

八角中莽草酸对人肝癌 HepG-2 细胞增殖 及 NF- κ B 蛋白表达的影响

朱开梅, 顾生玫*, 顾小文, 骆彩珍
(桂林医学院, 广西 桂林 541004)

[摘要] **目的:**探讨八角中莽草酸对人肝癌细胞 HepG-2 细胞增殖及其核因子- κ B (NF- κ B) p65 蛋白表达的影响。**方法:**用不同浓度的莽草酸处理 HepG-2 细胞, MTT 法测定莽草酸对 HepG-2 细胞的生长抑制率; 倒置显微镜下观察莽草酸作用 HepG-2 细胞后的形态学变化; 采用 hoechst33342 荧光染色观察莽草酸作用于人肝癌 HepG-2 细胞 48 h 后细胞凋亡形态变化。Western blot 试验观察莽草酸对人肝癌 HepG-2 细胞 NF- κ B (p65) 蛋白表达的影响。**结果:**MTT 实验结果表明, 莽草酸对人肝癌 HepG-2 细胞的生长抑制作用呈现时间依赖性和剂量依赖性; 倒置显微镜下观察细胞形态可以发现, 经莽草酸处理 48 h 后的各组细胞中, 可观察到随着药物浓度的增加, 细胞凋亡形态变化越来越明显, 细胞数量逐渐变少。荧光染色观察随着药物浓度增加, 凋亡细胞增多且明显, 当莽草酸质量浓度达 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 出现较多的凋亡小体。NF- κ B (p65) 蛋白的表达随莽草酸浓度升高而显著下降。**结论:**莽草酸对人肝癌细胞 HepG-2 有较显著的生长抑制作用, 莽草酸对人肝癌 HepG-2 细胞表达 NF- κ B (p65) 明显减弱, 其诱导人肝癌 HepG-2 细胞凋亡作用机制可能下调 NF- κ B 表达水平有关。

[关键词] 莽草酸; 人肝癌 HepG-2; 细胞增殖; 核因子- κ B

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0126-04

[doi] 10.11653/syfj2014010126

Influence of Shikimic Acid on Proliferation and Expression of Nuclear Factor- κ B in Human Hepatoma HepG2 Cells

ZHU Kai-mei, GU Sheng-jiu*, GU Xiao-wen, LUO Cai-zhen
(Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

[收稿日期] 20130507(007)

[基金项目] 广西科技攻关项目(129825-21); 广西教育厅项目(201202ZD065); 桂林市科技攻关项目(20110106-5, 20120105-5, 20120105-16, 20120105-8)

[第一作者] 朱开梅, 硕士, 教授, 硕士生导师, 从事天然药物分析的研究工作, Tel: 0773-5899602, E-mail: glzkm@163.com

[通讯作者] *顾生玫, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事心血管病理学及药物防治研究工作, Tel: 0773-2295148, E-mail: gushengjiu@163.com

- [2] 石欣, 宿士智, 高乃荣. 急性坏死性胰腺炎时 P 物质在肠壁的表达及与肠黏膜通透性之间的关系[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(8): 452.
- [3] 张庆光, 张雷, 李贤珍. 兔创伤应激与胆汁流量及胆囊收缩素、胃泌素、促胰液素分泌的关系[J]. 中华急诊医学杂志, 2006, 15(5): 419.
- [4] 蔡光先, 卜献春. 四磨汤治疗功能性消化不良肝脾不和证的疗效及对血浆 P 物质、胃动素的影响[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(6): 856.
- [5] 蔺晓源, 蔡莹, 谢勇, 等. 四磨汤口服液对束缚-寒冷应激小鼠胃肠功能和胃泌素的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(6): 19.
- [6] 孟宪镛. 功能性胃肠病和胃肠动力病的诊治新概念[J]. 胃肠病学, 2004, 9(1): 60.
- [7] 王伯军, 丁勇, 马微波, 等. 胃肠专科门诊病人情绪障碍的研究[J]. 中国医师进修杂志, 2006, 29(1): 34.
- [8] 王艳. 浅谈胃肠道激素[J]. 生物学通报, 2007, 42(3): 23.
- [9] 隋红, 陈卫, 陆杰. 5-羟色胺对大鼠膈下迷走神经传入放电的影响及机制[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(17): 1706.
- [10] 钱锋, 卜平. 痛泻要方干预大鼠肠易激综合征肝郁脾虚证的作用及机制[J]. 苏州大学学报: 医学版, 2010, 30(6): 1179.

