肿节风复方含药血清对肝癌 HepG2 细胞增殖、端粒酶及凋亡的影响

朱晓莹[1],李韬[2],李盛毅[2],曾怡[1*]
(1. 右江民族医学院科学实验中心,广西 百色 533000;
2. 右江民族医学院基础医学院,广西 百色 533000)

[摘要] **目的**:观察肿节风复方含药血清对人肝癌细胞 HepG2 细胞增殖及凋亡的影响。**方法**:实验设阴性对照组(NS)、5-氟尿嘧啶(5-FU)组(0.025 $g \cdot kg^{-1}$)和肿节风复方低、中、高剂量组(2.5,5,10 $g \cdot kg^{-1}$),灌服于大鼠后,提取含药血清。取上述含药血清分别作用于 HepG2 细胞 24,48,72 h;MTT 法测定细胞增殖抑制率;ELISA 法测定端粒酶活性;荧光显微法及流式细胞术(Annexin V-FITC/PI 法)检测肿节风复方含药血清对 HepG2 细胞凋亡的影响。**结果**:与对照组比较,肿节风复方含药血清低、中、高剂量组均能抑制 HepG2 细胞的增殖(高剂量组抑制率最高达 42.5%),呈现与时间-剂量依赖趋势;肿节风中、高剂量组能有效抑制 HepG2 细胞端粒酶活性,与对照组比较 $P < 0.05$;肿节风复方含药血清具有诱导 HepG2 细胞凋亡的作用,与对照组比较 $P < 0.05$,其中中剂量组作用 24,48,72 h 细胞凋亡率分别为(14.2 ± 0.9)%,(30.6 ± 1.0)%,(61.6 ± 1.5)%。**结论**:肿节风复方含药血清能抑制 HepG2 细胞增殖、端粒酶活性,诱导 HepG2 细胞凋亡。

[关键词] 肿节风复方;血清药理学;肝癌;端粒酶;凋亡
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)02-0109-04
[doi] 10.11653/syfj2014020109

Effect of Serum Containing Sarcandrae Compound on Proliferation, Telomerase Activity and Cellular Apoptosis of HepG2 Cells

ZHU Xiao-ying[1], *LI Tao*[2], *LI Sheng-yi*[2], *ZENG Yi*[1*]
(1. *Science Experiment Center*, *Baise* 533000, *China*;
2. *Basic Medical Sciences*, *Youjiang Medical University for Nationalities*, *Baise* 533000, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate effect of serum containing Sarcandrae compound on proliferation, telomerase activity and cellular apoptosis of HepG2 liver cancer cells. **Method**: Serum containing drugs was prepared by Administration of physiological saline, different concentrations of Sarcandrae compound and 5-fluoro-2, 4 (1H, 3H) pyrimidinedion (5-FU). Consequently to rats. The serum containing drugswas used totreat HepG2 cells for 24, 48, 72 h. Then the effects of different drugs on proliferation, telomerase and apoptosis of HepG2 cells were observed by MTT, ELISA and Flow cytometry Annexin V-FITC/PI assay, respectively. **Result**: Compared to control group, proliferation and telomerase activities of HepG2 cells were inhibited with time-dependent manner by serum containing Sarcandrae compound significantly ($P < 0.05$). All serum containing Sarcandrae compound could promote the apoptosis of HepG2 cells significantly. For middle dose group at 24, 48, 72 h the apoptosis rate was (14.2 ± 0.9)%, (30.6 ± 1.0)%, (61.6 ± 1.5)%. **Conclusion**: Serum containing Sarcandrae compound can inhibit the proliferation and telomerase activity of HepG2 cells, and promote the apoptosis of HepG2 cells.

[**Key words**] Sarcandrae compound; serum pharmacology; liver cancer; telomerase; apoptosis

[收稿日期] 20130806(012)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81071345);右江民族医学院科学[2011]1 号
[第一作者] 朱晓莹,硕士,高级实验师,从事中药抗肿瘤及其机制研究,E-mail:417343600@qq.com
[通讯作者] * 曾怡,博士,副教授,E-mail:zengyirr@163.com

肿节风是近年来发掘的重要中草药之一,肿节风化学成分主要有倍半萜、香豆素,黄酮等成分;药理研究表明肿节风具有抗菌消炎,抗肿瘤、抗病毒等多种活性[1-3]。肿节风复方以肿节风、苦参等中药为主要原料。前期研究发现肿节风复方对人肝癌 HepG2 细胞的增殖及端粒酶活性具有显著的抑制作用[4]。本研究旨在运用血清药理学方法,观察肿节风复方含药血清对 HepG2 细胞的增殖、端粒酶活性及凋亡的影响。

