

白藜药效成分没食子酸抑制人肝癌 HepG2 细胞生长及作用机制研究

杭佳¹, 张梦美¹, 叶晓川^{1*}, 陈树和², 刘焱文¹

(1. 湖北中医药大学药学院, 武汉 430061; 2. 湖北省中医院, 武汉 430061)

[摘要] **目的:**探讨从白藜抗肿瘤活性部位分离得到的没食子酸对人肝癌 HepG2 细胞生长的影响及其作用机制。**方法:**用不同浓度的没食子酸处理 HepG2 细胞, MTT 法测定没食子酸对 HepG2 细胞生长增殖的抑制活性; 采用 Hoechst 染色、荧光显微镜、Annexin V-FITC/PI 双标记法和流式细胞术观察凋亡细胞的形态结构变化以及定性、定量检测细胞凋亡; 采用 JC-1 染色检测 HepG2 细胞线粒体膜电位变化情况。**结果:**没食子酸在 12.5~200 mg·L⁻¹ 对 HepG2 细胞生长有明显抑制作用, 且呈一定的浓度依赖性; 没食子酸能诱导 HepG2 细胞凋亡, 降低细胞线粒体的膜电位。**结论:**没食子酸为白藜抗肿瘤主要活性成分之一, 通过降低细胞线粒体的膜电位而诱导细胞凋亡为其抗肿瘤作用机制之一。

[关键词] 没食子酸; HepG2 细胞; 细胞凋亡; 线粒体膜电位

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0291-05

HepG2 Proliferation Restriction and Active Mechanism of Gallic Acid as Active Compound in *Ampelopsis japonica*

HANG Jia¹, ZHANG Meng-mei¹, YE Xiao-chuan^{1*}, CHEN Shu-he², LIU Yan-wen¹

(1. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China;

2. Hubei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the effects and active mechanism of gallic acid (GA) as main active compound in *Ampelopsis japonica* (AJ) to HepG2 cells proliferation. **Method:** The MTT method was used to determine restriction activity of GA to HepG2 cells proliferation after HepG2 cells were treated with different GA concentration. Hoechst dyeing method, fluorescence microscope, annexin V-FITC/PI double-labeling method and flow cytometry method were used to observe morphological structure change of apoptotic cells and to detect cell apoptosis quantitatively and qualitatively. Finally, JC-1 dyeing method was used to detect the potential change of HepG2 cells mitochondrial membrane. **Result:** The restriction of GA to HepG2 proliferation is effective in concentration of 12.5-200 mg·L⁻¹. GA is concentration-dependence, and has an ability of inducing HepG2 cells apoptosis and reducing potential of mitochondria. **Conclusion:** GA is one of principle anti-tumor constituents of AJ. And one of its anti-tumor mechanism is inducing cell apoptosis by reducing potential change of mitochondria.

[Key words] gallic acid (GA); HepG2 cells; cell apoptosis; potential of mitochondrial membrane

没食子酸(gallic acid, GA)又名五倍子酸,是多种常见中药的有效活性成分^[1-3],具有抗病毒、抗真

菌、抗氧化、抗肿瘤等作用^[4]。前期研究显示,白藜的乙醚和乙酸乙酯部位及从乙酸乙酯部位分离得到的 P2, P3 组分对人肝癌 HepG2 细胞的增殖有较强的抑制作用^[5],进而从抗肿瘤活性最强的 P2 组分中,分离得到没食子酸等 7 个化合物。本研究考察了没食子酸对人肝癌细胞株 HepG2 细胞的抑制作用,并探讨其可能的作用机制,为诠释白藜抗肿瘤的物质基础及作用机制提供科学依据。

[收稿日期] 20120706(011)

[第一作者] 杭佳, 硕士, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 13628684025, E-mail: 370054174@qq.com

[通讯作者] * 叶晓川, 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 13871277719, E-mail: yxxc1965@163.com

