

内质网应激调控重楼皂苷I诱导肝癌 HepG2细胞凋亡的研究

阳丹丹¹ 齐琪¹ 陈正礼^{1,2} 陈兵¹ 黄超^{1,2} 罗启慧^{1,2*} 刘文涛^{1,2}

¹四川农业大学动物医学院, 实验动物疾病模型研究室, 成都 611130;

²四川农业大学动物医学院, 动物疾病与人类健康中心四川省重点实验室, 成都 611130)

摘要 该文探讨了内质网应激在重楼皂苷I(polyphyllin I, PPI)诱导人肝癌HepG2细胞凋亡中的作用。采用CCK-8法检测不同浓度的重楼皂苷I处理HepG2细胞6、12、24 h后细胞的增殖情况; 采用Hoechst 33258染色检测细胞凋亡情况; 应用qRT-PCR(Real-time quantitative PCR)检测内质网应激相关基因*GRP78*、*ATF-6*、*PERK*、*IRE-1*的mRNA水平; 采用Western blot方法分析重楼皂苷I对Cleaved-caspase12、Caspase-12、Cleaved-caspase3、Bax、Bcl-2、IRE-1、XBP1、CHOP和P-JNK1蛋白质水平的影响; 并用流式细胞术检测20 mmol/L内质网抑制剂4-苯基丁酸(4-phenyl butyric acid, 4-PBA)对细胞凋亡率的影响。结果发现, 重楼皂苷I以时间-浓度依赖的方式抑制HepG2细胞的增殖; 细胞出现典型的凋亡形态; *ATF-6*和*PERK* mRNA水平无明显变化, *GRP78*和*IRE-1* mRNA水平较阴性对照组(0 h)均显著增加($P < 0.05$); 重楼皂苷I通过增加Bax、减少Bcl-2蛋白质水平进而活化Caspase-3来诱导细胞凋亡。进一步研究发现, 重楼皂苷I可上调内质网应激通路的IRE-1, 下调P-JNK1和XBP1蛋白质水平及活化内质网应激的标志蛋白质Caspase-12, 但CHOP蛋白质水平无明显变化。流式细胞术结果显示, 4-PBA与2.5 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I联合作用组的细胞凋亡率显著增加($P < 0.05$)。因此, 内质网应激参与了重楼皂苷I诱导人肝癌HepG2细胞的凋亡, 且在该过程中对细胞起到保护作用。

关键词 重楼皂苷I; 细胞凋亡; 内质网应激; HepG2细胞

The Study on Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress in Polyphyllin I-Induced Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells

Yang Dandan¹, Qi Qi¹, Chen Zhengli^{1,2}, Chen Bing¹, Huang Chao^{1,2}, Luo Qihui^{1,2*}, Liu Wentao^{1,2}

¹Laboratory of Animal Disease Model, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University,

Chengdu 611130, China; ²Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province,

College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract This work was aimed to investigate the role of endoplasmic reticulum stress in polyphyllin I-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. HepG2 cells were treated with the different concentrations of polyphyllin I for 6, 12, 24 h, the inhibition of cell proliferation was detected by CCK-8; the qRT-PCR (Real-time quantitative PCR) was applied to detect *GRP78*, *ATF-6*, *IRE-1* and *PERK* mRNA levels; Western

收稿日期: 2017-07-03 接受日期: 2017-08-30

国家科技支撑计划课题(批准号: 2014BAI03B01)和国家重大科学仪器设备开发专项(批准号: 2013YQ49085906)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13111820881, E-mail: lqhbiology@163.com

Received: July 3, 2017 Accepted: August 30, 2017

This work was supported by the National Science and Technology Support Plan Project (Grant No.2014BAI03B01) and the National Major Scientific Instrument and Equipment Development Project (Grant No.2013YQ49085906)

*Corresponding author. Tel: +86-13111820881, E-mail: lqhbiology@163.com

网络出版时间: 2017-10-25 17:37:58 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171025.1737.016.html>

blot was applied to determine the protein levels of Cleaved-caspase12, Caspase-12, Cleaved-caspase3, Bax, Bcl-2, IRE-1, XBP1, CHOP and P-JNK1; the flow cytometry was applied to detect the effect of 20 mmol/L 4-PBA on apoptotic rate. The result showed that polyphyllin I could inhibit the proliferation and induce apoptosis of HepG2 cells in dose- and time-dependent manners; qRT-PCR results showed that the levels of *ATF-6* and *PERK* mRNA had no obvious change, but the levels of *GRP78* and *IRE-1* mRNA increased significantly, compared with the negative control group ($P < 0.05$); Western blot results showed that polyphyllin I could up-regulate the levels of apoptotic proteins Bax and Cleaved-caspase3, and down-regulate the level of the anti-apoptotic protein Bcl-2. Our further study revealed that polyphyllin I could up-regulate the levels of endoplasmic reticulum stress proteins IRE-1 and Cleaved-caspase12, and down-regulate the levels of P-JNK1 and XBP1 proteins, while the protein level of CHOP was no significant difference ($P > 0.05$). Flow cytometry results showed that the apoptotic rate increased significantly in combination group of 4-PBA with 2.5 $\mu\text{mol/L}$ polyphyllin I ($P < 0.01$). In conclusion, endoplasmic reticulum stress was involved in polyphyllin I inducing HepG2 cells apoptosis, which played a protective role in this process.

Keywords polyphyllin I; apoptosis; endoplasmic reticulum stress; HepG2 cells

内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是指由于内源性或外源性刺激引起的错误折叠与未折叠蛋白质在内质网(endoplasmic reticulum, ER)腔内的聚集以及 Ca^{2+} 平衡的失调^[1]。ERS是细胞的一种保护性应激反应,通常根据应激的强度和时长短,会激活未折叠蛋白质反应和内质网调亡途径来调控细胞的生存和死亡^[2]。重楼皂苷I(polyphyllin I, PPI)是天然药物重楼的主要活性物质,具有抗肿瘤、清热解毒、消炎止痛、止血等多种生物学效应^[3]。已有文献报道,重楼皂苷I能够抑制肝癌细胞的增殖并诱导其调亡^[4-5],但目前重楼皂苷I诱导肝癌细胞调亡的研究主要集中于线粒体通路,而内质网应激通路是否也参与了这一过程还未见报道。本文拟探讨重楼皂苷I诱导肝癌HepG2细胞调亡与内质网应激的关系,为找到在重楼皂苷I诱导肝癌细胞调亡中发挥关键作用的效应蛋白质提供研究方向及理论基础,并在此基础上开发新的治疗靶点。

