

文章编号 1006-8147(2022)05-0483-08

论 著

## 薯蓣皂苷对人结肠癌细胞凋亡的作用及机制研究

管君<sup>1</sup>, 荀敬<sup>2</sup>, 王波涛<sup>1</sup>, 张琦<sup>2</sup>, 王西墨<sup>2</sup>

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.天津市南开医院, 天津市急腹症器官损伤与中西医修复重点实验室, 天津 300100)

**摘要** 目的:探究薯蓣皂苷(Dioscin)诱导人结肠癌 HCT-116 细胞、RKO 细胞凋亡的作用及机制。方法:通过将体外培养的 HCT-116 细胞和 RKO 细胞分为对照组和不同浓度的药物组,采用 CCK-8 实验分析 Dioscin 对细胞增殖的抑制作用,可见分光光度法检测细胞 LDH 活性的变化;借助 DNA 含量检测法、Annexin V-FITC/PI 双染法和流式细胞术检测细胞凋亡情况;DCFH-DA 荧光探针法检测细胞活性氧簇(ROS)含量的变化;采用荧光探针法和可见分光光度法分别检测细胞超氧化物含量及细胞超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化,Western 印迹法检测凋亡相关蛋白的表达情况。结果:在 24 h、48 h 处理时间下,与对照组相比,HCT-116 细胞 Dioscin 组(2、4、6、8、10  $\mu\text{mol/L}$ )、RKO 细胞 Dioscin 组(5、10、15、20、25  $\mu\text{mol/L}$ )都明显抑制了结肠癌细胞的增殖活性(均  $P<0.05$ ),且 HCT-116、RKO 细胞经 Dioscin 处理后,细胞膜破坏,细胞 LDH 释放量较对照组增多( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );与对照组相比,Dioscin 作用 HCT-116、RKO 细胞后,DNA 含量暴露增多( $P<0.05$ ,  $P<0.001$ ),细胞凋亡率上调( $P<0.001$ ,  $P<0.01$ ),ROS 水平升高( $P<0.05$ ,  $P<0.001$ ),超氧化物含量增多(均  $P<0.001$ ),SOD 表达降低( $P<0.05$ ,  $P<0.001$ );Western 印迹结果表明,与对照组相比,Dioscin 可以抑制 HCT-116、RKO 细胞蛋白 p-Akt( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ )、Nrf2(均  $P<0.001$ )、Bcl-2(均  $P<0.001$ )的表达,促进蛋白 cleaved Caspase-9( $P<0.001$ ,  $P<0.01$ )的表达。结论:薯蓣皂苷可能通过 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路激活氧化应激反应,从而抑制结肠癌细胞生长,促进其凋亡。

**关键词** 薯蓣皂苷;结肠癌;细胞凋亡;氧化应激;Nrf2

中图分类号 R735.3+5

文献标志码 A

### The effect and underlying mechanism of Dioscin on apoptosis of human colon cancer cells

GUAN Jun<sup>1</sup>, XUN Jing<sup>2</sup>, WANG Bo-tao<sup>1</sup>, ZHANG Qi<sup>2</sup>, WANG Xi-mo<sup>2</sup>

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Acute Abdomen Disease Associated Organ Injury and ITCWM Repair, Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the effect of Dioscin on the apoptosis of human colon cancer HCT-116 cells and RKO cells and its mechanism. **Methods:** HCT-116 cells and RKO cells cultured *in vitro* were divided into control group and Dioscin groups with different concentrations. CCK-8 assay was conducted to analyze inhibitory effect of the cell proliferation, and visible spectrophotometry method was performed to measure the cell LDH activity. The cell apoptosis was detected by cell DNA content detection method, Annexin V-FITC/PI double staining method and flow cytometry. The content of reactive oxygen species(ROS) was detected by DCFH-DA fluorescent probe method. The content of superoxide and the activity of superoxide dismutase(SOD) were measured by fluorescent probe method and visible spectrophotometry method respectively. The expressions of apoptosis-related proteins were detected by Western blotting. **Results:** After 24 h and 48 h drug treated, compared with the control group, the proliferation activity of colon cancer cells was significantly inhibited in HCT-116 cell Dioscin group (2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) and RKO cell Dioscin group (5, 10, 15, 20, 25  $\mu\text{mol/L}$ ) (all  $P<0.05$ ), and after the HCT-116 and RKO cells were treated with Dioscin, the cell membrane was destroyed, and the cell LDH releasing amount increased than that in the control group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the control group, after the HCT-116, RKO cells were treated with Dioscin, the exposure of DNA content increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.001$ ), and the cell apoptosis rate was up-regulated ( $P<0.001$ ,  $P<0.01$ ), and the intracellular ROS level was increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.001$ ), and superoxide content were increased (all  $P<0.001$ ), while the expression of SOD was decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.001$ ). Western blotting results showed that compared with the control group, Dioscin inhibited the HCT-116, RKO cells protein expression of p-Akt ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ), Nrf2 (all  $P<0.001$ ), and Bcl-2 (all  $P<0.001$ ), and promoted the protein expression of cleaved Caspase-9 ( $P<0.001$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** Dioscin may activate oxidative stress through PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway to inhibit the growth of colon cancer cells and promote their apoptosis.

**Key words** Dioscin; colon cancer; apoptosis; oxidative stress; Nrf2

基金项目 国家自然科学基金(81971858);天津市自然科学基金资助项目(18JCQNJC11100)

作者简介 管君(1994-),女,硕士在读,研究方向:中药抗肿瘤的机制研究;通信作者:王西墨, E-mail: wangximonky@126.com。

结肠癌是消化道系统常见的恶性肿瘤,研究表明在中国结肠癌的发病率位于癌症第2位,死亡率位于肿瘤疾病前5位<sup>[1]</sup>,且发病率呈现上升趋势<sup>[2]</sup>。相较于手术、放化疗等治疗结肠癌的传统手段<sup>[3]</sup>,草药类化合物具有减低创伤、降低不良反应等优势,有望成为安全有效治疗结肠癌的新方法<sup>[4]</sup>。

