

重楼皂苷 I 通过 PI3K/Akt 途径诱导胰腺癌 PANC-1 细胞凋亡的研究

江 皓¹, 赵鹏军², 马胜林³

(1. 浙江医院, 浙江 杭州 310013; 2. 杭州市肿瘤医院, 浙江 杭州 310002;

3. 杭州市第一人民医院, 浙江 杭州 310006)

摘要: [目的] 评价重楼皂苷 I 对胰腺癌 PANC-1 细胞增殖和凋亡的影响。[方法] 以体外培养的胰腺癌 PANC-1 细胞为研究对象, MTT 法检测重楼皂苷 I 对 PANC-1 细胞增殖的抑制作用, Annexin-V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡, Western Blot 法检测 PI3K、Akt、pAkt、Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达改变。[结果] 不同浓度重楼皂苷 I 能有效抑制 PANC-1 细胞的增殖, 且呈时间浓度依赖性 ($P < 0.01$)。低、中、高浓度重楼皂苷 I 作用 PANC-1 细胞 24、48h 后, 细胞凋亡率明显增加, 与对照组相比, 具有统计学差异 ($P < 0.01$)。2 $\mu\text{g/ml}$ 重楼皂苷 I 作用 PANC-1 细胞 48h 后, PI3K、pAkt、Bcl-2 蛋白表达降低, caspase-3、Bax 蛋白表达增加, 与对照组相比, 具有统计学差异 ($P < 0.01$)。[结论] 重楼皂苷 I 能抑制胰腺癌 PANC-1 细胞的体外增殖, 诱导细胞凋亡, 机制可能与降低 PI3K、pAkt、Bcl-2 蛋白表达, 增加 Bax 及 caspase-3 蛋白表达有关。

关键词: 胰腺肿瘤; 重楼皂苷 I; 细胞凋亡

中图分类号: R736.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)02-0127-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.02.B010

The Effect of Paris Saponin I on Apoptosis Associating with PI3K/Akt Pathway in Pancreatic Carcinoma Cell Line PANC-1

JIANG Hao¹, ZHAO Peng-jun², MA Sheng-lin³

(1. Zhejiang Hospital, Hangzhou 310013, China; 2. Hangzhou Cancer Hospital, Hangzhou 310002, China; 3. The First People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310006, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of Paris Saponin I on proliferation and apoptosis in pancreatic carcinoma cell line PANC-1. [Methods] The effects of Paris Saponin I on cell proliferation and cell apoptosis were detected by MTT method and Annexin-V-FITC/PI respectively. The expressions of PI3K, Akt, pAkt, Bax, Bcl-2 and caspase-3 were detected by Western Blot. [Results] The growth of PANC-1 cells was inhibited by Paris Saponin I in dose-dependent and time-dependent manner. Cell apoptosis was induced significantly after treated with different concentration of Paris Saponin I at 24h and 48h ($P < 0.01$). The expression of PI3K, pAkt and Bcl-2 protein decreased, while the expressions of Bax and caspase-3 protein increased after treated with 2 $\mu\text{g/ml}$ Paris Saponin I at 48h. [Conclusion] Paris Saponin I can inhibit cell proliferation of pancreatic carcinoma cell line PANC-1 in dose-dependent and time-dependent manner and induce cell apoptosis, associating with decreasing expression of PI3K, pAkt and Bcl-2, increasing expression of Bax and caspase-3.

Subject words: pancreatic neoplasms; Paris Saponin I; apoptosis

胰腺癌是恶性程度最高的恶性肿瘤之一, 多数胰腺癌患者确诊时已属中晚期, 手术切除率低, 5 年生存率约 5%^[1]。化疗虽然是胰腺癌治疗的基石, 但其有效率低, 且容易出现耐药。从天然植物中寻找安全有效的抗肿瘤药物是当前研究的热点, 中药及其有效成分的抗肿瘤作用研究也已经取得很大进

展。本研究旨在通过重楼皂苷 I (Paris Saponin I, PSI) 作用胰腺癌 PANC-1 细胞来探讨重楼皂苷 I 对胰腺癌细胞的抑制作用及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株、实验药物和试剂

