

苦参碱抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖及其 对 VEGF、MMP-9 表达的影响^①

赵海亮^{1,2}, 黄桂柳³, 黄赞松⁴②, 周喜汉⁴, 邓志华⁴, 覃月秋⁴

(1. 桂林医学院研究生学院, 广西 桂林 541000;

2. 右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000;

3. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000;

4. 右江民族医学院消化疾病研究所, 右江民族医学院附属医院消化内科, 广西 百色 533000)

摘要: **目的** 研究苦参碱(matrine, Ma)抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖及其对血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质金属蛋白酶-9(matrix meta-lloproteinase-9, MMP-9)表达的影响,探讨其抗肝癌作用可能的分子机制。**方法** 设 Ma 组和阴性对照组, Ma 组设 5 个药物梯度,采用 0.2 mg/ml、0.4 mg/ml、0.8 mg/ml、1.6 mg/ml、3.2 mg/ml 浓度的苦参碱分别作用于对数生长期的 HepG2 细胞,MTT 法检测苦参碱对细胞生长的抑制作用,Real-time PCR 检测 VEGF mRNA 表达,蛋白质印迹法(Western Blot, WB)检测 VEGF 和 MMP-9 蛋白的表达。**结果** 苦参碱能抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖,呈时间和剂量依赖性。苦参碱能下调 VEGF mRNA 表达($P < 0.05$)和 VEGF、MMP-9 蛋白的表达($P < 0.05$)。**结论** 苦参碱在体外能抑制肝癌细胞增殖,呈时间和剂量依赖性,其可能的分子机制是通过下调 VEGF 和 MMP-9 蛋白表达,抑制肝癌血管生成,进而起到抗肝癌作用。

关键词: 苦参碱;癌,肝细胞;血管内皮生长因子;基质金属蛋白酶-9

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2016)01-0001-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.01.001

Matrine in inhibiting cell proliferation and its effects on expressions of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9 in human liver cancer HepG2 cell lines

Zhao Hailiang^{1,2}, Huang Guiliu³, Huang Zansong⁴, Zhou Xihan⁴, Deng Zhihua⁴, Qin Yueqiu⁴

(1. Graduate College of Guilin Medical University, Guilin 541000, Guangxi, China;

2. Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;

3. Graduate College of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;

4. Digestive Diseases Institute of Youjiang Medical University for Nationalities, Digestive System Department of Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the anti-hepatocellular carcinoma molecule mechanism of matrine (Ma) by observing cell proliferation and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in human liver cancer HepG2 cell lines. **Methods** A Ma group and a negative control group were created in this study. The Ma group included 5 drug concentrations gradients. The HepG2 cell lines at exponential phase were cultured in vitro and treated with 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.8 mg/ml,

① **基金项目:**广西自然科学基金资助项目(2014GXNSFAA118143);广西高校优秀人才基金资助项目(20077029);广西卫生厅课题基金重点基金资助项目(200887)

② **通讯作者,** E-mail: huangzansong@hotmail.com

1.6 mg/ml and 3.2 mg/ml matrine, respectively. HepG2 cell lines viability was measured by a MTT assay. Expressions of VEGF mRNA were measured by using a Real-time PCR. A Western Blot was applied to examine the protein levels of VEGF and MMP-9. **Results** Matrine significantly inhibited the proliferation of human cancer HepG2 cell lines in a dose- and time-dependent manner. Matrine could down-regulate VEGF mRNA expression ($P < 0.05$) and the expressions of VEGF and MMP-9 proteins ($P < 0.05$). **Conclusion**

Matrine showed satisfactory results in inhibiting the proliferation of HepG2 cell lines in vitro in a dose- and time-dependent manner, which might be achieved by down-regulating the expression of VEGF and MMP-9 and by inhibiting the hepatocellular carcinoma vascular formation for anti-liver cancer.

