

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

朱开梅¹, 姚丽新², 刘建楠¹, 桂劲松¹, 顾生玖^{1*}

(1. 桂林医学院, 广西 桂林 541004; 2. 广西壮族自治区南溪山医院, 广西 桂林 541002)

[摘要] 目的:探讨构树叶总黄酮(TFBP)对人肝癌细胞(HepG-2)增殖和凋亡的作用。方法:采用细胞增殖实验(MTT法),取对数生长期 HepG-2,随机分为药物组 and 对照组,用 3,6,9,12 g·L⁻¹不同质量浓度构树叶总黄酮作用 HepG-2,分别干预 24,48,72 h。通过流式细胞仪检测在以上质量浓度下作用细胞 48 h 后的细胞凋亡率,Western blot 法检测以上质量浓度构树叶总黄酮作用细胞 48 h 后 Bcl-2 基因、促凋亡基因 Bax 表达的情况。结果:各质量浓度构树叶总黄酮对 HepG-2 的生长有显著的抑制作用,呈明显的时间和剂量依赖性,经不同质量浓度的构树叶总黄酮作用 48 h 后 HepG-2 凋亡率显著增加,药物组与对照组比较为(0.478 ± 0.085 vs 0.498 ± 0.014; 0.354 ± 0.004 vs 0.498 ± 0.014; 0.218 ± 0.075 vs 0.498 ± 0.014)有显著性差异, $P < 0.05$, 抑癌基因 Bcl-2 表达量呈逐渐下降的趋势,促凋亡基因 Bax 表达量随着质量浓度的升高表达量呈现上升趋势。结论:构树叶总黄酮可以有效的抑制 HepG-2 的生长,诱导细胞凋亡,其诱导该细胞凋亡的作用可能是通过下调抑癌基因 Bcl-2 的表达,可为肝癌的生物学治疗提供新的方法。

[关键词] 构树叶总黄酮; 肝癌; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0270-04

Effects of Total Flavonoids of *Broussonetia papyrifera* on Proliferation and Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma HepG-2 Cells

ZHU Kai-mei¹, YAO Li-xin², LIU Jian-nan¹, GUI Jin-song¹, GU Sheng-jiu^{1*}

(1. Guilin Medical University, Guilin 541004, China;

2. Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of total flavonoids of *Broussonetia papyrifera* on growth and apoptosis of hepatocellular carcinoma HepG-2 cells. **Method:** The MTT assay was used, and the hepatocellular carcinoma HepG-2 cells in logarithmic phase of growth were randomly divided into drug group and control group, with the concentration of 3, 6, 9, 12 g·L⁻¹ total flavonoids of *B. papyrifera* in hepatocellular

[收稿日期] 20120630(001)

[基金项目] 广西科技特派员专项(桂科攻 09321056, 桂科能 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, 从事化学致病分子机制和药物防治研究, E-mail: glzkm@163.com

[通讯作者] * 顾生玖, 博士, 教授, Tel: 13607733816, E-mail: 5899602@glmc.edu.cn

[6] Wang J, Zhou H, Zheng J, et al. The antimalarial artemisin in synergizes with antibiotics to protect against lethal live *Escherichia coli* challenge by decreasing proinflammatory cytokine release[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(7): 2420.

[7] Eldesoky A, Shouma A, Mosaad Y, et al. Clinical relevance of serum vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in patients with colorectal cancer [J].

Saudi J Gastroenterol, 2011, 17(3): 170.

[8] 任守忠, 郭建生, 李鑫, 等. 安胃丸对慢性胃炎大鼠血清炎症因子及胃黏膜核因子- κ B 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 198.

[9] 熊永爱, 韩丽, 王森, 等. 氧化苦参碱干预 I κ B- α 蛋白对溃疡性结肠炎的治疗作用机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 152.

[责任编辑 邹晓翠]

carcinoma HepG-2 cells, intervention durations were 24, 48, 72 h accordingly. The percentage of apoptotic cell were detected by FCM. The expression of protein Bcl-2 was analyzed by Western blot. **Result:** Inhibition rate of the hepatocellular carcinoma HepG-2 was obviously enhanced along with increase of the total flavonoids of *B. papyrifera* concentration, the effect is also showed in time course. Flow cytometry study revealed, with the concentration increased, the percentage of apoptotic cells raised after 48h. The expression of protein Bcl-2 was down-regulated along with increase of the total flavonoids of *B. papyrifera* concentration. **Conclusion:** The quartering can effectively inhibit tumor cell growth and induced tumor cells into apoptosis. It may be associate with the low expression of protein Bcl-2 in hepatocellular carcinoma cell line HepG-2.

