

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.07.003

槲木皂苷通过降低 Akt/NF- κ B 通路抑制 HeLa 细胞的增殖并促进其凋亡*

段海霞, 李东红[△], 暴 蕾, 李 欢, 高红敏
(陕西省西安市第四医院妇产科 710004)

[摘要] 目的 探讨槲木皂苷对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖和凋亡的影响。方法 以体外培养的人宫颈癌 HeLa 细胞为研究对象, 实验分为阴性对照组和槲木皂苷组(50、100、200 μ g/mL)共 4 组, 分别给予 RPMI-1640 培养液和槲木皂苷(50、100、200 μ g/mL)处理。24、48 和 72 h 后, 分别收集各组细胞, 采用 MTT 法检测细胞的增殖情况, 流式细胞仪检测细胞凋亡, Western blot 技术测定细胞内蛋白(pAkt1、pI κ B α 、NF- κ B p65、Bcl-2 和 Caspase-3)表达水平。结果 槲木皂苷呈时间-剂量依赖性抑制 HeLa 细胞的增殖, 并增加其凋亡水平。另外, 槲木皂苷显著降低 Akt1 和 I κ B α 的磷酸化水平, 减少 NF- κ B(亚基 p65)和 Bcl-2 的蛋白表达, 相反却显著增加 Caspase-3 的含量。结论 槲木皂苷通过降低 Akt/NF- κ B 信号通路的活性抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖并促进其凋亡。

[关键词] 槲木皂苷; HeLa 细胞; Akt/NF- κ B; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R737.33

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)07-0873-03

Araloside inhibited proliferation and promotes apoptosis of HeLa cells via suppression of Akt/NF- κ B pathway*

Duan Haixia, Li Donghong[△], Bao Lei, Li Huan, Gao Hongmin

(Department of Obstetrics and Gynecology, The Affiliated Guangren Hospital of Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Xi'an, Shanxi, 710004, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of araloside on the proliferation and apoptosis of HeLa cells. **Methods** Human cervical cancer cell line HeLa was cultured in vitro, the experiment was divided into 4 groups as follows: blank group, araloside treated groups(50, 100, 200 μ g/mL). Normal saline and araloside (50, 100, 200 μ g/mL) were gave, respectively. 24, 48 and 72 hours later, the cells were collected. Cell proliferation was detected by MTT, cell apoptosis was determined by flow cytometry, the expression of pAkt1, pI κ B α , NF- κ B (p65), Bcl-2 and Caspase-3 were evaluated by western blot. **Results** Araloside obviously inhibited the proliferation and increased the apoptosis level of HeLa cells in a time-dose dependent manner. Moreover, Araloside significantly decreased the phosphorylation of Akt1 and I κ B α , reduced the expression of NF- κ B (p65) and Bcl-2, whereas obviously increased Caspase-3 content. **Conclusion** Araloside could inhibit the proliferation and promote the apoptosis of HeLa cells via suppressing Akt/NF- κ B signaling pathway.

[Key words] araloside; HeLa cells; Akt/NF- κ B; proliferation; apoptosis

宫颈癌严重威胁着广大妇女的健康^[1]。目前, 该病主要以手术与放射治疗为主要治疗措施^[2], 但中晚期患者的疗效很差, 因此, 积极寻找高效抗肿瘤药物具有重要的临床价值。槲木自古就有医用之说, 研究表明槲木总苷具备了抗氧化、正性肌力、保护心肌、抗肿瘤、抗病毒等积极作用, 在免疫、血液、心血管、神经等系统疾病中均有良好的疗效^[3]。但槲木总苷在宫颈癌中的作用尚不明确。以往研究认为, Akt/NF- κ B 信号通路在癌症的发生、发展中发挥着重要的作用^[4-5]。其中, NF- κ B 一类核转录调控因子, 广泛地参与免疫应激、生长分化、细胞增殖及凋亡等生理病理过程中^[6]。那么, 槲木皂苷对宫颈癌的作用是否与 Akt/NF- κ B 信号通路有关呢? 本研究以体外培养的人宫颈癌 HeLa 细胞株为研究对象, 观察了槲木皂苷对其增殖和凋亡的影响及与 Akt/NF- κ B 信号通路的关系, 旨在深入挖掘宫颈癌的治疗靶点。

1 材料与方

1.1 材料 HeLa 细胞(由西安交通大学医学院实验医学中心提供); 槲木皂苷(由西京医院药剂科提供); RPMI-1640 培

养基(Invitrogen 公司); DMSO(天津巴斯夫化工有限公司); MTT(Amresco 公司); Annexin V-FITC 荧光试剂盒(晶美生物技术有限公司); pAkt1、pI κ B α 和 NF- κ B p65 抗体(Abcam 公司); Bcl-2、Caspase-3 和 GAPDH 抗体(Cell Applications, Inc., Wiltshire, UK)。

