



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.06.09

文章编号: 2095-1264(2022)06-0736-09

黄芪多糖对食管癌细胞增殖与凋亡的影响 及其分子机制研究

李宗杰, 朱呈祥, 刘灿辉, 姚 圣, 董国华*

(南京中医药大学附属南京中医院 胸心血管外科, 江苏 南京, 210000)

摘要: **目的** 研究黄芪多糖(APS)对食管癌细胞的调控作用。**方法** 分别在活体水平和细胞水平添加不同浓度的APS,研究其对裸鼠成瘤及食管癌细胞增殖和凋亡的影响。活体水平:向裸鼠体内注射食管癌细胞和不同浓度APS后,检测肿瘤的生长趋势和抑瘤率;细胞水平:采用EdU染色和流式细胞术检测不同浓度APS处理后,食管癌细胞的细胞周期和凋亡情况。qPCR、Western blotting和Co-IP试验探讨APS对食管癌进行调控的分子机制。**结果** 向裸鼠食管癌移植瘤模型体内注射APS可抑制肿瘤的增殖,且随着剂量的增加,其抑癌效果亦增强。APS可抑制食管癌细胞增殖,促进其凋亡。TP73、FBXW7的表达随APS浓度的增加而增加,Ki67、BCL-2的表达随APS浓度的增加而降低。Co-IP试验发现,APS能够与TP73蛋白结合。过表达TP73可抑制食管癌细胞增殖并促进其凋亡,沉默TP73则与之相反。**结论** 本研究揭示了APS对食管癌的调控作用及其可能的分子机制,为食管癌的治疗及APS的应用提供了一定的研究基础。

关键词: 黄芪多糖;食管癌;TP73;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A

Effects of astragalus polysaccharide on the proliferation and apoptosis of esophageal carcinoma cells and its molecular mechanism

LI Zongjie, ZHU Chengxiang, LIU Canhui, YAO Sheng, DONG Guohua*

(Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Nanjing Hospital of Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210000, Jiangsu, China)

Abstract: Objective To explore the regulation of astragalus polysaccharide (APS) on esophageal cancer cells. **Methods** Different concentrations of APS were taken to figure out their effects on tumor formation and on the cell proliferation and apoptosis in nude mice *in vivo* and *in vitro*. *In vivo*, we first made an injection of esophageal cancer cells to the nude mice, then the tumor growth trends and its suppression rates were detected after the other injection of APS in different concentrations. *In vitro*, the cell cycle and apoptosis rates of esophageal cancer cells were detected through EdU staining and flow cytometry after the treatment of different concentrations of APS. The qPCR, Western blotting and Co-IP assay were used to investigate the molecular mechanism of APS regulation on esophageal cancer. **Results** The tumor proliferation was inhibited after APS treatment and the effect of tumor suppression was enhanced with the dose raising. APS can reduce the proliferation of esophageal cancer cell and promote its apoptosis. The expression of TP73 and FBXW7 was increased along with the raising concentrations of APS, while the expression of Ki67 and BCL-2 was decreased. The Co-IP results revealed that APS was able to bind to the protein of TP73. Overexpressed TP73 could suppress the cell proliferation and promote the apoptosis of esophageal cancer cells, while silenced TP73 did the opposite. **Conclusion** This study revealed the regulatory effects of APS on esophageal cancer and its possible molecular mechanism, which provided a certain

作者简介:李宗杰,男,硕士,医师,研究方向:肿瘤靶向给药系统的研究。

*通信作者:董国华,男,博士,主任医师,研究方向:胸腹腔镜联合食管疾病的手术治疗。

research basis for the treatment of esophageal cancer and the application of APS.

Keywords: Astragalus polysaccharide; Esophageal cancer; TP73; Cell proliferation; Apoptosis

前言

食管癌作为主要的消化道肿瘤之一,严重危害人们的身体健康。2018年,Freddie Bray等发布的全球癌症数据显示,食管癌的发病率在全球范围内位居第七,死亡率排名第六^[1]。目前,我国食管癌患者约占全球的50%^[2]。食管癌早期无明显临床表现,患者直至局部晚期甚至转移阶段时,食管阻塞或狭窄病变的症状才变得明显,加之临床暂缺乏具有诊断意义的肿瘤标志物,导致其死亡率较高^[3-4]。临床常采用内镜、手术辅助化疗和放疗等方式来治疗食管癌,然而,长期化疗可导致患者产生抵抗且预后不良,5年生存率较低^[5]。

黄芪多糖(astragalus polysaccharide, APS)是一种提取自中草药黄芪(*astragalus radix*)干燥根的水溶性多支链杂多糖,是黄芪的主要生物活性物质,具有抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、抗糖尿病、抗病毒、改善心血管功能、调节机体免疫力等多种功效^[6]。APS可通过靶向调控肿瘤微环境中的各种细胞和细胞因子,诱导肿瘤细胞凋亡及逆转化疗耐药,从而达到抗肿瘤效果^[7]。研究发现,APS对乳腺癌、肺癌、宫颈癌、肝癌等恶性肿瘤均有明显的抑制作用^[8-11],而目前有关APS对食管癌细胞的影响及机制的报告较少。本研究旨在通过体内实验探索APS对裸鼠成瘤以及食管癌细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 动物 选取平均体重15~20 g的4~6周龄雄性BALB/C裸鼠15只,均购于陆军军医大学实验动物中心。动物房设置12 h昼夜交替,温度23~25℃,保持裸鼠自由饮水、进食,适应性喂养1周。将裸鼠随机分为5组(每组3只),分别为空白对照组、顺铂组(5 mg·kg⁻¹)、低剂量APS组(0.25 g·kg⁻¹)、中剂量APS组(1 g·kg⁻¹)、高剂量APS组(4 g·kg⁻¹)。

1.2 细胞 人食管癌细胞KYSE30购于中科院细胞库。细胞实验中的给药剂量分别为:顺铂组10 μg·mL⁻¹、低剂量APS组为20 μmol·L⁻¹、中剂量APS组为40 μmol·L⁻¹、高剂量APS组为80 μmol·L⁻¹。

