

丫蕊花甾体皂苷 YB16 促进 A549 细胞凋亡及其机制研究

赵珍东^{1,2}, 夏黎^{1,2}, 杨炳伟^{1,2}, 邓晓迎^{1,2}, 段启^{1,2*}

1. 广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520

2. 南药资源保护与利用工程技术开发中心, 广东 广州 510520

摘要:目的 观察丫蕊花甾体皂苷 YB16 对人肺癌细胞 A549 凋亡的影响, 并探讨其促凋亡的作用机制。方法 体外培养 A549 细胞, 给予不同浓度的 YB16 干预, 采用 MTT 比色法检测 A549 细胞增殖; 荧光显微镜观察吖啶橙 (AO)、5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四甲基咪唑并羧花青碘化物 (JC-1) 染色的细胞荧光变化; 流式细胞术检测碘化丙啶 (PI) 单染、Annexin V-FITC/PI 双染、细胞线粒体膜电位 (JC-1 染色) 的变化; 采用 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA) 法检测细胞活性氧 (ROS) 量的变化, 免疫印迹法 (Western blotting) 检测 YB16 对细胞凋亡相关蛋白表达的影响。结果 丫蕊花甾体皂苷 YB16 显著抑制 A549 细胞的生长 ($P < 0.05$), 呈量效关系; 随着药物浓度的增加, 与对照组相比, 细胞形态有显著变化; 不同浓度 YB16 作用 A549 细胞后, 细胞凋亡率上升 ($P < 0.05$); 细胞线粒体膜电位下降明显; 细胞内 ROS 水平上升, 具有显著性差异 ($P < 0.05$); YB16 作用 A549 细胞 24 h 后, 抗细胞凋亡蛋白 Bcl-2 表达下降, 促细胞凋亡蛋白 Bax 的表达增加, 激活型半胱氨酸蛋白酶-3 (cleaved-Caspase-3) 表达增加 ($P < 0.05$)。结论 丫蕊花甾体皂苷 YB16 能抑制细胞增殖, 降低细胞线粒体的膜电位, 提升细胞 ROS 水平, 促进细胞凋亡, 具有良好的抗肿瘤活性。

关键词: 丫蕊花甾体皂苷 YB16; 细胞凋亡; 肺癌; A549 细胞; 细胞增殖

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)23-4211-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.23.016

Study on promotion of A549 cells apoptosis by steroid saponin YB16 of *Ypsilandra thibetica* and its mechanism

ZHAO Zhen-dong^{1,2}, XIA Li^{1,2}, YANG Bing-wei^{1,2}, DENG Xiao-ying^{1,2}, DUAN Qi^{1,2}

1. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China

2. Engineering Center for Protection and Utilization of Herbal Medicinal Resources in South China, Guangzhou 510520, China

Abstract: Objective To observe the effects of steroidal saponin YB16 of *Ypsilandra thibetica* on cell apoptosis of A549 human lung cancer cells, and explore the mechanism of apoptosis. **Methods** Cells were cultured *in vitro* and treated with different concentration of YB16; The proliferation of A549 cells was examined by MTT method; Cells fluorescence changes of A549 were examined by acridine orange (AO) and JC-1 staining; PI, Annexin V-FITC/PI double staining, and JC-1 staining were examined by flow cytometry. Intracellular level of reactive oxygen (ROS) was determined by DCFH-DA assay, the expression of YB16 on apoptosis-related proteins was examined by Western blotting. **Results** Steroidal saponin YB16 of *Y. thibetica* could inhibit A549 cells growth significantly with dose-effect relationship ($P < 0.05$); With the increasing of drug concentration, cell morphology changed significantly compared with the control group; Cell apoptosis rate increased with the different concentration of YB16 ($P < 0.05$); Mitochondrial membrane potential decreased significantly; ROS level of cells was increased with a significant difference ($P < 0.05$). Apoptotic protein, such as Bcl-2 expression of anti-apoptotic protein, was decreased, and the expression of pro-apoptotic protein Bax and cleaved caspase-3 was increased treated by YB16 after 24 h ($P < 0.05$). **Conclusion** Steroidal saponin YB16 of *Y. thibetica* could inhibit the cell proliferation, reduce the mitochondrial membrane potential, enhance ROS level of A549 cells, and promote apoptosis. Therefore, it has a good anti-tumor activity.