[责任编辑 聂淑琴]

[Abstract] Objective: To investigate the effects of shikimic acid from *Illicium verum* on controlling hepatoma carcinoma HepG-2 cell proliferation and expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65. **Method:** The growth inhibition rate of hepatoma carcinoma cell line HepG-2 was determined with MTT methods by different concentration of shikimic acid which effected the tumor cells for 24, 48, 72 h. The liver tumor cell morphology which was impacted by different concentration of shikimic acid was observed in the inverted microscope. Apoptotic cell were detected by immunofluorescence techniques with Hoechst33342 staining after different concentrations of shikimic acid affecting 48 h. The western blot technique was used to observe the effects of hepatoma carcinoma HepG-2 cells of expression of NF- κ B (p65). **Result:** Growth inhibition of hepatoma carcinoma cell line HepG-2 treated with shikimic acid was worked out time dependence and dose dependence. By inverted microscope it could be found that among the group of cells treated with shikimic acid for 48 hour, with the increase of drug concentration, the morphology change of cell apoptosis became more and more obvious, and the number of tumor cells were less. It could be observed that with the increase of drug concentration, the number of apoptosis cells increased, and as the concentration of shikimic acid reached $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, more and more apoptosis body were found. NF- κ B (p65) protein expression with the shikimic acid concentration decreased significantly. **Conclusion:** Shikimic acid can markedly control the growth of hepatoma carcinoma cell, Shikimic acid treated hepatoma carcinoma HepG-2 cells, that down-regulated the expression levels of NF- κ B (p65) protein. The mechanism of apoptosis induced by hepatoma carcinoma HepG-2 cells may be related to down-regulate the expression levels of NF- κ B (p65).

[Key words] shikimic acid; hepatoma carcinoma cell line HepG-2; proliferation; NF- κ B

莽草酸(shikimic acid)是一种白色结晶粉末,化学名为3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-羧酸。主要存在于八角科植物八角茴香中,分布在我国的广西、广东、福建、云南、贵州等地区,其中广西产量最多,占我国总产量的85%以上^[1]。目前研究表明,莽草酸及其衍生物具有抗炎,抗病毒,抗血栓,抗肿瘤^[2-3]等作用,未见对人肝癌细胞 HepG-2 影响的报道。本文报道从八角中提取莽草酸,体外作用于人肝癌 HepG-2 细胞株生长及其诱导凋亡的影响,希望为临床上治疗肝癌提供试验资料和理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌 HepG-2 细胞株由桂林医学院科学实验中心惠赠。

1.2 试剂 八角、莽草酸对照品(中国药品生物制品检定所),乙醇(成都市科龙化工试剂厂),RPMI1640 培养基,0.25% 胰蛋白酶(均购自 Gibco 公司,美国),小牛血清(杭州,四季青),MTT[3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐,噻唑蓝](Sigma 公司),Hoechst33342 荧光染料(凯基生物工程材料有限公司)。

1.3 仪器 CO₂ 培养箱和 Bio-Tek 酶标仪 ELX-800 (Biotech, 美国),倒置荧光显微镜(Olympus, 日本),旋转蒸发仪(德国, Laborota 4000 efficient), BT224S 型电子天平, NJL07-3 型实验专用微波炉(南京杰全微波设备有限公司),UV-2550 紫外分光

光度计(日本岛津)。

2 方法

2.1 提取八角中的莽草酸 称取八角粉末 10 g,放入平底烧瓶中,按照料液比为 1:20 加入蒸馏水浸泡 30 min 后,采用微波功率为 400 W,微波温度为 65 °C 条件下萃取 10 min,微波处理结束后将提取液进行旋转蒸发浓缩,趁热过滤杂质,静置浓缩液,再进行三氯甲烷脱脂,得莽草酸浓缩液。最后采用硅胶柱层析法^[5],对莽草酸粗提物进行分离纯化,得莽草酸。采用分光光度法测量样品含量,得出含量为 98.1%。