1 材料

1.1 肿节风复方制备 肿节风复方口服液,主要由肿节风、苦参、何首乌、甘草等组成,中药饮片加 8 倍量水,浸泡后煎煮,合并两次滤液,浓缩至含生药 1 g·mL^{-1},由右江民族医学院海尔福研制中心监制。

1.2 试剂 5-氟尿嘧啶注射液(5-FU,上海旭东海普药业,批号 111006);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基,批号 20120625);人端粒酶 ELISA 检查试剂盒(美国 R & D system 公司,批号 201206);RPMI 1640 培养基(批号 201110118)、胎牛血清(批号 201101082)、胰蛋白酶(批号 201109155)(均为北京索莱宝科技有限公司);四甲基偶氮唑盐、二甲基亚砜(美国 Sigma 公司);生理盐水(贵州天地药业,批号 B11062303)。

1.3 仪器 HF-90 CO_2 培养箱(力康仪器上海公司),DMIL-FL 荧光倒置显微镜(德国徕卡公司),Tristar LB941 酶标仪(德国伯托公司),FACSanto Ⅱ 全自动流式细胞分析仪(美国 BD 公司)。

1.4 细胞与动物 人肝癌细胞株 HepG2 由本室保存。清洁级成年 SD 大鼠 50 只,体重 280~310 g,雌雄各半,由右江民族医学院实验动物中心提供,许可证号 SCXK(桂)2012-0003。

2 方法

2.1 细胞培养 HepG2 细胞贴壁生长,培养于含 10% 胎牛血清、100 U·mL^{-1} 青霉素、链霉素的 1640 培养基中,置于 37 ℃,5% CO_2 的饱和湿度培养箱中,2~3 d换液 1 次,4~5 d 传代,选用指对数生长期细胞进行实验。

2.2 含药血清的制备 SD 大鼠按体重随机分为 5 组,肿节风复方按临床等效剂量的 5,10,20 倍进行灌胃:肿节风复方低、中、高剂量组(2.5,5,10 g·kg^{-1})、5-氟尿嘧啶组(0.025 g·kg^{-1})、阴性对照组(NS 组),每组 10 只。按 1 次/d,每只灌胃给药 3 mL,将各组药物按剂量取,不足 3 mL 给予生理盐水补足 3 mL,连续 7 d,末次给药 2 h 后再重复给药 1 次,1 h 后麻醉,腹主动脉采血,分离合并同组动物血清[5],56 ℃灭活30 min,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,-20 ℃分装保存备用。临用前加入 1640 培养基并调整剂量供实验用。

2.3 肿节风复方含药血清对 HepG2 细胞增殖的影响 实验设 5 组,分别为肿节风复方低、中、高剂量、5-FU,阴性对照组。取 1×10^5 个/mL 的单细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL;待细胞融合度为 70% 时,分别加入各浓度为 10% 含药血清-培养基,每组设 6 复孔,在培养 24,48,72 h 时,采用 MTT 法检测各孔的吸光度(A),计算细胞生长抑制率。

细胞增殖抑制率 =(对照组 A - 实验组 A/对照组 A)×100%

2.4 肿节风复方含药血清对 HepG2 细胞端粒酶活性的影响 实验设 5 组,分别为肿节风复方低、中、高剂量、5-FU,阴性对照组。取 1×10^5 个/mL 的单细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL;待细胞融合度为 70% 时,分别加入上述各组 10% 含药血清培养基,每组设 5 个复孔,每隔 24 h 重复给药 1 次,连续 3 d,收集细胞上清液,-20 ℃保存,统一检测端粒酶活性,操作按照试剂盒说明书进行。

2.5 肿节风复方含药血清诱导细胞凋亡形态观察 实验设 5 组,分别为肿节风复方低、中、高剂量、5-FU,阴性对照组。取 1×10^5 个/mL 的单细胞悬液,接种于含盖玻片 6 孔培养板中,每孔 1 mL,分别加入 10% 含药血清培养基培养 24,48,72 h,经试剂染色后在荧光显微镜下观察细胞凋亡情况并拍照,数 4 个高倍视野(×400 倍),分别计算凋亡细胞数和总细胞数。

凋亡率 = 凋亡细胞数/总细胞数×100%

2.6 细胞凋亡率检测 根据上述细胞凋亡荧光检测结果,选择肿节风最佳作用剂量、时间上流式细胞仪检测肿节风含药血清诱导细胞凋亡情况。同时设 5-FU 组(阳性对照)及对照组(阴性对照);具体操作按试剂盒说明书。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理,计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组计量资料间比较采用重复测量数据的方差分析,计数资料率的比较采用 χ^2 检验,$P<0.05$ 为差异具有显著意义。