Key words: steroidal saponin YB16; cells apoptosis; lung cancer; A549 cells; cell proliferation

收稿日期: 2016-08-15

基金项目: 广东省高等学校优秀青年教师培养计划项目 (YQ2015196); 广东省高职院校专业领军人才培养计划项目 (2016009); 广东省自然科学基金项目 (S2012040007924); 广东省医学科研基金项目 (B2012058); 广东省中医药局科研项目 (20121107); 广东食品药品职业学院自然科学研究项目 (2011YZ011)

作者简介: 赵珍东 (1976—), 男, 副教授, 主要从事中药抗肿瘤作用及机制研究。Tel: (020)28854936 E-mail: zhaozd2008@126.com

***通信作者** 段启 (1969—), 男, 教授, 从事中药炮制及活性成分研究。Tel: (020)28854960 E-mail: Duanq@gdyzy.edu.cn

国际癌症研究中心报告指出,全球因肺癌造成的死亡人数不断增加。2012 年,全球 160 万人死于肺癌,占恶性肿瘤死亡人数的 19.4%^[1]。肺癌已成为全球癌症相关死亡的首要因素,2012 年中国的肺癌新发病例 60 余万例,占全世界肺癌病例的 35.8%,而中国肺癌死亡人数为 59 万余例,占世界肺癌死亡人数的三分之一^[2]。近年来,随着工业化速度加快、环境污染加重、人口老龄化的加剧,肺癌造成的死亡率已居恶性肿瘤之首,是我国的第 4 大主要死因^[3]。可见,中国肺癌的发病率和死亡率均居高位,但肺癌的治疗手段,主要是手术、化疗、放疗等,因化疗药物的毒副作用和产生耐药性的问题,其治疗效果不甚理想^[4]。因此,从中药中研发抗癌药物对肺癌的治疗具有重要意义。

丫蕊花 *Ypsilandra thibetica* Franch. 为百合科 (Liliaceae) 丫蕊花属 *Ypsilandra* Franch. 植物,别名峨嵋石凤丹,为多年生草本,主要分布于四川、湖南、广西等地。丫蕊花以全草入药,在四川等民间常用于止血,《中华本草》谓之“清热、解毒、散结、利小便”。据报道,丫蕊花所含主要成分为甾体皂苷类,还含有糖酯类和黄酮类成分。研究发现,甾体皂苷是丫蕊花的主要次生代谢产物^[5]。丫蕊花所含甾体皂苷具抗癌活性,对人肺癌 A549 细胞、人胃癌细胞 BGC-823、人白血病细胞 HL-60 等具有显著的抑制作用^[6],但是其作用机制仍未见报道。近年来,丫蕊花的药用价值越来越受到重视。本课题组前期研究从丫蕊花中分离提取,得到单体成分丫蕊花甾体皂苷 YB16^[7],属螺甾烷型,苷元为薯蓣皂苷,目前有关 YB16 对人肺癌 A549 细胞作用及其机制鲜有报道,本研究拟体外培养人肺癌 A549 细胞,研究 YB16 抗肿瘤作用及其机制,为进一步开发利用丫蕊花提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞

人肺癌 A549 细胞,引自中山大学实验动物中心,培养时加入 5% 的胎牛血清培养。

1.2 药物

YB16^[7]为自制,取 5 kg 丫蕊花药材粉碎,用 95%乙醇浸泡 24 h,渗漉提取得到浸膏。将浸膏用水混悬,再用不同极性溶剂(石油醚、醋酸乙酯、正丁醇)依次萃取,将萃取到的正丁醇部位上硅胶柱、反相柱、凝胶柱,分别以氯仿-甲醇、甲醇-水、甲醇反复进行梯度洗脱后获得化合物 YB16,根据

光谱分析确定该化合物为甾体皂苷类,具体为薯蓣皂苷元-3-*O*- α -L-吡喃鼠李糖基 (1 $\rightarrow$ 2)-[α -L-吡喃鼠李糖基 (1 $\rightarrow$ 4)- α -L-吡喃鼠李糖基 (1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-吡喃葡萄糖苷(质量分数 98%)。临用时配制成储备液(二甲基亚砷溶解,10 mmol/L),-20 °C 保存。实验前用 RPMI 1640 培养基稀释至所需浓度。

1.3 主要试剂

甲基噻唑蓝 (MTT), Sigma 公司;碘化丙啶 (PI)、RNase A、5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基苯并咪唑羧花菁碘化物 (JC-1) 试剂盒、活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐, DCFH-DA)、细胞裂解液,上海碧云天生物技术研究;吖啶橙/溴化乙啶 (AO/EB) 双染试剂盒,北京斯百汇公司;Annexin V-FITC/碘化丙啶 (PI) 细胞凋亡双染试剂盒,美国 BD 公司;B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、激活型半胱氨酸蛋白酶-3 (cleaved-Caspase-3) 和 β -actin 抗体,美国 Bioworld 公司;胎牛血清、双抗,杭州四季青;RPMI 1640 培养基, Gibco;其他所用试剂均为分析纯。

