

· 论著 ·

七叶皂苷钠抑制人甲状腺未分化癌 HTh74 细胞株增殖作用的研究

李兴佳 郑全喜 陈国芳 茅晓东 刘超

【摘要】 目的 研究七叶皂苷钠对人甲状腺未分化癌 HTh74 细胞株增殖的潜在抑制作用及其分子机制。**方法** 以不同浓度的七叶皂苷钠(0, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol/L}$)处理 HTh74 细胞 48 h 后,观察细胞形态变化;以不同浓度的七叶皂苷钠(0, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol/L}$)处理 HTh74 细胞 24 h、48 h 和 72 h 后, 噻唑蓝比色(MTT)法检测七叶皂苷钠对 HTh74 细胞株增殖的抑制效应并计算细胞增殖率及半数抑制率(IC_{50});以不同浓度的七叶皂苷钠(0, 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{mol/L}$)处理 HTh74 细胞 48 h 后, Western 印迹检测七叶皂苷钠引起的蛋白激酶 B(Akt)、磷酸化 Akt(p-Akt)以及细胞周期相关蛋白的表达。**结果** 七叶皂苷钠作用后,细胞发生明显皱缩,且作用浓度越高细胞皱缩越明显;MTT 法结果显示,七叶皂苷钠对 HTh74 细胞有显著的生长抑制作用,呈现典型的时间与剂量依赖性,80 $\mu\text{mol/L}$ 七叶皂苷钠作用 24 h,对细胞的生长抑制作用有统计学意义($F = 111.4, P < 0.01$),而 40 $\mu\text{mol/L}$ 作用 48 h 及 72 h 时,细胞生长均受到抑制($F = 543.6, 722.1, P < 0.01$),并且 48 h 的 IC_{50} 为 69.4 $\mu\text{mol/L}$, 72 h 的 IC_{50} 为 32.5 $\mu\text{mol/L}$;七叶皂苷钠作用 48 h 后 Akt、p-Akt 和细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)2 的表达显著降低,并呈现剂量依赖效应。与未经处理的细胞相比,低浓度(5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$)七叶皂苷钠处理时 Akt 和 p-Akt 的表达水平已开始降低($F = 613.9, P < 0.05$),而从 15 $\mu\text{mol/L}$ 开始,CDK2 表达的降低有统计学意义($F = 208.9, 208.3, P < 0.05$)。CDK1、CDK6、细胞周期蛋白 D 以及细胞周期蛋白 E 的表达在各处理组间差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。**结论** 七叶皂苷钠可抑制人甲状腺未分化癌 HTh74 细胞的增殖,可能是通过调节 Akt、p-Akt 以及 CDK2 等蛋白的表达实现的。

【关键词】 甲状腺未分化癌;HTh74;七叶皂苷钠;细胞周期;细胞凋亡

Inhibitory effects of sodium aescinate on cell proliferation in human anaplastic thyroid carcinoma cell

HTh74 Li Xingjia, Zheng Quanxi, Chen Guofang, Mao Xiaodong, Liu Chao. Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Key Laboratory of TCM Syndrome & Treatment of Yingbing of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Corresponding author: Liu Chao, Email: liuchao@nfm.cn.com

【Abstract】 Objective To investigate the potent inhibitory effects of sodium aescinate on human anaplastic thyroid cancer cell line HTh74 and its molecular mechanism. **Methods** Different concentrations of sodium aescinate(0, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol/L}$) were used to treat HTh74 cells for 48 h, and the morphological changes of cells were observed. After treated with different concentrations of sodium aescinate(0, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol/L}$), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide(MTT) assay was used to detect the inhibitory effects of sodium aescinate on proliferation of HTh74 cells and cell proliferation rate, 50% inhibitory concentration(IC_{50}) were calculated. After treated with different concentrations of sodium aescinate(0, 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{mol/L}$), Western blotting was performed to detect the expression of protein kinase B(Akt), phosphorylated Akt(p-Akt) and cell cycle-related proteins. **Results** After treated with sodium aescinate, cells shrunked significantly in a dose dependent manner. MTT assay showed that sodium aescinate had obvious inhibitory effect on HTh74 cell growth in a time and dose dependent manner, when treated with 80 $\mu\text{mol/L}$ sodium aescinate for 24 h, the inhibitory effects on the cell growth had statistical significance($F = 111.4, P < 0.01$), while treated with 40 $\mu\text{mol/L}$ for 48 h and 72 h, the cell growth was inhibited($F = 543.6, 722.1$, all $P < 0.01$), and the IC_{50} was 69.4 $\mu\text{mol/L}$ at 48 h and 32.5 $\mu\text{mol/L}$

