

山楂乙醇提取物对肝癌细胞 HepG2 凋亡及相关因子表达的影响

彭芳华^{1*}, 马玄¹, 胡秀英²

(1. 盘江投资控股(集团)有限公司总医院, 贵州六盘水 553536;

2. 贵州医科大学附属医院, 贵阳 550000)

[摘要] **目的:**探讨山楂提取物体外对肝癌细胞株 HepG2 凋亡的影响。**方法:**山楂乙醇提取,并采用不同质量浓度(0.1, 0.2, 0.4, 0.8 g·L⁻¹)山楂提取物处理 HepG2 细胞 24, 48, 72 h。四甲基偶氮唑盐比色(MTT)法检测提取物对肝癌细胞活力的影响;流式细胞术检测提取物处理细胞 48 h 后的凋亡率;实时定量荧光 PCR(real-time PCR)检测半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3), B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)基因表达;免疫印迹法(Western blot)检测激活型 Caspase-3(Cleaved-Caspase-3), Bcl-2, Bax 蛋白表达。**结果:**山楂提取物对 HepG2 细胞的活力有显著抑制作用($P < 0.05$),并以浓度及时间依赖的形式诱导细胞凋亡。山楂提取物可以显著促进 Bax 和 Cleaved-Caspase-3 基因和蛋白表达,抑制 Bcl-2 基因和蛋白表达。**结论:**山楂提取物抑制肝癌细胞 HepG2 的增殖,促进其发生凋亡,与 Bax 和 Cleaved-Caspase-3 的表达增加, Bcl-2/Bax 降低有关。

[关键词] 山楂; 提取物; HepG2; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)07-0169-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016070169

Effect of Hawthorn Extract on Apoptosis and Related Factors of HepG2 Cells

PENG Fang-hua^{1*}, MA Xuan¹, HU Xiu-ying²

(1. General Hospital in Panjiang Investment Holding Co. Ltd., Liupanshui 553536, China;

2. Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and mechanism of hawthorn extract on apoptosis of hepatoma cells HepG2 *in vitro*. **Method:** Ethonal fraction was extracted from hawthorn, then HepG2 cells were treated by hawthorn extract at concentrations of 0.1, 0.2, 0.4 and 0.8 g·L⁻¹ for 24, 48 and 72 h. Effect of the extract on hepatoma cells activity was detected by 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) assay; apoptotic rate was measured by flow cytometry after HepG2 cells were treated by hawthorn extract for 48 h. Gene expressions of cysteinyl aspartate specific proteinase (Caspase-3), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and Bax were detected by real-time PCR; protein expressions of cleaved-caspase3, Bcl-2 and Bax were detected by Western blot. **Result:** Hawthorn extract significantly inhibited the activity of HepG2 cells, and induced apoptosis in time-and concentration-dependent manners. Bcl-2 expression was inhibited in mRNA and protein level, while Bax and Caspase-3 were up-regulated by extract. **Conclusion:** Hawthorn extract could inhibit proliferation and promote apoptosis of HepG2 cells, and its mechanism may be associated with increasing expressions of Bax and Cleaved-Caspase-3 and reducing Bcl-2/Bax ratio.

[Key words] hawthorn; extract; HepG2; apoptosis

[收稿日期] 20150811(016)

[基金项目] 贵州省科技合作计划项目(TN2014-60)

[通讯作者] * 彭芳华, 副主任医师, 从事中西医结合内科研究, Tel:13885816456, E-mail: pengfh2015@163.com

中药山楂为蔷薇科山楂或山里红的干燥果实^[1]。主产地为山东、河北、河南、山西等省^[2]。山楂性酸、甘,味温,归脾、胃、肝经,常用于消食健脾,行气散瘀,泻痢腹痛,瘀血经闭等治疗^[3]。目前已有文献报道从山楂中提取到山楂酸、黄酮类、萜类、酒石酸、柠檬酸、多糖、苷类等主要成分^[4]。其中,山楂提取黄酮类化合物用于降血脂,降血压^[5];山楂提取物可以增加心肌收缩力,增加心输出量,减慢心率^[6];山楂榨取原液对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、大肠埃希菌等具有较好的抑制作用^[7];同时山楂多糖类也能有效缓解疲劳等^[8]。近年研究发现,山楂提取液可以通过阻断亚硝酸胺合成从而抑制消化道癌症的发生或加重,还可以抑制黄曲霉素的致癌作用,因此,消化道肿瘤患者食用山楂既有利于消化,又可以起到辅助抗肿瘤的作用^[9]。但关于山楂提取物抗肿瘤效应及机制的报道并不多见。本研究选取肝癌细胞 HepG2 为研究对象,探索不同浓度的山楂乙醇提取物在不同时间内对肝癌细胞 HepG2 凋亡情况的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料 肝癌细胞株 HepG2 购自中科院昆明动物研究所。药材山楂饮片购于贵州省盘江投资控股(集团)有限公司总医院中药房,由贵州医科大学附属白云医院中药房副主任药师王丽鉴定为蔷薇科山楂 *Grataegus pinnatifida* 的干燥果实。

