

赤芍总苷对人肝癌 SMMC-7721 细胞迁移的影响及作用机制探讨

杨玉, 王帅, 孟宪生*, 包永睿

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁省组分中药工程技术研究中心,
辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁大连 116600)

[摘要] **目的:**探讨赤芍总苷对肝癌细胞 SMMC-7721 细胞迁移能力的影响及对血管内皮生长因子(VEGF), 环氧合酶-2(COX-2)表达的影响。**方法:**体外培养 SMMC-7721 细胞, 随机分组, 不加药物作用的为空白组, 其他各组为赤芍总苷低、中、高剂量组, 将不同质量浓度(200, 400, 600 mg·L⁻¹)的赤芍总苷作用于细胞 24 h 后, 采用 MTT 法检测赤芍总苷对细胞抑制作用, 细胞划痕实验测定迁移能力, RT-PCR 检测 COX-2 mRNA 表达, Western blot 检测 VEGF 蛋白的表达。**结果:**与空白组比较, 赤芍总苷能够明显的抑制肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖, 且呈现量效关系($P < 0.01$), 并能够抑制细胞的迁移($P < 0.01$), RT-PCR 及 Western blot 结果显示, 赤芍总苷作用细胞 24 h 后, 可使 COX-2 mRNA 和 VEGF 蛋白的表达明显下降($P < 0.01$)。**结论:**赤芍总苷能够抑制肝癌 SMMC-7721 细胞的生长、迁移, 其机制可能是通过下调 COX-2, VEGF 的表达来实现, 从而为赤芍总苷治疗肝癌的发展及其临床应用提供理论和实验依据。

[关键词] 赤芍总苷; SMMC-7721 细胞; 细胞迁移; 环氧合酶-2; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)06-0108-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015060108

Study on Migration of SMMC-7721 Hepatocarcinoma Cells Included by Total Paeony Glucosides and Its Preliminary Mechanism YANG Yu, WANG Shuai, MENG Xian-sheng*, BAO Yong-rui (Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Liaoning Province Engineering Research Center of Chinese Medicine Ingredients, Liaoning Modern Traditional Chinese Medicine Research and Engineering Laboratory, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the migration of SMMC-7721 hepatocarcinoma cells induced by total paeony glucosides (TPG) and its impact on vascular endothelial growth factor (VEGF), cyclooxygenase (COX)-2 expression. **Method:** SMMC-7721 cells were cultured with culture solution as blank group and TPG in different concentrations (200, 400, 600 mg·L⁻¹) for 24 h *in vitro*. Inhibition on proliferation of cells was assessed by MTT assay. Cell migration was detected by wound scratch assay. COX-2 mRNA expression was detected by RT-PCR. VEGF protein expression was detected by Western blot. **Result:** Compared to the blank group, the proliferation of liver cancer SMMC-7721 cells were significantly inhibited by TPG in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). The cell migration ability was inhibited ($P < 0.05$), the expression of COX-2 mRNA and VEGF protein decreased in the TPG groups. **Conclusion:** TPG could inhibit the growth and migration of liver cancer SMMC-7721 cells. Its mechanism may be related to downregulating the expressions of COX-2 and VEGF. The findings provide theoretical and experimental basis for the development and clinical application of TGF in treating liver cancer.

[Key words] total paeony glucosides; SMMC-7721 cells; migration; cyclooxygenase; vascular endothelial growth factor

[收稿日期] 20140819(018)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09507005)

[第一作者] 杨玉, 硕士, 从事药物分析研究, Tel:0411-85890185, E-mail:807608298@qq.com

[通讯作者] *孟宪生, 博士, 教授, 从事中药组分配伍、代谢组学及药品质量分析研究, Tel:0411-85890185, E-mail:mxsvvv@126.com

赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* 或川赤芍 *Paeonia veitchii* 的干燥根;味苦,性微寒,归肝经;其主要功能为清热凉血,散瘀止痛^[1]。现代研究表明,赤芍具有抗肿瘤、抑制血小板和红细胞聚集、抗凝血和抗血栓、抗动脉粥样硬化、保护心脏和肝脏等作用^[2]。赤芍总苷是赤芍中的主要成分之一,有文献报道赤芍总苷具有显著的抗肿瘤作用^[3],但是关于赤芍总苷对人肝癌细胞迁移影响及相关机制的研究较少。本实验对赤芍总苷抗肝癌细胞 SMMC-7721 进行研究,在验证赤芍总苷能够抑制肝癌细胞 SMMC-7721 的生长、迁移的基础上,对其作用机制进行了初步研究,为赤芍总苷抗肝癌的研究及临床应用提供实验依据和理论基础。

