

论著·基础研究

黄芪甲昔通过抑制 AKT 和 NF-κB 通路诱导胃癌 MGC-803 细胞凋亡

郭英

(三二〇一医院肿瘤内一科,陕西汉中 723000)

摘要:目的 观察黄芪甲昔对胃癌 MGC-803 细胞凋亡的影响并探讨其诱导凋亡可能的机制。方法 应用四唑盐比色法(MTT 法)观察黄芪甲昔对胃癌 MGC-803 细胞增殖的影响,应用流式细胞术检测其对胃癌 MGC-803 细胞周期和凋亡的影响,应用蛋白质免疫印迹(Western blot)方法观察其对蛋白激酶 B(AKT)和核因子 κB(NF-κB)等相关信号通路蛋白及凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(BCL-2)、BCL2-Associated X 的蛋白质(BAX)、天冬氨酸蛋白水解酶 3(Caspase-3)的影响。结果 黄芪甲昔能够抑制胃癌 MGC-803 细胞的增殖并促进其凋亡,并呈时间和剂量依赖性。同时其能够抑制 AKT 及 NF-κB 通路,抑制抗凋亡蛋白 BCL-2 的表达,促进促凋亡蛋白 BAX 的表达,降低 BCL-2/BAX 的比例,增加 Caspase-3 的活化。结论 黄芪甲昔能够促进胃癌 MGC-803 细胞凋亡,推测可能通过抑制 AKT 和 NF-κB 通路,降低 BCL-2/BAX 的比例,增加 Caspase-3 的活化的机制而实现。

关键词:黄芪甲昔; 胃癌; 凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.19.002

文章编号:1673-4130(2018)19-2341-04

中图法分类号:R735.2

文献标识码:A

Astragaloside induces gastric MGC-803 cells apoptosis by inhibiting AKT and NF-κB pathway

GUO Ying

(Department of Oncology, 3201 Hospital, Hanzhong, Shaanxi 723000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of astragaloside on gastric MGC-803 cells apoptosis. **Methods** The effect of astragaloside on the proliferation of gastric MGC-803 cells was detected by MTT assay, the cell cycle and apoptosis of MGC-803 were detected by flow cytometry, and the effects of astragaloside on AKT and NF-κB pathways and apoptosis related proteins BCL-2, BAX, Caspase-3 was detected by Western blot. **Results** Astragaloside could inhibit gastric MGC-803 cells proliferation but promote apoptosis of in time and dose dependent manner. At the same time, the AKT and NF-κB pathway would be inhibited by inducing BCL-2 anti-apoptotic protein expression, but promoting the expression of BAX pro-apoptotic protein, which would reduce the proportion of BCL-2/BAX, and activate Caspase-3. **Conclusion** Astragaloside can promote gastric MGC-803 cells apoptosis, which was caused by inhibiting the AKT and NF-κB pathway to reduce the proportion of BCL-2/BAX and activate Caspase-3.

Key words: astragaloside; gastric cancer; apoptosis

胃癌是目前严重威胁人类健康的肿瘤之一,我国也是胃癌高发大国。目前胃癌的治疗主要有手术、放疗、化疗。由于大部分胃癌患者确诊时已属于晚期,失去了手术治疗的机会。化疗是晚期胃癌的重要治疗手段,而化疗药物的治疗疗效同样十分有限,严重制约着胃癌的治疗^[1-2]。寻找新的治疗药物对于胃癌的治疗具有十分重要的临床意义。黄芪甲昔是黄芪中提取的有效成分,研究表明其可以通过抑制细胞外调节蛋白激酶(ERK)及核因子 κB(NF-κB)来抑制肺癌细胞的侵袭及转移^[3],并通过抑制丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路抑制乳腺癌细胞侵袭及转移^[4],同时其可以增加肺癌细胞对顺铂的化疗敏感

