

黄芪皂苷IV对食管癌细胞凋亡、干细胞样特性和PI3K/AKT通路的影响

胡建丽*, 章春芝, 李倩, 王晓芳, 杜丽佳, 王大伟

河北北方学院附属第一医院 胸外科, 河北 张家口 075000

【摘要】 目的 探讨黄芪皂苷IV(astragaloside IV, AS-IV)对食管癌TE-1细胞凋亡、干细胞样特性和PI3K/AKT通路的影响。方法 将TE-1细胞分为四组:空白对照组、黄芪皂苷IV 20 μg/ml组、黄芪皂苷IV 40 μg/ml组和黄芪皂苷IV 80 μg/ml组。给予各组细胞不同的黄芪皂苷IV药物浓度处理48 h后采用CCK-8法检测细胞存活率,成球实验检测干细胞成球情况,流式细胞术检测细胞凋亡,Western印迹法检测凋亡相关蛋白、干细胞标志蛋白和PI3K/AKT通路蛋白,以及免疫荧光检测AKT膜定位情况。**结果** 与空白对照组比较,黄芪皂苷IV 40、80 μg/ml组显著增加细胞凋亡率,显著上调caspase-3和caspase-9蛋白表达($P<0.05$);黄芪皂苷IV 40、80 μg/ml组显著减小干细胞成球球体直径及球体数量($P<0.05$);黄芪皂苷IV 40、80 μg/ml组显著下调干细胞标志蛋白SOX2、OCT4和CD44的表达($P<0.05$);黄芪皂苷IV 40、80 μg/ml组显著下调通路蛋白PI3K和AKT磷酸化水平,显著抑制AKT膜定位($P<0.05$)。**结论** 黄芪皂苷IV可诱导TE-1细胞凋亡,抑制干细胞样特性,其作用机制可能与抑制PI3K/AKT通路活化有关。

【关键词】 黄芪皂苷IV; TE-1细胞; 细胞凋亡; 干细胞特性; AKT通路

Effects of Astragaloside IV on apoptosis, stem cell-like characteristics and PI3K/AKT pathway of esophageal carcinoma cells

Hu Jianli*, Zhang Chunzhi, Li Qian, Wang Xiaofang, Du Lijia, Wang Dawei

Department of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei, China

*Corresponding author: Hu Jianli, E-mail: hujianli851121@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of astragaloside IV (AS-IV) on apoptosis, stem cell-like characteristics and PI3K/AKT pathway of esophageal cancer TE-1 cells. **Method** TE-1 cells were divided into four groups: blank control group, astragaloside IV 20 μg/ml group, astragaloside IV 40 μg/ml group and astragaloside IV 80 μg/ml group. After 48 h of treatment with different concentrations of astragaloside IV, the cell survival rate was detected by CCK-8 method, the pellet formation of stem cells was detected by pellet formation assay, cell apoptosis was detected by flow cytometry, apoptosis-related proteins, stem cell marker proteins and PI3K/AKT pathway proteins were detected by Western Blot. And the localization of AKT membrane was detected by immunofluorescence. **Result** Compared with blank control group, astragaloside IV 40 and 80 μg/ml groups significantly increased the apoptosis rate, and significantly up-regulated the protein expression of caspase-3 and caspase-9 ($P<0.05$). Astragaloside IV 40 and 80 μg/ml groups significantly decreased the diameter and number of stem cell spherules ($P<0.05$); Astragaloside IV 40 and 80 μg/ml groups significantly down-regulated the expression of stem cell marker proteins SOX2, OCT4 and CD44 ($P<0.05$). Astragaloside IV 40 and 80 μg/ml groups significantly down-regulated the phosphorylation levels of pathway protein PI3K and AKT, and significantly inhibited AKT membrane localization ($P<0.05$). **Conclusion** Astragaloside IV can induce apoptosis of TE-1 cells and inhibit stem cell-like properties, which may be related to inhibition of PI3K/AKT pathway activation.

