

# 红花注射液对 HepG-2 细胞 Bcl-2 和 Survivin 表达的影响

李福娟<sup>1,2</sup>, 石学魁<sup>2\*</sup>, 李玉婷<sup>2</sup>, 董艳<sup>2</sup>, 王亚贤<sup>3</sup>, 陶冀<sup>3</sup>,  
梁颖<sup>3</sup>, 张晓莉<sup>2</sup>, 桂金秋<sup>2</sup>, 刘亚威<sup>2</sup>, 宋宝辉<sup>2</sup>, 张红军<sup>2</sup>

(1. 佳木斯大学, 黑龙江 佳木斯 154007; 2. 牡丹江医学院, 黑龙江 牡丹江 157011;  
3. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

**[摘要]** **目的:**研究红花注射液在体外对 HepG-2 细胞 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、Survivin 基因转录和蛋白表达的影响,探讨红花注射液诱导人肝癌 HepG-2 细胞凋亡的机制。**方法:**采用不同剂量的红花注射液(0, 50, 100, 150, 200, 250 g·L<sup>-1</sup>)体外作用于 HepG-2 细胞,利用 MTT 法观察红花注射液对 HepG-2 细胞增殖的抑制作用;以流式细胞术观察细胞凋亡率的变化;通过实时荧光定量 PCR 技术 (real time-PCR) 以及蛋白免疫印迹 (Western blotting) 法检测细胞凋亡相关因子 Bcl-2 和 Survivin mRNA 和蛋白的表达情况。**结果:**红花注射液对体外培养的人肝癌 HepG-2 细胞的增殖具有抑制作用 ( $P < 0.01$ ), 且具有剂量、时间相关性;细胞凋亡率随着红花注射液浓度的增加而逐步增高,细胞凋亡相关因子 Bcl-2, Survivin 的 mRNA 和蛋白表达均下调。**结论:**红花注射液能够抑制 HepG-2 人肝癌细胞增殖,诱导 HepG-2 细胞凋亡,可在翻译和转录水平下调 Bcl-2, Survivin 的表达,这可能是红花注射液诱导 HepG-2 细胞凋亡的主要机制之一。

**[关键词]** 红花注射液; 人肝癌细胞株 HepG-2; 细胞增殖; 细胞凋亡; Survivin; Bcl-2

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0218-05

**[doi]** 10.11653/syjf2013210218

## Effects of Safflower Injection on Gene Transcription and Protein Expression of Bcl-2 and Survivin in Human Hepatoma Cell Line HepG-2

LI Fu-juan<sup>1,2</sup>, SHI Xue-kui<sup>2\*</sup>, LI Yu-ting<sup>2</sup>, DONG Yan<sup>2</sup>, WANG Ya-xian<sup>3</sup>, TAO Ji<sup>3</sup>, LIANG Ying<sup>3</sup>,  
ZHANG Xiao-li<sup>2</sup>, GUI Jin-qiu<sup>2</sup>, LIU Ya-wei<sup>2</sup>, SONG Bao-hui<sup>2</sup>, ZHANG Hong-jun<sup>2</sup>

(1. Jiamusi University, Jiamusi 154007, China;

2. Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011 China;

3. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Safflower injection on gene transcription and protein expression of B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and Survivin in HepG-2 cell so as to explore its mechanism of inducing apoptosis in human hepatoma cell line HepG-2. **Method:** HepG-2 cells were treated *in vitro* with different concentrations (0, 50, 100, 150, 200, 250 g·L<sup>-1</sup>) of Safflower injection. Inhibiting effect of cell proliferation was measured by methylthiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Cell apoptosis rates were analyzed by flow cytometry (FCM). Quantitative real-time RT-PCR and Western blot methods were used to detect the mRNA and protein expressions of apoptosis related factors Bcl-2 and Survivin. **Result:** The results indicated that Safflower injection could inhibit the proliferation of HepG-2 cells in a dose and time dependent manner ( $P < 0.01$ ). As the concentration of Safflower injection increased, the apoptosis rates of the cells were increased. Both the mRNA and protein expressions of Bcl-2 and survivin were down-regulated. **Conclusion:** Safflower injection could inhibit the