薯蓣为薯蓣科植物薯蓣或参薯的根,性平微涩<sup>[5]</sup>,在中医学上归脾、肺、肾经,具有祛痰、消食利水、舒筋活血、截疟等功效<sup>[6]</sup>。薯蓣皂苷(Dioscin)来源于薯蓣<sup>[7]</sup>,是一种天然甾体皂苷类化合物,也是现临床常用的六味地黄丸、地奥心血康胶囊等中药的有效成分<sup>[8]</sup>。现代药理学研究显示,Dioscin对多种疾病有预防及治疗作用,如抗肿瘤、抗真菌病毒、抗炎等<sup>[9]</sup>。近年来的研究显示,Dioscin可对结肠癌<sup>[10]</sup>、前列腺癌<sup>[11]</sup>及肝癌<sup>[12]</sup>等多种肿瘤细胞发挥抑制细胞增殖并诱导其凋亡的作用。在结肠癌中,已有蛋白组学研究发现Dioscin可能通过氧化应激途径导致结肠癌细胞的凋亡<sup>[13]</sup>,但未进一步探讨其氧化应激机制及其相关的信号通路。本文以HCT-116细胞及RKO细胞为研究对象,探讨Dioscin激活氧化应激机制的信号通路,为其应用于结肠癌临床治疗进一步提供了理论和实验依据。

## 1 材料与方法

1.1 药品与试剂 Dioscin购自美国Selleck Chemicals公司(质量分数 $\geq 99\%$ ,批号S2379);DMEM培养基、胰蛋白酶、灭活胎牛血清(FBS)、磷酸盐缓冲液(PBS)、RIPA裂解液、PVDF膜和化学发光试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司);抗体 $\beta$ -actin、Bcl-2、Nrf2、Caspase-9以及cleaved Caspase-9(英国Abcam公司);抗体Akt和p-Akt(美国Cell Signaling Technology公司);二甲基亚砜(DMSO)、青霉素/链霉素双抗、BCA蛋白浓度测定试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)活性检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒、DNA含量检测试剂盒、ROS检测试剂盒、DAPI染色剂及超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司);CCK-8检测试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司);荧光探针MitoSOX Red(上海懋康生物科技有限公司)。

1.2 仪器 超低温冰箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);二级生物安全柜(苏州市金净净化科技有限公司);CO<sub>2</sub>恒温细胞培养箱(立康生物医疗科技控股有限公司);酶标仪(上海科华实验系统有限公司);全自动多功能化学发光成像仪(上海天能科技有限公司);流式细胞仪(美国ACEA公司);倒置荧光相差显微镜(德国Leica公司);高压蒸汽灭菌

锅(日本Hirayama公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 细胞培养 人结肠癌细胞系HCT-116细胞、RKO细胞(购自中国科学院细胞研究所)在含有10% FBS和1%青霉素/链霉素双抗的DMEM培养液中培养,放置在37℃、饱和湿度、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中,每2~3 d换液,用胰蛋白酶消化传代,取对数生长期的细胞进行实验。

1.3.2 CCK-8实验 将生长状态良好,处于对数生长期的HCT-116细胞、RKO细胞以 $5 \times 10^4$ /mL的细胞密度、100  $\mu$ L/孔接种于96孔板中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。将HCT-116细胞培养12 h待贴壁后开始加药处理,分别设置空白组、对照组(DMSO溶剂)和Dioscin组(2、4、6、8、10  $\mu$ mol/L),每组设置3个复孔,分别培养24、48 h。将RKO细胞培养12 h待贴壁后开始加药处理,分别设置空白组、对照组(DMSO溶剂)和Dioscin组(5、10、15、20、25  $\mu$ mol/L),每组设置3个复孔,分别培养24、48 h。测量前,每孔加入10  $\mu$ L CCK-8工作液,震荡混匀后继续正常培养2 h,用酶标仪在450 nm波长处测定吸光度(A)值,计算细胞存活率及半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)值。

细胞存活率=(药物组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值)

1.3.3 试剂盒检测 细胞LDH释放量和SOD活性严格按照试剂盒说明书操作步骤执行,分别检测LDH和SOD的表达水平。

1.3.4 流式细胞术(Annexin V-FITC/PI双染法)检测细胞凋亡 取对数生长期的HCT-116细胞、RKO细胞,用完全培养液重悬后,以 $5 \times 10^5$ 个/孔的细胞数目接种于6孔板中培养。待细胞贴壁后,HCT-116药物组加入Dioscin(4、6  $\mu$ mol/L)处理,RKO药物组加入Dioscin(5、10  $\mu$ mol/L)处理,并各自设置对照组。继续培养24 h后,用0.25%胰蛋白酶消化细胞,离心收集细胞后用预冷的PBS清洗。实验过程按照Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒操作,各组加入5  $\mu$ L Annexin V-FITC轻摇混匀,之后加入10  $\mu$ L PI染色液混匀,室温避光孵育20 min后,用流式细胞仪进行检测分析。细胞凋亡率=早期细胞凋亡率+晚期细胞凋亡率

1.3.5 流式细胞术检测细胞DNA含量 细胞培养及处理方法同“1.3.4”项,离心后收集的细胞用预冷的PBS冲洗2次,制备成单细胞悬液后去除上清,在细胞中加入70%预冷乙醇500  $\mu$ L,固定2 h过夜,4℃保存,染色前用PBS洗去固定液。在细胞沉淀中加100  $\mu$ L RNase A溶液,重悬细胞后以37℃水浴

30 min,再加入 400  $\mu\text{L}$  PI 染色液混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,之后用流式细胞仪进行检测分析。

**1.3.6 流式细胞术检测细胞内 ROS 表达水平** 取对数生长期、生长状态良好的 HCT-116 细胞、RKO 细胞,以  $5\times 10^5$ /孔的细胞数目接种于 6 孔板中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  的培养箱中孵育。待细胞贴壁之后,HCT-116 细胞各加入 4、6  $\mu\text{mol/L}$  的 Dioscin,RKO 细胞各加入 5、10  $\mu\text{mol/L}$  的 Dioscin,另各自设立对照组,收集细胞弃去上清后用预冷的 PBS 洗涤 2 次,之后加入 10  $\mu\text{mol/L}$  的 DCFH-DA 溶液,在室温中避光孵育 10 min,孵育完成后用 PBS 洗涤细胞 2 次,再用 500  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞,用流式细胞仪检测细胞内 ROS 表达水平。