1.2 主要试剂 RPMI 1640 培养基(赛默飞世尔生物化学制品有限公司,批号 SH30809.01B);胎牛血清(FBS,杭州四季青生物有限公司,批号 sc-224480);四甲基噻唑蓝(MTT,北京索莱宝科技有限公司,批号 M8180-1);二甲基亚砜(DMSO,上海慧颖生物科技有限公司,批号 0231);激活型 Caspase-3 (Cleaved-Caspase-3) 抗体(碧云天公司,批号 AC033-1);B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)和 β 肌动蛋白(β -actin)抗体(Proteintech Group 公司,批号分别为 12789-1-AP,60267-1-Ig,66009-1-Ig);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(七海生物公司,批号 A005-2);半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),Bcl-2, Bax 和内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成,Trizol(Invitrogen 公司,批号 15596-026),Transcript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix,2 \times EasyTaq PCR SuperMix(北京庄盟国际生物基因科技有限公司,批号分别为 ZR102-2,ZF101-2)。

1.3 仪器 HF90 型 CO₂ 细胞培养箱(力新仪器上

海有限公司),CA-2000 型酶标仪(广州仪涛科学仪器有限公司),DYCZ-20F 型电泳仪及电泳相关仪器(北京市六一仪器厂公司),ABI 7500 型 real-time PCR 仪(贵州源济商贸有限公司),FACSCalibur 型流式细胞仪(新乡市亚都医疗器械有限公司)。

2 方 法

2.1 山楂乙醇提取 将山楂饮片干燥至恒重,粉碎为 0.5 cm 左右颗粒状。称取 50 g 颗粒置于 2 L 的大圆底烧瓶中,加入 10 倍体积的蒸馏水回流提取 3 次,每次回流 0.5 h,弃水提液,加入乙醇水浴恒温回流 3 次,每次 2 h,合并提取液,浓缩干燥成粉末。精密称取 100 mg 粉末,加入 RPMI 1640 培养基,超声至完全溶解并定容为 100 mL,终质量浓度为 1 g \cdot L⁻¹。将山楂乙醇提取物初溶液(1 g \cdot L⁻¹)经 0.25 μ m 的微孔滤膜除菌,再等比稀释至 0.8,0.4,0.2,0.1 g \cdot L⁻¹ 备用。

2.2 细胞培养 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中培养肝癌细胞 HepG2。

2.3 MTT 法测定细胞毒性 将 HepG2 细胞接种于 96 孔板中,每孔细胞悬液 100 μ L,2 \times 10³ 个/孔,培养过夜至细胞贴壁。将培养基换为含山楂乙醇提取物(0,0.1,0.2,0.4,0.8 g \cdot L⁻¹)的 RPMI 1640 培养基,每个浓度 3 个复孔,分别培养 24,48,72 h 后,每孔加入 5 g \cdot L⁻¹ MTT(15 μ L),继续孵育 4 h 后,小心吸除培养液,加入 DMSO 150 μ L,充分振荡后用酶标仪在 570 nm 波长处检测吸光度 A。

2.4 AnnexinV-FITC/碘化丙啶(PI)双染检测凋亡率 将 HepG2 细胞接种于 6 孔板内,待细胞生长至 70% ~ 80% 时,加入山楂乙醇提取物水溶液(0.1,0.2,0.4,0.8 g \cdot L⁻¹)作用细胞 24 h。24 h 后加入胰蛋白酶消化,收集细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞后加入 500 μ L 结合液重悬细胞,再分别加入 5 μ L AnnexinV-FITC 和 PI,混匀 4 $^{\circ}$ C 避光反应 15 min,使用流式细胞仪进行检测。

