

绞股蓝总皂苷对人肝癌细胞 Bel-7402 增殖与凋亡的影响

李晓龙*, 吴育朗, 林子群, 莫森, 梁雅杏, 潘越, 刘诗良
(广西医科大学, 南宁 530021)

[摘要] **目的:**探讨绞股蓝总皂苷(gyenosides, Gyp)对人肝癌细胞 Bel-7402 增殖与凋亡的影响。**方法:**采用 MTT 法检测 Gyp 对体外培养的人肝癌细胞 Bel-7402 的增殖抑制作用;单细胞凝胶电泳法检测 Gyp 对人肝癌细胞 Bel-7402 DNA 损伤的影响;RT-PCR 技术从分子水平上检测 Gyp 对人肝癌细胞 Bel-7402 的诱导凋亡作用机制。**结果:**100~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Gyp 对人肝癌细胞 Bel-7402 增殖生长有抑制作用,Gyp (182 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 作用 4, 8, 12, 16, 24 h 后,单细胞凝胶电泳观测到 DNA 损伤,12 h 时 DNA 损伤最大,达到(81.15 \pm 14.23)% ,且有时间依赖性;caspase-8 大量表达,对照组细胞无表达。**结论:**Gyp 能抑制人肝癌细胞 Bel-7402 增殖且促进其凋亡,其作用机制与 DNA 损伤以及 caspase-8 的大量表达有关。

[关键词] 绞股蓝总皂苷;人肝癌细胞 Bel-7402;增殖与凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0238-04

Proliferation and Apoptosis Effects of Gypenosides on Human Hepatocellular Carcinoma Bel-7402 Cells

LI Xiao-long*, WU Yu-lang, LIN Zi-qun, MO Miao, LIANG Ya-xing, PAN Yue, LIU Shi-liang
(Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the suppressive effect of gypenosides (Gyp) on human hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells. **Method:** The growth inhibition of human hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells was detected by MTT assay. The DNA damage of human hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells was detected by single cell gel electrophoresis; RT-PCR was utilized to investigate the apoptosis of human hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells and its relationship with caspase-8 from molecule level. **Result:** Gyp (100-400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) inhibited the growth of human hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells. DNA damage was detected after Gyp (182 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) treated for 4, 8, 12, 16, 24 h. The change reached maximum at 12 h (81.15 \pm 14.23)% and with time-dependent. caspase-8 expressed strongly in Gyp group and nothing in control. **Conclusion:** Gyp has effects on cell viability, it could induce human hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells apoptosis, DNA damage and caspase-8 expression.

[Key words] gypenosides; human hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells; proliferation and apoptosis

绞股蓝,属葫芦科绞股蓝属植物,广泛分布于亚热带和北亚热带地区。其主要药用成分是绞股蓝总皂苷(gyenosides, Gyp)。研究表明,Gyp具有多种功效,其中 Gyp 抗肿瘤作用已被临床证实^[1]。Gyp 能抑制体外培养的人小细胞型肺癌 592/9、人肺癌

细胞 549 和 Calu1、人结肠癌 Colo205、人宫颈癌 HelaS3、人红白血病 K562 等细胞的增殖作用^[2-4]。Gyp 对术后患者的治疗以及恶性肿瘤的辅助治疗有明显的疗效^[5]。但有关 Gyp 的体外抑制癌细胞增殖作用以及诱导凋亡的具体机制研究尚少,本研究检测了 Gyp 对人肝癌细胞 Bel-7402 增殖和肝癌细胞 DNA 损伤的影响,初步探讨 Gyp 抑制癌细胞增殖以及诱导凋亡的作用机制。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌细胞 Bel-7402 购自中国科学

[收稿日期] 20120523(368)

[基金项目] 广西医科大学青年科学基金项目(02602211010);
实验室开放课题(02608211024)

[通讯作者] * 李晓龙,助教,硕士, Tel:0771-5358242, E-mail:
cellonglee@hotmail.com

院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 药物与试剂 绞股蓝总皂苷,由安康北医大制药有限公司提供,纯度为 85%,储存液质量浓度为 $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;1640 (solarbio);胎牛血清(四季青);谷氨酰胺 (solarbio);二甲基亚砷 (DMSO, solarbio);噻唑蓝 (MTT, solarbio);Tris (solarbio);RT-PCR 试剂盒及琼脂糖(天根生化)。

1.3 仪器 5810R 型高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司), E600 荧光显微成像系统 (Nikon 公司), CO_2 培养箱 (Thermo 公司)。

2 方法

2.1 人肝癌细胞 Bel-7402 的培养 细胞用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 , 饱和湿度培养箱中培养,取对数生长期细胞进行试验,用 2% 台盼蓝拒染法鉴定细胞活力 $>95\%$ 。