【Key words】 Astragaloside IV; TE-1 cells; Apoptosis; Stem cell characteristics; AKT pathway

* 通信作者: 胡建丽, E-mail: hujianli851121@163.com

食管癌是最常见的癌症之一,被列为癌症相关死亡的第四大原因^[1]。食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是食管癌的主要类型之一,起源于食管上皮细胞,在我国发病率较高,60%~70%的患者已达中晚期,失去了根治性手术治疗的机会^[2]。食管鳞状细胞癌的危险因素包括烟草、酒精、热饮和不良饮食习惯。目前主要的治疗方法是手术,如早期食管鳞状细胞癌的内镜下黏膜切除,较严重的则需要化疗辅助或放疗^[3]。顺铂、长春碱、博来霉素等辅助化疗已应用于食管癌的治疗^[4]。为了扩充药物选择性范围,寻找潜在疗效的新药具有重要意义。

中药黄芪是豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根,作用非常广泛,对心血管疾病有很高的应用价值^[5]。黄芪主要含皂苷、黄酮、多糖、生物碱及氨基酸等多种成分,黄芪皂苷IV(astragaloside IV)是从黄芪中分离提纯的一种三萜类皂苷,具有改善心肌功能等作用^[6]。近年来,研究表明,黄芪皂苷IV对某些肿瘤细胞具有抑癌的功效:黄芪皂苷IV通过抑制AKT/NF- κ B信号通路增强前列腺癌对卡铂的敏感性^[7];通过抑制内质网应激和自噬,使非小细胞肺癌细胞对顺铂敏感^[8]。本研究重点探讨黄芪皂苷IV如何对食管鳞状细胞癌TE-1细胞的凋亡及干细胞样特性的产生影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 食管鳞状细胞癌TE-1细胞购自武汉Procell公司;细胞计数试剂盒(cell counting kit 8, CCK8)、胰蛋白酶、10 mg/ml RnaseA、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、ECL试剂购自北京索莱宝科技有限公司;表皮生长因子、无血清达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)购自美国Sigma公司;20 ng/ml碱性成纤维细胞生长因子、2% B27、F12培养基购自美国Invitrogen公司;BCA试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;抗体半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)、半胱氨酸蛋白酶-8(caspase-8)、肌动蛋白(β -actin)、性别决定相关基因簇2(sex determining region Y-box 2, SOX2)、八聚体结合转录因子4(octamer-binding transcription factor 4, OCT4)、归巢细胞黏附分子(homing cell adhesion molecule, CD44)、磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、磷酸化PI3K

(phosphorylation PI3K, p-PI3K)、蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)、磷酸化AKT(phosphorylation AKT, p-AKT)、Alexa Fluor[®] 488偶联物、DAPI均购自美国CST公司。Multiskan FC酶标仪购自美国Thermo Fisher公司;FACScan流式细胞仪购自美国Becton Dickinson公司。

1.2 CCK-8法检测存活率并分组 将TE-1细胞接种至96孔板,每孔1500个细胞,分别用0、2.5、5、10、20、40、80、160、320 μ g/ml的黄芪皂苷IV处理细胞,在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂条件下培养24 h。将10 μ l CCK-8溶液添加至上述孔中,再培养2 h。用Multiskan FC多功能酶标仪分析每孔在450 nm下的吸光度值,并绘制生长曲线。通过计算黄芪皂苷IV对TE-1细胞的IC₅₀值,将细胞分为四组:空白对照组、黄芪皂苷IV 20 μ g/ml组、黄芪皂苷IV 40 μ g/ml组和黄芪皂苷IV 80 μ g/ml组,分别采用0、20、40、80 μ g/ml剂量黄芪皂苷IV处理TE-1细胞48 h。

1.3 流式细胞术检测凋亡 将转染后的各组细胞按照5 \times 10⁶个/孔接种到96孔板,离心后弃培养基,用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤2次,弃上清液,加入Annexin V-FITC溶液重悬细胞,避光孵育10 min,离心弃上清液,碘化丙啶(propidium iodide, PI)避光孵育10 min后用流式细胞仪检测各组TE-1细胞凋亡率,实验重复3次。

1.4 细胞成球实验检测干细胞成球情况 将各组TE-1细胞计数后铺至超低黏附96孔板。每孔加入100 μ l F12成球培养基,含10个活细胞,各铺10个复孔。静置培养14 d后倒置显微镜下观察球体直径和球体数量。

