

重楼皂苷 I 对胰腺癌 PANC-1 细胞体外放射敏感性的影响

江 皓¹, 赵鹏军², 冯建国³, 花永虹³, 马胜林⁴

(1. 浙江医院, 浙江 杭州 310013; 2. 杭州市肿瘤医院, 浙江 杭州 310002; 3. 浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022; 4. 杭州市第一人民医院, 浙江 杭州 310006)

摘要: [目的] 探讨重楼皂苷 I (PS I) 对胰腺癌 PANC-1 细胞的放射增敏作用及可能机制。[方法] MTT 法检测 PS I 对 PANC-1 细胞的增殖抑制作用。克隆形成实验检测 PS I 对 PANC-1 细胞的放射增敏效应。流式细胞仪检测细胞周期变化。Annexin V-PI 双染法检测细胞凋亡。Western Blot 法检测 caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达改变。[结果] 不同浓度 PS I 对 PANC-1 细胞有不同程度的体外抑制作用。1 μ g/ml PS I 联合放射线明显降低 PANC-1 细胞克隆形成率。增敏组凋亡率及 G₂/M 期细胞比例较对照组明显增多 ($P < 0.01$)。PS I 作用后细胞 caspase-3、Bax 蛋白表达增加, Bcl-2 蛋白表达降低。[结论] PS I 对胰腺癌 PANC-1 细胞具有放射增敏作用, 其机制可能与诱导 caspase-3、Bax 蛋白表达增加, Bcl-2 蛋白表达降低, 引起细胞 G₂/M 期阻滞, 促进细胞凋亡有关。

关键词: 重楼皂苷 I; 胰腺肿瘤; 放射敏感性

中图分类号: R735.9 文献标识码: A 文章编号: 1671-170X(2014)06-0483-05
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.06.B010

Radiosensitivity of Paris Saponin I on Pancreatic Carcinoma Cell Line PANC-1 in Vitro

JIANG Hao¹, ZHAO Peng-jun², FENG Jian-guo³, et al.

(1. Zhejiang Hospital, Hangzhou 310013, China; 2. Hangzhou Cancer Hospital, Hangzhou 310002, China; 3. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the radiosensitization of paris saponin I (PS I) on pancreatic carcinoma cell line PANC-1 and its possible mechanism. [Methods] MTT assay was used to measure the effect of PS I on PANC-1 cell proliferation. Clonogenic assay was performed to determine the radiosensitizing effect of PS I on PANC-1 cell line. The cell cycle was measured by flow cytometry and apoptosis was measured by Annexin V-PI. Caspase-3, Bax and Bcl-2 protein expression were detected by Western Blot. [Results] PS I inhibited PANC-1 cell line proliferation. Radiation with PS I (1 μ g/ml) decreased cloning efficiency significantly. The radiosensitization group had a higher apoptosis rate and G₂/M phase cells than control group ($P < 0.01$). Western Blot showed caspase-3 and Bax protein expression increased after the treatment of PS I, but Bcl-2 protein expression decreased. [Conclusion] PS I could enhance the radiosensitivity of pancreatic carcinoma cell line PANC-1, which might induce caspase-3, Bax proteins increasing, Bcl-2 protein expression decreasing, and cause G₂/M phase arrest and promote cell apoptosis.

Subject words: paris saponin I; pancreatic neoplasms; radiosensitivity

重楼皂苷 I (paris saponin I, PS I) 是从中药重楼中提取的小分子单体。重楼药理学活性广泛, 许多文献报道重楼皂苷对多种肿瘤细胞具有明确的抗肿瘤作用, 主要以诱导细胞凋亡的方式发挥抗肿瘤作用, 具有巨大的应用前景。本研究拟观察 PS I 对胰

腺癌细胞株 PANC-1 细胞放射敏感性的影响。

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, 传代培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,

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: 2013-12-21; 修回日期: 2014-01-18

5% CO₂、37℃ 条件下培养。重楼皂苷 I (Paris Saponin 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。精确称取重楼皂苷 I 粉末, 溶解于二甲基亚砷(DMSO)制成 10mg/100μl 药物原液, 贮存于-20℃, 使用时用培养液稀释至所需浓度, 其中 DMSO 终浓度小于 0.3%。DMEM 培养基、南美洲胎牛血清 Hyclone NTE0100 购自美国 Thermo 公司。细胞周期试剂盒、Annexin V-FITC & PI Apoptosis Detection Kits 试剂购自美国 Becton Dickinson 公司。抗 caspase-3、抗 Bax、抗 Bcl-2 抗体购自美国 Cell signaling 公司。

