingbing<sup>1</sup>, SHI Guohui<sup>2</sup>, ZHANG Hongyu<sup>2</sup>, ZHANG Xiaoshu<sup>1</sup>, ZHAO Yuqing<sup>1,2</sup>

1. School of Functional Food and Wine, Shenyang Pharmaceutical University, Benxi 117004, China

2. School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

**Abstract:** Objective To investigate the cell apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells induced by gypensapogenin H *in vitro*. Methods After human breast cancer MCF-7 cells were treatment with GH of 5, 10, 20, 40, 60 and 80 μmol/L for 48 h, the effect of GH on cell proliferation was measured by MTT assay. After cells were treated by GH for 24 h, the morphological changes were observed under Phase contrast microscope, and apoptotic bodys were observed under fluorescence microscope with DAPI staining. Additionally, flow cytometry was used to evaluate the apoptosis rate, Western blotting was used to detect the effect of GH treating for 6, 12, and 24 h on the expression of Bcl-2, Bax, Cytochrome c, Caspase 3 and other proteins. Results GH inhibited cell proliferation in a concentration-dependent manner, and the half inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) was (8.67±1.22) umol/L. Compared with control group, the cell morphology of GH group changed significantly, mainly in cell shrinkage, chromatin concentration and nuclear deformation. After cells were stained with DAPI, the formation of apoptotic cells could be observed under the fluorescence microscope. With the extension of GH, the apoptosis rate of cells increased significantly, compared with control group, the early apoptotic rate of GH group increased significantly at 12 and 24 hours ( $P < 0.05$  and 0.01). Western Blotting showed that compared with control group, the levels of Bax, Cleaved Caspase 3 and Cytochrome C protein increased significantly ( $P < 0.05$  and 0.01) and the levels of Bcl-2 and Caspase 3 protein decreased significantly ( $P < 0.05$ , 0.01). Conclusion GH induces apoptosis of breast cancer

收稿日期: 2018-08-12

基金项目: 国家自然科学基金(81703389)

第一作者: 刘明兵(1994—), 男, 硕士在读, 研究方向为药食同源品中功效成分的提纯与活性评价。Tel: 13842018840

E-mail: liumingbing1994@163.com

\*通信作者: 张晓书, 硕士生导师, 主要从事抗乳腺癌活性成分的发现及作用机制研究。E-mail: xiaoshu2397@163.com

赵余庆, 博士生导师, 主要从事药食同源保健食品的开发。E-mail: zyq4885@126.com

MCF-7 cells through mitochondrial pathway

**Key words:** Gypensapogenin H; breast cancer; MCF-7 cells; apoptosis; mitochondrial pathway

细胞凋亡是细胞主动实施的程序性死亡过程；伴随凋亡进程细胞形态发生特征性变化，包括细胞壁皱缩，细胞核破裂，以及出现凋亡小体<sup>[1]</sup>。机体可由线粒体途径调控细胞凋亡，当细胞凋亡机制发生紊乱时，可引起机体相应疾病的发生，了解凋亡相应机制对疾病治疗具有重要作用<sup>[2-3]</sup>。线粒体途径调控的细胞凋亡与线粒体膜外通透性的变化有关，而通透性的变化受Bcl-2家族蛋白控制。Bcl-2蛋白通过调节线粒体膜上凋亡蛋白传导孔膜的形成，促使细胞色素C(Cytochrome C)进入细胞质，Cytochrome C的释放会激活Caspase 3蛋白活性，进而引起相关蛋白的降解，最终使细胞发生凋亡<sup>[4]</sup>。

绞股蓝次级皂苷H(GH)是本课题组前期从绞股蓝水解产物中分离得到的结构新颖的四环三萜型次级皂苷。据报道，绞股蓝皂苷可诱导人乳腺癌细胞<sup>[5]</sup>、肺癌细胞<sup>[6]</sup>、前列腺癌细胞<sup>[7]</sup>凋亡。但关于绞股蓝皂苷诱导人乳腺癌细胞凋亡的机制研究较少，本实验将采用人乳腺癌MCF-7细胞株，初步探讨GH对MCF-7细胞凋亡的作用机制，旨在为GH的临床应用提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞株