1 材料

1.1 仪器 318C 型酶标仪 (Microplate Reader), 311 型二氧化碳培养箱 (美国 ThermoForma 公司产品), SW-CJ-2G 型超净工作台 (名牌之星), 细胞培养瓶 (加拿大 BIOFIL 公司产品), 倒置显微镜 (德国 Leica), 1/10 万电子天平 (德国赛多利斯产品), 96 孔板 (加拿大 BIOFIL 公司产品), 6 孔板 (加拿大 BIOFIL 公司产品)。

1.2 细胞株 人肝癌细胞 HepG2 细胞株由华中科技大学生命科学与技术学院提供。

1.3 药物与试剂 没食子酸 (由本课题组从白藜中分离得到, 纯度 > 95%, 用时以血清 1640 培养基配制不同的工作浓度), 胰蛋白酶, 链霉素 (华北制药股份有限公司), 青霉素 (悦康药业集团有限公司), 5-氟尿嘧啶 (上海旭东海普药品有限公司), 四甲基偶氮唑盐 (MTT, Amresco), 细胞培养液 (RPMI-1640 培养基, Gibco), 牛血清 (Gibco)。其他的试剂皆为分析纯。

2 方法

2.1 MTT 法检测细胞增殖抑制率^[6] 取对数生长期的 HepG2 细胞, 胰酶消化后制成细胞悬浮液, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μL , 0.4×10^4 个/孔, 加入时需要不断地搅拌细胞悬浮液, 以保证每孔细胞密度尽量均匀、一致。将铺有细胞的培养板置于培养箱中培养 6 ~ 18 h 后, 再加入 100 μL 的药液。温孵 48 h 后, 在显微镜下观察。每孔加入 20 μL MTT 溶液 ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 继续培养 4 h。然后吸去各孔的培养基, 加入 150 μL 的二甲基亚砜, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。最后在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光值。每块板子都设置调零组 (药品, 培养基, MTT, DMSO)、对照组 (细胞、与药品一致的溶解介质、细胞培养基, MTT, DMSO) 和阳性对照组 (PC, 5-Fu 质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。实验重复 3 次。

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

2.2 Hoechst 染色荧光显微镜观测细胞凋亡^[7] 取对数生长期的 HepG2 细胞接种于 6 孔培养板中, 每孔 1 mL, 6 ~ 18 h 后, 加入 1 mL 的没食子酸的药液, 使质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。作用 24 h 后小心用 PBS 冲洗 1 遍, 每孔加入 1 mL PBS, 加入 5 μL 的 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Hoechst 33342, 37°C 孵育 15 min 后, 吸去孔内试剂, 用 PBS 冲洗一遍, 再加入 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PI 50 μL , 4°C 避光反应 30 min, 吸去培养液, 用 PBS 洗涤, 置于荧光显微镜下, 在紫外光下观察细胞的凋亡

情况并照相。实验重复 3 次。

2.3 Annexin V-FITC/PI 双标记法检测细胞凋亡 HepG2 细胞常规预培养 6 ~ 18 h 后, 实验组分别换以含 $100, 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 终浓度的没食子酸的培养液, 对照组换以含等量 PBS 的 RPMI-1640 培养液。24 h 后用不含 EDTA 的胰酶消化, 收集细胞, PBS 洗 2 遍。将细胞悬浮于 Binding Buffer 中, 调整密度为 2.5×10^5 / 个, 与 FITC 标记的 Annexin V 混合, 加入 Propidium Iodide 混匀, 室温孵育 10 min 后, 离心, PBS 洗涤。缓冲液重悬细胞, PI 染色细胞。上流式细胞仪检测。

2.4 JC-1 染色检测 HepG2 细胞线粒体膜电位 HepG2 细胞常规预培养 6 ~ 18 h 后, 实验组换以含有 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 终浓度的没食子酸的培养基, 对照组换以含等量 PBS 的 RPMI-1640 培养基。24 h 后用不含 EDTA 的胰酶消化, 收集细胞, PBS 洗两遍。在流式管中加入 2 μL JC-1 储备液和 600 μL PBS 稀释液, 再与收集到的 HepG2 细胞混悬液混匀至混合液呈粉红色, 此时, 细胞的密度约为 1.6×10^5 / 个。孵育 20 min 后, 上流式细胞仪检测。

