

## 攻癌夺命组方对肝癌细胞系 HepG2 的杀伤作用研究

许筱梅, 袁房均\*, 张有顺, 邹灿, 戴宗晴, 钱行  
( 郧阳医学院附属东风总医院肝脏外科研究所, 湖北 十堰 442000)

[摘要] 目的: 探讨中药组方攻癌夺命汤对肝癌细胞系 HepG2 的杀伤作用及作用机制。方法: 攻癌夺命汤煎剂与肝癌细胞系 HepG2 共培养后, 分别用 MTT 法检测煎剂对肝癌细胞的杀伤作用, 用 RT-PCR 方法检测缺氧诱导因子 HIF1 (Hypoxia-inducible factor 1)、凋亡相关分子 Bax 和 Bcl-2 等基因的 mRNA 表达变化。结果: 攻癌夺命汤对肝癌细胞系 HepG2 的杀伤作用明显, 且随浓度增高而增强, 按生药量计  $6.375 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  药液质量浓度 3 d 时的细胞毒作用达到 80% 以上; 药物作用使 HepG2 的 HIF1 的表达迅速升高, 12 h 即达到 3 倍以上; 凋亡相关分子的变化在不同药液浓度有所差别: 在  $2.125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  药液作用时 Bax 的增加幅度要大于 Bcl-2。在  $4.250 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  药液作用下, 在早期 Bcl-2 和 Bax 都增加, 24 h 后二者表达均下降。结论: 中药组方攻癌夺命汤对肝癌细胞系 HepG2 有很强的杀伤作用。药物作用后缺氧诱导因子 HIF1 迅速升高提示其作用机理可能是影响到细胞呼吸所致。药物可能对细胞凋亡有一定作用。

[关键词] 攻癌夺命汤; 肝癌细胞; 细胞杀伤; 缺氧诱导因子

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0145-04

## Observation on Cytotoxic Effect of Herb Decoction Gongai Duoming Tang to Hepatocellular Carcinoma Line HepG2

XU Xiao-mei, YUAN Fang-jun\*, ZHANG You-shun, ZOU Can, DAI Zong-qing, QIAN Hang  
( Institute of Liver Surgery, Dongfeng Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan 442008, China )

**[Abstract] Objective:** To investigate the effect of the herb decoction Gongai Duoming Tang (GADMT) on hepatocellular carcinoma (HCC) cell line HepG<sub>2</sub>. **Method:** MTT was used to detect the cytotoxicity of the decoction to HepG2 and RT-PCR was used to detect the expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF1) and the apoptosis-related genes Bax and Bcl-2 in HCC cell line after treated by GADMT decoction. **Result:** MTT demonstrated that the GADMT decoction had a strong cytotoxicity to HepG2 as much as 80% after treating the cells with  $6.375 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  of concentration; the treatment also increased the expression of HIF1 promptly at 3 h and as high as 3 times at 24 h later; but the change of the Bax as well as Bcl-2 were more sophisticated. **Conclusion:** The GADMT decoction has a strong cytotoxic effect on HCC cell line HepG2 and the mechanism might be related with interrupting or damaging the cell respiration since a prompt increase of the expression of HIF1. The decoction may have also an influence on the cell apoptosis.

**[Key words]** Gongai Duoming Tang; hepatocellular carcinoma cell; cytotoxicity; hypoxia-inducible factor 1

[收稿日期] 20100421(005)

[基金项目] 湖北省教育厅重点项目 (D200724003), 十堰市科技局科技攻关项目 (十科发 [2008] 024D), 郧阳医学院创新团队项目 (2008CXG03)

[第一作者] 许筱梅, 主治医师, 主要研究方向: 中医肿瘤

[通讯作者] \* 袁房均, Tel: 0719-8272283, E-mail: zlib125@yahoo.com.cn

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一。由于肝癌对化疗的耐药性, 手术治疗及其他物理治疗如冷冻、栓塞、微波等是治疗肝癌的主要手段。近年来从分子生物学水平探寻新的肿瘤治疗靶点日益引起重视。中药抗肿瘤作用日益成为研究热点, 中药防治恶性肿瘤已取得了较明显的疗效<sup>[1]</sup>。随着分子生物

