

· 基础研究 ·

地榆皂苷 I 诱导人甲状腺乳头状癌细胞
BCPAP 凋亡的实验研究高 芸¹ 王 柯² 朱 雪² 潘 懿¹ 贾 冰¹

摘要 **目的** 研究地榆皂苷 I 对人甲状腺乳头状癌 BCPAP 细胞作用及相关的分子机制。**方法** MTT 法检测地榆皂苷 I 对 BCPAP 细胞增殖的作用; Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡; Western blot 法检测凋亡相关蛋白表达水平; JC-1 染色检测线粒体膜电位; 试剂盒检测 Caspase 活性。**结果** 地榆皂苷 I 对 BCPAP 细胞增殖有显著抑制作用, 且呈浓度依赖性 ($P < 0.05$), IC_{50} 为 $28.99 \mu\text{mol/L}$ 。地榆皂苷 I 可显著诱导 BCPAP 细胞凋亡, 且凋亡率随着药物浓度的升高而显著升高, 呈剂量依赖性。地榆皂苷 I 可提高 Bax/Bcl-2 比率, 降低线粒体膜电位, 促使细胞色素 C 从线粒体内的释放, 提高 Caspase-9 和 Caspase-3 活性。**结论** 地榆皂苷 I 通过激活线粒体通路导致人甲状腺乳头状癌 BCPAP 细胞增殖受到抑制并诱导细胞凋亡。

关键词 地榆皂苷 I; 甲状腺乳头状癌; BCPAP 细胞; 凋亡

Ziyuglycoside I Induced Apoptosis of Human Thyroid Papillary Carcinoma BCPAP Cells GAO Yun¹, WANG Ke², ZHU Xue², PAN Yi¹, and JIA Bing¹ 1 Department of Internal Medicine, Jiangyuan Hospital Affiliated to Jiangsu Institute of Atomic Medicine, Jiangsu (214063); 2 Key Laboratory of Nuclear Medicine, Ministry of Health/Jiangsu Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Jiangsu Institute of Atomic Medicine, Jiangsu (214063)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects and underlying molecular mechanisms of Ziyuglycoside I (Z I) on human thyroid papillary carcinoma BCPAP cells. **Methods** The proliferation inhibitory of Z I on BCPAP cells was detected by MTT assay. Cell apoptosis was detected by flow cytometry with double staining of Annexin V/PI. The expression levels of apoptosis-related proteins were performed by Western blot. Mitochondrial membrane potential (MMP) was detected by flow cytometry with JC-1 staining. Caspase activity was detected by reagent kit. **Results** Z I significantly inhibited the proliferation of BCPAP cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$, IC_{50} value: $28.99 \mu\text{mol/L}$). Z I could positively induce BCPAP cell apoptosis in a dose-dependent manner. Z I could increase Bax/Bcl-2 ratio, decrease the level of MMP, promote the release of cytochrome C from mitochondria, and elevate activities of Caspase-3 and Caspase-9. **Conclusion** Z I could inhibit the proliferation of human thyroid papillary carcinoma BCPAP cells through activating mitochondria-dependent pathway and induce cell apoptosis.

KEYWORDS Ziyuglycoside I; thyroid papillary carcinoma; BCPAP cell; apoptosis

甲状腺癌是目前内分泌系统最常见的恶性肿瘤, 约占人体所有肿瘤的 1.3%^[1], 目前中国的平均甲状腺癌发病率约为 7.7/10 万, 高于世界平均发病率, 且呈逐年快速上升趋势^[1,2]。其中以乳头状癌发病最为

常见, 约占甲状腺肿瘤的 88%^[3]。目前甲状腺癌的治疗方法主要是外科手术、¹³¹I 放射治疗、TSH 抑制治疗等, 部分甲状腺乳头状癌患者经治疗复发后, 不易再次手术, 或对放射性碘及化疗药无效, 因此积极探求新的治疗方法具有现实意义。目前已有报道证实地榆皂苷 II 可抑制多种肿瘤细胞的生长^[4,5], 而地榆皂苷类化合物对人甲状腺癌细胞的作用尚未见相关报道。本研究以人甲状腺乳头状癌细胞 BCPAP 为研究对象, 观察地榆皂苷 I 对其增殖抑制及凋亡诱导的作用, 并初步探讨相关的分子机制, 为甲状腺乳头状癌的临床治