1.2 MTT 法检测细胞增殖抑制率

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。

1.3 放射敏感性实验

细胞照射: 采用 SIEMENS 直线加速器 6-MV X 线照射。射野大小为 10cm×10cm, X 线自下出射, 距细胞生长面为 100cm, 培养瓶底部垫 1cm 填充物, 剂量率为 100cGy/min。

集落形成实验: 选用低于 IC₅₀ 的药物浓度 1μg/ml 作放射增敏实验, 设对照组、PS I 组、单纯照射组、PS I +照射组。单纯照射组不接受药物处理。PANC-1 细胞经胰酶消化成单细胞悬液, 计数细胞, 稀释后接种于 6 孔板内, 各组细胞贴壁后药物处理 3h, 之后给予 2Gy 剂量照射, 每组培养 21h, 之后弃去药液, 换常规培养液继续培养 14d。去培养液, 每孔加入固定液 3ml(甲醇:冰醋酸=3:1), 固定 10min, 生理盐水冲洗 2 次, Giemsa 染液染色 10min, 生理盐水冲洗, 自然干燥后计数每瓶克隆数。倒置显微镜下观察, 计数≥50 个细胞的克隆数。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期

PANC-1 细胞经胰酶消化、计数后以 10×10⁴ 个/

瓶的浓度接种于培养瓶, 设对照组、单纯照射组、PS I +照射组。PS I +照射组和单纯照射组同时接受 2Gy 照射, 照射条件同上。之后对照组和单纯照射组更换为培养液, PS I +照射组更换为含 PS I 浓度 1μg/ml 的培养液。分别收集药物作用 24、48、72h 的各组细胞, PBS 洗涤 2 遍后加入 70%冰预冷乙醇固定过夜。按细胞周期试剂盒提供的说明书操作, 流式细胞仪检测并分析细胞周期。

1.5 Annexin V-PI 双染法检测细胞凋亡

细胞照射及药物处理方式同上, 分别收集药物作用 24h 各组细胞, 每组 3 个样本。重悬于 1×Binding Buffer, 调整细胞浓度为 1×10⁶ 个/ml, 提取 100μl (1×10⁵ 个细胞), 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。

1.6 Western Blot 法检测 caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达

PANC-1 细胞经 1μg/ml PS I 处理 24h, 收集细胞, 按说明书操作检测蛋白表达改变。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件, 计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 进行配对资料方差分析和 t 检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PS I 对 PANC-1 细胞增殖的抑制作用

不同浓度的 PS I 对 PANC-1 细胞有着不同程度的体外抑制作用(Figure 1)。

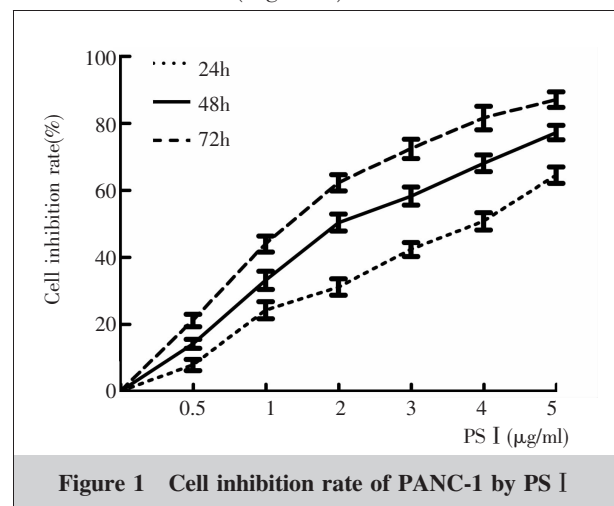


Figure 1 Cell inhibition rate of PANC-1 by PS I

2.2 PS I 对 PANC-1 细胞放射敏感性的影响

对照组克隆形成率为 10.6%(106/1 000)、PS I 组为 8.7%(87/1 000)、单纯照射组为 5.4%(54/1 000)、PS I +照射组为 2.1%(21/1 000)。PS I +照射组与单纯照射组相比具有显著统计学意义($P<0.01$)。

2.3 PS I 对 PANC-1 细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果显示,加药组细胞较单纯照射组 G₂/M 期明显增加,行 F 检验,差异有统计学意义($P<0.01$) (Table 1)。

2.4 PS I 对 PANC-1 细胞凋亡的影响

Annexin V-PI 双染法检测凋亡结果显示,加药组细胞较单纯照射组凋亡明显增加,行 F 检验,差

异有统计学意义($P<0.01$) (Figure 2)。

2.5 PS I 对 PANC-1 细胞 caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

PANC-1 细胞经 1μg/ml PS I 处理后,caspase-3、Bax 蛋白表达增加,Bcl-2 蛋白表达降低。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)。