学的发展,从分子生物学角度探讨中药防治肿瘤的机理取得较大进展。

中药研究在充分发挥中医药特长,逐步提高中医药治疗肿瘤的疗效的过程,经历了从验方研究到单体研究再到组方研究的循环过程<sup>[2]</sup>。本文将李可的攻癌夺命汤煎剂<sup>[3]</sup>用于人肝癌细胞系 HepG2 的体外研究,从分子水平观察该方对肝癌细胞系中缺氧诱导因子 HIF1 及凋亡相关分子 Bax 和 Bcl-2 表达的影响,为进一步探讨组方中不同成分的组合对肿瘤细胞的不同影响及机理提供实验基础。

### 1 材料

**1.1 受试药物** 本实验药方选自李可的攻癌夺命(以下简称“攻癌”方)组方:海藻 3 g,生甘草 3 g,木鳖子 3 g,鳖甲 3 g,白花蛇舌草 3 g,夏枯草 3 g,蚤休 3 g,海蛤壳 3 g,黄药子 3 g,生半夏 3 g,生姜 3 g,玄参 3 g,生牡蛎 3 g,大贝 1.5 g,山慈菇 1 g,山豆根 1 g。制备方法:加 400 mL 水,室温浸泡 1 h 后,置高压锅内 121 30 min 灭菌后,无菌条件下收集药液 200 mL,按生药量计为 21.25 g · L<sup>-1</sup> 室温冷却,4 过夜后调 pH 至中性,分装, - 40 保存备用。药材鉴定由本院副主任中药师陆莲英鉴定均为正品。用于细胞实验时将该药液以不同比例与培养基混合,并同时补充相应量的胎牛血清及生理盐水以使培养基比例相同。分别制备成含生药 6.375, 4.250, 2.125g · L<sup>-1</sup> 质量浓度的培养液。

**1.2 细胞株** 人肝癌细胞系 HepG2 购自武汉大学典型培养物保藏中心,在本实验室传代保存。

**1.3 仪器** CO<sub>2</sub> 培养箱(6500TC,法国 Thermo 公司),生物安全柜(HFsafe1200,上海 Heal Force 公司),冷冻低温离心机(MR23i,法国 Jouan 公司),制冰机(MDF-5400,日本三洋公司),紫外分光光度计(HITACHI U-0080D,日本),PCR 仪(Veriti 96-well Thermal cyler,美国 ABI 公司),实时荧光定量 PCR 仪(Rotor Gene-6000,澳大利亚 Rotor Gene 公司),水平电泳仪(北京六一仪器厂),凝胶成像分析系统(BioImaging systems,美国 UVP 公司)。

**1.4 试剂** RPM1640 培养基(美国 GiBCo 公司),胎牛血清(杭州四季青生物有限公司),TRIzol Reagent(美国 Invitrogen 公司),逆转录试剂盒(美国 Fermentas 公司),PCR 反应试剂盒(北京 TianGen 公司),PCR 引物均为上海生工生物公司合成,DNA Marker(Takara 公司),琼脂糖(AMRESCO 公司),其

他试剂均为国产分析纯试剂。

### 2 方法

**2.1 细胞培养** 人肝癌细胞系 HepG2 细胞培养条件:RPM1640 培养基,含 10% 胎牛血清,Hepes 25 mmol · L<sup>-1</sup>,谷氨酰胺 2 mmol · L<sup>-1</sup>,NaHCO<sub>3</sub> 0.2% 及 2-巯基乙醇 10 μmol · L<sup>-1</sup>,青、链霉素双抗 100 u · mL。在 37 饱和湿度及 5% CO<sub>2</sub> 条件下进行培养,2 d 换液 1 次。