1 材料与方 法

1.1 药品与试剂

本实验所使用的药品和试剂包括:重楼皂苷I(纯度 $\geq 98\%$,成都曼思特生物技术有限公司,批号: MUST-16021905)、DMEM培养基(Hyclone公司)、胎牛血清(Gibco公司)、CCK-8试剂盒(Dojindo公司)、Hoechst 33258染色液(Solarbio公司)、4-PBA(Sigma公司)、Annexin V-FITC细胞调亡检测试剂盒(BD公司)、总RNA提取试剂盒(Solarbio公司)、PrimeScriptTM RT reagent Kit(TaKaRa公司)、SYBR

Premix Ex TaqTM II试剂盒(TaKaRa公司)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、内质网核信号转导蛋白a1(IRE-1)抗体、B细胞淋巴瘤因子2(Bcl-2)抗体、Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体、细胞核转录因子X盒结合蛋白1(XBP1)抗体均购自博士德工程有限公司;半胱天冬酶-12(Caspase-12)抗体和C/EBP同源蛋白(CHOP)抗体均购自博奥森生物技术有限公司;磷酸化氨基末端激酶1(P-JNK1)抗体购自碧云天生物技术有限公司;Cleaved-caspase3抗体购自Cell Signaling公司;葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、活化转录因子-6(ATF-6)、IRE-1、蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)及 β -actin引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 细胞及培养

人肝癌HepG2细胞株购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。将HepG2细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下孵育,待细胞贴壁生长至80%汇合时,进行传代或实验。

1.3 仪器

本实验使用的仪器包括:酶标仪(Thermo公司)、细胞培养箱(Thermo 170公司)、倒置显微镜(Olympus公司)、荧光显微镜(Olympus公司)、低温高速离心机(Thermo公司)、荧光定量PCR仪(Bio-Rad公司)、蛋白质电泳仪(Bio-Rad公司)、全功能成像仪(Bio-Rad公司)、流式细胞仪(BD公司)。

1.4 CCK-8法检测HepG2细胞增殖

收集对数期细胞,调整细胞浓度为 $6 \times 10^4/\text{mL}$,以每孔100 μL 接种于96孔板,设6个平行孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、

5% CO₂条件下孵育, 待细胞生长至60%~70%汇合时, 加入含不同浓度(1、2、3、4、5 μmol/L)重楼皂苷I的培养基, 同时设立不加药组(0 μmol/L)为阴性对照组, 无细胞组为空白对照组, 继续孵育6、12、24 h后, 吸弃含药培养基, 新鲜培养基与CCK-8按10:1的比例混匀后每孔加入100 μL, 继续孵育1 h后放于酶标仪上检测(检测波长为450 nm, 参比波长为650 nm)各孔吸光度(D)值。计算细胞的存活率和半数有效浓度(IC₅₀)。

$$\text{细胞存活率(\%)} = \frac{\text{药物组平均D值} - \text{空白组平均D值}}{\text{阴性对照组平均D值} - \text{空白组平均D值}} \times 100\%$$

1.5 HepG2细胞形态学观察

调整细胞浓度为 1×10^5 /mL接种于6孔板, 每孔2 mL, 待细胞密度达70%汇合时, 弃去原培养液, 加入含不同药物浓度的培养基继续培养12 h, 培养结束时在倒置光学显微镜下观察加药前后细胞形态和数量的变化, 并选择合适倍数拍照。

1.6 Hoechst 33258染色检测HepG2细胞凋亡

调整细胞密度为 3×10^4 /mL, 接种于12孔板的爬片上, 每孔1 mL, 待细胞贴壁后, 按实验设计给予不同药物处理, 培养12 h后弃去培养液, PBS清洗3遍, 每次3~5 min, 加入4%多聚甲醛固定细胞20 min。弃去固定液, 用PBS清洗3遍, 吸尽液体, 每孔均匀滴加0.5 mL Hoechst 33258染色液, 常温下染色30 min后弃染色液, PBS清洗3遍, 吸尽液体。滴一滴抗荧光淬灭封闭液于载玻片上, 盖上贴有细胞的盖玻片, 在荧光显微镜下观察, 400倍镜下采集图像。计数200个(5个视野)细胞中的致密浓染凋亡细胞数, 计算细胞凋亡率, 实验重复3次。

1.7 qRT-PCR(Real-time quantitative PCR)

使用总RNA提取试剂提取细胞RNA, 并使用逆转录试剂盒PrimeScript™ RT reagent Kit进行逆转录, 制备cDNA, 各cDNA样品分别用下列引物进行qRT-PCR反应。反应体系为: SYBR Premix Ex Taq™II 6.25 μL、上游引物0.5 μL、下游引物0.5 μL、灭菌双蒸的4.25 μL、cDNA 1 μL, 体系为12.5 μL。反应条件为: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性10 s, 58 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 40个循环。以β-actin mRNA水平作为内参, 用Bio-Rad CFX Manager软件对所得数据进行分析。引物序列包括GRP78 F: 5'-TAG CGT ATG GTG CTG CTG TC-3', GRP78 R: 5'-TGA CAC CTC CCA CAG TTT CA-3'^[6]; IRE-1 F: 5'-TGG

ATC CAA AAC TAC GCC TCC-3', IRE-1 R: 5'-GGT CAG ATA GCG CAG GGT CTC-3'^[7]; ATF-6 F: 5'-TAT CAG TTT ACA ACC TGC ACC CAC TA-3', ATF-6 R: 5'-GCA AGG ACT GGC TGA GCA GA-3'^[7]; PERK F: 5'-TTG TCG CCA ATG GGA TAG-3', PERK R: 5'-CAG TCA GCA ACC GAA ACC-3'^[9]; β-actin F: 5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3', β-actin R: 5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3'^[8]。