性^[5]。目前在胃癌方面的研究发现黄芪甲昔可以抑制胃癌 SGC7901 细胞的侵袭及转移^[6]。在本研究中观察了黄芪甲昔对胃癌 MGC-803 细胞凋亡的影响,并初步探讨了其可能的促凋亡机制,为黄芪甲昔治疗胃癌的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料及细胞来源 胃癌 MGC-803 细胞购自于中科院上海细胞库,Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒购自于 BD 公司。抗人蛋白激酶 B(AKT)、NF-κB、B 淋巴细胞瘤-2(BCL-2)、BCL2-Associated X 的蛋白质(BAX)、天冬氨酸蛋白水解酶 3(Caspase-3)、肌动蛋白(β-actin)一抗,辣根过氧化物酶标记的二抗均购自

作者简介:郭英,女,医师,主要从事肿瘤疾病的临床和基础研究。

本文引用格式:郭英.黄芪甲昔通过抑制 AKT 和 NF-κB 通路诱导胃癌 MGC-803 细胞凋亡[J].国际检验医学杂志,2018,39(19):2341-2344.

于美国 Sigma 公司,胰酶、胎牛血清、聚丁二酸丁二醇酯(PBS)、青链霉素等均购自于 Gibco 公司。所有实验均在西安交通大学基础医学院完成。

1.2 方法

1.2.1 四唑盐比色法(MTT法)检测细胞增殖 收取呈对数生长的细胞接种于96孔板内,每孔3 000个细胞,96孔边缘部位孔板注入等体积的PBS液体。待细胞贴壁后加入不同浓度的黄芪甲苷分别为0、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$,不同浓度梯度设置6个复孔。5% CO₂,37 °C分别孵育24、48、72 h。孵育结束后加入MTT液(5 mg/mL)继续孵育4 h,4 h后吸取培养液,加入150 μL 二甲基亚砜(DMSO),震荡混匀10 min后使得结晶充分溶解,置于酶标仪490 nm吸光度进行检测。实验重复3次。

1.2.2 流式细胞术检测细胞周期 取对数生长期的细胞加入6孔板内,每孔细胞20 000个,待细胞贴壁后加入不同黄芪甲苷药物浓度(0、40、60 $\mu\text{mol/L}$)的细胞培养液共培养。24 h后吸取培养液上清,PBS清洗2次,用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化收取细胞。收集细胞于离心管内,PBS清洗2次,于70%冷乙醇固定后进行碘化丙啶染色,检测细胞周期。实验重复3次。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 收取处于对数生长期的胃癌 MGC-803 细胞加入6孔板内,每孔细胞20 000个,待到细胞贴壁后加入含有不同黄芪甲苷药物浓度(0、40、60 $\mu\text{mol/L}$)的细胞培养液共培养。24 h后吸取培养液,PBS清洗2次,用不含EDTA的胰酶消化并收取细胞。收集细胞于离心管内,PBS清洗2次,加入500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞后进行 Annexin V-FITC/PI 双染色。具体步骤为首先在避光条件下加入 Annexin V-FITC 染料孵育15 min,再次于避光条件下加入碘化丙啶染料孵育30 min,后于流式细胞仪检测细胞凋亡。实验重复3次。

1.2.4 蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 收取处于对数生长期的胃癌 MGC-803 细胞接种于10 cm 细胞培养皿内,待到细胞贴壁后加入不同浓度的黄芪甲苷(0、40、60 $\mu\text{mol/L}$)。24 h后,吸取培养液,PBS清洗后加入胰酶,置于37 °C消化3 min后,吹打并收集细胞。用PBS清洗,之后置于离心机高速离心去除PBS。重复2次。加入200 μL 裂解液,待细胞裂解后高速离心,并收取蛋白层液体。应用聚丙烯酰胺凝胶电泳并转于聚偏氟乙烯膜。聚偏氟乙烯膜用TBS清洗后用5%BSA封闭过夜,后加入相应的一抗4 °C孵育过夜,再次PBS清洗3次,每5 min 1次。再次加入相应的二抗孵育2 h后,PBS清洗3次,每次5 min。之后用生物素标记核酸检测试剂盒(ECL发光法)检测拍照。实验重复3次。