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2016.02.010

作者单位:210028 南京中医药大学附属中西医结合医院,江苏省中医药研究院,国家中医药管理局瘰病证治重点研究室

通信作者:刘超,Email:liuchao@nfm.cn.com

at 72 h. The expression of Akt, p-Akt and cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) significantly decreased in a dose dependent manner after treated with sodium aescinate for 48 h. Compared with untreated cells, expression of Akt and p-Akt began to decrease when treated with low concentration (5 $\mu\text{mol/L}$ and 10 $\mu\text{mol/L}$) of sodium aescinate ($F=613.9, P<0.05$), while expression of CDK2 decreased when treated with 15 $\mu\text{mol/L}$ sodium aescinate ($F=208.9, 208.3$, all $P<0.05$). But the expression of CDK1, CDK6, cyclin D and cyclin E were not different among the groups (all $P>0.05$). **Conclusion** Sodium aescinate can inhibit the proliferation of HTh74 cells, and the molecular mechanisms may be mediated by regulation of Akt, p-Akt and CDK2.

【Key words】 Anaplastic thyroid cancer; HTh74; Sodium aescinate; Cell cycle; Apoptosis

甲状腺癌在病理学上共分为 4 种,分别是甲状腺乳头状癌、甲状腺滤泡状癌、甲状腺髓样癌和甲状腺未分化癌,其中甲状腺未分化癌的恶性程度最高、预后最差^[1]。目前,临床上针对分化型甲状腺癌治疗的手段主要为手术联合放射性碘清扫;而对未分化癌的治疗一直没有非常有效的手段,未分化癌对放射性碘的治疗不敏感,手术、化学治疗效果也不尽如人意。因此,从中草药中寻找甲状腺未分化癌敏感的新化合物成为该领域的重要研究方向。

临床上广泛应用的药物七叶皂苷钠,为七叶皂苷的钠盐化合物。七叶皂苷是从七叶树的果实和干燥成熟种子(总称婆罗子)中提取得到的总皂苷,属于五环三萜皂苷,具有抗渗出、增加静脉张力、消肿、抗炎和改善血液循环的作用^[2-4]。临床上常用其钠盐作为抗炎和抗水肿药物。与其他五环三萜皂苷类化合物相比,国内、外对七叶皂苷的研究还处于初步阶段,特别是有关其抑制肿瘤细胞增殖的分子机制研究比较匮乏^[5]。因此,本研究采用人甲状腺未分化癌 HTh74 作为研究对象,探讨七叶皂苷钠抑制肿瘤细胞增殖的作用机制,为中药治疗甲状腺未分化癌提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人甲状腺未分化癌 HTh74 细胞株由德国 Charite 医学院 Derwahl 教授赠送。

1.1.2 药物 七叶皂苷钠购于南京艾斯替么中药研究所,室温干燥保存。七叶皂苷钠用 DMEM 溶解配制 20 mmol/L 的贮存液, -20°C 冰箱保存。

1.1.3 试剂 RPMI-1640 培养基、胎牛血清、青霉素和链霉素购于美国 Invitrogen 公司。噻唑蓝为美国 Sigma 公司产品。蛋白激酶 B(Akt)、磷酸化 Akt(p-Akt)、细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)1、CDK2、CDK6、细胞周期蛋白(cyclin)D 和 cyclinE 的一抗为美国 Bioworld 公司产品, GAPDH 一抗购于南京康成

