

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.17.005

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190514.1623.006.html(2019-05-16)

黄芪多糖抑制结肠癌 HT-29 细胞生长作用研究*

宋鑫¹,张俊²,魏立强¹,郭文渊¹,王仕祺³,陈承魁^{1△}(1. 中国人民解放军第九〇七医院药学科,福建南平 353000;2. 福建医科大学科技处,福州 350000;
3. 空军军医大学第一附属医院胃肠外科,西安 710032)

[摘要] **目的** 探讨黄芪多糖对结肠癌 HT-29 细胞增殖、凋亡及周期的影响,以及黄芪多糖用于结肠癌治疗的抗肿瘤分子机制。**方法** 在体外培养 HT-29 细胞,四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测黄芪多糖抑制 HT-29 细胞增殖的半数致死量(IC₅₀),设置不同的黄芪多糖浓度,检测黄芪多糖对 HT-29 细胞增殖能力的影响;利用膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)凋亡检测试剂盒流式细胞仪检测不同浓度黄芪多糖对 HT-29 细胞凋亡的影响;利用碘化丙啶(PI)周期检测试剂盒流式细胞仪检测不同浓度黄芪多糖对 HT-29 细胞周期的影响。**结果** MTT 实验结果显示黄芪多糖抑制 HT-29 细胞增殖的 IC₅₀ 为 92.49 μg/mL,黄芪多糖能够抑制人结肠癌细胞 HT-29 的增殖,且当浓度小于 200 μg/mL 时,随着黄芪多糖浓度的增高其抑制增殖作用增强,抑制作用呈剂量依赖型;流式细胞仪检测结果显示,黄芪多糖能够促进人结肠癌细胞 HT-29 的凋亡,且当浓度小于 200 μg/mL 时,随着黄芪多糖浓度的增高其促进凋亡作用增强;黄芪多糖对 HT-29 细胞具有周期阻滞作用。**结论** 黄芪多糖可使结肠癌 HT-29 细胞增殖减慢延缓、凋亡增加,细胞阻滞于 G₁ 期,其可能是黄芪用于结肠癌治疗的抗肿瘤机制。

[关键词] 黄芪多糖;结肠肿瘤;细胞增殖;细胞凋亡**[中图分类号]** R285.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)17-2899-04**Inhibitory effect of Astragalus polysaccharide on the growth of colon cancer HT-29 cells***SONG Xin¹,ZHANG Jun²,WEI Liqiang¹,GUO Wenyuan¹,WANG Shiqi³,CHEN Chengkui^{1△}(1. Department of Pharmacy, the 907th Hospital of PLA, Nanping, Fujian 353000, China;
2. Department of Technology, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350000, China; 3. Department of Digestive Surgery, the First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

[Abstract] **Objective** To study the effects of Astragalus polysaccharide on the proliferation, apoptosis and cell cycle of colon cancer cells (HT-29), and to explore the anti-tumor molecular mechanism of astragalus for colon cancer treatment. **Methods** HT-29 cells were cultured in vitro, methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of Astragalus polysaccharide to inhibit HT-29 cell proliferation. Different concentrations of Astragalus polysaccharide was setted to study the effects on the proliferation of HT-29 cells. Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit was used to detect the effects on the apoptosis. Propidium iodide (PI) Cycle Detection Kit was used to detect the effects on the cell cycle by flow cytometry. **Results** MTT assay showed that the IC₅₀ of Astragalus polysaccharide to inhibit the proliferation of HT-29 cells is 92.49 μg/mL. Astragalus polysaccharides can inhibit the proliferation of HT-29 cells. When the Astragalus polysaccharides concentration was less than 200 μg/mL, the inhibition effect on proliferation increased with the increase of concentration in a dose-dependent manner. The flow cytometry results showed that Astragalus polysaccharide can promote the apoptosis of HT-29 cells, and when the concentration was less than 200 μg/mL, with the increase of Astragalus polysaccharide concentration, the effect on promoting apoptosis is enhanced. Astragalus polysaccharides can block the cell cycle of HT-29 cells. **Conclusion** Astragalus polysaccharide can inhibit the proliferation and increase the apoptosis of colon cancer HT-29 cells, and also can block cells in G₁ phase, which may be the anti-tumor mechanism for colon cancer treatment.

