

人参多糖注射液对肝细胞癌的增殖抑制作用及机制探讨

高恒宇, 郭林娜*, 刘丹

(齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

[摘要] **目的:**观察人参多糖注射液对人肝癌细胞 BEL-7402 和 HpeG2 增殖抑制作用,并探讨其机制。**方法:**将不同浓度的人参多糖注射液与人肝癌细胞 BEL-7402 和 HpeG2 作用,采用 cell counting kit-8 (CCK8)检测细胞的增殖抑制,通过倒置显微镜观察用药前后细胞形态、数量变化,透射电镜观察细胞坏死、凋亡等形态学变化,蛋白免疫印迹法 (Western blot)检测肿瘤坏死因子受体 1 (TNFR1) 蛋白表达情况。**结果:**人参多糖注射液对人肝癌细胞 BEL-7402 和 HpeG2 的增殖有明显抑制作用 ($P < 0.05$),并且与浓度和时间呈正相关。 $60, 80, 100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 人参多糖注射液作用于人肝癌细胞 BEL-7402 和 HpeG2 24, 48, 72 h 后,可显著抑制其增殖 ($P < 0.01$), $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 人参多糖注射液作用于人肝癌细胞 BEL-7402 和 HpeG2 24, 48, 72 h 后可明显抑制其增殖 ($P < 0.05$)。人参多糖注射液作用人肝癌细胞 BEL-7402 和 HpeG2 48 h 后,细胞出现细胞核边集、凋亡小体等凋亡形态变化,72 h 后部分细胞出现空泡样变等形态学变化。与空白组比较, $40, 60, 80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 人参多糖注射液组作用人肝癌细胞 BEL-7402 和 HpeG2 后, TNFR1 蛋白相对表达量明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**人参多糖注射液对人肝癌细胞 BEL-7402 和 HpeG2 的增殖有明显的抑制作用;诱导细胞凋亡可能是抑制作用的机制。

[关键词] 肝细胞癌; 人参多糖注射液; BEL-7402 细胞; HpeG2 细胞; 凋亡; 肿瘤坏死因子受体 1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)16-0134-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016160134

Discussion on Effects and Mechanism of Ginseng Polysaccharide Injection on Proliferation Inhibition of Hepatoma Cells

GAO Heng-yu, GUO Lin-na*, LIU Dan

(Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and mechanism of ginseng polysaccharide injection on the proliferative inhibition of hepatoma cell line BEL-7402 and HpeG2. **Method:** The hepatoma cell line BEL-7402 and HpeG2 were treated with different concentrations of ginseng polysaccharide injection. Cell counting kit-8 (CCK8) was used to detect the proliferative inhibition of cells. Inverted microscope was used to observe the changes both in quantity and morphology of the cells before and after the treatment. Transmission electron microscope (TEM) was used to observe the morphological changes such as apoptosis and necrosis. Western blot was used to detect the expression levels of tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1). **Result:** Ginseng polysaccharide injection could effectively inhibit the proliferation of BEL-7402 and HpeG2 cells ($P < 0.05$), which was positively correlated with concentration and time. It could significantly inhibit the proliferation of BEL-7402 and HpeG2 cells after 24, 48, 72 h treatment with the concentrations of 60, 80 and 100 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ginseng polysaccharide injection ($P < 0.01$). It could also inhibit the proliferation of BEL-7402 and HpeG2 cells after 24, 48, 72 h treatment with the concentration of 40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$). The results of TEM showed that ginseng polysaccharide injection resulted in morphological changes of BEL-7402 and HpeG2 such as nuclear edge set and apoptotic bodies after 48 hours treatment, and vacuoles appeared in part cells after 72 hours treatment. As

[收稿日期] 20160125(008)

[基金项目] 黑龙江省教育厅科学技术研究面上项目(12531831)

[第一作者] 高恒宇, 硕士, 副教授, 从事肝癌中药治疗研究, E-mail:46702729@qq.com

[通讯作者] * 郭林娜, 硕士, 讲师, 从事肝癌中药治疗研究, Tel:045-22663184, E-mail:30547814@qq.com

compared with the blank group, after BEL-7402 and HpeG2 cells were treated with 40, 60, 80 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ginseng polysaccharide injection, the relative expressions of TNFR1 protein were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Ginseng polysaccharide injection can effectively inhibit the proliferation of hepatoma cell line BEL-7402 and HpeG2, and the mechanism may be associated with induction of apoptosis.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; ginseng polysaccharide injection; BEL-7402 cell; HpeG2 cell; apoptosis; tumor necrosis factor receptor 1