1.8 Western blot

收集经实验预处理的细胞, 预冷PBS洗2遍, 每孔加入约100 μL全细胞蛋白质裂解液(蛋白酶抑制剂:裂解液=1:100, 现用现配), 震荡混匀, 置冰上10 min后将细胞收集于1.5 mL离心管中。裂解体系在冰上进行超声作用, 每次3 s, 共3次, 每次间隔1 s, 超声后的裂解体系于4 °C、13 000 r/min离心5 min并收集上清, 即为全细胞提取物。BCA法进行蛋白质定量, 用裂解液将不同处理组蛋白质浓度调为一致, 按照每4 μL蛋白质样品加入1 μL SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5×)的比例, 混合蛋白质样品和缓冲液, 煮沸5 min, 样品于-20 °C保存备用。使用等量蛋白质上样, 选择8%的SDS-PAGE进行分离, 分离后的蛋白质转移至PVDF膜上, 用5%的脱脂奶粉封闭1 h, 封闭结束后按照实验目的结合不同滴度的一抗(β-actin、Caspase-12、Bax、Bcl-2、CHOP、XBP1及IRE-1均按1:400稀释, Cleaved-caspase3和P-JNK1按1:1 000稀释), 4 °C孵育过夜后TBST清洗, 然后根据一抗来源选择合适的二抗(稀释比例均为1:5 000), 室温孵育1 h, TBST清洗, ECL暗室显色。显色后的蛋白使用Bio-Rad全功能成像系统采集图像, Image-ProPlus分析光密度, 以β-actin为内参, 阴性对照组目标蛋白质相对含量为1, 计算各组蛋白质的相对表达量, 实验重复3次。

1.9 流式细胞术检测细胞凋亡率

不同处理组的细胞在预处理结束时, 把细胞培养液吸出至合适离心管内, PBS洗涤贴壁细胞1次, 胰蛋白酶消化, 加入收集的细胞培养液, 把细胞轻轻吹打下来, 转移到离心管内, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 收集细胞。用结合缓冲液(1×)轻轻重悬细胞至细胞密度为 1×10^6 /mL, 吸取100 μL的细胞悬液(1×10^5 细胞)到1.5 mL离心管, 加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL碘化丙啶染色液, 轻轻混匀, 室温(20~25 °C)避光孵育15 min, 孵育结束后每管再加入400 μL的结合缓冲液(1×), 在1 h内用流式细胞仪检

测细胞凋亡率,实验重复3次。

1.10 统计分析

用SPSS 19.0分析软件进行数据处理分析,结果数据均以平均数(\bar{x})±标准差(S.D.)表示,统计方法为单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重楼皂苷I抑制HepG2细胞增殖活性

不同浓度重楼皂苷I分别处理HepG2细胞6、12、24 h,采用CCK-8法检测各组细胞活力。结果显示,重楼皂苷I处理后,HepG2细胞生长受到不同程度的抑制,且表现出良好的时间和剂量依赖性。根据Graphpad prism 5软件计算出重楼皂苷I刺激HepG2细胞6、12、24 h的 IC_{50} 分别为 $4.4 \pm 0.5 \mu\text{mol/L}$ 、 $2.5 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$ 、 $2.3 \pm 0.2 \mu\text{mol/L}$ (图1)。基于以上结果,本研究选取 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 和12 h作为后续实验中重楼皂苷I的干预浓度和时间。

2.2 重楼皂苷I影响HepG2细胞形态学

重楼皂苷I处理HepG2细胞12 h后观察细胞形态学变化。结果显示,阴性对照组细胞生长旺盛,细胞形态饱满、轮廓清晰,细胞间连接紧密;添加重楼皂苷I各组可见细胞数量呈剂量依赖性减少,高浓度组可见细胞明显皱缩,细胞间几乎无连接,失去贴壁性

(图2)。

2.3 重楼皂苷I对HepG2细胞凋亡的影响

在经过Hoechst 33258荧光核染料染色后,细胞核或凋亡小体内的DNA会呈现蓝色的致密浓染。在荧光显微镜下观察,重楼皂苷I(1、2、3、4、5 $\mu\text{mol/L}$)作用12 h后,HepG2细胞呈典型的凋亡细胞形态,细胞体积变小、核固缩,细胞核内可见致密的蓝色颗粒状强荧光,且随着药物浓度升高,细胞内的蓝色荧光越强;而阴性对照组细胞未见明显的核固缩或浓染现象,细胞呈弥散性均匀荧光,且荧光较弱。随机计数5个视野中的致密浓染凋亡细胞数,计

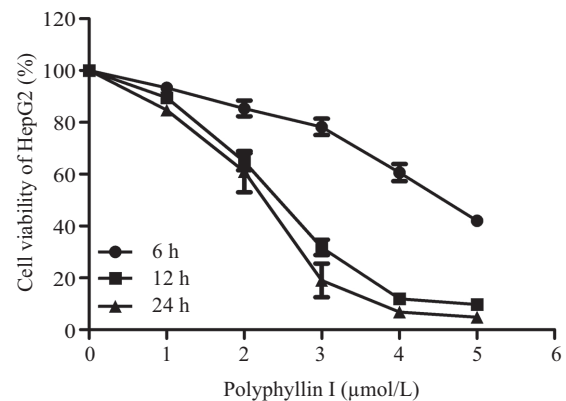
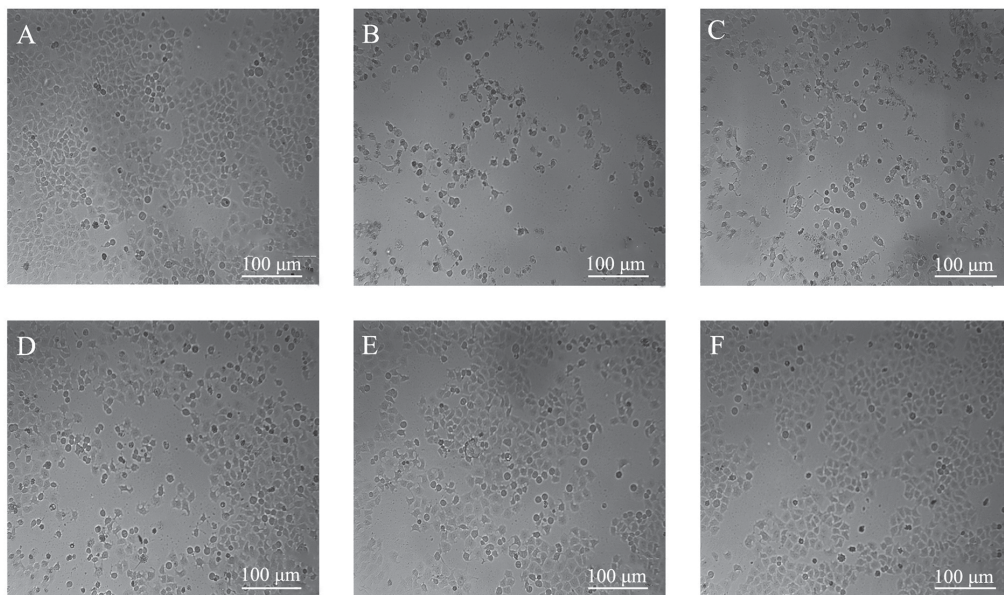


图1 不同浓度重楼皂苷I对HepG2细胞活力的影响

Fig.1 The effect of PPI on cell viability of HepG2 cells



A: 阴性对照组; B: 5 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I组; C: 4 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I组; D: 3 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I组; E: 2 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I组; F: 1 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I组。
A: negative control group; B: 5 $\mu\text{mol/L}$ polyphyllin I group; C: 4 $\mu\text{mol/L}$ polyphyllin I group; D: 3 $\mu\text{mol/L}$ polyphyllin I group; E: 2 $\mu\text{mol/L}$ polyphyllin I group; F: 1 $\mu\text{mol/L}$ polyphyllin I group.