[Key words] astragalus polysaccharide; colonic neoplasms; cell proliferation; apoptosis

结肠癌具有早期侵袭及转移的特点,其生物学恶性程度高,严重危害人类健康。结肠癌发病率呈年轻

化态势,近年来青年人结肠癌发病率较以往有了明显的升高趋势,提高早诊率及结肠癌救治水平迫在眉睫^[1]。现阶段结肠癌治疗仍主要依靠手术、放疗及化疗治疗,外科手术技术的不断提高及新的化疗药物的发展在很大程度上使得结肠癌的救治水平得到一定的改善,但仍有很多患者无法接受手术治疗,化疗药物由于其较严重的毒副作用使患者无法耐受,结肠癌病死率仍居高不下。中国传统医学中医中药的发展弥补了这一缺陷^[2-3]。黄芪味甘,性温,有健脾理气的功效,得益于其低毒副作用、高效及多靶点的优势,黄芪已广泛应用于结肠癌抑制肿瘤生长、减轻化疗副反应、放疗增敏以及改善患者症状^[4-7]。本研究基于黄芪治疗结肠癌的基础,研究黄芪多糖对结肠癌 HT-29 细胞生长作用的影响,探讨黄芪多糖抑制结肠癌 HT-29 细胞增殖的作用机制,为黄芪治疗结肠癌提供实验和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 HT-29 人结肠癌细胞株系购自中国科学院上海生命科学研究所以。

1.1.2 药物及试剂 黄芪多糖购自森弗生物公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自美国 Amresco 公司;MCCOY'S 5A 培养基购自北京 Macgene 公司;二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Amresco 公司;胰蛋白酶购自北京中杉金桥生物技术有限公司;胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)凋亡检测试剂盒购自美国 Sigma 公司;碘化丙啶(PI)周期检测试剂盒购自美国 BD 公司;小鼠免疫组化染色 S-P 检测试剂盒,浓缩型二氨基联苯胺(DAB)试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.3 实验仪器 细胞培养箱购自德国 Heraeus 公司;倒置显微镜购自日本 Olympus 公司;离心机购自德国 Eppendorf 公司;紫外分光光度计购自美国 Bio-Rad 公司;酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司;超净工作台购自西安净化仪器厂;移液器购自德国 Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、黄芪多糖配制及实验分组 细胞在 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养于含 10% 胎牛血清的 MCCOY'S 5A 培养液中,适时使用胰蛋白酶进行消化传代。超净工作台内无菌条件下用 MCCOY'S 5A 培养液溶解黄芪多糖粉末呈不同浓度的黄芪多糖混合培养液,使黄芪多糖的终浓度分别为 50、100、200 μg/mL,设置分组如下:对照组加入 200 μL 培养液,黄芪多糖 A、B、C 组分别加入含黄芪多糖 50、100、200 μg/mL 的黄芪多糖混合培养液 200 μL。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖 采用 MTT 法检测细胞增殖,选取对数生长期 HT-29 细胞,以 2 × 10⁴ 个/mL 的浓度接种于 96 孔板中培养,每孔 200 μL,共接种 4 块板,于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h 待

