

# 华蟾素注射液对人肝癌 HepG-2 细胞增殖 及 P-YAP 蛋白表达的影响

田莉莉, 候力, 高山, 崔晓楠\*

(大连医科大学第一附属医院肿瘤科, 辽宁 大连 116011)

**[摘要]** 目的:探讨华蟾素注射液对人肝癌 HepG-2 细胞增殖及磷酸化 YAP 蛋白(P-YAP)表达的影响。方法:将实验分为对照组,华蟾素注射液 0.105,0.21,0.42 mg·L<sup>-1</sup>组;采用 CCK8 观察华蟾素注射液对 HepG-2 细胞增殖的影响;采用流式细胞术检测华蟾素注射液对 HepG-2 细胞凋亡及周期的影响;采用蛋白免疫印迹法(Western blot 法)观察华蟾素注射液对 HepG-2 细胞中 P-YAP 蛋白表达的影响。结果:华蟾素注射液能抑制 HepG-2 细胞增殖,促进凋亡,且呈时间和剂量依赖性( $P < 0.05$ );阻滞 HepG-2 细胞于 S 期,呈剂量依赖性。药物作用 1 h,P-YAP 蛋白表达上调,呈剂量依赖性( $P < 0.05$ );药物作用 12 h,P-YAP 蛋白的表达无明显变化,与对照组无显著差异;药物作用 24 h,P-YAP 蛋白表达下调( $P < 0.05$ ),呈剂量依赖性。结论:华蟾素注射液能抑制人肝癌 HepG-2 细胞增殖,上调 P-YAP 蛋白表达可能是华蟾素注射液早期抗肝癌药效机制之一。

**[关键词]** 华蟾素注射液; HepG-2 细胞; 增殖; 凋亡; 磷酸化 YAP 蛋白

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0153-04

**[doi]** 10.11653/syfy2014010153

## Effects of Cinobufacini Injections on Proliferation and P-YAP Expression of Hepatocarcinoma HepG-2 Cells

TIAN Li-li, HOU Li, GAO Shan, CUI Xiao-nan\*

(Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of Cinobufacini injections on the proliferation and protein phosphorylation, YAP (P-YAP) expression of hepatocarcinoma HepG-2 cells (HHC). **Method:** Cell proliferation was assessed by cell counting kit-8 (CCK8) assay. Cell apoptosis and cycles were shown through flow cytometry method (FCM). The expressions of P-YAP protein were analyzed by Western blot. **Result:** Cinobufacini injections significantly inhibited HepG-2 cell proliferation, promoted apoptosis ( $P < 0.05$ ) in dose- and time-dependent ways, blocked cycles at the S-phase in a dose-dependent way; increased the expression of P-YAP in a dose-dependent way after 1 h ( $P < 0.05$ ), had no significant influence on the expression of P-YAP after 12 h, decreased the expression of P-YAP in a dose-dependent way after 24 h ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Cinobufacini injections can inhibit proliferation, increased P-YAP expression may be one of its anti-tumor mechanisms.

**[Key words]** Cinobufacini injections; HepG-2 cells; proliferation; apoptosis; P-YAP

**[收稿日期]** 20130510(011)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81173615);高等学校博士学科点专项基金,新教师类基金(20102105120002,2010210512000);第 45 批教育部留学回国人员科研启动基金课题

**[第一作者]** 田莉莉,硕士研究生,从事肿瘤淋巴道转移方面的研究;中药抗肿瘤药效基础研究,Tel:18741136996,E-mail:Tiansinuo1986@126.com

**[通讯作者]** \*崔晓楠,教授,博士生导师,从事肿瘤淋巴道转移方面的研究;中药抗肿瘤药效基础研究,Tel:0411-83635963-3209,E-mail:cxn23@sina.com

肝癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,发病率呈逐渐上升趋势,死亡率亦居高不下。肝癌对化疗不敏感,有效率不超过 20%<sup>[1]</sup>;靶向药物如索拉非尼的问世也未能明显改善肝癌的治疗现状<sup>[2]</sup>。在探讨抗肝癌药物历程中,华蟾素注射液以其多靶位的抗肝癌机制及显著的免疫提升功能<sup>[3]</sup>,受到前所未有的关注,抗肝癌机制正在探讨中。Hippo-YAP 信号通路在调控细胞生长、凋亡及组织器官大小方面起重要作用<sup>[4-5]</sup>。YAP 是 Hippo-YAP 信号通路下游的效应子,其异常表达与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[6-8]</sup>,YAP 的致癌性与其磷酸化水平有关,P-YAP 能够抑制细胞增殖,促进细胞凋亡<sup>[9-10]</sup>。目前有关华蟾素注射液对 YAP 的影响尚未见报道。本实验观察了华蟾素注射液对人肝癌 HepG-2 细胞增殖及磷酸化 YAP 蛋白(P-YAP)的影响,探讨华蟾素注射液抗肝癌的可能作用机制。