**[收稿日期]** 20130628(004)

**[基金项目]** 黑龙江省教育厅科研项目(11551520)

**[第一作者]** 李福娟, 实验师, 从事中药抗肿瘤、免疫调节的研究, Tel:0453-6984673, E-mail:382957318@qq.com

**[通讯作者]** \* 石学魁, 博士, 教授, 从事中药活血化瘀、抗肿瘤、抗感染的研究, Tel:0453-6984383, E-mail:bs680112@qq.com

proliferation and induce cell apoptosis of human hepatoma cell line HepG-2. The down-regulating expressions of Bcl-2 and Survivin on both mRNA and protein levels maybe one of the main mechanisms for Safflower injection inducing apoptosis of HepG-2 cells.

[ **Key words** ] Safflower injection; human hepatoma cell line HepG-2; cell proliferation; cell apoptosis; survivin; Bcl-2

红花(Safflower)是1~2年生菊科植物红花(*Carthamus tinctorius* L.)的干燥管状花,是临床上最常用的活血化瘀中药之一,性味辛温,入心、肝经,具有活血通经、化瘀止痛之功效,适用于各种类型动脉粥样硬化、高胆固醇、高血压、心肌梗死、心绞痛、脉管炎、脑血栓等,还有抗癌、杀菌、解毒的作用;而且红花成分复杂多样,其中主要有效成分有黄酮类(红花黄色素、羟基红花黄色素A)、红花多糖、有机酸(棕榈酸、肉豆蔻酸、月桂酸、油酸、亚油酸等)、5-羟色胺、甾族、 $\beta$ -谷甾醇、核黄素降解产物、核黄素、核苷等<sup>[1]</sup>。临床上应用较广泛的红花注射液是从活血化瘀中药红花中提取制备的灭菌水溶液,其主要成分为红花黄色素(safflor yellow, SY),具有一定的抗肿瘤作用<sup>[2-5]</sup>。但是,目前对红花注射液具体的抗肿瘤作用机制缺乏深入的认识,因此,本研究在前期研究工作的基础上,观察了红花注射液对体外培养的人肝癌细胞株 HepG-2 诱导凋亡的作用,探讨其诱导细胞凋亡过程中 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2), Survivin 基因转录和蛋白表达的影响,进一步揭示红花注射液诱导细胞凋亡的机制,为其临床应用治疗肝癌提供理论和实验依据。

## 1 材料

**1.1 细胞株** HepG-2 人肝癌细胞株引自中国科学院上海细胞生物学研究所,本实验室自行保存传代备用。

**1.2 药物和试剂** 红花注射液(山西安特生物制药股份有限公司,规格为5 mL/支,相当于红花原生药质量浓度  $500 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,批号 20090614),改良型 RPMI-1640 培养基(液体,HyClone Thermo 公司,批号 NVH0304),胰蛋白酶(Invitrogen 公司,批号 20100415),新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号 080131),四甲基偶氮唑蓝(MTT, Amresco 公司,批号 09052345),二甲基亚砜(DMSO, Sigma 公司,批号 20100103658),Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物公司,商品编号 KGA107),引物(上海艾博思生物科技有限公司合成),Trizol Reagent (Invitrogen,批号 20120816), Real-Time PCR Kit (SYBR Green)

(Shanghai Novland 公司,批号 20120304), Fresh animal Tissue and cell sample Total RNA Extraction Kit(Shanghai Novland Co., Ltd,批号 20120509),溴化乙锭(EB, Sigma 公司),焦碳酸二乙脂(DEPC, Promega 公司),全蛋白抽提试剂盒(南京凯基生物公司,编号 KGP250), Bcl-2 antibody (Cell Signaling Technology, Cat. No. 2876),兔抗人 Survivin 多克隆抗体和抗人  $\beta$ -actin 多克隆抗体(北京中衫金桥生物公司),HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG(1:2 000, 晶美生物,进口分装),其他试剂均为国产分析纯。