1.3 药物和试剂 APS购自上海生工生物,顺铂由西南大学药学院提供;抗体购自重庆博艾迈迪森生

物科技有限公司,TP73一抗(BM0385,IGEE,中国),FBXW7(BM5872,IGEE,中国),Ki67(BM11005,IGEE,中国),BCL-2(BM19693,IGEE,中国),二抗(BMS014,IGEE,中国);DMEM培养基、胰酶购自美国Gibco公司;新生牛血清(new born calf serum, NBS)购自北京元亨圣马生物技术研究;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自美国Amresco公司。

1.4 人食管癌细胞的培养 将人食管癌细胞KYSE30复苏、培养、传代,加入含10%新生小牛血清的高糖DMEM培养液中、置于37℃、5% CO₂培养箱中培养;每日在倒置显微镜下观察细胞的生长状况,待细胞融合约80%时,加入0.25%胰蛋白酶消化及传代;取对数生长期细胞,制成浓度为1×10⁷ mL⁻¹的细胞悬液。

1.5 裸鼠移植瘤模型的构建 用0.3 mL 0.4%戊巴比妥钠溶液麻醉裸鼠,待其进入麻醉状态后,取150 μL KYSE30细胞悬液,以皮下植入的方式移植到裸鼠右侧腋下部位,待裸鼠成瘤后,每日观察肿瘤的生长情况。1周后,每隔1天用游标卡尺测量肿瘤大小并记录裸鼠体重。分别测量肿瘤的最大直径(a)及与之垂直的短径(b),各测3次。移植瘤体积(V)=a×b²/2,抑瘤率=(V_{对照组}-V_{实验组})/V_{对照组}×100%。成瘤后开始给药。

给药剂量与方法:①空白对照组不予灌胃,常规喂养;②阳性药物对照组给药剂量为5 mg·kg⁻¹,使用时按5 μL·g⁻¹腹腔注射,3天1次;③低剂量APS组:按0.25 g·kg⁻¹给药量将APS配制成0.05 g·mL⁻¹的溶液,使用时按5 μL·g⁻¹灌胃,3天1次;④中剂量APS组:按1 g·kg⁻¹给药量将APS配制成0.2 g·mL⁻¹的溶液,使用时按5 μL·g⁻¹灌胃,3天1次;⑤高剂量APS组:按4 g·kg⁻¹给药量将APS配制成0.8 g·mL⁻¹的溶液,使用时按5 μL·g⁻¹灌胃,3天1次。

1.6 EdU检测细胞增殖 取对数生长期的细胞,以1×10⁷ mL⁻¹接种于6孔板并培养过夜,加入终浓度为10 μmol·L⁻¹的EdU孵育2 h;去除培养液,加入1 mL 4%多聚甲醛,室温固定15 min;去除固定液,每孔用1 mL洗涤液洗涤细胞3次,每次3~5 min;去除洗涤液,每孔加入1 mL含0.3% Triton X-100的PBS室温孵育10~15 min;去除通透液,每孔用1 mL洗涤液

洗涤细胞 1~2 次,每次 3~5 min;加入内源性过氧化物酶封闭液室温孵育 20 min,以灭活内源性过氧化物酶,随后用洗涤液洗涤 3 次,每次 2 min。

1.7 BrdU 检测细胞增殖 取密度为 $1.5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞接种于直径 35 mm 培养皿中培养 24 h,用含 0.4% FBS 的培养液同步化 3 天,使绝大多数细胞处于 G_0 期;加入 BrdU (储液: $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,终浓度 $0.03 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 37°C 孵育 40 min;弃培养液,将细胞收集到流式管中, $1\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min;弃上清,每管加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定 15 min, $2\,400 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min;弃上清,每管加入 2 mL 甘氨酸,清洗,加入 1 mL 0.5% 曲拉通孵育 10 min, PBS 清洗,重悬,用流式细胞仪检测细胞增殖情况。

1.8 PI 染色检测细胞周期 加入 3 mL PBS 洗涤细胞,吸弃 PBS,加入 1 mL 胰蛋白酶消化 5 min;加入 5 mL PBS 制成细胞悬液,移至 15 mL 离心管中, $1\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清液;加入 $500 \mu\text{L}$ PBS 轻轻吹打细胞,制成细胞悬液,在旋涡状态下逐滴加入 2 mL 20°C 的 95% 乙醇,混匀后固定 30 min;加入 5 mL PBS, $1\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min;弃上清液,加入 5 mL PBS 重悬细胞, $1\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min;弃上清液,加入 $800 \mu\text{L}$ PI 染液,轻轻吹打细胞团,混匀,室温避光染色 30 min,用流式细胞仪检测细胞周期。

1.9 细胞凋亡检测 直接收集细胞到 10 mL 离心管中,每个样本的细胞数为 $(1 \sim 5) \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min;弃培养液,用孵育缓冲液洗涤 1 次, $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min;加入 $100 \mu\text{L}$ 标记溶液重悬细胞,室温避光孵育 15 min; $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,沉淀细胞,孵育缓冲液洗 1 次;加入荧光溶液 (SA-FLOUS), 4°C 孵育 20 min,避光并不时振动。流式细胞仪激发光波长为 488 nm,采用波长为 515 nm 的通带滤器检测 FITC 荧光,另一波长 $>560 \text{ nm}$ 的滤器检测 PI。

1.10 TP73 过表达/干扰 从 PubMed Nucleotide 数据库中检索 TP73 (GenBank ID: NG_017035.2) 的 CDS 序列。构建 pcDNA-HA-TP73 过表达载体,通过 Lipofectamine 2000 试剂盒 (Invitrogen) 用空载和过表达载体转染食管癌细胞,转染 24 h 后收集细胞,严格按说明书进行操作。TP73 小干扰表达质粒、阴性对照质粒购自上海吉玛公司, pBabe-U6 被用作 shRNA 质粒表达载体,采用 Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) 试剂盒转染,按说明书进行操作。过表达序列:正向引物 $5'-\text{CCGGAATTCAT}$

