白头翁总皂苷碱水解产物通过线粒体通路促进肝癌细胞凋亡研究

沈文华[1]，季秀美[2]，舒 展[2]，杨世林[1,2]，刘艳丽[2]，冯育林[1*]，许琼明[2*]
1. 江西中医药大学，江西 南昌 330000
2. 苏州大学，江苏 苏州 215123

摘 要：目的 研究白头翁总皂苷碱水解产物（PAHS）抗肝癌作用及其相关机制。**方法** 采用 MTT 法检测 PAHS 对于人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖的影响，并用 Giemsa 染色法观察细胞形态；采用 Hoechst 33258 染色法以及流式细胞术检测 PAHS 对细胞凋亡、细胞周期及线粒体膜电位的影响；采用 Western blotting 检测凋亡相关蛋白 Cytochrome C、Caspase-3、cleaved Caspase-3 和 Bcl-2 的表达。采用 ICR 小鼠腋下 sc 肝癌细胞 H_{22} 建立体内肝癌模型，测定肿瘤生长抑制率，并通过 HE 染色和透射电镜观察组织形态。**结果** 体外结果显示，PAHS 能够以剂量和时间依赖的方式抑制 SMMC-7721 细胞的增殖，能够将肿瘤细胞的生长周期阻滞在 S 期，降低线粒体膜电位。PAHS 可以上调 Cytochrome C、cleaved Caspase-3 的表达和下调 Bcl-2、Caspase-3 的表达。体内实验结果显示，PAHS（50、100、200 mg/kg）可以抑制小鼠肝癌细胞的生长，具有剂量依赖性。组织学观察显示 PAHS 组的小鼠肿瘤组织均有大面积坏死及凋亡细胞的出现。**结论** PAHS 可通过诱导细胞凋亡发挥抗肝癌作用，其作用机制与线粒体凋亡途径有关。

关键词：白头翁总皂苷碱水解产物；肝癌；细胞凋亡；线粒体凋亡途径；Caspase-3
中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2019)04 - 0895 - 08
DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.04.016

Alkali hydrolysate of total saponins from *Pulsatilla chinensis* inhibits hepatic carcinoma cell growth by inducing apoptosis through mitochondrial pathway

SHEN Wen-hua[1], JI Xiu-mei[2], SHU Zhan[2], YANG Shi-lin[1,2], LIU Yan-li[2], FENG Yu-lin[1], XU Qiong-ming[2]
1. College of Pharmaceutical Science, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000, China
2. Department of Pharmacognosy, College of Pharmaceutical Science, Soochow University, Suzhou 215123, China

Abstract: Objective To investigate the anti-hepatocarcinoma effect and mechanisms of the alkali hydrolysate of total saponins from *Pulsatilla chinensis* (PAHS). **Methods** MTT assay was used to evaluate the effect of PAHS on proliferation of human liver cancer cell line SMMC-7721 *in vitro*; Cell morphology was observed by Giemsa staining. The effects of PAHS on apoptosis, cell cycle, and mitochondrial membrane potential of SMMC-7721 were detected by Hoechst 33258 staining and flow cytometry assay; Western blotting was employed to detect the protein expression of Cytochrome C, Caspase-3, cleaved Caspase-3, and Bcl-2 in SMMC-7721 cells. An *in vivo* liver cancer model was established using ICR mice subcutaneously received H_{22} hepatoma carcinoma cells to detect tumor growth inhibitory rate. Morphological changes of the tumor samples were observed by HE staining and transmission electron microscope. **Results** MTT assay showed that PAHS could inhibit proliferation and increase apoptosis of SMMC-7721 cells in dose-and time-dependent manners *in vitro*, block the cell cycle in S phase, and decrease mitochondria membrane potential; PAHS could significantly increase the expression of Cytochrome C and cleaved Caspase-3 and decrease the expression of Bcl-2 and Caspase-3. PAHS dramatically decreased the weight of tumor tissue in a dose-dependent manner. Histopathological examination showed that large necrosis area and apoptotic cells were found in tumor tissues of mice in PAHS administrated group. **Conclusion** PAHS exerts antitumor activity *in vitro* and *in vivo* by inducing apoptosis, and its mechanism is related to regulation of the mitochondrial pathway.
Key words: alkali hydrolysate of total saponins from *Pulsatilla chinensis*; liver cancer; cell apoptosis; mitochondrial pathway; Caspase-3

白头翁是毛茛科白头翁属植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel. 的干燥根，具有清热解毒、凉血止痢的功效，广泛用于治疗疟疾、阴道毛滴虫病和细菌感染等疾病[1-2]。白头翁属植物