Key words: matrine; carcinoma, hepatocellular; vascular endothelial growth factor; matrix metalloproteinase 9

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球第 5 大常见的恶性肿瘤, 占肿瘤致死原因的 3 位, 全球每年有 80 万新发肝癌病例, 其中一半以上在中国^[1], 广西发病率较高, 为肿瘤致死原因的第 1 位^[2]。有一半以上的肝癌患者在首诊时便被确诊为晚期^[3], 虽可通过手术、经肝动脉化疗栓塞、局部消融及放疗等治疗, 但总体疗效差^[4-5], 因此寻找新的抗肝癌药物成为治疗 HCC 的研究热点。苦参碱 (matrine, Ma) 是从中药苦参中提取的有效成分, 已有研究表明其具有抗肝癌等多种抗肿瘤作用^[6-7], 我们课题组先前研究发现, 苦参碱具有抑制肝癌细胞增殖和增强顺铂抗肝癌细胞株及肝癌移植瘤作用, 对人正常肝细胞 L02 无明显损伤^[8-12]。临床上肝癌疗效差的原因之一是其早期就易发生侵袭、转移, 至目前, 苦参碱抗肝癌作用的机制尚未明确。迄今, 苦参碱在抑制肝癌血管生成方面的研究少有报道, 本实验以肝癌细胞株 HepG2 为研究对象, 观察不同浓度 Ma 对 HepG2 细胞增殖及 VEGF、MMP-9 表达的影响, 探讨其作用的可能分子机制, 为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 HepG2 细胞株购自中科院上海细胞库, 由本实验中心传代、保存。苦参碱注射液 [广州杰景药业有限公司 (广州白云山明兴制药有限公司, 批号: 140101, 规格: 50 mg: 5 ml × 5 支/盒)], DMEM 培养基购自 Gibco 公司, 胎牛血清购自 Hylcone 公司, 0.25% 胰蛋白酶消化液-EDTA、青链霉素混合液、PVDF 膜 (0.45 μm) 购自北京索莱宝科技有限公司。RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、SYBR premix Ex Taq II 试剂盒及引物购自大连宝生物公司。VEGF、MMP-9 一抗及二抗购自 Santa Cruz Biotechnology、武汉博士德公司, 内参一抗购自北京中杉金桥生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2 细胞复苏后, 用 DMEM 培养液 (含 10% 小牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μg/ml) 培养, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养。细胞呈贴壁状态, 每 2~3 天传一代, 均使用指数生长期细胞进行实验。

1.2.2 MTT 法检测 Ma 对 HepG2 细胞增殖抑制情况 设 Ma 组、阴性对照组 (加入培养基、药物和 HepG2 细胞) 和空白对照组 (只加入培养基和药物), Ma 组设 5 个药物梯度, 每组设 5 个复孔。制备浓度为 5×10^4 /ml 的细胞悬液, 接种于 96 孔细胞培养板, 100 微升/孔。待细胞贴壁后 (培养 12 h 后), 弃旧培养基, 分别向实验组加入含 Ma 培养液 (浓度分别为 0.2 mg/ml、0.4 mg/ml、0.8 mg/ml、1.6 mg/ml、3.2 mg/ml), 200 微升/孔; 向阴性对照组和空白对照组加入新培养液 200 微升/孔。继续培养 24 h、48 h、72 h 后, 分别向各组加入 5 mg/ml MTT, 15 微升/孔, 继续孵育 4 h。吸净上清液后加入 DMSO, 150 微升/孔, 置恒温振荡箱中, 37 °C、100 r/min, 振荡 10 min。在全自动酶标仪上于 490 nm 波长处测定光密度值 (OD), 取各复孔平均 OD 值进行比较, 计算 Ma 对 HepG2 细胞作用 24 h、48 h、72 h 后的抑制率 (IR)。计算公式: $IR(\%) = [1 - (\text{实验药物组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值}) / (\text{阴性对照组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值})] \times 100\%$ 。

1.2.3 Real-time PCR 检测 HepG2 细胞 VEGF mRNA 表达 根据细胞计数结果, 调整细胞密度为 1×10^6 个/毫升, 各浓度 Ma 分别作用 HepG2 细胞 48 h 后, 采用 TaKaRa 试剂盒提取细胞总 RNA, 按 Prime-Script RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time) 逆转录试剂盒说明书制备 cDNA。以 cDNA 为模板, GADPH 为内参进行 Real-time PCR 扩

