

· 论 著 ·

绞股蓝皂苷 LI 与顺铂联用对食管癌 EC109 细胞生长的抑制作用

赵敏彤, 齐彦爽, 郝林瑶, 纪小桐, 朴香兰

(中央民族大学药学院, 北京 100081)

摘要: 目的 研究绞股蓝皂苷 LI (Gyp LI) 与顺铂(DDP)联用对食管癌 EC109 细胞存活的抑制作用, 以及对细胞凋亡、周期和迁移的影响。方法 ① 将 Gyp LI 0~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、DDP 0~800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、Gyp LI 3.125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +DDP 0~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 分别作用 EC109 细胞 24 h, MTT 法检测细胞存活率并计算半抑制浓度 (IC_{50}) 值, 利用 CompuSyn 软件计算联合指数 (CI)。② 将 EC109 细胞分为细胞对照组、Gyp LI 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、DDP 35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组及 Gyp LI 3.125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 DDP 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组, 给药 24 h 后, 显微镜下观察细胞形态, Annexin V-FITC/PI 双染、PI/RNase 染色和流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞周期, 采用划痕实验检测细胞迁移, Western 印迹法检测促凋亡因子 Bax、细胞色素 c、细胞周期蛋白 A、细胞周期蛋白 D1 和基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 蛋白表达。结果 ① Gyp LI 和 DDP 单用组 EC109 细胞存活率的 IC_{50} 值分别为 $(55.34\pm 3.52)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $(37.48\pm 2.99)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Gyp LI 3.125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与不同浓度 DDP 联用时, IC_{50} 值降至 $(8.05\pm 5.34)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CI 值均 <1 , 表明两药联用具有协同作用。② Gyp LI 与 DDP 联用时细胞出现生长缓慢、形态不规则、细胞脱落等特征。与细胞对照组比较, Gyp LI 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、DDP 35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和联用组的细胞凋亡率从 $(1.30\pm 0.08)\%$ 分别上升至 $(4.87\pm 0.04)\%$, $(6.44\pm 0.37)\%$ 和 $(9.12\pm 0.20)\%$ ($P<0.01$), 联用组细胞凋亡率比 DDP 单用组显著升高 ($P<0.01$)。Gyp LI 组、DDP 组和联用组细胞周期分别阻滞于 S 期, G_2/M 期和 G_0/G_1 期。与细胞对照组比较, Gyp LI 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、DDP 35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和联用组细胞迁移率从 $(29.54\pm 5.56)\%$ 分别降至 $(15.30\pm 3.64)\%$, $(13.61\pm 0.06)\%$ 和 $(5.95\pm 0.56)\%$ ($P<0.01$)。Western 印迹法结果显示, 与细胞对照组相比, DDP 35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和联用组促凋亡因子 Bax 表达水平均显著升高 ($P<0.01$), Gyp LI 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、DDP 35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和联用组细胞色素 c 表达水平均显著升高 ($P<0.01$), 其中联用组 Bax 和细胞色素 c 相对表达含量最高; 与细胞对照组相比, Gyp LI 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞周期蛋白 A 表达水平显著降低 ($P<0.01$), 联用组细胞周期蛋白 D1 表达水平显著降低 ($P<0.05$); 与细胞对照组相比, Gyp LI 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、DDP 35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和联用组 MMP-9 表达均下降 ($P<0.05$, $P<0.01$), 其中联用组 MMP-9 表达水平最低。结论 Gyp LI 具有较好的抑制 EC109 细胞存活作用, 与 DDP 联用能够协同抑制 EC109 细胞增殖, 联用机制可能与上调 Bax 和细胞色素 c 表达、下调细胞周期蛋白 D1 和 MMP-9 表达有关。

关键词: 绞股蓝皂苷 LI; EC109 细胞; 顺铂; 联合用药; 细胞凋亡; 细胞周期

中图分类号: R285.5, R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-3002-(2022)10-0746-08

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2022.10.004

食管癌是世界范围内常见的恶性肿瘤之一。中国为食管癌高发国家, 是我国发病率排名第六的恶性肿瘤, 发病率约占全世界食管癌患者 46.6%^[1-3]。目前主要采用手术、放疗和化疗方式治疗食管癌, 但效果仍不佳^[4]。顺铂 (cisplatin, DDP) 是临床使用的广谱抗癌药, 但其不良反应较大, 且易产生耐药性^[5-6]。因此, 中药在恶性肿瘤治疗中越来越受重

视。吴耀松等^[7]研究发现, 启膈散与 DDP 可协同抑制食管癌 EC-9706 细胞增殖; 尚艺婉等^[8]研究结果表明, 六君子汤通过影响细胞能量代谢增强 DDP 对食管癌 EC-9706 细胞增殖抑制作用。表明联合治疗前景比单一放化疗更广阔, 因此, 研究新的联合治疗方案以及寻找治疗食管癌新药具有重要意义。

肿瘤是因细胞丧失功能调控而表现出失控性生长, 其发病主要是由细胞周期调控紊乱和细胞凋亡规律失常引起。中药及复方可通过线粒体途径、内质网途径和死亡受体途径等诱导食管癌细胞凋亡^[9]。绞股蓝 [*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.)