2.5 总 RNA 提取及引物设计合成 细胞培养及加药同 2.4。培养 24 h 后加入胰蛋白酶消化,收集细胞加入 0.5 mL Trizol 使细胞充分裂解,再加入 0.2 mL 三氯甲烷,振荡混匀,孵育 3 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min,取上层水相,加入等体积异丙醇,充分混匀,静置 10 min,12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min,加入 75% 乙醇溶液洗涤,8 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min 后,去乙醇,加入焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶解,得总 RNA。酶标仪测定总 RNA 的浓度和纯度,-70 $^{\circ}$ C 保存备用。实时定量荧光 PCR(real-time

PCR) 引物根据 genbank, Caspase-3 (基因号 NM_004346), 5'-TGTGGCATTGAGACAGAC-3', 3'-CCTGTCCTCCGTCCTCT-5'; Bcl-2 (基因号 NM_000633), 5'-GTGGGGTCATGTGTGTGGAGAG-3', 3'-TCAGAGACAGCCAGGAGAAATCAA-5'; Bax (基因号 NM_004324), 5'-GCCCTTTTGCTTCAGGGTTTCA-3', 3'-GAGGATGAAACCCTGCGGGT-5'; 内参 (GAPDH, 基因号 NM_001256799), 5'-TGAAGTTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3', 3'-CACCACCTGGA GTACCGGGTGTAC-5'; 通过 Primer5.0 软件设计引物及内参, 用 Oligo6 软件进行引物合理性检测。

2.6 real-time PCR 检测相关基因 将提取的总 RNA 按照逆转录试剂盒操作说明书合成 cDNA。分别加入上下游引物, 2 × Easy Taq PCR SuperMix 等进行扩增。扩增条件: 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。最后通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算各基因表达变化。

2.7 Western blot 检测 Cleaved-Caspase-3, Bcl-2, Bax 蛋白表达 细胞培养及加药同 2.4。24 h 后加入胰蛋白酶消化, 收集细胞并提取细胞总蛋白。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 湿转法将蛋白转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜 70 min, 转膜后 5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜, 一抗 (1:1 000) 室温下孵育 2.5 h, 二抗室温孵育 1.5 h, 化学发光检测并曝光。

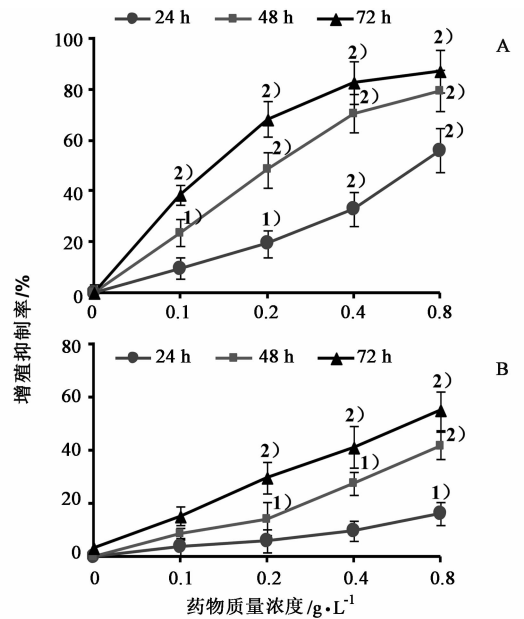
2.8 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用 *t* 检验和方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 山楂乙醇提取物对 HepG2 细胞抑制活力及促凋亡作用 山楂乙醇提取物 (0.1, 0.2, 0.4, 0.8 g·L⁻¹) 作用于 HepG2 细胞 24, 48, 72 h 后, 对 HepG2 细胞有不同程度的增殖抑制作用, 72 h 时抑制作用最强, 细胞活力显著减低, 细胞增殖抑制率明显下降, 并有一定的时间依赖性 ($P < 0.05$)。山楂乙醇提取物对正常肝细胞 24 h 的影响较低。24 h 时, 与正常组相比, 随着药物浓度的增加, 细胞凋亡增加, 当山楂提取物浓度达 0.8 g·L⁻¹ 时, 细胞凋亡率最高 ($P < 0.01$)。见图 1, 2。