增。使用引物序列, VEGF 引物: 上游 5'-TGG AGT GTG TGC CCA CTG AG-3', 下游 5'-TGC ATT CAC ATT TGT GCT GTA G-3', 扩增片段长度 117 bp; GAPDH 引物: 上游 5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3', 下游 5'-TGG TGA AGA CGC CAG TGG A-3', 扩增片段长度 138 bp。反应体系如下: 2×SuperReal PreMix Plus 10 μl, 上、下游引物(浓度 10 μmol/L)各 0.8 μl, cDNA(原液)2 μl, 50×ROX Reference Dye 1 μl, RNase Free dH2O 6.4 μl, 总体积 20 μl。反应条件: 预变性 95℃ 30 s 1 个反应循环, 95℃ 10 s、60℃ 34 s, 共 40 个循环; 55℃~95℃ 30 s 共 81 个反应循环。PCR 扩增结束后, 分析仪即显示标准曲线、扩增曲线和熔解曲线。用 2- $\Delta\Delta$ Ct 法计算扩增倍数。

1.2.4 Western blot 检测 HepG2 细胞 VEGF 和 MMP-9 蛋白表达 取终浓度 Ma 处理 HepG2 细胞 48 h 后, 强 RIPA(与 PMSG 100:1 预混)裂解液提取各组细胞总蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 取总

蛋白 20 μg 制备蛋白样品上样, 进行 10% SDS-PAGE 胶电泳, PVDF 转膜, 膜封闭 2 h 后, 一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次(10 分/次), 加二抗(HRP 标记的羊抗鼠抗体), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次(10 分/次), 用化学发光法曝光显影。

1.2.5 统计学方法 用 SPSS 16.0 软件对所得数据进行统计学分析, 计量资料采用($\bar{x} \pm s$), 组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), 多组间均数的两两比较采用 LSD 法检验, 率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 Ma 对 HepG2 细胞增殖的影响 经 0.2 mg/ml、0.4 mg/ml、0.8 mg/ml、1.6 mg/ml、3.2 mg/ml 浓度 Ma 分别作用于 HepG2 细胞 24 h、48 h、72 h 后, 结果显示 Ma 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用随着药物浓度增加及作用时间的延长而显著增强, 呈剂量与时间依赖性, 与对照组相比差异有统计学意义($F = 259.406, P < 0.05$), 详见表 1、图 1。

表 1 Ma 对 HepG2 细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Ma 质量浓度 (mg/ml)	24 h		48 h		72 h	
	A _{490nm}	抑制率(%)	A _{490nm}	抑制率(%)	A _{490nm}	抑制率(%)
0	0.53±0.01	0.00	0.52±0.01	0.00	0.54±0.02	0.00
0.2	0.49±0.09 ^a	7.67	0.48±0.01 ^a	7.45	0.48±0.01 ^a	10.29
0.4	0.48±0.01 ^a	10.23	0.45±0.02 ^a	13.95	0.45±0.01 ^a	16.83
0.8	0.41±0.02 ^a	23.27	0.39±0.02 ^a	26.24	0.37±0.03 ^a	30.55
1.6	0.34±0.03 ^a	36.81	0.30±0.01 ^a	42.04	0.28±0.01 ^a	47.01
3.2	0.23±0.02 ^a	57.45	0.14±0.01 ^a	73.82	0.12±0.01 ^a	77.87