## 1 材料

**1.1 细胞株** HepG-2 细胞株由大连医科大学附属第一医院中心实验室提供。

**1.2 药品与试剂** 华蟾素注射液(含量以其主要成分吲哚生物碱为标量测定,于使用前用培养液稀释至所需浓度,安徽金蟾生化股份有限公司,批号 100265-1),细胞计数试剂-8(CCK8,日本同仁公司),流式 Annexin V/PI 双染色法试剂盒(凯基生物有限公司),兔抗人 YAP 多克隆抗体(sc-13059,CST 公司),辣根酶标记山羊抗兔 IgG II 抗体(河北博海生物工程有限公司),十二烷基硫酸钠、四甲基乙二胺、丙烯酰胺和亚甲双丙烯酰胺(美国 Sigma 公司),甘氨酸(上海生工生物工程技术有限公司)。

**1.3 仪器** 流式细胞仪(Becton Dickinson 公司 FACs),层流超净工作台(Forma Scientific 公司),三蒸水蒸馏器(上海本波仪器有限公司),凝胶成像分析系统(UVP 公司 GD8000),Thermo 高速低温离心机(Sigma 公司),稳压稳流型电泳仪(北京六一仪器厂),SP-2102UV 型紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司),HH W21600 型电热恒温水浴箱(上海)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 将 HepG-2 细胞接种于含 10% 新生牛血清的低糖 IMDM 培养液中,置于 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 饱和湿度的孵箱中培养,细胞状态达到对数生长期时用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代培养。

**2.2 HepG-2 细胞增殖检测** 将处于对数生长期细胞接种于 96 孔板,每孔 100 μL,控制细胞密度为

$6 \times 10^3$  个/孔,5% CO<sub>2</sub>,37 °C 温箱孵育至细胞单层铺满孔底,去原培养液,设华蟾素注射液(0.42, 0.21,0.105,0.053,0.026 mg·L<sup>-1</sup>)、阳性对照组(5-Fu)和空白对照组,每组设 5 个复孔。5% CO<sub>2</sub>,37 °C 温箱孵育 12,24,48 h,倒置显微镜下观察细胞形态变化。在每个时点结束后每孔加入 10 μL CCK8,继续孵育 2~3 h 后在酶联免疫检测仪 450 nm 波长处测定各孔吸光度(A),计算抑制率。根据量效曲线计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。实验重复 3 次。

$$\text{抑制率} = (1 - A_{\text{试验组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

**2.3 肿瘤细胞的凋亡检测** 将密度为  $5 \times 10^8$  个/L 对数生长期细胞均匀接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶内,设药物组华蟾素注射液(0.42,0.21,0.105 mg·L<sup>-1</sup>)和空白对照组。分别作用 24,48 h 后收集细胞,用预冷的 PBS 洗 2 遍,1 × Binding buffer 调整细胞至  $1 \times 10^9$  个/L,余按试剂盒说明书操作,在流式细胞仪(FCM)上对细胞凋亡及死亡进行荧光检测和分析。实验重复 3 次。

**2.4 细胞周期分析** 将密度为  $5 \times 10^8$  个/L 对数生长期细胞均匀接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶内,设药物组华蟾素注射液(0.42,0.21,0.105 mg·L<sup>-1</sup>)和空白对照组。作用 24 h 收集细胞,0.25% 胰蛋白酶消化,560 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,弃上清液,冷 PBS 洗 2 次,重悬于 70% 冷乙醇中,充分混匀,4 °C 固定过夜。加入 25 μL RNaseA,置 37 °C 30 min,再加入 25 μL PI 染料,4 °C 避光静置 30 min,在流式细胞仪上进行周期分析。实验重复 3 次。

