

肝复康胶囊对人肝癌细胞系 HepG2 的影响

万元泰¹, 刘小敏^{2*}, 虞金宝³, 黄惠明¹, 丰平⁴, 吴华强²

(1. 南昌大学医学院, 南昌 330006; 2. 江西中医学院, 南昌 330006;
3. 江西省中医药研究院, 南昌 330046; 4. 首都医科大学, 北京 100069)

[摘要] **目的:**探讨肝复康胶囊抑制人肝癌细胞系 HepG2 增殖的作用机制。**方法:**采用 MTT 比色法测定肝复康胶囊对人肝癌细胞系 HepG2 细胞增殖的影响;用流式细胞仪分析细胞周期、细胞凋亡,分析各时期细胞周期的变化;用免疫细胞化学方法检测药物作用后诱导凋亡蛋白 Omi/HtrA2 和 casepase-3 的表达。**结果:**肝复康胶囊具有较好的抑制 HepG2 细胞增生的作用,呈现出时间-剂量依赖性;应用肝复康胶囊后 HepG2 细胞 G₂ 期比例升高, G₁ 期和 S 期细胞比例降低,并使细胞凋亡率升高。**结论:**肝复康胶囊能够抑制人肝癌细胞系 HepG2 增殖,促进其凋亡。

[关键词] 肝复康胶囊; 肝癌细胞; 流式细胞术; 细胞周期; 细胞凋亡

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0165-04

Effect of Ganfukang Capsule on Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2

WAN Yuan-tai¹, LIU Xiao-min^{2*}, YU Jin-bao³, HUANG Hui-ming¹, FENG Ping⁴, WU Hua-qiang²

(1. Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006, China;
2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China;
3. Research Institute of Jiangxi Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330046, China;
4. Capital Medicine University, Beijing 100069, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of action of Ganfukang capsule to human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. **Method:** The effect of cell proliferation of Ganfukang capsule to human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was determined by MTT colorimetric. The cell cycle, cell apoptosis was analyzed by flow cytometry. Detect induction apoptosis protein Omi/HtrA2 and casepase-3 expression after the action of drug was observed by immunocytochemical method. **Result:** Ganfukang capsule had good inhibitory effect on HepG2 cell proliferation, showing a time-dose dependent. Application of Ganfukang capsule increased the proportion of HepG₂ cells in G₂ phase, reduced the proportion of G₁ phase cells and S phase cells, and made the apoptosis rate increased. **Conclusion:** Ganfukang capsule can inhibit proliferation of hepatoma cell line HepG2, and promote their apoptosis.

[Key words] Ganfukang capsule; hepatoma carcinoma cell; flow cytometry; cell cycle; cell apoptosis

肝复康主要由五味子、太子参和白花蛇舌草 3 味中药组成,临床主要用于急、慢性肝炎,早期肝硬

化和肝功能不良^[1]。为进一步探讨肝复康干预肝癌发生、发展的药理作用机制,本文以人肝癌细胞(HepG2)为研究对象,探讨肝复康对人肝癌细胞生长增殖的影响及诱导凋亡的作用,为完善肝复康的药理作用机制提供理论和实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌细胞株 HepG2 由北京肿瘤防

[收稿日期] 2011-07-06

[第一作者] 万元泰,硕士研究生, E-mail: 363873022@qq.com

[通讯作者] *刘小敏,教授,从事中西医结合研究, E-mail: liuxmxxx@163.com

治研究所提供。

1.2 噻唑蓝(MTT)、Rnase A、羟乙基哌嗪乙硫磺酸 [4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid), HEPES]、碘化丙啶(PI),均购自 Sigma; Rabbit monoclonal anti-Omi/HtrA2, 购自 santa cruz (sc52927); Mouse monoclonal anti-cleaved caspase-3, 购自 cst (D175); 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (ZB2301), 购自中杉金桥公司。

1.3 仪器 CKX31 倒置显微照相仪(日本 Olympus 公司), 680 酶标仪(美国 BioRad 公司), EPICS XL-型流式细胞仪(美国 Bechman Coulter 公司)。

1.4 肝复康的制备 取五味子破碎, 加 5 倍 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 滤过, 合并滤液, 回收乙醇, 备用; 另取太子参、白花蛇舌草加 8 倍水煎煮 3 次, 每次 2 h, 滤过, 滤液与醇提液合并, 减压浓缩至相对密度 1.32 ~ 1.35 (60 °C), 减压干燥, 粉碎成细粉, 即得含生药 4.7 g·g⁻¹ 浸膏, 备用。