3.2 山楂乙醇提取物对 HepG2 细胞凋亡率的影响 与空白组比较, 山楂提取物 0.2, 0.4, 0.8 g·L⁻¹ 组细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2。

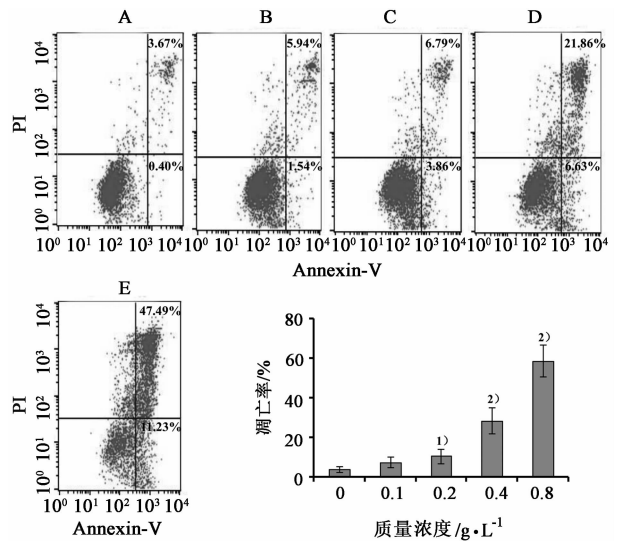
3.3 山楂乙醇提取物对 HepG2 细胞 Caspase-3, Bcl-2, Bax 基因表达的影响 山楂乙醇提取物 (0.2,



A. HepG2 细胞; B. 正常小鼠肝细胞; 与 0 g·L⁻¹ 组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

图 1 山楂提取物对 HepG2 细胞及正常小鼠肝细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of hawthorn extract on the activity of HepG2 cells and normal liver cells in mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A. 空白组; B~E. 山楂乙醇提取物 (0.1, 0.2, 0.4, 0.8 g·L⁻¹) 组; 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (图 3, 4 同)

图 2 山楂提取物对 HepG2 细胞的促凋亡作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Flow cytometry analysis of effects of hawthorn extract on apoptosis rates of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

0.4, 0.8 g·L⁻¹) 处理 HepG2 细胞 24 h 后, 与空白组相比, 各组 Caspase-3, Bax 基因表达显著上调 ($P < 0.05, P < 0.01$), Bcl-2 基因表达下调 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 3。

3.4 山楂乙醇提取物对 HepG2 细胞 Cleaved-Caspase-3, Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响 山楂乙醇提

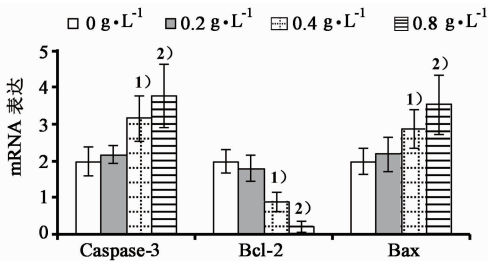


图 3 山楂提取物对 HepG2 细 Caspase-3, Bcl-2, Bax mRNA 水平表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Changes in mRNA expressions of Caspase-3, Bcl-2 and Bax in HepG2 cells with different concentrations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

取物 (0.2, 0.4, 0.8 g·L⁻¹) 处理 HepG2 细胞 24 h 后, 与空白组相比, HepG2 细胞中 Cleaved-Caspase-3, Bax 蛋白表达逐渐上升, Bcl-2 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$)。见图 4。

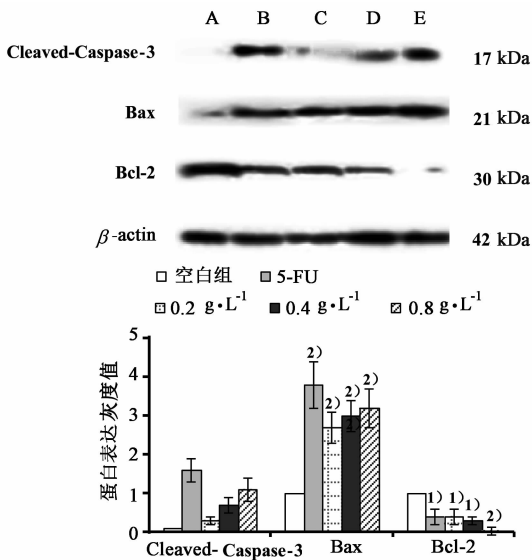


图 4 山楂提取物对 HepG2 细胞 Cleaved-Caspase-3, Bcl-2, Bax 蛋白水平表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of hawthorn extract on protein expressions of Cleaved-Caspase-3, Bcl-2 and Bax in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