2.2 细胞培养及处理 将人肝癌 HepG-2 细胞接种于含 10% 热灭活胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,在 37 °C 5% CO₂ 的培养箱中培养,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,每 2~3 d 传代 1 次。取对数生长期细胞进行试验。

2.3 细胞增殖抑制率检测 调整人肝癌 HepG-2 细胞密度为 4×10^4 /mL,加入 96 孔培养板内,每孔 100 μ L,再加入培养基 80 μ L。倒置显微镜观察细胞贴壁后,加入不同浓度的莽草酸 20 μ L,使其终质量浓度为 0.125, 0.25, 0.5, 1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,再置于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中分别培养 24, 48, 72 h。终止培养后每孔加入 20 μ L MTT 溶液,37 °C 培养箱中继续培养 4 h。弃掉上清液,用 PBS 冲洗 3 次后,加入 150 μ L DMSO,振荡,充分溶解结晶,用酶联免

疫检测仪测定 490 nm 处各孔的吸光度(A)。计算细胞抑制率。

$$\text{抑制率} = (\text{对照组 } A - \text{实验组 } A) / \text{对照组 } A \times 100\%$$

2.4 细胞形态学变化 调整人肝癌 HepG-2 细胞密度为 $4 \times 10^5/\text{mL}$, 加入 6 孔培养板内, 每孔 500 μL , 再加入培养基 1 300 μL 。倒置显微镜观察细胞贴壁后, 加入不同浓度的莽草酸 200 μL , 使其终质量浓度为 0.125, 0.5, 1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 再置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 饱和湿度的培养箱中分别培养 48 h。待培养 48 h 后, 终止培养, PBS 溶液冲洗 3 次, 每次 3 min, 更换新鲜培养基, 置于倒置显微镜下观察细胞贴壁生长情况以及细胞的形态变化。

2.5 凋亡细胞观察 取肝癌对数生长期细胞, 以每孔 $2 \times 10^5/\text{孔}$ 的密度接种于 6 孔培养板(6 孔培养板中预先放好经过高压灭菌处理的盖玻片), 24 h 后, 倒置显微镜观察细胞, 细胞爬片且生长状态良好时, 加入不同浓度的莽草酸 200 μL , 使其终质量浓度为 0.125, 0.5, 1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 再置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 饱和湿度的培养箱中分别培养 48 h。待培养 48 h 后终止培养, 吸尽培养液, PBS 溶液冲洗 3 次; 每孔加 4% 多聚甲醛 1 mL 后固定细胞 30 min; 除去固定液, PBS 溶液冲洗 3 次, 每次 3 min。每孔加入 Hoechst33342 染液 1 mL, 避光, 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。去染色液, 用 PBS 冲洗 3 遍, 每次 3 min, 吸净液体。将细胞爬片贴于载玻片上, 尽量避免气泡, 于倒置荧光显微镜下观察细胞核形态(注意观察时避光, 防止荧光猝灭)。实验重复 3 次。

2.6 NK- κ B 表达检测 取对数生长期细胞, 用 0.25% 胰酶消化后接种于 50 mL 培养瓶中, 24 h 细胞贴壁后换培养基, 分药物组和对照组, 药物组加入质量浓度为 0.125, 0.25, 0.5, 1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 含药培养基, 对照组加等体积培养基。培养箱中静置培养 48 h 后, 提取各组细胞总蛋白, 经 BCA 法测定各组蛋白浓度。PAGE 分离胶为 13%, 每孔上样量为 45 μL , 电泳, 转膜。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h, 用核因子(NF)- κ B(p65)及 β -actin 抗体标记, 室温孵育 1 h, TBST 洗涤后加入 HRP 标记的二抗, 室温平摇 1 h, TBST 充分漂洗膜后, 暗室中化学发光液发光, X 片显影曝光。

2.7 统计学处理 实验数据均采用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 HepG-2 细胞株增殖的抑制作用 MTT 结果显示, 人肝癌 HepG-2 细胞经八角中莽草酸处理