2 方法

2.1 人肝癌细胞株 HepG2 培养及传代 细胞用含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U·L⁻¹、链霉素 100 mg·L⁻¹ 的 DMEM 培养基在 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养, 隔天换液, 2 ~ 3 d 传代 1 次。细胞用 0.25% 胰酶消化液消化, 用对数期细胞进行实验。

2.2 对人肝癌细胞株 HepG2 生长抑制作用 用 MTT 比色法检测。取对数生长期细胞制成单细胞悬液, 按 1 × 10⁵ 个/孔接种于 96 孔细胞培养板, 细胞贴壁后, 无血清过夜; 药物处理组分别加入肝复康 (2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 g·L⁻¹), 每个浓度设 3 个复孔, 对照组加入完全 DMEM 培养液, 阳性药物组加入 5-FU 0.05 mmol·L⁻¹。MP 及 MA 均用完全 DMEM 培养液配置, 经培养基稀释, 过滤, 调整 pH 后使用; 细胞置 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养 24, 48, 72 h, 加入 5 g·L⁻¹ MTT 液 20 μL, 孵育 4 ~ 6 h, 吸弃上清液后, 每孔加入二甲基亚砷 150 μL, 震荡 10 min, 溶解微小结晶。于全自动酶标仪 570 nm 处测定各孔吸光度(A), 共重复 3 次。

2.3 流式细胞术分析细胞周期 取对数生长期细胞接种于 6 孔培养板中, 加入肝复康 1.25 g·L⁻¹, 对照组加入完全 DMEM 培养液, 阳性药物组加入 5-FU 0.05 mmol·L⁻¹。每个药物组设 3 个复孔。药物作用 72 h 后, 消化细胞并收集, 预冷 PBS 洗涤细胞 2

次, 离心 (1 000 r·min⁻¹ × 5 min) 弃上清, 用 70% 乙醇固定, 4 °C 过夜。测试前用 PBS 液洗去乙醇 (2 次), 先加入 RNA 酶 200 μL (终质量浓度 50 mg·L⁻¹), 37 °C 作用 30 min, 再加入碘化丙啶 (PI) 400 μL (终浓度 50 mg·L⁻¹), 避光染色 30 min, 流式细胞仪检测。流式细胞仪采集窗内 10 000 个细胞, 运用分析软件 MultiCycle 分析细胞周期。将不易区分的群体细胞分成 3 个亚群 (G₁ 期, S 期和 G₂/M 期)。

2.4 免疫细胞化学方法 检测 Omi/HtrA2, caspase-3 的表达 将无菌的圆玻片放到 24 孔板中, 将密度 1 × 10⁵ 个/mL 细胞接种于培养板中, 待细胞贴壁时, 弃掉培养基, 无血清过夜。参考 MTT 的实验结果, 选择肝复康 1.25 g·L⁻¹、阳性对照 5-FU 0.05 mmol·L⁻¹、阴性对照为 DEME 完全培养基。分别作用细胞 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 h。分别在各时间点用无菌的镊子夹出圆玻片, 转至旧的 24 孔板, PBS 洗 3 遍, 4% 的多聚甲醛 4 °C 固定 15 ~ 30 min。吸去固定液后用 PBST 洗 3 次。用 3% 的 H₂O₂ 封闭 8 ~ 10 min, 室温, 避光。PBS 洗。将圆玻片从 24 孔板中取出, 在滤纸上蘸干后, 正面朝上放在载玻片上, 标记, 放进湿盒内。加 5% 的 BSA 室温封闭 20 min, 然后甩掉封闭液, 直接加一抗, 4 °C 过夜, PBS 洗; 加二抗, 37 °C, 20 min, PBS 洗。DAB 显色, 镜下观察至棕黄色颗粒出现。自来水终止。脱水, 加拿大树胶封片。Leica Qwin 显微镜照相。

2.5 统计学处理 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。P < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 不同时间、不同质量浓度肝复康对 HepG2 增殖的影响 肝复康 1.25, 2.5 g·L⁻¹ 有较好的抑制人肝癌细胞 HepG2 增生的作用, 呈现出时间-剂量依赖性, 因此, 选取了 48 h, 1.25 g·L⁻¹ 的肝复康, 作为后续实验的用药标准。见图 1。

3.2 细胞周期检测 流式细胞仪检测发现, HepG2 细胞经药物作用 48 h 后, G₁ 期细胞比例明显提高 (P < 0.05), G₂ 和 S 期比例显著降低 (P < 0.01), 细胞凋亡率显著增加 (P < 0.01), 见表 1。

3.3 细胞 Omi/HtrA2 和 caspase-3 的表达 免疫细胞化学检测发现肝复康组在 30 h 时间点诱导出资氨酸蛋白酶 (棕黄色的颗粒, Omi/HtrA2), 且该蛋白酶主要集中在较小的细胞胞浆中, 空白对照组中