1.2 方法

1.2.1 HeLa 细胞培养 将 HeLa 细胞细胞培养基放置于 37 $^{\circ}$ C、5% 的饱和湿度条件下培养。待 HeLa 细胞贴壁生长后, 取用对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 HeLa 细胞的生长抑制检测 取处于对数生长期的 HeLa 细胞, 设空白对照组(不加细胞只加等量的培养液)、阴性对照孔(Blank, 不加槲木皂苷而加等量的培养液)和槲木皂苷实验组, 实验组加入不同浓度的槲木皂苷 100 μ L, 使其终浓度分别为 50、100、200 μ g/mL。分别于 24、48、72 h 后取出培养板, 新配制的 5 mg/mL MTT 液每次加入 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 4 h 后终止培养。去除 96 孔板中的上清液, 每孔加入 DMSO 150 μ L, 并置于摇床上低速振摇 10 min, 于 490 nm 测

* 基金项目: 陕西省科学技术研究发展计划基金资助项目(2013K12-03-22)。 作者简介: 段海霞(1983-), 主治医师, 硕士, 主要从事宫颈癌的机制研究。 [△] 通讯作者, Tel: 15991261332; E-mail: lidonghong2014@126.com。

吸光度(OD)值,依据公式计算细胞抑制率=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%。

1.2.3 HeLa 细胞凋亡检测 阴性对照组和槲木皂苷组(50、100 和 200 μg/mL)HeLa 细胞分别用 RPMI-1640 培养液相应浓度的药物处理,于培养箱内继续培养 24、48 和 72 h 后,分别收集各组细胞,以 2 000 r/min 离心 5 min,洗涤 3 次,加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞,调节细胞密度为 1×10^6 个/mL,取 100 μL 细胞,分别加入 PI 和 Annexin V-FITC,混匀后室温避光 15 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.4 蛋白表达检测 阴性对照组和槲木皂苷组(50、100 和 200 μg/mL)HeLa 细胞分别用相应浓度的药物处理,于培养箱内继续培养 48 h 后,收集细胞,以 BCA 法测定蛋白浓度。将 50 μg 蛋白与加样缓冲液混合,经凝胶电泳分离,再电转移到 PVDF 膜上。孵育一抗和二抗,用 ECL 发光法显色,曝光、显影、定影。以 GAPDH 作为内参照。条带用薄层扫描仪扫描,再运用软件分析各条带灰度值,计算各蛋白(pAkt1、pIkBa、NF-κB p65、Bcl-2 和 Caspase-3)的相对含量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析处理,本实验所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 槲木皂苷抑制 HeLa 细胞的增殖 槲木皂苷组在不同的作用时间点(24、48、72 h)和不同的浓度(50、100、200 μg/mL)时对 HeLa 细胞生长均有抑制作用。以 24 h 和 48 h 分别作对照,同一浓度的槲木皂苷对 HeLa 细胞生长的抑制率随着时间的延长而提高。以 50、100 μg/mL 分别作对照,同一时间的槲木皂苷对 HeLa 细胞生长的抑制率随着浓度的升高而提高。实验结果表明槲木皂苷对 HeLa 细胞生长的抑制作用具有明显的时间-剂量依赖性(表 1)。

2.2 槲木皂苷促进 HeLa 细胞的凋亡 槲木皂苷组在不同的作用时间点(24、48、72 h)和不同的浓度(50、100、200 μg/mL)时均能够明显增加 HeLa 细胞的凋亡。以 24 h 和 48 h 分别作对照,同一浓度的槲木皂苷对 HeLa 细胞凋亡的促进作用随着时间的延长而提高。以 50、100 μg/mL 分别作对照,同一时间的槲木皂苷对 HeLa 细胞凋亡的促进作用随着浓度的升高而

提高。实验结果表明槲木皂苷对 HeLa 细胞凋亡的影响也具有明显的时间-剂量依赖性(表 2)。

表 1 槲木皂苷对 HeLa 细胞增殖抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

组别	浓度(μg/mL)	24 h	48 h	72 h
阴性对照组	0	0	0	0
槲木皂苷组	50	20.35±2.21	28.56±1.69*	35.29±3.21#
	100	36.48±2.65	41.17±2.15 [△]	50.15±2.61 [▽]
	200	53.61±3.18	59.24±3.12*	65.69±3.39#

*: $P < 0.05$,[△]: $P < 0.01$,与同浓度 24 h 比较;#: $P < 0.05$,[▽]: $P < 0.01$,与同浓度 48 h 比较。