Table 1 G₂/M rates of PANC-1 by radiation and PS I ($\bar{x}\pm s$)

Groups	G ₂ /M rate (%)		
	24h	48h	72h
Control	6.33±1.25	11.26±2.43	14.18±1.67
Radiation	18.82±2.57	26.47±2.33	30.65±2.87
PS I +Radiation	31.51±2.72	35.88±2.47	41.48±2.15

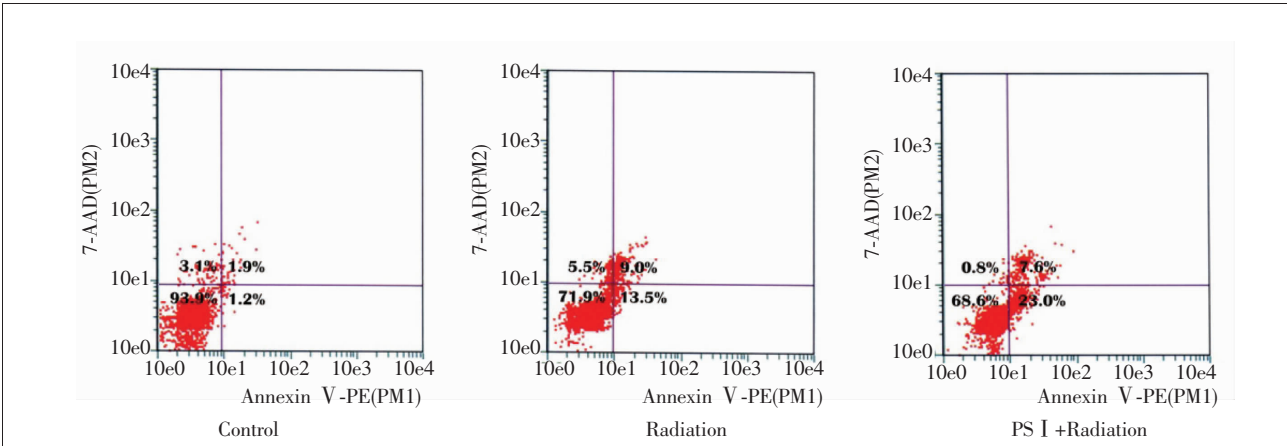


Figure 2 Apoptosis rates of PANC-1 by radiation and PS I

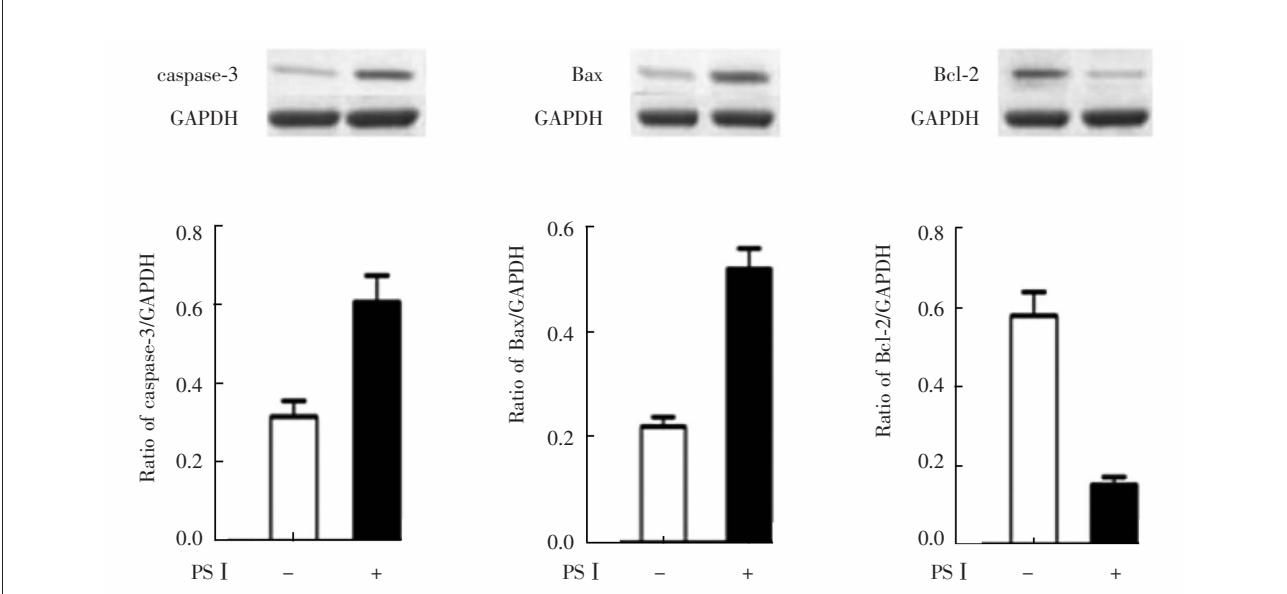


Figure 3 The expressions of caspase-3,Bax and Bcl-2 in PS I group and control group