**1.3 仪器和设备** BD FACS Canto II 流式细胞仪(BD 公司);Arium 611 UF 超纯水系统(德国 Sartorius 公司);MCO-15AC 恒温  $\text{CO}_2$  培养箱(日本 SANYO 公司);真空干燥冷冻离心机(2-16 PK, sigma);Multiskan Mk3 酶标仪(Thermo 公司);79-1 磁力加热搅拌器(上海浦东物理光学仪器厂);IQ5 Real-time PCR Instrument(美国伯乐实时荧光定量 PCR 仪),Bio-rad(US);PowerPac™ HC 电泳仪, Bio-rad(US);VE-180 垂直电泳槽(上海天能)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 人肝癌细胞株 HepG-2 常规方法复苏后,培养于完全 RPMI 1640 培养基(含 10% 灭活新生牛血清),置于培养箱( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、完全饱和湿度)常规培养,每 2~3 d 传代 1 次;实验所用细胞均处于对数生长期。

**2.2 对 HepG-2 细胞增殖的影响** 取对数生长期细胞,经胰酶消化制成单细胞悬液,调整细胞密度为  $1 \times 10^4/\text{mL}$ ,接种于 96 孔培养板,每孔 200  $\mu\text{L}$ ,置于  $\text{CO}_2$  培养箱培养 24 h,分别给予不同剂量的红花注射液(终质量浓度为 0, 50, 100, 150, 200, 250  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )处理,每个剂量设 5 个复孔。分别处理不同时间(24, 48, 72 h)后进行检测,每孔吸弃培养液上清 20  $\mu\text{L}$ ,加入 MTT 溶液( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )20  $\mu\text{L}$ ;培养 4 h,弃上清,每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO,避光震荡 10 min 充分溶解结晶物,在全自动酶标仪波长 490 nm 处检测各孔吸光度(A)。同时设空白对照(单纯培养基、无细胞)、单纯红花注射液(单纯红花注射液、无细胞)组。实验重复 3 次,取平均值。根据公式计算细胞增殖抑

制率 (inhibition rate, IR) :

$$\text{细胞增殖抑制率} = (1 - \text{实验组 A} / \text{对照组 A}) \times 100\%$$

**2.3 检测 HepG-2 细胞凋亡率** 取多次传代的 HepG-2 细胞接种于培养瓶中常规培养, 24 h 后更换培养液, 加入红花注射液 (终质量浓度为 0, 50, 100, 150, 200, 250  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 继续培养 24 h。0.25% 胰酶消化收集各组细胞, 用 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的 0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS (pH 7.4) 洗涤 1 次, 进行细胞计数, 并调整细胞数约为  $1 \times 10^6 / \text{mL}$ 。根据 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书处理样品, 对细胞进行染色, 上流式细胞仪检测, 利用 FCSExpress 3.0 软件分析细胞凋亡。

**2.4 检测 Bcl-2 及 Survivin mRNA 表达** 收集未用药组及经过红花注射液 (50, 150, 250  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理 48 h 的 HepG-2 细胞, 采用 Trizol 法提取细胞总 RNA。紫外分光光度技术测量总 RNA 含量、纯度, 变性琼脂糖凝胶电泳测定 RNA 的完整性。取适量总 RNA 进行反转录, 所得 cDNA 置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。然后以 cDNA 为模板, 进行实时荧光定量 PCR 反应。survivin 引物序列设计参照文献 [6] 方法, Bcl-2 及内参照 GAPDH 引物序列设计参照文献 [7] 方法; survivin (130 bp) 上游引物为 5'-GGA CCA CCG CAT CTC TAC ATT C-3', 下游引物为 5'-AGA AAC ACT GGG CCA AGT C-3'; Bcl-2 (187 bp) 上游引物为 5'-CAT GTG TGT GGA GAG CGT CAA C-3', 下游引物为 5'-CTT CAG AGA CAG CCA GGA GAA ATC-3'; GAPDH (113 bp) 上游引物为 5'-CAT GAG AAG TAT GAC AAC AGC CT-3', 下游引物为 5'-AGT