细胞完全贴壁后,按照倍比稀释方法,将细胞培养基更换为终浓度为 75、125、250、500、1 000 μg/mL 的黄芪多糖混合培养液 200 μL,对照组为不含黄芪多糖的培养液 200 μL,根据浓度不同将实验分为 6 组,每组样本设置 5 个副孔,其中 1 个副孔为只加培养液不含细胞的空白对照用以排除试剂对实验结果的影响,分别在培养 0、24、48、72 h 各取出 1 块 96 孔板每孔加入 MTT 液 25 μL(5 mg/mL),将该 96 孔板继续孵育 4 h 后每孔加入 DMSO 液 200 μL,酶标仪上在 490 nm 波长下检测各组样本吸光度值,分别记录 4 块板上各组细胞的吸光度值,根据吸光度值绘制生长增殖曲线。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 采用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit)流式细胞仪检测细胞凋亡,选取对数生长期 HT-29 细胞,根据细胞分组情况对各组细胞进行处理,收取各组细胞样本,磷酸盐缓冲液(PBS)液漂洗后使用胰蛋白酶消化,加入 PBS 反复漂洗,轻轻吹打制备单细胞悬液,细胞计数浓度约为 1 × 10⁶ 个/mL,离心收取细胞沉淀后使用 500 μL 固定液固定,依次加入 Annexin V-FITC 5 μL、PI 10 μL,混匀后室温条件下避光孵育 10~15 min,流式细胞仪检测。

1.2.4 细胞周期检测 采用 PI 周期检测试剂盒流式细胞仪检测细胞周期,细胞处理同凋亡检测,在 6 孔板内培养细胞,对照组加入 2 mL 培养液;黄芪多糖组加入 2 mL 终浓度为 100 μg/mL 黄芪多糖混合培养液,48 h 后收集细胞加入细胞周期检测试剂盒溶液 A 250 μL,充分混匀后室温条件下孵育 10 min,然后加入溶液 B 200 μL,继续室温孵育 10 min 后加入预冷的 C 液 200 μL,避光条件下冰浴 10 min,流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件及 GraphPad Prism 软件对实验数据进行记录及统计,实验结果均重复 3 次,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪多糖抑制 HT-29 细胞增殖

2.1.1 黄芪多糖抑制 HT-29 细胞增殖的半数致死量(IC₅₀) 检测 24 h 黄芪多糖对 HT-29 细胞增殖的抑制作用,MTT 法检测结果显示,与对照组比较,黄芪多糖在 75 μg/mL 以上时,对 HT-29 细胞具有较明显的抑制增殖作用,且当其浓度大于 200 μg/mL 时,24 h 细胞存活率低于 25%,由 Graphpad 软件求得其 IC₅₀ 值为 92.49 μg/mL(图 1),其 95% 可信区间(CI)为 78.32~109.20 μg/mL,故选择黄芪多糖 50、100、200 μg/mL 为实验分组浓度。

2.1.2 不同浓度黄芪多糖对 HT-29 细胞增殖能力的影响 对照组及黄芪多糖 A、B、C 组分别在培养第 0、24、48、72 h 时应用 MTT 法检测黄芪多糖对 HT-29 细胞增殖的抑制作用,结果显示黄芪多糖可抑制人结肠癌细胞 HT-29 的增殖,且当浓度小于 200 μg/mL 时,随着黄芪多糖浓度的增高其抑制增殖作用增

强,抑制作用呈剂量依赖型,见图 2。

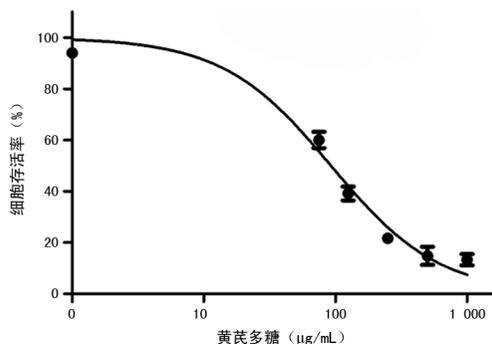
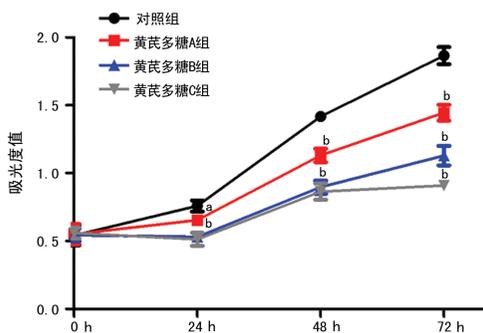