注: 与阴性对照组比较, a: $P < 0.05$

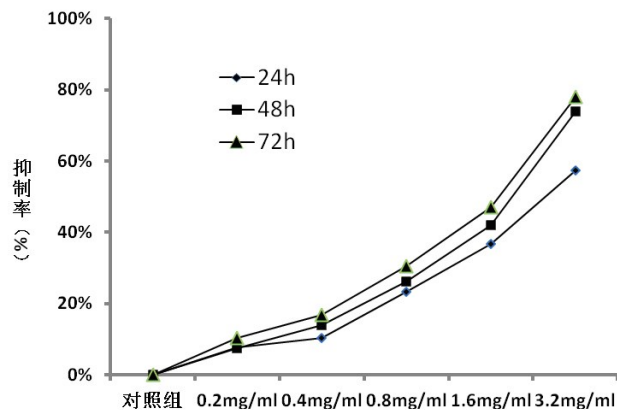
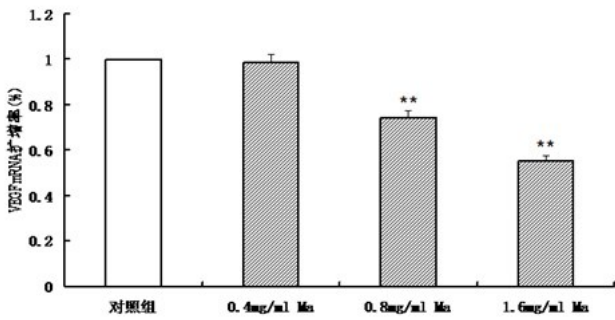


图 1 Ma 对 HepG2 细胞增殖抑制率的影响

2.2 不同浓度 Ma 对 HepG2 细胞 VEGF mRNA 的影响 实时定量 PCR 结果显示, 不同浓度的 Ma (0.4 mg/ml, 0.8 mg/ml, 1.6 mg/ml) 作用于 HepG2 细胞 48 h 后, VEGF mRNA 表达量与对照组相比结果表现为降低[表达率分别为(0.98±0.04)、(0.74±0.03)、(0.55±0.02)], 统计学分析结果显示, 0.4 mg/ml 组与对照组比较 VEGF mRNA 表达量差异无统计学意义($F = 0.639, P = 0.454$), 说明低剂量组(0.4 mg/ml) Ma 对 VEGF mRNA 的表达无明显抑制作用, 而随着 Ma 浓度的提高(0.8 mg/ml, 1.6 mg/ml), 其对 VEGF mRNA 表达抑制作用愈加明显($F = 255.438, F = 1366.883, P < 0.05$), 见图 2。



注:与对照组比较, * * $P < 0.01$

图 2 不同浓度 Ma 对 HepG2 细胞 VEGF mRNA 的影响

2.3 不同浓度 Ma 对 HepG2 细胞 VEGF 和 MMP-9 蛋白表达的影响 Western Blot 结果显示(见表 2 和图 3、图 4),0.4 mg/ml 组和 0.8 mg/ml 组与对照组比较,两组 VEGF 蛋白的表达差异无统计学意义 ($F = 57.535, F = 5.186, P > 0.05$),而当 Ma 浓度的升高至(1.6 mg/ml),其对 VEGF 蛋白表达的下调作用才开始显现,差异具有统计学意义 ($F = 13.179, P = 0.011 < 0.05$),见表 2。由此可见低剂量组、中剂量组 Ma 对 VEGF 蛋白表达均无明显抑制作用,当 Ma 浓度增加至 1.6 mg/ml 以上时,才能明显下调 VEGF 蛋白的表达,见表 2、图 3。各组 Ma(0.4 mg/ml、0.8 mg/ml、1.6 mg/ml)与对照组比较 MMP-9 蛋白的表达差异均具有统计学意义 ($F = 337.154、5370.457、17056.012, P < 0.05$),见表 2、图 4。可见随着药物浓度的增加 Ma 对 MMP-9 蛋白表达的抑制作用增强。

表 2 不同浓度 Ma 对 HepG2 细胞中 VEGF 和 MMP-9 蛋白表达的影响

Ma 质量浓度 (mg/ml)	VEGF 蛋白 相对比值	MMP-9 蛋白 相对比值
阴性对照组	0.613 ± 0.060	0.698 ± 0.005
0.4	0.876 ± 0.036	0.626 ± 0.006 ^a
0.8	0.682 ± 0.012	0.327 ± 0.009 ^a
1.6	0.484 ± 0.039 ^a	0.084 ± 0.008 ^a