基金项目: 北京市大学生创新训练计划项目 (BEIJ2020110030)

作者简介: 赵敏彤, 本科生, 从事抗肿瘤中药物质基础及作用机制研究。

通讯作者: 朴香兰, E-mail: xlpiao@muc.edu.cn

Makino)属于葫芦科绞股蓝属草质攀援植物,主要活性成分是皂苷类化合物。在壮医理论中,绞股蓝又名“国虾薄”,具有清热解毒和调节气机的作用^[10]。现代药理学研究表明,绞股蓝具有抗肿瘤^[11-13]、降血脂^[14]和降血糖^[15]等功效,其抗肿瘤作用靶点广泛,途径多样,与化疗药联用有增效作用^[16]。《中药大辞典》就曾记载,绞股蓝提取液对大鼠食管癌有一定的预防和治疗作用^[17];在临床上,曾将绞股蓝单独用药或联合化疗药治疗食管癌,并取得了不错的疗效^[18-19]。以绞股蓝等中药材为主要成分的志苓胶囊,也表现出能够缓解食管疾病的功效^[20]。绞股蓝皂苷 LI (gypenoside LI, Gyp LI) 是人参皂苷 20(R)-ginsenoside Rg3 的达玛烷型四环三萜化学编号为 2 的碳上连有羟基的化合物。本实验室前期发现, Gyp LI 能够抑制肺癌 A549 细胞和肝癌 HepG2 细胞存活,但对食管癌 EC109 细胞的抑制作用尚未见报道。如能在化疗药物中联用一定剂量的 Gyp LI 而减少 DDP 的用量,在降低不良反应的同时达到相同甚至更好的治疗效果,就能起到增效减毒的作用。因此,本研究探究 Gyp LI 与 DDP 联用对食管癌 EC109 细胞存活的抑制作用及其潜在机制,从而为食管癌的化疗提供更多的药物选择和治疗方案,为临床用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞、药物、试剂和主要仪器

人食管癌 EC109 细胞,北京协和细胞资源中心。DMEM 培养基,美国 Gibco 公司;PBS 和青链霉素混合液,北京索莱宝科技有限公司;胰酶、二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、DDP 和甘氨酸,美国 Sigma 公司;胎牛血清,以色列 Biological Industries 公司;Gyp LI,成都乐美天医药科技有限公司;Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、特超敏 ECL 化学发光试剂盒和细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;30% 丙烯酰胺溶液、牛血清白蛋白 V、4×SDS-PAGE 分离胶缓冲液、4×SDS-PAGE 浓缩胶缓冲液和 BCA 法蛋白定量试剂盒,北京兰博利德商贸有限公司;一抗:小鼠抗人 Bax 单克隆抗体、小鼠抗人细胞色素 c (cytochrome c, Cyt c) 单克隆抗体、兔抗人基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 多克隆抗体,武汉三鹰生物技术有限公司;小鼠抗人细胞周期蛋白 D1 和小鼠抗人细胞周期蛋白 A 单

克隆抗体,美国 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔 IgG 抗体(二抗)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(二抗)和小鼠抗人 β 肌动蛋白单克隆抗体,武汉赛维尔生物科技有限公司;脱脂奶粉,英国 OXOID 公司。流式细胞仪,美国 Beckman Coulter 公司;FlexStation 3 多功能酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;Olympus IX81 显微镜,日本 Olympus 公司。

1.2 MTT 法检测细胞存活率和联合指数计算

将对数生长期 EC109 细胞悬液密度调整为 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$,每孔 100 μL 接种于 96 孔板,于 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养至细胞融合 80% 后,将 Gyp LI (0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100 和 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、DDP (0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 和 800 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、Gyp LI 3.125 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + DDP (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 和 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别作用于 EC109 细胞 24 h,细胞对照组加等量含血清和终浓度为 0.01% DMSO 的培养基,空白组不接种细胞,加等量含血清的培养基。每组均设 3 个复孔。培养 24 h 后,每孔加入 MTT 溶液 20 μL ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 4 h 后弃上清,加入 DMSO 150 μL ,室温避光振荡,用酶标仪检测 490 nm 波长处吸光度 ($A_{490 \text{ nm}}$) 值。细胞存活率 (%) = (药物组 $A_{490 \text{ nm}}$ - 空白组 $A_{490 \text{ nm}}$) / (对照组 $A_{490 \text{ nm}}$ - 空白组 $A_{490 \text{ nm}}$) $\times 100\%$, 利用 GraphPad Prism 8 软件计算半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 值。选择 Chou-Talalay 联合指数法分析两药物之间相互作用效果,利用 CompuSyn 软件计算联合用药指数 (combination index, CI), $\text{CI} < 1$ 表示协同作用, $\text{CI} = 1$ 表示相加作用, $\text{CI} > 1$ 表示拮抗作用^[21]。

1.3 显微镜下观察细胞形态变化

将对数生长期 EC109 细胞悬液密度调至 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$,每孔 1 mL 接种于 6 孔板,待细胞融合 80% 后,设细胞对照组、Gyp LI 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组、DDP 35 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组和 Gyp LI 3.125 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + DDP 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 联用组,培养 24 h 后,光学倒置显微镜下观察细胞形态,拍照记录。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

取 1.3 分组处理的细胞,给药 24 h 后,收集细胞,采用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒染色,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.5 流式细胞术检测细胞周期

取 1.3 分组处理的细胞,给药 24 h 后,收集细胞, PBS 洗涤 2 次,加入 1 mL 预冷的 70% 乙醇,混匀细胞,固定过夜。离心弃上清, PBS 洗涤 1 次,采