3 讨论

胰腺癌是当前世界上最常见的恶性肿瘤,其恶性程度高,进展快,总的手术切除率仅为5%~10%。如何提高晚期患者非手术治疗疗效,是提高胰腺癌患者生存质量和生存率的关键。放射治疗在胰腺癌治疗中占十分重要的地位,因此提高胰腺癌的放射治疗疗效尤为关键。虽然放化疗联合使用能够明显提高疗效,但目前的联合化疗方案由于存在较大的不良反应,患者往往无法耐受,因而寻找高效低毒的药物增敏放射治疗以提高治疗有效性成为目前的研究热点。

重楼又称七叶一支花,以蚤休之名首载于《神农本草经》。其味苦,性微寒,有小毒,归肝经,具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效。重楼的主要有效成分是甾体皂苷,重楼皂苷 I、II、VI 具有较强细胞毒性,对多种肿瘤细胞及移植瘤具有明显抑制作用。目前国内外对重楼皂苷的抗肿瘤作用及其机制研究较少,文献报道重楼皂苷 I 能抑制卵巢癌 SKOV3 细胞生长,引起 G₂/M 期阻滞及诱导细胞凋亡。重楼皂苷 I 作用后 Bax、细胞色素 C 蛋白水平升高, caspase-9、caspase-3 激活,且 Bcl-2、磷酸化 ERK1/2 以及磷酸化 AKT 水平降低,抑制 ERK 通路,诱导细胞凋亡。重楼皂苷 I 还能上调 Fas 和 Bax 的表达,下调 Bcl-2、Cyclin D1 和 Cyclin E 蛋白的表达水平^[1-10]。PS I 可以通过 P53/GADD45/JUN 通路诱导肺癌 A549 细胞凋亡, Gadd45 α 可与 Cdc2 结合,使 Cdc2/CyclinB1 蛋白复合体解离,形成 Gadd45/Cdc2 复合体,后者不具备 Cdc2/CyclinB1 蛋白复合体的细胞周期依赖性激酶作用,细胞无法完成 G₂ 期到 M 期的过渡,导致细胞 G₂/M 期阻滞^[11,12]。文献报道重楼皂苷 I 同时具有明显的放射增敏作用,机制与下调 Survivin 蛋白表达,上调 p21 蛋白表达有关^[13]。细胞增殖动力学指出, G₂/M 期细胞对射线敏感性最高。而且,细胞的放射敏感性还与细胞凋亡水平有关,凋亡反应越强提示放射敏感性愈高。从放射生物的角度来看,PS I 可能将细胞周期阻断在 G₂/M 期,同时能诱导细胞凋亡,与放射线联合,具有潜在放射增敏作用。本实验将 PS I 与放射线联合应用,观察其对吉非替尼耐药细胞株 PANC-1 细胞增殖抑制和放射增敏作用,探讨其可能的放射增敏机制。

本实验发现,不同浓度的 PS I 对 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。与放射线联用时,PS I 可增强 PANC-1 细胞的放射敏感性。结果显示:①Annexin V-PI 双染法证实 PS I 能诱导细胞凋亡;②流式细胞术检测细胞周期分布明显变化,出现 G₂/M 期阻滞;③PS I 联合放射线使细胞克隆形成能力明显下降;④Western Blot 法检测 caspase-3、Bax 蛋白表达增加, Bcl-2 蛋白表达降低。Bcl-2 家族蛋白在细胞凋亡中发挥重要的作用, Bcl-2 蛋白可抑制细胞凋亡,而 Bax 蛋白可促进细胞凋亡。目前认为, Bax 可能通过促进细胞色素 C 释放而激活 caspase,抑制 Bcl-2 的作用而导致细胞凋亡。caspase-3 参与多条途径的细胞凋亡,是介导细胞凋亡的核心酶。因此,调节 Bax、Bcl-2 和 caspase-3 蛋白表达在诱导细胞凋亡反应中具有重要作用。我们认为, PANC-1 细胞经 PS I 处理后, caspase-3、Bax 蛋白表达增加, Bcl-2 蛋白表达降低,出现凋亡增加,并使细胞周期阻滞于 G₂/M 期,直接导致细胞放射性敏感性增加,而亚致死损伤修复能力下降,射线诱导细胞损伤增多,从而提高放射敏感性。