山楂中含有黄酮、三萜、甾体等多种具有生物活性的天然产物。其中部分三萜类化合物被证实具有抗肿瘤活性^[10]。肝癌是目前世界上最常见的癌症之一, 预后差, 严重危害着人类的健康^[11]。目前, 化疗是治疗肝癌的重要手段, 但大多数化疗药均有明显的副作用^[12]。因此, 研究采用具有药物活性的饮片治疗肝癌具有重要意义。本研究通过乙醇反复回流提取抗肿瘤的有效部位。研究发现随着山楂提取物浓度的增加和作用时间的延长, 肝癌细胞株 HepG2 增殖抑制显著增加, 并具有时间和浓度依赖性, 同时, 细胞凋亡逐渐增加, 山楂提取物抑制

HepG2 细胞增殖与细胞凋亡增加有关。研究表明, 细胞凋亡与 Caspase 途径的激活, Bcl-2/Bax 减低有关^[13]。本研究发现经山楂提取物处理 HepG2 细胞后, 细胞内 Caspase-3, Bax mRNA 水平显著升高; Cleaved-Caspase-3, Bax/Bcl-2 蛋白水平表达显著升高。因此, 本研究认为山楂提取物抑制肝癌细胞 HepG2 的增殖, 促进其发生凋亡, 与 Bax, Cleaved-Caspase-3 的表达增加, Bcl-2/Bax 减低有关。

综上所述, 本研究证实山楂乙醇提取物对肝癌细胞株 HepG2 有明确的促凋亡作用。其诱导 HepG2 凋亡可能与线粒体途径有关。以上结果为应用山楂饮片或山楂乙醇提取部位治疗肝癌奠定了实验基础。山楂乙醇提取物作用于 HepG2 细胞的具体机制还需要进行更加深入的研究。

[参考文献]

- [1] 詹琤琤, 段时振, 李杰. 中药山楂的化学成分与药理作用研究概况 [J]. 湖北中医杂志, 2012, 34 (12): 77-79.
- [2] 朱日明. 山楂水提取液对结肠癌细胞增殖的影响 [J]. 中国医学科学, 2012, 2(23): 39-40.
- [3] 楼陆军, 罗洁霞, 高云. 山楂的化学成分和药理作用研究概述 [J]. 中国药业, 2014. 23 (3): 92-94.
- [4] 乔晓莉, 吴士杰, 祁向争, 等. 山楂中化学成分的 UPLC/ESI-TOF/MS 分析 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29 (2): 120-124.
- [5] 范红艳, 王艳春, 顾饶胜, 等. 茶多酚抗衰老的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2011, 31 (5): 893-895.
- [6] 黄凯, 杨新波, 黄正明. 金丝桃苷药理作用研究进展 [J]. 药学进展, 2009, 28 (8): 1046-1048.
- [7] 李长青, 吴伟, 佟颖. 山楂核提取物杀菌效果及影响因素的研究 [J]. 中国消毒学杂志, 2007, 24 (1): 50-52.
- [8] 周蓉蓉, 陈平, 张俊红, 等. 鄂产全缘火棘多糖类成分的抗疲劳作用 [J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26 (10): 1210-1212.
- [9] 张瑶. 山楂, 药理作用你了解多少 [J]. 黑龙江科技信息, 2009 (6): 163.
- [10] 李娇妹, 郑纺, 翟丽娟, 等. 三萜类化合物抗肿瘤活性研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45 (15): 2265-2271.
- [11] 戴朝六, 赵阳. 原发性肝癌的综合治疗 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2014, 21 (2): 133-137.
- [12] 李文文, 何信佳, 于丽, 等. 精确放疗联合介入栓塞化疗对原发性肝癌临床效果 [J]. 齐鲁医学杂志, 2014, 29 (6): 493-495, 499.
- [13] 胡光荣, 王天群, 贾广生, 等. 乳酸堆积和二氯乙酸钠对肝癌细胞凋亡及 Bax, Bcl-2 表达和 Caspase-3 活性的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14 (24): 4601-4605.

[责任编辑 张丰丰]