人参主治劳伤虚损、健忘、倦怠、安神、眩晕头痛、生津、气血津液不足等证^[1]。现代生物学和医学研究发现,人参含有皂苷、挥发油、糖类和多肽等多种有效活性成分^[2],其中人参多糖(GPS)是主要成分之一,有多种生物活性,如抗肿瘤、免疫调节、抗疲劳、降血糖、抗辐射等作用^[3-4]。近年来,GPS的抗肿瘤作用受到学者们的关注,已有研究证实,GPS诱导白血病细胞 K562 凋亡,其机制可能是细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期所致^[5];GPS 通过下调基质金属蛋白酶(MMP)-2 及 MMP-9 蛋白表达抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 侵袭和迁移能力^[6];GPS 可显著抑制 CNE-2 细胞增殖,证明 Wnt/ β -链蛋白(β -catenin)信号通路受阻可能为 GPS 诱导人鼻咽癌细胞 CNE-2 凋亡的机制^[7]。GPS 抗肿瘤作用及机制在胃癌等其他肿瘤中也有相关报道,其机制主要有诱导凋亡、细胞增殖抑制及改变细胞周期分布等途径^[8-9]。但关于人参多糖抗肝癌作用及机制的研究国内外报道更少,且在 GPS 抗肿瘤机制中相关死亡受体途径中肿瘤坏死因子受体 1(TNFR1)参与凋亡过程的研究较少。本课题检测人参多糖注射液对人肝癌细胞 BEL-7402 和 HpeG2 的增殖抑制作用并检测细胞中 TNFR1 表达,探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药物与试剂 人参多糖注射液(山西普德药业股份有限公司,国药准字 H14023512),TNFR1 人抗兔单克隆抗体(Proteintech 公司,批号 18249),cell counting kit-8(CCK8)试剂盒(同仁化学研究所,批号 JQ701), β -肌动蛋白(β -actin)抗体,二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 20150512,20150610),其余试剂为进口或国产分析纯。

1.2 细胞株 人肝癌细胞 HpeG2 由哈尔滨医科大学第一附属医院馈赠,人肝癌细胞 BEL-7402 由齐齐哈尔医学院基础研究室提供。

1.3 仪器 SW-CJ-1FDA 型超净工作台(中国苏州安泰空气技术有限公司),IMT-2 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),371 气套式二氧化碳细胞培养箱(美国 Thermo Electron Corporation 公司),Multiskan

Ascent 型多功能酶标仪(中国芬兰雷勃公司),EPS-DYY-10C 型电泳仪(北京市六一仪器厂),EM208S 型透射电镜(荷兰飞利浦公司)。

2 方法

2.1 培养人肝癌细胞 BEL-7402 和 HepG2 取冻存人肝癌细胞 BEL-7402, HepG2 复苏,采用 DMEM 培养基(含 10% 小牛血清,100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素),放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱内培养,隔天换液,3 d 左右传代培养。

2.2 CCK8 检测人肝癌细胞 BEL-7402 和 HepG2 增殖抑制 取对数生长期的细胞,采用胰酶消化,血球仪计数,按计数结果用培养基按体积 1:60 稀释,接种于 96 孔板,每孔 150 μL ,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱内培养 24 h 后,设空白组和 GPS(20,40,60,80,100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组。分别向 GPS 组加入相应质量浓度的 GPS,设 5 个复孔,空白组加培养基,重复 3 次。放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱内培养 24,48,72 h。弃掉培养基及药物,每孔加培养基 100 μL 和 CCK8 10 μL ,培养 1 h,在 490 nm 波长测定吸光度 A 。计算细胞增殖抑制率(IR)。

$$\text{IR} = [1 - (A_{\text{GPS组}}/A_{\text{空白组}})] \times 100\%$$

2.3 细胞形态变化观察 取对数生长期细胞,根据 CCK8 结果,在两个细胞系分别设 GPS(40 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组和空白(不加药)组,分别培养 24,48,72 h,倒置显微镜下观察两种人肝癌细胞的形态变化。

2.4 透射电镜观察人肝癌细胞 BEL-7402 和 HepG2 形态 取对数生长期细胞,根据 CCK8 结果,在两个细胞系分别设 GPS(80 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组,加入相应药物,同时设空白(不加药)组,分别培养 24,48,72 h,胰酶消化收集细胞,离心,弃上清液,洗涤,加戊二醛电镜固定液固定 4 h 以上,送至电镜室切片观察。