1 材料

1.1 细胞 人肝癌细胞株 SMMC-7721,购于上海拜力生物科技有限公司。

1.2 药物及试剂 赤芍总苷由本实验提取纯化^[4],纯度 > 70%;RPMI-1640 培养粉、四甲基偶氮唑盐 (MTT,美国 Gibco 公司),小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),青霉素(哈药集团制药总厂,批号 A081100207),链霉素(大连美大药厂,批号 65081216),TransZol UP RNA 提取试剂(北京全式金生物技术有限公司,批号 H21119),cDNA 逆转录试剂盒(北京全式金生物技术有限公司,批号 H30922),RIPA 裂解液,Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(生工生物工程有限公司,批号 111201), β -actin 抗体(北京全式金生物技术有限公司,批号 H10427),Anti-VEGF antibody(美国 Abcom 公司,批号 GR91271-1),辣根酶标记山羊抗兔 ZB-2301(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 83228),辣根酶标记山羊抗小鼠 ZB-2305(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 I20303)。

1.3 仪器 HPP-9272 型电热恒温培养箱(常州诺基仪器有限公司),BX50-32E 型生物显微镜(日本 Olympus 公司),EQ-0603-021 型 PCR 仪(日本 TAKARA 公司),SUNRISE 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司),DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂),STS-3 型脱色摇床(上海琪特分析仪器有限公司),Mini-Protean tetra 型小型垂直电泳槽(美国 Bio-Rad 公司),Bioshine GelX 1520 型凝胶成像系统(美国 UVP 公司)。

2 方法

2.1 SMMC-7721 细胞培养 人肝癌 SMMC-7721 细胞株,常规培养于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640

培养液(内含青、链霉素各 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)中,在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$,5% CO_2 培养箱内常规传代培养,取对数生长期细胞用于实验。

2.2 赤芍总苷对肝癌 SMMC-7721 细胞抑制作用 取对数生长期、生长状态良好的细胞,经 PBS 清洗,用 0.25% 的胰酶消化,待细胞趋于变圆用培养液冲洗吹打细胞,制成细胞悬液。细胞计数板上计数,加 RPMI-1640 培养液稀释至密度为 5×10^4 个/mL,接种于 96 孔培养板,每孔 $100 \text{ } \mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$,5% CO_2 ,饱和湿度培养箱中培养 24 h 后,实验组分别加入赤芍总苷低、中、高(终质量浓度 200,400,600 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) $100 \text{ } \mu\text{L}$,空白组加入等体积的培养液,每组设置 5 个复孔。继续培养 24 h,每孔避光加 $20 \text{ } \mu\text{L}$ ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) MTT,继续培养 4 h 后吸净孔内上清液,每孔加入二甲基亚砷 $150 \text{ } \mu\text{L}$,摇床振荡 10 min。待紫色结晶充分溶解后,用酶标仪在 492 nm 处扫描,测定吸光度(A),计算药物对细胞的抑制率^[5]。

2.3 对肝癌 SMMC-7721 细胞迁移影响 取对数生长期的人肝癌 SMMC-7721 细胞用 0.25% 的胰酶使之消化,用含 10% 新生牛血清 RPMI-1640 培养液制成 5×10^7 个/L 的细胞悬液,每孔 1 mL 转种入 6 孔板中,再加入 1 mL 的含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养液。观察当细胞贴壁生长至 80% 左右时,用无血清的 RPMI-1640 培养基同步化 24 h,加丝裂霉素处理 1 h,去除培养液,应用无菌的移液管尖(约 0.7 mm)在各培养板细胞生长单层的相同位置划垂直或平行直线,造成几条“伤口”。PBS 洗 3 次,去除被移液管尖破坏而脱落的细胞。加入含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液配制的赤芍总苷低、中、高(200,400,600 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)2 mL,每组设 3 个复孔。在 24 h 后对细胞划痕愈合程度及细胞横向迁移能力进行观察。

2.4 对肝癌细胞 SMMC-7721 中 VEGF 蛋白表达的影响 将 SMMC-7721 细胞培养于 6 孔板,分别为空白组、赤芍总苷低、中、高组,分别 2 个复孔,给药 24 h 后,用蛋白裂解液裂解细胞,待细胞充分裂解后, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,吸取上清得总蛋白,取上清 BCA 法测定蛋白浓度,以每孔 $50 \text{ } \mu\text{g}$ 上样。以 10% SDS-PAGE 胶进行电泳;电泳后,用 PVDF 膜转膜;以 1:1 000 稀释的一抗 VEGF 在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育过夜;TBST 洗膜后,以封闭液稀释辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:5 000),室温摇床孵育 2 h;TBST 洗膜后,将膜从 TBST 液中取出,在滤纸上吸干,置于保鲜膜上,加入试剂盒的 A,B,C 液反应数