2.2 MTT 法检测对细胞增殖抑制作用 用胰蛋白酶消化汇合的单层细胞,将细胞密度用含胎牛血清的培养基调节为 2×10^5 个/mL,以 2×10^4 个/孔细胞接种在 96 孔培养板中进行培养, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 湿润环境中温育 1~3 d,等细胞进入指数生长期时加入药物 Gyp。实验分为无药对照组和 Gyp 组, Gyp 终质量浓度为 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 每组 4 个孔,同时设立阴性对照 (不加药)。加药培养孵育 24 h 后,每孔中各加入 100 μL 新鲜培养基,后在每孔加入 50 μL MTT ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)。 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 继续培养 4 h。弃去孔内上清液,每孔加入 100 μL DMSO,待沉淀完全溶解后,立即在 570 nm 处记录吸光度 (A),计算不同质量浓度 Gyp 作用后细胞的生长抑制率,并求出半数抑制率 (IC_{50})^[6]。

$$\text{细胞生长抑制率} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{加药}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

2.3 单细胞凝胶电泳检测细胞 DNA 的损伤 取质量浓度为 $182 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (IC_{50}) 的 Gyp 作用于密度为 2×10^5 /mL 的 Bel-7402 人肝癌细胞 4, 8, 12, 16, 24 h 后,采用改良碱性彗星电泳方法检测人肝癌细胞 Bel-7402 细胞 DNA 的受损情况^[7],倒置荧光显微镜观察并采集图像并分析。采用 TM 值 (Tail Moment, 定义为尾部 DNA 占总 DNA 的百分比与头、尾部中心间距的乘积) 为检测指标,因 TM 值与 DNA 损伤程度有良好的线性关系, TM 值的大小可以反映 DNA 的损伤程度^[8]。

2.4 RT-PCR 检测人肝癌细胞 Bel-7402 caspase-8 mRNA 表达 取含 10% 胎牛血清的 1640 培养基培养的人肝癌细胞 Bel-7402,随机分为两组,一组换含

$182 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Gyp 的培养基,另一组为无药对照组,继续培养 48 h 后中止培养。用试剂盒提取细胞总 RNA 后按逆转录试剂盒逆转录出 cDNA。PCR 反应条件为: $94\text{ }^\circ\text{C}$, 3 min; $94\text{ }^\circ\text{C}$, 30 s; $53\text{ }^\circ\text{C}$, 30 s; $72\text{ }^\circ\text{C}$, 1 min, 35 个周期; $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。caspase-8 上游引物为 5'-AGTGAATCACAGACTTTG-3',下游引物为 5'-ATCAGAAGGGAAGACAAG-3', 924 bp。 β -actin 内参,上游引物为 5'-CAACTCCATCATGAAGTGTAAC-3',下游引物为 5'-AGAGCCACCAACCCACACAGAG-3', 750 bp。取扩增产物 6.5 μL 与 Loading Buffer 1.3 μL 混匀后,在 1.2% 的琼脂糖凝胶 (每 100 mL 加 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溴化乙锭 5 μL) 中电泳。通过凝胶成像分析系统测定 A ,以目的基因与内参照基因吸光度 (A) 的比值作为 caspase-8 mRNA 的相对表达量。

2.5 统计学分析 实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件处理,生长抑制率与药物浓度的关系用直线相关分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 Gyp 对人肝癌细胞 Bel-7402 增殖的影响 Gyp 在 50~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,随着 Gyp 浓度增高其 A 逐渐降低。与对照组比较, Gyp 组细胞增殖被抑制。以 Gyp 不同质量浓度和肿瘤细胞生长抑制率作直线相关分析,相关系数 (r) = 0.962, $P < 0.05$ 。Gyp 处理细胞 24 h 的 IC_{50} 约为 (182 ± 0.046) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。见表 1。

表 1 Gyp 对人肝癌细胞 Bel-7402 的生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	A	抑制率/%
对照	0	0.847 ± 0.011	-
Gyp	50	$0.656 \pm 0.031^{1)}$	22.6
	100	$0.575 \pm 0.014^{1)}$	32.1
	150	$0.461 \pm 0.035^{1)}$	45.6
	200	$0.389 \pm 0.018^{1)}$	54.1
	250	$0.243 \pm 0.023^{1)}$	71.3
	300	$0.136 \pm 0.032^{1)}$	83.9
	400	$0.043 \pm 0.003^{1)}$	94.9

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ (图 1 同)。

3.2 Gyp 对人肝癌细胞 Bel-7402 DNA 损伤的影响 质量浓度为 $182 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Gyp 分别作用于人肝癌细胞 Bel-7402 4, 8, 12, 16, 24 h 后发现, 4 h 处理组细胞已有一定的 DNA 损伤 (35.31 ± 7.35)%, 在处理 12 h 时细胞 DNA 损伤达到最大为 (81.15 ± 14.23)%。见图 1。

