

黄芪多糖通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进肝癌细胞凋亡研究

吕 君¹, 朱鹏飞^{2*}, 刘艳民¹, 曾庆磊¹, 余祖江¹

1. 郑州大学第一附属医院 感染性疾病科, 河南 郑州 450052

2. 郑州大学第一附属医院 检验科, 河南 郑州 450052

摘要: 目的 探讨黄芪多糖通过 Wnt/ β -catenin 信号通路对人肝癌 HepG2 细胞增殖及凋亡的影响。方法 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测 HepG2 细胞增殖能力和存活率; Annexin V-FITC/PI 双染和 Caspase-3 活性检测细胞凋亡; 荧光素酶实验检测黄芪多糖 (100、200 mg/L) 处理后 HepG2 细胞 Wnt/ β -catenin 通路活性改变; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)、Western blotting 法检测细胞内的 β -catenin、c-myc 和 Cyclin D1 表达水平。结果 与对照组比较, 随着黄芪多糖质量浓度的增加和作用时间的延长, HepG2 细胞存活率显著降低 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 黄芪多糖 100、200 mg/L 组 HepG2 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); 凋亡关键因子 Caspase-3 的相对活性显著升高 ($P < 0.05$), cleaved Caspase-3 蛋白水平显著升高, Bcl-2 蛋白表达水平显著降低; 荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.05$); β -catenin、c-myc 和 Cyclin D1 mRNA 及蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$, 0.01)。结论 黄芪多糖通过下调 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制凋亡相关基因 Bcl-2 的表达, 促进 HepG2 细胞凋亡。

关键词: HepG2 细胞; 黄芪多糖; Wnt/ β -catenin 信号通路; 细胞凋亡; 细胞增殖

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)21-5155-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.21.029

Astragalus polysaccharides downregulates apoptosis in HepG2 cell through Wnt/ β -catenin signaling pathway

LV Jun¹, ZHU Peng-fei², LIU Yan-min¹, ZENG Qing-lei¹, YU Zu-jiang¹

1. Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract: Objective To investigate the effects of Astragalus polysaccharides (APS) on HepG2 cell proliferation and apoptosis through Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Methods** Cell proliferation ability and cell viability was measured by MTT assay. Annexin V-FITC/PI stain and Caspase-3 activity assay were used to detect cell apoptosis. The changes of Wnt/ β -catenin signaling pathway activity after treated by APS (100 and 200 mg/L) was measured by luciferase assay. The expression levels of β -catenin, c-myc, and Cyclin D1 were detected by qRT-PCR and Western blotting. **Results** As the concentration of APS increases, the cell viability of HepG2 cells decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with control group, the cells apoptosis rates of in APS 100 and 200 mg/L groups were increased remarkably ($P < 0.05$); The relative activities of Caspase-3 in APS 100 and 200 mg/L groups increased significantly ($P < 0.05$); Meanwhile, the activity of luciferase in APS 100 and 200 mg/L groups decreased significantly ($P < 0.05$). The expression level of cleaved Caspase-3 was increased significantly. The mRNA level of β -catenin, Cyclin D1, and c-myc in APS 100 and 200 mg/L groups were decreased significantly ($P < 0.05$), and the expression levels of Bcl-2, β -catenin, c-myc, and Cyclin D1 protein in APS 100 and 200 mg/L groups were decreased significantly ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** APS promote the apoptosis of HepG2 cells through the down-regulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway, which leads to the inhibition of apoptosis-related gene Bcl-2 expression.