$\text{GGCAGCGCTGCGCT}-3'$;反向引物 $5'-\text{CGGGATCC-TTAGCCGGACTGGCTGCCAAGC}-3'$ 。干扰序列: $5'-\text{GCGTGAAGGCAATAATCTCT}-3'$ 。

1.11 免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 用生物素标记 APS,采用 EZ-Link™ Biotin-LC-Hydrazide (Thermo Scientific) 试剂盒,严格按照说明书进行操作。将生物素标记的 APS 接种到细胞悬液中,培养 24 h 后离心收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,吸弃 PBS;加入预冷的 RIPA Buffer,用预冷的细胞刮子将细胞从培养皿或培养瓶上刮下,把悬液转移到 1.5 mL EP 管中, 4°C 水平摇床缓慢晃动 15 min; 4°C 、 $11\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,立即将上清液转移到新的离心管中。准备 Protein A agarose,用 PBS 洗涤 2 遍琼脂糖珠,用 PBS 配制成 50% 的浓度;每 1 mL 总蛋白中加入 $100 \mu\text{L}$ Protein A 琼脂糖珠 (50%), 4°C 摇晃 10 min; 4°C 、 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,将上清液转移到新的离心管中,去除 Protein A 琼脂糖珠;制作蛋白标准曲线,测定蛋白浓度,检测前将总蛋白稀释 10 倍,加入一定体积的兔抗至 $500 \mu\text{L}$ 总蛋白中,缓慢摇动抗原抗体混合物, 4°C 过夜或室温 2 h;加入 $100 \mu\text{L}$ Protein A 琼脂糖珠缓慢摇动, 4°C 过夜或室温 1 h; $14\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 瞬时离心 5 s,收集琼脂糖珠-抗原抗体复合物,去上清液,用预冷的 RIPA buffer 洗涤 3 遍;用 $60 \mu\text{L} \times 2$ 上样缓冲液将琼脂糖珠-抗原抗体复合物悬起,轻轻混匀;将上样品煮 5 min,以游离抗原、抗体、琼脂糖珠,离心,取上清液进行电泳,收集剩余琼脂糖珠。

1.12 蛋白免疫印迹 (Western blotting) 用眼科剪将肿瘤组织块剪碎,加入 RIPA 裂解液 (含 PMSF 和蛋白酶抑制剂 cocktail) 充分裂解组织; 4°C 、 $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,将上清液转入预冷的 1.5 mL 离心管中进行浓度测定;取总蛋白 $30 \mu\text{g}/\text{孔}$, 100°C 煮沸 10 min, 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE) 分离总蛋白,将蛋白转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, TBST 洗涤 3 次 $\times 5 \text{ min}$; 3% BSA 一抗稀释液按 1: (1000~2000) 稀释一抗, 4°C 孵育过夜;二抗 (1:1000) 孵育 1 h, ECL 显色。

1.13 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 使用 TRIzol 试剂 (Takara, 日本) 从样本中提取总 RNA, 操作步骤严格按照说明书进行;反转录第一条 cDNA 链使用 PrimeScript™ RT 试剂盒 (Takara, 日本);

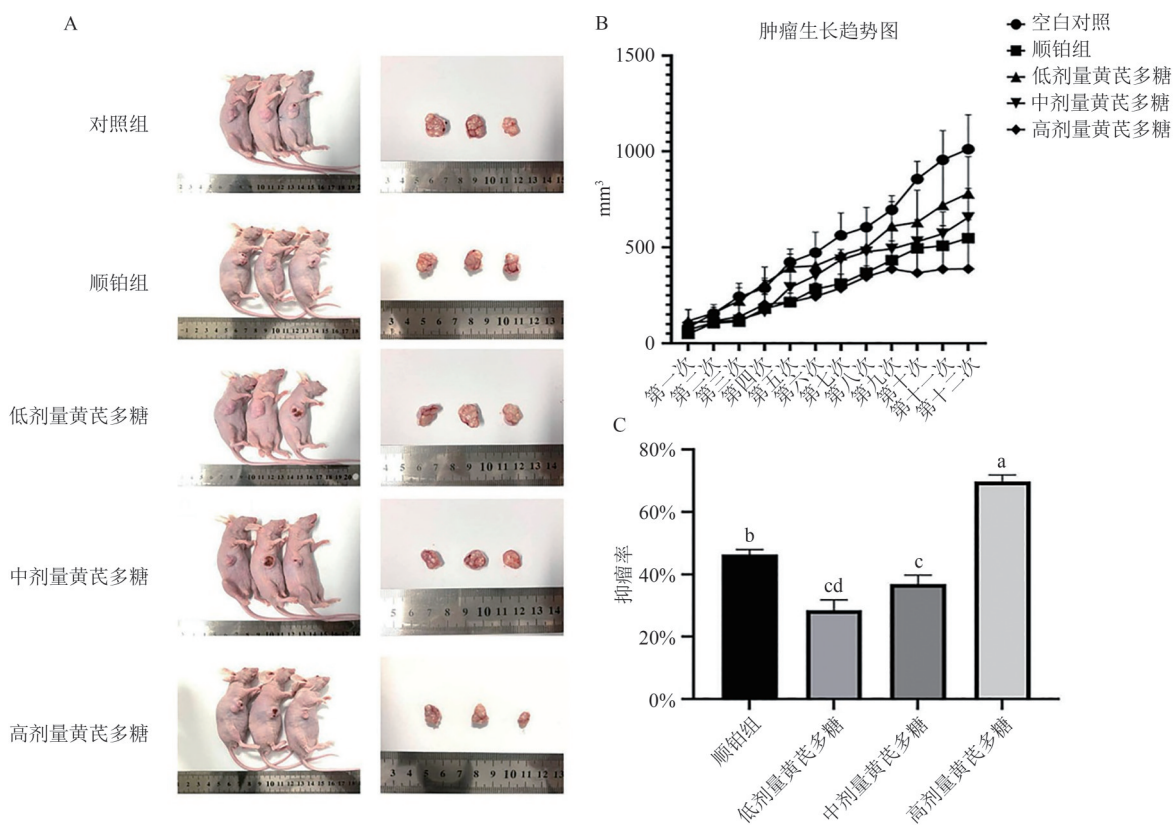
qRT-PCR 反应体系和程序参考 TB Green Premix Ex Taq II (Takara, 日本) 说明书, 使用仪器为 CFX96 Real-Time system (Bio-Rad, 美国), 利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因相对表达水平。引物由重庆博艾迈迪森生物科技有限公司合成, TP73 正向引物 5'-GGTCACTTTCCAGCAGTCCA-3', 反向引物 5'-GGGTGACACCTTGATCTGG-3'; FBXW7 正向引物 5'-ACCGCTTCTTCCTCAGTTCC-3', 反向引物 5'-CTTCAGAGTCGAGCGGTGG-3'; Ki67 正向引物 5'-CCAGCTGCCTGTAGTGTCAA-3', 反向引物 5'-CCATGTCTCAGCCTCACAGG-3'; Bcl-2 正向引物 5'-GCGTCAACAGGGAGATGTCA-3', 反向引物 5'-GCATGCTGGGGCCATATAGT-3'。