1.5 Western印迹法检测蛋白表达 将各组TE-1细胞加裂解液后提取总蛋白,用BCA试剂盒检测蛋白含量。十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶电泳分离蛋白转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,加入一抗(caspase-3、caspase-9、 β -actin、SOX2、OCT4、CD44、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT),4 $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST洗膜,加入二抗HRP-IgG,室温孵育1 h, TBST洗膜。通过Image Lab[™]软件行灰度值分析。

1.6 免疫荧光检测AKT的阳性定位 细胞被接种在玻璃盖玻片上,0.5% Triton X-100渗透20 min,然后用5%牛血清白蛋白封闭细胞30 min,与抗

体(AKT)在4℃孵育过夜。随后,用PBS洗涤细胞,用Alexa Fluor® 488偶联物孵育,用DAPI重新染色。细胞质呈现明显绿色荧光颗粒的细胞为阳性细胞。
 1.7 统计学方法 采用SPSS 20.0软件进行数据分析,所有计量资料均采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行比较,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪皂苷IV对TE-1细胞活力的影响 用不同浓度(2.5、5、10、20、40、80、160、320 μg/ml)的黄芪皂苷IV处理TE-1细胞。CCK-8结果表明,与2.5 μg/ml浓度的黄芪皂苷IV比较,5、10 μg/ml黄芪皂苷IV对细胞存活率无显著影响,20、40、80、160、320 μg/ml黄芪皂苷IV显著降低细胞存活率($P<0.05$,图1),其抑制作用呈明显的剂量依赖性。
 2.2 黄芪皂苷IV对TE-1细胞凋亡的影响 流式细胞术检测细胞凋亡,与空白对照组比较,黄芪皂苷IV 20 μg/ml组的细胞凋亡率无明显变化,黄芪皂苷IV 40、80 μg/ml组的细胞凋亡率显著升高($P<0.05$)。Western印迹法检测凋亡相关蛋白,与空白对照组比较,黄芪皂苷IV 20 μg/ml组的裂解的

caspase-3/caspase-3和裂解的caspase-9/caspase-9蛋白表达无明显变化,黄芪皂苷IV 40、80 μg/ml组的裂解的caspase-3/caspase-3和裂解的caspase-9/caspase-9蛋白表达显著上调($P<0.05$)(图2)。由此可见,黄芪皂苷IV可诱导TE-1细胞凋亡。
 2.3 黄芪皂苷IV对TE-1细胞成球的影响 成球实验检测细胞成球情况,与空白对照组比较,黄芪皂苷IV 20 μg/ml组的球体直径无明显变化,黄芪皂苷IV 40、80 μg/ml组的球体直径显著减小($P<0.05$,图3A、B)。与空白对照组比较,黄芪皂苷IV 20 μg/ml组的球体数量无明显变化,黄芪皂苷IV 40、80 μg/ml组的球体数量显著减少($P<0.05$,