生物公司。羊抗鼠-HRP 标记二抗、羊抗兔-HRP 标记二抗购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及干预条件 人甲状腺未分化癌 HTh74 细胞株在 37°C 、5% CO_2 条件下,用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 F-12 培养基传代培养。取对数生长期的细胞用于后续实验。

1.2.2 细胞形态观察 不同浓度的七叶皂苷钠(0, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol/L}$)处理处于对数生长期的 HTh74 细胞,于 48 h 后观察细胞的形态变化,倒置显微镜拍摄($200\times$)。

1.2.3 细胞增殖分析 噻唑蓝比色法分析七叶皂苷钠对 HTh74 细胞增殖的抑制作用。取对数生长期的 HTh74 细胞接种于 96 孔板中,接种密度为 5×10^3 个/孔,每组设置 3 个复孔。去血清饥饿过夜后,分别加入含不同浓度七叶皂苷钠(0, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol/L}$)的完全培养液,继续培养 24、48 及 72 h。培养结束后,每孔加入 5 mg/ml 的噻唑蓝 10 μl , 37°C 温育 4 h。吸除上清液,每孔加入 100 μl 二甲基亚砜,室温震荡溶解结晶 10 min,于 570 nm(吸收波长)和 630 nm(参比波长)测吸光光度值。计算细胞增殖率及半数抑制率(IC_{50})。细胞增殖率 = $(A_{570\text{nm}} - A_{630\text{nm}})/\text{对照组}(A_{570\text{nm}} - A_{630\text{nm}}) \times 100\%$ 。

1.2.4 Western 印迹分析 对数生长期的 HTh74 细胞去血清饥饿 12 h 后,用不同浓度的七叶皂苷钠(0, 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{mol/L}$)处理 48 h,冰上裂解细胞提取总蛋白, Nanodrop 1000 检测蛋白浓度,用浓度为 10% 的 SDS-PAGE 凝胶进行电泳,上样量为 30 μg ,湿转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗孵育过夜,二抗孵育 1 h 后, ECL 显影曝光。Quantity one 软件对蛋白条带进行灰度分析,以 GAPDH 为内参,比较经不同浓度七叶皂苷钠处理后, Akt、p-Akt、cyclinD、cyclinE 以及 CDK1、CDK2 和

CDK6 表达水平的变化。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计学分析,正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两样本均数比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 七叶皂苷钠对 HTh74 细胞形态的影响 光学显微镜下观察到七叶皂苷钠处理后细胞形态发生明显变化。20 $\mu\text{mol/L}$ 七叶皂苷钠处理 48 h 后,细胞开始发生皱缩,并且有部分细胞脱离培养皿;随着七叶皂苷钠处理浓度的增加,细胞的皱缩程度越来越严重,脱离培养皿的细胞数也逐渐增加,80 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞已皱缩至圆形,几乎无贴壁(图 1)。

2.2 七叶皂苷钠对 HTh74 细胞增殖的作用 噻唑蓝比色法分析显示,七叶皂苷钠呈浓度、时间依赖性抑制 HTh74 细胞的增殖(图 2)。80 $\mu\text{mol/L}$ 七叶皂苷钠作用 24 h,对细胞的生长抑制作用有统计学意

义($F = 111.4, P < 0.01$),而 40 $\mu\text{mol/L}$ 作用 48 h 及 72 h 时,细胞生长均受到抑制($F = 543.6, 722.1, P$ 均 < 0.01),并且 48 h、72 h 的 IC_{50} 分别为 69.4 $\mu\text{mol/L}$ 和 32.5 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.3 七叶皂苷钠对 HTh74 细胞 Akt、p-Akt 及 cyclin 表达的影响 七叶皂苷钠处理 HTh74 细胞 48 h 后, Akt、p-Akt 以及 CDK2 的表达水平均明显降低,并呈现剂量依赖效应,与未经处理的细胞相比,低浓度(5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$)七叶皂苷钠处理时 Akt 和 p-Akt 的表达水平已开始降低(P 均 < 0.05),而从 15 $\mu\text{mol/L}$ 开始, CDK2 表达的降低有统计学意义(P 均 < 0.01);而 CDK1、CDK6、cyclinD 和 cyclinE 的表达在各处理组间差异无统计学意义(图 3)。