2.5 数据处理 运用 SPSS 10.0 统计学软件进行数据统计分析, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 没食子酸对 HepG2 细胞增殖的抑制作用 结果显示, 在 $12.5 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 没食子酸对 HepG2 细胞的增殖有较强的抑制作用, 其 24, 48, 72 h IC_{50} 分别为 48.97, 35.64, 35.48 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。没食子酸的抗肿瘤活性随着浓度的增加而增大, 显示其对 HepG2 细胞的增殖抑制存在着明显的剂量-效应关系, 并且呈现一定的时间依赖性。结果见表 1。

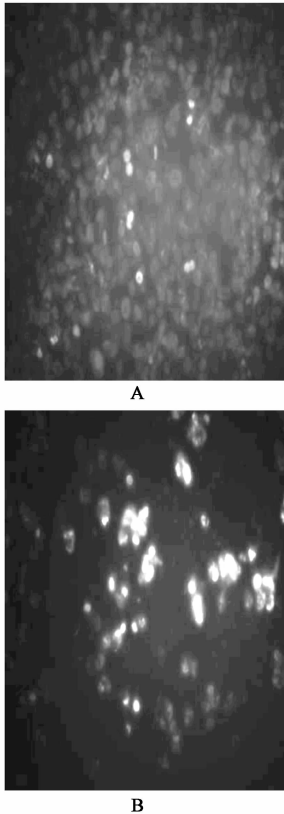
表 1 没食子酸作用于 HepG2 细胞 24, 48, 72 h 考察 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	生长抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
阴性对照	-	-	-	-
没食子酸	12.5	13.6 \pm 1.03	14.0 \pm 1.34	9.5 \pm 0.96
	25	15.0 \pm 1.25	15.9 \pm 1.03	12.0 \pm 1.14
	50	74.5 \pm 1.17	89.2 \pm 2.11	92.0 \pm 1.53
	100	76.2 \pm 0.95	89.4 \pm 2.05	92.5 \pm 1.31
	200	77.5 \pm 2.01	89.8 \pm 1.92	93.2 \pm 1.66
5-氟尿嘧啶	10	36.5 \pm 0.15	49.5 \pm 0.23	57.5 \pm 0.19

3.2 肿瘤细胞形态学变化 Hoechst 染色可以反应细胞凋亡情况, 细胞内有浓聚的蓝色荧光是凋亡细

胞,细胞内为均匀蓝色荧光的是正常细胞。

在荧光显微镜下可观察到:由 Hoechst33342 荧光染色结果可见,正常对照组的细胞着浅而均一的蓝色荧光,加药组可见被 Hoechst33342 染成不均一的亮蓝色细胞(图 1)。由此可见没食子酸处理过的 HepG2 细胞明显出现细胞凋亡。