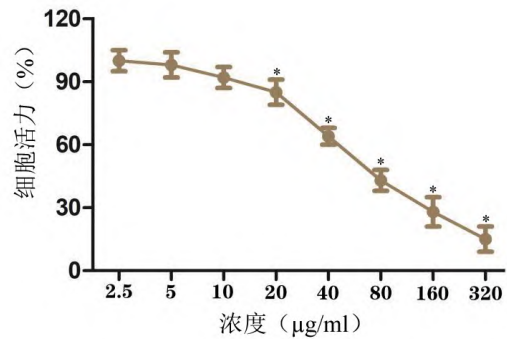


图1 黄芪皂苷IV对TE-1细胞存活率的影响 注:与2.5 μg/ml浓度的黄芪皂苷IV比较,* $P<0.05$ 。

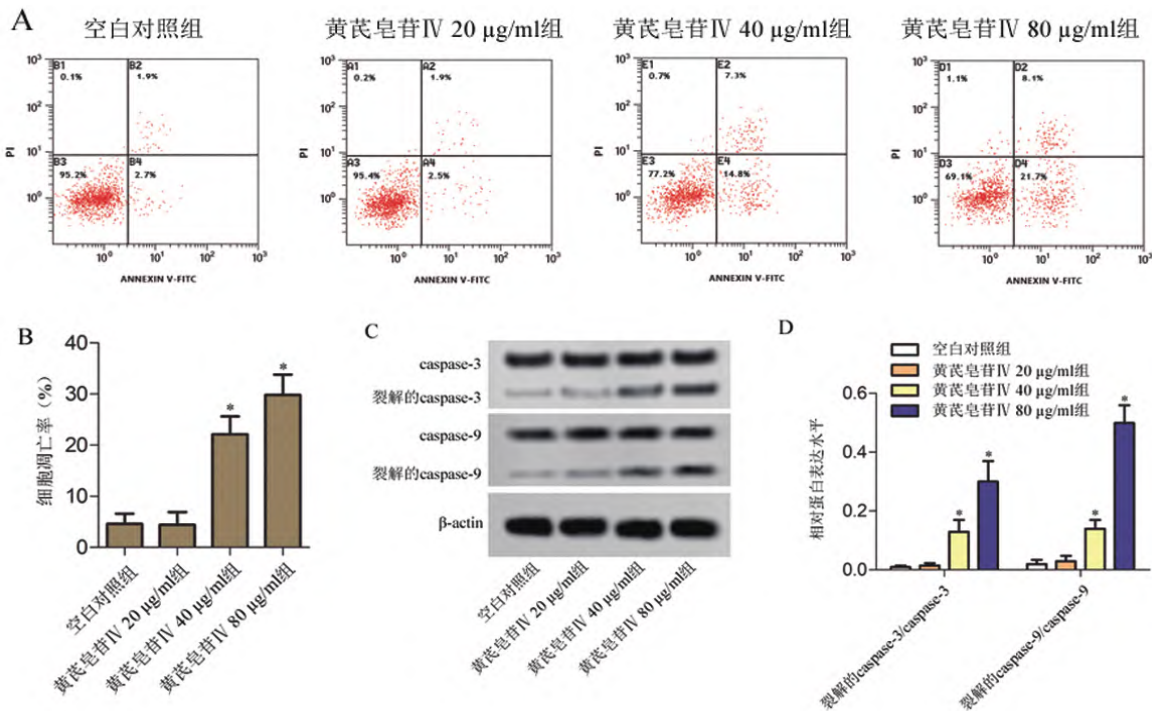


图2 黄芪皂苷IV对TE-1细胞凋亡的影响

注:A,流式细胞仪检测细胞凋亡;B,细胞凋亡率定量直方图;C,Western印迹法检测裂解的caspase-3/caspase-3、裂解的caspase-9/caspase-9蛋白表达;D,裂解的caspase-3/caspase-3、裂解的caspase-9/caspase-9蛋白表达定量直方图。与空白对照组比较,* $P<0.05$ 。