3 结果

3.1 对 HepG2 细胞增殖的影响 与对照组相比,各个剂量的肿节风含药血清组对 HepG2 细胞增殖

均有抑制作用,并有随时间延长而增长的趋势。见图 1。

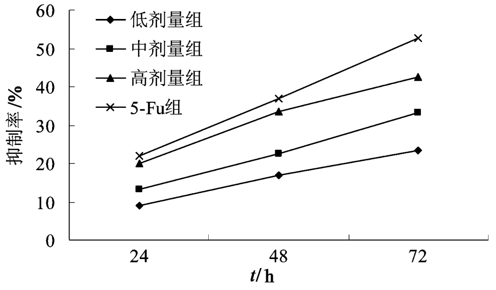

图 1　肿节风复方含药血清对 HepG2 细胞增殖的抑制作用

3.2　对 HepG2 细胞端粒酶活性的影响　较对照组,除肿节风低剂量组端粒酶活性与对照组无明显差异外,肿节风中、高剂量组与 5-FU 组细胞端粒酶活性均被抑制。见表 1。

3.3　对 HepG2 细胞凋亡的影响

3.3.1　荧光显微镜下计数 HepG2 细胞凋亡率　见表 2。随着时间的推移,各实验组均出现细胞凋亡现象,与对照组比较,肿节风各剂量组及 5-FU 组细胞凋亡现象明显。综合上述 **3.1**,**3.2**,**3.3.1** 实验结果,采用中剂量组开展下一步流式细胞术实验。

3.3.2　肿节风复方含药血清中剂量组对 HepG2 细胞凋亡的作用　凋亡率见表 3。肿节风复方含药血清中剂量组与对照组比较,具有诱导 HepG2 细胞凋亡,并呈现随时间增加,凋亡率增高的趋势。与阳性对照 5-FU 组比较,差异无统计学意义。

表 1　10%肿节风复方含药血清对 HepG2 细胞端粒酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)　$ng \cdot L^{-1}$

组别	灌胃剂量/$g \cdot kg^{-1}$	24 h	48 h	72 h
对照	–	45.6 ± 1.37	51.48 ± 1.81	53.06 ± 2.9
肿节风复方血清	2.5	42.07 ± 1.88	50.06 ± 2.49	49.28 ± 2.14
	5	43.49 ± 2.04 1)	45.9 ± 1.67 1)	45.87 ± 1.65 1)
	10	41.2 ± 1.47 1)	43.14 ± 2.94 1)	39.51 ± 2.16 1)
5-FU	0.025	38.71 ± 1.52 1)	43.73 ± 1.47 1)	37.49 ± 0.94 1)

注:与对照组比较 1) $P < 0.05$。

表 2　10%肿节风复方含药血清诱导 HepG2 细胞的凋亡率(荧光显微镜下,$\bar{x} \pm s, n=4$)　%

组别	灌胃剂量/$g \cdot kg^{-1}$	24 h	48 h	72 h
对照	–	1.25 ± 0.52	5.18 ± 0.67	7.45 ± 0.58
肿节风复方血清	2.5	6.78 ± 0.73 1)	13.38 ± 1.56 1)	19.58 ± 1.87 1)
	5	15.71 ± 1.48 1)	23.23 ± 0.88 1)	39.24 ± 1.26 1)
	10	16.78 ± 1.26 1)	22.35 ± 1.37 1)	40.56 ± 2.42 1)
5-FU	0.025	10.01 ± 0.79 1)	42.52 ± 2.59 1)	72.09 ± 3.54 1)

注:与对照组比较 1) $P < 0.001$(表 3 同)。

表 3　10%肿节风复方含药血清诱导 HepG2 细胞的凋亡率(流式细胞术,$\bar{x} \pm s, n=3$)　%

组别	灌胃剂量/$g \cdot kg^{-1}$	24 h	48 h	72 h
对照	–	8.8 ± 0.3	12.8 ± 0.3	16.2 ± 0.6
肿节风复方血清	5	14.2 ± 0.9 1)	30.6 ± 1.0 1)	61.6 ± 1.5 1)
5-FU	0.025	21.9 ± 1.0 1)	42.2 ± 1.3 1)	76.6 ± 2.0 1)