人乳腺癌MCF-7细胞株，由中国医学科学院细胞库提供。

### 1.2 主要药物和试剂

GH由本课题组前期制备得到，并进行了结构鉴定(质量分数为98.5%)<sup>[8]</sup>；胎牛血清(FBS, Gibco公司)；MTT试剂、二甲基亚砜(DMSO), Sigma公司；DMEM培养基(Thermo Fisher Scientific公司)；4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒，碧云天生物技术有限公司。

### 1.3 主要仪器

酶标仪(美国伯乐)；超净工作台(苏州净化)；倒置显微镜(德国莱卡)；细胞培养瓶(大连美仑)；细胞培养箱(上海力康)；脱色摇床(北京六一)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

MCF-7细胞用DMEM培养基培养，培养基内加入10% FBS、青霉素(浓度为100 U/mL)和链霉素(浓度为100 μg/mL)。放置于无菌，温度37 °C，

相对湿度98%，含5% CO<sub>2</sub>、95%空气的培养箱内培养。

### 2.2 MTT法检测细胞增殖

取对数生长期的MCF-7细胞制成单细胞悬液，接种于96孔板(6×10<sup>3</sup>/孔)，培养终体积为100 μL/孔；37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱内培养。24 h后加入GH，终浓度分别为5、10、20、40、60、80 μmol/L，每个浓度设4个复孔，另设不加药组为对照组。孵育48 h后，每孔加入MTT(质量浓度为5 mg/mL)15 μL，轻微振荡混匀后，置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱继续培养。4 h后，取出96孔培养板，弃培养液，每孔加入DMSO 100 μL，于摇床上振荡20 min，充分溶解蓝色的甲臜沉淀。使用酶标检测仪测各孔吸光度(A)值，波长设置为490 nm。计算不同浓度的GH对MCF-7细胞的生长抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{照组}}$$

### 2.3 观察细胞形态学变化

取对数生长期的MCF-7细胞接种于12孔板，分为GH组(浓度为20 μmol/L)和对照组，处理24 h，相差显微镜下观察细胞的形态学变化。

药物处理24 h后，用多聚甲醛在4 °C条件下处理细胞30 min，PBS冲洗2次，DAPI(10 μg/mL)在暗处处理20 min，PBS冲洗，荧光显微镜下观察凋亡小体的形成。

### 2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率

将MCF-7细胞接种至6孔板，当细胞状态良好且铺满6孔板底部70%~80%时，加入20 μmol/L GH，作用6、12、24 h后，收集细胞，PBS溶液清洗2次，用100 μL 1×Binding Buffer重悬细胞，之后再加入5 μL的AnnexinV-FITC和5 μL的PI，轻轻混匀后室温条件下染色30 min，并在1 h内用流式细胞仪分析细胞发生凋亡的时期及比率。

### 2.5 免疫印迹法检测蛋白表达

将MCF-7细胞接种至6孔板，当细胞状态良好且铺满6孔板底部70%~80%时，加入20 μmol/L GH处理6、12、24 h后，DAPI裂解液提取细胞总蛋白，BCA法测定蛋白浓度，10% SDS-PAGE电泳，转移蛋白至硝酸纤维素膜上。膜用5%牛血清白蛋白TBST封闭2 h；加入一抗Bcl-2、Bax、Cytochrome C、Caspase 3、Cleaved-Caspase 3、β-actin(稀释比例为1:1 000~1:5 000)，室温孵育3 h。TBST洗膜4次，

每次8 min;与二抗(稀释比例为1:5 000)室温孵育2 h,TBST洗膜4次;ECL显影,定影<sup>[9]</sup>。

## 2.6 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 19.0统计软件与GraphPad Prism 5软件进行统计分析,双向方差分析检验。

## 3 结果

### 3.1 GH对MCF-7细胞生长抑制作用

如表1所示,MCF-7细胞经不同浓度GH作用48 h后,GH抑制细胞增殖作用呈明显的浓度相关性,半数抑制浓度( $IC_{50}$ )为 $(8.67 \pm 1.22)\mu\text{mol/L}$ 。

表1 GH对MCF-7细胞生长抑制作用的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

Table 1 Effect of GH on growth inhibition of MCF-7 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

