

裂果薯皂苷 I 体外抑制鼻咽癌细胞 HONE-1 作用及其机制

郭心怡¹, 梁梓樱¹, 王金妮¹, 丁小莲¹, 王燕雪¹, 梁 钢^{1,2}

(广西医科大学¹药学院、²靶向肿瘤学国家重点实验室, 南宁 530021)

摘要 目的 探讨裂果薯皂苷 I (SSPH I) 对人鼻咽癌 HONE-1 细胞的抑制作用及其相关分子机制。方法 采用 CCK-8 法检测 SSPH I 对 HONE-1 细胞活性的影响; 通过集落形成实验评估其对细胞增殖的抑制作用; 利用 Transwell 实验分析细胞侵袭能力的变化; 使用二氢吡啶 (DHE) 荧光探针检测细胞内活性氧 (ROS) 水平; 通过乳酸脱氢酶 (LDH) 释放实验反映细胞内含物的释放程度; 运用 Annexin-V/PI 双染法检测细胞焦亡率; 并采用 Western blot 法检测经典焦亡通路相关蛋白的表达变化。结果 CCK-8 结果显示, SSPH I 处理 24 h 后 HONE-1 细胞活性呈浓度依赖性降低, IC_{50} 值为 $3.383 \mu\text{mol/L}$; 集落形成实验中, 随着 SSPH I 浓度增加, HONE-1 细胞集落形成数量逐渐减少 ($P < 0.01$); Transwell 实验显示, SSPH I 处理后穿过小室的细胞数量减少 ($P < 0.01$); DHE 荧光探针检测结果显示, SSPH I 处理后细胞内 ROS 荧光强度升高 ($P < 0.001$); LDH 释放实验结果显示, 细胞上清液中 LDH 活性随 SSPH I 浓度增加而升高 ($P < 0.001$); Annexin-V/PI 双染法检测结果显示, SSPH I 处理后 Annexin-V/PI 阳性细胞比例增加 ($P < 0.001$); Western blot 结果显示, 与对照组相比, SSPH I 处理组细胞中 cleaved-Caspase-1 和 GSDMD-N-terminal 蛋白表达水平上调 ($P < 0.05$), NLRP3 蛋白表达水平亦升高 ($P < 0.05$); ELISA 结果显示, 细胞中 IL-1 β 和 IL-18 含量均随 SSPH I 浓度增加而升高 ($P < 0.05$)。结论 SSPH I 可通过调控 ROS/NLRP3 / Caspase-1 信号轴诱导鼻咽癌 HONE-1 细胞焦亡, 从而发挥抗鼻咽癌作用, 提示其可能作为治疗鼻咽癌的潜在药物。

关键词 SSPH I; 鼻咽癌; 活性氧; NLRP3; 焦亡; 皂苷

中图分类号 R966

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)04-0628-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.04.006

鼻咽癌是发生在鼻咽黏膜的一种恶性肿瘤, 在广东、广西、湖南等地高发^[1]。鼻咽癌的发展、预后与炎症反应的发生密切相关, 鼻咽癌微环境中可见大量炎症细胞浸润^[2]。由于鼻咽癌早期症状不明显且病灶位置较为隐蔽, 多数患者常是在肿瘤晚期或发生转移后才被确诊, 从而错过最佳治疗时机。放疗结合是晚期鼻咽癌患者治疗的一线策略, 但治疗过程常伴随骨髓抑制、脏器损伤等不良反应, 相对与传统化疗药物, 天然药物具有更小的毒副作用^[3]。天然产物被认为是小分子药物的宝库, 在抗癌药物的发现和开发中发挥了极其显著的作用。它具有广泛的来源和新颖的结构, 为癌症治疗提供了一个新的候选化合物库。越来越多的研究发现传统药物中的天然活性成分在体内外具有抗鼻咽癌的能力, 如雷公藤甲素能够通过线粒体代谢酶

HK-II 途径影响葡萄糖代谢而产生抗头颈部癌的作用^[4], 扁蒴藤素通过促进活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 途径增强铂耐药鼻咽癌细胞 HNE-1 的凋亡敏感性^[5]。

裂果薯 (*Schizocapsa plantaginea* Hance) 是薯蓣科裂果属多年生草本, 别名水田七, 是广西特色中草药, 作为地区壮、瑶药民族医药使用。裂果薯具有清热解毒、理气止痛等多种功效, 通常用于治疗肿瘤、咽喉痛和肝炎。裂果薯皂苷 I (Saponin of *Schizocapsa plantaginea* Hance I, SSPH I) 是裂果薯总皂苷的主要单体成分之一。本课题组前期经初步体外抗肿瘤活性筛选中发现 SSPH I 对鼻咽癌细胞增殖有明显抑制作用^[6], 该研究旨在探究 SSPH I 对人鼻咽癌细胞 HONE-1 的潜在调控机制, 进而为其在抗鼻咽癌的应用提供更多的理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人鼻咽癌细胞 HONE-1 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, 由本课题组进行传代培养。

1.2 试剂与药物 SSPH I (纯度 > 95%) 由本课题

2026-02-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82360792); 广西生物靶向诊治研究重点实验室开放课题项目 (编号: GXSWBX 202402)

作者简介: 郭心怡, 女, 硕士研究生;