注:与阴性对照组比较,a: $P < 0.05$

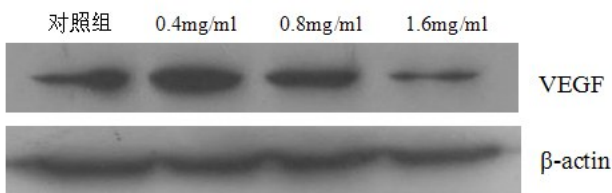


图 3 Ma 对 VEGF 蛋白表达的影响

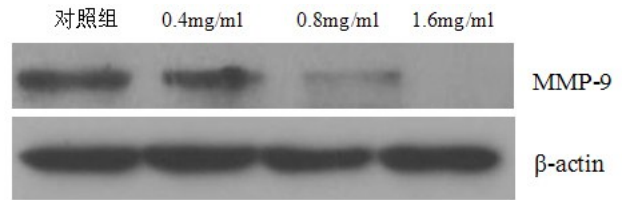


图 4 Ma 对 MMP-9 蛋白表达的影响

3 讨论

体外实验表明苦参碱对多种肿瘤细胞有抑制作用^[13],本实验研究显示,低剂量组(0.4 mg/ml)对肝癌细胞增殖无明显抑制作用,当浓度达到中剂量组(0.8 mg/ml)以上时,则表现出明显的抑制肿瘤细胞增殖作用,且呈时间和浓度依赖性,与文献报道一致^[8-9]。

1995 年 Folkman 首次提出“肿瘤生长依赖于血管生成”的观点^[14]。肿瘤血管生成需要多种血管生成因子的参与,肝癌组织血管丰富,有研究表明血管内皮生长因子(VEGF)是体内最强的一种血管生成因子^[15],它在肝癌中高度表达,与其受体 VEGFR 在肝癌生长、转移及复发中发挥重要作用,因此针对 VEGF/VEGFR 信号转导通路为靶点的研究成为肝癌抗血管生成治疗的热点。

原发性肝癌是典型的多血管恶性肿瘤,有研究发现原发性肝癌患者中 85.7% VEGF 表达呈阳性^[16]。目前关于苦参碱抗肝癌作用的具体分子机制尚不清楚,为探讨其可能作用的分子机制,我们先用 Real-time PCR 检测 Ma 对 HepG2 细胞中 VEGF mRNA 表达的影响,结果显示,不同浓度的 Ma(0.4 mg/ml、0.8 mg/ml、1.6 mg/ml)作用于 HepG2 细胞 48 h 后,VEGF mRNA 表达量与对照组相比结果表现为低剂量组(0.4 mg/ml)无明显改变,中、高剂量组(0.8 mg/ml、1.6mg/ml)对 VEGFmRNA 表达抑制作用明显 ($P < 0.05$),随后用 WB 检测 VEGF 蛋白表达,不同浓度 Ma(0.4 mg/ml、0.8 mg/ml、1.6 mg/ml)作用于人肝癌 HepG2 细胞 48 h 后,发现低剂量、中剂量 Ma 对 VEGF 蛋白表达无明显下调作用,但当 Ma 浓度升高至 1.6 mg/ml 时,发现 VEGF 蛋白的表达量随药物浓度的增加呈下降趋势,其中高剂量组 Ma 对 VEGF 蛋白表达的下调明显 ($P < 0.05$)。从基因和蛋白表达水平验证了 Ma 对 HepG2 细胞中 VEGF 表达的影响。

原发性肝癌难治性的很大原因在于侵袭和转移,基质金属蛋白酶(MMPs)是一类能降解 ECM 的内肽酶家族,在血管生成过程中的细胞运动、基底膜降解和

管腔形成中发挥重要作用,与原发性肝癌的侵袭和转移密切相关^[15]。此外有研究表明,血管内皮生长因子通过刺激内皮细胞产生 MMPs 或通过调控 MMPs 及其抑制物即基质金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP)s的平衡,从而激活了基质降解的瀑布式反应,使肿瘤细胞的穿透变得更加容易,影响肿瘤的浸润与转移^[17-18]。在 MMP 家族中,MMP-9 是研究中常见的反映原发性肝癌浸润、转移和复发的肿瘤分子标记物^[19]。我们的实验研究同时发现,低、中、高剂量浓度 Ma 均能下调 MMP-9 的蛋白表达,且随 Ma 剂量浓度的增加对 MMP-9 蛋白表达下调愈加明显。