Key words: HepG2 cells; Astragalus polysaccharides; Wnt/ β -catenin signaling pathway; proliferation; apoptosis

原发性肝癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 其中 70%~85%为肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)。我国为肝癌高发区, 每年全世界新发肝癌病例约 60 万, 其中中国占了半数以上^[1]。

收稿日期: 2018-04-24

基金项目: 河南省自然科学基金项目 (162300410289)

作者简介: 吕 君 (1985—), 女, 医学博士, 研究方向为肝癌的发病机制。Tel: (0371)67966942 E-mail: lvjun558@126.com

*通信作者 朱鹏飞 (1982—), 男, 医学博士, 研究方向为肝癌的发病机制。Tel: (0371)67966308 E-mail: zpf020908@163.com

黄芪是目前临床常用的抗肿瘤辅助用药, 研究表明黄芪多糖 (Astragalus polysaccharides, APS) 具有提高免疫力、活血化瘀及抗肿瘤作用, 其中关于 APS 促进肝癌细胞凋亡作用也有相关研究^[2-3], 但具体作用机制尚不清楚。

细胞凋亡是在生理或病理条件下由细胞内基因及细胞外因子调控的细胞主动死亡的生物学过程。目前认为恶性肿瘤发病的主要分子机制是细胞周期紊乱导致肿瘤细胞无限制增生和凋亡减少, 因此抑制肿瘤细胞恶性增生、诱导肿瘤细胞凋亡成为研究肿瘤治疗新途径的热点^[4]。目前发现有多种机制可以导致肿瘤细胞凋亡, 其中 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活可通过一系列过程激活下游的 c-myc、Cyclin D1 等靶基因, 从而影响细胞的增殖、凋亡过程^[5-6]。Wnt/ β -catenin 信号通路是一个古老的信号通路, 在进化过程中高度保守, 在器官组织的再生、形态发生、细胞表面受体的激活、信号传导、细胞增殖、细胞分化等许多过程中起着至关重要的作用, 在多种肿瘤中均存在异常激活^[7]。本研究探讨 APS 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路对人肝癌 HepG2 细胞增殖及凋亡的影响及作用机制, 为开发抗肝癌新药及寻找抗肝癌靶点提供实验和理论依据。

1 材料

1.1 细胞

HepG2 细胞由郑州大学第一附属医院肝病中心实验室液氮冻存。

1.2 药品与试剂

APS 粉针购自天津赛诺制药有限公司 (批号 160901, 250 mg/瓶, 质量分数大于 98%); 胎牛血清购自 Gibco 公司; DMEM 培养基由 Hyclone 公司生产; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 购自碧云天公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒购自 Becton Dickinson 公司; Caspase-3 活性检测试剂盒购自 Thermo Fisher 公司; 总 RNA 抽提试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒购自 Thermo Fisher 公司; Real time-PCR 定量试剂盒购自 Roche 公司; 聚偏二氟乙烯膜膜 (PVDF) 购自 Millipore 公司; 兔抗人 β -actin、 β -catenin、Cyclin D1 和 c-myc 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; 兔抗人 cleaved Caspase-3 多克隆抗体购自 Cell Signal Technology 公司; 羊抗兔辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗为北京中山金桥公司生产。鼠抗人 Caspase-3、Bcl-2 单克隆抗体购自 Abcam 公司; Lipofectamine™ 2000

购自 Thermo Fisher 公司; TOP FLASH 和 FOP FLASH 质粒购自 Promega 公司。

1.3 仪器

EnVision 多模式读板仪用于荧光素酶报告实验, 购自 Perkin Elmer 公司; 流式细胞仪购自美国 BD 公司; 酶标仪购自 Bio-Rad 公司; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 仪购自 Roche 公司; GE Image Quant LAS 4000 mini 超灵敏化学发光成像仪购自 GE 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

HepG2 细胞用含 10% 胎牛血清的 DME 培养基, 在 5% CO₂、37 °C、饱和湿度的培养箱培养, 0.25% 胰酶消化传代, 2~3 d 传代 1 次。实验采用对数生长期细胞。

