

苦参素促进肝癌 HepG2 细胞凋亡及其分子机制^①

黄桂柳¹, 黎梨¹, 黄赞松²*, 周喜汉², 冯巍巍¹

(1. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院消化病研究所/附属医院消化内科, 广西 百色 533000)

摘要: **目的** 研究苦参素抑制人肝癌细胞的增殖与促进细胞凋亡的作用及其可能的分子机制。**方法** 体外培养人肝癌细胞 HepG2, MTT 法检测浓度分别为 0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml、8 mg/ml 的苦参素作用 HepG2 细胞 24 h、48 h、72 h 后的细胞增殖抑制率; 选择合适浓度(0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml)苦参素作用 HepG2 细胞 48 h 后, 流式细胞术检测 HepG2 细胞凋亡率, real-time qRT-PCR 法检测促凋亡蛋白 Bim mRNA 表达变化。**结果** MTT 结果显示, 0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml、8 mg/ml 苦参素作用 HepG2 细胞不同时间后, 各组细胞增殖均受到抑制, 且呈浓度依赖性, 各组间差异有统计学意义($P < 0.001$)。经 0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml 苦参素作用后, 各实验组 HepG2 细胞凋亡率增加, 促凋亡蛋白 Bim mRNA 表达增加, 与阴性对照组相比, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)。**结论** 苦参素可抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖, 促进细胞凋亡, 其分子机制可能与提高促凋亡蛋白 Bim 的表达有关。

关键词: 苦参素; 肝细胞癌; HepG2 细胞; 细胞凋亡; Bim

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2017)01-0010-04
doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.01.003

Hepatocellular carcinoma HepG2 cell apoptosis induced by oxymatrine and its mechanism

Huang Guiliu¹, Li Li¹, Huang Zansong²*, Zhou Xihan², Feng Weiwei¹

(1. Graduate School of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
2. Institute of Digestive Diseases/ Gastroenterology Department of Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of oxymatrine on inhibiting the proliferation of human hepatocellular carcinoma cells and on promoting the cells apoptosis and their underlying mechanisms. **Methods** The human hepatocellular carcinoma HepG2 cell lines were cultured *in vitro*, and then oxymatrine at various concentrations (0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml and 8 mg/ml) were administered to HepG2 cells of different experimental groups for 24 h, 48 h, and 72 h, respectively. An MTT method was used to detect the growth inhibition rate of HepG2 cells. After HepG2 cells were administered with oxymatrine at appropriate concentrations (0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml and 4 mg/ml) for 48 h, a flow cytometry was used to detect the apoptosis of HepG2 cells. The expressions of Bim mRNA were detected by real-time quantitative reverse transcription PCR (real-time qRT-PCR). **Results** The MTT detection results showed that after HepG2 cells were treated with 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml and 8 mg/ml oxymatrine for different time, the proliferation of HepG2 cells in every group was inhibited with concentration-dependence, there were statistical differences among every group ($P < 0.001$). After administration with 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml and 4 mg/ml oxymatrine, the apoptosis of HepG2 cells in the experimental group increased, and the expressions of pro-apoptotic protein Bim mRNA increased, compared with the negative control group, there were all statistical differences ($P < 0.05$ or $P < 0.001$). **Conclusion** Oxymatrine can inhibit proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cell lines and can promote cell apoptosis, and the molecular mechanism maybe asso-

① **基金项目:** 广西自然科学基金资助项目(桂财教 2014GXNSFAA118143); 广西研究生创新课题[右医研[2016]7 号]; 广西高校桂西地区微生物感染研究重点实验室培育基地开放课题(kfkt2016013, kfkt2016022)

② **通信作者,** E-mail: 1019846481@qq.com

ciated with up-regulation of the pro-apoptotic protein Bim expressions.