图 1 黄芪多糖抑制 HT-29 细胞增殖的 IC₅₀



a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$, 与对照组比较

图 2 各组 HT-29 细胞增殖能力比较

2.2 黄芪多糖促进 HT-29 细胞凋亡 在培养第 48 h 时 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率,与对照组比较,黄芪多糖 A 组仅晚期凋亡率差异有统计学意义($P < 0.05$);而黄芪多糖 B、C 组早期凋亡率及晚期凋亡率差异均有统计学意义($P < 0.05$),且晚期凋亡率均明显增高($P < 0.01$),见表 1。

表 1 黄芪多糖对 HT-29 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	早期凋亡率(%)	晚期凋亡率(%)
对照组	1.39 ± 1.04	5.25 ± 1.33
黄芪多糖 A 组	2.63 ± 2.19	15.10 ± 3.47 ^a
黄芪多糖 B 组	4.94 ± 1.86 ^a	25.40 ± 3.11 ^b
黄芪多糖 C 组	6.93 ± 2.78 ^a	34.70 ± 3.94 ^b

a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$, 与对照组比较

2.3 黄芪多糖对 HT-29 细胞具有细胞周期阻滞作用 培养 48 h,与对照组比较,黄芪多糖组 HT-29 细胞 G₀/G₁ 期细胞数目增加($P = 0.0186$),S 期细胞数量明显减少($P = 0.0087$),G₂/M 期细胞数目无明显变化($P > 0.05$),见表 2。

表 2 两组 HT-29 细胞周期细胞数量比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	G ₀ /G ₁ (%)	S(%)	G ₂ /M(%)
对照组	65.30 ± 4.71	32.70 ± 2.31	2.01 ± 1.49
黄芪多糖组	77.40 ± 2.78 ^a	20.90 ± 3.58 ^a	1.80 ± 2.61

a: $P < 0.05$, 与对照组比较

3 讨论

现代中医认为大肠癌发生主要由外感六淫、饮食不节、情志失调所导致的正气亏虚、气血失调、毒邪蕴

结大肠而导致,晚期大肠癌常表现为脾肾亏虚、气血不足,术后气血两虚,化疗使患者脾气不足是大肠癌患者症状难以改善的根本^[8]。研究证实,内服中药对大肠癌临床症状的缓解及化疗毒副作用的减轻有明确疗效,临床治疗大肠癌常用枳实消痞丸、参苓白术汤等经方,亦使用康艾注射液、康莱特注射液等中成药注射液,扶正的同时兼顾攻邪,健脾益气,在这方面取得了确切的治疗效果^[9]。中医外治法作为内服中药的补充可通过局部给药直达病灶局部,达到缓解大肠癌患者便秘、便血、肠胀气等并发症的目的,同时可以缩小肿瘤大小达到治疗效果。中药灌肠、针灸疗法、穴位注射、中药外涂、中药坐浴、热奄包、封包等在临床上广泛用于大肠癌的中医外治^[9]。

黄芪性喜凉爽,耐寒耐旱,产于内蒙古、山西、甘肃、黑龙江等地,属补气良药,以补虚为主,可有效增强机体免疫功能,有保肝利尿、抗衰老、抗应激、降压以及广谱抗菌功效^[10],黄芪多糖是黄芪的主要生物学活性成分,其组成为多糖和黄芪苷,黄芪苷分为黄芪苷 I、黄芪苷 II、黄芪苷 IV,其中生物活性最好的是黄芪苷 IV 即黄芪甲苷,黄芪甲苷能增强机体免疫力、提高机体的抗病能力及抗肿瘤功效,有研究证实,黄芪甲苷对结肠癌^[11-12]、乳腺癌^[13]、胃癌^[14]、宫颈癌^[15]、肝癌^[16]、胰腺癌^[17] 等癌症都有治疗作用。黄芪可以通过影响细胞周期相关蛋白的表达,阻滞细胞增殖周期,抑制肿瘤细胞增殖^[18];黄芪还可以影响细胞凋亡信号转导途径,促进肿瘤细胞凋亡^[19];黄芪亦可通过调控癌基因及抑癌基因表达抑制肿瘤细胞增殖、转移起到抗肿瘤目的;其抗氧化应激功效可有效清除和抑制自由基,逆转肿瘤化疗耐药及辅助化疗药物抗肿瘤治疗等。