梁 钢, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail:

lianggang0922@foxmail.com

组自行提取、纯化、鉴定;RPMI-1640培养基(美国Gibco公司,货号:624184);胎牛血清(美国Gemini公司,货号:A11HOOK);BCA蛋白定量试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,货号:AR1189);CCK-8(货号:HY-K0301)、二氢吡啶(dihydroethidium, DHE)(货号:HY-D0079)(美国MedChemExpress公司);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(上海碧云天生物技术公司,货号:C0016); β -actin(武汉三鹰生物技术有限公司,货号:66009-1-Ig);NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)抗体(成都正能生物技术有限公司,货号:R381207);GSDMD-N-terminal抗体(货号:PU224937)、Total and Cleaved Caspase 1(货号:P79884R2)(上海艾比玛特医药科技有限公司);白细胞介素(interleukin, IL)-1 β ELISA试剂盒(货号:G203075M)、IL-18 ELISA试剂盒(货号:D711091-0096)(泉州睿信生物科技有限公司)。

1.3 实验仪器 细胞培养箱(美国Thermo Fisher公司,型号:3111)、高速低温离心机(湖南凯达科学仪器有限公司,型号:KH20R);WIX-minPRO4型电泳仪、WIX-minBLOT型电转仪(北京韦克斯科技有限公司);自动全波长酶标仪(瑞士Tecan公司,型号:Infinite 200 PRO);倒置显微镜(日本Olympus株式会社,型号:CKX53);流式细胞仪(美国BD公司,型号:Accuri C6 Plus);Odyssey红外成像系统(美国LI-COR公司,型号:Odyssey Clx)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养与分组 HONE-1细胞使用RPMI-1640培养基,加入10%胎牛血清、1%双抗条件进行贴壁培养,培养条件为37℃、5% CO₂。根据CCK-8法测定的细胞活力结果,确定SSPH I的给药浓度范围。集落形成实验分为4组,SSPH I浓度为0、1.25、1.75、2.00 μ mol/L,其余实验(包括Transwell、ROS检测、LDH释放、流式细胞术、Western blot及ELISA)设置4组,4组中SSPH I浓度为0、1.25、2.5、5.0 μ mol/L,给药处理时间为24 h。

1.4.2 CCK-8法检测细胞增殖 取贴壁的HONE-1细胞,0.5%胰蛋白酶消化,RPMI-1640培养基制成单细胞悬液,以每孔 5×10^3 个密度接种于96孔板中。培养24 h后去除旧培养基,加入100 μ L不同浓度(0、0.25、0.5、1、2、4、8 μ mol/L)SSPH I培养24 h后,每孔加入10 μ L CCK-8溶液,37℃避光孵育45 min,450 nm波长处检测吸光度(absorbance, A),并计算

细胞存活率= $[(A_{\text{实验孔}} - A_{\text{空白孔}})/(A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}})]$ 及24 h的细胞增殖半最大抑制浓度IC₅₀。

1.4.3 集落形成实验 收集对数生长期的HONE-1细胞,以每孔300个接种于12孔板中,每孔加入500 μ L的RPMI-1640完全培养基,培养72 h完全贴壁后弃去旧培养液,加入500 μ L不同浓度的SSPH I给药培养,每72 h换液1次。连续15 d后弃去上清液,以4%多聚甲醛固定,0.5%结晶紫溶液染色后PBS充分洗涤,烘干后拍照。

1.4.4 Transwell实验检测细胞侵袭能力 取Matrigel基质胶与各细胞对应无血清培养基按1:8的比例稀释混合,每孔100 μ L加入小室内,37℃培养箱中孵育3 h至基质胶凝固后去除上清液。细胞提前24 h更换无血清培养基培养进行饥饿处理,取HONE-1细胞消化重悬计数,使细胞密度至 5×10^5 个/mL,每孔100 μ L接种于上室,再加入100 μ L SSPH I药液处理。下室加入700 μ L含10%胎牛血清的完全培养基,培养箱中孵育24 h后,弃去培养基,PBS洗2遍,小室放入4%多聚甲醛中固定30 min后PBS洗2遍,用棉签将小室内未穿透的细胞,待膜完全风干后放入0.1%的结晶紫溶液中,染色30 min,PBS洗净后风干,显微镜选取4个视野进行拍照,对穿过小室的细胞计数分析。

1.4.5 流式细胞术检测细胞内ROS 取对数生长期的HONE-1细胞,以每孔 5×10^5 个密度接种于6孔板中,培养24 h贴壁后不同浓度SSPH I给药处理,培养24 h后使用孵育DHE探针,流式细胞术检测细胞内ROS强度。

1.4.6 LDH检测细胞内容释放 取对数生长期的HONE-1细胞,以每孔 8×10^3 个密度接种于96孔板中,培养24 h贴壁后以不同浓度SSPH I给药处理,每孔100 μ L,24 h后收集上清液按说明书于450 nm检测吸光度,检测LDH活性。

1.4.7 Annexin V/PI染色检测SSPH I对细胞死亡的影响 取生长良好的对数生长期鼻咽癌HONE-1细胞消化重悬计数,以每孔 1×10^6 个细胞的密度接种于6孔板中,以不同浓度SSPH I给药处理分组,每孔给药2 mL。

药物处理结束后用不含EDTA的胰蛋白酶消化细胞,用预冷的PBS洗涤细胞后离心去上清液,用ddH₂O稀释5 \times Binding Buffer为1 \times 工作液,取500 μ L重悬细胞。每管加入5 μ L的Annexin V-FITC和10 μ L的PI,轻柔涡旋混匀后室温避光孵育5~30

min, 随后过筛网上机进行流式分析。

1.4.8 Western blot 法检测相关蛋白表达 取对数生长期的 HONE-1 细胞, 以每皿 2×10^6 个密度接种于 60 mm 培养皿中, 培养至细胞完全贴壁, 密度约 90% 后弃去旧培养液。以不同浓度 SSPH I 给药处理分组, 每皿 6 mL 药液处理 24 h 后收集细胞, 冰上 RIPA 裂解细胞 30 min, 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液。BCA 试剂盒检测各组蛋白浓度, 使用 12.5% 浓度 SDS-PAGE 电泳分离后转移至 PVDF 膜, 5% BSA 封闭 1 h, 随后分别加入 β -actin、NLRP3、半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1 剪切体 (cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-1, cleaved-Caspase-1)、消皮素-D (Gasdermin-D, GSDMD)、消皮素-D-N 端 (Gasdermin-D-N-terminal, GSDMD-N-terminal)、一抗 (β -actin 稀释比为 1:3 000, 其余稀释比均为 1:1 000) 4 °C 孵育过夜。次日使用 TBST 洗涤后, 选项对应二抗, 室温避光孵育 1 h, TBST 充分洗涤后使用 Odyssey 红外系统进行成像, ImageJ 软件进行蛋白条带灰度值分析。