用细胞周期检测试剂盒染色,室温避光孵育 20 min,流式细胞仪检测细胞周期。

1.6 划痕实验检测细胞迁移

取 1.3 分组处理的细胞,给药 0 和 24 h 后,于倒置显微镜下观察、拍照。细胞迁移率(%)=(0 h 划痕面积-24 h 划痕面积)/0 h 划痕面积×100%。

1.7 Western 印迹法检测 Bax、Cyt c、细胞周期蛋白 A、细胞周期蛋白 D1 和 MMP-9 蛋白表达水平

取 1.3 分组处理的细胞,给药 24 h 后,加入 100 μL 裂解液,裂解后样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件 12 000 $\times g$ 离心,取上清。用 BCA 蛋白定量试剂盒对样品进行定量,将各组总蛋白浓度调整一致后,沸水浴 10 min 使蛋白质充分变性,进行 SDS-PAGE,并湿转至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉在摇床上室温封闭 2 h。TBST 清洗 3 次,每次 10 min,加入一抗(Bax 和 Cyt c 的稀释比例为 1:5000,细胞周期蛋白 A、细胞周期蛋白 D1 和 MMP-9 的稀释比例为 1:200, β 肌动蛋白稀释比例为 1:5000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 清洗 3 次,每次 10 min,加入二抗(1:5000),室温孵育 2 h。TBST 清洗 3 次,每次 10 min,加入特超敏 ECL 化学发光液在数码凝胶成像系统发光成像。采用 Image J 软件对蛋白印迹条带进行积分吸光度(integrated absorbance, IA)分析, β 肌动蛋白为内参蛋白。以目标蛋白与内参蛋白的 IA 值之比表示目标蛋白相对表达水平。

1.8 统计学分析

实验数据结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,实验重复 3 次。采用 Graphpad Prism 8 软件进行统计学分析,组间差异采用单因素方差分析及 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Gyp LI 与 DDP 联用对 EC109 细胞存活率的影响

MTT 结果显示(图 1),与细胞对照组比较,随着浓度的升高,Gyp LI 和 DDP 对 EC109 细胞抑制作用增强,Gyp LI 和 DDP 对 EC109 细胞的 IC_{50} 值分别为 55.34 ± 3.52 和 $(37.48\pm 2.99)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。当 Gyp LI 浓度为 $3.125\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对 EC109 细胞无明显抑制作用,因此选择 Gyp LI $3.125\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与不同浓度的 DDP 联用。在恒定 Gyp LI 浓度为 $3.125\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下,联用组中 DDP 的 IC_{50} 值为 $(8.05\pm 5.34)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,低于 DDP 单独给药组的 IC_{50} 值,联合用药组 CI 值均 <1 ,说明两药联合使用具有协同抑制食管癌 EC109 细胞存活的作用(表 1)。

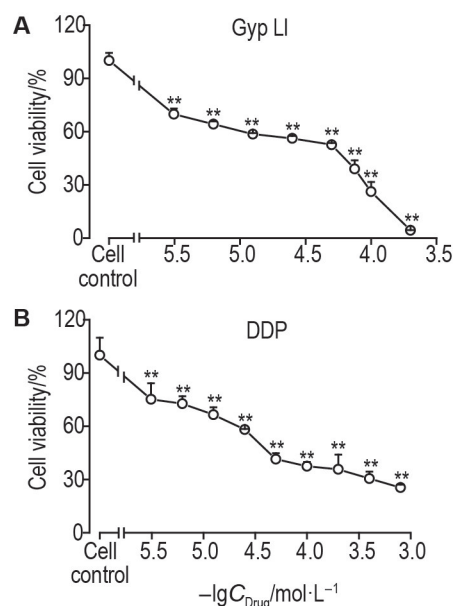


Fig. 1 Effect of gypenoside LI (Gyp LI) and cisplatin (DDP) on viability of EC109 cells by MTT assay. 100 μL of human esophageal cancer EC109 cells ($5\times 10^7\text{L}^{-1}$) in the logarithmic growth phase were seeded in 96-well plants at 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 until 80% of the cells fused, and treated with Gyp LI 3.125~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (A), DDP 3.125~800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (B) for 24 h respectively. $\bar{x}\pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, compared with cell control ($0\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group.

Tab. 1 Combination effect of Gyp LI with DDP on viability of EC109 cells

Group	Cell viability/%	CI
Cell control	100.00 \pm 2.51	-
Gyp LI 3.125	69.85 \pm 3.09**	-
DDP 3.125	75.13 \pm 9.01	-
6.25	72.67 \pm 4.21	-
12.5	66.47 \pm 4.19	-
25.0	58.05 \pm 0.42	-
50.0	41.46 \pm 3.35	-
100.0	37.40 \pm 2.37	-
200.0	35.75 \pm 8.21	-
Gyp LI 3.125+DDP 3.125	60.22 \pm 8.69***	0.524
6.25	52.26 \pm 8.52****	0.368
12.5	39.48 \pm 9.53****	0.202
25.0	31.76 \pm 3.83****	0.146
50.0	25.41 \pm 5.68****	0.127
100.0	4.44 \pm 1.75****	0.005
200.0	2.98 \pm 0.07****	0.003

EC109 cells were treated with Gyp LI $3.125\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ combined with DDP 3.125~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 h. CI: combination index; -: none. $\bar{x}\pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, compared with cell control group; # $P<0.05$, *** $P<0.01$, compared with corresponding DDP alone group.