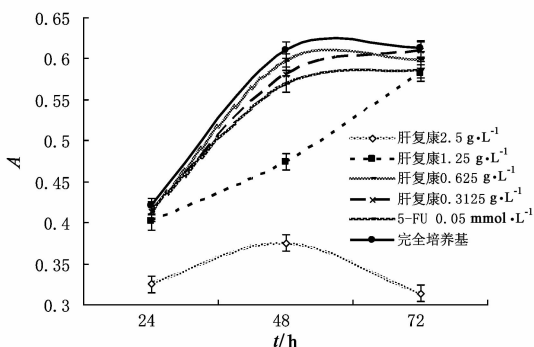


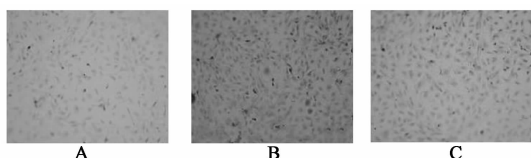
图1 不同时间、不同质量浓度肝复康对 HepG2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表1 肝复康对 HepG2 细胞周期和凋亡率的影响 (48 h) ($n = 3$)

组别	剂量/g·L ⁻¹	G ₁	G ₂ /M	S	凋亡率 %
空白对照	-	63.288	25.736	10.976	0
肝复康	1.25	71.456 ¹⁾	23.928 ¹⁾	4.616 ²⁾	15.041 ²⁾
5-FU ³⁾	0.05	91.605 ¹⁾	7.884 ²⁾	0.511 ²⁾	25.295 ²⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ 5-Fu 的浓度单位为 mmol·L⁻¹。

几乎没有 Omi/HtrA2 的表达产生(图2);另外,肝复康组在 48 h 的时间点发现了 casepase-3 的表达(图3)。



A. 对照组; B. 肝复康组; C. 5-Fu 0.05 mmol·L⁻¹组(图3同)

图2 肝复康干预 30 h 对 HepG2 细胞 Omi/HtrA2 表达的影响(免疫细胞化学, ×20, $n = 3$)

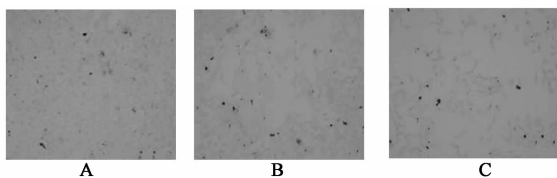


图3 肝复康干预 48 h 对 HepG2 细胞 casepase-3 表达的影响(免疫细胞化学, ×20, $n = 3$)

4 讨论

原发性肝癌是常见的恶性肿瘤之一。在肝癌形成的过程中,细胞通过遗传基因先天和后来的相继变化逃逸了正常细胞周期的调控,导致肿瘤细胞无限制地增殖。因此,恶性肿瘤治疗的中心环节就是设法干扰恶性肿瘤细胞的细胞周期,从而使其增殖减慢或诱导其凋亡^[1]。我们在前期实验中发现,肝

复康胶囊在治疗肝纤维化方面疗效显著,能够通过降低氧化损伤达到保护肝脏的作用。

本研究发现,肝复康能够显著抑制肝癌细胞的增殖,并呈现一定的时间-剂量依赖性;应用了肝复康后,处于 S 期(DNA 合成期)细胞的比例显著减少,凋亡峰(Ap)出现在了 G₁ 期(DNA 合成前期)之前,且 G₁ 期细胞比例明显升高,这提示肝复康可能将肝癌细胞周期阻滞在 G₁ 期,抑制了 DNA 的合成,从而达到抑制或延缓肝癌进程的作用。在流式细胞检测结果的提示下,我们关注了肝复康诱导肝癌细胞凋亡的作用。

细胞凋亡是一种由基因调控的、高度有序的、能量依赖和一系列酶参与的细胞主动死亡过程^[2-3],分为半胱氨天冬氨酸蛋白酶(caspase)依赖性途径和 caspase 非依赖性途径,其中以前者为主。目前已证实 caspases 活化途径主要有 3 条:死亡受体途径,线粒体途径和内质网途径。这 3 条途径最终主要激活凋亡效应酶即 caspase-3,进而通过水解多种重要的蛋白而导致细胞凋亡。其中,线粒体途径中的 Omi/HtrA2 是新近发现的促凋亡因子,位于线粒体膜间隙,已显示对多种肿瘤细胞具有促凋亡效应^[4]。Omi/HtrA2 由 458 个氨基酸残基组成,相对分子质量 50×10^3 ,其基因位于人类染色体 2p12^[5-6]。在凋亡信号的刺激下 Omi/HtrA2 与 cytochrome C, Smac 一起释放入胞浆,并经过自身酶切转变成成熟形式,相对分子质量 38×10^3 。胞浆中成熟的 Omi/HtrA2 可以解除凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)对 caspases 的阻抑作用^[7],进而引起 caspase 级联放大反应,从而加速凋亡的进行^[8]。