PANC-1 细胞株购自中国科学院上海细胞库,

通讯作者: 江 皓, 主治医师, 博士; 浙江医院肿瘤内科, 浙江省杭州市灵隐路 12 号 (310013); E-mail: 1980111618@163.com

收稿日期: 2013-08-14; **修回日期:** 2013-09-18

传代培养于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,5%CO₂,37℃条件下培养。重楼皂苷 I, 分子式 C₄₄H₇₀O₁₆,分子量 854,购自浙江美迪康医药有限公司,编号:111590。MTT(四甲基偶氮唑蓝)为华美生物技术有限公司产品。Annexin-V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒为美国 Becton Dickinson 公司产品。抗 PI3K、抗 Akt、抗 pAkt、抗 Bax、抗 Bcl-2、抗 caspase-3 抗体为美国 Cell Signaling 公司产品。

1.2 MTT 法检测重楼皂苷 I 对 PANC-1 细胞增殖的影响

取对数生长期状态良好的 PANC-1 细胞,调整细胞浓度为 5×10⁴ 个/ml, 每孔 100μl 接种于 96 孔板,培养 24h 后置 4℃ 5h 同步化,吸去原培养液,加入含重楼皂苷 I 浓度分别是 0、0.5、1、2、3、4、5μg/ml 的培养液, 每孔 100μl, 以培养液每孔 100μl 为对照孔,同时每个浓度组设 8 个复孔,分别培养 24、48、72h 后每孔加入 5mg/ml MTT 15μl,继续培养 4h,去上清,加入酸化异丙醇 100μl,静置 30min,待孔底褐色结晶完全溶解,酶标仪检测 570nm 处各孔吸光度值(A₅₇₀),计算各组抑制率。细胞抑制率(%)=(对照组 A₅₇₀-实验组 A₅₇₀)/对照组 A₅₇₀×100%。

1.3 Annexin-V-FITC/PI 双染法检测重楼皂苷 I 对 PANC-1 细胞凋亡的作用

调整 PANC-1 细胞浓度为 10×10⁴ 个/瓶接种于培养瓶,设对照组及低、中、高重楼皂苷 I 浓度组(1、2、4μg/ml), 对照组中加入等量含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液,分别作用 24h 和 48h,每组 3 个样本。收集细胞,加入 5μl FITC Annexin V 和 5μl PI,轻微振荡,室温下(25℃)避光孵育 15min,加入 400μl 1×Binding Buffer,流式细胞仪检测。

1.4 Western Blot 法检测 PI3K、Akt、pAkt、Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达改变

调整 PANC-1 细胞浓度为 10×10⁴ 个/瓶接种于培养瓶,分对照组及 2μg/ml 重楼皂苷 I 组,对照组中加入等量含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液,作用 48h,每组 3 个样本。收集细胞,检测 PI3K、Akt、pAkt、Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达改变。

1.5 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料采用方差分析和 *t* 检验进行各组数据的比较。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重楼皂苷 I 对 PANC-1 细胞增殖的抑制作用

不同浓度重楼皂苷 I 能有效抑制 PANC-1 细胞增殖,且随时间的延长、浓度的增加抑制率也随之增加,*F* 值分别为 111.30 和 254.36(*P* 均<0.01)(Table 1, Figure 1)。

Table 1 Cell inhibition rates of PANC-1 by PSI($\bar{x} \pm s$)

PSI(μg/ml)	Cell inhibition rate(%)		
	24h	48h	72h
0	0	0	0
0.5	7.94±0.57	14.35±1.01	20.84±1.33
1	16.48±1.05	23.91±1.36	34.64±1.46
2	22.39±1.05	47.62±1.82	56.88±3.04
3	39.14±2.91	57.33±2.14	71.22±3.20
4	52.67±2.52	67.31±1.90	79.16±3.56
5	63.56±3.60	76.69±2.64	86.17±5.26