1.3 统计学处理 采用SPSS17.0软件处理数据,独立样本采用t检验分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 描述,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 黄芪甲苷对胃癌 MGC-803 细胞增殖的影响 采用不同浓度(0、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$)的黄芪甲苷处理胃癌 MGC-803 细胞(以下简称胃癌细胞),分别在24、48、72 h后检测胃癌细胞的增殖情况。见图1所示,相同时间范围内,不同浓度的黄芪甲苷对胃癌细胞的增殖的抑制率随浓度的升高而提高,差异有统计学意义($P<0.05$)。而使用相同浓度的黄芪甲苷,对胃癌细胞的抑制活性随时间的延长而提高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

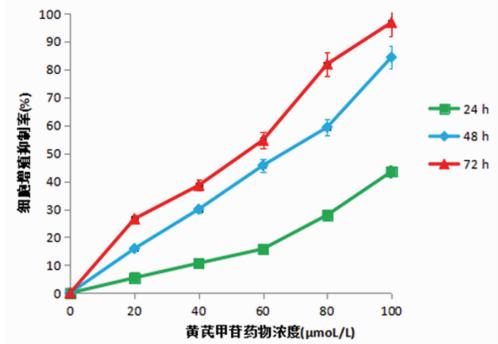
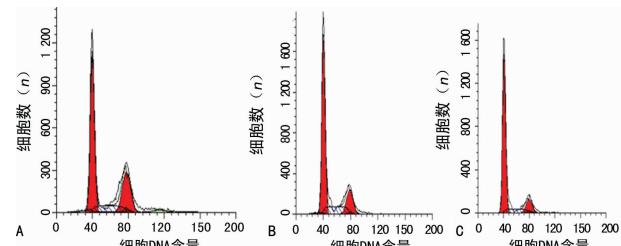


图1 黄芪甲苷对胃癌 MGC-803 细胞增殖的影响

2.2 黄芪甲苷对胃癌 MGC-803 细胞周期的影响 应用流式细胞仪检测胃癌细胞在不同浓度的黄芪甲苷作用24 h后的细胞周期状况。实验结果显示,0、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 黄芪甲苷作用24 h后处于G₁期细胞比例分别为55.65%、67.32%、78.43%,差异有统计学意义($P<0.05$),呈现出随黄芪甲苷的浓度提高而呈现上升趋势。见图2,表1。



注:A为0 $\mu\text{mol/L}$ 黄芪甲苷;B为40 $\mu\text{mol/L}$ 黄芪甲苷;C为60 $\mu\text{mol/L}$ 黄芪甲苷

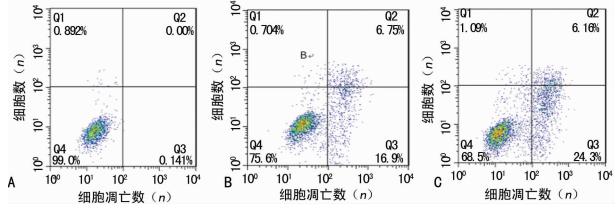
图2 黄芪甲苷对胃癌 MGC-803 细胞周期的影响

表1 不同浓度的黄芪甲苷对胃癌 MGC-803 细胞周期的影响(%)

浓度	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
0 $\mu\text{mol/L}$	55.65	17.74	26.61
40 $\mu\text{mol/L}$	67.32	13.93	18.75
60 $\mu\text{mol/L}$	78.43	10.61	10.96

2.3 黄芪甲苷对胃癌 MGC-803 细胞凋亡的影响

在胃癌细胞被不同浓度的黄芪甲苷处理 24 h 后,采用 Annexin V-FITC/PI 双染色方法检测细胞凋亡比例,经流式细胞仪检测发现 0、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 浓度黄芪甲苷组细胞凋亡比例分别为 0.14%、16.9%、24.3%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。