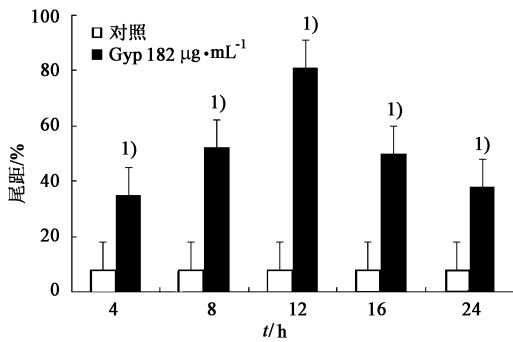
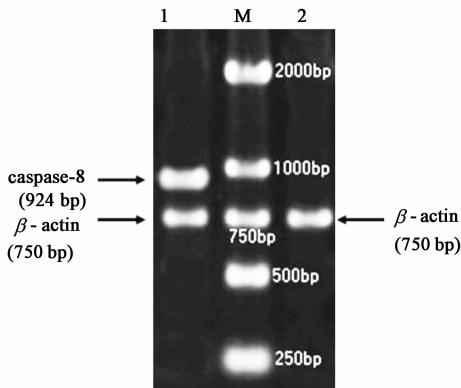


图 1 单细胞凝胶电泳检测 Gyp 对人肝癌细胞 Bel-7402 DNA 损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 电泳检测 RT-PCR 扩增产物 caspase-8 mRNA 在 Gyp 组细胞中大量表达 (0.634 ± 0.324), 说明 Gyp 能够活化人肝癌细胞 Bel-7402 的 caspase-8 mRNA, 使其高度表达。而对照组细胞 caspase-8 无表达。见图 2。



通道 M. DL 2000 marker; 通道 1. 对照; 通道 2. Gyp 48 h
图 2 人肝癌细胞 Bel-7402 caspase-8 RT-PCR 的表达

4 讨论

绞股蓝有多种药理作用, 研究发现三七绞股蓝药对及其总皂苷配伍具有抗血管重构的作用^[9]; 绞股蓝及复方通过降低 TGF-β₁ 表达, 减轻该因子致细胞增殖的作用, 减轻血管壁肥厚性重构^[10]。

本实验结果表明, 一定质量浓度的绞股蓝总皂苷能抑制人肝癌细胞 Bel-7402 的生长。绞股蓝总皂苷对人肝癌细胞 Bel-7402 作用 24 h 的 IC₅₀ 约为 182 μg·mL⁻¹, 且随着 Gyp 质量浓度的增加, 细胞存活率显著降低。Gyp 182 μg·mL⁻¹ 作用于人肝癌 Bel-7402 细胞 4 h 后, 能检测到细胞 DNA 损伤, Gyp 处理细胞 4 h 后, 已有 DNA 片段化产生, 12 h DNA 片段化严重, 然而 24 h DNA 损伤程度 < 12 h, 但仍 > 4 h。推测可能是 24 h 时, 细胞经过一段时间的自我修复, DNA 损伤可部分减弱。这提示一定浓

度的 Gyp 作用于肿瘤细胞后, 产生 DNA 损伤, 不能正常地复制, 最后抑制细胞的增殖。

含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解 caspase 家族, 是凋亡的主要执行者^[11-12]。有两类 caspase, 一类是起始者 (initiators), 另一类是执行者 (executioners), 起始 caspase 起凋亡激发和活性调节的作用^[13], 起始 caspase 在外来蛋白信号的作用下被切割激活, 激活的起始 caspase 对执行者 caspase 进行切割并使之激活, 被激活的执行者 caspase 降解细胞的结构蛋白和功能蛋白导致细胞凋亡, 诱导凋亡小体形成, 导致程序性细胞死亡^[14]。caspase-8 的活化是 caspase 级联反应的第一步。Gyp 组 caspase-8 mRNA 高表达, 而对照组不表达, 说明一定浓度的 Gyp 对人肝癌细胞 Bel-7402 的诱导凋亡有显著作用。随着对绞股蓝各成分及其作用机制研究的深入, 绞股蓝作为一种传统保健中药材必将对人类健康做出越来越大的贡献。

[参考文献]