2.2 MTT 实验

HepG2 细胞接种于 96 孔板 (2×10⁴/孔), 过夜培养后分为对照组和 APS 50、100、200、400 mg/L 组, 每组 6 个复孔, 各组分别加入生理盐水和相应质量浓度的 APS。于培养 24、48、72 h 分别加入 MTT 溶液 20 μ L (5 mg/mL) 继续培养 4 h。吸弃上清后每孔加入 150 μ L 二甲亚砜 (DMSO), 避光震荡摇匀 10 min。使用 Bio-Rad 酶标仪于 490 nm 波长测定各孔吸光度 (*A*) 值, 计算细胞存活率。

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

2.3 细胞凋亡检测

于 6 孔板中接种 HepG2 细胞 (5×10⁶/孔), 分为对照组和 APS 100、200 mg/L 组, 每组 6 个复孔, 培养过夜后分别加入生理盐水及相应质量浓度的 APS, 48 h 后收集细胞, 按照 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明, 流式细胞仪检测细胞凋亡率; Caspase-3 活性检测试剂盒检测凋亡关键因子 Caspase-3 活性。

2.4 荧光素酶报告实验

使用荧光素酶报告系统 TOP/FOP FLASH 检测 Wnt/ β -catenin 通路的转录活性, 实验分为对照组和 APS 100、200 mg/L 组。于 12 孔板中接种 HepG2 细胞 (2×10⁵/孔), 培养过夜后使用 Lipofectamine™ 2000 分别转染 TOP FLASH 和 FOP FLASH 质粒, 转染 24 h 后各组分别加入生理盐水和相应质量浓度的 APS, 转染 48 h 后采用双荧光素酶报告基因检测系统 (Promega 公司) 测定荧光素酶/海肾荧光素酶活性, 根据海肾荧光素酶活性计算各孔荧光素酶相对值。

2.5 Western blotting 法检测相关蛋白表达水平

于 12 孔板中接种 HepG2 细胞 (2×10^5 /孔), 分为对照组和 APS 100、200 mg/L 组。培养过夜后收集细胞, PBS 洗涤 3 次, 用试剂盒提取蛋白后, 采用 BCA 蛋白定量法测定蛋白质量浓度, 每孔上样量为 40 μ g。6%~12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白电泳, 蛋白分离后恒定电流 200 mA 转膜至 PVDF 膜上。室温下 5%脱脂奶粉封闭 2 h, 用相应的一抗 (1:500→1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗涤后换 HRP 标记二抗 (1:5 000) 室温孵育 2 h。洗涤后采用化学发光试剂盒在 GE Image Quant LAS 4000 mini 超灵敏化学发光成像仪显影, 检测 β -catenin、Caspase-3、Bcl-2、cleaved Caspase-3、Cyclin D1 和 c-myc 蛋白的表达, 以 β -actin 为内参。

2.6 qRT-PCR 检测相关基因表达水平

于 12 孔板中接种 HepG2 细胞 (2×10^5 /孔), 分为对照组和 APS 100、200 mg/L 组。培养过夜后收集细胞, 使用 Trizol 处理细胞, 提取总 RNA, 逆转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 使用含 SYBR Green 的定量试剂盒进行 qRT-PCR 反应, 检测 β -catenin、Cyclin D1、c-myc、 β -actin mRNA 表达。反应参数: 95 $^{\circ}$ C、30 s, 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C、5 s, 60 $^{\circ}$ C、10 s, 40 个循环。样本中目的基因相对表达量的计算方法为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, β -actin 为内参, 引物序列见表 1。

2.7 统计学分析

所有数据均为 3 次独立实验结果, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SAS 9.1 统计学软件进行统计分析, 组间差异比较采用 t 检验。