4　讨论

目前临床治疗肝癌以外科手术、化学药物治疗等为主,但由于缺乏特异性,治疗中常表现出局限性和毒副作用对病人身体恢复很不利。传统中药在控制患者病情发展、改善症状及提高生存质量等方面的优势日渐显现。中药治疗肿瘤主要通过抑制细胞增生、促进细胞分化、诱导细胞凋亡及抑制肿瘤血管生成等环节发挥抗癌作用[6]。利用含药血清代替中药粗提物作为药物载体,可以有效地避免直接用中药粗提物带来的如成分过多,难以确定其有效成分;其次,细胞、基因等体外试验结果有时与体内药效试验的结果不一致等诸多问题。体外利用含药血清进行实验,可以较好的模拟药物在体内环境中产生药理效应的真实过程,理论上更具备科学性、真实性[6]。

肿瘤细胞的生物学特征是失控性生长,其主要

分子机制是细胞周期紊乱导致细胞增生过多和凋亡减少。近年来,随着细胞凋亡研究的深入,人们已经认识到抗肿瘤药主要是通过诱导肿瘤细胞凋亡发挥治疗作用,能否诱导凋亡以及凋亡的程度已成为评价抗肿瘤药物的重要指标[8],本实验选用 MTT 法及流式细胞术观察肿节风复方含药血清对 HepG2 细胞抑制增殖及诱导凋亡进行初步的检测,结果显示:肿节风含药血清对 HepG2 细胞具有较好的抑制增殖的作用,呈现剂量-时间依赖效应。流式细胞结果显示,肿节风复方含药血清具有诱导 HepG2 细胞凋亡的作用,其诱导凋亡作用与阳性对照 5-FU 组效果相当,但诱导细胞凋亡的相关基因的变化,凋亡信号的产生等,还有待进一步研究。

此为,肿节风含药血清能有效抑制 HepG2 细胞端粒酶活性($P<0.05$),并随剂量、时间增加,抑制作用逐渐增强。端粒酶是由端粒酶逆转录酶、端粒酶 RNA 及端粒酶相关蛋白组成的核糖核酸复合物,起到维持染色体的完整性和稳定性的作用。正常细胞端粒酶活性低表达或不表达。端粒酶在肝癌组织的端粒酶活性阳性率在 80% ~100%[9-10],显著性地高于非癌肝组织。因此综合本文研究结果,肿节风含药血清能有效抑制肝癌细胞的增殖,并具有诱导其凋亡的作用,这为肿节风复方今后进一步开发利用奠定基础。

[参考文献]

[1] 邹小燕,高慧媛,吴斌,等. 肿节风化学成分的研究[J]. 中草药,2007,38(3):354.
[2] 冷永涛,吕圭源,陈素红. 肿节风抗肿瘤相关作用及机制研究[J]. 中国现代药物应用,2010,4(6):232.
[3] 黄明菊,曾光尧,谭健兵,等. 肿节风中黄酮苷类成分研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(14):1700.
[4] 朱晓莹, 龙昶文, 梁永赞,等. 肿节风复方对肝癌细胞 HepG2 作用效果观察[J]. 广西医学,2012,34(12):1597.
[5] 崔晓兰, 贺玉琢, 高英杰,等. 中药复方血清药理研究方法学探讨-Ⅰ[J]. 中国实验方剂学杂志,1998,4(2):13.
[6] 马向华, 马超英. 中药诱导肿瘤细胞凋亡的研究进展[J]. 时珍国医国药,2012, 23(3):732.
[7] 杨会锦, 尹华. 中药血清药物化学研究进展[J]. 中国医院药学杂志,2013, 33(5):399.
[8] 梁欣娜, 张兴燊, 滕红丽. 中药及其有效成分抗肿瘤作用研究[J]. 时珍国医国药,2013,24(1):119.
[9] Sabah M, Cummins R, Leader M, et al. Immunohistochemical detection of hTERT protein in soft tissue sarcomas correlation with tumor grade[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2006, 14(2):198.
[10] 傅青岭, 刘厚奇. 端粒酶与癌症靶向治疗[J]. 生命科学,2010, 22(12):1254.

[责任编辑 聂淑琴]

天津中医药大学期刊编辑部 2014 年征订启事

《天津中医药》月刊,每期 8 元,年定价 96 元,联系电话:022-59596310,联系人:张震之。邮局订阅:邮发代号 6-83 电子邮件:zhongyiyao@ vip. 126. com, xuebaobj@ 126. com,网 址:http://www. tjzhongyiyao. com,地 址:天津市南开区鞍山西道 312 号,邮政编码: 300193 。

《天津中医药大学学报》双月刊,每期 6 元,年定价 36 元,联系电话:022-59596310,联系人:张震之。邮局订阅:邮发代号 6 –153, 电子邮件:xuebaobj@ vip. 126. com, xuebaotxd@ 126. com, 网 址:http://www. tjzhongyiyao. com, 地 址:天津市南开区鞍山西道 312 号, 邮政编码:300193。