2.5 免疫印迹法(Western blot)检测人肝癌细胞 BEL-7402 和 HepG2 中 TNFR1 相对蛋白表达水平 取对数生长期细胞,根据 CCK8 结果,在两个细胞系分别设 GPS(40,60,80 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组,另设空白组。分别培养 48 h,消化,收集细胞,加入细胞裂解液 100 μL 冰上裂解 30 min,离心取上清进行蛋白定量,绘

制标准曲线, 计算蛋白浓度, 蛋白变性, 上样, 电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 洗膜, 加一抗 (1:500) 4 ℃ 过夜, 洗膜, 滴加二抗 (1:5 000) 室温孵育 2 h, 进行 ECL 发光, 显影, 定影, 图像条带分析用 Photoshop 软件。以目的蛋白条带/ β -actin 条带表示蛋白相对表达量。

2.6 统计方法 采用 SPSS 16.0 软件, 计量数据以

$\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较采用 t 检验和方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 人参多糖注射液对人肝癌细胞 BEL-7402 和 HepG2 增殖的影响

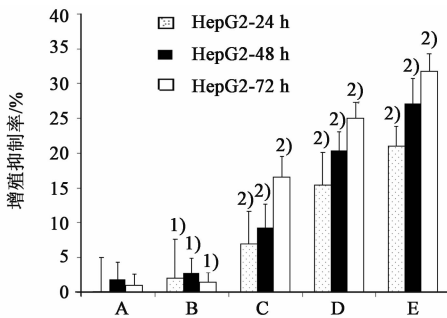
与空白组比较, GPS 各质量浓度组 HepG2, BEL-7402 细胞增殖抑制率均明显上升 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1, 图 1, 2。

表 1 人参多糖注射液对人肝癌细胞 HepG2, BEL-7402 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of GPS on proliferation of BEL-7402 and HpeG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	HepG2			BEL-7402			
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	
空白	-	1.198 ± 0.034	1.273 ± 0.027	1.398 ± 0.180	0.817 ± 0.050	0.90 ± 0.033	1.117 ± 0.039
GPS	20	1.098 ± 0.046	1.063 ± 0.034	1.373 ± 0.037	0.723 ± 0.012	0.892 ± 0.019	0.963 ± 0.029
	40	1.076 ± 0.05 ¹⁾	1.056 ± 0.015 ¹⁾	1.359 ± 0.038 ¹⁾	0.705 ± 0.02 ¹⁾	0.846 ± 0.027 ¹⁾	0.910 ± 0.022 ¹⁾
	60	1.023 ± 0.05 ²⁾	0.896 ± 0.032 ²⁾	1.269 ± 0.035 ²⁾	0.610 ± 0.042 ²⁾	0.698 ± 0.033 ²⁾	0.796 ± 0.012 ²⁾
	80	0.796 ± 0.021 ²⁾	0.690 ± 0.012 ²⁾	0.954 ± 0.034 ²⁾	0.509 ± 0.041 ²⁾	0.569 ± 0.022 ²⁾	0.649 ± 0.023 ²⁾
	100	0.685 ± 0.04 ²⁾	0.671 ± 0.022 ²⁾	0.865 ± 0.015 ²⁾	0.467 ± 0.042 ²⁾	0.541 ± 0.021 ²⁾	0.527 ± 0.026 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。



A ~ E. 20, 40, 60, 80, 100 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 (图 2 同)

图 1 人参多糖注射液对人肝癌细胞 HepG2 增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of GPS on proliferative inhibition rate of HpeG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