Key words: oxymatrine; hepatocellular carcinoma; HepG2 cells; apoptosis; Bim

原发性肝细胞癌(primary hepatocellular carcinoma, PHCC)是常见的恶性肿瘤,在癌症相关死亡率中仅次于肺癌,排名第二,其发病率逐年增加,复发率高且预后不良,每年约有78万新发病例,约74万死亡病例,其中我国约占一半^[1]。目前,原发性肝癌最有效的治疗方式是手术,但由于肿瘤大小、部位,患者肝功能情况及已发生转移等多种原因,往往无法进行手术治疗^[2],故只能选择介入治疗、放疗、化疗及综合治疗等,但治疗效果欠佳,预后差,大多数国家原发性肝癌5年生存率仅为3%~5%^[3]。越来越多证据表明中药在抗肿瘤方面有好的作用,其可抑制肿瘤细胞增殖、促进细胞凋亡等^[4-5]。苦参素为我国传统中药,是豆科植物苦参的有效成分,近年研究显示其在多种肿瘤中显示出明显的抗癌作用,课题组前期研究结果也显示出明显抑制人肝癌细胞的增殖,但具体机制尚未明确^[6-7]。本实验在前期基础上进一步探讨苦参素对人肝癌细胞 HepG2 细胞凋亡的影响及促凋亡相关因子 Bim 的表达变化,探讨苦参素抗肝癌的可能分子机制。

1 材料与方 法

1.1 材料 人肝癌 HepG2 细胞、人正常肝细胞 LO2 购自中国科学院上海细胞生物研究所,胎牛血清、RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司,苦参素购自江苏正大天晴药业股份有限公司(批号:国药准字 H20057480,规格 7 支/盒),MTT 购自 Sigma 公司,总 RNA 提取试剂盒(货号 DP419)、FastQuant RT Kit (With gDNase)(货号 KR106-02)、SuperReal 荧光定量预混试剂增强版(SYBR Green)(货号 FP205)购自天根生化科技(北京)有限公司,Bim 引物及内参 GAPDH 引物由 Takara 公司设计并合成,Annexin-V FITC/PI 细胞凋亡试剂盒购自 Invitrogen 公司(货号 V13241)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 HepG2 细胞及 LO2 细胞在含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养,置于 37℃、含 5%CO₂ 的培养箱中培养,细胞密度为 80%~90%时可进行传代,约 2~3 d 传代一次,所有实验均采用对数生长期的细胞。

1.2.2 MTT 法检测苦参素对 HepG2 细胞的抑制作用 取对数生长期细胞,胰酶消化成单细胞悬液,调整至合适的细胞密度,接种至 96 孔板,使每孔含 1×10^4 个细胞,实验分为:实验组(苦参素作用组)、阴性对照组(加等量完全培养基)及空白对照组(只加培养基,不加细胞),每组设 4 个复孔。次日实验组分别加入含苦

参素浓度为 0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml、8 mg/ml 的完全培养基,对照组加等量培养基,作用 24 h、48 h、72 h 后,MTT 法检测细胞活力,于 492 nm 波长检测各组吸光度值(A 值)。抑制率计算公式:抑制率=[1-(实验组 A 值-空白对照组 A 值)/(阴性对照组 A 值-空白对照组 A 值)]×100%。

1.2.3 流式细胞术检测苦参素对 HepG2 细胞凋亡的影响 取对数生长期的 HepG2 细胞,消化成单细胞悬液,接种至 6 孔板,次日加入含苦参素浓度为 0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml 的完全培养基,对照组加等量完全培养基,作用 48 h 后,PBS 洗细胞 2 次,胰酶消化成单细胞悬液,PBS 清洗 2 次,弃上清,1×annexin-binding buffer 重悬细胞,分别加入 annexin V 与 PI 染料,室温孵育 15 min,上机前每组加入 400 μl 1×annexin-binding buffer,上流式细胞仪检测细胞凋亡,激发光波长 488 nm。实验于不同日重复 3 次。