**2.2 MTT 法检测细胞杀伤作用<sup>[4]</sup>** 取各处理组对数生长期细胞(包括试验组,对照组),胰酶消化后调整细胞浓度为 1 × 10<sup>6</sup> /mL。取 200 μL 接种于 96 孔板,培养 24 h 后弃上清,给药组分别加入 6.375, 4.250, 2.125 g · L<sup>-1</sup> 质量浓度的含药培养液,对照组加入相应量的生理盐水于培养液中,置 5% CO<sub>2</sub> 37 培养箱中孵育 24 ~ 72 h 后,加入 MTT 10 μL(5 g · L<sup>-1</sup>),继续培养 4 h;弃培养上清液,加入二甲亚砜(DMSO) 150 μL/孔,振摇 10 min 后于酶标仪 570 nm 处读取吸光度(A)。每个浓度组平行 4 孔,取平均值,根据 A 值计算细胞杀伤率 = (1 - A 实验) / A 对照 × 100%。

**2.3 细胞系总 RNA 抽提** 应用 TRIzol Reagent 总 RNA 抽提纯化试剂盒,按说明书抽提培养的 HepG2 细胞总 RNA,用紫外分光光度计测定总 RNA 纯度和含量。

**2.4 RT-PCR 和 Real time RT-PCR<sup>[6]</sup>** 按照逆转录试剂盒说明书,使用 oligd(T) 18 将上述 RNA 逆转录成 cDNA,使用 NCBI 网站 PCR 引物设计软件设计引物,详见表 1。

表 1 RT-PCR 中的引物序列

引物名称		引物序列
HIF1	上游引物	5'-ACAGCAGCCAGACGATCATGC-3'
	下游引物	5'-CCTGCAGTAGGTTTCTGCTGCCT-3'
Bax	上游引物	5'-TTTGCTTCAGGGTTTCATCC-3'
	下游引物	5'-CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA-3'
Bcl-2	上游引物	5'-GGATGCCTTTGTGGAAGTGT-3'
	下游引物	5'-AGCCTGCAGCTTTGTTTCAT-3'
GAPDH	上游引物	5'-CTTTGACGCTGGGGCTGGCA-3'
	下游引物	5'-TGGCAGGGACTCCCCAGCAG-3'

PCR 扩增条件为 HIF1 : 95 5 min, 95 30 s, 60 30 s, 72 45 s, 30 个循环,最后 72 延伸 5 min; Bcl-2, Bax 的条件为 95 5 min, 95 30 s, 58 30 s, 72 40 s, 30 个循环,最后 72 延

伸 5 min。取 15  $\mu\text{L}$  扩增产物置于 2% 琼脂糖凝胶电泳, 使用 UVP 凝胶成像分析系统采集荧光信号, 并使用系统软件分析吸光度, 以 PCR 产物/GAPDH 的灰度比值表示其表达量。Real time-PCR 时在反应液中加入 1  $\mu\text{L}$  SYBR Green I (Roche, Basel, Switzerland), 其他条件同上。扩增在 Rotor Gene-6000 上进行并采集荧光信号, 通过与 GAPDH 的比值做相对定量分析。

**2.5 统计学处理** 数据用单因素方差分析进行显著性检验,  $P < 0.05$  具有显著性差异。

### 3 结果

**3.1 “攻癌”方对肝癌细胞的杀伤作用** 在 HepG2 培养液中加入 2.125 ~6.375  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的“攻癌”方液, 培养 24 ~72 h 后用 MIT 法检测“攻癌”方对肝癌细胞的杀伤作用发现: 不同浓度的“攻癌”方对所实验的肝癌细胞系均有明显的杀伤作用, 且浓度和时间成反比, 6.375  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  终质量浓度在 24 h 时杀伤率即达到 50% 左右, 72 h 时可达到 80% 以上; 2.125  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  终质量浓度在 72 h 时杀伤率也达到 30% (表 2)。

表 2 “攻癌”方对 HepG2 细胞的杀伤作用(  $\bar{x} \pm s, n=4$  )

质量终浓度 $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞杀伤 / %		
	24 h	48 h	72 h
2.125	6.3 $\pm$ 2.5	24.2 $\pm$ 5.3	31.7 $\pm$ 5.4
4.250	25.0 $\pm$ 4.3	41.7 $\pm$ 4.7	55.8 $\pm$ 5.6
6.375	47.3 $\pm$ 5.1	74.5 $\pm$ 6.3	88.4 $\pm$ 6.1