以 IC_{50} 值为参考,选择 Gyp LI $60\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、DDP $35\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为后续实验单独用药组药物浓度,选择

Gyp LI $3.125 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 DPP $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为后续实验联用组药物浓度,作用时间选择 24 h。

2.2 Gyp LI 与 DDP 联用对 EC109 细胞形态的影响

光学显微镜下观察细胞形态(图 2),EC109 细胞在不同药物作用下细胞形态略有差别。细胞对照组细胞形态饱满、透亮,形状规则,边界清晰。Gyp LI $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和 DDP $35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞生长缓慢,细胞间连接消失,形态不规则,与周围细胞脱离,少量细胞悬浮于培养液中。Gyp LI+DDP 联用组细胞变圆皱缩,大量细胞脱落并悬浮于培养液中,凋亡样特征更显著。

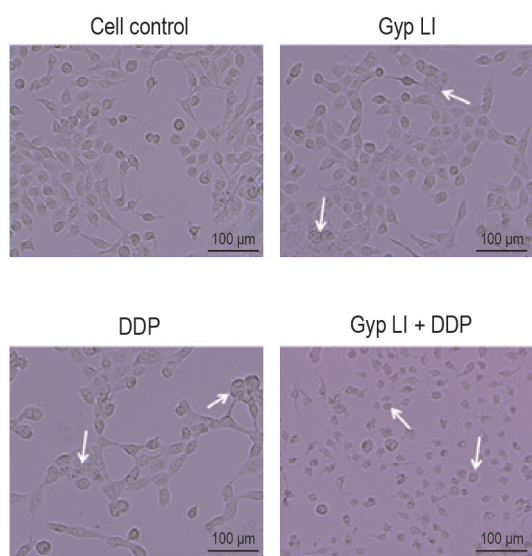


Fig.2 Combination effect of Gyp LI with DDP on morphology of EC109 cells. Cells were treated with Gyp LI $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, DDP $35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and Gyp LI $3.125 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +DDP $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 h, respectively. Arrows show that the intercellular connections disappear and the cells become round and wrinkled.

2.3 Gyp LI 与 DDP 联用对 EC109 细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC/PI 双染实验结果(图 3)显示,与细胞对照组比较,Gyp LI $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、DDP $35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和 Gyp LI+DDP 联用组细胞凋亡率均显著升高($P<0.01$)。与 Gyp LI 和 DDP 单独用药组比较,Gyp LI+DDP 联用组细胞凋亡率显著上升($P<0.01$)。

2.4 Gyp LI 与 DDP 联用对 EC109 细胞周期的影响

细胞周期流式结果(图 4)显示,与细胞对照组比较,Gyp LI $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 S 期细胞比例显著增加($P<0.05$), G_2/M 期细胞比例显著减少($P<0.01$),说明 Gyp LI 能使细胞阻滞于 S 期。与细胞对照组比较,DDP $35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 S 期细胞比例显著下降($P<0.01$),而 G_2/M 期细胞比例显著上升($P<0.01$),表明 DDP 能使细胞阻滞于 G_2/M 期。与细胞对照组比

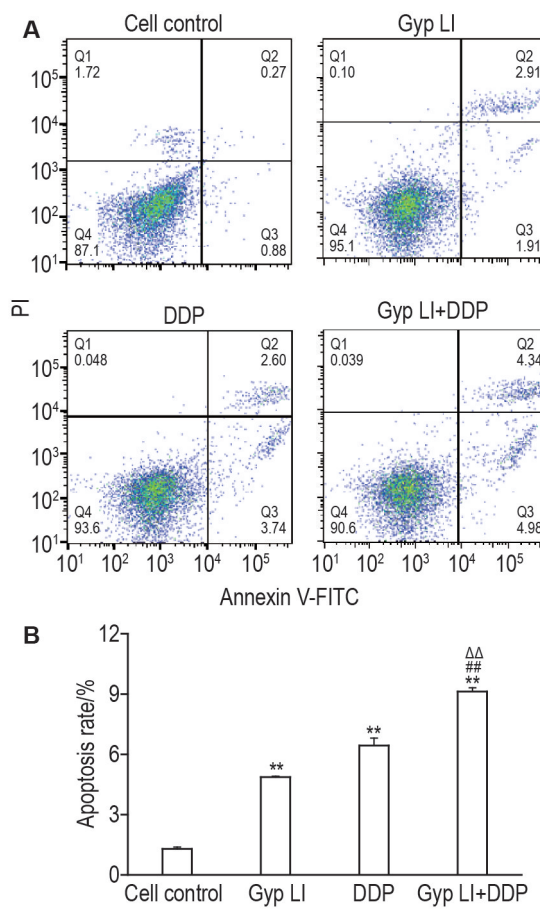


Fig.3 Combination effect of Gyp LI with DDP on apoptosis rate of EC109 cells by flowcytometry. See Fig.2 for the cell treatment. B was the semi-quantitative result of A. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, compared with cell control group; ## $P<0.01$, compared with Gyp LI group; $\triangle\triangle P<0.01$, compared with DDP group.