1.14 统计学分析 采用 SPSS 23.0 统计学软件对数据进行分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组独立样本比较采用 t 检验; 多组样本均数比

较采用单因素方差分析; 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。所有实验独立重复 3 次, 使用 GraphPad Prism 8 作图。

2 结果

2.1 APS 对各组裸鼠抑瘤率的影响 移植肿瘤细胞后, 每隔 1 天观察肿瘤生长情况, 待肿瘤生长至可测量大小时, 每隔 1 天测量并记录一次 (图 1A); 随着时间推移, 各组裸鼠体内肿瘤体积逐渐增大, 其中空白对照组肿瘤生长最迅速, 低剂量 APS 组次之, 中剂量 APS 组、顺铂组和高剂量 APS 组肿瘤体积增长趋势逐渐降低 (图 1B); 顺铂组、低剂量 APS 组、中剂量 APS 组和高剂量 APS 组裸鼠的抑瘤率分别为 46.36%、28.52%、36.89%、69.81% (图 1C), 提示 APS 能够抑制食管癌的增长, 且随着剂量的增加, 其抑瘤效果增加。



注: (A) 各组裸鼠成瘤情况; (B) 各组裸鼠肿瘤生长趋势图; (C) 各组裸鼠抑瘤率统计图。不同小写字母表示各组间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: (A) The tumor formation in nude mice; (B) The tumor growth trend; (C) The tumor inhibition rate. Different lowercase letters indicate significant differences between groups ($P<0.05$).

图 1 APS 对裸鼠成瘤的影响

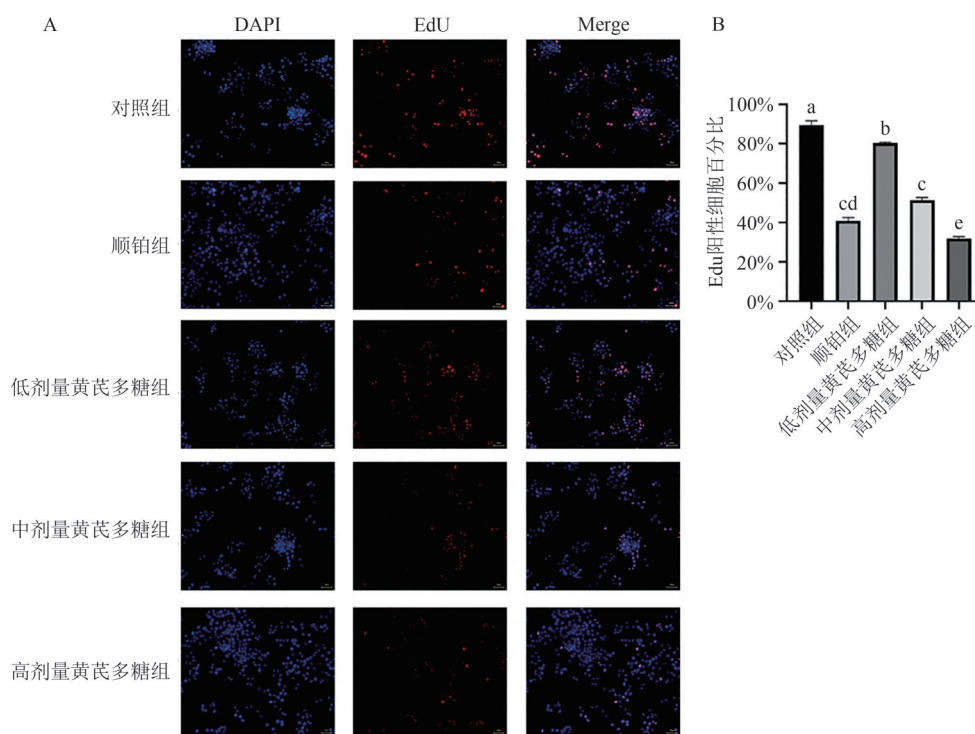
Fig. 1 The effects of APS on tumor formation in nude mice

2.2 APS 对食管癌细胞增殖与凋亡的调控作用 本研究结果显示, 对照组、顺铂组、低剂量 APS 组、

中剂量 APS 组和高剂量 APS 组食管癌细胞 EdU 阳性率分别为 89.59%、40.81%、80.33%、51.38% 和

31.79% (图 2); S 期细胞比例分别为 31.01%、12.20%、29.48%、22.85% 和 11.44%; BrdU 阳性率分别为 35.10%、23.10%、30.52%、26.17% 和 22.30%; 细胞凋亡率分别为 25.82%、40.18%、28.29%、35.92%

和 45.43% (图 3)。上述结果表明, APS 可抑制食管癌细胞增殖, 促进食管癌细胞凋亡, 且作用效果随 APS 剂量的增加而增强。



注: (A) EdU 染色; (B) EdU 阳性细胞百分比。不同小写字母表示各组间有显著差异 ($P < 0.05$)。

Note: (A) EdU staining results; (B) The percentage of EdU positive cells. Different lowercase letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$).