3 讨论

七叶皂苷是从婆罗子中提取得到的总皂苷。国内、外对七叶皂苷的研究比较广泛,但有关其抗肿瘤活性的报道较少。1986 年 Konoshima 和 Lee^[6] 首次报道七叶树果实中的皂苷可抑制鼻咽癌 KB 细胞的增殖,半数有效量(ED_{50})为 3.6 g/ml。近 5 年的研究表明,七叶皂苷钠在体外对人鼻咽癌 KB 细胞、人宫颈癌 Hela 细胞、人胃癌 SGC-7901 细胞、人白血病 HL-60 细胞、小鼠白血病 P388 细胞及 3 种人结肠癌 HeT-8、HT-29、HeT-116 细胞均有生长抑制作用^[7-13]。体内研究也发现其能够抑制小鼠宫颈癌 U14、肝癌 H22、肉瘤 S180 和白血病 P388 细胞生长^[7-10]。此外,还有研究发现七叶皂苷钠可降低大鼠变性隐窝病灶(一种结直肠癌癌前病变)的产生、鸡胚绒毛尿囊膜血管的生成及内皮细胞 ECV340 的增殖和迁移能力^[12-13]。

本研究发现,七叶皂苷钠对人甲状腺未分化癌细胞 HTh74 的增殖具有抑制作用,且随着药物浓度的升高,抑制作用逐渐增强,此外,这种抑制作用还呈现明显的时间依赖性,48 h 的 IC_{50} 为 69.4 $\mu\text{mol/L}$,72 h 的 IC_{50} 为 32.5 $\mu\text{mol/L}$ 。

通过 Western 印迹检测七叶皂苷钠处理 48 h 后 HTh74 细胞中 Akt、p-Akt 以及多种 cyclin、CDK 的表达水平,仅观察到 Akt、p-Akt 和 CDK2 的降低,而其他 CDK 如 CDK1 和 CDK6 以及 cyclin D 和 cyclin E 的表达水平则没有明显变化。这些结果提示七叶皂苷钠对 HTh74 细胞增殖的抑制作用可能是通过抑制 Akt 表达和活性以及下调 CDK2 的表达来实现的。