较,联用组 G_0/G_1 期细胞比例显著上升($P<0.01$),S 期细胞比例显著下降($P<0.05$),推测联用可使细胞阻滞于 G_0/G_1 期。与 Gyp LI 和 DDP 单用组相比,Gyp LI+DDP 联用组所阻滞的细胞周期有所不同,Gyp LI 和 DDP 分别将 EC109 细胞阻滞于 S 期和 G_2/M 期,而 Gyp LI+DDP 联用则使 EC109 细胞阻滞于 G_0/G_1 期。

2.5 Gyp LI 与 DDP 联用对 EC109 细胞迁移能力的影响

从表观形态上看(图 5A),细胞对照组划痕区的细胞数目明显增多,划痕边缘细胞增殖较多,愈合区域较大,划痕明显变窄;而 Gyp LI 和 DDP 单独给药组划痕区存活细胞较少,划痕面积无明显变化;Gyp LI+DDP 联用组细胞数量减少,培养基中有悬浮细胞。说明 Gyp LI、DDP 单用和 Gyp LI+DDP 联用组对 EC109 细胞的迁移均具有一定的抑制作用,联用组的抑制迁移作用最强。划痕实验结果表明(图 5B),与细胞对照组相比,Gyp LI $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、

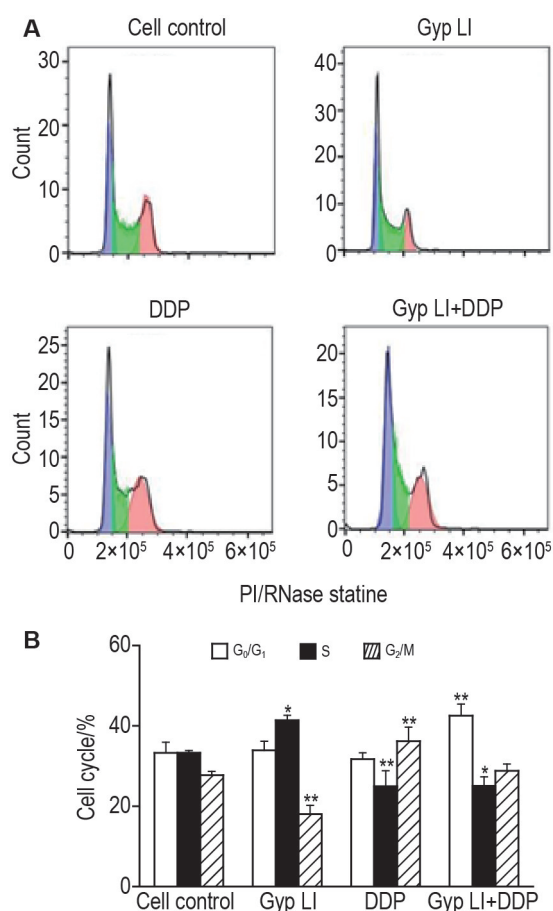


Fig.4 Combination effect of Gyp LI with DDP on EC109 cell cycle by flow cytometry. See Fig.2 for the cell treatment. B was the quantitative result of A. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with cell control group.

DDP $35 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组和 Gyp LI+DDP 联用组的细胞迁移率均显著下降 ($P < 0.01$); 与 Gyp LI 或 DDP 单用组比较, 联用组细胞的细胞迁移率均显著下降 ($P < 0.05, P < 0.01$).

2.6 Gyp LI 与 DDP 联用对 EC109 细胞促凋亡因子 Bax、Cyt c、细胞周期蛋白 A、细胞周期蛋白 D1 和 MMP-9 蛋白表达的影响

Western 印迹实验结果显示 (图 6), 与细胞对

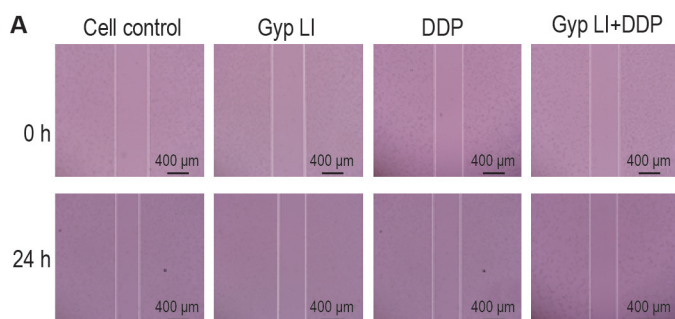


Fig.5 Combination effect of Gyp LI with DDP on EC109 migration. See Fig.2 for the cell treatment. B was the quantitative result of A. Cell migration rate (%) = (0 h scratch area - 24 h scratch area) / 0 h scratch area $\times 100\%$. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P < 0.01$, compared with cell control group; # $P < 0.05$, compared with Gyp LI group; $\Delta\Delta P < 0.01$, compared with DDP group.

照组相比, DDP $35 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组和 Gyp LI+DDP 联用组细胞 Bax 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), Gyp LI $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组、DDP $35 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组和 Gyp LI+DDP 联用组 Cyt c 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。与 Gyp LI $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组和 DDP $35 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比, Gyp LI+DDP 联用组 Bax 和 Cyt c 表达水平显著上升 ($P < 0.01, P < 0.05$)。与细胞对照组相比, Gyp LI $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞周期蛋白 A 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), Gyp LI+DDP 联用组细胞周期蛋白