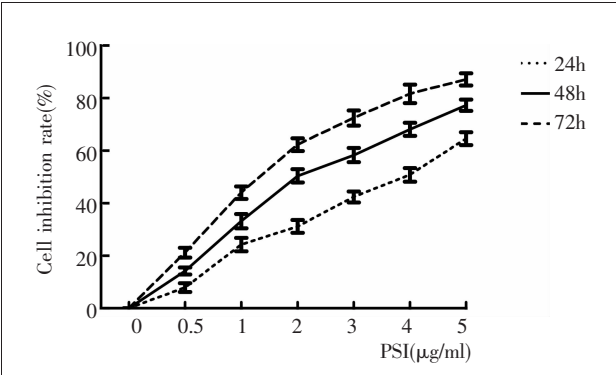


Figure 1 Cell inhibition rates of PANC-1 by PSI

2.2 重楼皂苷 I 对 PANC-1 细胞诱导凋亡的作用

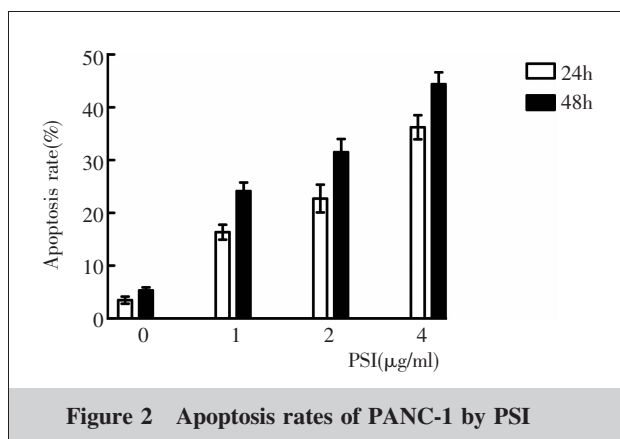
PANC-1 细胞经低、中、高浓度重楼皂苷 I 处理 24h 及 48h 后, 处理组比正常对照组凋亡明显增加, 且随时间的延长、浓度的增加抑制率也随之增加,*F* 值分别为 60.02 和 282.71(*P* 均<0.01)(Table 2, Figure 2)。

2.3 重楼皂苷 I 对 PANC-1 细胞 PI3K、Akt、pAkt、Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达的影响

PANC-1 细胞经中浓度 2μg/ml 重楼皂苷 I 处理

Table 2 Apoptosis rates of PANC-1 by PSI($\bar{x} \pm s$)

Groups	Apoptosis rate(%)	
	24h	48h
Control	3.35±0.34	5.51±0.49
PSI (1μg/ml)	16.30±0.46	25.43±0.81
PSI (2μg/ml)	23.10±1.35	30.70±1.70
PSI (4μg/ml)	35.53±1.98	43.50±3.36