分钟,暗盒中曝光,显影液显影至条带清晰,移至定影液中定影;采用图像分析软件对 Western blot 结果进行定量分析,灰度值以积分吸光度 (IA) 表示,结果以目的蛋白与 β -actin 的 IA 的比值表示。

2.5 对肝癌细胞 SMMC-7721 细胞中 COX-2 mRNA 表达的影响 分别取上述各给药组细胞,按 Trizol 法提取细胞总 RNA,反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板, β -actin 为内参,所用引物序列如下,COX-2 引物(上游:5'-ATCTACCCTCCTCAAGTCCC-3';下游:5'-TACCAGAAGGGCAGGATACAG-3';扩增片段长度:708 bp); β -actin 引物(上游:5'-TGCTGTCCCTGTATGCCTCT-3';下游:5'-TTTGATGTCACGCACGATTT-3';扩增片段长度:208 bp)。PCR 反应条件为:①预变性,94 °C 2 min;②变性,94 °C 30 s;③退火,56 °C 30 s;④延伸,72 °C 30 s;⑤②~④步 30 个循环。采用凝胶成像分析系统进行定量分析,以 β -actin 作为内参,通过目的基因吸光度值与 β -actin 吸光度的比值反映 COX-2 的 mRNA 表达情况。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法。以

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

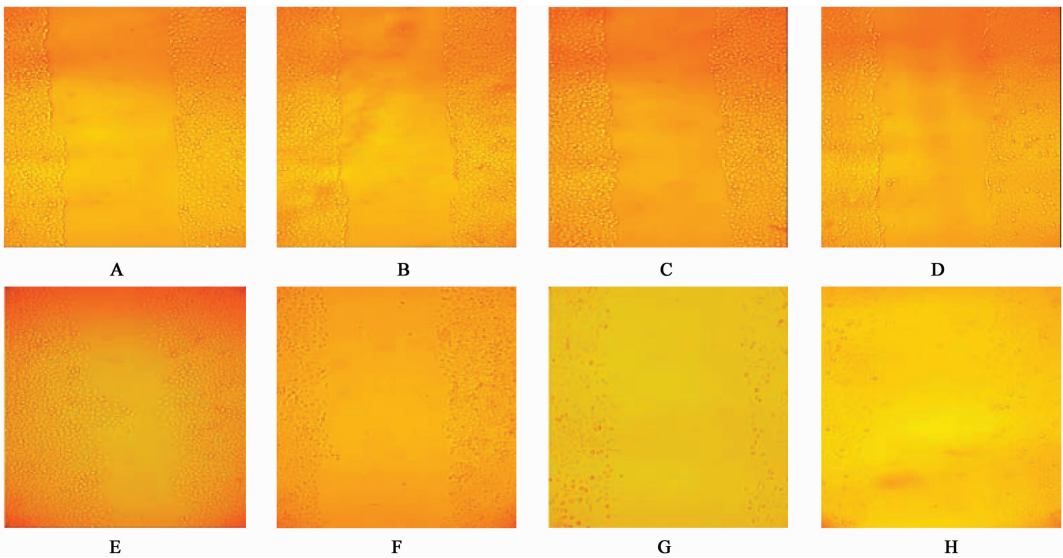
3.1 对 SMMC-7721 细胞增殖的影响 与空白组比较,200,400,600 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 赤芍总苷作用 SMMC-7721 24 h 后,均能抑制细胞增殖,各组的 A 均明显高于空白组 ($P < 0.05$),并且呈一定的量效关系。见表 1。

表 1 赤芍总苷对 SMMC-7721 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Effects of total paeony glucosides on proliferation of SMMC-7721 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率/%
空白	-	-
赤芍总苷	200	$31.8 \pm 1.609^{2)}$
	400	$45.3 \pm 1.249^{2)}$
	600	$70.4 \pm 1.212^{2)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (图 2~3 同)。

3.2 对细胞划痕实验的影响 空白组在 24 h 内划痕基本上被“铺满”,细胞生长状态良好;与空白组比较,赤芍总苷各给药组细胞划痕仍较明显,细胞形态趋于变圆,细胞之间出现较大的缝隙。中剂量组与高剂量组的迁移距离接近,但高剂量组变圆的细胞多于中剂量。见图 1。