**1.3.7 荧光染色法观察细胞超氧化物的表达情况** 取生长状态良好的 HCT-116 细胞,以  $3\times 10^5$ /孔的细胞浓度接种于 6 孔板中,每孔 2 mL 的细胞悬液。待细胞贴壁后,药物组加入 Dioscin(4、6  $\mu\text{mol/L}$ )处理细胞,对照组加入相同体积的 DMSO 溶剂。取生长状态良好的 RKO 细胞,以  $5\times 10^5$ /孔的细胞浓度接种于 6 孔板中,每孔 2 mL 的细胞悬液。待细胞贴壁后,药物组加入 Dioscin(5、10  $\mu\text{mol/L}$ )处理细胞,另设对照组。在培养箱中继续培养 24 h 后收集细胞并用预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次,按照荧光探针 MitoSOX Red 及 DAPI 染色剂说明书处理待测细胞,在荧光显微镜下观察拍照。

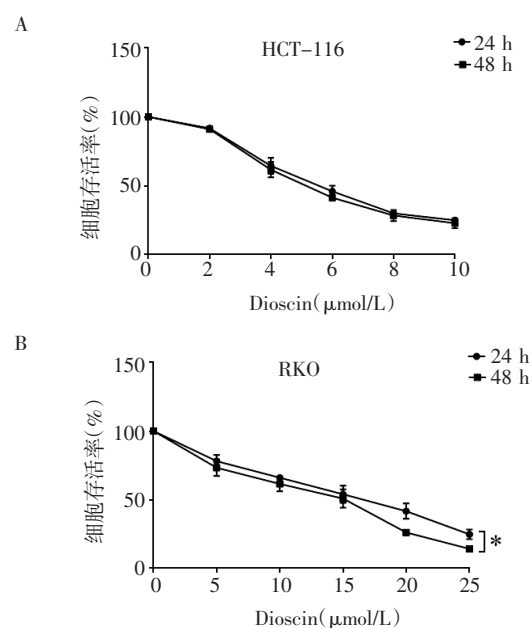
**1.3.8 Western 印迹法检测细胞相关蛋白的表达** 取处于对数生长期生长状态良好的 HCT-116 细胞、RKO 细胞以  $5\times 10^5$  个/孔细胞密度接种于 6 孔板中,每孔 2 mL 的细胞悬液。待细胞贴壁后,HCT-116 细胞加入 Dioscin(4、6  $\mu\text{mol/L}$ )处理,RKO 细胞加入 Dioscin(5、10  $\mu\text{mol/L}$ )处理,对照组细胞加入等体积的 DMSO 溶剂。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 后弃去培养液,用预冷的 PBS 缓冲液冲洗 2 遍后收集各组细胞,分别加入 200  $\mu\text{L}$  的 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度测定,蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,之后湿转到 PVDF 膜上,用含有 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 1 h,分别加入  $\beta$ -actin、Bcl-2、Nrf2、AKT、p-Akt、Caspase-9 以及 cleaved Caspase-9 蛋白抗体(稀释比例为 1:1 000),一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,室温下用 TBST 溶液洗膜 3 次,每次 10 min。然后分别加入辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释比例为 1:5 000),室温孵育 1 h,室温下用 TBST 溶液洗膜 3 次,每次 10 min。采用化学发光法检测,结果在化学发光成像仪上显影,使用 Image J 软件对各蛋白条带的灰度值进行半定量分析,计算目的蛋白和内参

蛋白的灰度比值。

**1.4 统计学处理** 除特殊说明外,所有实验均进行 3 次及以上的生物学重复测试。使用 GraphPad Prism 7.0 软件绘图并进行统计分析,结果均用  $\bar{x}\pm s$  表示,组间差异比较应用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计学分析, $P<0.05$  表明差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Dioscin 对结肠癌细胞生长的影响** CCK-8 实验结果显示,以不同浓度 Dioscin 分别作用于 HCT-116 细胞、RKO 细胞,分别检测 24 h 和 48 h 的细胞存活率。HCT-116 细胞结果显示,经过 Dioscin 处理 24 h 后,与对照组相比,2、4、6、8、10  $\mu\text{mol/L}$  组的细胞存活率降低(均  $P<0.05$ )。经过 Dioscin 处理 48 h 后,与对照组相比,2、4、6、8、10  $\mu\text{mol/L}$  组的细胞存活率降低(均  $P<0.05$ );RKO 细胞结果显示,经过 Dioscin 处理 24 h 后,与对照组相比,5、10、15、20、25  $\mu\text{mol/L}$  组的细胞存活率降低(均  $P<0.001$ )。经过 Dioscin 处理 48 h 后,与对照组相比,5、10、15、20、25  $\mu\text{mol/L}$  组的细胞存活率降低(均  $P<0.001$ )。从时间梯度上,48 h 相较于 24 h 的 25  $\mu\text{mol/L}$  组的细胞存活率降低( $P<0.05$ ),结果见图 1。此外,Dioscin 作用 HCT-116 细胞 24 h 和 48 h 的半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )值分别为 6.15  $\mu\text{mol/L}$  和 5.89  $\mu\text{mol/L}$ ,RKO 细胞 24 h 和 48 h 的半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )值分别为 16.15  $\mu\text{mol/L}$  和 13.77  $\mu\text{mol/L}$ 。



注:A:CCK-8 法检测 Dioscin 对 HCT-116 细胞的增殖抑制作用;B:CCK-8 法检测 Dioscin 对 RKO 细胞的增殖抑制作用; \* $P<0.05$