图 2 EdU 检测 APS 对食管癌细胞增殖的影响
Fig. 2 The effects of APS on cell proliferation detected by EdU staining

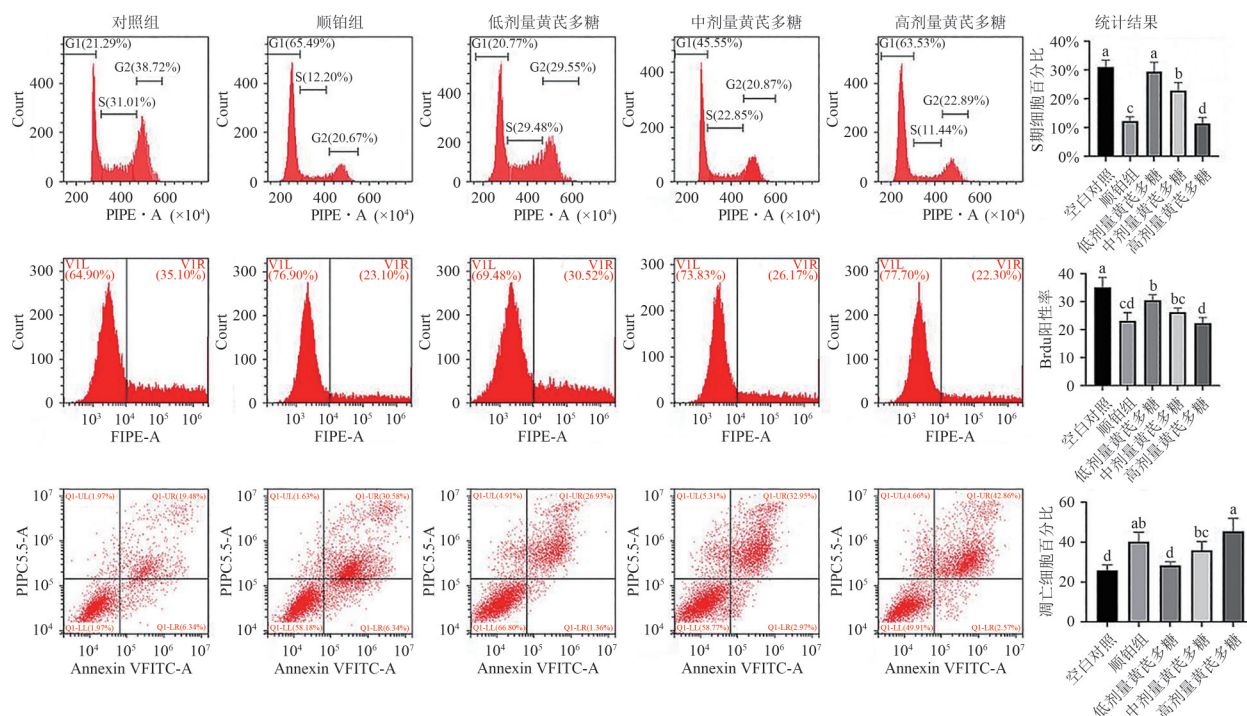
2.3 APS 对相关基因和蛋白表达的影响 本研究通过 TCMSP 和 pharmMapper 数据库分析对比了 APS 的网络药理学机制, 预测到 TP73 和 FBXW7 与 APS 可能存在结合调控作用。进一步研究结果显示, TP73、FBXW7 的 mRNA 和蛋白表达量随着 APS 浓度的增加而增加, Ki67、Bcl-2 的表达情况则与之相反; 将 APS 用生物素标记后, 与细胞总蛋白孵育, 用经过亲和素标记的磁珠拉取结合的蛋白, 结果显示 TP73 能够与 APS 结合 (图 4)。

2.4 TP73 对食管癌细胞增殖与凋亡的影响 在体外培养的食管癌细胞中分别过表达和干扰 TP73 (图 5A)。细胞增殖结果显示, 过表达对照组、过表达 TP73 组、干扰对照组和干扰 TP73 组 EdU 阳性率分别为 82.22%、27.01%、83.05% 和 90.37% (图 5B、5C)。细胞流式结果显示, 过表达对照组、过表达 TP73 组、干扰对照组、干扰 TP73 组和高剂量 APS+

干扰 TP73 组中, S 期细胞百分比分别为 31.30%、13.97%、29.22%、36.68% 和 30.17%, BrdU 阳性率分别为 35.31%、20.94%、36.24%、39.40% 和 35.42%, 凋亡细胞比例分别为 25.40%、40.04%、28.06%、15.00% 和 21.61% (图 6)。与干扰 TP73 组相比, APS+干扰 TP73 组 S 期细胞百分比和 BrdU 阳性细胞百分比均降低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 而细胞凋亡则显著增加 ($P < 0.05$)。以上结果提示, TP73 可抑制食管癌细胞的增殖并促进其凋亡, APS 可在一定程度上影响 TP73 对食管癌细胞的作用效果。

3 讨论

食管癌是最具侵袭性的消化道肿瘤之一, 中医药在食管癌治疗中展现出一定的临床优势, 主要表现在术后免疫力提高、放化疗副作用减轻、肿瘤复发抑制和转移减少等方面^[12]。黄芪是常用中药之



注:不同小写字母表示各组间差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$).