1.4 仪器

Sorvall ST16R 高速冷冻多用离心机、cell150 二氧化碳培养箱 (Thermo Fisher)、SW-CJ-2F 超净工作台 (苏州净化设备有限公司)、Eclipse Ti-FL 倒置相差显微镜、荧光倒置显微镜 (Nikon);流式细胞仪 Epics-XL (Beckman);多功能酶标仪、垂直凝胶电泳、电转系统 (Bio-Rad);超低温冰箱 MDF U53V (SANYO)、多功能超纯水系统 Unique-20R (厦门锐思捷科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

A549 细胞,贴壁培养,培养于含 5% 胎牛血清、100 kU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养基中,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,传 3~4 代进行后续实验。

2.2 细胞增殖抑制实验

取对数生长 A549 细胞,重悬于含有 5% FBS 的 RPMI 1640 培养基中,细胞密度为 6×10^4 个/mL,以 100 μ L 细胞悬液接种于 96 孔板中,培养 24 h 去除培养基。随机分为对照组 (正常培养),YB16 (终浓度为 0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16 μ mol/L) 组,每组设置 5 个复孔,同时设置阴性对照。继续培养 24 h 后,去上清,每孔加入 100 μ L 5% MTT (PBS 配制),继续孵育 4 h。4 h 后弃上清,每孔加

入 150 μL DMSO 避光振荡 5 min, 于 490 nm 处测定吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

细胞存活率 = 实验组 A 值 / 对照组 A 值

2.3 形态学观察

将 A549 细胞重悬于培养基中, 调整细胞密度为 3×10^5 个/mL, 接种于 12 孔板, 培养 24 h 后去除培养基。将细胞分为对照组、YB16 处理组 (根据 MTT 法测定的 YB16 对 A549 细胞生长抑制的浓度梯度, 确定 YB16 终浓度为 1、2、4 $\mu\text{mol/L}$), 分别加入培养基和相应药物, 24 h 后将细胞放在倒置显微镜下观察。

2.4 AO/EB 染色

细胞接种方法同“2.3”项, 培养 24 h 后去除培养基, 加入 YB16 干预, 实验结束后每孔加入 AO/EB 染色液 10 μL (30 mg/L), 避光染色, 迅速置于荧光显微镜下观察。

2.5 流式细胞仪检测 YB16 对 A549 细胞凋亡的影响

取细胞悬液, 接种于 6 孔培养板, 每孔 6×10^5 个细胞, 分组同“2.3”项, 药物作用 24 h 后, 收集细胞, 70%冰乙醇固定, 混匀 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。检测前离心细胞, 经 2 次 PBS 洗涤后, 加入 PI 染液 (0.5 mL), 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光, 温浴 30 min, 及时在流式细胞仪上 (激发波长 488 nm) 检测。

取对数生长期 A549 细胞, 以细胞密度为 6×10^5 个接种于 6 孔板, 24 h 后加入相应浓度的药物 (YB16 终浓度为 1、2、4 $\mu\text{mol/L}$), 继续培养 24 h, 胰酶消化, 2 000 r/min 离心 6 min, 去上清后用预冷 PBS 重悬细胞, 洗涤 2 次后, 加入 1 $\times$ Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 5 μL 的 Annexin V-FITC 混匀避光, 室温孵育 15 min; 上机前 5 min 再加入 5 μL PI 染色, 补加 200 μL 的 1 $\times$ Binding Buffer 进行流式细胞仪检测。每个样本分析 1×10^4 个细胞, 计算早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞的百分率。

2.6 JC-1 染色观察线粒体膜电位的变化

细胞培养及其分组同“2.5”项。荧光显微镜观察: 药物作用细胞 24 h 后, 去除培养基, PBS 洗涤 2 次, 加入 1 mL RPMI 1640 完全培养基 (JC-1 染色液按照 2:1 000 的比例先配制, 在漩涡混匀器上混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育), 混匀后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中孵育 20 min。去除含 JC-1 的培养基, PBS 洗涤 2 次, 加入完全培养基置于倒置荧光显微镜下观察。

流式细胞仪检测: 药物作用细胞 24 h 后, 胰酶消化, 2 000 r/min 离心 6 min, 去上清后 PBS 洗涤

1 次。将预先配制好的含有 JC-1 的完全培养基 (以 2.5:1 000 比例, 边加边震荡, 直到无明显聚集体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 预先孵育)。每样本加入 1 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min 后, 加入 2 mL PBS 洗涤 2 次。以 0.3 mL PBS 重悬细胞, 上机检测, 细胞速度不超过 300 个/s。