1.2.4 实时定量逆转录 PCR(real-time quantitative reverse transcription PCR, real-time qRT-PCR)检测苦参素作用后 Bim mRNA 表达 实验分为人正常肝细胞空白对照组(LO2 细胞)、HepG2 空白对照组、HepG2 苦参素组(加 0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml 苦参素)。药物干预 48 h 后,提取细胞总 RNA,检测 RNA 浓度, $A_{260}/_{280}$ 在 1.8~2.1 之间说明提取的 RNA 样品合格,取 1 μg RNA 进行逆转录,操作过程按照说明书进行,取合成的 cDNA 进行实时荧光定量 PCR,Bim 引物序列:上游引物 TCATCGCG-GTATTCGGTTC,下游引物 GAAGGTTGCTTT-GCCATTTG,产物长度约 140 bp,内参 GAPDH 上游引物 GCACCGTCAAGGCTGAGAAC,下游引物 TGGTGAAGACGCCAGTGGA,产物长度约 138 bp。反应条件:预变性 95℃ 15 min,变性 95℃ 10 s,退火/延伸 60℃ 32 s,共 40 个循环。结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析。

1.2.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间均数比较采用 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度苦参素对细胞的抑制作用 以 0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml、8 mg/ml 苦参素分别作用细胞 24 h、48 h、72 h 后,MTT 法检测苦参素对 HepG2 细胞的增殖抑制作用,结果显示,经苦参素分别作用 24 h、48 h 及 72 h 后,各组细胞增殖均

受到抑制,且呈浓度依赖性,即随着作用浓度的增加,抑制率逐渐增加,经方差分析显示,各组间差异有统计学意义($P < 0.001$)(见图 1)。同一浓度下,随着作用时间的延长,苦参素对细胞的增殖抑制作用增加(各组抑制率增加),但差异无统计学意义($P > 0.05$)(见图 1)。各时间段 24 h、48 h、72 h 的 IC_{50} 分别为 (3.51 ± 0.61) mg/ml、 (2.57 ± 0.08) mg/ml 及 (2.3 ± 0.07) mg/ml,时间越长, IC_{50} 越小,即抑制 50% 细胞增殖的药物浓度越低。

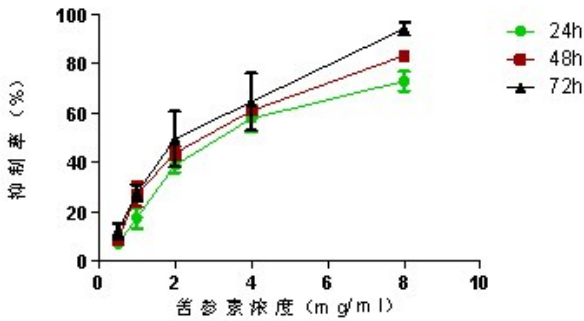


图 1 不同浓度苦参素作用于 HepG2 细胞 24 h、48 h、72h 后细胞抑制率 ($n = 4$)

2.2 苦参素对 HepG2 细胞凋亡的影响 由于 8 mg/ml 苦参素组抑制率高,故选择 0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml 浓度的苦参素作为实验干预条件。经 0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml 苦参素作

用 48 h 后,使用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测各组细胞凋亡率。结果显示,苦参素可以诱导细胞凋亡(见图 2)。与阴性对照组相比,苦参素组凋亡率依次增加,除 0.5 mg/ml 浓度差异无统计学意义($t = -1.893, P = 0.191,$)外,其他浓度(1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml)差异均有统计学意义($P < 0.001$),见表 1。

表 1 流式细胞术检测各组细胞凋亡率 ($n = 3$)

组别	细胞凋亡率($\bar{x} \pm s, \%$)
阴性对照组	4.23 ± 0.57
不同浓度苦参素组(mg/ml)	
0.5	7.8 ± 3.21
1	13.6 ± 0.93 ^a
2	16.3 ± 0.6 ^a
4	19.97 ± 1.55 ^a