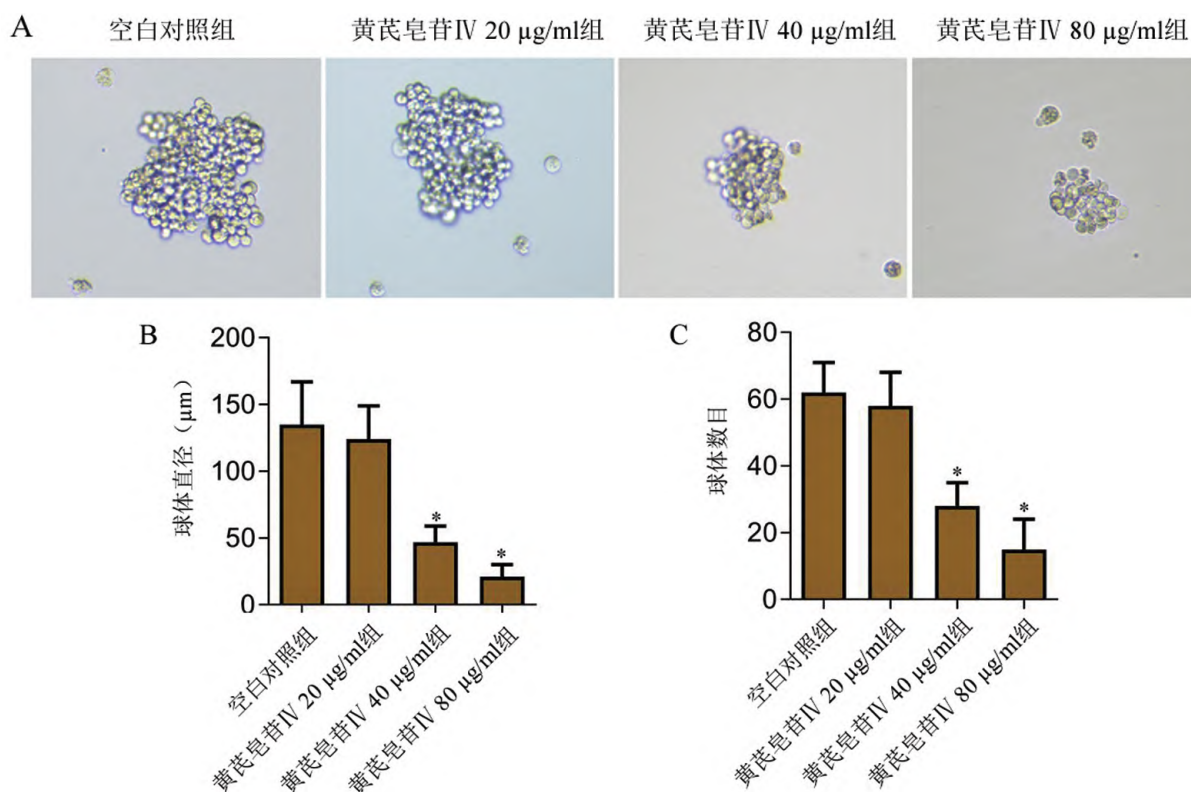


图3 黄芪皂苷IV对TE-1细胞成球的影响

注:A,细胞成球实验图像($\times 200$);B,球体直径定量直方图;C,球体数目定量直方图。与空白对照组比较,* $P < 0.05$ 。

图3A、C)。由此表明,黄芪皂苷IV可抑制TE-1细胞成球能力。

2.4 黄芪皂苷IV对TE-1细胞干细胞标志物的影响 与空白对照组比较,黄芪皂苷IV 20 $\mu\text{g/ml}$ 组的SOX2、OCT4、CD44蛋白表达无明显变化,黄芪皂苷IV 40、80 $\mu\text{g/ml}$ 组的SOX2、OCT4、CD44蛋白表达显著下调($P < 0.05$,图4A、B)。由此可见,黄芪皂苷IV可抑制TE-1干细胞样特性。

2.5 黄芪皂苷IV对通路蛋白PI3K和AKT活化的影响 与空白对照组比较,黄芪皂苷IV 20 $\mu\text{g/ml}$

组的PI3K和AKT蛋白磷酸化无明显变化,黄芪皂苷IV 40、80 $\mu\text{g/ml}$ 组的PI3K和AKT蛋白磷酸化显著降低($P < 0.05$,图5A、B)。免疫荧光结果显示,与空白对照组比较,黄芪皂苷IV 20 $\mu\text{g/ml}$ 组的AKT+定位无明显变化,黄芪皂苷IV 40、80 $\mu\text{g/ml}$ 组的AKT+定位显著减少($P < 0.05$,图5C、D)。上述实验均表明,黄芪皂苷IV可抑制通路蛋白PI3K和AKT蛋白磷酸化,从而阻碍PI3K/AKT通路活化。

3 讨论

90%食管癌患者为食管鳞状细胞癌,虽然医疗技术的进步,但预后仍不令人满意^[9]。因此,更好地了解食管鳞状细胞癌的分子机制对提高治疗的效果至关重要。局部麻醉对减少癌症复发有益处。有研究表明,黄芪皂苷通过调控miR-150-5p/catenin轴抑制肝癌的发生^[10]。也有报道称,黄芪皂苷通过TGF- β 介导的PI3K和MAPK通路抑制SiHa宫颈癌细胞的侵袭和转移^[11]。还有数据显示,黄芪皂苷抑制人结肠直肠癌细胞生长^[12]。本研究发现,一定浓度的黄芪皂苷IV对食管鳞状细胞癌TE-1细胞具有细胞毒性,裂解的caspase-3/