2.7 细胞内活性氧 (ROS) 检测

细胞培养及其分组同“2.5”项。药物作用 24 h 后, 去除培养基, 用培养基洗涤细胞 2 次, 2 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 加入无血清培养基中 (含有 1:1 000 DCFH-DA), 混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 每 5 min 颠倒混匀, 用无血清细胞培养液洗涤细胞 2 次, 上流式细胞仪检测荧光强度。

2.8 Western blotting 检测 Bcl-2、Bax、cleaved-Caspase-3 蛋白表达

细胞培养及其分组同“2.5”项。收集 6 孔板细胞, 冰上加入 60 μL 细胞裂解液, 裂解 1 h 后, 低温 12 000 r/min 离心 20 min, 小心吸取上清。蛋白量经 Bio-Rad 法定量后, 取各组细胞总蛋白 30 μg 上样, 10%分离胶和 5%浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜; 5%脱脂奶粉封闭 2 h, 分别加入一抗 β -actin、Bcl-2、Bax、cleaved-Caspase-3 (1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBST 洗膜 3 次, 二抗稀释液 (1:5 000) 孵育 2 h 后, 加入电化学发光检测试剂反应, X 光胶片压片曝光。

2.9 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行处理, 组间两两比较采用 LSD 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 YB16 对 A549 细胞增殖抑制作用

结果表明, YB16 在 0.125~16 $\mu\text{mol/L}$ 内, 作用 24 h 后, 对 A549 细胞增殖具有显著的抑制作用。随着 YB16 浓度的增加, 对细胞的抑制作用逐渐增强。数据分析表明, YB16 对 A549 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 4.76 $\mu\text{mol/L}$ 。结果见图 1。

3.2 YB16 对 A549 细胞生长形态、凋亡的影响

倒置显微镜下观察, 对照组细胞形态无变化, YB16 作用 A549 细胞 24 h 后, 部分细胞逐渐变圆, 体积变小, 部分细胞皱缩、松散易脱落, 随着药物浓度的增加, 培养液中悬浮细胞亦增多。细胞生长明显受到抑制, 细胞密度则随 YB16 浓度增加而减少, 见图 2。

AO/EB 染色观察: 对照组细胞结构正常, 核染色质为绿色, 绿色荧光均匀一致。经各浓度 YB16

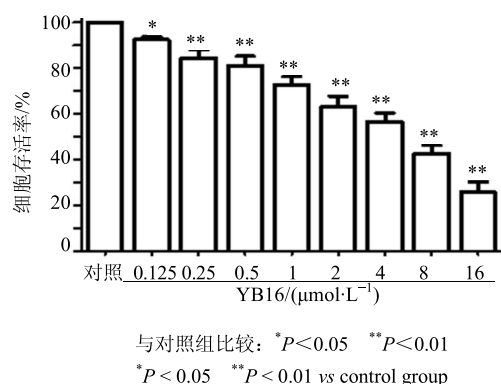


图1 YB16对A549细胞增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig. 1 Effect of YB16 on proliferation of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

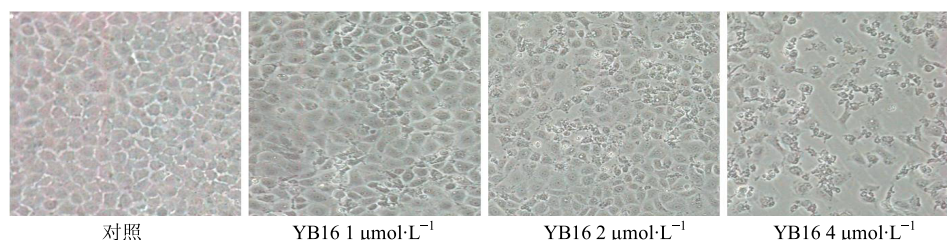


图2 YB16对A549细胞形态的影响
Fig. 2 Effect of YB16 on morphology of A549 cells

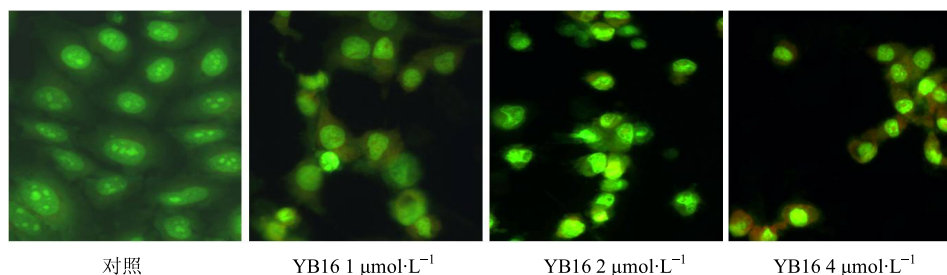


图3 AO/EB荧光染色观察YB16对A549细胞凋亡的影响
Fig. 3 Effect of YB16 on apoptosis of A549 cells by AO/EB fluorescence staining