图 3 流式细胞术检测 APS 对食管癌细胞增殖和凋亡的影响

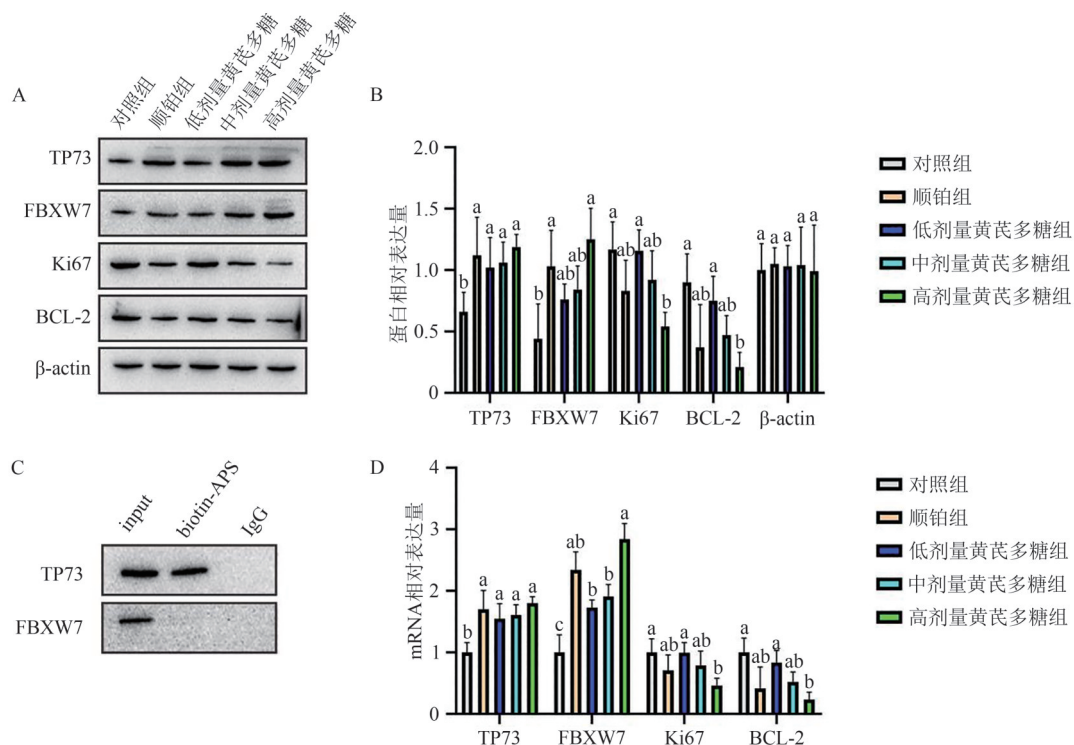
Fig. 3 The effects of APS on the proliferation and apoptosis of esophageal carcinoma cells detected by flow cytometry

一,含有丰富的活性物质,如多糖、黄酮、生物碱、皂苷等。近年来发现,黄芪的主要成分之一 APS 具有抗肿瘤、抗氧化、调节机体免疫力等多重功效,其中免疫调节和抗肿瘤作用被广泛研究^[13]。何伟星等^[14]发现,食管癌放疗患者注射 APS 可明显提高其近期疗效和生活质量。刘晓滨等^[15]发现,APS 可通过降低 *MRP* 和 *GST-π* 基因的表达逆转 EC109/DDP 耐药食管癌细胞对顺铂的耐药性。这些证据均表明,APS 可能在食管癌的治疗中扮演着重要角色。

本研究结果显示,APS 在体内表现出对裸鼠食管癌移植瘤的抑制作用;在体外可降低食管癌细胞的存活率、抑制其增殖并促进其凋亡。Ki67 在细胞周期的所有活动阶段均存在,其表达的高低反映了细胞的增殖状态,因此被认为是反映肿瘤细胞增殖活力的指标^[16]。Deng 等^[17]报道,Ki67 的高表达反映了食管小细胞癌的增殖活性。郑海波等^[18]研究显示,Ki67 表达水平与食管癌密切相关,肿瘤组织中 Ki67 高表达可降低患者术后 5 年生存率,且更容易出现术后复发转移。Bcl-2 是一种介导细胞凋亡途径的蛋白,可通过抑制肿瘤细胞凋亡间接促进肿瘤的发生发展^[19]。本研究中,不同浓度 APS 处理食管癌细胞后,Ki67 和 Bcl-2 的表达均受到抑制,且高剂

量 APS 具有更强的抑制作用。

TP73 属于 *TP53* 基因家族成员,与 *TP53* 基因序列高度相似,可以模拟 TP53 的抑癌活性,引发细胞周期停滞及细胞凋亡,从而抑制肿瘤的生长和存活,成为抗肿瘤治疗的靶点^[20]。TP73 缺陷小鼠可发生自发肿瘤,提示 TP73 具有抑癌作用^[21]。TP73 还具有促凋亡活性,作为一种转录因子,参与调控程序性细胞死亡的基因转录,例如 p53 上调凋亡调控因子、细胞周期调节因子 p21 和 Bcl-2 家族蛋白的 Noxa 表达^[22]。以上研究揭示了 TP73 在肿瘤细胞生物学行为中的重要性。本研究发现,经 APS 处理后,食管癌细胞中 TP73 表达上调。APS 能够与 TP73 蛋白相结合,过表达 TP73 可促进食管癌细胞凋亡和抑制细胞增殖;反之,沉默 TP73 则加剧食管癌细胞的增殖以及抑制其凋亡。本研究结果也表明,TP73 对食管癌细胞的生长和存活均具有抑制作用。此外,本研究还发现,与高剂量 APS 组相比,APS+干扰 TP73 组 S 期细胞和 BrdU 阳性细胞百分比升高、凋亡减少,这说明干扰 TP73 在一定程度上阻断了 APS 对食管癌细胞增殖和凋亡的影响。FBXW7 在人体细胞周期进程、细胞生长和分化中发挥重要的调节作用,其缺失可引起和加快肿瘤细胞的增殖^[23]。本研