后与对照组相比, 在 24, 48, 72 h 均出现细胞增殖抑制(图 1), 各质量浓度组与对照组比较, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 相同作用时间下, 各浓度组间细胞抑制率差异均有统计学意义($P < 0.05$); 同一浓度下, 24 h 与 72 h, 48 h 与 72 h 组的细胞抑制率差异有统计学意义($P < 0.05$); 经单因素方差分析发现, 对人肝癌 HepG-2 细胞株的抑制呈现时间依赖性和质量浓度依赖性, 且不同质量浓度组均随着莽草酸质量浓度的升高, 作用时间的延长, 诱导肿瘤细胞凋亡的作用越明显, 八角中莽草酸可能是通过干扰细胞的生长或诱导细胞凋亡来实现对肝癌 HepG-2 细胞增殖的抑制。

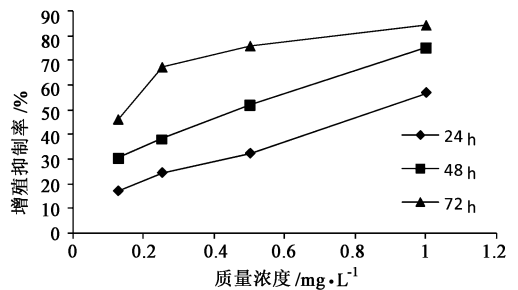


图 1 莽草酸对肝癌 HepG-2 细胞生长的影响

3.2 对人肝癌 HepG-2 细胞株形态的影响 倒置显微镜下可见, 对照组 HepG-2 细胞, 贴壁生长良好, 细胞排列紧密边界清楚, 细胞呈现星形或梭形, 细胞核大, 胞质丰富而饱满。实验组随着药物浓度的增加, 细胞数量逐渐减少, 细胞轮廓逐渐不清晰, 可见毛刺状, 细胞体积变小, 胞质分布不均, 细胞碎片逐渐增多。特别是质量浓度达 0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时, 各组细胞形态学变化比较明显。如图 2。

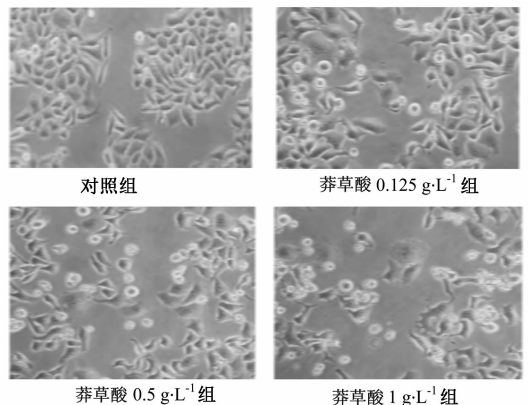


图 2 莽草酸对肝癌 HepG-2 细胞形态学变化的影响($\times 200$)

3.3 莽草酸诱导 HepG-2 细胞凋亡时细胞核的形态学变化 人肝癌 HepG-2 细胞株经不同浓度的莽草酸作用 48 h 后, 经过 hoechst33342 荧光染色后,

在荧光倒置显微镜下观察。对照组细胞,包膜完整,细胞核形态规则,核质着色深,核仁大且完整,细胞发光均匀。随着药物浓度增高,凋亡细胞越来越多,且越来越明显。凋亡细胞呈现细胞体积变小,染色质不均匀,细胞核固缩,甚至出现细胞核碎裂。低浓度组的莽草酸对人肝癌 HepG-2 细胞凋亡的作用不明显当莽草酸质量浓度 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,出现核致密浓染,荧光染色亢进呈现深蓝色,细胞核碎裂,核质浓集,形态及其不规则。当莽草酸到达 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,可见典型的凋亡小体,染色质固缩,细胞核呈碎块状致密浓染(图 3)。