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81300787)

作者单位: 1. 江苏省原子医学研究所附属江原医院内科 (江苏 214063); 2. 江苏省原子医学研究所, 卫生部核医学重点实验室/江苏省分子核医学重点实验室 (江苏 214063)

通讯作者: 潘懿, Tel: 15161536205, E-mail: panyi@jsinm.org

DOI: 10.7661/j.cjim.20170630.149

疗开拓新的思路。

材料与方法

1 细胞 人甲状腺癌细胞系 BCPAP 购于上海生命科学院细胞和生物化学研究所。

2 试剂及仪器 地榆皂苷 I 购于国家标准物质中心,以 DMSO 为溶液溶解后储存备用;DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;二甲亚砜 (DMSO)、胰蛋白酶、四氮唑溴盐 (MTT)、JC-1 检测试剂盒购自美国 Sigma 公司;Annexin V/PI 双染试剂盒购自美国 BD 公司;ApoAlert 细胞分级分离试剂盒购于美国 Clontech 公司;Bax、Bcl-2、细胞色素 C、 β -actin 抗体购自美国 Cell Signaling 公司;ECL 发光检测试剂盒,BCA 法蛋白定量试剂盒和羊抗鼠辣根过氧化物酶标记的二抗购自碧云天生物技术公司。Caspase 活性检测试剂盒购自 R&D 公司,其余试剂均为国产分析纯。JY3002 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司),DNP-9162 型电热恒温培养箱 (上海精宏设备有限公司),蛋白电泳转移系统 (美国 Bio-RAD),流式细胞仪 (BD 生命科学公司),酶标仪 (瑞士 TECAN 集团公司)。

3 方法

3.1 MTT 法测定细胞存活率 将细胞以 5×10^3 /孔接种于 96 孔细胞培养板,37 °C 培养 24 h 后,加入地榆皂苷 I (终浓度为 3.125、6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$),同时设定阴性对照组 (接种相同浓度的细胞,加入 DMEM 培养基) 及 DMSO 对照组 (1% DMSO 浓度)。作用 24 h 后,每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL),37 °C 孵育 4 h。每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min,使用酶标仪,在 490 nm 波长测定各孔的吸光值 (A)。细胞抑制率 (%) = $(1 - \text{药物组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。

3.2 Annexin V/PI 双染法测定细胞凋亡 将细胞以 1×10^5 /孔接种于 6 孔细胞培养板中,加入地榆皂苷 I (终浓度为 10、25、50 $\mu\text{mol/L}$),另以未加地榆皂苷 I 干预组为对照组 (接种相同浓度的细胞,加入 DMEM 培养基)。37 °C 孵育 24 h,收集细胞,用 4 °C 的 PBS 洗涤细胞 2~3 遍后,将细胞重悬于含 10 μL Annexin V 和 10 μL PI 的结合缓冲液细胞,室温避光孵育 15 min,用流式细胞仪分析,采用 Cellquest 软件分析结果。

3.3 Western blot 检测蛋白表达 将细胞以 2×10^5 /孔接种于 6 孔细胞培养板中,加入地榆皂苷 I (终浓度为 10、25、50 $\mu\text{mol/L}$),同时设置对照组 (未

加入地榆皂苷 I),37 °C 孵育 24 h,收集细胞,提取总蛋白。BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,按每孔上样量 50 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,电转移至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,一抗孵育 4 °C 过夜,二抗室温下孵育 1 h, ECL 发光,曝光显影。以 β -actin 进行标化。

3.4 线粒体膜电位 (MMP) 测定 将细胞以 1×10^5 /孔接种于 6 孔细胞培养板中,加入地榆皂苷 I (终浓度为 10、25、50 $\mu\text{mol/L}$),以未加地榆皂苷 I 干预组为对照组,37 °C 孵育 24 h,收集细胞,重悬于 JC-1 (25 $\mu\text{mol/L}$) 染液,37 °C 孵育 30 min,流式细胞仪检测^[6]。