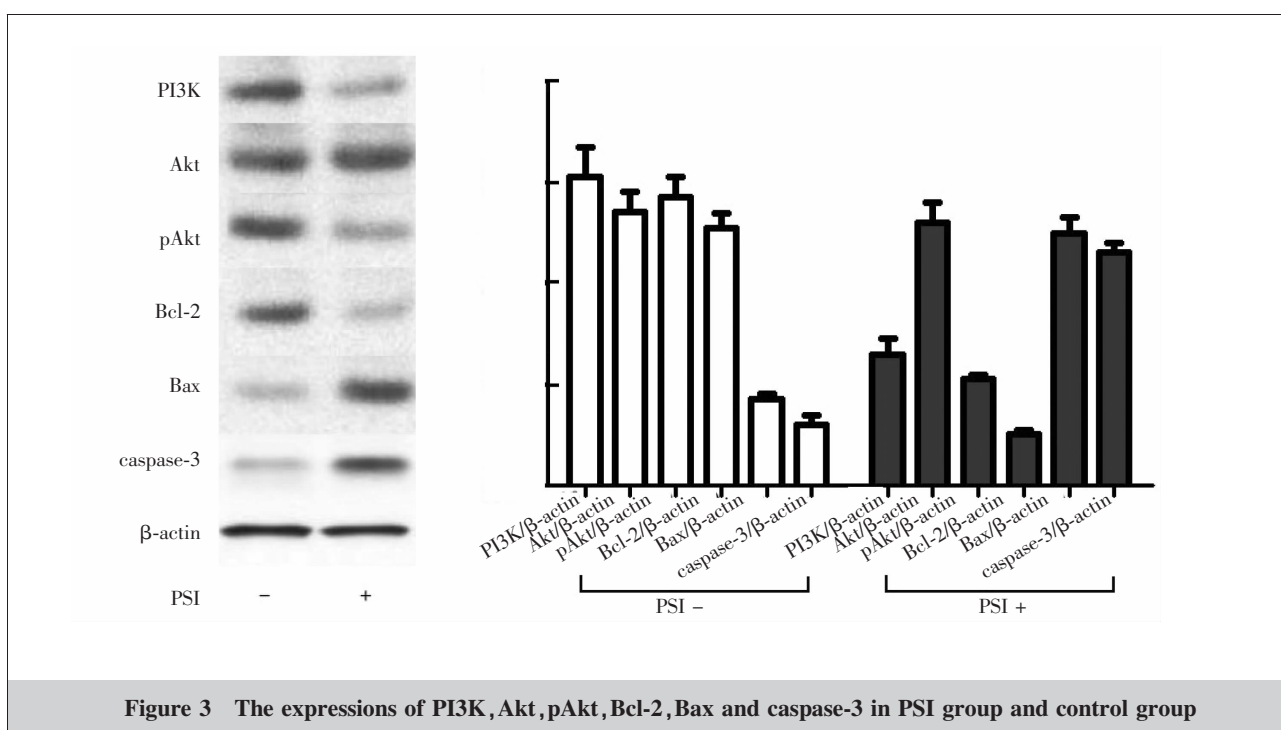
48h 后, PI3K、pAkt、Bcl-2 蛋白表达降低, caspase-3、Bax 蛋白表达增加。行 *t* 检验, 处理组与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (Figure 3)。

3 讨论

重楼, 为百合科重楼或七叶一支花的根茎, 具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊的功效。现代药理研究表明该药具有止血、抗肿瘤、免疫调节等药理活性^[2]。重楼主要有效成分是甾体皂苷, 许多文献报道重楼皂甙具有抗肿瘤及免疫调节作用, 重楼皂苷 I、II、VI 具有较强细胞毒性, 对艾氏腹水癌(EAC)、

宫颈癌 U14、RS615、小鼠肉瘤 S180、肝癌腹水型 Hep、小鼠肝癌 H22、白血病 P388、L1210 和鼻咽鳞癌 KB 等细胞株都有明显抑制作用^[3,4]。国内外研究报道重楼皂苷 I 对多种肿瘤细胞具有明显抑制增殖及促凋亡作用, 机制与促进 Bax 蛋白表达、激活 caspase 系统, 以及降低 Bcl-2、磷酸化 ERK1/2、磷酸化 AKT 表达, 抑制 ERK 通路等有关^[5-7]。重楼皂苷 I 同时具有明显的放射增敏作用, 机制与下调 Survivin 蛋白表达, 促进 p21 蛋白表达有关^[8]。

肿瘤的发生、发展与细胞凋亡密切相关, 而诱导肿瘤细胞凋亡在肿瘤治疗中具有重要作用。本实验发现, 不同浓度的 PSI 对胰腺癌 PANC-1 细胞有着不同程度的体外抑制作用, 在低浓度下就具有肿瘤抑制作用, 并能明显诱导细胞凋亡。对本实验结果进行综合分析, 发现 PSI 对胰腺癌 PANC-1 细胞的增殖抑制及诱导凋亡作用表现在以下几个方面: ①不同浓度 PSI 能有效抑制 PANC-1 细胞增殖, 且随着时间的延长、浓度的增加抑制率也随之增加, 呈时间浓度依赖性。②Annexin V-PI 双染法证实低、中、高浓度 PSI 能诱导细胞凋亡, 具有时间浓度依赖性。③Western Blot 法检测 PI3K、pAkt、Bcl-2 蛋白表达降低、caspase-3、Bax 蛋白表达增加。PI3K/Akt 信号通路作为细胞内重要信号转导通路之一, 通过影响