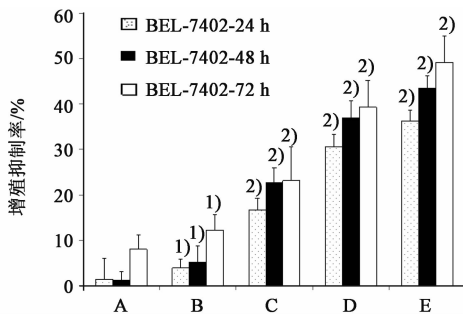


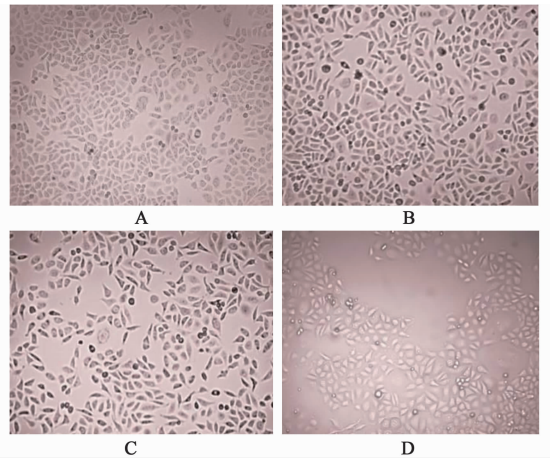
图 2 人参多糖注射液对人肝癌细胞 BEL-7402 增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of GPS on proliferative inhibition rate of BEL-7402 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 人参多糖注射液对人肝癌细胞 BEL-7402 和 HepG2 形态的影响

3.2.1 倒置显微镜观察细胞形态

随着药物作用时间的增加细胞数量逐渐下降, 坏死及凋亡细胞增多, 死亡细胞及细胞碎片漂浮在培养液中, 贴壁细胞形态不完整、皱缩、变形, 胞浆透明度下降, 细胞核固缩、裂解成质膜包裹的碎片, 表现为死亡细胞的形态变化; 空白组细胞数目较 GPS 组多, 细胞形态规整, 细胞饱满、膜光滑、有完整的细胞核。见图 3, 4。



A. 空白组; B ~ D. GPS (40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 组处理 24, 48, 72 h (图 4 同)

图 3 人参多糖注射液对各组 HepG2 细胞形态变化的影响 (倒置显微镜, $\times 100$)

Fig. 3 Effects of GPS on morphological changes of HepG2 cells in each group (inverted microscope, $\times 100$)

3.2.2 透射电镜观察细胞形态

人肝癌 BEL-7402 和 HpeG2 细胞在 GPS (80 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 24, 48, 72 h 后可见细胞体积缩小, 细胞膜完整, 绒毛消失, 细胞间连接变宽, 胞核固缩、边集、成块, 胞质浓缩、变深,

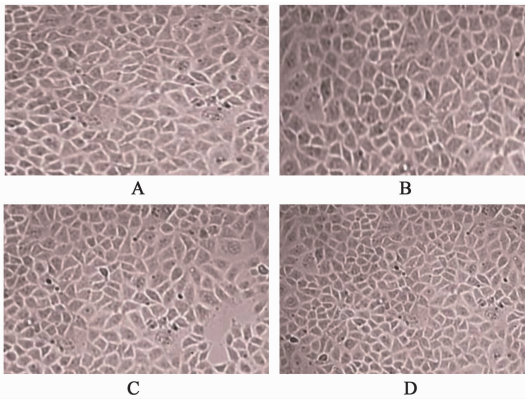
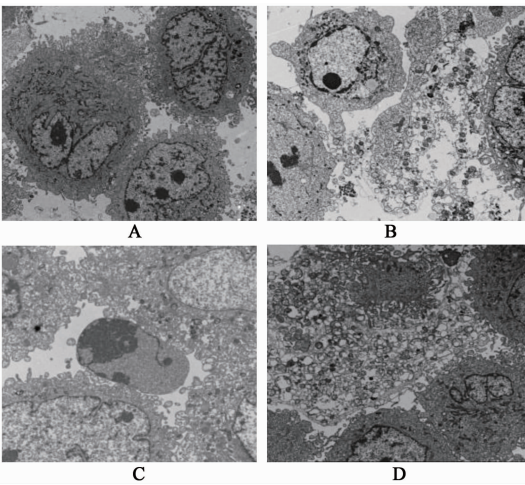


图 4 人参多糖注射液对 BEL-7402 各组细胞形态变化的影响(倒置显微镜, ×100)

Fig. 4 Effects of GPS on morphological changes of BEL-7402 cells in each group (inverted microscope, ×100)

线粒体未见明显肿胀,可见凋亡小体形成,后期可见坏死细胞,包膜、核膜不完整、细胞破裂、空泡等变化。见图 5,6。



A. 空白组; B~D. GPS (80 g·L⁻¹) 组处理 24, 48, 72 h (图 6 同)

图 5 人参多糖注射液对 HepG2 各组细胞形态变化的影响(透射电镜, ×11 000)

Fig. 5 Effects of GPS on morphological changes of HepG2 cells in each group (TEM, ×11 000)