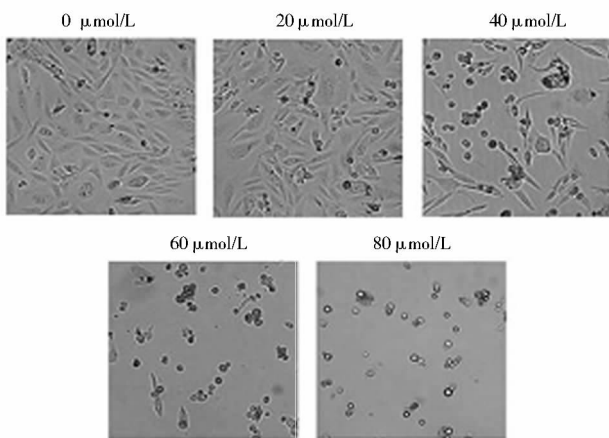
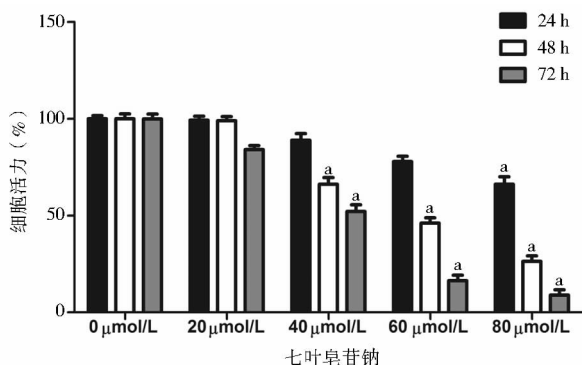
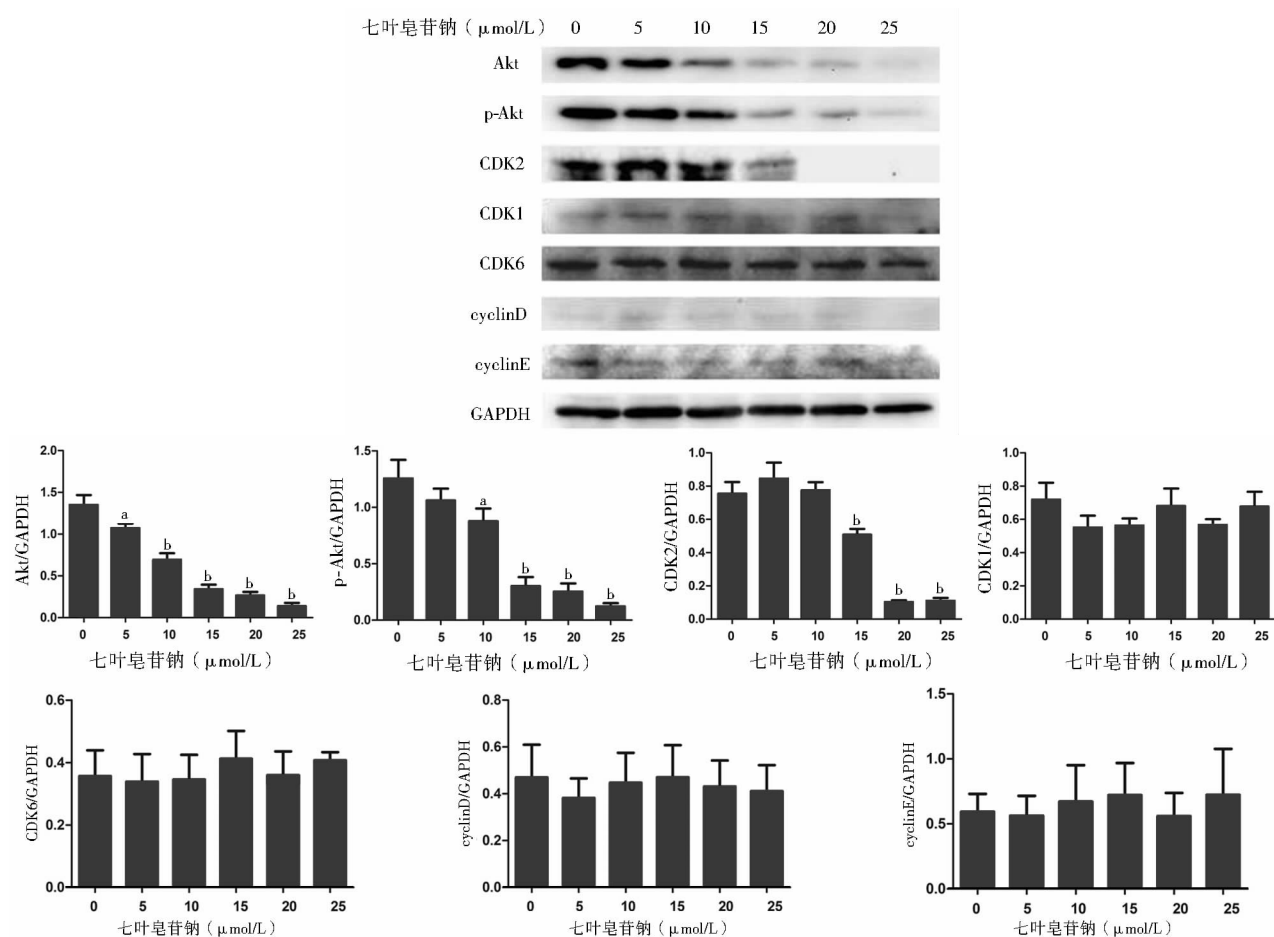


图 1 七叶皂苷钠对 HTh74 细胞形态的影响
(莱卡倒置显微镜, 200 ×)



注:与对照组相比, $^a P < 0.01$

图 2 七叶皂苷钠对 HTh74 细胞增殖的抑制作用



注:与对照组相比,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;Akt:蛋白激酶 B;CDK:细胞周期蛋白依赖性激酶;Cyclin:细胞周期蛋白