王倩竹等^[20]通过 90 例结直肠癌患者治疗研究比较认为中药对方(黄芪、角针)对结直肠癌患者术后肠道屏障功能损害有一定的保护作用,在肠功能恢复、减轻毒素吸收和降低致炎因子水平方面可能优于西药;阎月君等^[2]通过体外实验的方法得出结论认为黄芪多糖对结肠癌细胞 SW620 具有明显的抑制增殖和诱导凋亡作用,其诱导凋亡机制可能是通过线粒体凋亡通路实现;有研究证实黄芪甲苷在结肠癌的治疗中能够通过抑制自噬增强西妥昔单抗(CTX)的抗肿瘤细胞增殖作用。

本研究应用药物不同浓度梯度抑制 HT-29 细胞增殖,计算出黄芪多糖抑制 HT-29 细胞增殖的 IC₅₀,而后根据 IC₅₀ 值设置不同的黄芪多糖浓度作为实验分组,通过 MTT 实验,检测不同浓度黄芪多糖对 HT-29 细胞增殖能力的影响;利用流式细胞仪分别检测不同浓度黄芪多糖对 HT-29 细胞凋亡及周期的影响。结果表明:黄芪多糖抑制人结肠癌细胞 HT-29 的增殖,当浓度小于 200 μg/mL 时,随着黄芪多糖浓度的增高其抑制增殖作用增强,抑制作用呈剂量依赖型;黄芪多糖可以促进 HT-29 细胞凋亡,黄芪多糖使 HT-29 细胞的生长停滞在 G₁ 期,说明黄芪多糖对

HT-29 细胞具有周期阻滞作用,其主要为 G₁ 期阻滞。

本研究通过计算黄芪多糖作用于 HT-29 细胞的 IC₅₀,在结肠癌 HT-29 细胞系中证实了黄芪的抗肿瘤作用,研究结果认为,黄芪治疗结肠癌的抗肿瘤机制是黄芪多糖可使结肠癌 HT-29 细胞增殖受到抑制,细胞凋亡增加,细胞阻滞于 G₁ 期。本研究为黄芪多糖用于结肠癌治疗可提供新的理论依据,并为进一步研究打下基础。

参考文献

- [1] 张彩霞,江滨. 中医药干预大肠癌转移、复发的研究进展[J]. 中医药导报,2018,24(2):107-109,117.
- [2] 阎力君,洪涛,雒江菡,等. 黄芪多糖对结肠癌 SW620 细胞增殖及凋亡作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(22):97-101.
- [3] WANG Y, AUYEUNG K K, ZHANG X, et al. Astragalus saponins modulates colon cancer development by regulating calpain-mediated glucose-regulated protein expression[J]. BMC Complement Altern Med,2014(14):401.
- [4] 黄晓伟,沈克平,胡兵. 中医药对大肠癌多药耐药作用及机制[J]. 中华中医药学刊,2018,36(4):894-897.
- [5] 龚时夏,薛青,尤建良. 加味黄芪桂枝五物汤治疗大肠癌 XELOX 所致周围神经毒性及手足综合征的疗效观察[J]. 中医药导报,2018,24(2):102-103,128.
- [6] 朱燕辉,严奉祥. 黄芪甲苷及其生物学活性[J]. 现代生物医学进展,2008,8(4):781-783.
- [7] 周丹,王杏娥,曾祥平. 黄芪皂苷、多糖及黄酮在抗细胞凋亡方面的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2011,11(增刊 1):4687-4689,4724.
- [8] 王菁雯,沈克平,胡兵. 中医药对大肠癌信号通路的调控作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(1):227-234.
- [9] 张念华,陈高峰,李寿杰,等. 中成药逆转人结肠癌细胞株对化疗药物耐药的研究[J]. 新中医,2017,49(2):11-14.
- [10] 王瑞海,叶迎,许京,等. 甘肃红芪和黄芪总多糖含量测定对比[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(22):77-83.
- [11] TSENG A, YANG C H, CHEN C H, et al. An in vivo

molecular response analysis of colorectal cancer treated with Astragalus membranaceus extract[J]. Oncol Rep, 2016,35(2):659-668.