3.5 细胞色素 C 释放检测 将细胞以 2×10^5 /孔接种于 6 孔细胞培养板中,加入地榆皂苷 I (终浓度为 10、25、50 $\mu\text{mol/L}$),另以未加地榆皂苷 I 干预组为对照组 (接种相同浓度的细胞,加入 DMEM 培养基),37 °C 孵育 24 h,同时设置阴性对照,采用 ApoAlert 细胞分级分离试剂盒分离线粒体和胞浆蛋白,采用 Western blot 检测线粒体及胞浆内细胞色素 C 含量^[7]。线粒体内细胞色素 C 含量以 prohibitin 为内参,胞浆内细胞色素 C 含量以 β -actin 为内参。

3.6 Caspase 活性检测 将细胞以 5×10^4 /孔接种于 6 孔细胞培养板中,加入地榆皂苷 I (终浓度为 10、25、50 $\mu\text{mol/L}$),以未加地榆皂苷 I 干预组为对照组 (接种相同浓度的细胞,加入 DMEM 培养基),37 °C 孵育 24 h,收集细胞,离心弃上清,加入细胞裂解液,重悬,冰浴裂解 15 min,4 °C 离心,分离上清,分别加入 Caspase 特异性底物 (Caspase-3: Ac-DEVD-pNA; Caspase-9: Ac-LEHD-pNA),混匀,37 °C 孵育 1 h,使用酶标仪,在 405 nm 波长测定各孔的吸光值 (A)。Caspase 活性 (%) = $\text{药物组 A 值} / \text{对照组 A 值} \times 100\%$ ^[8]。

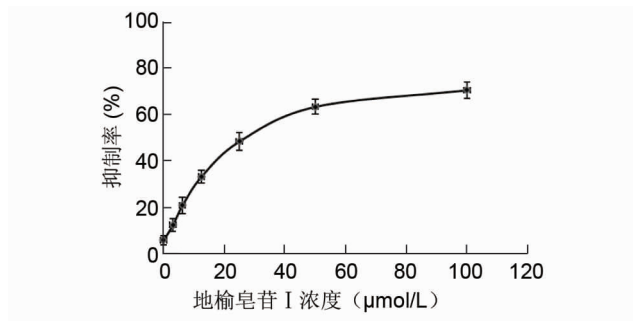
3.7 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 地榆皂苷 I 对 BCPAP 细胞增殖的影响 (图 1) 阴性对照组及 DMSO 对照组的细胞抑制率相等,可排除溶剂对后续实验的影响。与阴性对照组比较,地榆皂苷 I 能显著抑制 BCPAP 细胞的增殖;抑制作用呈浓度依赖性 ($P < 0.05$)。地榆皂苷 I 对 BCPAP 细胞半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 28.99 $\mu\text{mol/L}$ 。

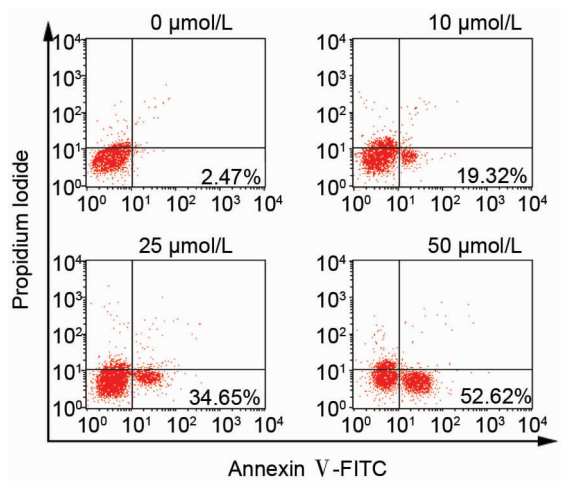
2 地榆皂苷 I 对 BCPAP 细胞凋亡的影响 (图

2) 不同浓度(10、25、50 $\mu\text{mol/L}$)地榆皂苷 I 诱导的细胞凋亡率分别为 $21.82\% \pm 3.76\%$ 、 $37.63\% \pm 4.26\%$ 和 $54.97\% \pm 3.84\%$, 高于未加入地榆皂苷 I 干预的对照组细胞凋亡率 ($3.17\% \pm 0.78\%$, $P < 0.01$), 且凋亡率呈剂量依赖性。