图 1 Dioscin 对结肠癌细胞存活率的影响

Fig 1 Effect of Dioscin on cell viability rates of colon cancer cell

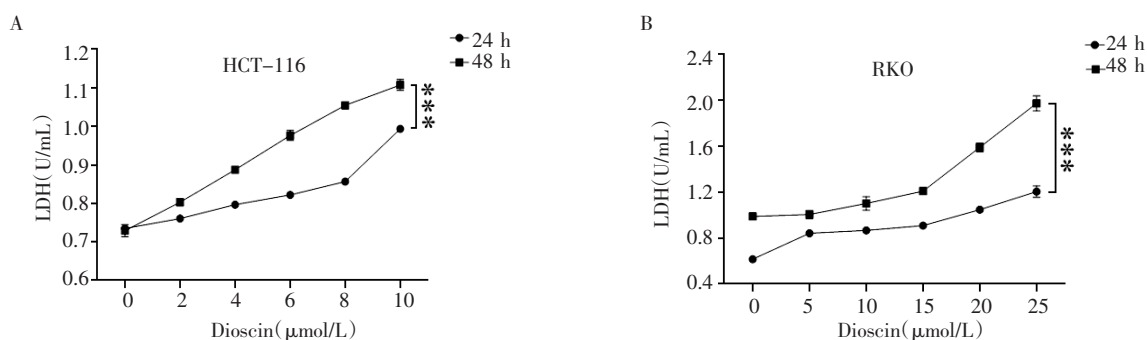


**2.2 Dioscin 对结肠癌细胞 LDH 释放量的影响** HCT-116 细胞结果显示,经过 Dioscin 处理 24 h 后,与对照组相比,2、4、6、8、10  $\mu\text{mol/L}$  组细胞的 LDH 释放量升高(均  $P<0.05$ )。经过 Dioscin 处理 48 h 后,与对照组相比,2、4、6、8、10  $\mu\text{mol/L}$  组细胞的 LDH 释放量升高(均  $P<0.001$ )。由图 2 可看出,从时间梯度上,48 h 相较于 24 h 的 10  $\mu\text{mol/L}$  组细胞的 LDH 释放量升高 ( $P<0.001$ );RKO 细胞结果显示,经过 Dioscin 处理 24 h 后,与对照组相比,5、10、15、20、25  $\mu\text{mol/L}$  组细胞的 LDH 释放量升高(均  $P<0.001$ )。经过 Dioscin 处理 48 h 后,与对照组相比,10、15、20、25  $\mu\text{mol/L}$  组细胞的 LDH 释放量升高(均  $P<0.01$ )。从时间梯度上,48 h 相较于 24 h 的 25  $\mu\text{mol/L}$  组细胞

的 LDH 释放量升高( $P<0.001$ )。

**2.3 Dioscin 对结肠癌细胞 DNA 含量的影响** Dioscin 作用细胞 24 h 后,HCT-116 细胞和 RKO 细胞的 DNA 含量则随 Dioscin 浓度增加明显上升,且差异显著( $P<0.05$ , $P<0.001$ )(图 3)。

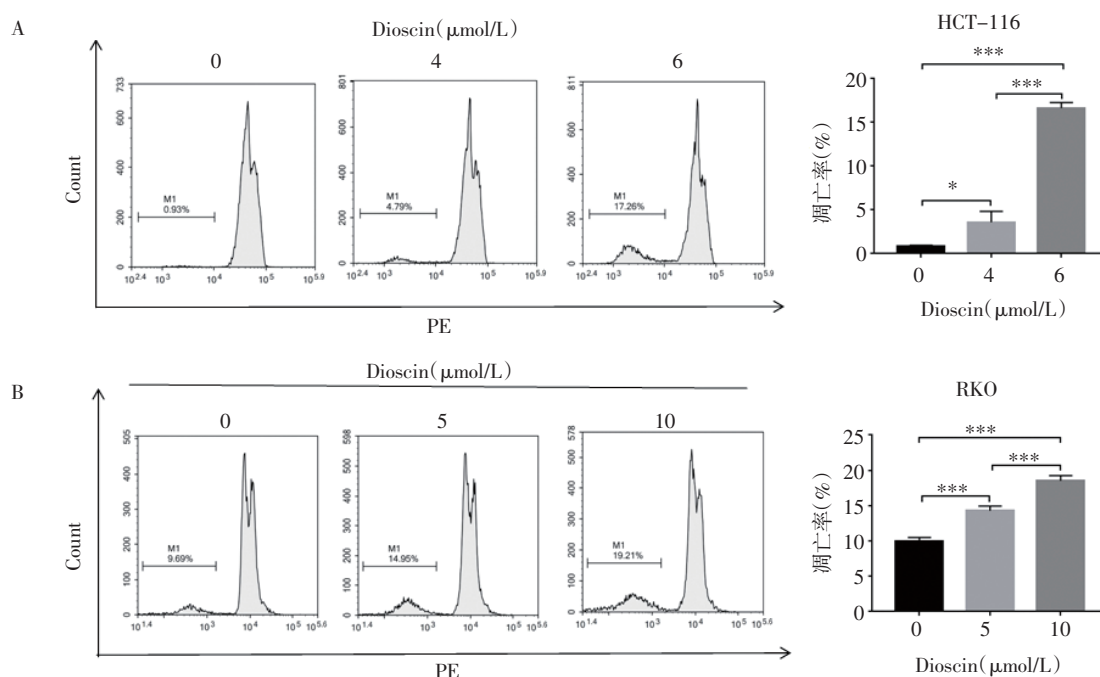
**2.4 Dioscin 对结肠癌细胞凋亡的影响** HCT-116 细胞的结果显示,与对照组相比,4、6  $\mu\text{mol/L}$  组细胞总凋亡率增加(均  $P<0.001$ ),且 6  $\mu\text{mol/L}$  组相较于 4  $\mu\text{mol/L}$  组总凋亡率也呈上升趋势( $P<0.05$ );RKO 细胞的结果显示,与对照组相比,5、10  $\mu\text{mol/L}$  组细胞总凋亡率增加( $P<0.01$ , $P<0.001$ ),且 10  $\mu\text{mol/L}$  组相较于 5  $\mu\text{mol/L}$  组总凋亡率具有统计学差异( $P<0.01$ )(图 4)。



注:A:可见分光光度法检测 Dioscin 对 HCT-116 细胞 LDH 释放量的影响;B:可见分光光度法检测 Dioscin 对 RKO 细胞 LDH 释放量的影响;LDH:乳酸脱氢酶;\*\*\* $P<0.001$