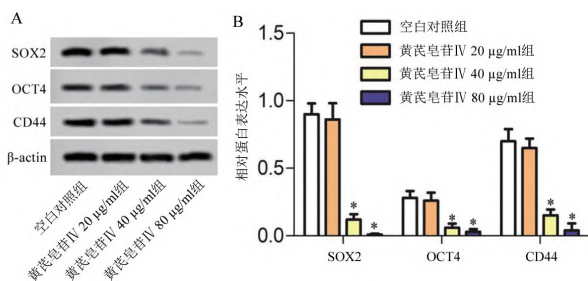


图4 黄芪皂苷IV对干细胞标志物的影响

注:A,Western印迹法检测裂解的SOX2、OCT4和CD44蛋白表达;B,SOX2、OCT4和CD44蛋白表达定量直方图。与空白对照组比较,* $P < 0.05$ 。

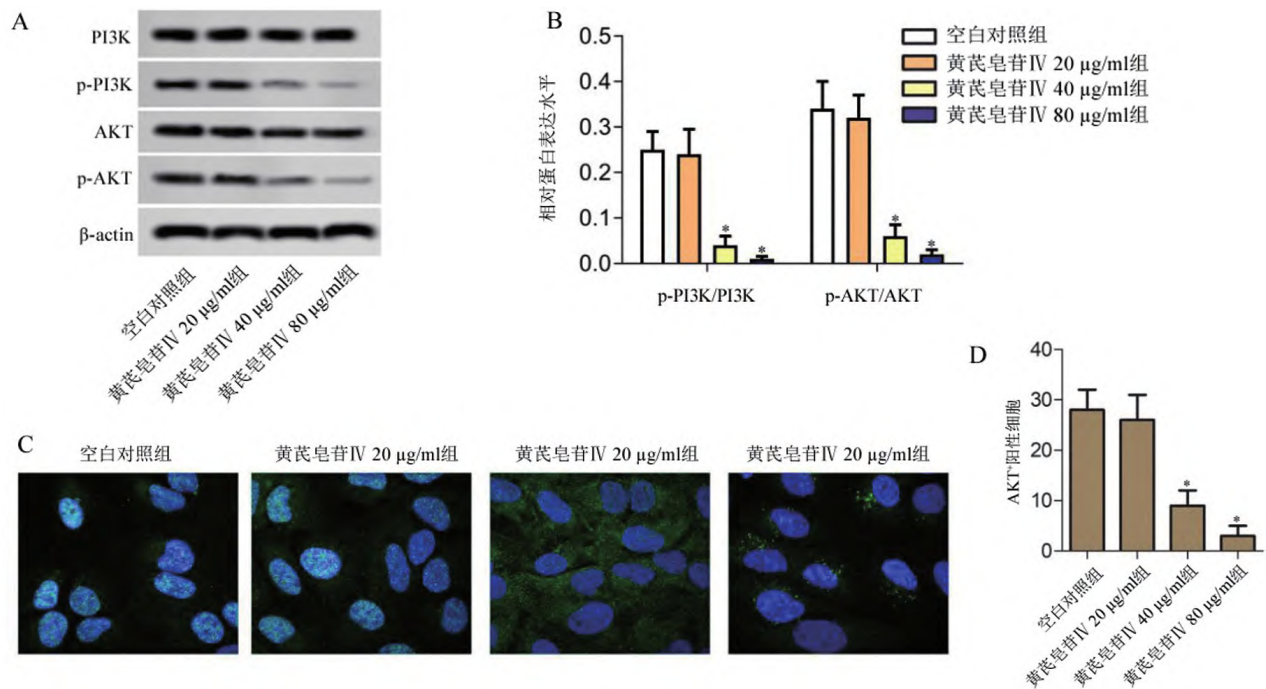


图5 黄芪皂苷IV对通路蛋白PI3K和AKT活化的影响

注:A, Western印迹法检测裂解的p-PI3K、PI3K、p-AKT和AKT蛋白表达;B, p-PI3K、PI3K、p-AKT和AKT蛋白表达定量直方图;C, 免疫荧光检测AKT+ (免疫荧光染色, $\times 200$);D, AKT+定量直方图。与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