CCT TCC ACG ATA CCA AAG T-3'。以  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法分析待检样品中各基因的相对表达程度 [8-9]。

**2.5 检测 Bcl-2 及 Survivin 蛋白表达** 实验分组及药物处理时间同 2.4, 收集未用药组及红花注射液 (50, 150, 250  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理的 HepG-2 细胞提取总蛋白, 用 Bradford 法测定各组蛋白质含量。各组取等量蛋白上样, 用 10% SDS-PAGE 进行凝胶电泳, 并转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶在 4  $^{\circ}\text{C}$  封闭 1 h, 分别加入兔抗人多克隆抗体 (1:100), 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。TBST 漂洗 5 min  $\times$  3 次, 加入山羊抗兔 HRP 标记二抗 (1:10 000), 室温杂交 1 h, TBST 漂洗 5 min  $\times$  3 次。采用 ECL 化学发光法检测分析结果。对蛋白条带灰度进行分析, 以  $\beta$ -actin 的灰度值为对照, 计算各组 Bcl-2 和 Survivin 蛋白相对表达水平 [6]。每组均重复 3 次。

**2.6 统计学处理** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 各组间差异采用单因素方差分析及 LSD 检验, 以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 红花注射液抑制 HepG-2 细胞增殖** MTT 比色法检测结果显示, 不同剂量的红花注射液作用于 HepG-2 细胞可明显抑制细胞的增殖, 并且随着红花注射液浓度的增加及作用时间的延长, 对细胞的生长抑制作用逐渐增强, 与对照组 (0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 各时间点均以 250  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  剂量的抑制率最高, 分别为 37.83%、51.08% 和 61.35% (表 1)。具有剂量依赖性和时间依赖性。

表 1 不同剂量的红花注射液对 HepG-2 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

红花注射液 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h		48 h		72 h	
	A	IR/%	A	IR/%	A	IR/%
0 (对照)	0.739 $\pm$ 0.065	-	0.863 $\pm$ 0.064	-	1.066 $\pm$ 0.092	-
50	0.683 $\pm$ 0.032	7.71	0.707 $\pm$ 0.051 <sup>1)</sup>	18.12	0.743 $\pm$ 0.062 <sup>1)</sup>	30.36
100	0.627 $\pm$ 0.040 <sup>1)</sup>	15.22	0.652 $\pm$ 0.054 <sup>1)</sup>	24.45	0.603 $\pm$ 0.045 <sup>1)</sup>	43.45
150	0.578 $\pm$ 0.057 <sup>1)</sup>	21.88	0.580 $\pm$ 0.071 <sup>1)</sup>	32.75	0.502 $\pm$ 0.059 <sup>1)</sup>	52.89
200	0.536 $\pm$ 0.071 <sup>1)</sup>	27.47	0.472 $\pm$ 0.028 <sup>1)</sup>	45.26	0.454 $\pm$ 0.036 <sup>1)</sup>	57.39
250	0.460 $\pm$ 0.029 <sup>1)</sup>	37.83	0.422 $\pm$ 0.021 <sup>1)</sup>	51.08	0.412 $\pm$ 0.010 <sup>1)</sup>	61.35

注: 与对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2 对 HepG-2 细胞凋亡率的影响** 红花注射液 (50, 100, 150, 200, 250  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作用于 HepG-2 细胞 24 h 后, 细胞早期凋亡率逐渐上升, 细胞坏死或晚期凋亡率也逐渐上升, 除 50  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  与对照组比较没