注:a:与阴性对照组相比, $P < 0.001$

2.3 苦参素作用后 Bim mRNA 表达变化 real-time qRT-PCR 结果显示,阴性对照组 HepG2 细胞中 Bim mRNA 表达低于人正常肝细胞 LO2,差异有统计学意义($P < 0.05$)(见图 3)。经苦参素作用 HepG2 细胞后,Bim mRNA 表达增加,与阴性对照组相比,各组差异均有统计学意义($P < 0.05$)(见图 3),随着药物浓度的增加,Bim mRNA 表达增加($F = 41.835, P < 0.001$)(见图 3)。

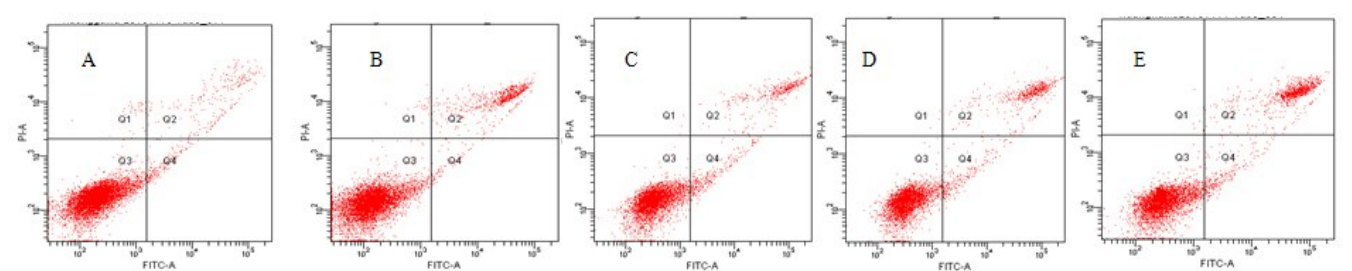


图 2 不同浓度苦参素作用后细胞凋亡的检测

注:A 为阴性对照组;B 为 0.5 mg/ml 苦参素组;C 为 1 mg/ml 苦参素组;D 为 2 mg/ml 苦参素组;E 为 4 mg/ml 苦参素组

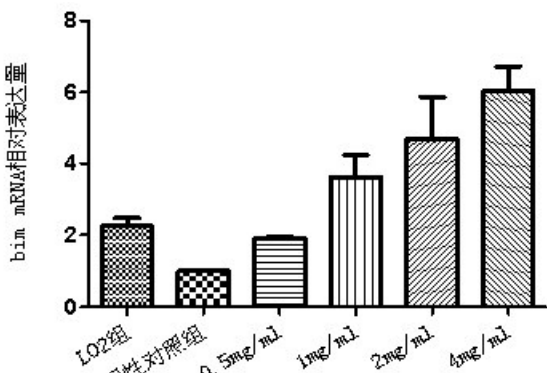


图 3 不同浓度苦参素作用后 Bim mRNA 相对表达量 ($n = 3$)

3 讨论

课题组前期研究发现苦参素可明显抑制肝癌细胞的增殖,其作用可能是通过调节 miR-122 及 miR-21 的表达、调节细胞凋亡相关基因等机制抑制细胞增殖^[7-9]。针对细胞凋亡异常采取诱导细胞凋亡的药物治疗或基因治疗可以直接杀伤肿瘤细胞,课题组前期研究表明苦参素可抑制肝癌细胞增殖,且对正常肝细胞无明显破坏^[10],提示苦参素在抗肿瘤上可能有良好的前景。本实验研究结果显示苦参素可明显抑制肝癌细胞增殖,流式细胞术检测显示,苦参素可促进肝癌细

胞凋亡,随着药物浓度增加,细胞凋亡率增加。细胞凋亡是细胞在基因调控下的自杀现象,在恶性肿瘤的发生发展过程中具有重要的生物学意义,目前多种药物主要通过诱导肿瘤细胞的凋亡进而抑制肿瘤生长增殖。