图3 不同浓度七叶皂苷钠处理 HTh74 细胞48 h后,Akt、p-Akt、CDK2、CDK1、CDK6、cyclin D 以及 cyclin E 蛋白水平的变化

Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,作为磷脂酰肌醇 3 激酶下游信号通路的分子,参与细胞增殖、凋亡以及细胞周期等的调控^[14]。磷脂酰肌醇 3 激酶/Akt 信号通路的活化可以促进细胞增殖、抑制多种原因导致的细胞凋亡、促进细胞周期进展以及参与血管形成等^[15]。本研究中,七叶皂苷钠作用于 HTh74 细胞后,Akt 及 p-Akt 的表达水平均显著降低,提示七叶皂苷钠对 HTh74 细胞增殖的抑制作用可能是通过降低 Akt 的表达及抑制 Akt 的活化而实现的。

CDK 也是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其催化活性通过正调节因子 cyclin 和负调节因子 CDK 抑制因子 CDI 的相互作用而进行调节。Cyclin 与 CDK 的丝氨酸/苏氨酸特异的催化位点相互作用,不仅可以控制激酶的活性,还可以决定底物的特异性。早在 20 世纪 80 年代,CDK/cyclin 复合物就被证实参与细胞周期调控。目前 CDK 家族至少有 20 余个成员被鉴定出来,每一种都有一个保守的催化核心区、

一个 cyclin 结合区以及一个有活性的 T 环基序。与 CDK 家族不同,cyclin 家族成员虽多,但分类标准非常单一,仅根据介导与 CDK 结合的周期蛋白框的不同而分类,包括 cyclin A, B, C, D, E, F 等,其周期蛋白框外的序列差异直接导致 cyclin 的调节差异及功能多样性^[16]。其中 cyclin E 与 CDK2 结合形成 cyclin E-CDK2 复合物,后者为细胞从 G₁ 期进入 S 期的关键激酶复合物,其通过促进 Rb 的磷酸化,释放转录因子 E2F,促进细胞周期 G₁/S 期进程的顺利进行^[17]。本研究发现七叶皂苷钠能够抑制甲状腺未分化癌 HTh74 细胞中 CDK2 的表达,表明至少在 HTh74 细胞株中,七叶皂苷钠有可能是通过降低 CDK2 的表达水平而将细胞阻滞在 G₁ 期,从而抑制细胞增殖的。