[**Key words**] total flavonoids of *Broussonetia papyrifera*; hepatocellular carcinoma; proliferation; apoptosis

构树为桑科构树属植物又称楮叶,能清热利湿、凉血止血、杀虫解毒。《本草纲目》云:“去风湿肿胀,癬疮”;《现代使用中药》曰:“打虫毒及皮肤病”。构树属提取物具有抗真菌、抗病毒、抗过氧化、抗血小板形成等活性。黄酮类化合物具有抗炎、抗氧化等作用,对肺癌、宫颈癌、鼻咽癌等都有一定的抑制作用^[1-3]。但是对肝癌作用的研究很少。本实验观察构树叶总黄酮对肝癌 HepG-2 细胞的生长抑制和凋亡作用的影响,以此来探讨构树叶总黄酮的抗肿瘤作用。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌细胞株 HepG-2(由桂林医学院科学实验中心惠赠)。

1.2 药材 构树叶于 2010 年 9 月采集于桂林医学院药用植物园,由药学院天然药化教研室傅鹏博士鉴定其来源于桑科构树属植物构树 *Broussonetia papyrifera* 的叶子。构树叶总黄酮(TFBP,自提),提取方法、纯度参照文献[4]。

1.3 试剂 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT, Sigma);二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO, Sigma);1640 培养基(RPMI-1640);胎牛血清(FBS,上海玉博生物科技有限公司,GIBCO 16000-044);碘化丙啶(PI)和 RNaseA 购自 Sigma 公司;TRIzol RNA 抽提试剂购自 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒购自 MBI Fermentas 公司;SYBR Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒购自 Toyobo 公司;引物设计与合成由上海生工生物工程技术有限公司完成;其余试剂均为分析纯配制。

1.4 仪器 Thermo 型 CO₂ 培养箱(美国),Model-550 型酶标仪(BD),PCR 仪(Hybaid 公司,英国),FACSCanto II 型流式细胞仪(BD),电泳仪(Bio-Rad 公司,USA)。

2 方法

2.1 细胞培养及分组 将人肝癌 HepG-2 细胞接

种于含 10% 热灭活小牛血清的 RPMI 1640 培养液中,在 37 ℃,5% CO₂ 的培养箱中培养,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,每 1~2 d 传代 1 次。取对数生长期细胞进行试验。将构树叶总黄酮用 DMSO 溶解后,分别以 3,6,9,12 g·L⁻¹ 终质量浓度加入培养液,使 DMSO 终质量浓度为 0.1%,阳性对照组(顺铂 10 mg·L⁻¹),阴性对照组(添加 PBS),每个质量浓度及对照组均设 3 个平行孔。

2.2 MTT 法检测构树叶总黄酮对 HepG-2 细胞株的增殖抑制率 取对数生长期细胞以含 EDTA 胰蛋白酶消化 3 min 后,加入 2 mL 培养基终止消化,制成单细胞悬液后,离心去胰酶,加入培养基,制成单细胞悬液调整密度为 5×10⁵/mL 接种于 96 孔板中,每孔 180 μL,12 h 后观察细胞贴壁情况,加入不同质量浓度的药物 20 μL,每种质量浓度设 3 个平行复孔,同时设 PBS 阴性对照组,顺铂阳性对照组。培养至 24,48,72 h 加入 MTT,继续培养 4 h 后,加入 DMSO 150 μL,振荡,充分溶解结晶,选择 490 nm 波长酶联免疫检测仪测定各孔的吸光度(A)。