3 结果

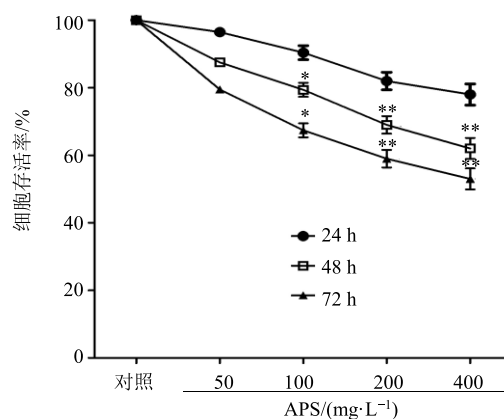
3.1 APS 对 HepG2 细胞存活率的影响

MTT 实验结果显示, 随着 APS 作用于 HepG2 细胞质量浓度的增加和时间的延长, 细胞的存活率显著降低 ($P < 0.05$, 图 1)。结果表明不同质量浓

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR

基因	引物序列 (5'→3')
β -catenin	正向 TTTGATGGAGTTGGACATGG
	反向 CAGGACTTGGGAGGTATCCA
Cyclin D1	正向 GCCACGTCTCCACACATCAG
	反向 TGGTGCATTTTCGGTTGTTG
c-myc	正向 CGCCCCACCCCTCCAG
	反向 CCGCCCAGACCCTCAGACT
β -actin	正向 CAAGAGATGGCCACGGCTGCT
	反向 TCCTTCTGCATCCTGTCGGCA



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

图 1 APS 对 HepG2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Effect of APS on survival rate of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

度的 APS 能够不同程度地抑制 HepG2 细胞增殖, 且随着质量浓度的增加其抑制作用增强。

3.2 APS 对 HepG2 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果表明, APS 100、200 mg/L 组 HepG2 细胞凋亡率 (早期凋亡率+晚期凋亡率, 图 2) 分别为 (16.11 ± 3.52) %和 (36.54 ± 2.73) %, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$)。

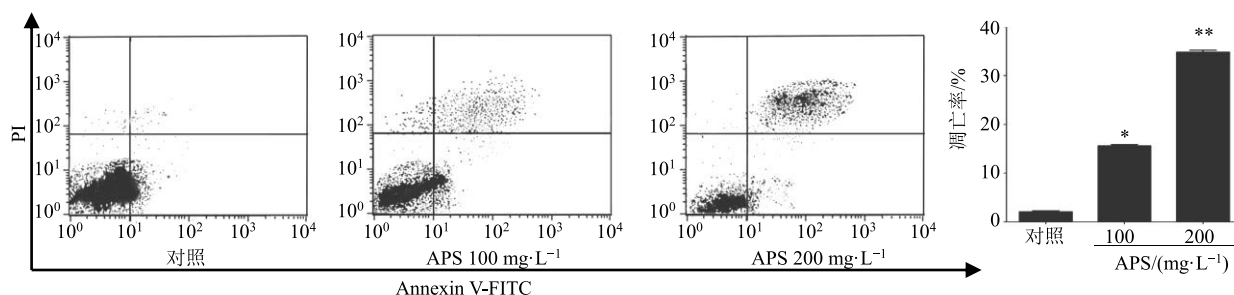


图 2 APS 对 HepG2 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 2 Effect of APS on apoptosis of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Caspase-3 活性试剂盒检测结果 (图 3) 表明, APS 100、200 mg/L 作用 HepG2 细胞 48 h 后, Caspase-3 的相对活性分别为 $(4.62 \pm 0.19)\%$ 、 $(7.32 \pm 0.35)\%$, 与对照组 $[(0.61 \pm 0.33)\%]$ 相比显著增强 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

Western blotting 结果 (图 4) 表明, 与对照组比较, APS 100、200 mg/L 组 cleaved Caspase-3 蛋白水平显著升高, Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提示 APS 可诱导 HepG2 细胞凋亡, 且呈浓度依赖性。