图 2 Dioscin 对结肠癌细胞 LDH 释放量的影响

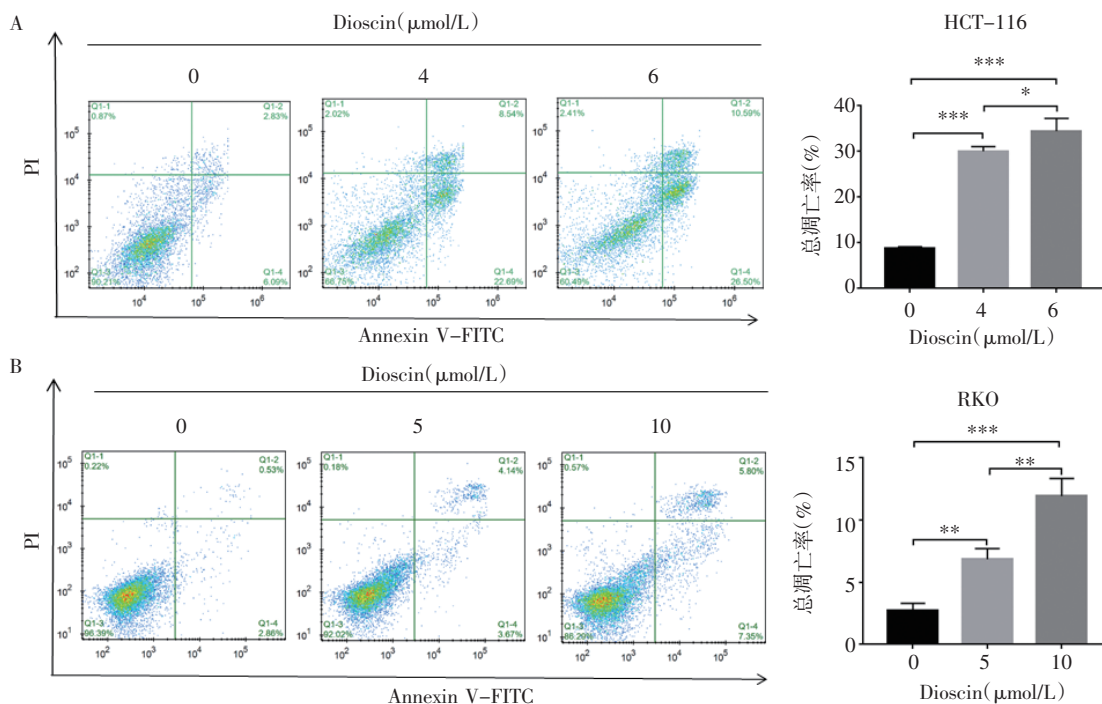
Fig 2 Effect of Dioscin on LDH release of colon cancer cells



注:A:DNA 含量检测法检测 Dioscin 对 HCT-116 细胞 DNA 含量的影响;B:DNA 含量检测法检测 Dioscin 对 RKO 细胞 DNA 含量的影响; \* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$

图 3 Dioscin 对结肠癌细胞 DNA 含量的影响

Fig 3 Effect of Dioscin on DNA content of colon cancer cells



注:A:Annexin V-FITC/PI 双染法检测 Dioscin 对 HCT-116 细胞凋亡的影响;B:Annexin V-FITC/PI 双染法检测 Dioscin 对 RKO 细胞凋亡的影响; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$

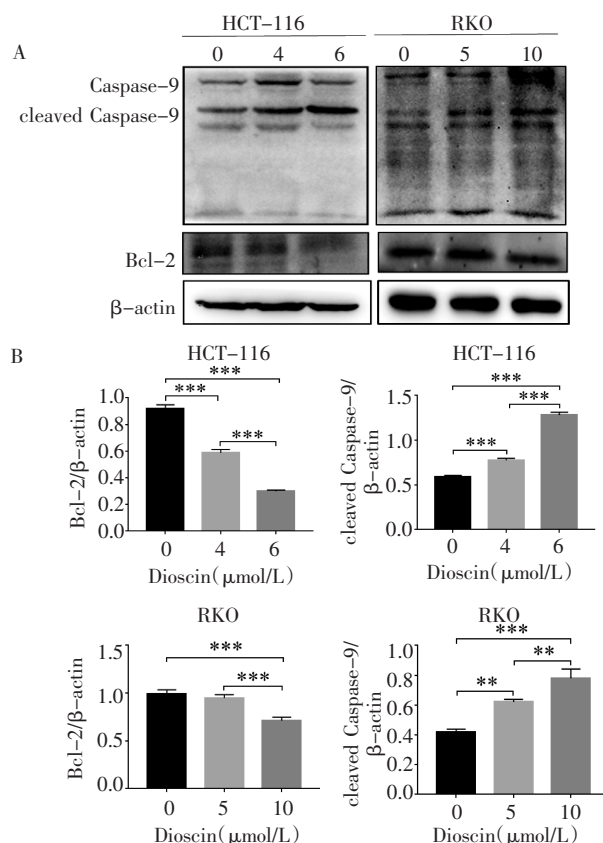
图4 Dioscin 对结肠癌细胞凋亡的影响

Fig 4 Effect of Dioscin on apoptosis of colon cancer cells

**2.5 Dioscin 对结肠癌细胞凋亡相关蛋白表达的影响** HCT-116 细胞的 Western 印迹结果显示,与对照组相比,4、6 μmol/L 组细胞 Bcl-2 蛋白表达水平下调(均  $P<0.001$ ),cleaved Caspase-9 蛋白表达水平上调(均  $P<0.001$ );RKO 细胞的 Western 印迹结果显示,与对照组相比,10 μmol/L Dioscin 组 Bcl-2 蛋白表达下调( $P<0.001$ ),Dioscin 组 cleaved Caspase-9 蛋白表达水平均上调( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ )(图 5)。

**2.6 Dioscin 通过氧化应激机制导致结肠癌细胞凋亡** 用 Dioscin 处理 HCT-116、RKO 细胞 24 h 后,使用荧光探针法处理后以流式细胞术检测细胞内 ROS 水平变化情况。结果显示,经 4、6 μmol/L Dioscin 处理后,HCT-116 细胞内 ROS 水平较对照组上调( $P<0.05$ ,  $P<0.001$ );经 5、10 μmol/L Dioscin 处理后,RKO 细胞的 ROS 水平较对照组上调(均  $P<0.001$ ),且 HCT-116 及 RKO 细胞的 ROS 表达情况均呈现浓度依赖性(图 6)。