**3.2 “攻癌”方的有效成分可被吸附** “攻癌”方药液富含胶性成分, 难以过滤, 放置一段时间或离心后有沉淀出现。如果将药液直接保存, 即使置 -40 低温, 3 周后对细胞的杀伤作用明显下降, 由新煎剂的 76% 下降至 13%。为探讨药效下降的原因, 将保存药液重新加热后再做实验, 对 HepG2 的杀伤作用又可恢复到 58%。表明“攻癌”方中有杀伤作用的有效成分可能被其中的有形成分吸附, 而且该吸附作用是可逆的。

**2.3 “攻癌”方作用于肝癌细胞后引起相关基因表达的改变** 为了探讨“攻癌”方的细胞毒作用的分子机理, 我们检测了部分基因 mRNA 的表达。由于 6.375  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  药液作用后的细胞存活细胞较少, 基因表达也受到严重抑制, 检测结果误差大。这里仅报道通过对 2.125, 4.250  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  药液作用 48 h 内的 HepG2 的基因缺氧诱导因子 1 (Hypoxia-inducible

factor 1a, HIF1)、凋亡相关分子 Bcl-2 和 Bax 表达变化。

**2.3.1 HIF1 表达变化** 对药液作用后的肝癌细胞的缺氧诱导因子 mRNA 检测表明, HIF1 在药液作用前 12 h 即开始表达增加, 达到对照的 3 倍以上, 并在 24 h 继续增加, 但到 48 h 时表达下降(图 1)。

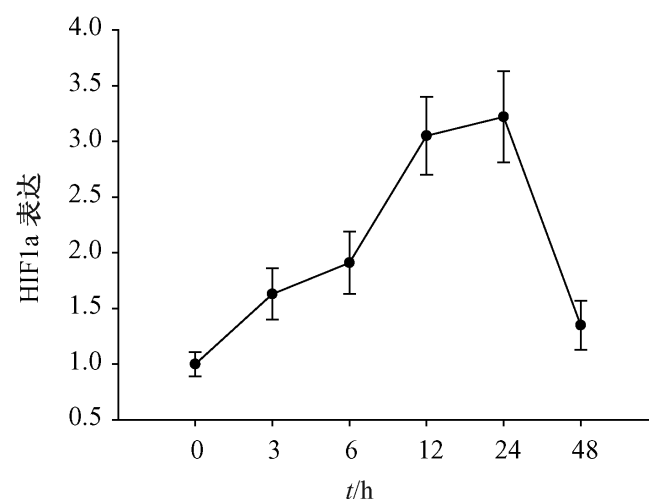


图 1 HepG2 细胞经“攻癌”方药液 4.250  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  作用不同时间 HIF1 mRNA 表达的改变(GAPDH 为对照)

**2.3.2 凋亡相关分子 Bcl-2 和 Bax 的表达变化** 检测结果表明受到药液作用后, 无论 Bcl-2 还是 Bax 的表达都增加, 但在不同药液作用浓度时表现有所差异。在 10% 药液作用时, 从 12 h 到 24 h 二者都增加, 且 Bax 的增加幅度要大于 Bcl-2。此后二者趋于相等甚至 Bcl-2 大于 Bax, 在 48 h 时 Bcl-2 和 Bax 表达均下降; 在 20% 药液作用下, 在早期 Bcl-2 和 Bax 都增加, 但增加幅度较小, 随后 Bcl-2 的增加幅度逐渐超过 Bax, 24 h 后二者表达均下降(图 2)。