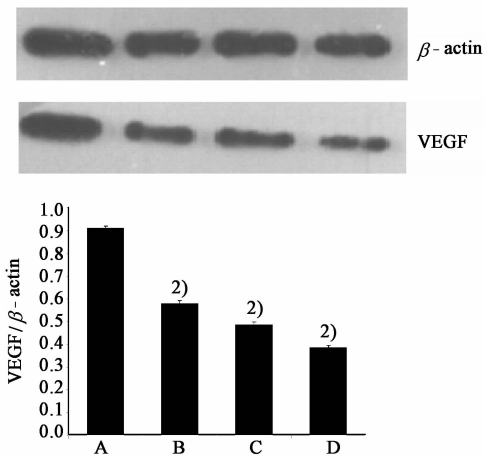
A. 空白 0 h 组; B. 赤芍总苷 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 0 h 组; C. 赤芍总苷 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 0 h 组; D. 赤芍总苷 600 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 0 h 组; E. 空白 24 h 组; F. 赤芍总苷 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 24 h 组; G. 赤芍总苷 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 24 h 组; H. 赤芍总苷 600 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 24 h 组

图 1 赤芍总苷对 SMMC-7721 细胞划痕实验的影响

Fig. 1 Effects of total paeony glucosides on scratch experiments of SMMC-7721 cell

3.3 对 SMMC-7721 细胞中 VEGF 蛋白表达的影响 与空白组比较,低、中、高浓度赤芍总苷干预细胞中 VEGF 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.01$)。见图 2。

3.4 对 SMMC-7721 细胞中 COX-2 mRNA 表达的影响 与空白组比较,低、中、高浓度赤芍总苷干预细胞中 COX-2 mRNA 表达水平均明显下降 ($P < 0.01$)。见图 3。



A. 空白组; B. 赤芍总苷 200 mg·L⁻¹组; C. 赤芍总苷 400 mg·L⁻¹组; D. 赤芍总苷 600 mg·L⁻¹组(图 3 同)

图 2 赤芍总苷对 SMMC-7721 细胞中 VEGF 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of total paeony glucosides on expression of VEGF protein in SMMC-7721 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

痕实验结果分析,赤芍总苷能抑制肝癌 SMMC-7721 细胞迁移,且呈剂量依赖性。赤芍总苷抑制 SMMC-7721 细胞生长、迁移作用的机制值得深入的探讨。

肝细胞癌是富血管肿瘤,它的发生及发展离不开肿瘤新生血管形成。最近许多研究证实了血管生成与肝癌侵袭性之间的联系,抑制血管生成能显著抑制肿瘤的生长及转移。COX-2 又称前列腺素内过氧化物合成酶,能够通过刺激肿瘤血管生成、增加肿瘤浸润转移能力、抑制细胞侵袭和转移能力、抑制机体免疫功能等途径来促进肿瘤的发生和发展^[7-8]。研究表明,COX-2 在许多肿瘤如:胃癌、胰腺癌、结肠癌中均呈现高表达,COX-2 在人肝癌细胞系中也大多呈高表达^[9]。本实验通过划痕损伤修复实验,发现赤芍总苷作用肝癌 SMMC-7721 细胞后,迁移距离明显小于空白组,且对赤芍总苷及空白组 24 h 后 COX-2 mRNA 表达量进行比较,结果给药组 COX-2 mRNA 表达较空白组降低,故可以证实赤芍总苷具有降低肝癌细胞迁移能力的作用,其机制可能与下调 COX-2 mRNA 表达有关。

肿瘤细胞依靠分泌血管生长因子(VEGF, bFGF, PDGF 等)保证其自身生长^[10]。VEGF 能够促使肿瘤血管的新生,从而促进肿瘤的增殖和发展。当肿瘤生长到一定程度以后,必需由肿瘤自身新生血管来提供营养物质和氧气,在肿瘤细胞分泌的 VEGF 等促进血管生成因子的作用下,肿瘤组织内出现新生毛细血管,进而迅速生长并侵袭和转移。VEGF 是肿瘤微血管生成和侵袭转移过程中的关键因素,因此本实验通过对赤芍总苷给药组及空白组细胞中的 VEGF 蛋白表达进行比较,结果表明,赤芍总苷能够抑制肝癌 SMMC-7721 细胞生长、转移,其机制可能与下调 VEGF 蛋白表达有关。

另有文献报道^[11],COX-2 与 VEGF 表达之间呈正相关的关系,COX-2 能够使肿瘤中 VEGF 的表达上调;同时,VEGF 又可以上调 COX-2 的表达,从而形成一个正反馈网络,协同刺激肿瘤血管生成。本实验研究的结果为赤芍总苷可能是通过下调 COX-2,VEGF 的表达来抑制肝癌细胞的增殖和迁移,验证了 COX-2 与 VEGF 表达之间的正向关系,也为赤芍总苷抗肝癌的进一步研究提供理论依据和实验基础。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:147.