- [1] 齐刚, 张莉. 绞股蓝研究新进展 [J]. 中草药, 1995, 26 (7): 377.
- [2] 刘华, 司履生. 绞股蓝总皂苷对体外培养肺癌细胞的抑制作用 [J]. 西安医科大学学报, 1994, 15 (4): 346.
- [3] 徐长福, 王冰, 任淑婷, 等. 绞股蓝总皂苷对小鼠 S180 肉瘤及 K562 细胞的抑制作用 [J]. 西安医科大学学报, 2002, 23 (3): 217.
- [4] 梁军, 汤小芳, 魏小龙. 绞股蓝总皂苷对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫功能的影响 [J]. 药学实践杂志, 1999, 17 (5): 279.
- [5] 李慧眷, 董碎珍, 王惠萍, 等. 绞股蓝总皂苷胶囊治疗肿瘤患者伴发高脂血症的临床观察 [J]. 中国民间疗法, 2001, 9 (3): 36.
- [6] R. I. 弗雷谢尼. 动物细胞培养-基本技术指南 [M]. 5 版. 北京: 科学出版社, 2008: 490.
- [7] 罗明志, 齐浩, 陈文芳, 等. 彗星实验检测紫外线诱导的 K562 细胞 DNA 损伤 [J]. 癌变·突变·畸变, 2006, 18 (5): 400.
- [8] Olive P L, Banner P B, Tice R R, et al. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay [J]. Radiat Res, 1990, 122 (1): 86.
- [9] 于涓, 陈德兴. 三七绞股蓝药对及其总皂苷配伍对兔动脉粥样硬化模型主动脉的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 (8): 120.

舒宁康水提液抗过敏药效研究

董银卯^{1*}, 张海娣¹, 孟宏², 张明明¹

(1. 北京工商大学, 北京 100048; 2. 中国中医科学院, 北京 100700)

[摘要] **目的:**观察舒宁康水提液对肥大细胞脱颗粒及组胺释放的影响,研究其抗过敏作用。**方法:**以卵蛋白(OVA)为致敏原,在 OVA 质量浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 30 min 条件下,观察舒宁康 $0.1, 1, 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 在体外对致敏大鼠肥大细胞脱颗粒及其释放组胺量的影响。**结果:**以色甘酸钠为阳性对照,舒宁康水提液具有明显的抑制肥大细胞脱颗粒作用,模型组、舒宁康水提液高、中、低剂量组及阳性对照组脱颗粒率分别为 $(47.53 \pm 5.57)\%$, $(25.11 \pm 2.56)\%$, $(35.71 \pm 6.99)\%$, $(47.11 \pm 4.26)\%$, $(22.87 \pm 6.52)\%$;舒宁康水提液对组胺的释放亦有显著的抑制作用,与模型组比,舒宁康水提液高、中、低组及阳性对照组的抑制率分别为 16.85%, 20.06%, 6.58%, 16.85%。**结论:**舒宁康水提液有良好的抗过敏作用,为将其开发成抗敏中药提供了实验依据。

[关键词] 舒宁康; 肥大细胞脱颗粒; 组胺释放

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0241-03

Antiallergic Effect of Aqueous Extract from Shuningkang

DONG Yin-mao^{1*}, ZHANG Hai-di¹, MENG Hong², ZHANG Ming-ming¹

(1. Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;

2. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antiallergic action of Shuningkang by investigating the effect of aqueous extract from Shuningkang on mast cell degranulation and histamine releasing *in vitro* by PMC degranulation percentage and histamine releasing assay. **Method:** OVA was used as allergen. In the concentration of $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 30 min conditions, the influences of aqueous extract from Shuningkang $0.1, 1, 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ on sensitized rat mast cell degranulation and histamine release were investigated. **Result:** The extract of Shuningkang could inhibit rat PMC degranulation and histamine releasing *in vitro*. PMC degranulation rates in model group, high, middle,

[收稿日期] 20120502(318)

[通讯作者] *董银卯,教授,硕士研究生导师,从事中草药化妆品研究, Tel:010-68987110, E-mail:yandong2008@163.com

[10] 文小平, 郑晓洁, 川崎宽也, 等. 三七、绞股蓝抗免疫血管重构的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(8):24.

[11] Nohara K, Yokoyama Y, Kano K, et al. The important role of caspase210 in sodium butyrate 2 induced apoptosis [J]. Kobe J Med Sci, 2007, 53(5): 2652273.

[12] Nakayama J, Ohtsuki M, Oda T. Caspase 2 independent cell death by Fas ligation in human thymus2derived T cell line, HPB2ALL cells [J]. Microbiol Immunol, 2007, 52(10):102921037.

[13] Wang Z L, Li J L, Wang C B. The role of tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand and polypeptide from chlamys farreri in UVA-induced apoptosis in HaCaT cells [J]. Chin Pharmacol Bull, 2007, 23(10): 1375.

[14] Lombardi L, Casani S, Ceccarilli N, et al. Programmed cell death of the nucellus during Sechium edule Sw. seed development is associated with activation of caspase-like proteases [J]. J Exp Bot, 2007, 58(11): 2949.

[责任编辑 何伟]