注:0 $\mu\text{mol/L}$ 即未加入地榆皂苷 I 干预的对照组

图1 地榆皂苷 I 对 BCPAP 细胞增殖的影响



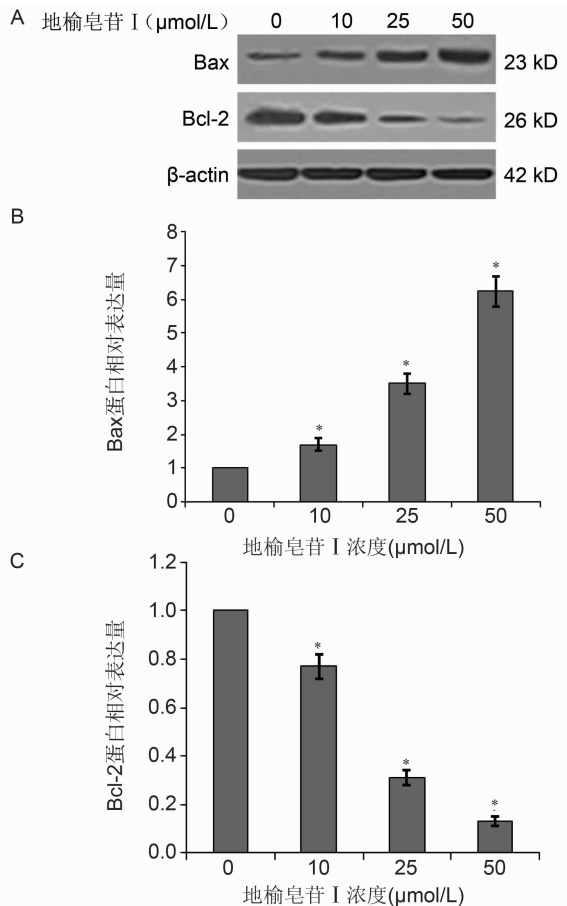
注:0 $\mu\text{mol/L}$ 即未加入地榆皂苷 I 干预的对照组

图2 地榆皂苷 I 对 BCPAP 细胞凋亡的影响

3 地榆皂苷 I 对凋亡相关蛋白表达的影响 (图3) 与对照组比较,经地榆皂苷 I 处理后,Bax 的表达量明显升高 ($P < 0.01$),Bcl-2 的表达量显著下降 ($P < 0.01$),且随着地榆皂苷 I 浓度升高呈显著的剂量依赖关系。

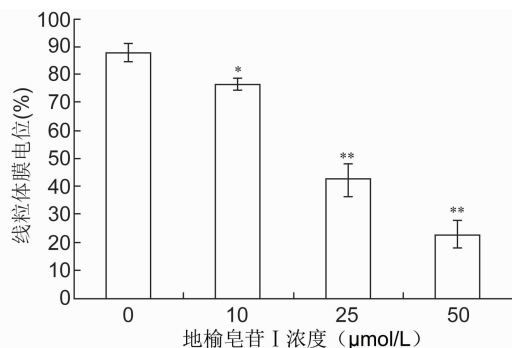
4 地榆皂苷 I 对 MMP 的影响 (图4) 不同浓度的地榆皂苷 I (终浓度为 10、25、50 $\mu\text{mol/L}$) 处理 BCPAP 细胞后,与对照组比较,细胞 MMP 显著下降,且呈剂量依赖性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

5 地榆皂苷 I 对线粒体细胞色素 C 释放的影响 (图5) 经地榆皂苷 I 处理后,线粒体内细胞色素 C 含量显著降低 ($P < 0.01$),胞浆内细胞色素 C 含量显著升高 ($P < 0.01$),且呈剂量依赖性。



注:0 $\mu\text{mol/L}$ 即未加入地榆皂苷 I 干预的对照组;A 为各浓度地榆皂苷 I 处理组与对照组 Bax 及 Bcl-2 蛋白电泳图;B 为 Bax 蛋白相对表达水平;C 为 Bcl-2 蛋白相对表达水平;与对照组比较, * $P < 0.01$