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

2.3 RT-PCR 法检测 Bcl-2, Bax 的表达 取对数生长期的人肝癌 HepG-2 细胞,制成单细胞悬液调整密度为 5×10⁵/mL,接种于一次性培养皿中,每皿 5 mL,12 h 后观察细胞贴壁情况,加入不同质量浓度的构树叶总黄酮,每种质量浓度设 3 个平行组,同时设 PBS 阳性对照组。药物作用 48 h 后终止培养,收集 HepG-2 细胞,采用 RT-PCR 方法检测 Bcl-2, Bax 基因的表达。细胞总 RNA 提取采用 TripureTM RNA 分离试剂盒并按照说明书进行,紫外分光光度计定量。PCR 扩增体系 12 μL, Bcl-2 基因上游引物:5'-CTCTCCCGCGACTCCTGA-3', 下游引物:5'-TCTTCAATCACGCGGAACACT-3', 各 2 μL, Taq 酶 0.2 μL, 与逆转录 cDNA 混匀,离心;扩增条件:37 ℃ 反转录 50 min, 94 ℃ 预变性 1 min, 94 ℃ 变性

30 s, 60 °C 退火 35 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 30 次, 72 °C 孵育 5 min。其产物长度为 301 pb。Bax 基因上游引物: 5'-GTCGCCCTTACTACTTTGCC-3', 下游引物: 5'-AAGACCACTCTTCCACACC-3', 各 2 μL, Taq 酶 0.2 μL, 与逆转录 cDNA 混匀, 离心; 扩增条件: 37 °C 反转录 50 min, 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 25 s, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 50 s, 循环 32 次, 72 °C 孵育 5 min, 其产物长度 381 pb。内参上游引物: 5'-AGAGCCTCGCCTTTGCCGAT-3', 下游引物: 5'-TGCCAGATTTTCTCCATGTCGT-3', 各 2 μL, Taq 酶 0.2 μL, 与逆转录 cDNA 混匀, 离心; 扩增条件: 37 °C 反转录 50 min, 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 50 s, 循环 30 次, 72 °C 孵育 5 min, 其产物长度 454 pb。PCR 产物 10 μL 上样缓冲液 2 μL, DNA Maker 10 μL, 于 1.4% 琼脂糖凝胶进行电泳观察。采用凝胶数字图像分析仪进行光度扫描, 观察各条带的灰度, 结果以目的基因的积分吸光度比值表示。

2.4 统计学处理 所有的数据均用 SPSS 17.0 统计软件分析, 用单因素方差分析组间差异的显著性。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 构树叶总黄酮对 HepG-2 细胞株增殖的抑制作用 MTT 结果显示, 人肝癌 HepG-2 细胞株经构树叶总黄酮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 ($P < 0.05$), 经单因素方差分析发现, 对肝癌 HepG-2 细胞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构树叶总黄酮质量浓度增加, 作用时间的延长, 诱导肿瘤细胞凋亡的作用越明显, 构树叶总黄酮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。

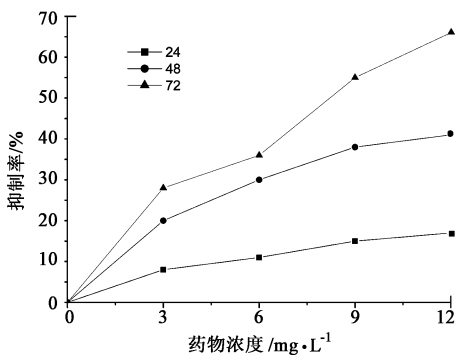
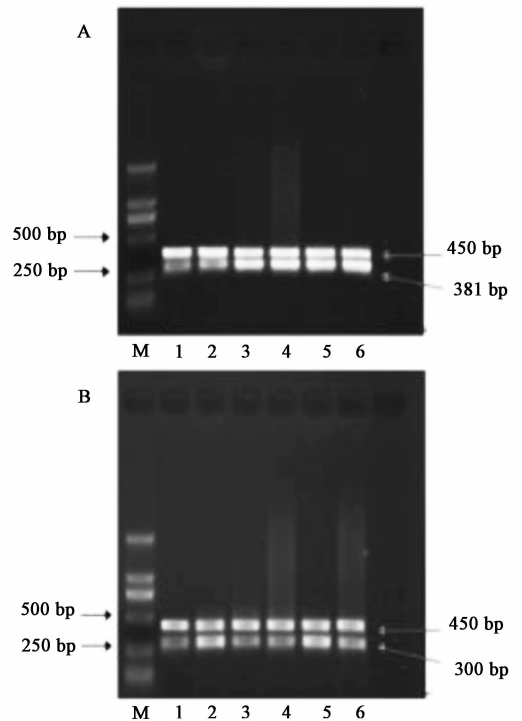