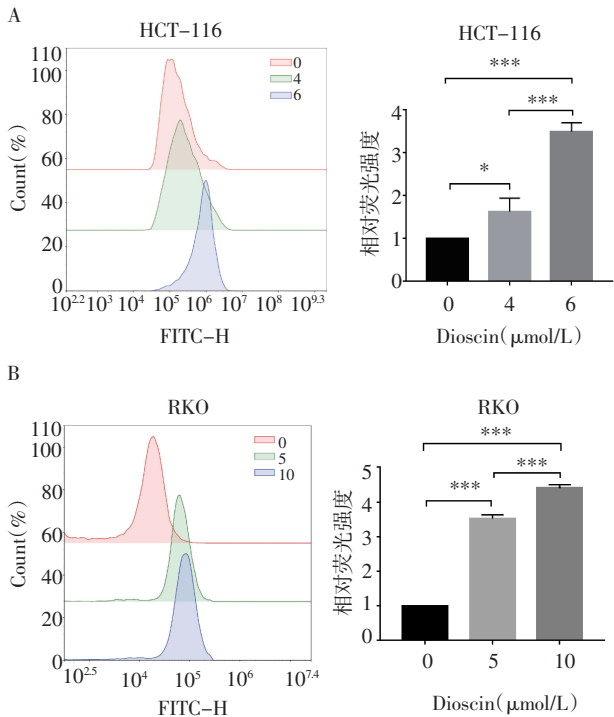
通过荧光探针法检测线粒体超氧化物的表达情况,HCT-116 细胞结果显示,与对照组相比,4、6 μmol/L 组细胞的超氧化物含量增多(均  $P<0.001$ ),且随着 Dioscin 浓度增加,超氧化物含量也逐渐上调( $P<0.001$ );RKO 细胞结果显示,经 5、10 μmol/L Dioscin 处理后,细胞的超氧化物含量较对照组增多(均  $P<0.001$ ),见图 7。



注:A:Western 印迹检测相关蛋白表达情况;B:灰度分析相关蛋白的表达情况; \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$

图5 Dioscin 对结肠癌细胞凋亡相关蛋白表达的影响

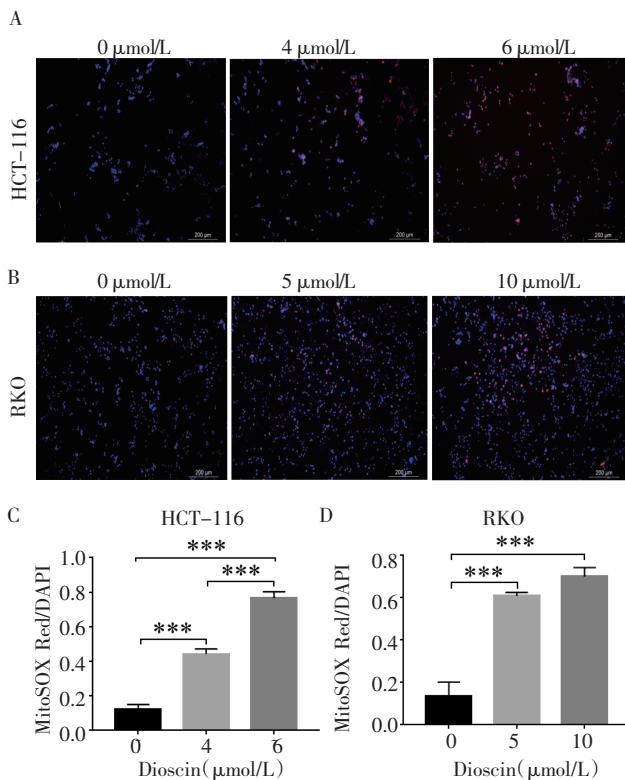
Fig 5 Effect of Dioscin on apoptosis-related protein expression of colon cancer cells



注:A:DCFH-DA 探针法检测 Dioscin 对 HCT-116 细胞 ROS 水平的影响;B:DCFH-DA 探针法检测 Dioscin 对 RKO 细胞 ROS 水平的影响;ROS:活性氧簇;\* $P<0.05$ ,\*\*\* $P<0.001$

图6 Dioscin 对结肠癌细胞内 ROS 水平的影响

Fig 6 Effect of Dioscin on intracellular ROS level of colon cancer

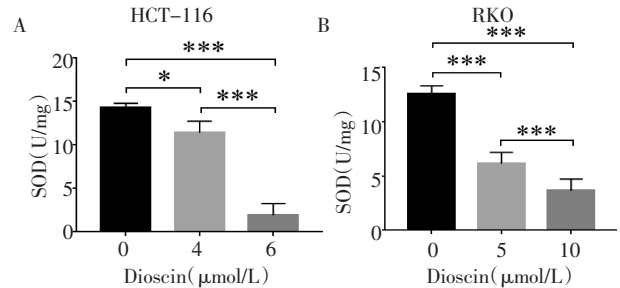


注:A: 荧光探针法检测 Dioscin 对 HCT-116 细胞超氧化物含量的影响;B: 荧光探针法检测 Dioscin 对 RKO 细胞超氧化物含量的影响;C:HCT-116 细胞超氧化物统计分析结果;D:RKO 细胞超氧化物统计分析结果;\*\*\* $P<0.001$

图7 Dioscin 对结肠癌细胞超氧化物含量的影响(200×)

Fig 7 Effect of Dioscin on superoxide content of colon cancer(200×)

从图8可以看出,经4、6  $\mu\text{mol/L}$  Dioscin 处理后, HCT-116 细胞的 SOD 活性较对照组降低( $P<0.05$ ,  $P<0.001$ ); 经5、10  $\mu\text{mol/L}$  Dioscin 处理后, RKO 细胞的 SOD 活性较对照组降低(均  $P<0.001$ ), 且 HCT-116 及 RKO 细胞的 SOD 的表达情况均呈现浓度依赖性。