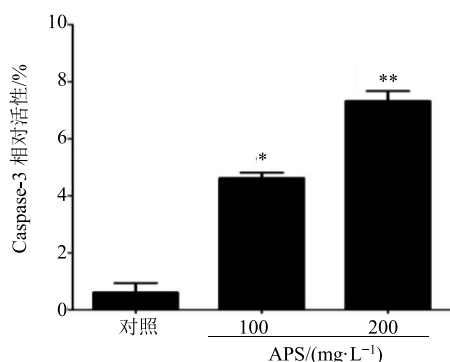


图 3 APS 对 HepG2 细胞凋亡因子 Caspase-3 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 3 Effect of APS on activity of apoptotic factor Caspase-3 in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

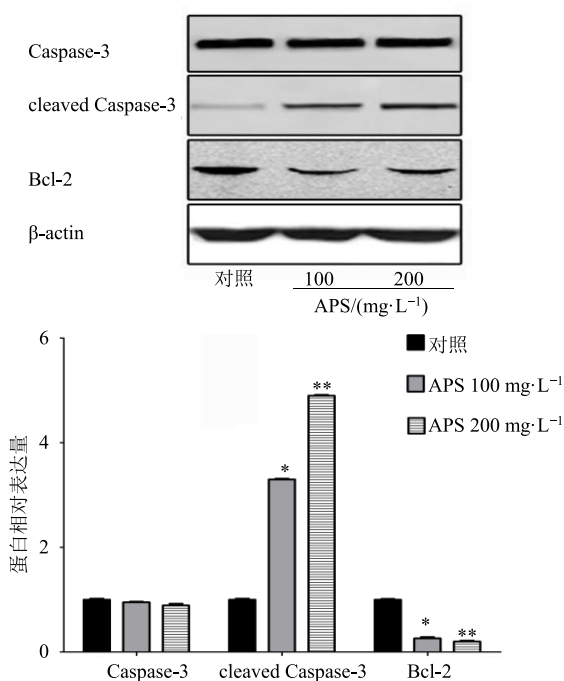


图 4 APS 对 HepG2 细胞凋亡相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 4 Effect of APS on apoptosis-related proteins in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.3 APS 对 HepG2 细胞 Wnt/β-catenin 信号通路的影响

荧光素酶双荧光报告系统检测结果 (图 5) 表明, 与对照组比较, APS 各质量浓度组 TOP FLASH 荧光素酶的活性降低 ($P < 0.05$), FOP FLASH 荧光素酶活性无显著改变。表明 APS 可能通过 Wnt/β-catenin 信号通路发挥 HepG2 细胞抑制作用。

qRT-PCR 实验结果 (图 6) 表明, 与对照组比较, APS 各质量浓度组细胞 Wnt/β-catenin 信号通路下游基因 CTNNB1、C-MYC 和 CCND1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

Western blotting 实验结果 (图 7) 表明, 与对照组比较, APS 各质量浓度组细胞 β-catenin、c-myc 和 Cyclin D1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 与基因表达趋势一致。综合上述结果, APS 可以通过抑制 Wnt/β-catenin 信号通路促进 HepG2 细胞凋亡。

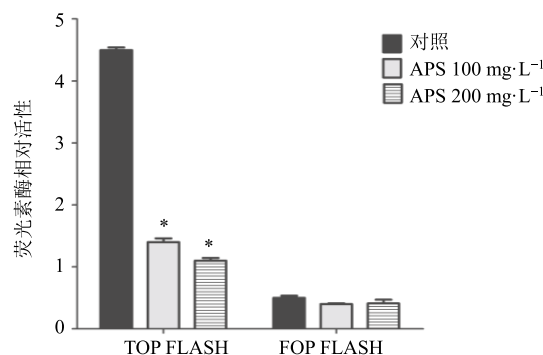


图 5 APS 对 HepG2 细胞 Wnt/β-catenin 信号通路的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 5 Effect of APS on Wnt/β-catenin signaling pathway in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