caspase-3和裂解的caspase-9/caspase-9表达上调,促进细胞凋亡。提示黄芪皂苷IV可能对食管鳞状细胞癌具有抑制作用。

食管鳞状细胞癌预后不良的一个可能原因是肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSCs)^[13]。CSCs的一个特性是,当在补充了碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)的无血清培养基中培养时,干细胞能够以非贴壁球体的形式生长^[14]。近年来,非贴壁球培养已被用于丰富和鉴定干细胞或CSCs。SOX2、OCT、CD44是CSCs的重要标志,它们在许多类型的CSCs中被鉴定^[15]。高SOX2、OCT、CD44表达也与转移和侵袭能力有关^[16-17]。本研究的细胞成球实验显示,黄芪皂苷IV抑制了球体成球直径和球体数量,也下调了干细胞标志蛋白SOX2、OCT4、CD44的表达,这表明黄芪皂苷IV对食管鳞状细胞癌TE-1细胞的干细胞样特性有抑制作用。

AKT信号的不适当激活与食管鳞状细胞癌有关。AKT也被称为蛋白激酶B(PKB)是一个激活下游目标的丝/苏氨酸激酶,下游目标包括糖原合酶激酶(GSK)3 β ,雷帕霉素(mammalian target of

rapamycin, mTOR)的机制靶点, NF- κ B。这些激活信号的级联反应参与了增强癌症进展、增加细胞增殖和促进凋亡逃避^[18]。AKT为多种癌症的抗癌靶点,包括胃癌^[19]、卵巢癌^[20]和食管癌^[21]。研究表明洛铂通过PI3K/AKT通路促进食管鳞状细胞癌放射敏感性、诱导细胞凋亡、减弱癌症干性和抑制增殖^[22]。Capilliposide C通过PI3K/Akt/mTOR通路诱导细胞凋亡使食管鳞状细胞癌细胞对奥沙利铂敏感^[23]。本研究考察了PI3K和AKT通路蛋白的活化情况,黄芪皂苷IV抑制了PI3K/AKT的磷酸化,阻碍AKT在细胞膜上的定位,从而抑制了PI3K/AKT通路活化。这也表明黄芪皂苷IV对食管鳞状细胞癌的作用部分是通过PI3K/AKT通路参与的。

综上所述,黄芪皂苷IV可诱导食管鳞状细胞癌TE-1细胞凋亡并抑制干细胞样特性,这可能是通过阻碍PI3K/AKT通路激活实现的。

参考文献

- [1] JIANG Z, WANG J, SHEN Z, et al. Characterization of Esophageal Microbiota in Patients With Esophagitis and Esophageal Squamous Cell Carcinoma [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11:774330.