有统计学意义外, 其余各组与对照组比较差异均有统计学意义。提示随着药物剂量的增加, 细胞凋亡率以及坏死率逐渐提高, 具有剂量依赖关系。见表 2。

表 2 红花注射液对 HepG-2 细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

红花注射液/ $g \cdot L^{-1}$	Q2/%	Q4/%
0(对照)	3.06 ± 0.63	0.44 ± 0.17
50	3.47 ± 0.51	0.70 ± 0.33
100	5.32 ± 0.61 <sup>1)</sup>	1.82 ± 0.26 <sup>1)</sup>
150	10.56 ± 1.57 <sup>2)</sup>	6.04 ± 0.70 <sup>2)</sup>
200	21.38 ± 0.38 <sup>2)</sup>	10.15 ± 0.67 <sup>2)</sup>
250	29.12 ± 0.90 <sup>2)</sup>	12.62 ± 1.11 <sup>2)</sup>

注:Q2 为晚期凋亡细胞或坏死细胞,Q4 为早期凋亡细胞;与对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

表 3 红花注射液对 HepG-2 细胞 Bcl-2 mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

红花注射液/ $g \cdot L^{-1}$	GAPDH/CT	Bcl-2/CT	$\Delta CT$	$\Delta \Delta CT$	$2^{-\Delta \Delta CT}$	IR/%
0(对照)	17.12 ± 0.20	30.56 ± 0.09	13.44 ± 0.22	0.00 ± 0.31	1.00(0.81-1.24)	-
50	14.41 ± 0.15	28.09 ± 0.17	13.68 ± 0.22	0.25 ± 0.31	0.84(0.68-1.5)	16
150	16.99 ± 0.13	31.26 ± 0.27	14.27 ± 0.29	0.84 ± 0.37	0.56(0.43-0.72)	44
250	16.24 ± 0.25	31.04 ± 0.38	14.80 ± 0.45	1.37 ± 0.50	0.39(0.25-0.61)	61

表 4 红花注射液对 HepG-2 细胞 Survivin mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

红花注射液/ $g \cdot L^{-1}$	GAPDH/CT	Bcl-2/CT	$\Delta CT$	$\Delta \Delta CT$	$2^{-\Delta \Delta CT}$	IR/%
0(对照)	13.95 ± 0.08	26.00 ± 0.16	12.05 ± 0.17	0.00 ± 0.25	1.00(0.84-1.13)	-
50	13.94 ± 0.14	26.13 ± 0.14	12.19 ± 0.20	0.14 ± 0.26	0.83(0.75-1.09)	17
150	16.26 ± 0.05	29.73 ± 0.11	13.47 ± 0.12	1.42 ± 0.21	0.37(0.32-0.43)	63
250	14.90 ± 0.19	28.76 ± 0.07	13.86 ± 0.20	1.81 ± 0.26	0.29(0.24-0.34)	71

平的影响 结果如图 1 和表 5 所示,不同剂量的红花注射液(50,150,250  $g \cdot L^{-1}$ )作用于 HepG-2 细胞 48 h 后,Bcl-2 及 Survivin 蛋白的表达水平随药物浓度的增高呈进行下降趋势,Bcl-2 的相对表达水平由对照组的  $0.956 \pm 0.067$  下调至 250  $g \cdot L^{-1}$  组的  $0.487 \pm 0.034$ ;Survivin 的相对表达水平由对照组的  $0.504 \pm 0.069$  下调至 250  $g \cdot L^{-1}$  组的  $0.191 \pm 0.026$ 。表明红花注射液下调 HepG-2 细胞 Bcl-2, Survivin 水平具有一定的剂量依赖性。

表 5 红花注射液对 HepG-2 细胞内 Bcl-2, Survivin 蛋白相对表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

红花注射液/ $g \cdot L^{-1}$	Bcl-2/ $\beta$ -actin	Survivin/ $\beta$ -actin
0(对照)	0.956 ± 0.067	0.504 ± 0.069
50	0.860 ± 0.060	0.443 ± 0.060
150	0.593 ± 0.041 <sup>1,2)</sup>	0.297 ± 0.041 <sup>1,2)</sup>
250	0.487 ± 0.034 <sup>1,2,3)</sup>	0.191 ± 0.026 <sup>1,2,3)</sup>