3.3 人参多糖注射液对人肝癌细胞 BEL-7402 和 HepG2 中 TNFR1 蛋白表达的影响 与空白组比较, 人肝癌 BEL-7402, HepG2 细胞不同 GPS 组 TNFR1 蛋白相对表达量均明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 7。

4 讨论

肝细胞癌致死率已经跃居第 2 位,且全球每年新发恶性肿瘤病例肝癌人数高达 5 百万例^[10]。从治疗角度看,手术切除是治疗的关键,但切除率不到 20%;或经肝动脉栓塞化疗,局部消融和放疗等,总体疗效较差^[11]。目前肝癌的药物治

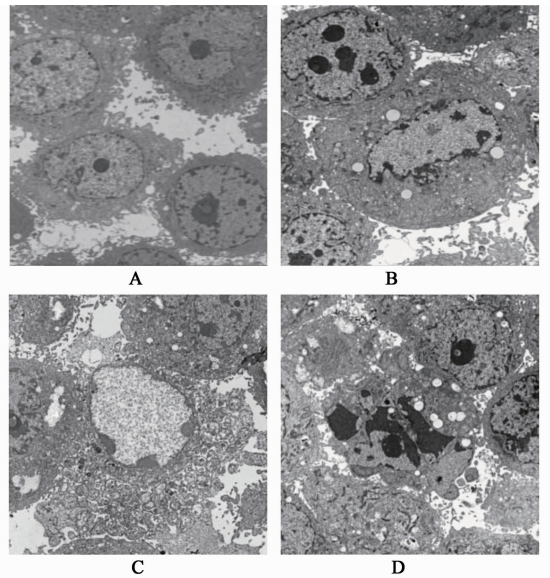
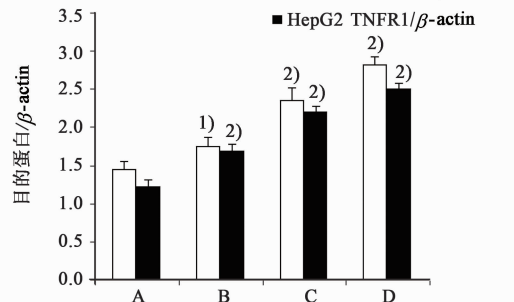
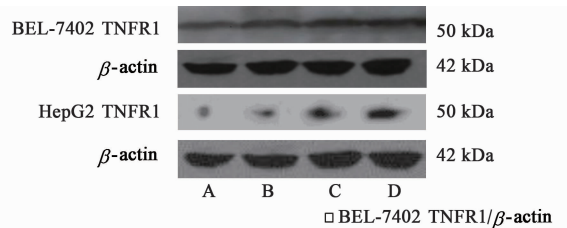


图 6 人参多糖注射液对 BEL-7402 各组细胞形态变化的影响(透射电镜, ×13 000)

Fig. 6 Effects of GPS on morphological changes of HepG2 cells in each group (TEM, ×13 000)



A. 空白组; B~D. GPS (40, 60, 80 g·L⁻¹) 组。与相应空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

图 7 人参多糖注射液对人肝癌细胞 BEL-7402, HepG2 中 TNFR1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effects of GPS on protein expressions of TNFR1 in BEL-7402 and HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

年存活率低,药物毒性高等局限性^[12]。因此,寻找延长 5 年存活率、低毒的抑制肿瘤生长的药物已经成为肝癌研究的方向之一。

研究表明多糖具有广泛的药理活性,如抗肿瘤、抗病毒、抗衰老、抗炎等^[13-14]。其中,研究认为其抗肿瘤作用的机制为诱导肿瘤细胞凋亡和分化、改变肿瘤细胞膜成分、影响核酸和蛋白质的合成等^[15],

中药多糖是中药的主要活性成分之一,在抗肿瘤作用方面有较多相关报道^[16-18]。GPS 作为人参的活性成分之一,有直接及间接的抗肿瘤作用^[17-18]。大量实验证明 GPS 抑制肿瘤生长的机制为诱导细胞凋亡及细胞周期阻滞^[5-9]。