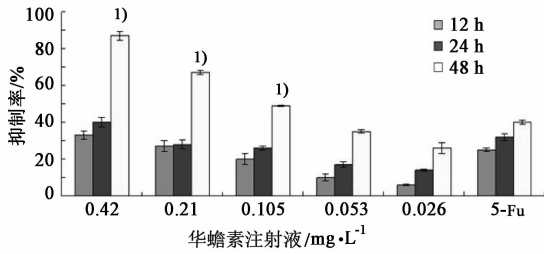
**2.5 P-YAP 蛋白的表达检测** 用 Western blot 法。细胞接种及分组、剂量同 2.4。作用 1,12,24 h 后收集细胞,常规方法提取总蛋白,蛋白样品采用 Bradford 法测定总蛋白含量。SDS-PAGE 电泳,8% 分离胶,每孔上样 50 μg,电泳完毕后经电转移至 PVDF 膜上,室温封闭 1 h。按适当比例加入一抗 4 °C 摇床过夜,PBST 洗膜 3 次,用辣根酶标记的抗体(1:10 000)PBST 溶液 37 °C 孵育 1 h,PBST 溶液洗膜 3 次。最后进行 ECL 试剂反应显色,X 射线胶片曝光 1~5 min 后显影,胶片晾干、扫描、照相,并用 Image-J 软件的图像分析仪分析结果以  $A_{\text{p-YAP}}/A_{\beta\text{-actin}}$  表示。实验重复 3 次。

**2.6 统计学方法** 采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间数据分析采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对 HepG-2 细胞增殖的影响** 随着药物质量

浓度增加,作用时间延长,药物对 HepG-2 细胞增殖抑制率增加,呈剂量和时间依赖性;12,24,48 h 的华蟾素注射液  $IC_{50}$  分别为  $(0.86 \pm 0.03)$ ,  $(0.08 \pm 0.01)$ ,  $(0.04 \pm 0.06) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。0.21  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  华蟾素注射液在 12,24 h 效果与 5-Fu ( $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组差异不明显,在 48 h 效果优于 5-Fu 组 ( $P < 0.05$ ),华蟾素注射液 0.105,0.21,0.42  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  在 48 h 效果显著优于 5-Fu 组 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。



与 5-Fu 组比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$

图 1 华蟾素注射液对 HepG-2 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

**3.2 对 HepG-2 细胞凋亡的影响** 华蟾素注射液 0.42,0.21,0.105  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,作用 HepG-2 细胞 24 h 凋亡率分别为  $(35.35 \pm 1.87)\%$ ,  $(27.52 \pm 1.22)\%$ ,  $(17.51 \pm 1.03)\%$ ,作用 48 h 凋亡率分别为  $(67.87 \pm 1.49)\%$ ,  $(59.22 \pm 2.65)\%$ ,  $(37.02 \pm 1.58)\%$ ,均显著高于对照组  $(1.25 \pm 0.53)\%$  ( $P < 0.05$ ),呈剂量和时间依赖性(图 2)。

**3.3 对 HepG-2 细胞周期的影响** 华蟾素注射液 0.42,0.21,0.105  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组肿瘤细胞 S 期分布比例分别为  $(42.66 \pm 1.12)\%$ ,  $(31.46 \pm 0.98)\%$ ,  $(24.85 \pm 0.85)\%$ ,显著高于对照组  $(19.16 \pm 0.76)\%$  ( $P < 0.05$ ),呈剂量依赖性(图 3)。

**3.4 对 HepG-2 细胞 P-YAP 蛋白表达的影响** 华蟾素注射液 (0.42,0.21,0.105,0.053  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作用 HepG-2 细胞 1 h,  $A_{P-YAP}/A_{\beta\text{-actin}}$  分别为  $(0.88 \pm 0.051)$ ,  $(0.784 \pm 0.042)$ ,  $(0.423 \pm 0.035)$ ,  $(0.356 \pm 0.025)$ ,明显高于对照组  $(0.313 \pm 0.037)$  ( $P < 0.05$ ),随着华蟾素注射液质量浓度的增高,P-YAP 蛋白表达增加,呈剂量依赖性;药物作用 12 h  $A_{P-YAP}/A_{\beta\text{-actin}}$  分别为  $(1.182 \pm 0.048)$ ,  $(1.187 \pm 0.032)$ ,  $(1.178 \pm 0.031)$ ,  $(1.185 \pm 0.038)$  与对照组  $(1.201 \pm 0.024)$ ,无明显差异;药物作用 24 h,  $A_{P-YAP}/A_{\beta\text{-actin}}$  比值分别为  $(0.647 \pm 0.027)$ ,  $(0.832 \pm 0.042)$ ,  $(0.954 \pm 0.041)$ ,  $(1.078 \pm 0.053)$  明显低于对照组  $(1.115 \pm 0.039)$  ( $P < 0.05$ ),随着华蟾素注射液浓度的增高,P-YAP 蛋白表达降低,呈剂量依赖性(图 4~6)。