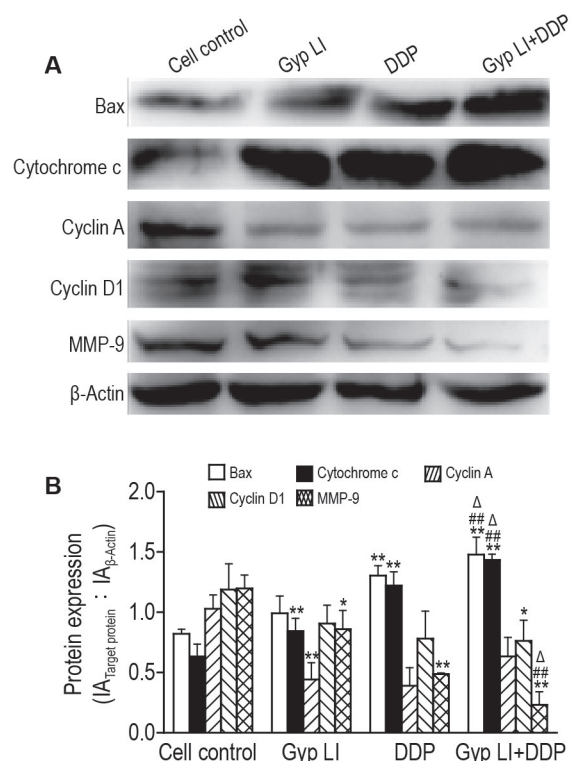


Fig.6 Combination effect of Gyp LI with DDP on protein expressions of Bax, cytochrome c, cyclin A, cyclin D1 and matrix metallo proteinase 9 (MMP-9) in EC109 cells by Western blotting. See Fig.2 for the cell treatment. B was semi-quantitative result of A. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with cell control group; ## $P < 0.01$, compared with Gyp LI group; $\Delta P < 0.05$, compared with DDP group.

D1 表达水平下降 ($P < 0.05$)。与细胞对照组相比, Gyp LI $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组、DDP $35 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组和 Gyp LI+DDP 联用组 MMP-9 表达水平均显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 Gyp LI $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组或 DDP $35 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比, 联用组 MMP-9 表达水平显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

3 讨论

本研究发现, Gyp LI 与 DDP 分别在 $3.125 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3.125 \sim 800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度均具有浓度依赖性抑制人食管癌 EC109 细胞存活作用, 但 DDP 在浓度 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 单独作用于 EC109 细胞时细胞存活率仍较高, 而在 Gyp LI $3.125 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 DDP $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 联用时, 细胞存活率显著降低, 表明 Gyp LI 具有协同抑制 EC109 细胞存活作用, 说明两药联用一定程度上增加了 EC109 细胞对 DDP 的敏感性; 细胞凋亡实验结果表明, 与 DDP 单用比较, Gyp LI 与 DDP 联用显著促进了 EC109 细胞凋亡; 细胞周期实验结果证明, Gyp LI 使细胞周期阻滞于 S 期, DDP 使细胞周期阻滞于 G_2/M 期, 两药联用使细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期, 联合用药和 DDP 单用时所阻滞的细胞周期不同, 可推测它们诱导 EC109 细胞凋亡的机制不同; 细胞划痕实验结果表明, Gyp LI 与 DDP 联用时均能降低细胞迁移能力, 与 DDP 单用比较, 联用组细胞迁移率更低, 提示 Gyp LI 与 DDP 联用抑制细胞迁移的作用更强; Western 印迹法结果表明, 与 Gyp LI 和 DDP 单用相比, 两药联用时 Bax 和细胞色素 c 的表达水平均显著升高, 而 MMP-9 的表达水平显著降低, 说明 Gyp LI 具有促进食管癌细胞的凋亡和抑制其迁移的作用, 而 Gyp LI 与 DDP 联用后具有更强的促凋亡和抑制迁移作用。

细胞凋亡主要有死亡受体介导的外部凋亡通路和内部线粒体通路。在线粒体通路中, BH3-only 促凋亡蛋白可直接或间接激活促凋亡蛋白 Bax 或 Bak, 同时能够中和 Bcl-2 蛋白的抗凋亡作用, 将凋亡信号传递给线粒体后, 线粒体膜通透性增加, 导致促凋亡因子 Cyt c、线粒体次级凋亡蛋白和丝氨酸蛋白酶 Omi 等蛋白被释放到细胞质中, 从而启动胱天蛋白酶级联反应, 最终引发细胞凋亡^[22]。本研究中, Western 印迹结果表明, Gyp LI 与 DDP 联用可使 Bax 和 Cyt c 表达水平均显著升高, 表明 Gyp LI 与 DDP 联用可更好地促进细胞凋亡, 其作用机制可能与触发了线粒体介导的凋亡通路从而诱导细胞凋

亡有关。细胞周期阻滞是抑制癌细胞增殖的另一个主要靶点。细胞周期蛋白 A 和细胞周期蛋白 D1 是细胞周期的重要调节因子, 细胞周期蛋白 A 调节细胞周期从 S 期转变至 G_2 期^[23], 细胞周期蛋白 D1 和细胞周期蛋白依赖性激酶协同发挥作用, 以调节细胞周期从 G_1 期到 S 期的转变^[24-25]。卢前微等^[26]发现, 苦参碱可通过减少 U937 细胞内细胞周期蛋白 A 的表达使细胞周期阻滞于 S 期, 从而抑制 U937 细胞增殖。Kim 等^[27]发现, 吡啶甲烷可通过降低细胞周期蛋白 D1、细胞周期蛋白 E2 及细胞周期蛋白依赖性激酶 4 和 6 的表达使食管癌细胞周期阻滞于 G_1 期, 从而抑制了食管癌细胞的增殖。本研究发现, Gyp LI 通过降低细胞周期蛋白 A 表达使细胞周期阻滞于 S 期, Gyp LI 与 DDP 联用通过减少细胞周期蛋白 D1 的表达使细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期。MMP-9 是一种分泌性内肽酶, 与细胞迁移密切相关^[28]。本研究结果表明, Gyp LI 与 DDP 联用可下调 MMP-9 表达, 抑制细胞迁移, 作用显著强于单独用药。