4 讨论

肝细胞癌是全世界最常见的恶性肿瘤之一,我国的肝癌发病率和死亡率均占肿瘤中的第二位^[6]。肝癌的复发、转移是导致患者死亡的主要原因。已有文献报道,赤芍总苷能显著的抑制肝癌细胞增殖。本文的研究结果表明赤芍总苷对人肝癌细胞 SMMC-7721 有较强的抑制作用,且细胞抑制率具有量效关系。划痕实验是测定细胞迁移能力的一种经典方法,本实验不需要阳性组,与空白组比较就能够较好的反映出各给药组对细胞迁移的影响。通过划

- [2] 冀兰鑫,黄浩,李长志,等. 赤芍药理作用的研究进展[J]. 药物评价研究,2010(3):233-236.
- [3] 陈志伟,许惠玉,严苏纯,等. 赤芍总苷对荷瘤小鼠肿瘤细胞形态学实验研究[J]. 中医药学刊,2005,23(7):1228-1229.
- [4] 舒心莹,孟宪生,潘英,等. 乙醇梯度处理和树脂联用技术对白芍中白芍总苷的纯化研究[J]. 中药材,2010,33(11):1788-1791.
- [5] 包永睿,王帅,孟宪生,等. 薏苡仁脂肪酸类成分对人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞周期及细胞凋亡的影响[J]. 中成药,2014,36(2):235-239.
- [6] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, et al. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000[J]. Int J Cancer, 2001, 94(2):153-156.
- [7] He X P, Shao Y, Li X L, et al. Downregulation of miR-101 in gastric cancer correlates with cyclooxygenase-2 overexpression and tumor growth[J]. FEBS J, 2012, 279(22):4201-4212.
- [8] Li Y, Dai L, Zhang J, et al. Cyclooxygenase-2 polymorphisms and the risk of gastric cancer in various degrees of relationship in the Chinese Han population[J]. Oncol Lett, 2012, 3(1):107-112.
- [9] Liu N B, Peng T, Pan C, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in human HepG2, Bel-7402 and SMMC-7721 hepatoma cell lines and mechanism of cyclooxygenase-2 selective inhibitor celecoxib-induced cell growth inhibition and apoptosis[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11:6281-6287.
- [10] Sufen G, Xianghong Y, Yongxia C, et al. bFGF and PDGF—BB have a synergistic effect on the proliferation, migration and VEGF release of endothelial progenitor cells[J]. Cells Biol Int, 2011, 35(5):545-551.
- [11] Li Z R, Li Y P, Lin M L, et al. Activated macrophages induce neovascularization through upregulation of MMP-9 and VEGF in rat corneas[J]. Cornea, 2012, 31(9):1028-1035.

[责任编辑 周冰冰]

《中国当代医药》杂志 欢迎订阅 欢迎投稿

《中国当代医药》杂志是国家卫生和计划生育委员会主管,中国保健协会、当代创新(北京)医药科学研究院主办的医药卫生专业期刊,本刊已被美国化学文摘(CA)数据库、万方数据数字化期刊群、中国核心期刊(遴选)数据库、中国知网、中国学术期刊网络出版总库、中文科技期刊数据库全文收录,系中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊。现为旬刊,国内刊号:CN11-5786/R,国际刊号:ISSN 1674-4721,邮发代号:2-515,定价:每期20元,通过本刊发行部订阅全年36期杂志优惠价为540元。

主要栏目:综述、论著、实验研究、临床研究、药理与毒理、药品鉴定、药物与临床、新药评价、麻醉与镇痛、医学检验、病理分析、影像与介入、中医中药、护理研究、制剂与技术、医药教育、调查研究、工作探讨等50多个栏目。对省、部级以上部门立项的科研论文以及本刊订户的论文予以优先刊登。本刊订户凭订阅单复印件投稿,同等条件优先录用。欢迎各医药单位、院校、厂家刊登广告。

社址:北京市朝阳区通惠家园惠润园(壹线国际)5-3-602 邮编:100025

投稿热线:010-59679076 59679077 发行热线:010-59679533 传真:010-59679056

投稿信箱:ddy@vip.163.com 网址:www.dangdaiyiyao.com