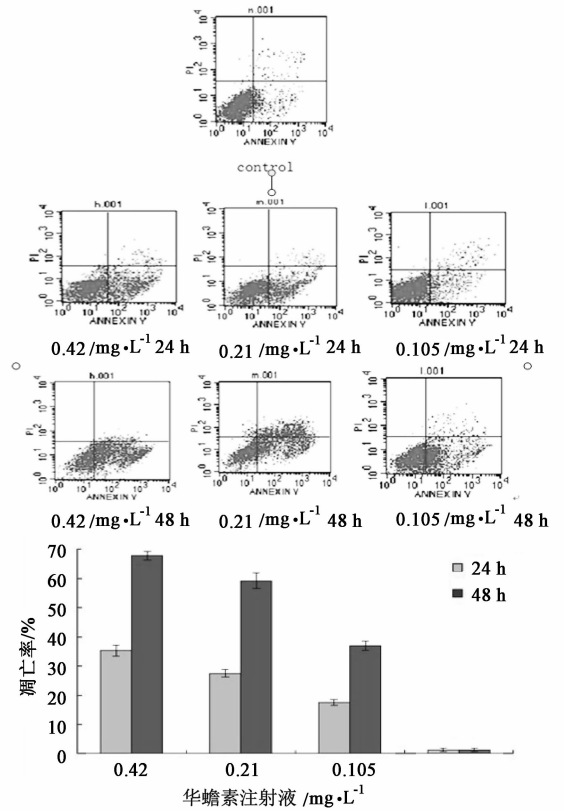


图 2 华蟾素注射液作用 24,48 h HepG-2 细胞细胞凋亡情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

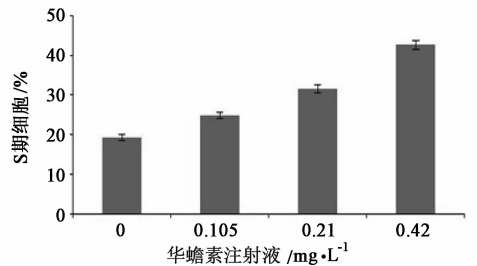
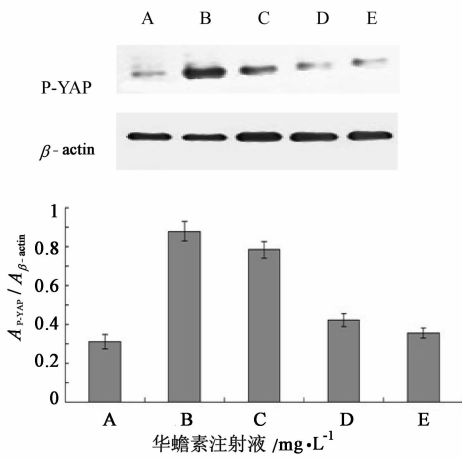


图 3 华蟾素注射液作用 24 h HepG-2 细胞周期分布 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 4 讨论

增殖和凋亡实验结果显示华蟾素注射液能明显抑制肿瘤细胞增殖,促进细胞凋亡。华蟾素注射液作用 HepG-2 细胞 1 h,能明显增强 YAP 蛋白磷酸化水平,且随着药物质量浓度升高,磷酸化水平逐渐增强。可能是由于 P-YAP 蛋白表达增多,导致胞浆内 P-YAP 增多,入核的 P-YAP 减少,从而发挥抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的抗肿瘤作用。随着药物作用时间延长 YAP 蛋白磷酸化水平逐渐减弱,24 h 后甚至出现 YAP 蛋白磷酸化水平下调,但是并没有影响华蟾素注射液抗肿瘤效果。因此笔者分析在药物作用早期阶段,华蟾素注射液可能通过增强 P-YAP