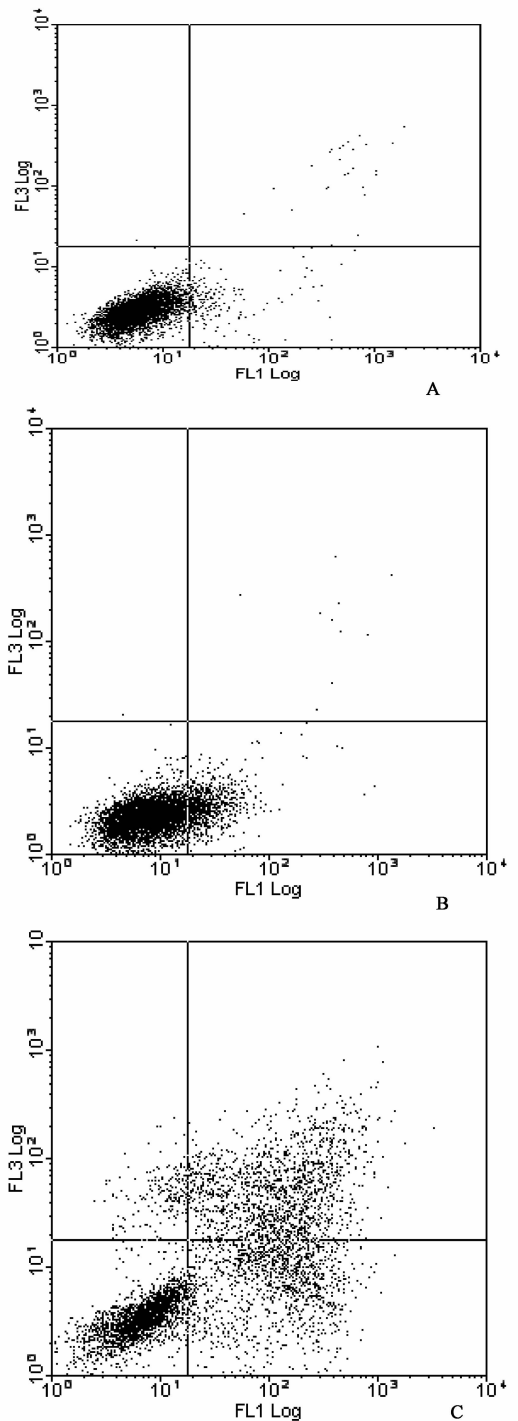


A. 对照组;B. 没食子酸($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

图 1 Hoechst33342 荧光染色观察 ($\times 200, 24 \text{ h}$)

3.3 没食子酸对 HepG2 细胞的诱导凋亡作用 PI-膜联蛋白-V 双重染色,可以很明显的把完整细胞、早期凋亡细胞或死亡细胞^[8]区分开来。细胞凋亡的早期会出现磷脂酰丝氨酸(PS)残基的外翻(自细胞膜内层转移至外层),Annexin V 能够与其特异而高亲和力的结合。因此,将凋亡细胞标记为 Annexin V 阳性,而 PI 染色阴性。坏死细胞因为已经失去了细胞膜的完整性,Annexin V 标记双阳,依此可与凋亡细胞鉴别。由实验结果可知:含 $50, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 没食子酸用药组细胞凋亡率分别是 16.86% , 25.32% , 凋亡率显著高于对照组自发凋亡率 3.57% 。结果见图 2,表 2。

3.4 没食子酸对 HepG2 细胞线粒体膜电位(MMP)的影响 JC-1 是一种碳氰化合物类阳离子荧光染料,可跨膜进入活细胞内定位于线粒体膜上,其聚集程度随线粒体膜电位升高而增加。JC-1 单体呈现



A. 对照组;B. 没食子酸($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);C. 没食子酸($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);
四格图中 LL 左下格为 Annexin V(-)/PI(-),表示为正常活细胞;
LR 右下格为 Annexin V(+)/PI(-),表示为包膜完整的凋亡细胞;
UL(左上)Annexin V(+)/PI(+),表示为包膜已破损的坏死细胞;
UR(右上)Annexin V(-)/PI(+),表示为细胞消化、
收集过程中包膜完整性受损的细胞