目前,关于七叶皂苷钠与甲状腺癌的研究尚属空白领域,本研究发现七叶皂苷钠能够抑制甲状腺未分化癌细胞 HTh74 的增殖,并且这种抑制作用可

能是通过降低 Akt、p-Akt 以及 CDK2 的表达水平进而影响其下游通路来实现的。这些结果为将七叶皂苷钠作为治疗甲状腺未分化癌的潜在药物提供了理论支持,但在临床应用之前还需要开展更多、更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002 [J]. JAMA, 2006, 295 (18): 2164-2167.
- [2] Li X, Chen GP, Li L, et al. Dual effects of sodium aescinate on vascular tension in rat thoracic aorta [J]. Microvasc Res, 2010, 79 (1): 63-69. DOI: 10.1016/j.mvr.2009.11.002.
- [3] Wang Y, Ye Z, Hu X, et al. Morphological changes of the neural cells after blast injury of spinal cord and neuroprotective effects of sodium beta-aescinate in rabbits [J]. Injury, 2010, 41 (7): 707-716. DOI: 10.1016/j.injury.2009.12.003.
- [4] Du Y, Wang T, Jiang N, et al. Protective effect of sodium aescinate on lung injury induced by methyl parathion [J]. Hum Exp Toxicol, 2011, 30 (10): 1584-1591. DOI: 10.1177/0960327110393764.
- [5] Wang XH, Xu B, Liu JT, et al. Effect of beta-escin sodium on endothelial cells proliferation, migration and apoptosis [J]. Vascu Pharmacol, 2008, 49 (4-6): 158-165. DOI: 10.1016/j.vph.2008.07.005.
- [6] Konoshima T, Lee KH. Antitumor agents, 82. Cytotoxic sapogenols from Aesculus hippocastanum [J]. J Nat Prod, 1986, 49 (4): 650-656.
- [7] 周雪莹, 傅风华, 李振, 等. 七叶皂苷钠对宫颈癌瘤株体内、外增殖的抑制作用 [J]. 烟台大学学报 (自然科学与工程版), 2009, 2 (15): 131-136. DOI: 10.3969/j.issn.1004-8820.2009.02.012.
- [8] 吴子侠, 吴海竞, 曹莉, 等. 七叶皂苷体外抗 SGC-7901 细胞的作用及机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25 (1): 78-81. DOI: 10.3321/j.issn:1001-1978.2009.01.020.
- [9] 竺佳, 牛映平, 徐佳, 等. 七叶皂苷钠对 P388 小鼠白血病细胞的体内、外增殖抑制作用 [J]. 浙江工业大学学报, 2009, 32 (2): 125-125. DOI: 10.3969/j.issn.1006-4303.2009.02.002.
- [10] 成志, 高瑞兰, 陈小红. 七叶皂苷诱导 HL-60 细胞凋亡的研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2008, 16 (2): 290-293. DOI: 10.3969/j.issn.1009-2137.2008.02.012.
- [11] 邹明, 韩英, 纪欣. 七叶皂苷钠抑制大肠癌 HCT-8 细胞生长及提高癌细胞对 5-氟尿嘧啶敏感性的研究 [J]. 中华消化杂志, 2001, 21 (4): 248-249. DOI: 10.3760/j.issn:0254-1432.2001.04.022.
- [12] Patlolla JM, Raju J, Swamy MV, et al. Beta-escin inhibits colonic aberrant crypt foci formation in rats and regulates the cell cycle growth by inducing p21 (waf1/cip1) in colon cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5 (6): 1459-1466.
- [13] 杨晓冉, 赵保忠, 崔景荣. β -七叶皂苷钠对鸡胚血管新生的影响 [J]. 中国新药杂志, 2006, 15 (11): 868-870. DOI: 10.3321/j.issn:1003-3734.2006.11.008.
- [14] Rosen N, She QB. AKT and cancer--is it all mTOR? [J]. Cancer Cell, 2006, 10 (4): 254-256.
- [15] Manfredi GI, Dicitore A, Gaudenzi G, et al. PI3K/Akt/mTOR signaling in medullary thyroid cancer: a promising molecular target for cancer therapy [J]. Endocrine, 2015, 48 (2): 363-370. DOI: 10.1007/s12020-014-0380-1.
- [16] Lim S, Kaldis P. Cdk, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation [J]. Development, 2013, 140 (15): 3079-3093. DOI: 10.1242/dev.091744.
- [17] 陈济, 宋方州. CyclinE-CDK2 分子活性调节机制 [J]. 医学分子生物学杂志, 2006, 3 (3): 220-222. DOI: 10.3870/j.issn.1672-8009.2006.03.014.

(收稿日期: 2015-07-09)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《国际内分泌代谢杂志》对缩略语的使用说明

文题原则上不能使用缩略语,文中应尽量减少缩略语。公认的缩略语在文中可以直接使用。未公布的名词术语,请按照如下规则进行缩写:原词过长且在文中出现 3 次以上者,可在第一次出现时写出全称,并在括号内写出缩略语。不超过 5 个汉字的名称不宜使用缩略语,以免影响文章的可读性。

缩略语	中文名称	缩略语	中文名称
ADA	美国糖尿病协会	MRI	磁共振成像
CT	电子计算机体层扫描	MtDNA	线粒体 DNA
ELISA	酶联免疫吸附试验	OR	优势比
HE	苏木素-伊红	PCR	聚合酶链反应
HIV	人类免疫缺陷病毒	PET	正电子发射断层摄影术
HbA1c	糖化血红蛋白	Real-time PCR	实时定量聚合酶链反应
HR	风险比	RT-PCR	反转录聚合酶链反应
ICU	重症监护治疗病房	WHO	世界卫生组织

本刊编辑部