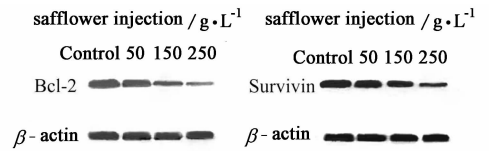
注:与对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与红花注射液 50  $g \cdot L^{-1}$  组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与红花注射液 150  $g \cdot L^{-1}$  组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ 。

#### 4 讨论

肝细胞癌是全球常见的恶性肿瘤之一,恶性程度高,预后不良,目前尚无有效的预防措施以及特异性强的治疗方法;因此,在我国针对肝癌的综合治疗

3.3 对 HepG-2 细胞 Bcl-2 及 Survivin mRNA 表达水平的影响 不同剂量的红花注射液作用 HepG-2 细胞 48 h 后,Bcl-2 及 Survivin mRNA 的表达水平均下降(表 3,4)。与对照组比较,各剂量红花注射液(50,150,250  $g \cdot L^{-1}$ )对 Bcl-2 mRNA 表达分别下调 16%,44%,61%;而对 Survivin mRNA 的表达分别下调 17%,63%,71%。

3.4 对 HepG-2 细胞 Bcl-2 及 Survivin 蛋白表达水

图 1 红花注射液对 HepG-2 细胞内 Bcl-2, Survivin 蛋白表达的影响( $\beta$ -actin 作为内参照)

方案中,中医药的积极参与是一个不可缺少的重要组成部分,能够提高肝癌的综合疗效,改善患者的生活质量,延长生存期<sup>[10]</sup>。红花注射液由活血化瘀中药红花为原料,采用水提醇沉法提取制成,并调节 pH 至 7.5 ~ 8.0,过滤、灭菌;主要成分是红花黄色素<sup>[5]</sup>。研究表明,红花黄色素对 H22 荷瘤小鼠皮下移植瘤具有明显的抑制作用,羟基红花黄色素 A (HSYA) 对人胃腺癌细胞株 BGC-823 裸鼠皮下移植瘤有一定抑制作用,并可能通过抑制 VEGF, bFGF 的 mRNA 表达来抑制裸鼠 BGC-823 移植瘤血管生成<sup>[3,11-12]</sup>。本实验结果表明,红花注射液能够抑制细胞增殖及诱导细胞凋亡和坏死,并可使具有抗细胞凋亡作用的 Bcl-2 和 Survivin 表达减弱。

Survivin 也称生存素,Survivin 是凋亡抑制蛋白(IAP)基因家族的成员,是迄今为止发现的最强的凋亡抑制因子,表达于各种肿瘤细胞中,尤其在大部

分恶性肿瘤组织中呈高表达,而在正常组织中几乎不表达<sup>[13]</sup>。Survivin 基因可以直接抑制凋亡信号通路中的 Caspase 蛋白酶活性,从而阻断凋亡信号的转导,抑制肿瘤细胞的凋亡<sup>[14]</sup>。研究表明,采用 RNA 干扰技术,转染 Survivin-siRNA 后乳腺癌 MCF-7 细胞中 Survivin 基因表达下调, MCF-7 细胞凋亡率明显增多(与对照组比较  $P < 0.05$ );并且与软骨多糖联合能增加软骨多糖诱导细胞凋亡的作用,与软骨多糖组和 siRNA 转染组比较均有统计学意义( $P < 0.05$ )<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,红花注射液能够下调 Survivin 水平,从而促进人肝癌 HepG-2 细胞凋亡。