图2 重楼皂苷I对HepG2细胞形态学的影响

Fig.2 The effect of PPI on morphology of HepG2 cells

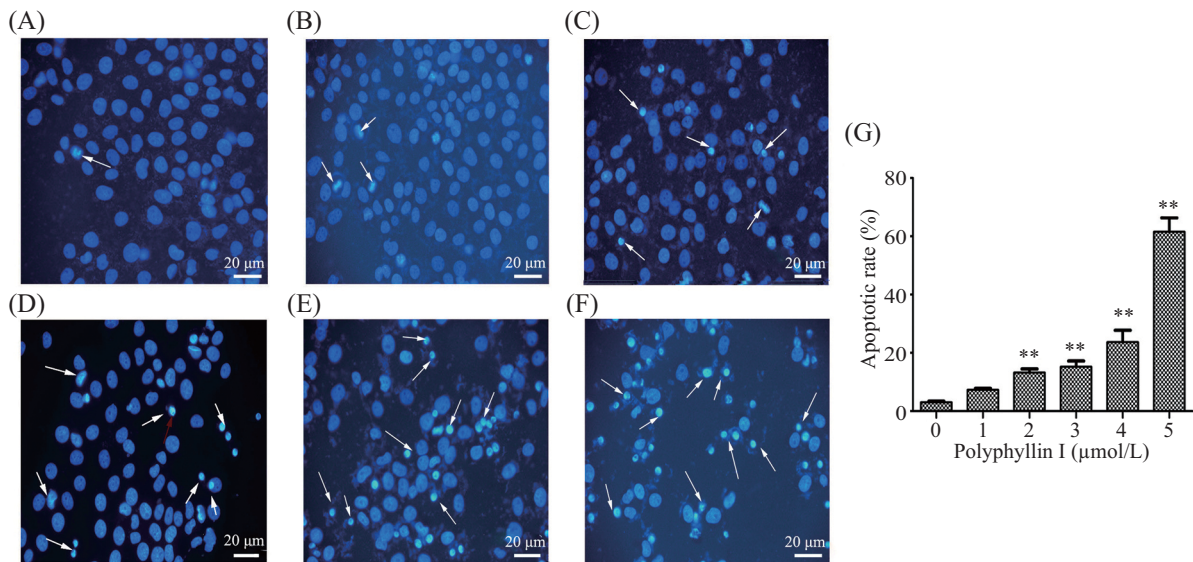
算细胞凋亡率。阴性对照组和各实验组的凋亡率分别是: 3.0%(0 $\mu\text{mol/L}$)、7.3%(1 $\mu\text{mol/L}$)、13.3%(2 $\mu\text{mol/L}$)、15.2%(3 $\mu\text{mol/L}$)、23.7%(4 $\mu\text{mol/L}$)和61.6%(5 $\mu\text{mol/L}$), 随着处理浓度的增加, 实验组凋亡率逐渐增加, 结果具有统计学意义($P<0.01$, 图3)。

进一步采用Western blot方法检测与细胞凋亡密切相关的蛋白Cleaved-caspase3、Bax、Bcl-2的表达情况。图4结果显示, 重楼皂苷I可以细胞不同程度的上调Cleaved-caspase3、Bax蛋白质水平, 下调

Bcl-2蛋白质水平, 且差异均具有显著性($P<0.05$)。

2.4 重楼皂苷I对HepG2细胞GRP78、ATF-6、IRE-1 mRNA水平的影响

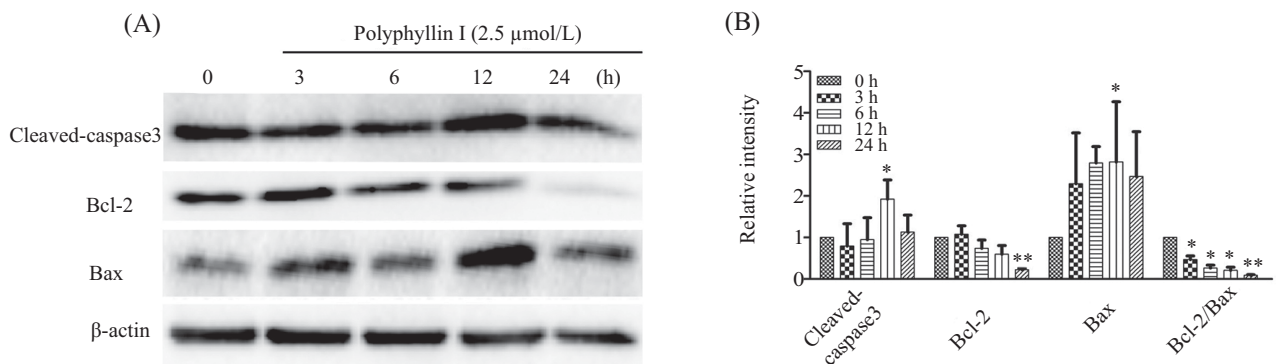
根据2.1计算出的 IC_{50} , 我们选用2.5 $\mu\text{mol/L}$ 的重楼皂苷I刺激HepG2细胞, 分别于0、1、3、6、12 h后提取mRNA检测内质网通路相关分子GRP78、ATF-6、IRE-1的mRNA水平。与阴性对照组(0 h)相比, GRP78 mRNA水平在PPI刺激6 h后显著升高($P<0.05$); IRE-1 mRNA水平在PPI刺激3 h后极显著



A: 阴性对照组; B: 1 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I组; C: 2 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I组; D: 3 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I组; E: 4 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I组; F: 5 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I组; G: 凋亡细胞数的定量分析。 ** $P<0.01$, 与阴性对照组比较(即0 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I组)。箭头所示为凋亡的细胞。

A: negative control group; B: 1 $\mu\text{mol/L}$ polyphyllin I group; C: 2 $\mu\text{mol/L}$ polyphyllin I group; D: 3 $\mu\text{mol/L}$ polyphyllin I group; E: 4 $\mu\text{mol/L}$ polyphyllin I group; F: 5 $\mu\text{mol/L}$ polyphyllin I group; G: the quantitative analysis of the apoptotic cell number. ** $P<0.01$ compared with the group of negative control. Arrows indicated the apoptotic cells.