注: A 为 0 $\mu\text{mol/L}$ 黄芪甲苷; B 为 40 $\mu\text{mol/L}$ 黄芪甲苷; C 为 60 $\mu\text{mol/L}$ 黄芪甲苷

图 3 黄芪甲苷诱导胃癌 MGC-803 细胞凋亡

2.4 黄芪甲苷对 NF- κ B 和 AKT 信号通路的影响

应用蛋白质免疫印迹法检测了增殖及凋亡相关蛋白。研究表明黄芪甲苷处理胃癌细胞 24 h 后检测发现,随着黄芪甲苷浓度的升高,NF- κ B 及 AKT 蛋白的表达下降,BAX 表达上调,BCL-2 的表达下降,即 BCL-2/BAX 的比例下降,同时结果显示 Caspase-3 表达增强。见图 4、5。

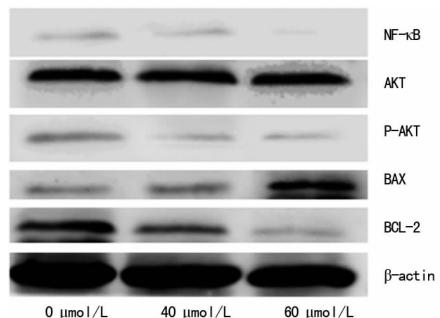


图 4 黄芪甲苷对胃癌 MGC-803 细胞 NF- κ B 和 AKT 蛋白表达的影响

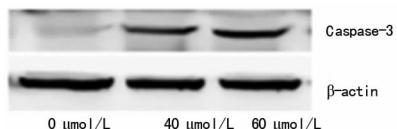


图 5 黄芪甲苷对胃癌 MGC-803 细胞 Caspase-3 表达的影响

3 讨 论

胃癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一,但目前应用于胃癌的治疗药物非常有限,主要包括铂类及氟尿嘧啶类药物、紫杉醇类药物和基因突变的特定靶向药物,但是这些药物的临床疗效并不理想^[1-2]。有研究表明黄芪甲苷可诱导白血病细胞的凋亡,有望用以治疗白血病^[7]。鉴于多种抗肿瘤药物通过诱导细胞凋亡而发挥抗肿瘤效应,而黄芪甲苷对胃癌细胞的影响暂不明确,因此本研究通过观察黄芪甲苷对胃癌 MGC-803 细胞增殖的影响,并对其影响的相关机制

作初步分析。

使用不同浓度的黄芪甲苷处理胃癌 MGC-803 细胞后,发现黄芪甲苷对胃癌 MGC-803 细胞的抑制活性随着浓度的提高而升高;而在相同浓度下,随着时间的推移,黄芪甲苷对胃癌 MGC-803 细胞的抑制活性逐渐增强;因此说明,黄芪甲苷对胃癌 MGC-803 细胞有明显的抑制活性,而且呈现出浓度和时间的依赖性。同时采用流式细胞进一步检测分析这一现象,在不同浓度地用药 24 h 后观察发现,黄芪甲苷表现出对胃癌 MGC-803 细胞的增殖的明显的抑制活性,主要表现为诱导细胞发生 G₁ 期阻滞,并呈现剂量依赖的规律。