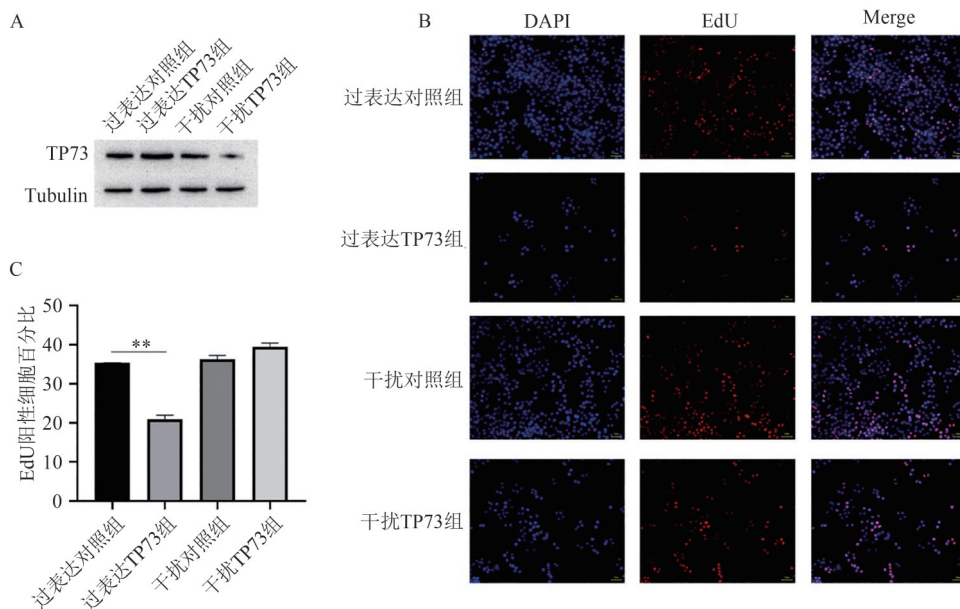


注: (A) TP73、FBXW7、Ki67 及 BCL-2 的蛋白表达条带图; (B) Western blotting 灰度分析; (C) Co-IP 试验检测与 APS 结合的蛋白; (D) qRT-PCR 检测 TP73、FBXW7、Ki67 及 BCL-2 的 mRNA 表达。不同小写字母表示各组间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: (A) The protein expression of TP73, FBXW7, Ki67 and BCL-2; (B) The gray value of Western Blotting analysis; (C) Co-IP analysis of APS binding proteins; (D) qRT-PCR analysis of gene expression. Different lowercase letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$).

图 4 APS 对食管癌细胞的调控机制

Fig. 4 The regulation mechanism of APS on esophageal carcinoma cells

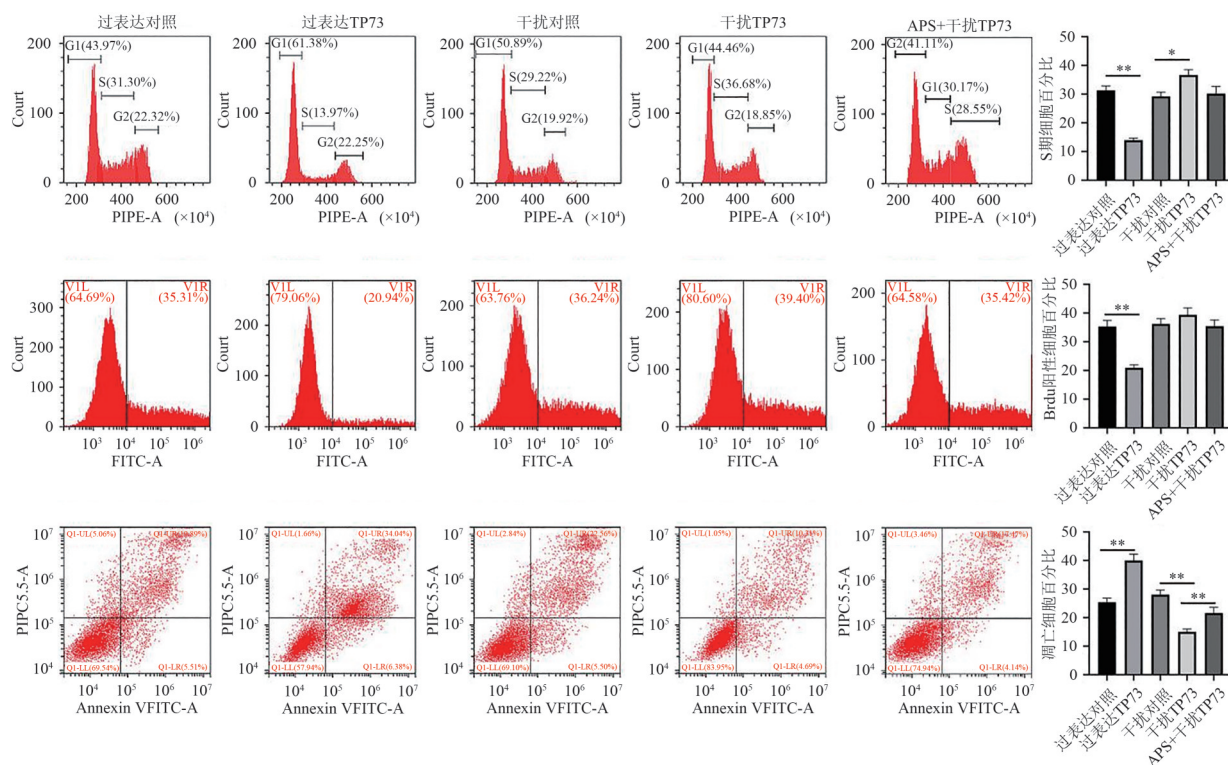


注: (A) Western blotting 检测 TP73 表达情况; (B) EdU 检测细胞增殖; (C) EdU 阳性细胞百分比。** $P < 0.05$ 。

Note: (A) Western blotting analysis of TP73 expression; (B) EdU analysis of cell proliferation; (C) The percentage of EdU positive cells. ** indicating $P < 0.05$.

图 5 过表达和干扰 TP73 后食管癌细胞的增殖情况

Fig. 5 The proliferation of esophageal carcinoma cells after overexpression and interference with TP73



注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Note: * indicated $P<0.05$; ** indicated $P<0.01$.