2.3 槲木皂苷抑制 HeLa 细胞中的 Akt/NF-κB 信号通路 根据上述槲木皂苷对 HeLa 细胞增殖和凋亡的影响,本研究选择 48 h 作为深入观察槲木皂苷作用机制的合适时间点。经不同浓度的槲木皂苷孵育 HeLa 细胞 48 h 后,作者发现 Akt1 和 IkBa 的磷酸化水平随着槲木皂苷浓度的升高而逐渐降低,同时 NF-κB(亚基 p65)和 Bcl-2 的蛋白表达也随着槲木皂苷浓度的升高而逐渐降低,相反 Caspase-3 的含量则随着槲木皂苷浓度的升高而逐渐升高。实验结果表明槲木皂苷通过降低 Akt/NF-κB 信号通路而抑制 HeLa 细胞增殖,并增加其凋亡(表 3)。

表 2 槲木皂苷对 HeLa 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

组别	浓度(μg/mL)	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0	2.51±0.68	2.67±0.59	2.83±0.73
槲木皂苷组	50	14.25±1.75	19.82±1.45*	23.72±2.11#
	100	23.18±1.06	27.04±1.85 [△]	33.02±1.98 [▽]
	200	32.29±1.17	36.32±1.11*	40.52±1.19#

*: $P < 0.05$,[△]: $P < 0.01$,与同浓度 24 h 比较;#: $P < 0.05$,[▽]: $P < 0.01$,与同浓度 48 h 比较。

表 3 条带的灰度值统计(48 h, $\bar{x} \pm s, n=6, \%$,GAPDH)

检测蛋白	阴性对照组	槲木皂苷组(μg/mL)		
		50	100	200
GAPDH(37×10^3)	100.11±1.08	102.16±1.32	101.38±1.09	103.03±1.57
pAkt1(56×10^3)	50.68±1.87	40.41±1.85 [△]	29.91±1.29 [▽]	11.42±1.66 [◇]
pIkBa(40×10^3)	44.15±1.63	33.18±1.96 [△]	21.72±2.05 [▽]	10.22±1.37 [◇]
NF-κB p65(65×10^3)	46.28±1.06	31.46±1.57 [△]	22.62±1.09 [▽]	13.55±1.49 [◇]
Bcl-2(30×10^3)	36.79±1.39	23.71±0.93 [△]	18.72±0.66 [▽]	9.82±0.37 [◇]
Caspase-3(34×10^3)	5.02±0.24	9.08±0.75 [△]	15.26±0.75 [▽]	24.79±0.84 [◇]

[△]: $P < 0.01$,与阴性对照组比较;[▽]: $P < 0.01$,与 50 μg/mL 槲木皂苷组比较;[◇]: $P < 0.01$,与 100 μg/mL 槲木皂苷组比较。

3 讨 论

宫颈癌是妇产科常见的恶性肿瘤之一,每年约 20 万女性死于该病^[7]。发展中国家的宫颈癌属多发妇科肿瘤,位居榜首^[8-9]。每年中国新发病例为 25 万,西北地区病死率最高。宫颈癌向邻近组织和器官蔓延,下至阴道穹窿及阴道壁,上侵子

宫体,两侧可犯盆腔组织,前可到膀胱,后可达直肠,晚期甚至可转移到全身淋巴结^[10]。手术和放射治疗是目前最主要的治疗手段,但中晚期治愈率很低,解决这一难题是目前的热点^[11]。寻找高效低毒抗肿瘤药物具有重要应用价值。

槲木皂苷提自槲木,属五加科植物。全球共 40 余种五加

科楤木属植物,分布于亚洲及北美洲。中国现有 30 余种,主要分布于东北地区,许多种类可为药用。楤木做为食材自古就有。现代研究发现,楤木总苷具备抗氧化、正性肌力、保护心肌、抗肿瘤、抗病毒等功效,对于免疫、血液、心血管及神经等系统疾病均有较好的治疗作用。药理实验研究表明楤木皂苷具有调节促进心肌收缩力,提高机体免疫、抗病毒、抗癌等生理和药理作用。本实验发现,楤木皂苷能够时间-剂量依赖性抑制 HeLa 细胞的增殖,同时也能够时间-剂量依赖性增加 HeLa 细胞的凋亡。该结果进一步表明楤木皂苷具有显著的抗癌作用,尤其是在宫颈癌的治疗中可能有良好的开发前景。那么楤木皂苷通过什么机制影响了宫颈癌的发生、发展呢?有待今后进一步研究。