1.4.9 ELISA 法检测细胞 IL-1 β 、IL-18 蛋白含量

取对数生长期 HONE-1 细胞, 以每孔 1×10^6 个密度接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后以不同浓度 SSPH I 给药处理, 每孔给药 1 mL, 消化收集细胞, 以 20 kHz 频率, 150 W 的功率, 在冰浴中进行超声波破碎, 每破碎 2 s, 间隔 3 s, 反复破碎 3 次, 制成全细胞裂解液。使用人源 IL-1 β 和 IL-18 的 ELISA 试剂盒, 实验流程按照说明书操作, 在波长 450 nm 处检测各组样品吸光度并计算蛋白含量。

1.5 统计学处理 通过 SPSS 23.0 软件对数据进行统计分析, 所有实验均独立重复 3 次。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组之间差异比较采用独立样本 *t* 检验进行分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用 GraphPad Prism 9.5.0 进行图表制作。

2 结果

2.1 SSPH I 对 HONE-1 细胞形态的影响 使用 2.5 $\mu\text{mol/L}$ SSPH I 处理 HONE-1 细胞后, 细胞形态发生焦亡表型。光学显微镜下可明显观察到细胞肿胀膨大, 细胞膜表面有气泡状突出物, 细胞核如气球样胀大, 最终导致细胞裂解而死亡。见图 1。

2.2 SSPH I 对 HONE-1 细胞增殖的影响 CCK-8 检测结果显示, 与空白对照组相比, 不同浓度的

SSPH I 处理 24 h 后随浓度增加而, 细胞活性明显降低。提示 SSPH I 能够显著抑制 HONE-1 细胞的增殖。其 24 h 的 IC_{50} 值为 3.383 $\mu\text{mol/L}$, 故后续实验选 1.25 $\mu\text{mol/L}$ 、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 作为实验低、中、高剂量。见图 2。

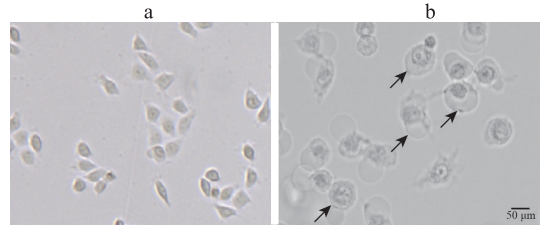


图1 SSPH I 处理前后细胞形态变化 $\times 400$

Fig. 1 Changes in cell morphology after SSPH I treatment $\times 400$
a: Normal HONE-1 cells; b: Cell morphology after treatment with 2.5 $\mu\text{mol/L}$ SSPH I; The arrowhead indicates that pyroptotic cells undergo cell swelling and membrane blebbing.

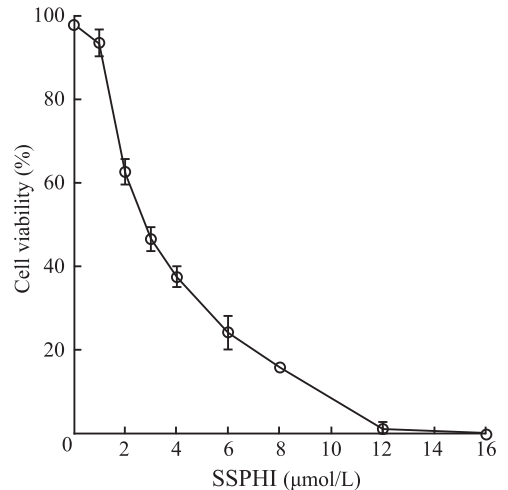


图2 CCK-8法检测 SSPH I 对 HONE-1 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Detection of the effects of SSPH I on HONE-1 cell proliferation by CCK-8 assay ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.3 SSPH I 对 HONE-1 细胞集落形成能力的影响 以 SSPH I 0、1.25、1.75、2.00 $\mu\text{mol/L}$ 给药处理后, 别集落数量分别为 (137.00 ± 15.13)、(71.00 ± 18.02)、(51.33 ± 15.82)、(13.67 ± 7.23) 个。与空白对照组相比, 各给药组 HONE-1 细胞集落形成率逐渐降低, 差异有统计学意义。见图 3。

2.4 SSPH I 对 HONE-1 细胞侵袭能力的影响 Transwell 实验结果显示, 以 SSPH I 1.25、2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理后, 与 control 组相比, 随着 SSPH I 给药剂量增加, 从上室穿到下室的各组细胞数量逐渐减少, 差异有统计学意义 ($F=67.166$)。见图 4。