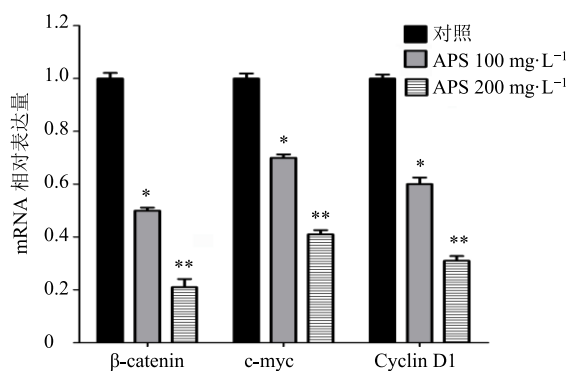


图 6 APS 对 HepG2 细胞 Wnt/β-catenin 信号通路下游基因 mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 6 Effect of APS on mRNA levels of downstream gene of Wnt/β-catenin signaling pathway in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

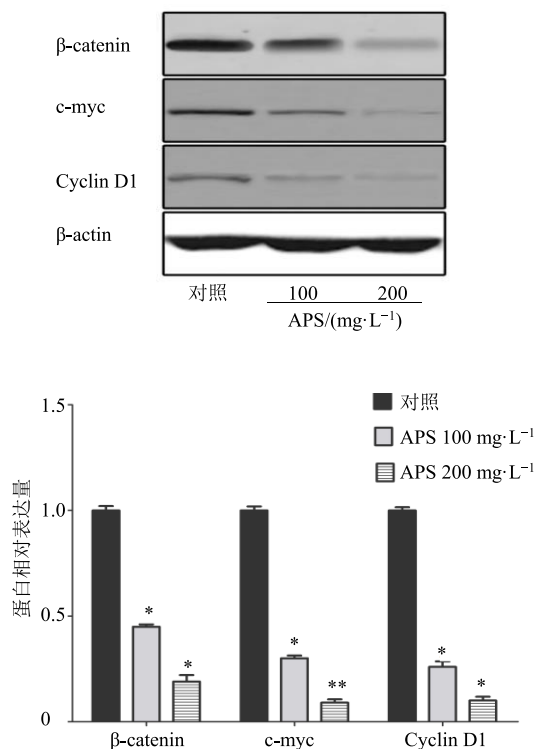


图 7 APS 对 HepG2 细胞 Wnt/β-catenin 信号通路下游蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 7 Effect of APS on expression of downstream protein of Wnt/β-catenin signaling pathway in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

4 讨论

黄芪是重要的常用中药材,在我国有着悠久的药用历史,随着现代医学的发展,黄芪的有效成分被逐渐发现和证实,其提取物之一 APS 在临床上应用广泛,可调理免疫功能、提高化疗药物治疗肿瘤的疗效并减轻放化疗毒副作用^[8-9]。近年研究发现 APS 联合斑蝥酸钠处理 HepG2 细胞可以诱导 HepG2 细胞凋亡,并且细胞中 Bcl-2 表达显著减少^[3]。宋杰等^[2]研究发现 APS 对 HepG2 细胞生长增殖有显著的抑制作用,并且可以通过影响腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路促进细胞凋亡。但相关研究尚未阐明 APS 调节 HepG2 细胞凋亡的机制。

Wnt 信号通路组成部分的突变或表达改变都可能诱发多种疾病,尤其是肿瘤。在癌症和其他疾病中, Wnt 信号通路中的许多基因异常活化或抑制,变成了癌基因或抑癌基因^[7]。有报道表明,黄芪可下调糖尿病肾病大鼠肾间质 Wnt/β-catenin 信号通路的表达,延缓大鼠肾间质纤维化的进程,发挥肾脏的保护作用^[10]。但 APS 通过 Wnt/β-catenin 信号通路发挥

作用尚未见报道。

本研究发现 APS 可以引起 HepG2 细胞凋亡,并且抑制 Wnt/β-catenin 信号通路下游基因和蛋白表达,提示 APS 可能通过下调 Wnt/β-catenin 信号通路导致 HepG2 细胞发生凋亡。