下游多种效应分子的活化状态,在细胞内发挥着抑制凋亡、促进增殖的关键作用。近年来的研究表明,PI3K/Akt 信号传导通路可以通过多种途径抑制细胞凋亡,进而促进细胞存活。主要机制为:①caspase 是介导细胞凋亡的一类蛋白水解酶,Akt 活化后可磷酸化 caspase-3 和 caspase-9 的 Ser196,阻止 caspase-3 和 caspase-9 的活化进而抑制细胞凋亡。②Bcl-2 蛋白家族分为抑制凋亡的 Bcl-2 和 Bcl-xl 和促进凋亡的 Bad、Bid、Bik 等。Akt 激活后可磷酸化 Bad 的 Ser136/Ser112 残基,而 Bad 磷酸化后再与 Bcl-2 或 Bcl-xl 解聚,Bad 再与 14-3-3 抗凋亡蛋白结合,而只有游离的 Bcl-2 才能发挥抗凋亡作用^[9]。另外,激活的 PI3K/Akt 通路可使 Bax 通过磷酸化 Ser184 残基导致其失活,继而抑制细胞凋亡^[10]。我们认为,重楼皂甙 I 能抑制胰腺癌 PANC-1 细胞的体外增殖,诱导细胞凋亡,机制与降低 PI3K、pAkt、Bcl-2 蛋白表达,增加 Bax 及 caspase-3 蛋白表达有关。

参考文献:

- [1] Riall TS, Nealon WH, Goodwin JS, et al. Pancreatic cancer in the general population: improvements in survival over the last decade[J]. *J Gastrointest Surg*, 2006, 10(9):1212-1223.
- [2] The State Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China [S]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005. 183. [国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 183.]
- [3] Wang YX, Li HF. The antitumor effects of paris saponin[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2005, 36(4):628-630. [王艳霞, 李惠芬. 重楼抗肿瘤作用研究[J]. *中草药*, 2005, 36(4):628-630.]
- [4] Yan LL, Zhang YJ, Gao WY, et al. The antitumor effects of Paris polyphylla Sm. var. yunnanensis (Franch.) Hand.-Mazz. on ten tumor cells [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2008, 33(16):2057-2060. [颜璐璐, 张艳军, 高文远, 等. 滇重楼皂苷对 10 种肿瘤细胞株的细胞毒谱及构效关系研究[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(16):2057-2060.]
- [5] Xiao X, Bai P, Bui Nguyen TM, et al. The antitumoral effect of Paris Saponin I associated with the induction of apoptosis through the mitochondrial pathway [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(5):1179-1188.
- [6] Yan LL, Zhang YJ, Gao WY, et al. In vitro and in vivo anticancer activity of steroid saponins of Paris polyphylla var. yunnanensis[J]. *Exp Oncol*, 2009, 31(1):27-32.
- [7] Jiang H, Su D, Ma SL. The effect of chonglou Saponin I on proliferation and apoptosis in lung adenocarcinoma cell line PC9[J]. *Journal of Chinese Oncology*, 2012, 18(3):166-169. [江皓, 苏丹, 马胜林. 重楼皂甙 I 对肺腺癌细胞株 PC9 增殖及凋亡的影响[J]. *肿瘤学杂志*, 2012, 18(3):166-169.]
- [8] Zhao PJ, Feng JG, Ma SL. In vitro study of radiosensitization of Saponin I on lung adenocarcinoma A549 cell line [J]. *Journal of Chinese Oncology*, 2012, 18(2):108-110. [赵鹏军, 冯建国, 马胜林. 重楼皂苷 I 对肺腺癌 A549 细胞系放射增敏作用研究[J]. *肿瘤学杂志*, 2012, 18(2):108-110.]
- [9] Henshall DC, Araki T, Schindler CK, et al. Activation of bcl-2 associated death protein and counter-response of Akt within cell populations during seizure-induced neuronal death[J]. *Neurosci*, 2002, 22(19):8458-8465.
- [10] Xin MG, Deng XM. Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation[J]. *Biol Chem*, 2005, 280 (11):10781-10789.