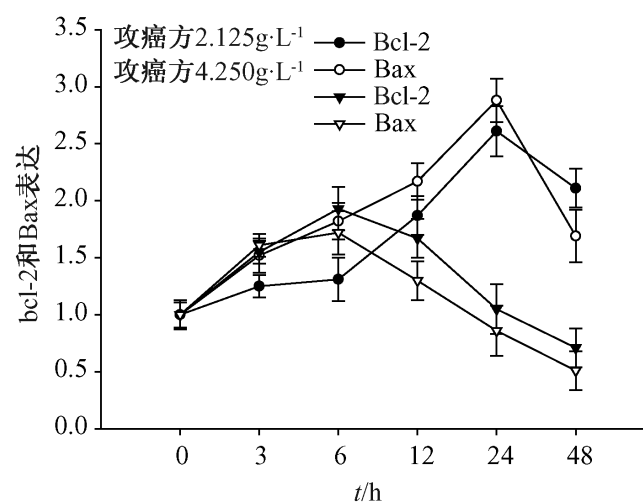


图 2 HepG2 细胞经“攻癌”方药液作用不同时间凋亡相关分子表达

### 3 讨论

攻癌夺命汤为李可先生所创, 对多种肿瘤具有确切临床效果<sup>[3]</sup>。本研究旨在从细胞及分子水平探讨其作用机理。在细胞水平, “攻癌”方显示了明显的细胞毒作用。由于中药煎剂均通过口服后经过吸

收转运到身体内各个部位而发挥作用, 因此通过发现肿瘤细胞的分子生物学改变, 将有助于进一步筛选方剂的有效成分或不同成分的作用靶点。

应用实时荧光定量 RT-PCR 对受药液作用后肝癌细胞系 HepG2 的 mRNA 检测发现 HIF1 表达增加。由于药液对细胞的杀伤作用在早期即呈现, 且杀伤作用极强, 而细胞缺氧是 HIF1 表达增加主要诱导因素<sup>[5]</sup>, 因此推测对细胞的杀伤作用可能由药液成分抑制或阻断了细胞呼吸链所致。

除 HIF1 外, “攻癌”方还引起肝癌细胞系凋亡基因的 Bcl-2 和 Bax 的表达改变, 但是比较复杂。综合分析 Bcl-2 和 Bax 的表达改变与药物浓度及作用时间的关系可见: 在低浓度药液早期作用下, 细胞表现为 Bcl-2 和 Bax 二者都升高, 但 Bax 升高的幅度更大些, 其综合效果将使细胞凋亡增加; 在低浓度药液晚期作用或高浓度药液作用下, Bcl-2 增加的幅度逐渐超过 Bax。由于药液对细胞的杀伤作用在短期即明显显现, 细胞凋亡在其中贡献很小<sup>[6]</sup>。但是既然缺氧过程和 HIF1 的高表达都将促进抗凋亡过程增强<sup>[7]</sup>, 本实验结果反映了“攻癌”方中有诱导细胞凋亡的成分存在。这种诱导细胞凋亡的因素在体内过程可能发挥一定的作用。而晚期的抗凋亡因素增强则可能正是 HIF1 的作用结果<sup>[8]</sup>。

总之, 本实验在证明“攻癌”方对肝癌细胞系 HepG2 有较强的细胞杀伤作用; 在早期即诱导 HIF1 mRNA 表达增加, 提示其细胞杀伤作用可能通过抑制或阻断细胞呼吸链完成; 同时“攻癌”方中

可能还存在着诱导细胞凋亡的成分。进一步对该方的每一味药做细胞水平分析以期找到发挥不同作用的有效成分是下一步目标。

#### [参考文献]

- [1] 钱伯文. 中医药防治肿瘤从基因层面探讨[J]. 上海中医药杂志, 2005, 39(6): 5.
- [2] 王秀峰, 苏式兵. 中药及其成分干预肿瘤转移实验研究进展[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(22): 2583.
- [3] 李可. 李可老中医急危重症疑难病经验专辑[M]. 山西科技出版社, 2006: 335.
- [4] Zhang Y S, Yuan F J, Jia G F, et al: CIK cell from patients with HCC hold strong cytotoxicity to multidrug-resistant cell line Bel-7402/R [J]. World J Gastroenterology, 2005, 11(22): 3339.
- [5] Loo G, Schumacker P T. Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia-reperfusion[J]. Cell Death and Differentiation, 2008, 15(4): 686.
- [6] Thompson S, Loftus L, Ashley M, et al. Ubiquitin-proteasome system as a modulator of cell fate[J]. Curr Opin Pharmacol, 2008, 8(1): 90.
- [7] Rankin E B, Giaccia A J. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis [J]. Cell Death and Differentiation, 2008, 15(4): 678.
- [8] Krohn K A, Link J M, Mason R P. Molecular imaging of hypoxia[J]. J Nucl Med, 2008, 49(6): 129S.

[责任编辑 聂淑琴]