本研究表明人参多糖注射液对人肝癌细胞 BEL-7402, HepG2 的增殖都有明显的抑制作用,在一定的浓度范围内,增殖抑制作用呈浓度及时间依赖关系。通过透射电镜观察到人参多糖注射液作用后的人肝癌细胞 BEL-7402, HepG2 出现凋亡的形态变化。细胞凋亡通常有线粒体凋亡途径及死亡受体凋亡途径, TNFR1 是一种死亡受体,参与死亡受体诱导的细胞凋亡,其可以诱导 TNF 毒性,即形成死亡诱导信号复合物(DISC), DISC 可进一步活化半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-8,活化的 Caspase-8 直接作用于下游的蛋白酶 Caspase-3,最终形成凋亡小体,导致细胞凋亡^[19-20]。本研究证实 GPS 组两种肝癌细胞中 TNFR1 蛋白相对表达量明显高于空白组,由此推测人参多糖注射液可通过上调死亡受体 TNFR1 的表达而诱导两种肝癌细胞凋亡,从而发挥抑制肿瘤生长的作用。证实诱导凋亡可能是人参多糖注射液对人肝癌细胞 BEL-7402, HepG2 的增殖抑制作用的机制,但具体机制有待进一步研究。

[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,2015:8-9.

[2] 杨武韬. 人参的化学成分和药理研究进展[J]. 中国医药指南,2014,13(2):33.

[3] 李珊珊,金银萍,姚春林,等. 人参多糖的结构与活性研究进展[J]. 中国中药杂志,2014,39(24):4709-4715.

[4] Oh H A, Kim D E, Choi H J, et al. Anti-fatigue effects of 20(S)-protopanaxadiol and 20(S)-protopanaxatriol in mice[J]. Biol Pharm Bull, 2015, 38(9):1415-1419.

[5] 魏强,李静,刘艺,等. MAPK 信号转导通路在人参多糖诱导白血病 K562 细胞凋亡中的作用[J]. 中草药,2013,44(2):193-198.

[6] 文娟,高鹏,王大海. 人参多糖与他莫昔芬联合对人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的影响及其机制研究[J]. 癌变·畸变·突变,2013,25(4):280-284.

[7] 范家铭,刘泽洪,李静,等. 人参多糖介导 Wnt/ β -catenin 信号转导诱导人鼻咽癌细胞 CNE-2 的凋亡[J]. 中国中药杂志,2013,38(19):3332-3337.

[8] Park E, Hwang I, Song J Y, et al. Acidic polysaccharide

of *Panax ginseng* as a defense against small intestinal damage by whole-body gamma irradiation of mice[J]. Acta Histochem, 2011, 113(1):19-23.

[9] Li C, Tian Z N, Cai J P, et al. *Panax ginseng* polysaccharide induces apoptosis by targeting Twist/AKR1C2/NF- κ B pathway in human gastric cancer[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 102(1):103-109.

[10] Tanaka S, Arii S. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma[J]. Semin Oncol, 2012, 39(4):486-492.

[11] Lin S, Hoffmann K, Schemmer P. Treatment of hepatocellular carcinoma; a systematic review[J]. Liver Cancer, 2012, 1(3):144-158.

[12] Stotz M, Gerger A, Haybaeck J, et al. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma: past, present and future[J]. Anti-cancer Res, 2015, 35(11):5737-5744.

[13] Zhang J, Li C Y, Li J P, et al. Immunoregulation on mice of low immunity and effects on five kinds of human cancer cells of *Panax japonicus* polysaccharide[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2015(12):243-246.

[14] Chung I M, Kim Y O, Ali M, et al. Triterpene glycosides from red ginseng marc and their anti-inflammatory activities[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24(17):4203-4208.

[15] 邓雪玉. 中药多糖抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国现代药物应用, 2011, 5(20):119-121.

[16] Chen C, Wu W, Xu X, et al. Chain conformation and anti-tumor activity of derivatives of polysaccharide from rhizoma panacis japonici[J]. Carbohydr Polym, 2014, 105(1):308-316.

[17] Cheng H, Li S, Fan Y, et al. Comparative studies of the antiproliferative effects of ginseng polysaccharides on HT-29 human col-on cancer cells[J]. Med Oncol, 2011, 28(1):175-181.

[18] Wang J, Zuo G, Li J, et al. Induction of tumoricidal activity in mouse peritoneal macrophages by ginseng polysaccharide[J]. Int J Biol Macromol, 2010, 46(4):389-395.

[19] Zhang C, Wang C, Tang S, et al. TNFR1/TNF- α and mitochondria interrelated signaling pathway mediates quinocetone-induced apoptosis in HepG2 cells[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 62:825-838.

[20] Gao Z, Kang X, Hu J, et al. Induction of apoptosis with mitochondrial membrane depolarization by a glycyrrhetic acid deriv-ative in human leukemia K562 cells[J]. Cytotechnology, 2012, 64(4):421-428.

[责任编辑 张丰丰]