图 6 流式细胞术检测过表达和干扰 TP73 后食管癌细胞的增殖和凋亡情况

Fig. 6 The proliferation and apoptosis of esophageal carcinoma cells after overexpression and interference with TP73 detected by flow cytometry

究 qRT-PCR 结果显示, APS 处理食管癌细胞后, FBXW7 在转录和翻译水平的表达均上调, 但 Co-IP 结果显示二者并无直接相互作用, 这可能是由于 APS 通过其他途径间接影响 FBXW7 的表达, 具体调控机制还需要进一步研究证明。

综上所述, APS 能够抑制食管癌细胞增殖, 促进其凋亡, 并且随着浓度的增加效果更佳。此外, APS 还可抑制裸鼠食管癌移植瘤的生长。据此推测, APS 可能通过调控细胞增殖及凋亡相关蛋白的表达, 来抑制食管癌细胞的增殖并促进其凋亡, 从而发挥抑癌作用。

参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA: A Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- [2] 乔友林. 食管癌流行病学研究的重要里程碑[J]. 中国肿瘤临床, 2016, 43(12): 500-501. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8179.2016.12.551.
- [3] SMYTH E C, LAGERGREN J, FITZGERALD R C, et al. Oe-

sophageal cancer [J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17048. DOI: 10.1038/nrdp.2017.48.

- [4] LIN E W, KARAKASHEVA T A, HICKS P D, et al. The tumor microenvironment in esophageal cancer [J]. Oncogene, 2016, 35(41): 5337-5349. DOI: 10.1038/ncr.2016.34.
- [5] ROODHART J M, DAENEN L G, STIGTER E C, et al. Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids [J]. Cancer Cell, 2011, 20(3): 370-383. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.08.010.
- [6] 盛耀光, 刘少静, 马秀, 等. 黄芪多糖的药理作用及剂型研究进展[J]. 广州化工, 2019, 47(15): 28-30. DOI: 10.3969/j.issn.1001-9677.2019.15.016.
- [7] 陆婷婷, 柯玲玲. 黄芪多糖靶向肿瘤微环境的抗肿瘤作用机制[J]. 江西中医药大学学报, 2019, 31: 107-111.
- [8] ZHANG Y M, LIU Y Q, LIU D, et al. The effects of Astragalus polysaccharide on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and morphology induced by A549 lung cancer cells [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 4110-4121. DOI: 10.12659/msm.914219.
- [9] LIU C, LI H, WANG K, et al. Identifying the antiproliferative effect of Astragalus polysaccharides on breast cancer: coupling network pharmacology with targetable screening from the cancer genome atlas [J]. Front Oncol, 2019, 9: 368. DOI: 10.3389/fonc.2019.00368.
- [10] ZHAI Q L, HU X D, XIAO J, et al. Astragalus polysaccharide may increase sensitivity of cervical cancer HeLa cells to cisplatin by regulating cell autophagy [J]. Zhongguo Zhong Yao Za

- Zhi, 2018, 43(4): 805–812. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20171113.018.
- [11] 马鹏飞, 阮柏, 王德盛, 等. 黄芪甲苷对肝癌细胞增殖和侵袭能力的影响及其机制研究[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22: 1012–1015.
- [12] 陈霞, 高静东. 中医药治疗食管癌研究进展[J]. 亚太传统医药, 2019, 15: 161–164.
- [13] 聂娟, 谢丽华, 马港圆, 等. 中药黄芪的化学成分及药理作用研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(7): 228–231. DOI: 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.07.095.
- [14] 何伟星, 朱艳仪, 李捷. 注射用黄芪多糖对食管癌放疗患者生活质量的影响[J]. 江西中医药, 2007, 38(2): 37–38. DOI: 10.3969/j.issn.0411-9584.2007.02.020.
- [15] 刘晓滨, 祁丽, 张文轩. 黄芪多糖逆转EC109/DDP食管癌细胞顺铂耐药的可能机制[J]. 癌症进展, 2017, 15: 29–31. DOI: 10.11877/j.issn.1672-1535.2017.15.01.09.
- [16] ELLIS M J, SUMAN V J, HOOG J, et al. Ki67 proliferation index as a tool for chemotherapy decisions during and after neoadjuvant aromatase inhibitor treatment of breast cancer: results from the American college of surgeons oncology group Z1031 trial (alliance) [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(10): 1061–1069. DOI: 10.1200/jco.2016.69.4406.
- [17] DENG H Y, CHEN Z H, WANG Z Q, et al. High expression of Ki-67 is an independent favorable prognostic factor for esophageal small cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(33): 55298–55307. DOI: 10.18632/oncotarget.19426.
- [18] 郑海波, 彭小雨, 吴智勇, 等. 食管癌组织中和癌旁正常组织 Ki67、TS、CerbB-2 的表达水平及其临床意义[J]. 中国实用医药, 2019, 14(5): 9–11. DOI: 10.14163/j.cnki.11-5547/r.2019.05.004.
- [19] WANG J L, FENG W M, YUAN Z, et al. DHX33 interacts with AP-2 β to regulate *Bcl-2* gene expression and promote cancer cell survival [J]. *Mol Cell Biol*, 2019, 39(17): e00017–e00019. DOI: 10.1128/mcb.00017-19.
- [20] ZAWACKA-PANKAU J, KOSTECKA A, SZNARKOWSKA A, et al. p73 tumor suppressor protein: a close relative of p53 not only in structure but also in anti-cancer approach? [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(4): 720–728. DOI: 10.4161/cc.9.4.10668.
- [21] FLORES E R, SENGUPTA S, MILLER J B, et al. Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family [J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(4): 363–373. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.02.019.
- [22] ZHAO L, FU L, XU Z, et al. The anticancer effects of cinobufagin on hepatocellular carcinoma Huh-7 cells are associated with activation of the p73 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(5): 4119–4128. DOI: 10.3892/mmr.2019.10108.
- [23] YEH C H, BELLON M, NICOT C. FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 115. DOI: 10.1186/s12943-018-0857-2.

校稿: 于静 李征

本文引用格式: 李宗杰, 朱呈祥, 刘灿辉, 等. 黄芪多糖对食管癌细胞增殖与凋亡的影响及其分子机制研究[J]. 肿瘤药学, 2022, 12(6): 736–744. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.06.09.

Cite this article as: LI Zongjie, ZHU Chengxiang, LIU Canhui, et al. Effects of astragalus polysaccharide on the proliferation and apoptosis of esophageal carcinoma cells and its molecular mechanism [J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2022, 12(6): 736–744. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.06.09.