综上所述, Gyp LI 具有较好的抑制食管癌 EC109 细胞存活作用, Gyp LI 和 DDP 联用具有协同效应, 可能通过上调 Bax 和 Cyt c 的表达、下调细胞周期蛋白 D1 和 MMP-9 的表达从而更显著地促进 EC109 细胞凋亡和抑制 EC109 细胞迁移。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2021[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7-33.
- [2] Chen WQ, Zheng RS, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] 于哲, 李晓敏, 槐梅, 等. T1 期浸润性原发性食管癌的临床病理特征及预后[J]. *中华肿瘤杂志(Chinese Journal of Oncology)*, 2018, 40(4): 268-273.
- [4] Kato H, Nakajima M. Treatments for esophageal cancer: a review[J]. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 2013, 61(6): 330-335.
- [5] Ghosh S. Cisplatin: the first metal based anticancer drug [J/OL]. *Bioorg Chem*, 2019, 88: 102925 (2019-04-11) [2022-02-22]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045206818311969?via%3Di-hub>. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.102925.
- [6] Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 740: 364-378.
- [7] 吴耀松, 任闪闪, 陈玉龙, 等. 启膈散对食管癌 EC9706

- 细胞株抑制树突状细胞成熟的影响[J]. *时珍国医国药 (Lishizhen Medicine and Materia Medica Research)*, 2017, 28 (4): 769-772.
- [8] 尚艺婉, 孟丹华, 罗文昭, 等. 健脾和胃法六君子汤通过影响细胞能量代谢增强顺铂对 EC9706 活性抑制作用[J]. *中药药理与临床 (Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica)*, 2021, 37(2): 7-12.
- [9] Zhang YS, Shen Q, Li J. Traditional Chinese medicine targeting apoptotic mechanisms for esophageal cancer therapy[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37 (3): 295-302.
- [10] 陈道金, 朴香兰. 壮药“国虾薄”(绞股蓝)热处理产物抗肺癌的有效成分研究进展[J]. *食品安全质量检测学报 (Journal of Food Safety & Quality)*, 2013, 4(2): 333-338.
- [11] Xing SF, Liu LH, Zu ML, *et al.* The inhibitory effect of gypenoside stereoisomers, gypenoside L and gypenoside LI, isolated from *Gynostemma pentaphyllum* on the growth of human lung cancer A549 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 219: 161-172.
- [12] Zu ML, Duan Y, Xie JB, *et al.* Gypenoside LI arrests the cell cycle of breast cancer in G₀/G₁ phase by down-regulating E2F1 [J/OL]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 273: 114017 (2021-03-11) [2022-02-22]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378-8741\(21\)00244-0](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378-8741(21)00244-0). DOI: 10.1016/j.jep.2021.114017.
- [13] Liu H, Li XM, Duan Y, *et al.* Mechanism of gypenosides of *Gynostemma pentaphyllum* inducing apoptosis of renal cell carcinoma by PI3K/AKT/mTOR pathway [J/OL]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 271: 113907 (2021-02-06) [2022-02-22]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378-8741\(21\)00133-1](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378-8741(21)00133-1). DOI: 10.1016/j.jep.2021.113907.
- [14] Lee HS, Lim SM, Jung JI, *et al.* *Gynostemma pentaphyllum* extract ameliorates high-fat diet-induced obesity in C57BL/6N mice by upregulating SIRT1[J/OL]. *Nutrients*, 2019, 11 (10): 2475 (2019-10-15) [2022-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6835433/>. DOI: 10.3390/nu11102475.
- [15] Megalli S, Davies NM, Roufogalis BD. Anti-hyperlipidemic and hypoglycemic effects of *Gynostemma pentaphyllum* in the Zucker fatty rat[J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2006, 9(3): 281-291.
- [16] Li YT, Lin WJ, Huang JJ, *et al.* Anti-cancer effects of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino (*Jiaogulan*) [J/OL]. *Chin Med*, 2016, 11: 43 (2016-09-17) [2022-02-22]. <https://cmjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13020-016-0114-9>. DOI: 10.1186/s13020-016-0114-9.
- [17] 南京中医药大学编著. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 2459-2463.
- [18] 李天海, 郭变如, 李志炎, 等. 绞股蓝治疗食管贲门癌 20 例疗效观察[J]. *河北中医 (Hebei Journal of Traditional Chinese Medicine)*, 1992, 14(4): 4-5.
- [19] 刘少翔, 陈志峰, 胡海山, 等. 中药结合化疗治疗晚期癌症 200 例对比观察[J]. *辽宁中医杂志 (Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine)*, 1995, 22(6): 273-274.
- [20] 潘云苓, 潘远志. 志苓胶囊治疗 400 例多种中晚期癌症的疗效观察[J]. *中国中西医结合杂志 (Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine)*, 2007, 27(9): 807-809.
- [21] Chen SH, Wang G, Niu XJ, *et al.* Combination of AZD2281 (Olaparib) and GX15-070 (Obatoclox) results in synergistic antitumor activities in preclinical models of pancreatic cancer[J]. *Cancer Lett*, 2014, 348 (1-2): 20-28.
- [22] Lopez J, Tait SWG. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within[J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(6): 957-962.
- [23] Yam CH, Fung TK, Poon RYC. Cyclin A in cell cycle control and cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59 (8): 1317-1326.
- [24] Qie S, Diehl JA. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94(12): 1313-1326.
- [25] Montalto FI, De Amicis F. Cyclin D1 in cancer: a molecular connection for cell cycle control, adhesion and invasion in tumor and stroma[J/OL]. *Cells*, 2020, 9(12): 2648 (2020-12-09) [2022-02-22]. <https://doi.org/10.3390/cells9122648>.
- [26] 卢前微, 陈建斌, 汤为学, 等. 苦参碱对 U937 细胞周期调控蛋白的影响[J]. *中成药 (Chinese Traditional Patent Medicine)*, 2009, 31 (11): 1658-1661.
- [27] Kim SJ, Lee JS, Kim SM. 3, 3'-Diindolylmethane suppresses growth of human esophageal squamous cancer cells by G₁ cell cycle arrest[J]. *Oncol Rep*, 2012, 27 (5): 1669-1673.
- [28] Augoff K, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R, *et al.* MMP9: a tough target for targeted therapy for cancer[J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14 (7): 1847 (2022-04-06) [2022-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8998077/>. DOI: 10.3390/cancers14071847.