2.5 SSPH I 对 HONE-1 细胞内 ROS 水平的影

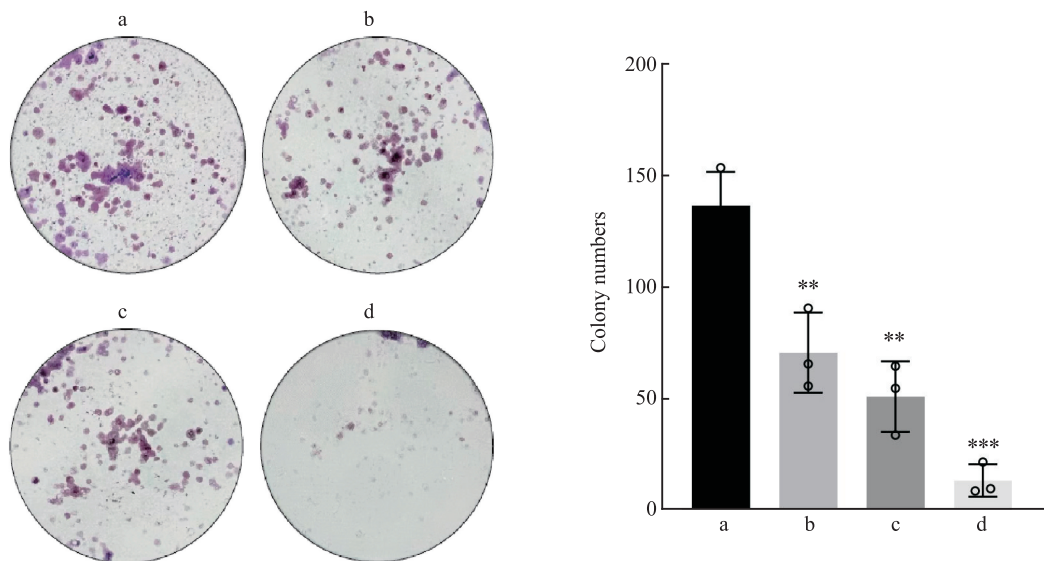


图3 平板克隆实验检测 HONE-1 细胞集落形成能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 The detection of the colony formation ability of HONE-1 cells by plate cloning assay ($\bar{x} \pm s, n=3$)

a: control group; b: 1.25 $\mu\text{mol/L}$ SSPH I; c: 1.75 $\mu\text{mol/L}$ SSPH I; d: 2.00 $\mu\text{mol/L}$ SSPH I; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group.

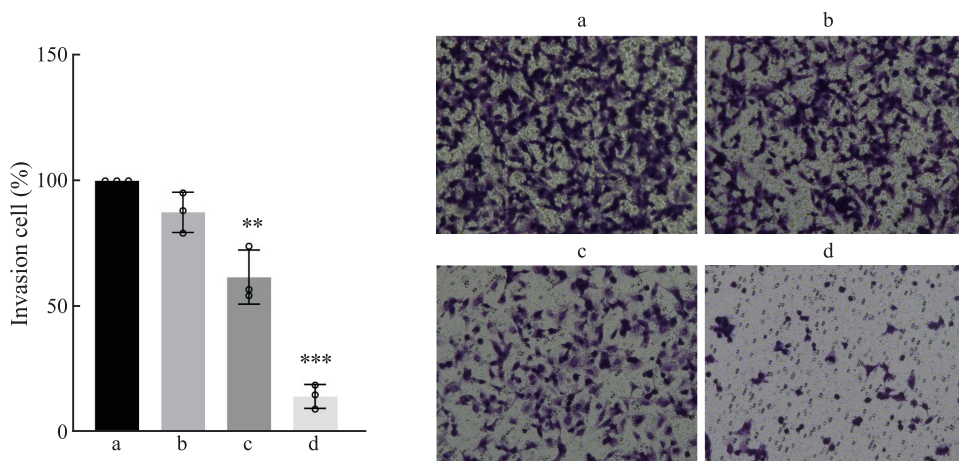


图4 Transwell 实验检测 SSPH I 对 HONE-1 细胞侵袭能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$) $\times 200$

Fig. 4 The effects of SSPH I on the invasion ability of HONE-1 cells detected by Transwell assay ($\bar{x} \pm s, n=3$) $\times 200$

a: control group; b: 1.25 $\mu\text{mol/L}$ SSPH I; c: 2.5 $\mu\text{mol/L}$ SSPH I; d: 5.0 $\mu\text{mol/L}$ SSPH I; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group.

响 以 SSPH I 1.25、2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理后,与 control 组相比,随着给药剂量的增大,HONE-1 细胞中 ROS 水平升高,差异有统计学意义($F=144.581$)。见图 5。

2.6 SSPH I 对 HONE-1 细胞 LDH 活性的影响

以 SSPH I 1.25、2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理后,与 control 组相比,随着 SSPH I 给药剂量增加,HONE-1 细胞上清液的 LDH 活性升高,具有剂量依赖性,差异具有统计学意义($F=51.046$)。见图 6。

2.7 Annexin V/PI 染色检测 SSPH I 对细胞死亡的影响

检测结果显示,以 SSPH I 1.25、2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理后,与 control 组相比,随着 SSPH I 给药

剂量增加,Annexin-V/PI 阳性率增大,差异具有统计学意义($F=146.003$),提示细胞凋亡比例增大,见图 7。

2.8 SSPH I 对 HONE-1 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Western blot 实验结果显示,以 SSPH I 1.25 $\mu\text{mol/L}$ 、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理后,与 control 组相比,随着给药剂量增加,SSPH I 处理后 HONE-1 细胞中 total-Caspase-1 蛋白表达下降($F=4.083$),NLRP3、cleaved-Caspase-1、GSDMD-N-terminal 蛋白表达升高($F=5.010$ 、6.238、25.857),差异有统计学意义。见图 8。