综上所述,我们的实验证实,Ma 能抑制肝癌细胞增殖,其可能的分子机制是通过下调肿瘤细胞内血管 VEGF 和 MMP-9 蛋白的表达,进而抑制肿瘤血管生成而发挥抗肝癌作用。目前对 Ma 抑制肿瘤生长的调控机制及其对 VEGF、MMP-9 的影响途径尚不十分清楚,需要进一步的实验和更多的研究揭示其具体调控通路。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(4): 69-90.
- [2] Chen JG, Zhang SW. Liver cancer epidemic in China: past, Present and future[J]. Semin Cancer Biol, 2011, 21(1): 59-69.
- [3] 吴孟超. 原发性肝癌在中国的治疗和研究现状[J]. 成都医学院学报, 2012, 7(2): 161-162.
- [4] Lin S, Hoffmann K, Schemmer P. Treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review[J]. Liver Cancer, 2012, 1(3-4): 144-158.
- [5] 黄赞松, 仇仪英, 周喜汉. 原发性肝癌现代医学治疗的研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(24): 4169-4172.
- [6] 韦玉脉, 黄赞松. 苦参素抗肿瘤作用实验与临床研究进展[J]. 右江民族医学院学报, 2008, 30(4): 639-641.
- [7] 向发良, 黄赞松. 苦参素抗肝癌作用研究[J]. 医学综述, 2011, 17(19): 2992-2995.
- [8] 韦星, 黄赞松, 黄岑汉, 等. 苦参素注射液联合顺铂对肝癌 SMMC-7721 细胞增殖抑制作用及其机制[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(31): 36-40.
- [9] 黄赞松, 向发良, 周喜汉, 等. 苦参素对肝癌细胞 HepG2 细胞增殖和 MicroRNA-122、MicroRNA-21 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(11): 3079-3081.
- [10] 黄宏思, 黄赞松, 黄卫彤, 等. 苦参素与顺铂合用对小鼠肝癌移植瘤的影响[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(9): 2102-2103.
- [11] 胡高裕, 黄赞松, 周喜汉, 等. 苦参碱增强顺铂抗人肝癌裸鼠移植瘤作用及其对 Survivin/Caspase-3 表达的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2015, 23(9): 669-674.
- [12] 向发良, 黄赞松, 黄衍强, 等. 苦参素对人肝正常细胞 L02 影响的实验研究[J]. 右江民族医学院学报, 2013, 35(1): 6-9.
- [13] 邵明坤, 范青. 苦参碱抗肿瘤作用研究的新进展[J]. 实用药物与临床, 2014, 17(6): 756-759.
- [14] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease[J]. Nat Med, 1995, 1(1): 27-31.
- [15] Kraizer Y, Mawasi N, Seagal J, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin in liver regeneration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 287(1): 209-215.
- [16] Shi J, He YY, Sun JX, et al. The impact of sphingosine kinase 1 on the prognosis of hepatocellular carcinoma patients with portal vein tumor thrombus[J]. Ann Hepatol, 2015, 14(2): 198-206.
- [17] 曾纪晓, 夏慧敏, 朱德力, 等. 基质金属蛋白酶-2 和血管内皮生长因子在肝癌肝移植受体的表达和意义[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2013, 34(2): 262-265.
- [18] 胡海涛, 沈世强. 国内肝细胞癌患者血清中血管内皮生长因子表达的 Meta 分析[J]. 肝胆外科杂志, 2011, 19(5): 345-350.
- [19] Ogasawara S, Yano H, Momosaki S, et al. Expression of matrix metalloproteinases(MMPs) in cultured hepatocellular carcinoma(HCC) cells and surgically resected HCC tissues[J]. Oncol Rep, 2005, 13(6): 1043-1048.

收稿日期: 2015-12-15; 修回日期: 2016-01-08