收稿日期：2018-09-21
作者简介：沈文华（1994—），女，硕士研究生，研究方向为天然药物活性成分及其作用机制研究。E-mail: shwh94@outlook.com
*通信作者 许琼明（1974—），男，博士生导师，研究方向为天然药物活性成分及其作用机制研究。E-mail: xuqiongming@suda.edu.cn
冯育林（1977—），男，博士生导师，研究方向为中药药效物质与药物代谢。E-mail: fengyulin2003@126.com

中的主要成分为三萜皂苷，多为羽扇豆烷型和齐墩果烷型[3-5]。有研究发现从白头翁中提取的皂苷具有很好的抗肿瘤活性，Xu 等[6]通过实验证明白头翁总皂苷在体外能明显抑制人肝癌 7402 细胞的增殖，药物作用 24 h 的半数抑制浓度（IC_{50}）值为 150.35 μg/mL；白头翁皂苷 D 在体内有很好的抗肝癌和乳腺癌作用，并且在体外可以抑制 MCF-7 和 Bel-7402 细胞的增殖[7-10]。构效关系研究表明，三萜皂苷的抗癌活性与 C-3 位上的糖苷链和 C-28 位上的自由羧酸相关[11-12]。将白头翁总皂苷提取物用 1%的 NaOH 溶液回流水解 6 h，去除位于 C-28 位上的糖链，得到白头翁总皂苷碱水解产物（PAHS）。将 PAHS 同样作用于人肝癌 7402 细胞 24 h，IC_{50} 值仅为 5.67 μg/mL[13]，与白头翁总皂苷相比，PAHS 抗肿瘤作用明显增强。本实验对 PAHS 的体内外抗肝癌作用进行了初步研究，并进一步探讨其作用机制，为更好地开发利用白头翁提供实验依据。

1 材料

1.1 动物与细胞株

ICR 小鼠，SPF 级，雄性，体质量 18～22 g，购自上海斯莱克生物有限公司，生产许可证号 SCXK（沪）2007-0005。人肝癌细胞 SMMC-7721 和 H_{22} 腹水型小鼠肝癌细胞均购自上海细胞生物学研究所细胞库。

1.2 药品与试剂

白头翁药材采集于辽宁绥中，经苏州大学药学院生药教研室李笑然教授鉴定为毛茛科白头翁属植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel. 的干燥根；环磷酰胺（CTX，批号 10072721），江苏恒瑞医药股份有限公司；5-氟尿嘧啶（5-FU，批号 120603），上海旭东海普药业有限公司；RPMI 1640 细胞培养基、新生牛血清（FBS），美国 Gibco 公司；四甲基偶氮唑盐（MTT），美国 Biosharp 公司；二甲基亚砜（DMSO），美国 Amersco 公司；一抗 Bcl-2（兔源）、Bax（兔源）、Caspase-3（兔源）、细胞色素 C（兔源），美国 CST 公司；V-FITC/PI 双染凋亡试剂盒，南京建成生物技术有限公司；Hoechst 33258 染色试剂盒，凯基生物科技发展有限公司。

1.3 仪器

LC-20AB 和 SPD-20A 型高效液相色谱仪、SHIMADZU ELSD-LT II 型蒸发光散射检测器（日本岛津公司）；C_{18} 分析色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm，美国 Kromasil 公司）；D101 大孔吸附树脂柱（150 cm×10 cm，天津南开大学化工厂）；BB-15 型二氧化碳培养箱（德国 Thermo Scientific 公司）；低温高速离心机（湘仪离心机仪器有限公司）；WD-9405B 型水平摇床（北京六一生物科技有限公司）；Thermo MULTISKANFC 型酶标仪（德国 Thermo Scientific 公司）；Eclipse TE2000-U 型倒置荧光显微镜（日本 Nikon 公司）。