GH/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	抑制率/%
5	45.02 $\pm$ 0.79
10	55.50 $\pm$ 1.58
20	56.15 $\pm$ 1.74
40	62.40 $\pm$ 2.17
60	74.45 $\pm$ 1.79
80	82.00 $\pm$ 2.27

### 3.2 GH处理24 h细胞形态变化

在相差显微镜下观察细胞形态,GH组细胞形态相比于对照组发生显著变化,主要表现为细胞皱缩、染色质浓缩、细胞核变形(图1-A)。经DAPI染色后,在荧光显微镜下可明显观测到凋亡小体形成(图1-B),表明细胞正在凋亡。

### 3.3 GH对MCF-7细胞凋亡率的影响

Annexin V/PI-FITC流式细胞仪结果见图2,结

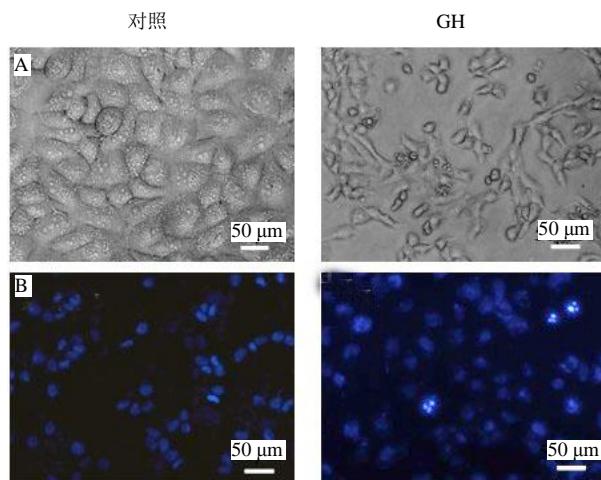


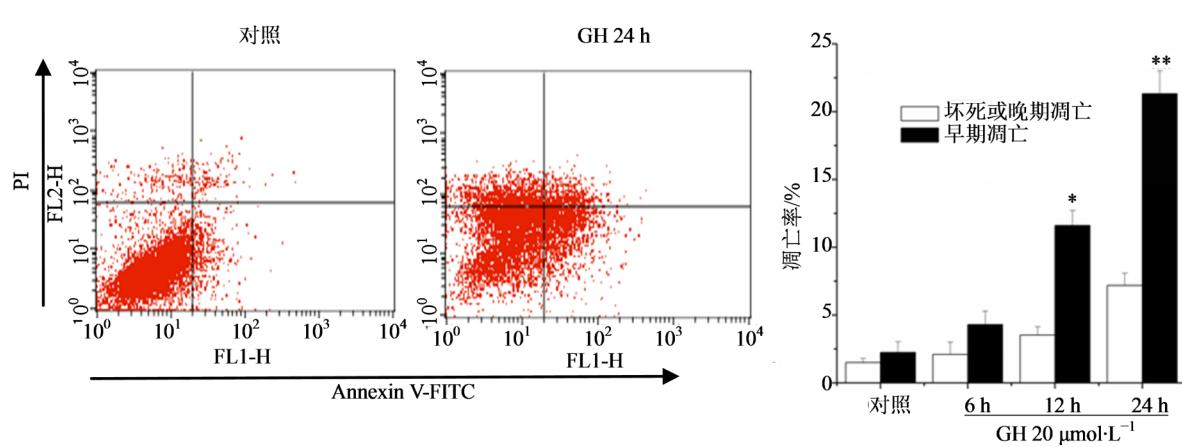
图1 GH处理MCF-7细胞24 h后,相差显微镜观察细胞形态(A);经DAPI染色后在荧光显微镜下观察凋亡小体(B)

Fig. 1 MCF-7 cells were incubated with GH for 24 h, and cellular morphological changes were observed by phase-contrast microscopy (A), and apoptotic bodys were observed by fluorescence microscopy with DAPI staining (B)

果显示,随着GH作用时间的增加,细胞凋亡率呈上升趋势,与对照组比较,GH作用12、24 h细胞早期凋亡率显著升高,差异显著( $P < 0.05, 0.01$ )。