2.9 SSPH I 对 HONE-1 细胞中 IL-1 β 、IL-18 表达

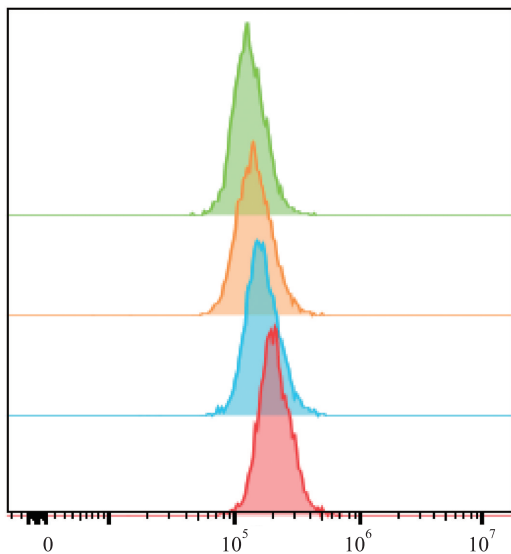


图5 流式细胞术检测SSPH I对HONE-1细胞内ROS水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

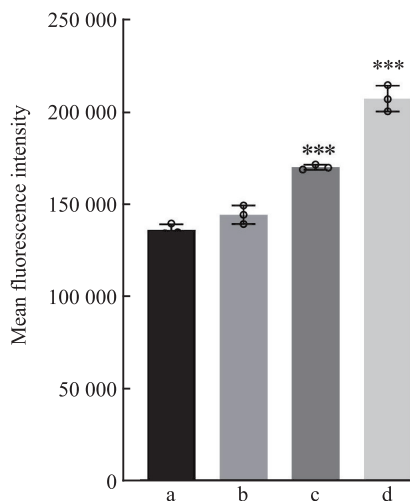


Fig. 5 The effects of SSPH I on intracellular ROS levels in HONE-1 cells detected by flow cytometry ($\bar{x}\pm s, n=3$)
a: control group; b: 1.25 $\mu\text{mol/L}$ SSPH I; c: 2.5 $\mu\text{mol/L}$ SSPH I; d: 5.0 $\mu\text{mol/L}$ SSPH I; *** $P<0.001$ vs control group.

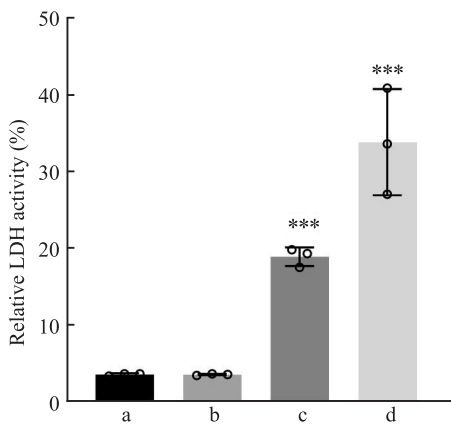


图6 比色法检测SSPH I对HONE-1细胞LDH水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 6 The effects of SSPH I on LDH levels in HONE-1 cells detected by colorimetric method ($\bar{x}\pm s, n=3$)

a: control group; b: 1.25 $\mu\text{mol/L}$ SSPH I; c: 2.5 $\mu\text{mol/L}$ SSPH I; d: 5.0 $\mu\text{mol/L}$ SSPH I; *** $P<0.001$ vs control group.

的影响 ELISA实验结果显示,与control组相比,随着给药剂量增加,SSPH I处理后HONE-1细胞中IL-1 β 含量升高($F=30.606$),IL-18含量升高($F=26.524$)。见图9。

3 讨论

天然产物因其来源广泛、结构新颖且毒副作用较小,一直是抗肿瘤药物研发的重要来源,皂苷类天然产物因其多样的生物活性在抗肿瘤药物研发领域备受关注。如常春藤皂苷元作为五环三萜类皂苷的代表性成分,可通过p53/Bcl-2/Bax信号轴介

导线粒体凋亡通路,显著抑制胶质母细胞瘤的恶性进展^[7]。裂果薯作为广西常见中草药,特色壮药材,其甾体类皂苷活性成分SSPH I在课题组前期研究中已显示出对肝癌、胰腺癌等多种肿瘤细胞的抑制活性^[8-9]。本研究在此基础上,首次探讨了SSPH I诱导鼻咽癌细胞发生焦亡的作用及其分子机制,为拓展该化合物的抗肿瘤谱提供了新的实验依据。

鼻咽癌是头颈部常见恶性肿瘤之一,其致病因素包括EB病毒感染、遗传、生活环境等^[10]。有临床试验通过病理特征检测发现,炎症细胞浸润与鼻咽癌发展密切相关,鼻咽癌微环境浸润炎症细胞亚群促进其病情发展^[2]。根据病理分型鼻咽癌可分为角化性鳞状细胞癌、非角化性癌,非角化型还包括分化型与未分化型。未分化型恶性程度最高,在流行病区占发病总数的70%~80%^[11]。未分化型癌常伴有淋巴细胞浸润,虽对放疗较为敏感但侵袭性强,治疗后易发生局部复发或远处转移^[12]。由于鼻咽癌早期症状不明显,并且病灶位置较为隐蔽,大部分患者常是在肿瘤晚期或发生转移后才被确诊。早期患者经放化疗治疗后复发率约为10%~15%,晚期患者复发率为30%~40%。局部复发患者由于治疗耐受差,再治疗5年总生存率仅30.2%,是在头颈部恶性肿瘤中预后最差的类型之一^[13]。