- [12] XIE T, LI Y, LI S L, et al. Astragaloside IV enhances cisplatin chemosensitivity in human colorectal cancer via regulating NOTCH3[J]. Oncol Res, 2016, 24(6):447-453.
- [13] ZHOU R, CHEN H, CHEN J, et al. Extract from Astragalus membranaceus inhibit breast cancer cells proliferation via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. BMC Complement Altern Med,2018,18(1):83.
- [14] WANG T, XUAN X, LI M, et al. Astragalus saponins affect proliferation, invasion and apoptosis of gastric cancer BGC-823 cells[J]. Diagn Pathol,2013,8(1):179.
- [15] ZHAI Q L, HU X D, XIAO J, et al. Astragalus polysaccharide may increase sensitivity of cervical cancer HeLa cells to cisplatin by regulating cell autophagy[J]. China J Chin Mater Med,2018,43(4):805-812.
- [16] 彭建新,何军明,蔡炳勤,等. 扶正抑瘤汤对肝癌细胞侵袭转移能力影响的研究[J]. 中国医药导报,2018,15(10):25-28.
- [17] WU J, WANG J, SU Q, et al. Traditional Chinese medicine Astragalus polysaccharide enhanced antitumor effects of the angiogenesis inhibitor apatinib in pancreatic cancer cells on proliferation, invasiveness, and apoptosis[J]. Onco Targets Ther,2018,11:2685-2698.
- [18] 郑学芝,李佳,王志刚,等. 黄芪多糖对 COLO205 人结肠癌细胞株抑制作用研究[J]. 中国食物与营养,2012,18(8):68-70.
- [19] 张宝明,黎成金,王烈. 黄芪注射液诱导人结肠癌 Lovo 细胞凋亡机制的研究[J]. 现代中西医结合杂志,2009,18(17):1987-1989.
- [20] 王倩竹,陈小平,黄建平,等. 黄芪、角针药对方对结肠直肠癌患者术后肠道屏障功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2015,35(11):1307-1312.

(收稿日期:2018-11-28 修回日期:2019-04-01)

(上接第 2898 页)

- [17] CALISKAN M, MOGULKOC R, BALTACI A K. The effect of 3',4'-dihydroxyflavonol on lipid peroxidation in rats with cerebral ischemia reperfusion injury[J]. Neurochem Res,2016,41(7):1732-1740.
- [18] 张俐,林庆宾. 丹参及丹参酮 II A 磺酸钠对脊髓缺血再灌注损伤 IL-1 β , ICAM-1 及 MPO 表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2012(8):2042-2047.
- [19] DING Y, HUANG L, XIAN X, et al. Loss of Reelin protects against atherosclerosis by reducing leukocyte-endothelial cell adhesion and lesion macrophage accumulation[J]. Sci Signal,2016,9(419):29-38.

[20] 余义俊,王贝然,吴春华,等. 肝动脉化疗栓塞术对肝功能的影响及其相关因素分析[J]. 实用医学影像杂志,2018,19(6):465-468.

[21] 王贝然,吴春华,杜伟,等. 核因子- κ B 和炎症反应因子对经导管动脉栓塞术后肝细胞损伤的作用探讨[J]. 介入放射学杂志,2018,27(8):760-764.

[22] 李娟娟,杜伟,郭伟莲,等. 肝癌 TAE 后正常肝组织中 PPAR- α 和氧化应激指标的表达[J]. 广东医学,2019,4(4):488-492.

(收稿日期:2018-12-18 修回日期:2019-03-23)