### 3.4 GH对细胞凋亡相关蛋白表达的影响

GH作用MCF-7细胞6、12、24 h后,蛋白免疫印迹结果见图3。与对照组比较,Bax、Cytochrome C、Cleaved Caspase 3蛋白表达量随着GH作用时间的增加而增加,其中6、24 h Bax,6、12、24 h Cleaved Caspase 3和Cytochrome C蛋白水平差异显著( $P < 0.05, 0.01$ );6、12、24 h Bcl-2和12、24 h Caspase 3蛋白表达量显著减少( $P < 0.05, 0.01$ )。线粒体通路中相关凋亡蛋白表达量的变化表明,GH可通过线粒

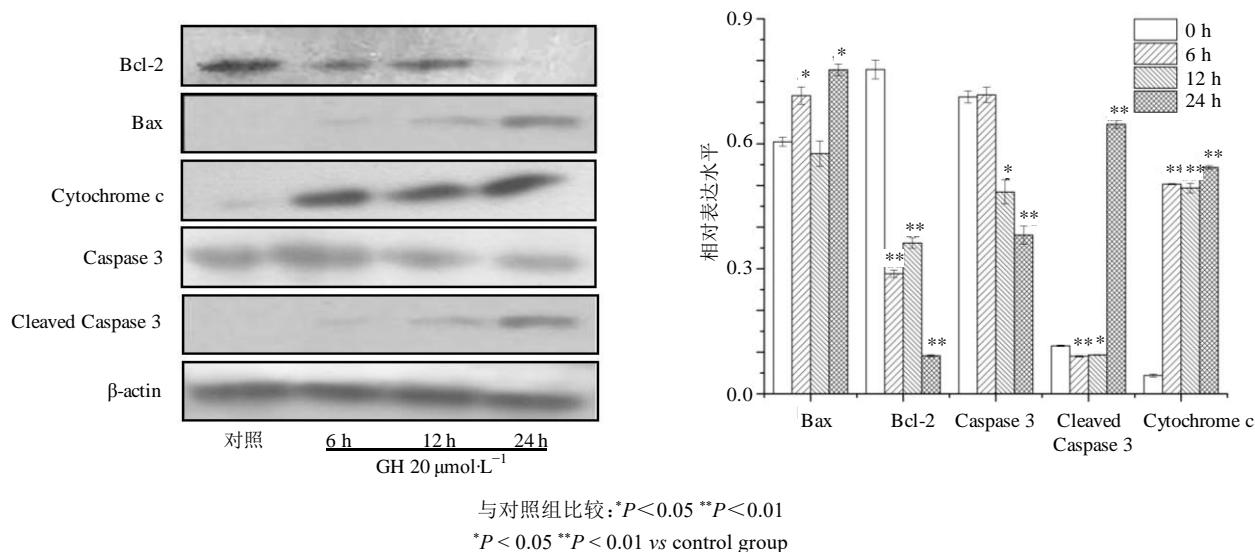


与对照组比较: $*P < 0.05$   $**P < 0.01$

$*P < 0.05$   $**P < 0.01$  vs control group

图2 流式细胞仪测细胞凋亡率( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 2 Cell apoptosis rate was measured by flow cytometry ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

图3 蛋白印迹法检测GH对相关蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s$ , n=3)Fig. 3 Influence of GH on expression of related proteins detected by Western blotting ( $\bar{x}\pm s$ , n=3)

体途径诱导MCF-7细胞凋亡。

#### 4 讨论

乳腺癌是世界范围内最常见的癌症之一,也是全球女性癌症死亡的最主要原因<sup>[10]</sup>。预计到2021年,我国将超过250万人患乳腺癌<sup>[11]</sup>,这将会大大威胁我国女性身体健康。目前,治疗乳腺癌的主要措施还是以手术为主,手术并不能保证肿瘤细胞不发生转移,而且还会对女性患者造成巨大的心理压力和负担<sup>[12]</sup>。

通过研究诱导细胞凋亡的机制以望来治疗乳腺癌正成为近年来研究的热点。虽然目前关于细胞凋亡的机制说法不一,但线粒体通路作为诱导细胞凋亡的重要途径已得到广泛认可<sup>[13]</sup>。研究表明,Bcl-2/Bax可调控细胞凋亡并在乳腺癌治疗中发挥重要作用<sup>[14]</sup>,提高活化的Caspase-3蛋白表达量可诱导乳腺癌细胞凋亡<sup>[15]</sup>。