Bim (Bcl-2-like 11)蛋白是 Bcl-2 家族的促凋亡成员,其作用是破坏线粒体的完整性导致细胞凋亡,近年研究显示,BH3-only 家族在促进细胞凋亡中起重要作用。Bim 属于 BH3-only 蛋白家族成员,被称为“凋亡的看门人”,是调控细胞凋亡的关键因子,其作用主要是上调线粒体凋亡通路,在内源性凋亡途径中起着重要作用。已有研究显示一定的凋亡刺激可激活 Bim 分子,活化的 Bim 分子与 Bcl-2/Bax 相互作用,Bax 被激活,引起线粒体途径的细胞凋亡^[11]。越来越多的证据表明 Bim 在肿瘤发生发展中起重要作用,使得其成为肿瘤治疗策略中的靶标。有研究表明 Bim 与慢性淋巴细胞白血病药物诱导的细胞凋亡有关^[12]。Bim 在许多肿瘤中表达缺失,在造血系统中,Bim 的缺失引起造血细胞凋亡缺陷^[13],至今国内鲜见有关 Bim 在肝癌细胞凋亡中作用的实验研究。施艳琳等^[14]研究发现在肝癌组织中,Bim 的表达明显低于癌旁正常肝组织,且与肝癌预后相关,采用 Kaplan-Meier 生存分析发现,Bim 蛋白表达越高,肝癌患者 5 年生存率越高,认为 Bim 蛋白表达可作为肝细胞癌独立的预后因子之一。本研究通过 RT-qPCR 检测结果发现,肝癌 HepG2 细胞中 Bim mRNA 表达低于人正常肝细胞,经苦参素作用后,肝癌细胞中 Bim mRNA 表达升高,提示苦参素可能通过提高 Bim mRNA 的表达,从而激活细胞凋亡相关通路而促进肝癌细胞的凋亡。

综上所述,本实验研究显示,苦参素能抑制人肝癌细胞 HepG2 的增殖,促进细胞凋亡,其分子机制可能与促进 Bim mRNA 表达有关。但本研究未能检测 Bim 蛋白变化及更多凋亡相关因子,存在一定的局限性,将在后续实验中继续完善。

参考文献:

[1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2):87-108.

- [2] Wang Y, Tian Y. miRNA for diagnosis and clinical implications of human hepatocellular carcinoma[J]. Hepatol Res, 2016, 46(1):89-99.
- [3] Liu Y, Bi T, Dai W, et al. Effects of Oxymatrine on the Proliferation and Apoptosis of Human Hepatoma Carcinoma Cells[J]. Technology Cancer Res Treat, 2016, 15(3):487-497.
- [4] 牛国敏,张复华,杨国雷,等. Cox-2 在槲皮素抑制耐药白血病 HL-60、HL-60A 细胞增殖中的作用[J]. 右江民族医学院学报, 2015, 37(1):14-16.
- [5] 孟宇,吕俊,齐世美. 牛蒡多糖对 K562 细胞增殖的抑制及其机制的探讨[J]. 右江民族医学院学报, 2014, 36(1):10-11.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 韦星,黄赞松,黄岑汉,等. 苦参素注射液联合顺铂对人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡相关基因 c-myc、bcl-2 和 bax 表达的影响[J]. 山东医药, 2012, 52(7):12-14.
- [9] 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.
- [10] 向发良,黄赞松,黄衍强,等. 苦参素对人肝正常细胞 LO2 影响的实验研究[J]. 右江民族医学院学报, 2013, 35(1):6-8.
- [11] Letai A, Bassik MC, Walensky LD, et al. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics[J]. Cancer Cell, 2002, 2(3):183-192.
- [12] Carter MJ, Cox KL, Blakemore SJ, et al. PI3K δ inhibition elicits anti-leukemic effects through Bim-dependent apoptosis[J]. Leukemia, 2016 Dec 20. doi:10.1038/leu.2016.333.
- [13] Weber A, Heinlein M, Dengjel J, et al. The deubiquitinase Usp27x stabilizes the BH3-only protein Bim and enhances apoptosis[J]. EMBO Rep, 2016, 17(5):724-738.
- [14] 施艳琳,张青,靳钦,等. Bim 蛋白在原发性肝细胞癌中的表达及临床意义[J]. 交通医学, 2016, 20(2):109-112.

收稿日期:2016-11-24;修回日期:2017-02-16