- [2] 刘艳春, 梁立, 孟立宁, 等. 转化生长因子- β 1 基因多态性与晚期食管鳞癌预后的相关性研究 [J]. 解放军医药杂志, 2022, 34(3):14-17.
- [3] 赵景娟, 夏琳, 付晶, 等. miR-138-5p 靶向 ZEB2 抑制食管鳞状细胞癌细胞的转移能力 [J]. 医学分子生物学杂志, 2020, 17(2):121-128.
- [4] YU J, WANG R, WU J, et al. Knockdown of Minichromosome Maintenance Proteins Inhibits Foci Forming of Mediator of DNA-Damage Checkpoint 1 in Response to DNA Damage in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma TE-1 Cells [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2016, 81(10):1221-1228.
- [5] ZHANG J, WU C, GAO L, et al. Astragaloside IV derived from *Astragalus membranaceus*: A research review on the pharmacological effects [J]. *Adv Pharmacol*, 2020, 87:89-112.
- [6] GONG G, YU H, ZHENG Y, et al. Astragaloside IV, a saponin from *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*, induces expressions of heme recycle proteins via signaling of Nrf2/ARE in cultured macrophages [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 265: 113389.
- [7] HE Y, ZHANG Q, CHEN H, et al. Astragaloside IV enhanced carboplatin sensitivity in prostate cancer by suppressing AKT/NF- κ B signaling pathway [J]. *Biochem Cell Biol*, 2021, 99(2): 214-222.
- [8] LAI ST, WANG Y, PENG F. Astragaloside IV sensitizes non-small cell lung cancer cells to cisplatin by suppressing endoplasmic reticulum stress and autophagy [J]. *J Thorac Dis*, 2020, 12(7):3715-3724.
- [9] 李大伟, 刘磊. miR-625 靶向 HMGA1 对食管癌细胞生物学行为的影响及机制 [J]. *临床误诊误治*, 2021, 34(11):107-112,116.
- [10] CUI X, JIANG X, WEI C, et al. Astragaloside IV suppresses development of hepatocellular carcinoma by regulating miR-150-5 p/ β -catenin axis [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2020, 78:103397.
- [11] ZHANG L, ZHOU J, QIN X, et al. Astragaloside IV inhibits the invasion and metastasis of SiHa cervical cancer cells via the TGF- β 1-mediated PI3K and MAPK pathways [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(5):2975-2986.
- [12] SUN P, LIU Y, WANG Q, et al. Astragaloside IV inhibits human colorectal cancer cell growth [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2019, 24(3):597-606.
- [13] ALMANAA TN, GEUSZ ME, JAMASBI RJ. Effects of curcumin on stem-like cells in human esophageal squamous carcinoma cell lines [J]. *Almanaa TN, Geusz ME, Jamasbi RJ*, 2012, 12: 195.
- [14] DUBASH TD, HOFFMANN CM, OPPEL F, et al. Phenotypic differentiation does not affect tumorigenicity of primary human colon cancer initiating cells [J]. *Cancer Lett*, 2016, 371(2): 326-333.
- [15] MATILAINEN H, YU XW, TANG CW, et al. Sphere formation reverses the metastatic and cancer stem cell phenotype of the murine mammary tumour 4T1, independently of the putative cancer stem cell marker Sca-1 [J]. *Cancer Lett*, 2012, 323(1): 20-28.
- [16] ZHANG C, GAO H, LI C, et al. TGF β 1 Promotes Breast Cancer Local Invasion and Liver Metastasis by Increasing the CD44 high/CD24 - Subpopulation [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2018, 17:1533033818764497.
- [17] LONG W, ZHAO W, NING B, et al. PHF20 collaborates with PARP1 to promote stemness and aggressiveness of neuroblastoma cells through activation of SOX2 and OCT4 [J]. *J Mol Cell Biol*, 2018, 10(2):147-160.
- [18] SONG M, LIU X, LIU K, et al. Targeting AKT with Oridonin Inhibits Growth of Esophageal Squamous Cell Carcinoma In Vitro and Patient-Derived Xenografts In Vivo [J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(7):1540-1553.
- [19] ALMHANNA K, STROBERG J, MALAFA M. Targeting AKT protein kinase in gastric cancer [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(12):4387-4392.
- [20] SASANO T, MABUCHI S, KURODA H, et al. Preclinical Efficacy for AKT Targeting in Clear Cell Carcinoma of the Ovary [J]. *Mol Cancer Res*, 2015, 13(4):795-806.
- [21] LI B, LI J, XU WW, et al. Suppression of esophageal tumor growth and chemoresistance by directly targeting the PI3K/AKT pathway [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(22):11576-11587.
- [22] PAN S, SUN Y, SUI D, et al. Lobaplatin promotes radiosensitivity, induces apoptosis, attenuates cancer stemness and inhibits proliferation through PI3K/AKT pathway in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102:567-574.
- [23] SHEN Z, XU L, LI J, et al. Capilliposide C Sensitizes Esophageal Squamous Carcinoma Cells to Oxaliplatin by Inducing Apoptosis Through the PI3K/Akt/mTOR Pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23:2096-2103.