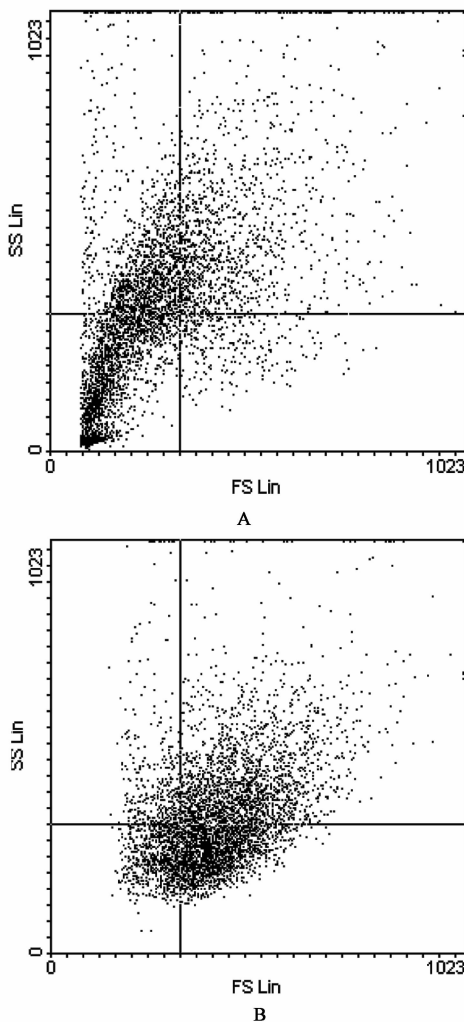
图 2 Annexin V-FITC/PI 双标记法染色观察

绿色荧光,聚集体呈现红色荧光。没食子酸作用 HepG2 细胞 24 h 后,与空白对照组比较有明显差异,细胞的红色荧光强度减弱(7.4%),绿色荧光增

表 2 PI-膜联蛋白-V 染色凋亡试验中的象限分布率

分组	剂量 /mg·L ⁻¹	QD			
		UL	UR	LL	LR
空白	0.04	0.48	95.91	3.57	
没食子酸	50	0.01	0.69	82.44	16.86
	100	3.36	28.6	42.71	25.32

强(38.19%),表明细胞 MMP 水平有所下降。实验结果表明,没食子酸能通过降低细胞的线粒体膜电位,最终诱导 HepG2 细胞的凋亡。结果见图 3,表 3。



A. 空白对照组;B. 没食子酸(100 mg·L⁻¹)

左上象限为红色荧光线粒体,右下象限为绿色荧光线粒体

图 3 没食子酸对 HepG2 细胞内线粒体膜电位 (MMP) 的影响

4 讨论

细胞凋亡又称程序性细胞死亡,是由细胞内特定基因操纵、调控的一种生理性或病理性的自杀性细胞死亡方式,诱导肿瘤细胞凋亡是目前许多抗肿

表 3 细胞内线粒体膜电位的象限分布(QD)率

组别	剂量 /mg·L ⁻¹	QD			
		UL	UR	LL	LR
空白	-	26.23	31.67	37.99	4.12
没食子酸	100	7.40	38.71	15.7	38.19

瘤药物作用的主要机制^[9-11]。Annexin V 是一种检测细胞早期凋亡的指标,灵敏度很高。它是一种磷脂结合蛋白,与 PS 有高度的亲和力,能够通过细胞外侧与包膜结合,研究中常常应用它来检测细胞凋亡。再与能够鉴定细胞死活的核酸染料 PI 合并使用,就能有效的区分凋亡细胞与坏死细胞。文献报道,细胞的凋亡可能与 MMP 降低有关^[12],阳离子荧光染料 JC-1 可跨膜进入活细胞内定位于线粒体膜上,可通过采用 JC-1 对细胞进行染色,检测 MMP 的变化。

本研究采用 Annexin V-FITC/PI 双标记法和 JC-1 染色检测 HepG2 细胞线粒体膜电位进行了没食子酸对 HepG2 细胞抑制作用机制的研究。结果表明,没食子酸通过降低细胞线粒体的膜电位而诱导细胞凋亡为其抗肿瘤的主要途径之一。没食子酸是本课题组从白藜抗肿瘤作用最强部分 P2 组分中分离得到最多的单体化合物。因此,没食子酸可能是白藜抗肿瘤的主要活性成分之一。

许多肿瘤的分化诱导剂、化学治疗药物、血管生成抑制剂均因毒性大而限制了其在临床上的应用。没食子酸为多种中药的主要活性成分,资源丰富,毒性小^[13],是一个很有前途的并有待广泛开发利用的抗肿瘤药物。

[参考文献]

- [1] 张广强,刘伟,尚遂存,等. 山茱萸核中脂肪酸的测定[J]. 中药材,1991,1(1):38.
- [2] 李玉东,刁勇,王立强. 芍药及其有效成分抗肿瘤作用的研究进展[J]. 海峡药学,2009,21(12):27.
- [3] 刘振丽,宋志前,李林福,等. HPLC 测定何首乌中抗氧化有效成分没食子酸和儿茶素在炮制前后含量的变化[J]. 中成药,2009,31(9):1392.
- [4] Barardi D, Sinoes C M. Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate[J]. Biol Pharm Bull,2008,31(5):903.
- [5] 张梦美,叶晓川,黄必胜,等. 白藜抗肿瘤活性部位的筛选研究[J]. 湖北中医药大学学报,2012,14(2):40.