A. 对照组; B ~ E. 华蟾素注射液 0.42, 0.21, 0.105, 0.053  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组 (图 4 ~ 6 同)

图 4 华蟾素注射液作用 1 h 后

HepG-2 细胞 P-YAP 蛋白水平表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

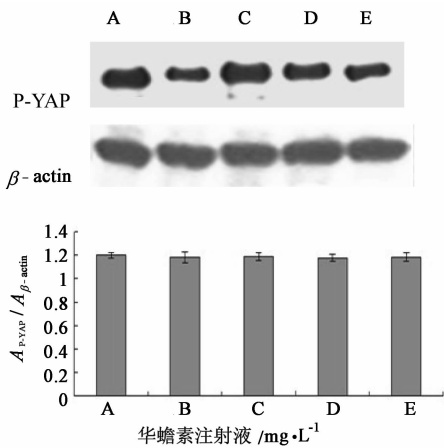


图 5 华蟾素注射液作用 12 h 后

HepG-2 细胞 P-YAP 蛋白水平表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

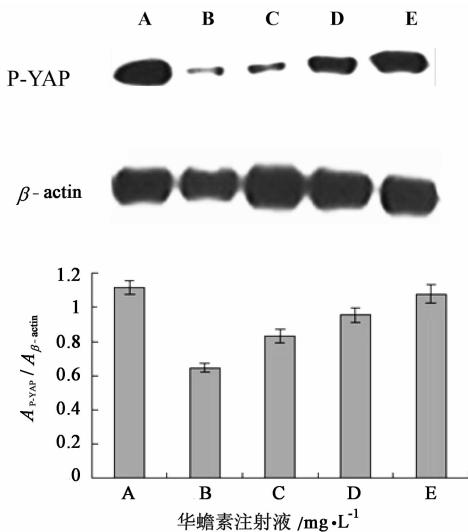


图 6 华蟾素注射液作用 24 h 后

HepG-2 细胞 P-YAP 蛋白水平表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

蛋白磷酸化水平发挥抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的抗肿瘤作用,随着药物作用时间延长,华蟾素注射液可能通过其他靶点或通路抑制肿瘤细胞增殖,促进细胞凋亡。本研究首次揭示增强 YAP 蛋白磷酸化水平是华蟾素注射液早期抗肝癌的作用机制之一,其具体机制有待进一步研究。由于华蟾素注射液显著的免疫提升功能,多靶点的抗肿瘤作用,使它明显优于很多一线抗肿瘤化疗药物,具有较好的前景。

[参考文献]

- [1] Brustmann H, Naude S. Expression of topoisomerase II alpha, Ki-67 proliferating cell nuclear antigen, p53, and argyrophilic nucleolar organizer regions in vulvar squamous lesions [J]. Gynecol Oncol, 2002, 86 (2):192.
- [2] Llovet J M, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma [J]. N Engl J Med, 2008, 359(4):378.
- [3] Nakopoulou L, Lazaris A C, Kavantzias N, et al. DNA topoisomerase II -alpha immunoreactivity as a marker of tumor aggressiveness in invasive breast cancer [J]. Pathobiology, 2000, 68(3):137.
- [4] 许传铭, 万福生. 哺乳动物 Hippo 信号通路:肿瘤治疗的新靶点 [J]. Hereditas (Beijing), 2012, 34 (3):269.
- [5] Zhao B, Lei Q Y, Guan K L. The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer [J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(6):638.
- [6] 谢水玲, 沈建箴. Hippo 通路在肿瘤发生中的研究进展 [J]. 医学综述, 2012, 18(8):1164.
- [7] Camargo F D, Gokhale S, Johnnidis J B, et al. YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells [J]. Curr Biol, 2007, 17(23):2054.
- [8] 达春丽, 辛彦, 赵晶, 等. 胃癌及其癌前病变组织 Yes 相关蛋白和 Survivin 的表达及其意义 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(6):406.
- [9] 陈志山, 杨昌毅. Yes 相关蛋白在结直肠癌中的表达及意义 [J]. 中国医师进修杂志, 2013(5):11.
- [10] Da C L, Xin Y, Zhao J, et al. Significance and relationship between Yes-associated protein and survivin expression in gastric carcinoma and precancerous lesions [J]. World J Gastroenterol, 2009, 32(15):4055.

[责任编辑 李玉洁]