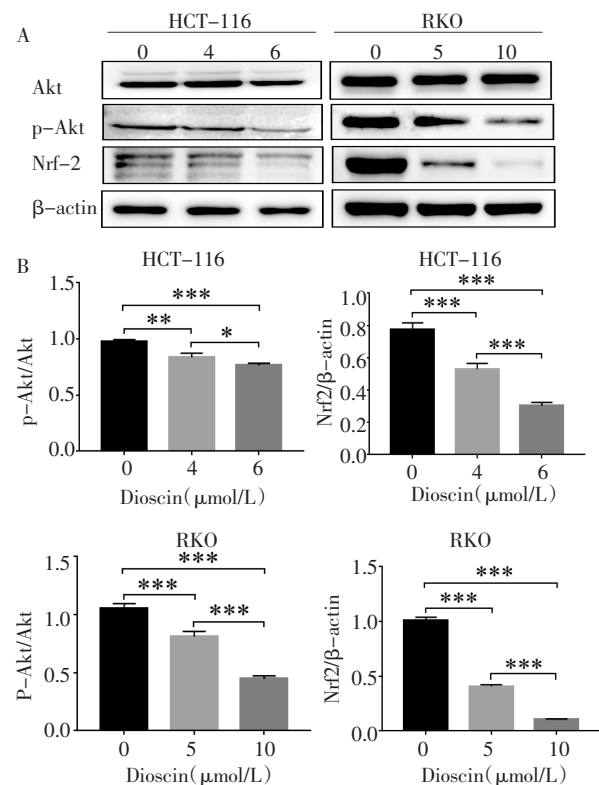


注:A: 可见分光光度法检测 Dioscin 对 HCT-116 细胞 SOD 活性的影响;B:可见分光光度法检测 Dioscin 对 RKO 细胞 SOD 活性的影响;SOD:超氧化物歧化酶;\* $P<0.05$ ,\*\*\* $P<0.001$

图8 Dioscin 对结肠癌细胞 SOD 活性的影响

Fig 8 Effect of Dioscin on SOD activity of colon cancer cells

2.7 Dioscin 对结肠癌细胞 Nrf2 信号通路相关蛋白表达的影响 Western 印迹法检测相关蛋白表达结果显示,与对照组相比,HCT-116、RKO 药物组细胞随着 Dioscin 浓度增加,磷酸化 Akt( $P<0.05$ , $P<0.001$ ) 和 Nrf2(均  $P<0.001$ )表达水平逐渐下调(图9)。



注:A:Western 印迹检测相关蛋白表达情况;B:灰度分析相关蛋白的表达情况;Akt:蛋白激酶 B;\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$

图9 Dioscin 对结肠癌细胞 Nrf2 信号通路相关蛋白表达的影响

Fig 9 Effect of Dioscin on Nrf2 signaling pathway-related protein expression of colon cancer cells

### 3 讨论

结肠癌是常见的恶性实体肿瘤,其不良预后严重影响了人类的身心健康。Dioscin 是一种传统中草药提取的天然糖苷,广泛存在于多种草本植物中<sup>[14]</sup>,已有研究表明其具有抗癌活性<sup>[15]</sup>。基于肿瘤发生、发展的复杂性,本实验以人结肠癌 HCT-116、RKO 细胞为研究对象,探讨 Dioscin 激活氧化应激,诱导细胞凋亡的机制。

细胞凋亡是细胞受基因调控的一种程序性死亡形式,在正常情况下机体通过凋亡来清除受损或病变细胞来维护机体健康。细胞凋亡主要有内源性和外源性两种途径,内源性途径主要在线粒体水平由 DNA 损伤和代谢应激启动凋亡<sup>[16]</sup>。在线粒体途径中调控细胞凋亡的主要因子是 Bcl-2 抗凋亡蛋白<sup>[17]</sup>,Bcl-2 表达改变会影响线粒体膜通透性,从而使细胞色素 C 释放激活下游 Caspase 蛋白,最终导致细胞凋亡<sup>[18]</sup>。有研究表明 Dioscin 可通过上调 Caspase 3、下调 Bcl-2 的表达来抑制肝癌细胞活性<sup>[19]</sup>,也有研究表明 Dioscin 可以激活线粒体信号途径导致皮肤癌细胞凋亡<sup>[20]</sup>。对于结肠肿瘤,本研究结果表明 Dioscin 可通过线粒体途径对肿瘤细胞产生毒性作用,诱导细胞凋亡。Western 印迹结果同样表明加药后抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调,促凋亡蛋白 cleaved Caspase-9 表达上调。

在许多病理状态下,发生活性氧和抗氧化系统失衡即为氧化应激。细胞 ROS 的产生主要在线粒体内,若 ROS 产生过多致使内环境失衡,细胞就会发生氧化应激,造成细胞凋亡<sup>[21]</sup>。一般情况下,机体中存在的 SOD 等抗氧化系统可通过清除氧自由基对抗氧化应激,清除线粒体氧化还原过程中产生的 ROS<sup>[22]</sup>。在炎症方面,有研究发现 Dioscin 通过改善氧化应激,细胞凋亡来减轻二甲基亚硝胺(DMN)诱导的急性肝损伤<sup>[23]</sup>;在肿瘤方面,已有文章阐明 Dioscin 可促进 ROS 介导的 p38-MAPK/HSP27 信号途径来诱导肺鳞癌细胞的凋亡<sup>[24]</sup>。本研究表明了 Dioscin 可通过 ROS 介导的氧化应激来激活线粒体途径的结肠癌细胞凋亡。

PI3K/Akt 是氧化应激的主要途径之一,跟细胞凋亡相关的 PI3K/Akt 信号转导的下游靶点为 Nrf2<sup>[25]</sup>。Nrf2 是一个监控机体氧化应激的重要转录因子,在正常生理条件下,Nrf2 通过与 Keap1 结合来维持稳定状态,但在蛋白激酶的作用下,Nrf2 可以和 Keap1 解离转入细胞核内,并识别 ARE 序列以激活后续的 SOD 等多种抗氧化蛋白酶<sup>[26]</sup>,进而消除有害物质使 ROS 失活。Western 印迹结果表明,加药后抗氧

化蛋白 Nrf2、p-Akt 表达下调,说明 Dioscin 可能通过 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路抑制 SOD 表达,使细胞超氧化物含量及 ROS 升高,进而激活后续的线粒体相关凋亡途径。

针对胆囊癌的研究证实 Dioscin 可通过 ROS 介导的 PI3K/Akt 信号转导诱导胆囊癌细胞凋亡<sup>[27]</sup>。对于 Dioscin 有关结肠癌的相关研究中,有文章表明 Dioscin 可通过 P38 和 JNK 途径抑制肿瘤生长<sup>[10]</sup>。本研究提示 Dioscin 可能通过抑制 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路来介导 ROS 蓄积从而激活下游的线粒体途径诱导细胞凋亡。目前还有研究表明 Dioscin 还可通过铁死亡<sup>[28]</sup>、细胞焦亡<sup>[29]</sup>等方式来延缓其他疾病进展,故而对于 Dioscin 治疗结肠癌的更多机制研究,还有待进一步发现。