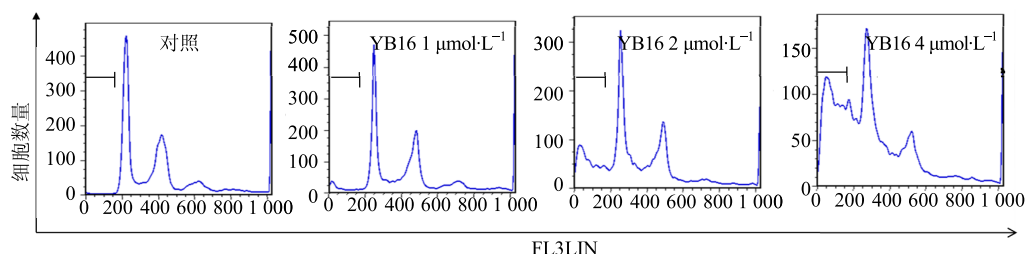


图4 流式细胞术测定YB16对A549凋亡的影响 (PI染色)
Fig. 4 Effect of YB16 on apoptosis of A549 measured by flow cytometry (PI staining)

3.3.2 Annexin V-FITC/PI 双染色 不同浓度 YB16 对细胞处理 24 h 后, Annexin V-FITC/PI 双染, 经流式细胞仪检测结果表明, 与对照组比较, 随着 YB16 的浓度增加, 细胞早期凋亡率和晚期凋亡率逐渐增加, YB16 4 μmol/L 组细胞凋亡率上升到 27.76%, 见图 5。

干预后, 可见细胞呈现凋亡, 表现为荧光更为明亮, 为均匀一致的圆状或固缩状、团块状结构, 可见早期凋亡细胞 (核染色质着绿色呈固缩状) 和晚期凋亡细胞 (核染色质为橘红色并呈圆珠状), 见图 3。

3.3 流式细胞术检测 YB16 对 A549 细胞凋亡的影响

3.3.1 PI 染色 YB16 作用 A549 细胞 24 h 后, 对照组 A549 细胞凋亡率为 (0.62 ± 0.23) %, YB16 1、2、4 μmol/L 组细胞凋亡率为 (5.92 ± 1.09) %、(21.67 ± 1.85) % 和 (38.76 ± 2.64) %, 与对照组比较, 具有显著性差异 ($P < 0.05, 0.01$)。可见, YB16 显著促进了 A549 细胞的凋亡, 见图 4。

3.4 JC-1 染色法检测 YB16 对 A549 细胞线粒体膜电位的影响

3.4.1 荧光显微镜观察 线粒体膜电位的下降, 是细胞凋亡早期的一个标志性事件。本实验结果表明, JC-1 染色后, 对照组细胞可见大部分是红色荧光, 少有绿色荧光; 经 YB16 对细胞干预 24 h 后, 红光逐渐

减弱, 而绿色荧光随着 YB16 剂量的增加而增强, 尤以 YB16 2、4 $\mu\text{mol/L}$ 组绿色荧光尤明显, 见图 6。

3.4.2 流式细胞仪检测 结果显示, 对照组细胞线

粒体膜电位正常, 经过 YB16 干预后, 细胞绿色荧光显著右移, 并且出现明显的细胞分群现象。表明 YB16 能导致 A549 细胞线粒体膜电位的下降。见图 7。

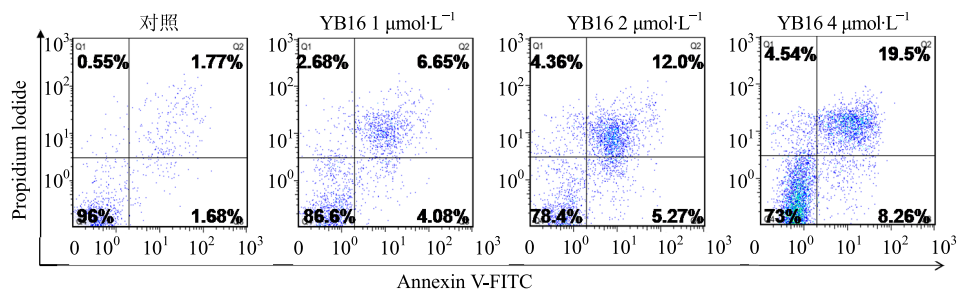


图 5 流式细胞术测定 YB16 对 A549 凋亡的影响 (Annexin V-FITC 法)