Bcl-2 是凋亡抑制基因,具有抑制细胞凋亡作用<sup>[16]</sup>。朱开梅通过 RT-PCR 观察到构树叶总黄酮可使抑癌基因 Bcl-2 基因表达下调,从而抑制 HepG-2 的生长,诱导细胞凋亡<sup>[17]</sup>。也有研究显示,珍珠梅提取物 TTF1 可通过抑制 Bcl-2 蛋白的表达而抑制 HepG-2 肝癌细胞增殖<sup>[18]</sup>。本研究结果显示,红花注射液处理的 HepG-2 细胞,随着红花注射液浓度的升高,其 Bcl-2 蛋白及 mRNA 的表达均下调。

因此可以认为红花注射液不论是在 mRNA 水平还是在翻译水平,均能够抑制 HepG-2 细胞 Survivin, Bcl-2 表达,从而诱导 HepG-2 细胞凋亡、抑制其增殖。

下一步将结合动物实验考证红花注射液有无诱导肝癌细胞凋亡的效果,并在此基础上研究红花注射液对抗肿瘤药物的辅助作用,明确有无减毒增效作用;并进一步明确信号转导通路方面抗肿瘤的具体作用机制。

#### [参考文献]

[1] 施峰,刘焱文.红花的化学成分及药理研究进展[J].时珍国医国药,2006,17(9):1666.  
[2] 靳祎,石少慧,王恩军,等.红花注射液对人宫颈癌细胞株 Hela 体外增殖的影响[J].军医进修学院学报,2007,28(6):448.  
[3] 奚胜艳,张前,刘朝阳,等.羟基红花黄色素 A 对裸鼠人胃腺癌 BGC-823 移植瘤抑制作用的研究[J].北京中医药大学学报,2009,32(5):331.

[4] 刘倩,陈晨,戴忠,等.红花注射液有效成分的确定及不同厂家中量效关系的比较[J].药物分析杂志,2012,32(7):1158.  
[5] 张清华.红花注射液质量稳定性的生产工艺控制[J].山西化工,2005,25(1):37.  
[6] 陈昌杰,刘彪彪,杨清玲,等.葡萄籽提取物通过抑制 Survivin 的表达而抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖[J].中国药理学通报,2009,25(7):955.  
[7] 张晓莉,程翔,刘洋,等.红花多糖对人肝癌 SMMC-7721 细胞 Bcl-2 与 Bax 基因转录及蛋白表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(14):239.  
[8] 王书杰,韦艾凌,张永琴,等.癌痛消方调控大鼠移植性肝癌细胞 Survivin 及 Bcl-2 的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2012,32(12):1652.  
[9] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method[J]. Methods, 2001, 25(4):402.  
[10] 吴孟超.中医药在肝癌防治中的作用、地位和存在的问题[J].中西医结合学报,2003,1(3):163.  
[11] 尹华伟.红花黄色素对肝癌 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠的抑瘤作用[J].中国现代医生,2012,50(23):4.  
[12] 奚胜艳,张前,解华,等.羟基红花黄色素 A 对裸鼠人胃腺癌 BGC-823 移植瘤血管及 VEGF, bFGF mRNA 表达的影响[J].中国中药杂志,2009,34(5):605.  
[13] Altieri D C. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer [J]. Oncogene, 2003, 22(53):8581.  
[14] 王玉峰,王岩峰,邴佩旭,等.骨肉瘤中 Survivin、Caspase-8 的表达及其与凋亡的相关性研究[J].中国医科大学学报,2008,37(1):73.  
[15] 尹军,谭曙光,贺赛奇,等.抑制 survivin 表达对软骨多糖诱导乳腺癌细胞凋亡的增敏作用[J].现代生物医学进展,2010,10(18):3434.  
[16] Youle R J, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(1):47.  
[17] 朱开梅,姚丽新,刘建楠,等.构树叶总黄酮对人肝癌细胞 HepG-2 增殖和凋亡的作用及其机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(6):270.  
[18] 李光星,林冬岩,张学武.珍珠梅提取物 TTF1 抑制肝癌细胞增殖作用的研究[J].时珍国医国药,2013,24(4):774.

[责任编辑 聂淑琴]