细胞焦亡是一种由Gasdermin蛋白介导的炎症性质的细胞程序性死亡方式,由Gasdermin家族蛋白接收上游信号所剪切形成的N端结构域在细胞膜

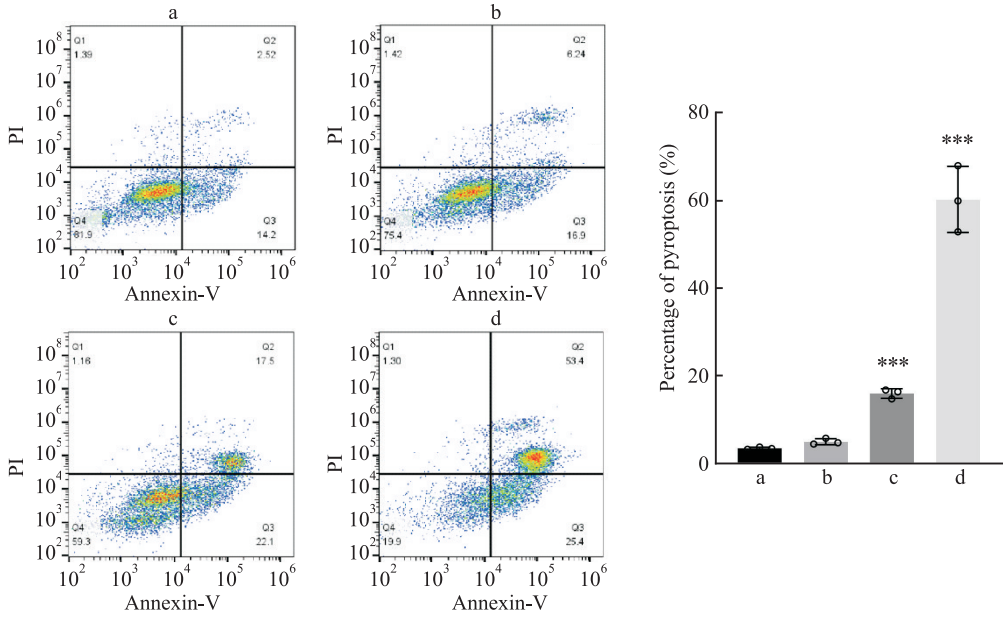


图7 流式细胞术检测SSPH I对HONE-1细胞焦亡率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 7 The effects of SSPH I on the pyroptosis rate of HONE-1 cells detected by flow cytometry ($\bar{x}\pm s, n=3$)

a: control group; b: 1.25 μmol/L SSPH I; c: 2.5 μmol/L SSPH I; d: 5.0 μmol/L SSPH I; *** $P<0.001$ vs control group.

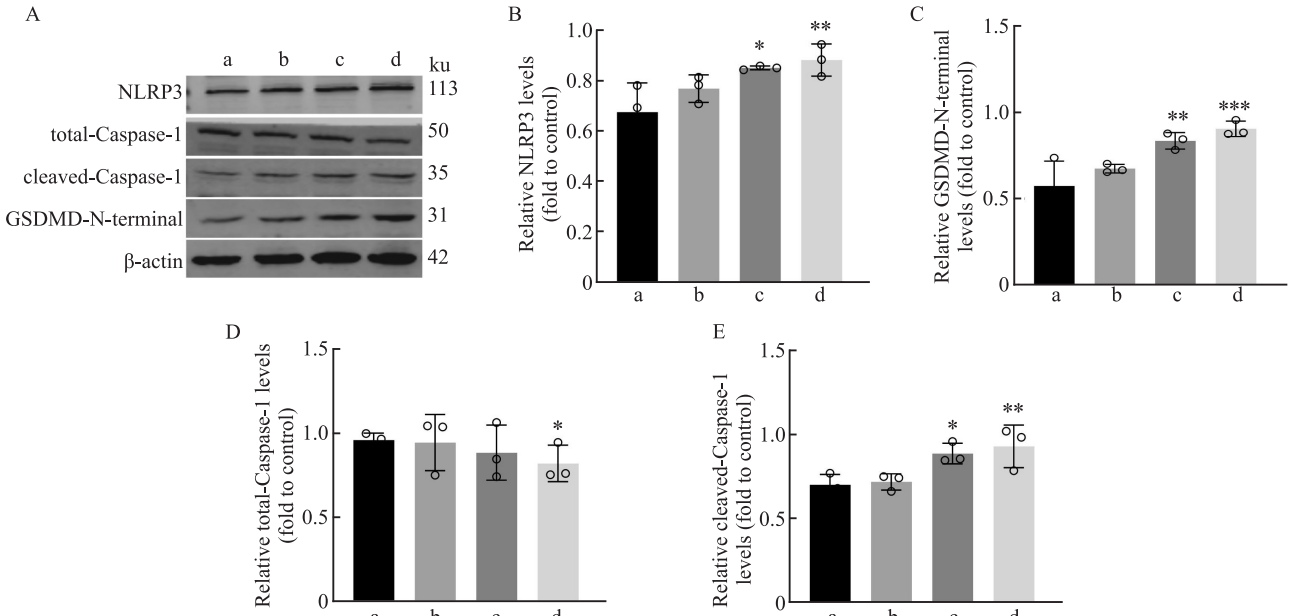


图8 Western blot检测SSPH I对HONE-1细胞焦亡相关蛋白的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 8 The effects of SSPH I on pyroptosis-related proteins in HONE-1 cells detected by Western blot ($\bar{x}\pm s, n=3$)

A: Pyroptosis-related proteins levels in HONE-1 cells detected by Western blot; B: The effects of SSPH I on the protein expression level of NLRP3; C: The effects of SSPH I on the protein expression level of GSDMD-N-terminal; D: The effects of SSPH I on the protein expression level of total-Caspase-1; E: The effects of SSPH I on the protein expression level of cleaved-Caspase-1; a: control group; b: 1.25 μmol/L SSPH I; c: 2.5 μmol/L SSPH I; d: 5 μmol/L SSPH I; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs control group.