图3 重楼皂苷I诱导HepG2细胞凋亡
Fig.3 PPI induced apoptosis in HepG2 cells



A: 采用Western blot方法检测凋亡相关蛋白; B: 统计各蛋白的相对光密度值。 * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与阴性对照组(0 h)比较。

A: apoptosis-related proteins were examined by Western blot assay; B: the relative intensity of proteins were shown as a bar graph. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs negative control group (0 h).

图4 重楼皂苷I对HepG2细胞Cleaved-caspase3、Bax和Bcl-2蛋白质水平的影响

Fig.4 The effect of PPI on the levels of Cleaved-caspase3, Bax and Bcl-2 proteins in HepG2 cells

升高($P < 0.01$), 12 h时达到最大值, 约为阴性对照组的2.1倍; 但*GRP78*和*IRE-1* mRNA水平并没有呈时间依赖性增加; *ATF-6*和*PERK* mRNA水平有所升高, 但无统计学意义($P > 0.05$)(图5)。

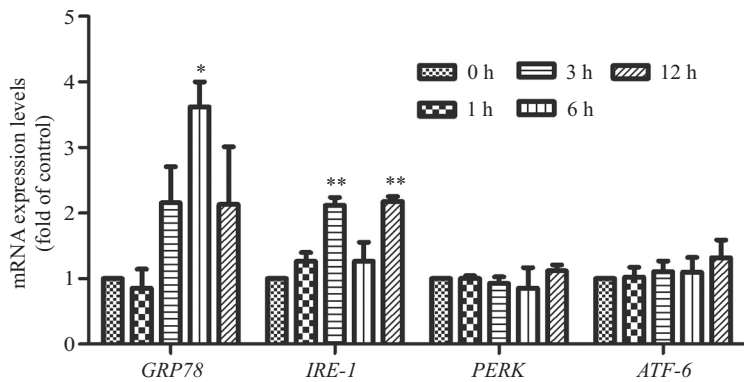
2.5 重楼皂苷I对HepG2细胞内质网应激相关蛋白质水平的影响

qRT-PCR实验结果显示, 处于内质网应激上游的因子只有*GRP78*和*IRE-1* mRNA水平增加, 因此, 进一步采用Western blot方法检测IRE-1通路相关蛋白质水平。结果如图6所示, 与阴性对照组(0 h)

比较, Cleaved-caspase12蛋白质水平在PPI刺激12 h时显著升高($P < 0.05$), Caspase-12在12 h时显著降低($P < 0.05$), 其降低趋势与Cleaved-caspase12升高趋势表现一致。此外, IRE-1蛋白质水平在6 h时极显著升高($P < 0.01$), 而其通路下游的XBP1及磷酸化的JNK1在24 h时显著降低($P < 0.05$), 但CHOP蛋白质的变化无统计学意义($P > 0.05$)。

2.6 内质网抑制剂4-PBA对HepG2细胞形态学及凋亡的影响

2.6.1 4-PBA加入前后对HepG2细胞数量及形态学

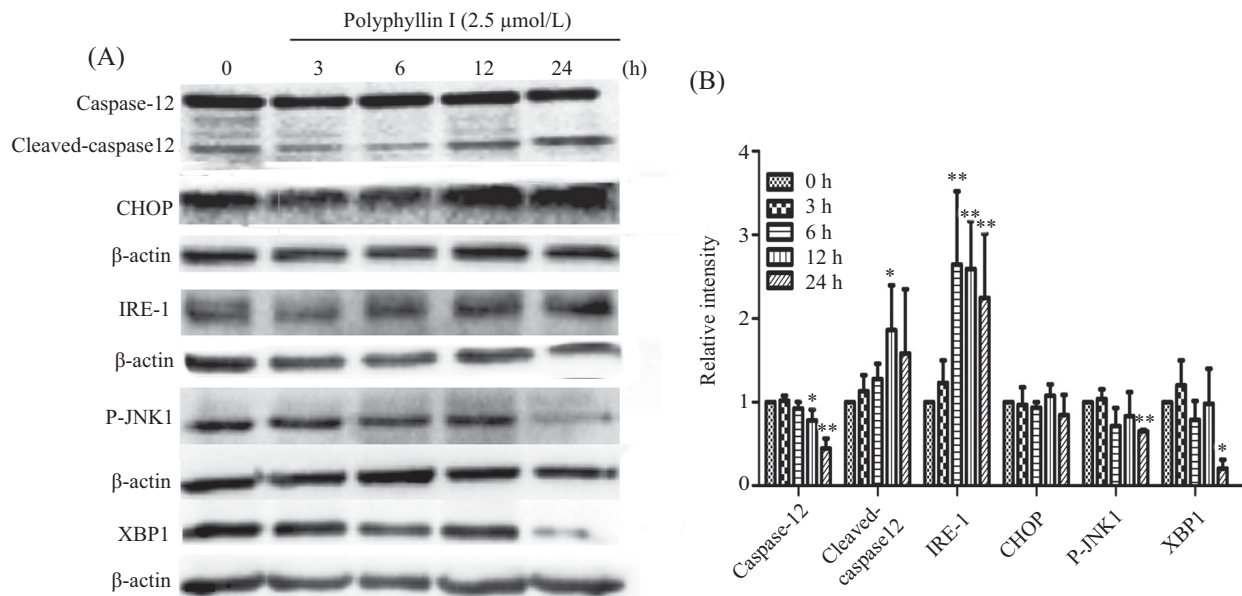


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与阴性对照组(0 h)比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs negative control group (0 h).

图5 重楼皂苷I对HepG2细胞mRNA水平的影响

Fig.5 The effect of PPI on mRNA level in HepG2 cells



A: 采用Western blot方法检测内质网应激通路相关蛋白; B: 统计各蛋白的相对光密度值。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与阴性对照组(0 h)比较。

A: endoplasmic reticulum stress related proteins were examined by Western blot assay; B: the relative intensity of proteins were shown as a bar graph.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs negative control group (0 h).