Fig. 5 Effect of YB16 on apoptosis of A549 measured by flow cytometry (Annexin V-FITC method)

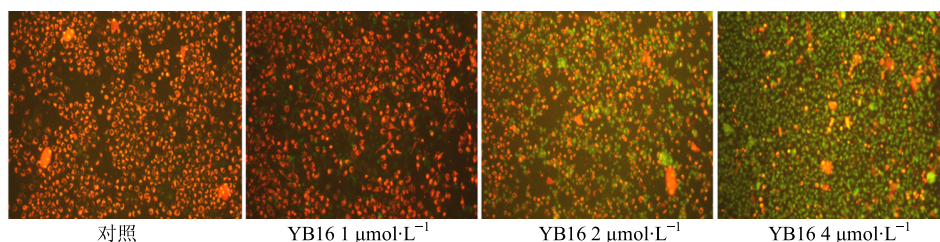


图 6 荧光显微镜观察 JC-1 染色法检测 YB16 对 A549 细胞线粒体膜电位的影响

Fig. 6 Effect of YB16 on mitochondrial membrane potential of A549 by JC-1 staining measured by fluorescence microscopy

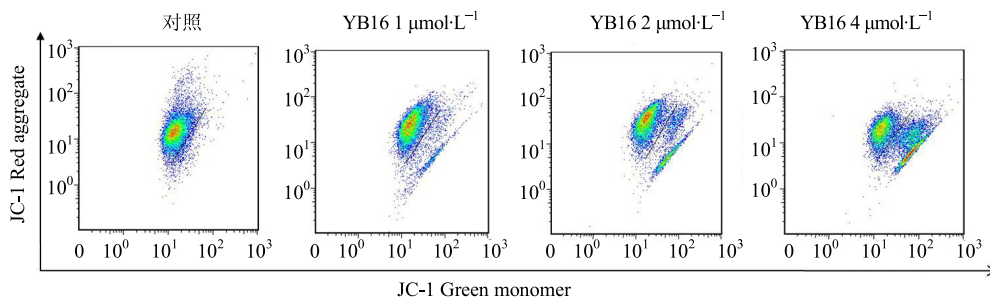


图 7 流式细胞观察 JC-1 染色法检测 YB16 对 A549 细胞膜电位的影响

Fig. 7 Effect of YB16 on mitochondrial membrane potential of A549 by JC-1 staining measured by flow cytometry

3.5 YB16 对 A549 细胞 ROS 水平的影响

对照组细胞荧光强度值较低, 为 1.23 ± 0.31 , 给予药物 YB16 (1、2、4 $\mu\text{mol/L}$) 干预 24 h 后, 各组细胞内 ROS 水平升高显著, 细胞荧光强度值分别为 3.41 ± 0.73 、 9.27 ± 1.07 、 13.48 ± 1.06 , 与对照组比较, 具有显著性差异 ($P < 0.05$ 、 0.01)。表明 YB16 能诱导 A549 细胞内 ROS 水平的升高, 见图 8。

3.6 YB16 对 A549 细胞 Bcl-2、Bax、cleaved-Caspase-3 蛋白表达的影响

与对照组比较, 不同浓度的 YB16 作用于 A549 细胞 24 h 后, A549 细胞 Bcl-2 蛋白表达下降 ($P < 0.05$); 而 A549 细胞的 Bax、cleaved-Caspase-3 蛋白表达上升 ($P < 0.05$ 、 0.01)。见表 1 和图 9。

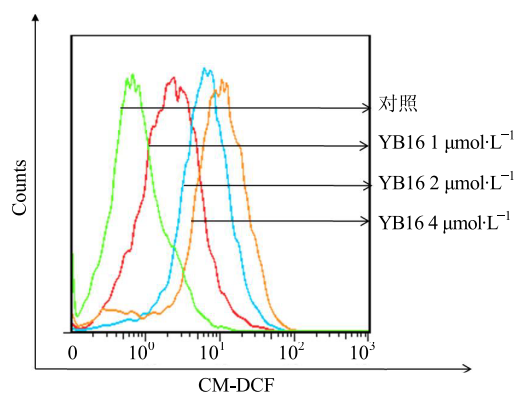


图 8 流式细胞术测定 YB16 对 A549 细胞 ROS 水平的影响

Fig. 8 Effect of YB16 on ROS levels of A549 cells measured by flow cytometry

表 1 YB16 各组 Bcl-2、Bax、cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 1 Comparison of YB16 on protein expression levels of Bcl-2, Bax, cleaved-Caspase-3 in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Bax/ β -actin	cleaved-Caspase-3/ β -actin	Bcl-2/ β -actin
对照	—	0.712 ± 0.012	0.431 ± 0.016	0.667 ± 0.017
YB16	1	0.710 ± 0.019	$0.481 \pm 0.018^*$	$0.533 \pm 0.009^{**}$
	2	$0.767 \pm 0.022^*$	$0.755 \pm 0.008^{**}$	$0.486 \pm 0.015^{**}$
	4	$0.986 \pm 0.016^{**}$	$0.806 \pm 0.015^{**}$	$0.477 \pm 0.010^{**}$