相关研究表明,多种抗肿瘤药物通过抑制 NF- κ B 细胞增殖相关信号通路发挥抗肿瘤效应^[8],如黄芪甲苷通过影响 BCL-2、NF- κ B、Caspase-3 的表达及活化促进人白血病细胞的凋亡^[7]。NF- κ B 和 AKT 信号通路都是重要的肿瘤增殖相关信号通路,抑制 AKT 也是多种治疗胃癌相关化疗药物的作用机制之一。有研究表明,胃癌常用药物奥沙利铂及治疗原癌基因人类表皮生长因子受体 2 基因(HER-2)阳性胃癌的曲妥珠单抗均可抑制 AKT 表达,发挥其针对胃癌的抗肿瘤效应^[9]。而 JIN 等^[10]的研究发现黄芪甲苷可以通过干预 AKT 信号通路抑制乳腺癌细胞的增殖并促进乳腺癌细胞凋亡。因此,在确定黄芪甲苷对胃癌 MGC-803 细胞具有抑制活性后,为了探究其抑制作用的机制,进一步分别检测了不同浓度的黄芪甲苷对胃癌 MGC-803 细胞增殖过程中 NF- κ B 和 AKT 通路的影响。

首先使用不同浓度的黄芪甲苷处理胃癌细胞 24 h 后,发现 NF- κ B 及 AKT 蛋白的表达随浓度的升高而下降,说明黄芪甲苷能够抑制 NF- κ B 和 AKT 蛋白的表达而促进细胞凋亡。其次,作为一种抗凋亡相关蛋白,BCL-2 的高表达能够抑制肿瘤细胞凋亡;而 BAX 是一种同属于 BCL-2 家族的凋亡相关蛋白,BAX 的表达可以促进肿瘤细胞凋亡。在细胞内 BCL-2 与 BAX 可以形成复合物,进而互相限制彼此发挥对细胞凋亡的调节效应,因此胞内 BCL-2 与 BAX 的比例影响肿瘤细胞的凋亡速率。若 BCL-2 多于 BAX,总体发挥抗凋亡作用,反之则发挥促凋亡效应^[11-12]。实验结果表明,黄芪甲苷可以抑制胃癌 MGC-803 细胞的 BCL-2 表达,同时使 BAX 蛋白表达上调,从而降低 BCL-2/BAX 的比例,发挥促凋亡效应,进而促进胃癌 MGC-803 细胞发生凋亡。另一方面,Caspase-3 作为细胞凋亡的终末执行蛋白,该蛋白的过量表达也能够促进细胞凋亡^[13-14]。因此,根据研究结果显示,黄芪甲苷能够降低胞内 BCL-2/BAX 的比例,促进 Caspase-3 活化,推测这一变化是黄芪甲苷诱导胃癌 MGC-803 细胞凋亡的机制之一。

4 结 论

实验结果表明,黄芪甲苷能够抑制胃癌 MGC-803

细胞增殖,诱导胃癌 MGC-803 细胞 G₁ 期阻滞及凋亡。经过分析假设和验证,研究者推测黄芪甲苷的促凋亡作用主要通过抑制 AKT 和 NF-κB 蛋白表达,抑制 AKT 和 NF-κB 信号通路,降低 BCL-2/BAX 的比例,增加 Caspase-3 的活化的机制诱导细胞的凋亡。本研究主要是从细胞层面进行的观察验证,有一定局限性,下一步将从小鼠模型进行凋亡相关影响及机制的研究。