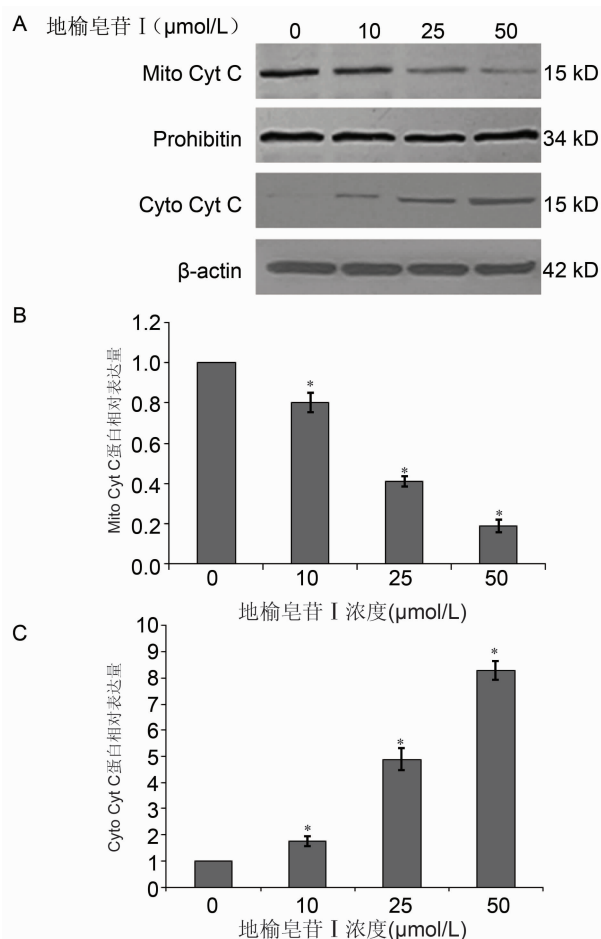
图3 地榆皂苷 I 对凋亡相关蛋白表达的影响



注:0 $\mu\text{mol/L}$ 即未加入地榆皂苷 I 干预的对照组;与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

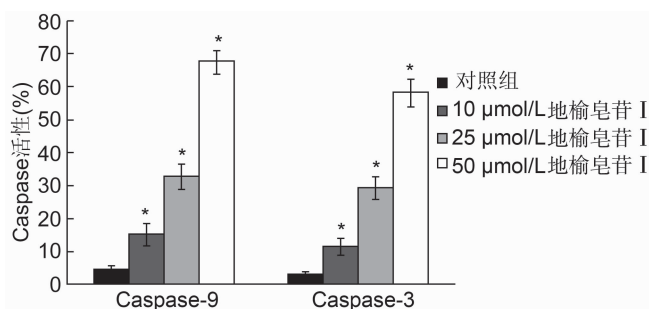
图4 地榆皂苷 I 对 BCPAP 细胞线粒体膜电位的影响

6 地榆皂苷 I 对 Caspase 活性的影响 (图6) Caspase 活性测定显示地榆皂苷 I 能显著提高 Caspase-9 和 Caspase-3 的活性,且呈剂量依赖性。与对照组比较,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。



注: Mito Cyt C 为线粒体内细胞色素 C; Cyto Cyt C 为胞浆内细胞色素 C; 0 $\mu\text{mol/L}$ 即未加入地榆皂苷 I 干预的对照组; A 为各浓度地榆皂苷 I 处理组与对照组 Mito Cyt C 及 Cyto Cyt C 蛋白电泳图; B 为 Mito Cyt C 蛋白相对表达水平; C 为 Cyto Cyt C 蛋白相对表达水平, 与对照组比较, $*P < 0.01$