综上所述,Dioscin 可能通过 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路介导氧化应激发挥作用,抑制人结肠癌 HCT-116 细胞及 RKO 细胞生长并诱导其凋亡,进一步证明了 Dioscin 的抗结肠癌作用,为其对结肠癌的临床应用提供了理论和实验依据。

#### 参考文献:

- [1] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. Chin Med J(Engl), 2021, 134(7):783-791.
- [2] XI L T, ZHU J Z, ZHANG H X, et al. Epidemiological trends in gastrointestinal cancers in China: an ecological study[J]. Dig Dis Sci, 2019, 64(2):532-543.
- [3] DIENSTMANN R, SALAZAR R, TABERNERO J. Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatments for individual patients[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(16):1787-1796.
- [4] AIELLO P, SHARGHI M, MANSOURKHANI S M, et al. Medicinal plants in the prevention and treatment of colon cancer[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019:2075614.
- [5] 周滢, 苏咏梅, 曾志华, 等. 山药与《神农本草经》中“上品”中药配伍的临床运用探析[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2013, 15(9):2060-2062.
- [6] 王淑荣, 凌霜, 张庆光, 等. 薯蓣皂苷现代药理学研究进展[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(2):161-166.
- [7] LI X F, LIU S L, QU L P, et al. Dioscin and diosgenin: insights into their potential protective effects in cardiac diseases[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 274:114018.
- [8] TAO X F, YIN L H, XU L N, et al. Dioscin: a diverse acting natural compound with therapeutic potential in metabolic diseases, cancer, inflammation and infections[J]. Pharmacol Res, 2018, 137:259-269.
- [9] YANG L F, REN S N, XU F, et al. Recent advances in the pharmacological activities of dioscin [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019:5763602.
- [10] LI S, CHENG B B, HOU L X, et al. Dioscin inhibits colon cancer cells growth by reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction and p38 and JNK pathways[J]. Anti-Cancer Drugs, 2018, 29(3):234-242.



- [11] SI L L, ZHENG L L, XU L N, et al. Dioscin suppresses human laryngeal cancer cells growth via induction of cell-cycle arrest and MAPK-mediated mitochondrial-derived apoptosis and inhibition of tumor invasion[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 774: 105–117.
- [12] MAO Z, HAN X, CHEN D H, et al. Potent effects of dioscin against hepatocellular carcinoma through regulating TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator(TIGAR)-mediated apoptosis, autophagy, and DNA damage[J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(7): 919–937.
- [13] CHEN H, XU L N, YIN L H, et al. iTRAQ-based proteomic analysis of dioscin on human HCT-116 colon cancer cells[J]. *Proteomics*, 2014, 14(1): 51–73.
- [14] MAO W L, YIN H, CHEN W Y, et al. Network pharmacology and experimental evidence reveal dioscin suppresses proliferation, invasion, and EMT via AKT/GSK3b/mTOR Signaling in lung adenocarcinoma[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 2135–2147.
- [15] 梁玉琼, 黄庆, 梁天坚, 等. 薯蓣皂苷对肝癌细胞 Bel-7402 和正常人肝细胞 LO2 增殖和凋亡的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(3): 30–35.
- [16] MATSUURA K, CANFIELD K, FENG W, et al. Metabolic regulation of apoptosis in cancer[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2016, 327: 43–87.
- [17] EDLICH F. BCL-2 proteins and apoptosis: recent insights and unknowns[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(1): 26–34.
- [18] CHUNG C. Restoring the switch for cancer cell death: targeting the apoptosis signaling pathway[J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2018, 75(13): 945–952.
- [19] ZHANG G X, ZENG X C, ZHANG R, et al. Dioscin suppresses hepatocellular carcinoma tumor growth by inducing apoptosis and regulation of TP53, BAX, BCL2 and cleaved CASP3[J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(12): 1329–1336.
- [20] WANG P, WANG C, LIU C Y. Antitumor effects of dioscin in A431 cells via adjusting ATM/p53-mediated cell apoptosis, DNA damage and migration[J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(1): 59.
- [21] WANG P, GONG Q, HU J, et al. Reactive oxygen species(ROS)-responsive prodrugs, probes, and theranostic prodrugs: applications in the ROS-related diseases[J]. *J Med Chem*, 2021, 64(1): 298–325.
- [22] DIWANJI N, BERGMANN A. An unexpected friend-ROS in apoptosis-induced compensatory proliferation: implications for regeneration and cancer[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 80: 74–82.
- [23] ZHANG W X, YIN L H, TAO X F, et al. Dioscin alleviates dimethyl-nitrosamine-induced acute liver injury through regulating apoptosis, oxidative stress and inflammation[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 45: 193–201.
- [24] YAO Y N, CUI L Y, YE J N, et al. Dioscin facilitates ROS-induced apoptosis via the p38-MAPK/HSP27-mediated pathways in lung squamous cell carcinoma[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(15): 2883–2894.
- [25] YU C, XIAO J H. The keap1-Nrf2 system: a mediator between oxidative stress and aging[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6635460.
- [26] LIU Q, JIN Z Q, XU Z L, et al. Antioxidant effects of ginkgolides and bilobalide against cerebral ischemia injury by activating the Akt/Nrf2 pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2019, 24(2): 441–452.
- [27] SONG X L, WANG Z, LIANG H B, et al. Dioscin induces gallbladder cancer apoptosis by inhibiting ROS-mediated PI3K/AKT signalling[J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(6): 782–793.
- [28] XIE Y J, CHEN G X. Dioscin induces ferroptosis and synergistic cytotoxicity with chemotherapeutics in melanoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 557: 213–220.
- [29] RAN X, YAN Z, YANG Y X, et al. Dioscin improves pyroptosis in LPS-induced mice mastitis by activating AMPK/Nrf2 and inhibiting the NF-kappa B signaling pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 8845521.

(2021-12-31 收稿)

## 启 事

《天津医科大学学报》2021 年 5 期发表的《注射用头孢米诺钠中有关物质 HPLC 检测方法的建立与验证》一文的通信作者是徐亮教授。