参考文献:

- [1] GuangLie C, WeiShi G, GaiLing H, et al. Effect of paris saponin on antitumor and immune function in U14 tumor-bearing mice[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2013, 10(3):503-507.
- [2] Li Y, Gu JF, Zou X, et al. The anti-lung cancer activities of steroidal saponins of *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara through enhanced immunostimulation in experimental Lewis tumor-bearing C57BL/6 mice and induction of apoptosis in the A549 cell line [J]. Molecules, 2013, 18(10):12916-12936.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.]
- [6] 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.]
- [7] Yan LL,Zhang YJ,Gao WY,et al. The antitumor effects of Paris polyphylla Smith var. yunnanensis(Franch.)Hand.Mazz to 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.]
- [8] Wang Y,Zhang YJ,Gao WY,et al. Anti-tumor constituents from Paris polyphylla var. yunnanensis [J]. China Journal of Chinese Materia Medica,2007,32(14):1425-1428.[王羽,张彦军,高文远,等.滇重楼的抗肿瘤活性成分研究[J].中国中药杂志,2007,32(14):1425-1428.]
- [9] Gu LH,Feng JG,Qian LJ,et al. Research on proliferation inhibitory effect of paris saponin I on high metastatic human ovarian cancer cell line HO-8910PM in vitro[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine,2012,30(10):70-73.[顾琳慧,冯建国,钱丽娟,等.重楼皂苷 I 对高转移人卵巢癌细胞体外生长抑制功能的研究[J].中华中医药学刊,2012,30(10):70-73.]
- [10] Xiao MF,Dai XH,He XC,et al.Growth and apoptosis effects of paris saponin I on human hepatocellular carcinoma cells[J]. Life Science Research,2011,15(6):53-57.[萧梅芳,戴霞红,贺新春,等.重楼皂苷 I 对肝癌细胞的增殖及凋亡的影响[J].生命科学研究,2011,15(6):53-57.]
- [11] Mak SK,Kultz D. Gadd45 proteins induce G2/M arrest and modulate apoptosis in kidney cells exposed to hyperosmotic stress[J]. J Biol Chem,2004,279(37):39075-39084.
- [12] Shih RS,Wong SH,Schoene NW,et al. Suppression of Gadd45 alleviates the G2/M blockage and the enhanced phosphorylation of p53 and p38 in zinc supplemented normal human bronchial epithelial cells [J]. Exp Biol Med (Maywood),2008,233(3):317-327.
- [13] Zhao PJ,Feng JG,Ma SL. In vitro study of radiosensitization of Paris 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.]

《中国肿瘤》杂志、《肿瘤学杂志》联合征订征稿启事

《中国肿瘤》杂志由卫生部主管,中国医学科学院、全国肿瘤防治研究办公室主办,中国肿瘤医学综合类科技月刊 (ISSN 1004-0242 CN11-2859/R),大 16 开,80 页,单价 8 元,全年 96 元,邮发代号:32-100。以交流肿瘤防治经验,推广肿瘤科技成果,促进肿瘤控制事业的发展为宗旨。郑树森院士、郝希山院士、陈君石院士、曹雪涛院士出任编委。办刊 20 余年,紧扣肿瘤控制主题,尤其在肿瘤预防、流行病学方面独树一帜。每期刊出相应专题报道,配有病情监测、医院管理、研究进展、学术论著等栏目。已成为社会各方了解我国肿瘤防控工作进展和动态的重要论坛。中国科技核心期刊

《肿瘤学杂志》为面向全国肿瘤学术类科技月刊 (ISSN 1671-170X CN 33-1266/R),大 16 开,80 页,单价 8 元,全年 96 元,邮发代号:32-37。由浙江省卫生厅主管,浙江省肿瘤医院和浙江省抗癌协会联合主办,报道我国肿瘤学术研究领域的新技术、新成果和新进展,刊登肿瘤临床与基础类学术论文,报道重点为常见恶性肿瘤诊治研究,指导临床实践和科研。公平、公正,择优录用稿件,好稿快发。中国科技核心期刊

读者可在当地邮局订阅,漏订者可向编辑部补订。

地址:浙江省杭州市半山桥广济路 38 号(310022)

咨询电话和传真:0571-88122280