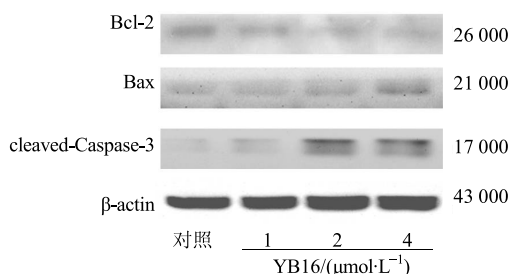
与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图 9 YB16 对 A549 细胞 Bcl-2、Bax、cleaved-Caspase-3 蛋白表达的影响

Fig. 9 Effect of YB16 on protein expression of Bcl-2, Bax, and cleaved-Caspase-3 of A549 cells

4 讨论

21 世纪以来,肺癌的发病率、死亡率仍然居高不下,并呈继续增长的趋势,在相当长的一段时间内,将仍然是导致人类因癌症死亡的首要疾病。肺癌在我国发病率极高,呈逐年上升趋势。近年来,国内外学者越来越重视植物类抗肿瘤药物的研究,已报道从长春花、红豆杉、喜树碱等分离出的抗肿瘤活性成分,并成功研发抗肿瘤药物^[8]。既往研究表明,丫蕊花所含甾体皂苷具有抗癌活性,对皮肤癌、肝癌、咽喉癌、胰腺癌等细胞的增殖具有抑制作用^[6]。本实验结果显示,YB16 能显著抑制 A549 细胞增殖,存在着剂量依赖关系;通过 AO 染色、PI、Annexin V-FITC/PI 双染,实验结果表明 YB16 能明显诱导 A549 细胞凋亡,随着药物浓度的增加,A549 细胞的凋亡率逐渐升高。

为了进一步证实 YB16 对 A549 细胞的促凋亡作用,采用荧光显微镜观察和流式细胞仪检测检测 JC-1 染色后线粒体膜电位的变化。线粒体膜电位较高时,JC-1 聚集在线粒体的基质中,形成聚合物产生红色荧光;较低时,JC-1 不能聚集在线粒体的基质中,此时 JC-1 为单体,产生绿色荧光。JC-1 从红色荧光到绿色荧光的转变,是细胞凋亡早期的一个检测指标^[9]。ROS 含氧原子或原子团,化学性质

活跃,氧化能力较强,可广泛参与细胞内信号传递,机体内过量的 ROS 可介导氧化应激反应。ROS 攻击线粒体膜可引起脂质过氧化膜的通透性改变,导致 Ca^{2+} 外流和细胞色素 C 释放,最终激活 Caspase-3 引起细胞凋亡;亦可攻击核膜,激活核酸内切酶,造成 DNA 损伤,最终导致细胞凋亡^[10]。肿瘤细胞内抗氧化酶活性较正常细胞低,清除 ROS 的效率降低,当 ROS 量与正常细胞持平时,能对肿瘤细胞具有良好的杀伤作用,近年来成为抗肿瘤药物研究的重要靶点之一^[11]。有报道,植物类抗肿瘤药物半枝莲乙醇提取物^[12]、显齿蛇葡萄提取物^[13]、吉祥草中甾体皂苷^[14]能升高肿瘤细胞中的 ROS 量,其抗肿瘤作用与 ROS 明显相关。本实验结果显示,YB16 作用 A549 细胞后,对照组细胞基本无绿色荧光,而 YB16 中高剂量组可见显著的绿色荧光,这表明线粒体膜电位明显降低;同时,流式检测绿色荧光随着 YB16 剂量的增加而明显升高,证实了线粒体膜电位的下降。YB16 亦能引起 A549 细胞内的 ROS 量的升高,中高剂量组的 ROS 量升高显著。可见,YB16 抗肿瘤作用与线粒体膜电位降低、细胞内 ROS 量增加有关。