近期研究发现,Akt/NF- κ B 信号通路在癌症的发生、发展中发挥着重要作用^[12]。NF- κ B 是近年来发现的一类核转录调控因子,常以 p50/p65 组成的二聚体存在,广泛参与免疫应激、细胞增殖、生长分化及凋亡等过程。现已证实,NF- κ B 与肿瘤的发生发展、浸润转移、抗凋亡及耐药性的产生有着密切关系^[13]。外界刺激的条件不同,NF- κ B 信号传导的途径也不相同^[14]。在非刺激状态时,NF- κ B 与抑制物 I κ B 结合以未被激活形式存在于细胞质,当细胞受到刺激后,I κ B 发生磷酸化并降解,NF- κ B 移至核内促进细胞因子、趋化因子、黏附因子等的转录^[15-16]。TRAF-1、TRAF-2、C-IAp1 和 C-IAp2 等均是 NF- κ B 的靶基因^[17]。TRAF-2 作为第 2 信使,接受 TNF 刺激信号后,可活化下游 NF- κ B 诱导激酶,激活 I κ K α / β 降解 I κ B 蛋白,进而活化 NF- κ B 通路^[18],最终可诱导 Bcl-2 等基因转录表达^[19-20],增强肿瘤细胞的抗凋亡性。作者发现,楤木皂苷可能通过降低 Akt/NF- κ B 信号通路抑制了 HeLa 细胞的增殖,并增加了 HeLa 细胞的凋亡。本研究为揭示楤木皂苷抗宫颈癌的作用提供了理论基础,给予早期宫颈癌患者服用楤木皂苷将有利于抑制癌症发展,而给予手术患者同时服用楤木皂苷可能会增强癌症的治疗效果,有利于控制患者病情。

综上所述,楤木皂苷具有很好的抗宫颈癌作用,但其作用强度与剂量的大小及作用时间的长短等密切相关,合理开发含有楤木皂苷成分的药物将为宫颈癌患者带来希望。

参考文献

- Basu S, Mahajan A. Psoas muscle metastasis from cervical carcinoma: Correlation and comparison of diagnostic features on FDG-PET/CT and diffusion-weighted MRI[J]. *World J Radiol*, 2014, 6(4): 125-129.
- Kahla S, Kochbati L, Maalej M, et al. Situation of HPV16 E2 gene status during radiotherapy treatment of cervical carcinoma[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(6): 2869-2873.
- Lee EB, Kim OJ, Kang SS, et al. Araloside A, an antiulcer constituent from the root bark of *Aralia elata* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(3): 523-526.
- Kaur S, Sharma N, Krishn SR, et al. MUC4-mediated regulation of acute phase protein lipocalin 2 through HER2/AKT/NF- κ B signaling in pancreatic cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(3): 688-700.
- Erstad DJ, Jr Cusack JC. Targeting the NF- κ B pathway in cancer therapy[J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2013, 22(4): 705-746.
- Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer[J]. *Mol Cancer*, 2013, 12: 86.
- Tirumani SH, Shanbhogue AK, Prasad SR. Current concepts in the diagnosis and management of endometrial and cervical carcinomas[J]. *Radiol Clin North Am*, 2013, 51(6): 1087-1110.
- Nogami Y, Iida M, Banno K, et al. Application of FDG-PET in cervical cancer and endometrial cancer: utility and future prospects[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(2): 585-592.
- Rositch AF, Soeters HM, Offutt-Powell TN, et al. The incidence of human papillomavirus infection following treatment for cervical neoplasia: a systematic review[J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 132(3): 767-779.
- Schiffman M, Solomon D. Clinical practice. Cervical-cancer screening with human papillomavirus and cytologic co-testing[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(24): 2324-2331.
- Kitchener HC, Denton K, Soldan K, et al. Developing role of HPV in cervical cancer prevention[J]. *BMJ*, 2013, 347: 4781.
- Wang Y, Li CF, Pan LM, et al. 7, 8-Dihydroxycoumarin inhibits A549 human lung adenocarcinoma cell proliferation by inducing apoptosis via suppression of Akt/NF- κ B signaling[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(6): 1770-1774.
- Tokunaga F. Linear ubiquitination-mediated NF- κ B regulation and its related disorders[J]. *J Biochem*, 2013, 154(4): 313-323.
- Park SH, Cho G, Park SG. NF- κ B Activation in T Helper 17 Cell Differentiation[J]. *Immune Netw*, 2014, 14(1): 14-20.
- Huang WC, Hung MC. Beyond NF- κ B activation: nuclear functions of I κ B kinase α [J]. *J Biomed Sci*, 2013, 20: 3.
- Kanarek N, Ben-Neriah Y. Regulation of NF- κ B by ubiquitination and degradation of the I κ Bs[J]. *Immunol Rev*, 2012, 246(1): 77-94.
- Royuela M, Rodriguez-Berriguete G, Fraile B, et al. TNF- α /IL-1/NF- κ B transduction pathway in human cancer prostate [J]. *Histol Histopathol*, 2008, 23(10): 1279-1290.
- Wajant H, Scheurich P. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001, 33(1): 19-32.
- Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF- κ B in nerve cell survival, plasticity, and disease[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(5): 852-860.
- Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1): 49-63.