我们选取了线粒体凋亡途径中的 Omi/HtrA 2 和 caspase-3 2 个指标来观察肝复康胶囊对肝癌细胞的促凋亡作用。通过免疫细胞化学的方法,我们发现,仅在 30 h 这个时间点有 Omi/HtrA 2 的大量表达,而在 48 h,细胞中有大量表达的 casepase-3,这就解释了凋亡途径是相继发生的级联反应,Omi/HtrA2 的表达早于 casepase-3 的激活。说明凋亡蛋白确实存在,肝复康胶囊可以诱导肝癌细胞凋亡蛋白的表达,从而促进肝癌细胞的凋亡。

[参考文献]

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂 [S] (第 7 册), 1993:77.

竹节参总皂苷对脑缺血大鼠神经细胞凋亡和 即早基因表达的影响

贾占红¹, 赵晖^{2*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100102; 2. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069)

[摘要] 目的: 观察竹节参总皂苷(TSPJ)对脑缺血再灌注大鼠神经细胞凋亡和早期快速反应基因 c-fos, c-jun 表达的影响。方法: 60 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平组、TSPJ 组(200, 100, 50 mg·kg⁻¹)。线栓法制备大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤模型; HE 染色检测脑组织病理变化; TUNEL 法检测神经细胞凋亡; 免疫组化方法检测 c-fos, c-jun 的表达。结果: 脑缺血再灌注损伤后, 模型组大鼠脑组织病理损伤明显, TUNEL 细胞较假手术组显著增多($P < 0.01$), c-fos, c-jun 表达较假手术组明显增强($P < 0.01$); TSPJ 可明显改善模型大鼠脑组织病理形态, TSPJ(200, 100 mg·kg⁻¹)组与模型组相比, TUNEL 阳性细胞数明显减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), c-fos, c-jun 阳性表达减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论: 对脑缺血损伤具有保护作用, 其作用可能是通过下调 c-fos, c-jun 蛋白表达, 从而干预脑缺血后的神经细胞凋亡。

[关键词] 竹节参总皂苷; 脑缺血再灌注损伤; 细胞凋亡; c-fos; c-jun

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0168-05

Effects of TSPJ on Neuronal Apoptosis and Related Gene Expression in Rat Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury

JIA Zhan-hong¹, ZHAO Hui^{2*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

[收稿日期] 20110114(006)

[基金项目] 北京市优秀人材资助项目(20051D0501823); 首都中医药与护理专项基金(11zyh07)

[通讯作者] * 赵晖, 博士, 副教授, 从事心脑血管疾病的基础研究, Tel: 010-83911635, E-mail: zhaohui8957@ sina. com

[2] 包素珍, 郑小伟, 宋红, 等. 十全大补汤对小鼠 Lewis 肺癌转移及肿瘤细胞周期的影响[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(12): 2479.

[3] Siegel R M. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(4): 308.

[4] Hail N Jr, Carter B Z, Konopleva M, et al. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys[J]. Apoptosis, 2006, 11(6): 889.

[5] Tatsushi Igaki, Yasuyuki Suzuki, Naoko Tokushice, et al. Evolution of mitochondrial cell death pathway: proapoptotic role of HtrA2/Omi in drosophila [J]. Biochemi Biophys Res Commun, 2007, 356(4): 993.

[6] Donna Amran, Yolanda Sanchez, Carlos Fernandez, et al. Arsenic trioxide sensitizes promonocytic leukemia cells to TNF α -induced apoptosis via p38-MAPK-regulated

activation of both receptor-mediated and mitochondrial pathways[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2007, 1773(11): 1653.

[7] Tomomi K, Donald D Newmeyer. Bel-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis [J]. Current Opinion in Cell Biology, 2003, 15: 691.

[8] Hans K, Lorenzo, Santos A Susin. Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death [J]. FEBS Letters, 2004, 557: 14.

[9] Althaus J, Siegelin, Dehghani F, et al. The serine protease Omi/HtrA2 is involved in XIAP cleavage and in neuronal cell death following focal cerebral ischemia/reperfusion [J]. Neurochemistry International, 2007, 5: 172.

[责任编辑 何伟]