图 1 构树叶总黄酮对肝癌 HepG-2 细胞生长的影响

3.2 构树叶总黄酮对 Bcl-2, Bax 基因表达的影响

RT-PCR (反转录聚合酶链式反应) 观察到构树叶总黄酮作用 48 h 后 Bcl-2, Bax mRNA 基因的表达, 结果显示, 各组分别在 301, 381 bp 的位置上出现上述特异基因条带, 在 454 bp 的位置上出现了 β -actin 的特异片段 (图 2)。经过电泳条带灰度值分析可以看出, HepG-2 经构树叶总黄酮作用 48 h 后, 抑癌基因 Bcl-2 基因表达量呈逐渐下降的趋势, 6, 9, 12 g·L⁻¹ 组与对照组比较差异有显著性 (0.478 ± 0.085) vs (0.498 ± 0.014); (0.354 ± 0.004) vs (0.498 ± 0.014); (0.218 ± 0.075) vs (0.498 ± 0.014); 促凋亡基因 Bax 基因表达量随着质量浓度的升高表达量呈现上升趋势, 经统计分析 3, 6, 9, g·L⁻¹ 组与对照组比较差异有显著性 (图 3)。



A. Bax mRNA; B. Bcl-2 mRNA; M. 标识物; 1. 对照组; 2. 顺铂组; 3~6. TFBP 3, 6, 9, 12 g·L⁻¹ 剂量组

图 2 构树叶总黄酮处理 HepG-2 细胞 Bax, Bcl-2 mRNA 的影响

4 讨论

从天然植物或民族药物中寻找具有抗肿瘤活性的药物是抗肿瘤药物研究的主要途径之一^[5]。黄酮类化合物, 广泛存在于植物中, 如三羟异黄酮可以抑制乳腺癌生长, 大豆及丹贝异黄酮可以有效抑制妇科肿瘤的生长, 一枝蒿黄酮可通过调节凋亡基因表达诱导肝癌凋亡^[6-8]。本研究发现, 构树叶总黄酮对人肝癌 HepG-2 细胞具有增殖抑制作用, 并呈质量浓度和时间依赖性。