图6 重楼皂苷I对HepG2细胞Cleaved-caspase12、Caspase-12、IRE-1、CHOP、XBP1和P-JNK1蛋白质水平的影响

Fig.6 The effect of PPI on the levels of Cleaved-caspase12, Caspase-12, IRE-1, CHOP, XBP1 and P-JNK1 proteins in HepG2 cells

的影响 20 mmol/L的4-PBA预处理细胞2 h后加入2.5 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I刺激12 h, 观察细胞形态学变化。结果如图7所示, 只添加4-PBA的预处理组细胞形态饱满, 轮廓清晰, 与阴性对照组的细胞状态一致, 说明20 mmol/L的4-PBA预处理细胞2 h期间不会对细胞产生细胞毒性。2.5 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I组及其与4-PBA联合组的细胞形态都发生明显改变, 如细胞皱缩, 细胞数量明显减少, 贴壁性差。但联合组细胞状态较之重楼皂苷I单独作用组又有明显差别, 重楼皂苷I单独作用组尚有正常细胞存在, 而联合组几乎无可见活细胞。这说明加入内质网抑制剂4-PBA后, 抑制了内质网应激, 使HepG2细胞的死亡率增加。

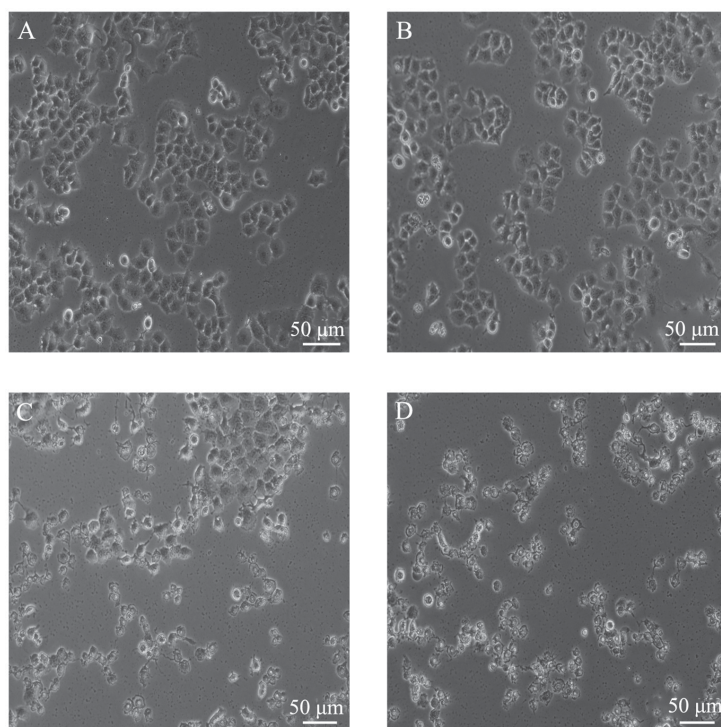
2.6.2 Hoechst 33258荧光染色检测细胞凋亡 结果如图8所示, 阴性对照组和4-PBA组细胞边缘清晰, 细胞核近似圆形, 染色均匀, 呈淡蓝色荧光(图8A和图8B)。2.5 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I处理组可见部分细胞核为凋亡细胞核形态(图8C), 而2.5 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I与4-PBA联合组多数细胞体积变小、核固缩, 核内可见致密的蓝色颗粒状强荧光(图8D), 与重楼皂苷I单独作用组比较有明显差别。该结果显示, 在内质

网应激被抑制以后, HepG2细胞的凋亡率反而升高, 说明内质网应激在重楼皂苷I诱导HepG2细胞凋亡过程中对细胞起到保护作用。

2.6.3 流式细胞术检测细胞凋亡率的变化 由2.6.1和2.6.2结果可知, 4-PBA不会对HepG2细胞产生毒性, 也不影响HepG2细胞的凋亡, 所以在该部分实验未单独设立4-PBA组。结果如图9所示, 与阴性对照组(3.0% \pm 1.1%)比较, 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I处理组(27.5% \pm 9.9%)和4-PBA+2.5 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I联合作用组(54.49% \pm 12.21%)的细胞凋亡率均显著增加($P<0.05$), 且重楼皂苷I单独作用组与联合作用组比较也差异显著, 具有统计学意义($P<0.05$)。本结果与2.6.2中Hoechst 33258荧光染色结果一致。

3 讨论

重楼皂苷作为抗癌药, 已广泛应用于消化系统肿瘤、肺癌、鼻咽癌等的治疗。本研究结果表明, 重楼皂苷I作用于肝癌HepG2细胞后对细胞增殖有明显的抑制作用, 且与药物浓度及作用时间成正比关系。同时, 通过观察经重楼皂苷I刺激后的细胞形态和密度的改变, 确定重楼皂苷I能够有效地促进

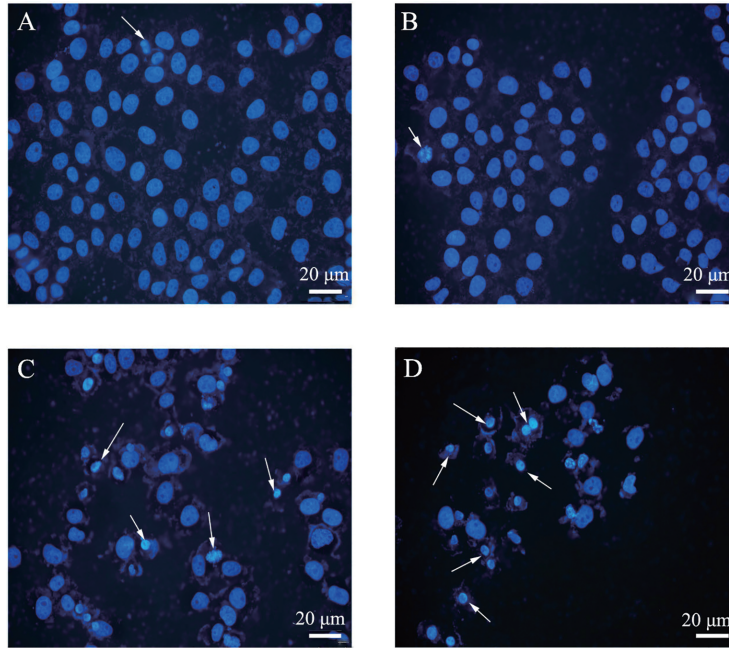


A: 阴性对照组; B: 4-PBA组; C: 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I组; D: 4-PBA+2.5 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷I组。

A: negative control group; B: 4-PBA group; C: 2.5 $\mu\text{mol/L}$ polyphyllin I group; D: 4-PBA+2.5 $\mu\text{mol/L}$ polyphyllin I group.