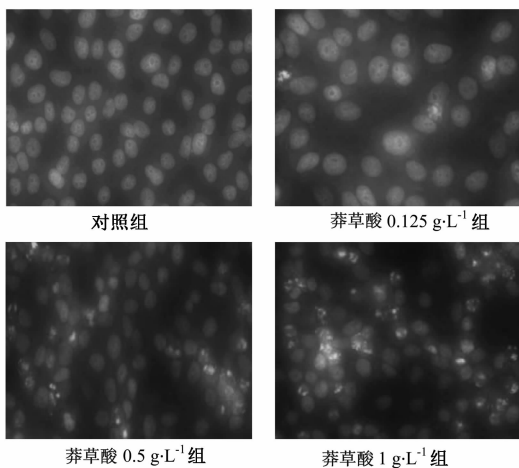
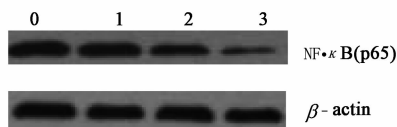


图 3 莽草酸对人肝癌 HepG-2 细胞凋亡的影响
(hoechst 333 42 荧光染色, $\times 200$)

3.4 莽草酸抑制 NF- κ B 表达 Western blot 结果显示,以 β -actin 作为内参照,人肝癌细胞 HepG-2 经莽草酸干预 48 h 后,随着药物剂量的增加,NF- κ B (p65) 蛋白的表达进行性降低。(图 4)。



0. 对照组; 1. 莽草酸 $0.125 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;

2. 莽草酸 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; 3. 莽草酸 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图 4 莽草酸对人肝癌 HepG-2 细胞 NF- κ B (p65) 表达的影响

4 讨论

细胞信号传导通路在肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭,抵抗化疗和放疗等方面起着重要作用。NF- κ B 是一类广泛存在于肿瘤细胞内的重要转录因子,是多信号转导途径的汇聚点,参与组织细胞的免疫调节、炎症反应、生长分化和凋亡等^[4-5]。通常情况下 NF- κ B 复合物由许多同型二聚体组成,NF- κ B 因其抑制子 I κ B α 结合,以无活性形式存在于细胞

质中。当外来刺激因素触发 I κ B α 磷酸化后,异源二聚体降解,NF- κ B 激活并发生核转移继而激活靶基因的转录^[6-8]。NF- κ B 是肿瘤发生发展的关键调节因子^[9],NF- κ B 作为一种在调控细胞的生存和凋亡中起关键作用的重要调控因子,其最重要功能之一就是抑制细胞凋亡^[10]。本研究发现,采用微波辅助法提取八角中的莽草酸作用人肝癌 HepG-2 细胞后,明显抑制 NF- κ B (p65) 的表达,从而发挥对人肝癌 HepG-2 细胞的增殖抑制作用,这说明莽草酸可以作为一种新型的天然药物用于抗癌基础研究,但确切机制仍有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 曾辉,李开祥,陆顺忠. 广西八角综合开发利用[J]. 广西林业科学, 2008, 37(4): 223.
- [2] 何新华,刘玲,刘兴国,等. 八角茴香中莽草酸提取和纯化工艺的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20: 914.
- [3] 李伟,杨旭. 八角茴香及其提取物莽草酸的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 1: 24.
- [4] Xing J, Sun J, You H, et al. Anti-inflammatory effect of 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid on acetic acid-induced colitis in rats [J]. Inflammation, 2012, 35 (6): 1872.
- [5] Karin M. Nuclear factor-kappa B in cancer development and progression [J]. Nature, 2006, 441: 431.
- [6] Fischer C D, Beatty J K, Zvaigzne C G, et al. Anti-inflammatory benefits of antibiotic-induced neutrophil apoptosis: tulathromycin induces caspase-3-dependent neutrophil programmed cell death and inhibits NF-kappa B signaling and CXCL8 transcription [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(1): 338.
- [7] Lawrence T. The nuclear factor NF-kappa B pathway in inflammation [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6): a001651.
- [8] 赵坚,张望群,李金源. VEGF、NF- κ B/p50 在不同分型涎腺多形性腺瘤中的表达及意义[J]. 军医进修学院学报, 2011, 32(5): 516.
- [9] 张颖,赵鑫,姜秀娟,等. NF- κ B p65 在肝炎后肝癌中的表达[J]. 军医进修学院学报, 2013, <http://www.301xuebao.com.cn>.
- [10] Basak S, Hoffmann A. Crosstalk via the NF-kappa B signaling system [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2008, 19: 187.

[责任编辑 聂淑琴]