四逆汤对实验性高脂血症合并动脉粥样硬化兔高、低密度脂蛋白及载脂蛋白 Apo-A, B 含量的影响

石晓理, 郁保生*, 吕瑶, 刘娟, 郜文辉
(湖南中医药大学中医学院, 长沙 410007)

[摘要] 目的: 通过系统观察四逆汤干预对实验兔高脂血症(HLP)合并动脉粥样硬化(AS)模型的高、低密度脂蛋白胆固醇(HDL-CH, LDL-CH)和载脂蛋白 A, B(Apo-A, Apo-B)的影响, 以期探寻四逆汤治疗 HLP 及干预 AS 形成的作用机制。方法: 采用高脂饲料喂养及耳缘静脉注射牛血清蛋白、皮下注射卵清白蛋白法建立兔 HLP 合并 AS 模型并将其随机分组; 分别应用四逆汤(高、中、低剂量)治疗方法, 采用空白组、模型组及西药组(给予阿托伐他汀)作为对照; 运用比色法测定干预后血中 HDL-CH, LDL-CH 含量的变化, 免疫比色法测定干预后血中 Apo-A, Apo-B 含量的变化。结果: ①LDL, Apo-B 含量: 四逆汤低、中剂量组指标值均小于模型组, 但差异无统计学意义; 四逆汤高剂量组指标值明显小于模型组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。②HDL, Apo-A 含量, HDL/LDL 比值, Apo-A/Apo-B 比值: 四逆汤各剂量组指标数值均高于模型组, 但低、中剂量组与模型组差异无统计学意义, 而高剂量组与模型组差异具有显著统计学意义($P < 0.01$)。结论: 四逆汤能够降低血中 LDL 和 Apo-B 的含量并使 HDL, Apo-A 含量升高是其能调节实验性兔 HLP 并 AS 模型血脂代谢的作用机制。

[关键词] 四逆汤; 高脂血症; 动脉粥样硬化; 高密度脂蛋白; 低密度脂蛋白; 载脂蛋白 A, B

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0295-05

Effect of Sini Decoction on HDL-CH, LDL-CH and Apo-A, B on Hyperlipidemia Combined with Atherosclerosis in Rabbits

SHI Xiao-li, YU Bao-sheng*, LV Yao, LIU Juan, GAO Wen-hui
(Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Sini decoction (it consist of Radix Aconiti Praeparata,

[收稿日期] 20120623(001)

[基金项目] 湖南省科技厅科技项目(2012SK3143); 湖南省教育厅课题(06C629)

[通讯作者] * 郁保生, 教授, 中医临床基础重点学科学术带头人, 从事伤寒论经方治病机制的研究, Tel: 13808465462, E-mail: ybs1955@126.com

- [6] 朱英环, 孟宪生, 包永睿, 等. 余甘子总酚酸和总黄酮配伍抑制肝癌细胞增殖及对免疫功能的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 132.
- [7] 杜琴, 胡兵, 沈克平, 等. 白藜芦醇联合姜黄素对 SMMC-7721 肝癌细胞作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 262.
- [8] Van Engeland M, Nieland L J, Ramaekers F C, et al. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure[J]. Cytometry, 1998, 31(1): 1.
- [9] 郭晓辰, 张军平. 中药调控血管平滑肌细胞凋亡的作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 288.
- [10] 夏亚飞, 阎姝. 重楼抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 304.
- [11] 刘玉军, 李刚, 马睿, 等. 天龙抗肿瘤研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 262.
- [12] Ly J D, Grubb D R, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) in apoptosis: an update[J]. Apoptosis, 2003, 8(2): 115.
- [13] Raijalakshmi K, Devaral H, Niranjali Devaraj S. Assessment of the no-dose-related-adverse-effect level (NOAEL) of gallic acid in mice[J]. Food and Chemical Toxicology, 2001, 39(9): 919.

[责任编辑 邹晓翠]