图7 4-PBA加入前后细胞形态学变化

Fig.7 The changes of cell morphology after treatment with 4-PBA

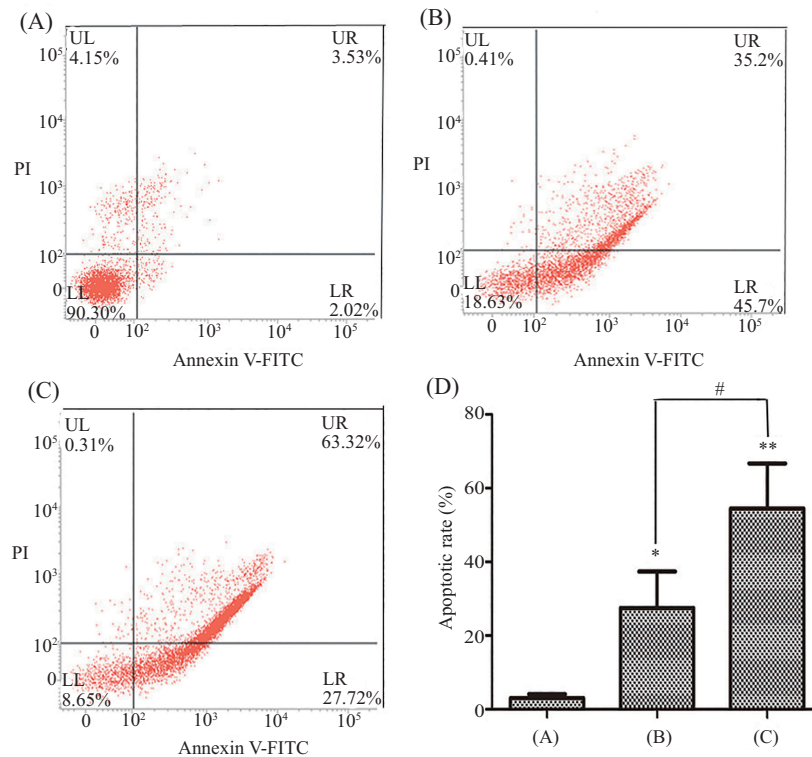


A: 阴性对照组; B: 4-PBA组; C: 2.5 μmol/L重楼皂苷I组; D: 4-PBA+2.5 μmol/L重楼皂苷I组。箭头所示为凋亡的细胞。

A: negative control group; B: 4-PBA group; C: 2.5 μmol/L polyphyllin I group; D: 4-PBA+2.5 μmol/L polyphyllin I group. Arrows indicated the apoptotic cells.

图8 4-PBA加入前后细胞核形态学变化

Fig.8 The changes of nuclear morphology after treatment with 4-PBA



A: 阴性对照组; B: 2.5 μmol/L重楼皂苷I组; C: 4-PBA+2.5 μmol/L重楼皂苷I组; D: HepG2细胞凋亡率。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与阴性对照组比较; # $P < 0.05$ 。

A: negative control group; B: 2.5 μmol/L polyphyllin I group; C: 4-PBA+2.5 μmol/L polyphyllin I group; D: apoptotic rate of HepG2 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs negative control group; # $P < 0.05$.

图9 4-PBA加入前后细胞凋亡率的变化

Fig.9 The changes of apoptotic rate after treatment with 4-PBA

HepG2细胞的死亡。按照细胞死亡的特点,大致可以分为3种:程序性细胞死亡(细胞凋亡)、病理性细胞死亡(坏死)和自噬性细胞死亡^[10]。为明确重楼皂苷I诱导细胞死亡的类型,采用Hoechst 33258染色检测HepG2细胞是否发生了凋亡以及结合Western blot方法检测细胞凋亡相关的蛋白质Cleaved-caspase3、Bax、Bcl-2水平。实验结果表明,重楼皂苷I引起的细胞死亡中,细胞凋亡占据了绝大比例,且细胞凋亡比例也呈浓度依赖性增加。在明确了细胞凋亡为主要途径的基础上,对其机制探讨具有重要的指导意义。

目前,有关ERS与细胞凋亡之间联系的研究受到广泛关注。ERS介导的细胞凋亡是有别于线粒体通路和死亡受体通路独立存在的一条凋亡途径,其在肿瘤的发生发展过程中起着关键性作用。当内质网处于应激的情况下,积聚的蛋白质使ERS感受蛋白质(PERK、IRE-1和ATF6)与GRP78解离,激活感受蛋白质及未折叠蛋白质反应,在转录和翻译水平分别介导3条不同的信号通路^[11]。本研究采用qRT-PCR技术检测3种感受蛋白质,发现只有IRE-1 mRNA水平显著上调,而PERK和ATF6 mRNA水平却无明显改变,其原因可能是PPI在诱导HepG2细胞凋亡的过程中只会选择性的激活相关因子,这也说明重楼皂苷I在HepG2细胞中诱导内质网应激反应可能主要是通过IRE-1途径。因此,本文进一步的研究主要是IRE-1途径相关因子的表达情况。

在IRE-1信号通路上,激活的IRE-1可以招募TRAF2以及ASK1共同形成IRE-1-TRAF2-ASK1复合物,该复合物可以激活JNK,启动其下游凋亡信号^[12]。同时,IRE-1的自身磷酸化激活其RNA酶活性,切割XBPI mRNA,改变XBPI mRNA的开放阅读框,剪切后的翻译产物XBPI-s,是一个具有很强转录活性的转录因子,在转录水平调节蛋白质折叠的相关基因表达^[14]。Caspase-12是ERS诱导细胞凋亡的特异性启动蛋白酶,其活化是凋亡的中心环节。研究表明,Caspase-12只与内质网应激介导的凋亡有关,而非内质网应激介导的凋亡无关^[17]。ERS可特异地激活Caspase-12酶原,激活的Caspase-12移位到细胞质剪切Caspase-9并使之激活,激活的Caspase-9又能激活Caspase-3,最终导致细胞凋亡^[13]。CHOP是内质网应激特异的转录因子,在ERS诱导细胞凋亡中发挥促凋亡作用^[15]。本研究结果显示,HepG2细胞经