Bcl-2 家族蛋白在细胞凋亡过程中,起着重要的调控作用,包括抗凋亡蛋白 (Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-XS 等)、促凋亡蛋白 (Bax、Bak、Bid、Bad、Bim 等)。其中,Bcl-2 为主要抗凋亡蛋白,Bax 是促细胞凋亡蛋白之一^[15]。当线粒体膜上的 Bcl-2 减少时,Bax 形成链式聚合物,镶嵌在线粒体膜上形成孔道导致膜通透性增加,使细胞色素 C 释放进入细胞质,从而激活 Caspase-9 并启动线粒体凋亡信号通路^[16]。Caspase-3 是细胞凋亡过程中最关键的执行分子之一,检测激活型 Caspase-3 (cleaved-Caspase-3) 常作为细胞凋亡的一个重要参考指标^[17]。本研究结果显示,YB16 作用人 A549 细胞后,Bcl-2 表达下降,Bax 表达增加,Caspase-3

被激活, cleaved-Caspase-3 表达增加, 由此表明 YB16 通过调控 Bcl-2 蛋白, 活化线粒体凋亡途径, 诱导细胞凋亡。

本实验证实了 YB16 对 A549 细胞具有抑制增殖、促进细胞凋亡的活性, 为丫蕊花抗肺癌作用提供了实验依据。YB16 能升高 A549 细胞的 ROS 水平, 降低 A549 细胞的线粒体膜电位, 但 YB16 抗肿瘤作用机制仍未明确。p53-ROS、Notch、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和 Wnt 等信号通路参与了肿瘤的发生发展, 这将是进一步研究的方向。

志谢: 中山大学药学院杜军教授 PI 组给予本研究大力支持!

参考文献

- [1] Ferlay J L, Soerjomataram I, Dikshit R, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-386.
- [2] Shi Y, Sun Y. Medical management of lung cancer: Experience in China [J]. *Thorac Cancer*, 2015, 6(1): 10-16.
- [3] Zhou M G, Wang H D, Zhu J, *et al.* Cause-specific mortality for 240 causes in China during 1990—2013: a systematic subnational analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. *Lancet*, 2016, 387(10015): 251-272.
- [4] 姚晓军, 刘伦旭. 肺癌的流行病学及治疗现状 [J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(8): 1982-1986.
- [5] 夏黎, 郭强, 张水英, 等. 百合科药用植物丫蕊花的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(20): 3413-3418.
- [6] Xie B B, Liu H Y, Ni W, *et al.* Ypsilandrosides C-G, five new spirostanol saponins from *Ypsilandra thibetica* [J]. *Steroids*, 2009, 74(12): 950-955.
- [7] Xia L, Ouyang P Y, Gao W, *et al.* Rapid and sensitive determination of the major steroidal saponins of *Ypsilandra thibetica* Franch by ultra high-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry [J]. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54(6): 1010-1015.
- [8] Dai S X, Li W X, Han F F, *et al.* In silico identification of anti-cancer compounds and plants from traditional Chinese medicine database [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep25462.
- [9] Zhang X J, Mei W L, Tan G H, *et al.* Strophalloside induces apoptosis of SGC-7901 cells through the mitochondrion-dependent caspase-3 pathway [J]. *Molecules*, 2015, 20(4): 5714-5728.
- [10] Roland M, Shamim N, Christoph R, *et al.* Cytosolic Ca^{2+} prevents the subplasmalemmal clustering of STIM1: anin-trinsic mechanism to avoid Ca^{2+} overload [J]. *Cell Sci*, 2008, 121(19): 3133-3139.
- [11] Kang S W, Lee S, Lee E K. ROS and energy metabolism in cancer cells: alliance for fast growth [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(3): 338-345.
- [12] Shim J H, Gim H, Lee S, *et al.* Inductions of Caspase-, MAPK-and ROS-dependent apoptosis and chemotherapeutic effects caused by an ethanol extract of *Scutellaria barbata* D. Don in human gastric adenocarcinoma cells [J]. *J Pharmacopunct*, 2016, 19(2): 129-136.
- [13] Fan T F, Wu T F, Bu L L, *et al.* Dihydromyricetin promotes autophagy and apoptosis through ROS-STAT3 signaling in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.10836.
- [14] 杨小姣, 邹坤, 尉小琴, 等. 吉祥草中甾体皂苷 RCE-4 激活 p53-ROS 通路诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的机制研究 [J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(2): 62-67.
- [15] Gross A. BCL-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1857(8): 1243-1246.
- [16] Zhang L, Zhang S. Modulating Bcl-2 family proteins and caspase-3 in induction of apoptosis by paeoniflorin in human cervicalcancer cells [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(10): 1551-1557.
- [17] Hu Q, Peng J, Liu W, *et al.* Elevated cleaved caspase-3 is associated with shortened overall survival in several cancer types [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(8): 5057-5070.