陈瑾歆等^[3]报道 APS 通过抑制凋亡相关基因 Bcl-2 表达诱导 HepG2 细胞凋亡。也有报道表明 Wnt3a 能够以细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 依赖的方式增加 Bcl-2 的表达,从而抑制凋亡的发生^[11]。因此推测, APS 可能通过抑制 Wnt/β-catenin 信号通路导致 Bcl-2 的表达被抑制,最终导致 HepG2 细胞凋亡。本研究结果表明,不同质量浓度的 APS 可以不同程度的增加 cleaved Caspase-3 的表达,同时抑制 Bcl-2 的表达。上述结果提示, APS 导致 HepG2 细胞发生凋亡可能通过下调 Wnt/β-catenin 信号通路进而抑制下游凋亡相关基因 Bcl-2。

宋杰等^[2]报道了 APS 通过 AMPK-mTOR 信号通路促进肝癌细胞生长增殖及凋亡,而 mTOR 信号通路的过度活化与肿瘤发生发展密切相关。有研究报道 Wnt1 蛋白可以通过活化 mTOR 信号通路而抑制肿瘤的形成^[12]。因此推测, APS 对肝癌细胞增殖的抑制和促进凋亡的作用也可能是通过其下调 Wnt/β-catenin 信号通路导致 mTOR 信号通路被抑制来实现的,但还需进一步实验证实。

综上所述, APS 体外具有抑制肝癌细胞生长增殖、促进其凋亡的作用,作用机制为 APS 抑制 Wnt/β-catenin 信号通路导致凋亡相关基因 Bcl-2 的抑制。本研究进一步明确了 APS 抗肝癌的作用机制,为 APS 在抗肝癌的应用以及发现新的抗肝癌靶点提供实验及理论依据。

参考文献

- [1] 吕桂帅, 陈 磊, 王红阳. 我国肝癌研究的现状与前景 [J]. 生命科学, 2015(3): 237-248.
- [2] 宋 杰, 李 静, 黄铁柱, 等. 黄芪多糖对肝癌细胞生长增殖凋亡及 AMPK-mTOR 信号通路的影响 [J]. 中国医师杂志, 2015, 17(5): 667-670.
- [3] 陈瑾歆, 何 军, 张娟娟, 等. 黄芪多糖对人肝癌细胞 hepg2 凋亡相关基因表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2014(1): 124-126.
- [4] Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death [J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(4): 495-516.
- [5] Xu J, Zhu X, Wu L, et al. MicroRNA-122 suppresses cell proliferation and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma by directly targeting wnt/beta-catenin pathway

- [J]. *Liver Inter*, 2012, 32(5): 752-760.
- [6] Xu M X, Zhao L, Deng C, *et al*. Curcumin suppresses proliferation and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via the wnt signaling pathway [J]. *Inter J Oncol*, 2013, 43(6): 1951-1959.
- [7] Anastas J N, Moon R T. Wnt signalling pathways as therapeutic targets in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(1): 11-26.
- [8] 左 军, 张文钊, 胡晓阳, 等. 黄芪现代药理及临床研究进展 [J]. 中医药信息, 2014, 31(1): 111-112.
- [9] 吴 梅, 谭 睿. 黄芪多糖研究进展 [J]. 川北医学院学报, 2013, 28(1): 17-22.
- [10] 邓文超, 方敬爱. 黄芪对糖尿病肾病大鼠肾间质 wnt/ β -catenin 及 TGF- β 1 信号通路表达的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2012, 13(7): 571-574.
- [11] Almeida M, Han L, Bellido T, *et al*. Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and-independent signaling cascades involving src/erk and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(50): 41342-41351.
- [12] Castilho R M, Squarize C H, Chodosh L A, *et al*. mTOR mediates Wnt-induced epidermal stem cell exhaustion and aging [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(3): 279-289.