参考文献

- [1] 梁寒.影响胃癌预后因素研究进展[J].中国实用外科杂志,2011,20(8):726-729.
- [2] 徐学新,张炜.晚期胃癌的治疗进展[J].中国肿瘤临床与康复,2011,30(6):574-576.
- [3] CHENG X D, GU J F, ZHANG M H, et al. Astragaloside IV inhibits migration and invasion in human lung cancer A549 cells via regulating PKC-alpha-ERK1/2-NF-kappa B pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 23(1): 304-313.
- [4] JIANG K, LU Q, LI Q, et al. Astragaloside IV inhibits breast cancer cell invasion by suppressing Vav3 mediated Rac1/MAPK signaling[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 42(1): 195-202.
- [5] HE C S, LIU Y C, XU Z P, et al. Astragaloside IV enhances cisplatin chemosensitivity in Non-Small cell lung cancer cells through inhibition of B7-H3 [J]. Cellular Physiol Bio, 2016, 40(5): 1221-1229.
- [6] 曹艳,何利红,孙贊,等.黄芪甲苷对胃癌 MGC-803 细胞 SGC7901 侵袭能力的影响及其机制探讨[J].陕西医学杂志,2015,20(6):656-659.
- [7] QIN Y, CHEN J, LI L, et al. Exogenous morphine inhibits human gastric cancer MGC-803 cell growth by cell cycle arrest and apoptosis induction. [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(4): 1377-1382.
- [8] DOLCET X, LLOBET D, PALLARES J, et al. NF-κB in development and progression of human cancer[J]. Virchows Arch, 2005, 446(5): 475-482.
- [9] DING X D, QU X J, FAN Y B, et al. Trastuzumab and oxaliplatin exhibit a synergistic antitumor effect in HER2-positive gastric cancer cells[J]. Anticancer Drugs, 2014, 25(3): 315-322.
- [10] JIN X, SHI Y I. Isobavachalcone induces the apoptosis of gastric cancer cells via inhibition of the Akt and Erk pathways[J]. Exper Ther Med, 2016, 11(2): 403.
- [11] CORY S, ROBERTS A W, COLMAN P M, et al. Targeting BCL-2-like Proteins to Kill Cancer Cells[J]. Trends Cancer, 2016, 2(8): 443-460.
- [12] SUN L, LI W, LI W, et al. Astragaloside IV prevents damage to human mesangial cells through the inhibition of the NADPH oxidase/ROS/Akt/NF-κB pathway under high glucose conditions. [J]. Inter J Mol Med, 2014, 34(1): 167-176.
- [13] MIRZYANS R, ANDRAIS B, KUMAR P, et al. The growing complexity of cancer cell response to DNA-damaging agents: Caspase 3 mediates cell death or survival [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(5): 708-710.
- [14] GALLUZZI L, KEPP O, KROEMER G. Caspase-3 and prostaglandins signal for tumor regrowth in cancer therapy[J]. Oncogene, 2012, 31(23): 2805-2808.

(收稿日期:2018-01-20 修回日期:2018-03-15)

(上接第 2340 页)

- 高糖诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡的保护作用[J].中药药理与临床,2013,22(6):19-22.
- [15] YIN Z, YU H, CHEN S, et al. Asiaticoside attenuates diabetes-induced cognition deficits by regulating PI3K/Akt/NF-kappaB pathway[J]. Behav Brain Res, 2015, 292(1): 288-299.
- [16] 刘鹃,康刚劲,康海军,等.槲皮素对糖尿病大鼠晶状体上皮细胞凋亡的影响[J].泸州医学院学报,2016,23(6): 560-565.
- [17] 朱开梅,唐丽霞,赵文鹏,等.槲皮素脂质体对糖尿病肾病氧化应激和 TGF-β1/Smad7 通路的影响[J].安徽医科大学学报,2017,22(3):319-323.
- [18] 徐向进,吴玉水,冯修高,等.槲皮素对糖尿病大鼠肾脏转化生长因子-β1(TGF-β1)表达的影响[J].中国糖尿病

杂志,2001,20(1):45-49.

- [19] OLA M S, AHMED M M, SHAMS S, et al. Neuroprotective effects of quercetin in diabetic rat retina[J]. Saudi J Biol Sci, 2017, 24(6): 1186-1194.
- [20] DHANYA R, ARYA AD, NISHA P, et al. Quercetin, a lead compound against type 2 diabetes ameliorates glucose uptake via ampk pathway in skeletal muscle cell line [J]. Front Pharmacol, 2017, 8(1): 336.
- [21] NADI M, MARANDI S M, ESFARJANI F, et al. The comparison between effects of 12 weeks combined training and vitamin d supplement on improvement of sensory-motor neuropathy in type 2 diabetic women[J]. Adv Biomed Res, 2017, 6(1): 55.

(收稿日期:2018-01-20 修回日期:2018-03-28)