上打孔^[14],细胞膜上形成独特的泡状突起,最后细胞膜破裂导致细胞死亡。区别于凋亡细胞皱缩时细胞膜完整,并不会大量细胞内容物释放,细胞发生焦亡时细胞膜完整性受损时,存在于胞质中的LDH释放到上清液中。经典焦亡依赖于Cas-

pase-1的激活,激活的Caspase-1会促进炎症细胞因子IL-1 β 的分泌^[15]。其中,通过NLRP3炎症小体激活Caspase-1途径是最经典的焦亡发生方式。

本研究结果显示,SSPH I能够显著抑制HONE-1细胞的增殖、集落形成及侵袭能力,并诱导典型的

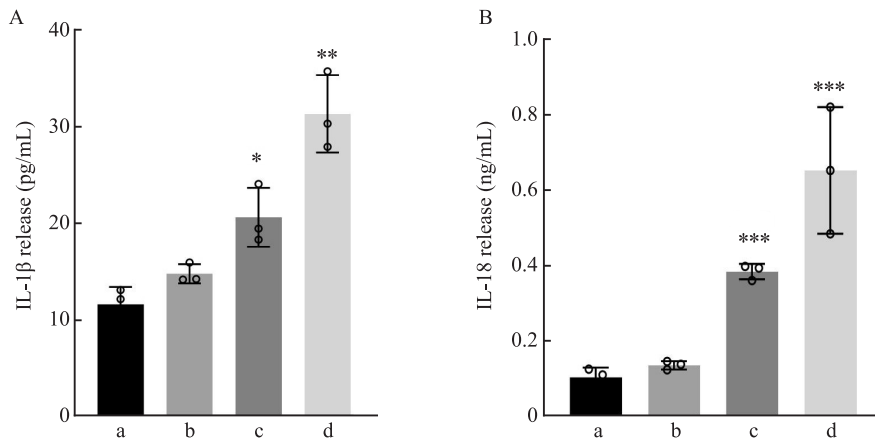


图9 ELISA检测SSPH I对HONE-1细胞中IL-1β与IL-18含量的影响(̄x±s, n=3)

Fig. 9 The effects of SSPH I on the levels of IL-1β and IL-18 in HONE-1 cells detected by ELISA (̄x±s, n=3)

A: The effects of SSPH I on the protein expression level of IL-1β; B: The effects of SSPH I on the protein expression level of IL-18; a: control group; b: 1.25 μmol/L SSPH I; c: 2.5 μmol/L SSPH I; d: 5.0 μmol/L SSPH I; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs control group.

焦亡形态学改变。进一步研究结果显示, SSPH I 处理后细胞内 ROS 水平呈剂量依赖性升高, 同时 NLRP3、cleaved-Caspase-1、GSDMD-N-terminal 蛋白表达上调, 伴随 IL-1β 及 LDH 释放增加。这些结果表明, SSPH I 可能通过促进 ROS 积累激活 NLRP3 炎症小体, 进而触发 Caspase-1 依赖的经典焦亡通路, 最终导致 HONE-1 细胞焦亡。与课题组前期在肝癌细胞中的研究结果相呼应, 即 SSPH I 可通过 ROS 积累调控细胞死亡, 提示 ROS 介导的氧化应激可能是 SSPH I 诱导肿瘤细胞死亡的核心机制之一。

综上所述, SSPH I 可通过调控 ROS/NLRP3/Caspase-1 信号轴诱导鼻咽癌 HONE-1 细胞发生典型焦亡, 从而发挥抗肿瘤作用。研究拓展了对 SSPH I 抗肿瘤机制的认识, 也为鼻咽癌的治疗提供了潜在的候选药物分子。后续研究将进一步通过动物模型验证其体内药效, 并深入探究其调控线粒体能量代谢及 ROS 产生的上游分子机制, 以推动 SSPH I 的临床应用转化。

参考文献

[1] Chang E T, Ye W, Zeng Y X, et al. The evolving epidemiology of nasopharyngeal carcinoma [J]. Cancer Epidemiol Biomark Prev, 2021, 30(6): 1035-47. doi:10.1158/1055-9965.epi-20-1702.

[2] Lu J, Chen X M, Huang H R, et al. Detailed analysis of inflammatory cell infiltration and the prognostic impact on nasopharyngeal carcinoma [J]. Head Neck, 2018, 40(6): 1245-53. doi:10.1002/hed.25104.

[3] Solomon B, Young R J, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments [J]. Semin Cancer Biol, 2018, 52:

228-40. doi:10.1016/j.semcancer.2018.01.008.

[4] Cai J, Yi M, Tan Y, et al. Natural product triptolide induces GS-DME-mediated pyroptosis in head and neck cancer through suppressing mitochondrial hexokinase-II [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40: 190. doi:10.1186/s13046-021-01995-7.

[5] 王媛媛, 陈腾, 从小凡, 等. 扁蒴藤素通过活性氧调控 PI3K/AKT 通路增强顺铂诱导鼻咽癌细胞凋亡 [J]. 南方医科大学学报, 2024, 44(5): 904-12. doi:10.12122/j.issn.1673-4254.2024.05.12.

[5] Wang Y Y, Chen T, Cong X F, et al. Pristimerin enhances cisplatin-induced apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells via ROS-mediated deactivation of the PI3K/AKT signaling pathway [J]. J South Med Univ, 2024, 44(5): 904-12. doi:10.12122/j.issn.1673-4254.2024.05.12.

[6] 孙悦文. 广西特色中草药靶向抗肿瘤筛选及裂果薯皂苷的分离与抗肿瘤作用研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2013.