本实验通过MTT实验测得GH对人乳腺癌细胞的IC<sub>50</sub>为(8.67±1.22)μmol/L,IC<sub>50</sub>值较低,表明GH具有较强的活性且对人乳腺癌细胞的增殖具有显著抑制效果;DAPI核染色在荧光显微镜下可明显观测到有凋亡小体形成,直观地表明GH可诱导人乳腺癌细胞凋亡;线粒体通路上促细胞凋亡蛋白Bax、Cytochrome C、Cleaved Caspase 3表达量在24 h后分别增加到对照组水平的(77.76±1.41)%、(54.33±0.41)%、(64.70±0.96)%,变化显著;抑制凋亡的Bcl-2和Caspase 3蛋白表达量逐渐下降,进一步证实了GH可通过线粒体通路诱导乳腺癌细胞凋亡。

本研究结果证实,GH通过线粒体通路诱导乳

腺癌细胞凋亡,为临床应用提供参考。

#### 参考文献

- He H, Zang L H, Feng Y S, et al. Physalin A induces apoptotic cell death and protective autophagy in HT1080 human fibrosarcoma cells [J]. J Nat Prod, 2013, 76(5): 880-888.
- Chipuk J E, McStay G P, Bharti A, et al. Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis [J]. Cell, 2012, 148(5): 988-1000.
- Wang Y E, Xu K, Yue W H, et al. Hederacolchiside A1 suppresses proliferation of tumor cells by inducing apoptosis through modulating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Chin Herb Med, 2018, 10(2): 214-221.
- Chien S Y, Wu Y C, Chung J G, et al. Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial - and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells [J]. Hum Exp Toxicol, 2009, 28(8): 493-503.
- 朴香兰.一种绞股蓝叶提取物及其制备治疗肿瘤药物的用途[P].中国专利:CN102552371A, 2013-11-13.
- Xing S F, Jang M, Wang Y R, et al. A new dammarane-type saponin from Gynostemma pentaphyllum induces apoptosis in A549 human lung carcinoma cells [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2016, 26(7): 1754-1759.
- Zhang X S, Zhao C, Tang W Z, et al. Gypensapogenin H, a novel dammarane-type triterpene induces cell cycle arrest and apoptosis on prostate cancer cells [J]. Steroids, 2015, 104: 276-283.
- Zhang X S, Cao J Q, Zhao C, et al. Novel dammarane-type triterpenes isolated from hydrolyzate of total Gynostemma pentaphyllum saponins [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2016, 26(7): 1754-1759.

- Chem Lett, 2015, 25(16): 3095-3099.
- [9] Xia X C, Jiang B W, Liu W, et al. Anti-tumor activity of three novel derivatives of ginsenoside on colorectal cancer cells [J]. Steroids, 2014, 80: 24-29.
- [10] Xu J W, Zuo D Y, Qi H, et al. 2-Methoxy-5((3, 4, 5-trimethoxyphenyl)seleninyl) phenol (SQ0814061), a novel microtubule inhibitor, evokes G2 / M cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 78: 308-321.
- [11] Fan L, Strasser-Weippl K, Li J J, et al. Breast cancer in China [J]. The Lancet Oncology, 2014, 15(7): e279-e289.
- [12] Lindberg P, Koller M, Steinger B, et al. Breast cancer survivors' recollection of their illness and therapy seven years after enrolment into a randomised controlled clinical trial [J]. BMC Cancer, 2015, 15: 554.
- [13] Foo J B, Saiful Yazan L, Tor Y S, et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by betulinic acid-rich fraction from Dillenia suffruticosa root in MCF-7 cells involved p53 / p21 and mitochondrial signalling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 166: 270-278.
- [14] 钱小英, 胡春宏, QIAN Xiao-ying, 等. 吉西他滨对乳腺癌细胞凋亡作用及其对Bcl-2、Bax蛋白表达的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2016, 15(14): 1394-1398.
- [15] Yan F, He Q Z, Hu X, et al. Direct regulation of caspase-3 by the transcription factor AP-2 $\alpha$  is involved in aspirin-induced apoptosis in MDA-MB-453 breast cancer cells [J]. Molecular Medicine Reports, 2013, 7 (3): 909-914.