图 5 地榆皂苷 I 对细胞色素 C 释放的影响



注: 与对照组比较, $*P < 0.01$

图 6 地榆皂苷 I 激活 Caspase-9 和 Caspase-3

讨论

在肿瘤治疗中, 化疗药物由于严重的不良反应及耐药性, 其临床应用受到越来越多的限制。近年来, 来源于中药的天然产物由于性质温和, 不良反应小, 逐渐

引起人们的关注。部分来源于中药的天然化合物已被证实具有抗肿瘤作用, 基于其显著的疗效及相对小的不良反应, 被广泛应用于临床抗肿瘤的治疗, 其中长春新碱、羟喜树碱等天然产物已成为抗肿瘤治疗的一线药物^[9,10]。地榆是广泛分布于中国的蔷薇科植物地榆或长叶地榆的干燥根^[11-13]。地榆皂苷是地榆中最主要的三萜皂苷类活性成分, 主要分为地榆皂苷 I 和地榆皂苷 II。药理学研究表明, 地榆皂苷具有良好的止血, 消炎抗菌、抗氧化及抗过敏等作用^[14], 而地榆皂苷的抗肿瘤作用近年来也逐渐成为研究的热点。目前已有研究证实地榆皂苷类化合物可通过介导多种信号通路抑制胃癌及乳腺癌细胞的增殖, 具有抗肿瘤作用^[4-5,7,15]。目前有报道证实, 地榆类化合物可以通过激活 ROS/JNK 信号通路及线粒体通路促进乳腺癌细胞凋亡^[4,7,15]。另有报道证实, 地榆类化合物在胃癌细胞中也发挥作用, 在胃癌细胞 BGC-823 细胞中, 其通过调节 Bax/Bcl-2 蛋白表达及激活 Caspase-3 通路促进细胞凋亡^[5]。然而目前地榆类化合物对甲状腺癌的作用还未有相关报道。本实验证实, 相较于其他肿瘤细胞, 在甲状腺乳头状癌细胞 BCPAP 中, 地榆皂苷类化合物地榆皂苷 I 同样具有显著的抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的作用, 且呈剂量依赖性。另外, 本研究进一步探讨了地榆皂苷 I 诱导甲状腺乳头状癌细胞凋亡的相关分子机制。

肿瘤治疗最本质的策略是诱导肿瘤细胞的凋亡。凋亡即程序性细胞死亡, 是一个被多基因精细调控的细胞主动和有序的死亡过程, 目前经典的凋亡途径有两条, 即死亡受体通路和线粒体通路, 本研究主要着重于对线粒体通路的研究。促凋亡蛋白 Bax 及凋亡抑制蛋白 Bcl-2 都属于 Bcl-2 家族, 为线粒体通路激活的关键分子, 其表达比率的上调可诱导细胞色素 C 自线粒体的释放及 Caspase 蛋白酶级联反应的激活, 从而启动肿瘤细胞凋亡^[16-18]。本实验发现经地榆皂苷 I 作用后 Bax 表达量明显上升、Bcl-2 表达量显著下降, Bax/Bcl-2 比率上升, 细胞凋亡增加, 证实 Bax 和 Bcl-2 为地榆皂苷 I 诱导甲状腺乳头状癌细胞凋亡的关键分子。另外, 细胞凋亡早期, 线粒体结构会发生显著变化, 如线粒体通透性增加、跨膜电位下降等。线粒体膜电位的下降可促使细胞色素 C 从线粒体内释放至胞浆中, 在 dATP 存在下与 Apaf-1 结合形成多聚体, 激活 Caspase-9, 继而活化下游效应器 Caspase-3, 启动 Caspase 的级联反应, 导致细胞凋亡过程中的一系列形态和生化特征, 如染色质凝聚、DNA 片段化、核膜崩解、磷脂酰丝氨酸的外翻等^[19,20]。本研究

发现甲状腺乳头状癌细胞经地榆皂苷 I 作用后细胞线粒体膜电位下降, 细胞色素 C 从线粒体释放到胞浆中, Caspase-9 和 Caspase-3 被激活, 从而发生凋亡。研究结果进一步证实线粒体通路激活是地榆皂苷 I 诱导甲状腺乳头状癌细胞凋亡的主要机制之一。

综上所述, 地榆皂苷 I 能有效抑制甲状腺乳头状癌细胞 BCPAP 的增殖, 并通过激活线粒体通路诱导细胞凋亡。本研究为甲状腺乳头状癌新治疗手段的开拓提供了新的思路, 为来源于中药的天然产物应用于甲状腺乳头状癌的治疗提供了有力的实验依据。