Inhibitory effect of gypenoside LI combined with cisplatin on growth of esophageal cancer EC109 cells

ZHAO Min-tong, QI Yan-shuang, HAO Lin-yao, JI Xiao-tong, PIAO Xiang-lan
(School of Pharmacy, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate the inhibitory effect of gypenoside LI (Gyp LI) combined with cisplatin (DDP) on EC109 cells and the effect on cell apoptosis, cycle and migration. **METHODS** ① EC109 cells were treated with Gyp LI 0~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, DDP 0~800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and Gyp LI 3.125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +DDP 0~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 h, respectively. Cell viability was detected by MTT assay to calculate half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values. CompuSyn software was used to calculate the combination index (CI). ② EC109 cells were treated with Gyp LI 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, DDP 35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ or Gyp LI 3.125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and DDP 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ combination for 24 h. Cell morphology was observed under a microscope, while the apoptotic rate and cell cycle were investigated by Annexin V-FITC/PI staining, PI/RNase staining and flow cytometry, respectively. The cell migration ability was detected by scratch test. The expression levels of Bax, cytochrome c, cyclin A, cyclin D1 and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) were detected by Western blotting. **RESULTS** ① The IC_{50} values of Gyp LI and DDP on EC109 cells were 55.34 ± 3.52 and (37.48 ± 2.99) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. When Gyp LI 3.125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ was combined with DDP of different concentrations, the IC_{50} value was decreased to (8.05 ± 5.34) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and the CI values were <1 , suggesting that the combination of the two drugs had a synergistic effect. ② When Gyp LI was combined with DDP, the cells grew slowly, shed, showed irregular morphology. Compared with the cell control group, the apoptotic rate was increased from $(1.30\pm 0.08)\%$ to $(4.87\pm 0.04)\%$, $(6.44\pm 0.37)\%$ and $(9.12\pm 0.20)\%$, respectively ($P<0.01$). The apoptotic rate of the combination group was significantly higher than that of the DDP group ($P<0.01$). Gyp LI, DDP and the combination group arrested cell cycle at S, G_2/M and G_0/G_1 phase, respectively. Compared with the cell control group, the cell migration rates of Gyp LI, DDP and the combination group was decreased from $(29.54\pm 5.56)\%$ to $(15.30\pm 3.64)\%$, $(13.61\pm 0.06)\%$ and $(5.95\pm 0.56)\%$, respectively ($P<0.01$). Western blotting results showed that the expression of Bax was significantly increased in the DDP 35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group and the combination group compared with the cell control group ($P<0.01$), and the expression of cytochrome c was significantly increased in the Gyp LI 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, DDP 35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and the combination group compared with cell control group ($P<0.01$), with the highest expression of Bax and cytochrome c in the combination group. Compared with the cell control group, the expression of cyclin A was significantly decreased in the Gyp LI 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group ($P<0.01$), and the expression of cyclin D1 was significantly decreased in the combination group ($P<0.05$). Compared with the cell control group, the expression of MMP-9 in the Gyp LI 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group, DDP 35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group and the combination group was decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), with the lowest expression of MMP-9 in the combination group. **CONCLUSION** Gyp LI inhibits the proliferation of EC109 cells. The combination of Gyp LI and DDP has a synergistic effect in inhibiting the proliferation of EC109 cells. The mechanism can be related to up-regulating the expressions of Bax, cytochrome c and decreasing the expressions of cyclin D1 and MMP-9.

Key words: gypenoside LI; EC109 cells; cisplatin; drug combination; apoptosis; cell cycle

Foundation item: Beijing Student's Platform for Innovation Training Program (BEIJ2020110030)

Corresponding author: PIAO Xiang-lan, E-mail: xlpiao@muc.edu.cn

(收稿日期: 2022-02-22 接受日期: 2022-09-06)

(本文编辑: 乔虹)