IC₅₀浓度的重楼皂苷I刺激后,IRE-1蛋白质水平显著增加,Caspase-12剪切被激活,说明在重楼皂苷I诱导HepG2细胞凋亡的过程中发生了内质网应激。作为IRE-1信号通路下游的关键蛋白质,JNK1的磷酸化被显著抑制,XBPI水平也显著降低,促凋亡蛋白质CHOP的水平在各处理组间无统计学意义。由以上结果推断,重楼皂苷I诱导的HepG2细胞凋亡不是由内质网应激介导的。

4-PBA是一种低分子游离脂肪酸,可以稳定蛋白质合成,增加蛋白质的折叠能力,抑制内质网应激,恢复细胞内环境的稳态。为了进一步验证ERS在重楼皂苷I诱导HepG2细胞凋亡中的作用,我们采用4-PBA预处理细胞2 h,结果显示,4-PBA+2.5 μmol/L重楼皂苷I联合作用组与2.5 μmol/L重楼皂苷I单独作用组比较,致密浓染的细胞核明显增加,细胞凋亡率也显著升高,表明4-PBA进一步增加了重楼皂苷I诱导HepG2细胞的凋亡。由此得出结论:ERS在重楼皂苷I诱导HepG2细胞凋亡过程中对细胞起到保护作用,当加入内质网抑制剂4-PBA后,降低了ERS对细胞凋亡的保护作用,从而导致细胞凋亡率升高。

重楼皂苷I对不同细胞的作用不同,Siu等^[16]在重楼皂苷I诱导肺癌细胞凋亡中的研究发现,重楼皂苷I可通过上调GRP78和CHOP蛋白质水平促进内质网应激诱导细胞凋亡,这可能是由于不同肿瘤中重楼皂苷I调控细胞凋亡的靶点可能存在较大差异。细胞凋亡机制非常复杂,本研究仅初步探讨了内质网应激在重楼皂苷I诱导HepG2细胞凋亡中的作用,重楼皂苷I诱导肿瘤细胞凋亡的具体机制还有待全面深入的研究。

参考文献 (References)

- 1 Wang Y, Zhao Y, Zhu C, Li X, Zhang Z, Yuan Y, et al. Asterosaponin I induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in A549 human lung cancer cells. *Oncol Rep* 2011; 26(4): 919-24.
- 2 Li X, Zhang K, Li Z. Unfolded protein response in cancer: the Physician's perspective. *J Hematol Oncol* 2011; 4(1): 8-17.
- 3 赵保胜,朱寅荻,马勇,桂海水,徐敬海. 中药重楼研究进展. 中国实验方剂学杂志(Zhao Baosheng, Zhu Yinhuo, MA Yong, Gui Haishui, Xu Tunhai. *Advances in studies on Paridis rhizoma*. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae) 2011; 17(11): 267-70.
- 4 Shi YM, Yang L, Geng YD, Zhang C, Kong LY. Polyphyllin I induced-apoptosis is enhanced by inhibition of autophagy in human hepatocellular carcinoma cells. *Phytomedicine* 2015; 22(13): 1139-49.

- 5 Cheung YN, Ong CY, Suen YK, Ooi V, Wong NC, Mak CW, *et al.* Polyphyllin D is a potent apoptosis inducer in drug-resistant HepG2 cells. *Cancer Lett* 2005; 217(2): 203-11.
- 6 Sakaki K, Yoshina S, Shen X, Han J, Desantis MR, Xiong M, *et al.* RNA surveillance is required for endoplasmic reticulum homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(21): 8079-84.
- 7 Pagliarini V, Giglio P, Bernardoni P, De ZD, Fimia GM, Piacentini M, *et al.* Downregulation of E2F1 during ER stress is required to induce apoptosis. *J Cell Sci* 2015; 128(6): 1166-79.
- 8 Chen J, Wei H, Xie B, Wang B, Cheng J, Cheng J. Endoplasmic reticulum stress contributes to arsenic trioxide-induced apoptosis in drug-sensitive and resistant leukemia cells. *Leukemia Res* 2012; 36(12): 1526-35.
- 9 杨双艳. 内质网应激介导的PERK-eIF2 α -ATF4信号通路在牵张力作用下牙周膜干细胞成骨向分化中的作用研究. 山东大学(博士论文)(Study of PERK-eIF2 α -ATF4 pathway mediated by endoplasmic reticulum stress response in hPDLSCs osteogenic differentiation induced by cyclic stretch. Shandong University), 2016.
- 10 崔天盆, 郑承红, 陈杰, 苏斌涛. 细胞死亡方式及其清除. 中国免疫学杂志(Cui Tianpen, Zheng Chenghong, Chen Jie, Su Bintao. The patterns of cell death and clear. *Chinese Journal of Immunology*) 2014; 6: 843-6.
- 11 Wolfson JJ, May KL, Thorpe CM, Jandhyala DM, Paton JC, Paton AW. Subtilase cytotoxin activates PERK, IRE1 and ATF6 endoplasmic reticulum stress-signalling pathways. *Cell Microbiol* 2008; 10(9): 1775-86.
- 12 Liu H, Yang J, Li L, Shi W, Yuan X, Wu L. The natural occurring compounds targeting endoplasmic reticulum stress. *Evid Based Compl Alt Med* 2016; 2016(5a): 1-13.
- 13 孙丽娜, 周东方, 周俊芳, 赵彩彦, 甄真. 内质网应激在大鼠酒精性肝病肝细胞凋亡中的作用. 中华肝脏病杂志(Sun Lina, Zhou Dongfang, Zhou Junfang, Zhao Caiyan, Zhen Zhen. Contribution of endoplasmic reticulum stress to hepatocyte apoptosis in alcoholic liver disease. *Chinese Journal of Hepatology*) 2012; 20(1): 35-9.
- 14 Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001; 107(7): 881-91.
- 15 Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 2004; 11(4): 381-9.
- 16 Siu FM, Ma DL, Cheung YW, Lok CN, Yan K, Yang Z, *et al.* Proteomic and transcriptomic study on the action of a cytotoxic saponin(Polyphyllin D): induction of endoplasmic reticulum stress and mitochondria-mediated apoptotic pathways. *Proteomics* 2008; 8(15): 3105-17.
- 17 Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, *et al.* Caspase-12 mediates ER-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid β . *Nature* 2000; 403(6765): 98-103.