参 考 文 献

- [1] Shirazi HA, Hedayati M, Daneshpour MS, et al. Analysis of loss of heterozygosity effect on thyroid tumor with oxyphilia cell locus in familial non-medullary thyroid carcinoma in Iranian families[J]. Indian J Hum Genet, 2012, 18(3): 340-343.
- [2] 孙嘉伟, 许晓君, 蔡秋茂, 等. 中国甲状腺癌发病趋势分析[J]. 中国肿瘤, 2013, 22(9): 690-693.
- [3] Fassnacht M, Kreissl MC, Weismann D, et al. New targets and therapeutic approaches for endocrine malignancies[J]. Pharmacol Ther, 2009, 123(1): 117-141.
- [4] Zhu X, Wang K, Zhang K, et al. Ziyuglycoside II inhibits the growth of human breast carcinoma MDA-MB-435 cells via cell cycle arrest and induction of apoptosis through the mitochondria dependent pathway[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(9): 18041-18055.
- [5] Zhu AK, Zhou H, Xia JZ, et al. Ziyuglycoside II-induced apoptosis in human gastric carcinoma BGC-823 cells by regulating Bax/Bcl-2 expression and activating Caspase-3 pathway[J]. Braz J Med Biol Res, 2013, 46(8): 670-675.
- [6] Huang HC, Liu WT, Hua KS, et al. α -Carboline derivative TJY-16 inhibits tumor growth by inducing G₂/M cell cycle arrest in glioma cells[J]. J Biomed Sci, 2016, 23:10.
- [7] Zhu X, Wang K, Zhang K, et al. Ziyuglycoside I inhibits the proliferation of MDA-MB-231 breast carcinoma cells through inducing p53-mediated G₂/M cell cycle arrest and intrinsic/extrinsic apoptosis[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(11): E1903.
- [8] Jiang Q, Li Q, Chen H, et al. *Scutellaria barbata* D. Don inhibits growth and induces apoptosis by suppressing IL-6-inducible STAT3 pathway activation in human colorectal cancer cells[J]. Exp Ther Med, 2015, 10(4): 1602-1608.
- [9] Lee SM, Li ML, Tse YC, et al. *Paeoniae Radix*, a Chinese herbal extract, inhibit hepatoma cells growth by inducing apoptosis in a p53 independent pathway[J]. Life Sci, 2002, 71(19): 2267-2277.
- [10] Kim S, Choi JH, Kim JB, et al. Berberine suppresses TNF-alpha-induced MMP-9 and cell invasion through inhibition of AP-1 activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells[J]. Molecules, 2008, 13(12): 2975-2985.
- [11] Cai Z, Li W, Wang H, et al. Anti-tumor and immunomodulating activities of a polysaccharide from the root of *Sanguisorba officinalis* L[J]. Int J Biol Macromol, 2012, 51(4): 484-488.
- [12] Wang Z, Loo WT, Wang N, et al. Effect of *Sanguisorba officinalis* L. on breast cancer growth and angiogenesis[J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16(Suppl 1): S79-S89.
- [13] Choi ES, Kim JS, Kwon KH, et al. Methanol extract of *Sanguisorba officinalis* L. with cytotoxic activity against PC3 human prostate cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2012, 6(3): 670-674.
- [14] Kim YH, Chung CB, Kim JG, et al. Anti-wrinkle activity of Ziyuglycoside I isolated from *Sanguisorba officinalis* root extract and its application as a cosmeceutical ingredient[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2008, 72(2): 303-311.
- [15] Zhu X, Wang K, Zhang K, et al. Ziyuglycoside II induces cell cycle arrest and apoptosis through activation of ROS/JNK pathway in human breast cancer cells[J]. Toxicol Lett, 2014, 227(1): 65-73.
- [16] Neitemeier S, Jelinek A, Laino V, et al. BID links ferroptosis to mitochondrial cell death pathways[J]. Redox Biol, 2017, 12: 558-570.
- [17] Campbell S, Thibault J, Mehta N, et al. Structural insight into BH3 domain binding of vaccinia virus antiapoptotic F1L[J]. J Virol, 2014, 88(15): 8667-8677.
- [18] Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak[J]. Science, 2007, 315(5813): 856-859.
- [19] Zhou M, Li Y, Hu Q, et al. Atomic structure of the apoptosome: mechanism of cytochrome c- and dATP-mediated activation of Apaf-1[J]. Genes Dev, 2015, 29(22): 2349-2361.
- [20] Wu CC, Lee S, Malladi S, et al. The Apaf-1 apoptosome induces formation of Caspase-9 homo- and heterodimers with distinct activities[J]. Nat Commun, 2016, 7: 13565.

(收稿:2015-12-12 修回:2017-06-10)

责任编辑:李焕荣

英文责编:张晶晶