[6] Sun Y W. Targeted screening anti-cancer from herbal medicine in Guangxi and the isolation and anti cancer research of steroidal saponins from *Schizocapsa planta ginea hance* [D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2013.

[7] 樊庆葵, 余南琼, 胡美纯, 等. 常春藤皂苷元抑制胶质母细胞瘤细胞的增殖和迁移并诱导其凋亡 [J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(5): 852-63. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.017.

[7] Fan Q K, Yu N Q, Hu M C, et al. HDG inhibits the proliferation and migration of GBM cells and induces their apoptosis [J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(5): 852-63. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.017.

[8] Zhou J L, Huang X Y, Qiu H C, et al. SSPH I, a novel anti-cancer saponin, inhibits autophagy and induces apoptosis via ROS accumulation and ERK1/2 signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells [J]. OncoTargets Ther, 2020, 13: 5979-91. doi:10.2147/ott.s253234.

[9] 章璇璇, 秦燕萍, 何能婷, 等. 裂果薯皂苷 I 体外对人胰腺癌 PANC-1 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2022, 39(12): 1945-50. doi:10.16190/j.cnki.45-1211/

- r. 2022. 12. 012.
- [9] Zhang X X, Qin Y P, He N T, et al. Effects of saponin of *Schizocapsa Plantaginea* Hance I on proliferation and apoptosis of human pancreatic cancer PANC-1 cells *in vitro* [J]. *J Guangxi Med Univ*, 2022, 39(12): 1945-50. doi:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2022.12.012.
- [10] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49. doi:10.3322/caac.21660.
- [11] Pan J J, Mai H Q, Ng W T, et al. Ninth version of the AJCC and UICC nasopharyngeal cancer TNM staging classification [J]. *JAMA Oncol*, 2024, 10(12): 1627. doi:10.1001/jamaoncol.2024.4354.
- [12] Cai M, Wang Y, Ma H, et al. Advances and challenges in immunotherapy for locally advanced nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer Treat Rev*, 2024, 131: 102840. doi:10.1016/j.ctrv.2024.102840.
- [13] Xiao X T, Wu Y S, Chen Y P, et al. Patterns and prognosis of regional recurrence in nasopharyngeal carcinoma after intensity-modulated radiotherapy [J]. *Cancer Med*, 2023, 12(2): 1399-408. doi:10.1002/cam4.5020.
- [14] Liu X, Zhang Z, Ruan J, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores [J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 153-8. doi:10.1038/nature18629.
- [15] Fu J, Wu H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation [J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 301-16. doi:10.1146/annurev-immunol-081022-021207.

The effect and mechanism of Saponin I of *Schizocapsa plantaginea* Hance on nasopharyngeal carcinoma cell line HONE-1 *in vitro*

Guo Xinyi¹, Liang Ziyang¹, Wang Jinni¹, Ding Xiaolian¹, Wang Yanxue¹, Liang Gang^{1,2}

(¹College of Pharmacy, ²State Key Laboratory of Targeting Oncology, Guangxi Medical University, Nanning 530021)

Abstract Objective To explore the inhibitory effect and related molecular mechanisms of Saponin of *Schizocapsa plantaginea* Hance I (SSPH I) on human nasopharyngeal carcinoma HONE-1 cells. **Methods** The effect of SSPH I on HONE-1 cell viability was detected using the CCK-8 assay. Its inhibitory effect on cell proliferation was evaluated through a colony formation assay. Changes in cell invasion ability were analyzed using the Transwell assay. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were measured using the DHE fluorescent probe. The extent of intracellular content release was reflected by the LDH release assay. The rate of cell pyroptosis was detected using the Annexin-V/PI double staining method. Changes in the expression of proteins related to the classical pyroptosis pathway were examined by Western Blot. **Results** CCK-8 assay showed that treatment with SSPH I for 24 hours reduced HONE-1 cell viability in a concentration-dependent manner, with an IC₅₀ value of 3.383 μmol/L. In the colony formation assay, the number of HONE-1 cell colonies gradually decreased with increasing concentrations of SSPH I ($P < 0.01$). The Transwell assay revealed that the number of cells migrating through the chamber was reduced following SSPH I treatment ($P < 0.01$). DHE fluorescence probe detection indicated that intracellular ROS fluorescence intensity increased after SSPH I treatment ($P < 0.001$). The LDH release assay showed that LDH activity in the cell supernatant increased with higher concentrations of SSPH I ($P < 0.001$). Annexin-V/PI double staining demonstrated that the proportion of Annexin-V/PI-positive cells increased after SSPH I treatment ($P < 0.001$). Western blot analysis showed that, compared with the control group, the protein expression levels of cleaved-Caspase-1 and GSDMD-N-terminal were upregulated in SSPH I-treated cells ($P < 0.05$), and NLRP3 protein expression levels also increased ($P < 0.05$). ELISA results showed that the levels of IL-1β and IL-18 in the cells increased with higher concentrations of SSPH I ($P < 0.05$). **Conclusion** SSPH I can induce pyroptosis in nasopharyngeal carcinoma HONE-1 cells by regulating the ROS/NLRP3/Caspase-1 signaling axis, thereby exerting an anti-nasopharyngeal carcinoma effect. This suggests that SSPH I may serve as a potential therapeutic agent for nasopharyngeal carcinoma.

Key words SSPH I; nasopharyngeal carcinoma; reactive oxygen species; NLRP3; pyroptosis; saponin

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82360792); Open Project of Guangxi Key Laboratory of Biological Targeting Diagnosis and Therapy Research (No. GXSWBX202402)

Corresponding author Liang Gang, E-mail: lianggang0922@foxmail.com