细胞凋亡通路主要包括内源性的线粒体通路和

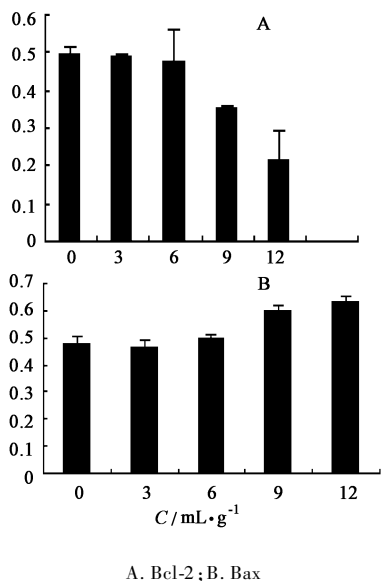


图3 构树叶总黄酮处理后 HepG-2 细胞 Bcl-2, Bax 基因表达变化

外源性的死亡受体通路,其异常与参与诸多疾病包括恶性肿瘤的发生发展过程。Bcl-2 家族主要通过线粒体通路发挥其促凋亡或抑制凋亡活性。Bcl-2 家族中备受关注的两大基因分别是 Bcl-2, Bax。Bcl-2 有“长寿基因”之称。Bcl-2 蛋白在体内组织分布比较局限,在肝细胞一般不表达。Bax 蛋白广泛分布于人体组织,尤其在肝细胞、肾小管上皮细胞核胰岛细胞等处高度表达。Bcl-2 抑制细胞凋亡是个多途径共同作用的结果,其一,细胞内质网 Ca⁺ 离子水平的升高是开启 Bcl-2 抑制凋亡程序的“金钥匙”。其二,Bcl-2 可以改变 P53 以及细胞周期蛋白核-胞浆转运,充当“运输官”阻止细胞凋亡^[9]。其三,Bcl-2 可发挥抗氧化剂的作用,使细胞保持“年轻态”。其四,Bcl-2 的“天敌”Bax, Bax 是存在细胞浆的“情报员”,当刺激或损伤发生时,与线粒体相关的 Bax 可与 Bcl-2 形成异源二聚体,而破坏正常状态下抗凋亡 Bcl-2 基因的工作,使细胞发生凋亡^[10]。Bcl-2 家族基因结构特性,家族内基因可“联合”可形成同源二聚体或异源二聚体,这些二聚体往往是决定细胞存亡的关键。细胞基因转染、转基因鼠和基因敲出鼠的研究均表明,Bcl-2 过表达能过抑制多种因素诱导的多种细胞凋亡;Bax 过表达不仅可使多种细胞发生自发凋亡,而且也可以促进许多因素诱导的多种细胞凋亡^[11-13]。其五,Bcl-2 可通过信号传导途径“强强联合”,活化 R-ras 的活性区域后,两者互相活化,这两个基因均可使阻止细胞凋亡。本实验通过 RT-PCR 观察到构树叶总黄酮作用 48 h 后 Bcl-2, Bax mRNA 的表达,与对照组比较,抑癌基因 Bcl-2 基因表达量呈逐渐下降的趋势,促凋亡基

因 Bax 蛋白表达量随着质量浓度的升高表达量呈现上升趋势。

综上所述,构树叶总黄酮能明显抑制肝癌 HepG-2 细胞的增殖,呈剂量和时间依赖性,其作用机制可能是通过抑制上调促凋亡基因 Bax 的表达,使下调抑癌基因 Bcl-2 蛋白水平表达逐渐升高,从而诱导 HepG-2 细胞凋亡。但是作为天然植物,其成分复杂,对于是否还存在其他途径和通道,需进一步深入研究证实。

[参考文献]

- [1] 朱开梅,刘建楠,顾生玖,等. 构树药用活性化学成分及药理临床应用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):198.
- [2] 吴世成,杨家林,万进军. 构树叶利尿活性研究[J]. 医学信息,2010,5(9):2307.
- [3] 董杨,季光,曹爱丽,等. 甜橙黄酮对人胃癌 AGS 细胞增殖和凋亡的作用及其机制研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(6):790.
- [4] 顾生玖,姚立新,刘建楠,等. 微波辅助法提取构树叶中总黄酮的工艺研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(2):782.
- [5] 于德泉. 天然产物与创新药物研究开发[J]. 中国天然药物,2005,3(6):321.
- [6] 徐德平,江汉湖. 大豆及丹贝异黄酮对乳腺癌、子宫癌、和卵巢癌细胞的抑制效应[J]. 食品科学,2001,22(6):6.
- [7] 王耕,黄韬,薛家鹏,等. 三羟异黄酮对人乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞体外抑瘤效应、细胞周期及凋亡的影响[J]. 肿瘤防治研究,2011,31(1):82.
- [8] 孙黎,罗强,张力,等. 金莲花黄酮对 A549 细胞生长及凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志,2011(1):82.
- [9] Miao Ruidong, Wei Juan, Lv Minghua. Conjugation of substituted ferrocenyl to thiadiazine as apoptosis-inducing agents targeting the Bax/Bcl-2 pathway[J]. Europ J medchem, 2012, 43(6):61.
- [10] 张力,龚明玉,李毅学,等. 放疗联合热疗诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡及其与 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达关系的研究[J]. 中国全科医学,2011,14(20):627.
- [11] Hyun J H, Kim S C, Kang J I, et al. Apoptosis inducing activity of fucoidan in HCT-15 colon carcinoma cells[J]. Biol Pharm Bull,2009,32(10):1760.
- [12] 肖广显,丁素银,程英俊,等. 索拉非尼联合热疗对肝癌 HepG-2 细胞中 Bax, Bcl-2 表达的影响[J]. 解放军医药杂志,2011,23(5):1.
- [13] Wang J, Kuropatwinski K, Hauser J, et al. Colon carcinoma cells harboring PIK3CA mutations display resistance to growth factor deprivation induced apoptosis[J]. Mol Cancer Ther, 2007,6(3):1143.

[责任编辑 邹晓翠]