2 方法

2.1 PAHS 的制备

将干燥的白头翁药材（20 kg）用 70%乙醇回流提取 3 次（60 L×3 次，3 h/次），提取液减压干燥得到残余物 2.4 kg。将其溶于蒸馏水中过 D101 大孔树脂柱（150 cm×10 cm），用乙醇-水进行梯度洗脱，分别为 0∶100（25 L）、30∶70（50 L）、60∶40（100 L）、90∶10（50 L），体积流量 25 mL/min，得到 4 个组分。将乙醇-水（60∶40）部分微波真空干燥得总皂苷 340 g。取总皂苷（150 g）溶于 1.0% NaOH 溶液（1 L），并在回流条件下水解 6 h。将水解产物冷却并调节 pH 至 7.0，通过大孔树脂（10 cm×150 cm），用乙醇-水进行梯度洗脱，分别为 0∶100（10 L）、40∶60（10 L）、75∶25（25 L）、95∶5（10 L），体积流量为 25 mL/min，得到 4 个亚组分。将乙醇-水（75∶25）亚组分通过微波真空干燥，得到粉末 75 g，即为 PAHS。PAHS 中含有白头翁皂苷 D 30.72%、常春藤皂苷元 3-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖基-(1→4)-α-*L*-吡喃阿拉伯糖苷 12.61%、白头翁皂苷 A 5.57%、黑海常春藤苷 A1 15.71%、齐墩果酸 3-*O*-α-*L*-吡喃鼠李糖基-(1→6)-β-*D*-吡喃葡萄糖基-(1→4)-β-*D*-吡喃葡萄糖基-(1→3)-α-*L*-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-*L*-吡喃阿拉伯糖苷 4.60%、齐墩果酸 3-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖基-(1→4)-β-*D*-吡喃葡萄糖基-(1→3)-α-*L*-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-*L*-吡喃阿拉伯糖苷 11.75%、齐墩果酸 3-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖基-(1→3)-α-*L*-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-*L*-吡喃阿拉伯糖苷 3.46%、齐墩果酸 3-*O*-α-*L*-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-*L*-吡喃阿拉伯糖苷 2.30%。

2.2 细胞培养

给予 SMMC-7721 细胞含 10%灭活 FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基，在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。当细胞密度达 70%～80%时，用 0.25%胰蛋白酶消化传代。

2.3 MTT 实验

取对数生长期的 SMMC-7721 细胞接种于 96 孔

板，密度为 5×10^4 个/mL，每孔 100 μL。在 37 ℃、5% CO_2 培养 24 h 后，次日分组给药，PAHS 各组的终质量浓度分别为 0.80、1.60、3.13、6.25、12.50、25.00、50.00 μg/mL；阳性对照药组加入 5-FU（终质量浓度为 50.00 μg/mL）；对照组加入等体积的 PBS。每组 3 个复孔，分别作用 12、24、48、72 h。培养终止前的 4 h，每孔加入 10 μL 的 5 mg/mL MTT，培养结束后每孔加入 100 μL DMSO。用酶标仪检测每孔在 492 nm 波长下的吸光度（A）值。计算细胞增殖抑制率。

细胞增殖抑制率＝$1-A_{实验}/A_{对照}$

2.4 细胞形态观察

取对数生长期的 SMMC-7721 细胞接种在 6 孔板中，密度为 5×10^4 个/mL，每孔 2 mL。给药组 24 h 后给予 PAHS，终质量浓度为 6.25 μg/mL，对照组加入等体积的 PBS，每组 3 个复孔。培养 48 h 后弃上清液，PBS 冲洗 2 次，空气干燥；用甲醇固定 15 min，干燥后用 Giemsa 染液染色约 15 min，去除染液，二甲苯透明 2 min，干燥后于显微镜下观察拍照。

2.5 Annexin-V/PI 染色

将 SMMC-7721 细胞接种于 6 孔板中，密度为 5×10^5 个/mL，每孔 2 mL。培养 24 h 后，给药组给予 PAHS，终质量浓度分别为 6.25、12.50、25.00 μg/mL，对照组加入等体积的 PBS。48 h 后用胰酶消化收集细胞，并用预冷的 PBS 洗涤 2 次。根据 V-FITC/PI 双染凋亡试剂盒说明书，加入 500 μL Binding Buffer 和 5 μL FITC 标记的 Annexin-V，再加入 5 μL PI，避光反应 5～15 min，1 h 后用 FACScan 流式细胞仪进行细胞的定量检测。

2.6 Hoechst 33258 染色

将 SMMC-7721 细胞接种于处理过的盖玻片上，置于 6 孔板中培养。培养 24 h 后，给药组给予 PAHS，终质量浓度分别为 1.60、3.13、6.25、12.50、25.00 μg/mL，对照组加入等体积的 PBS。48 h 后用 4%甲醛固定 10 min，用 PBS 洗 2 次，空气干燥后在暗处加入 0.5 mL 的 Hoechst 33258 染色液。避光孵育 30 min，PBS 洗 2 遍，滴加荧光淬灭剂并封片，置于激光共聚焦显微镜下，激发波长 350 nm，发射波长 460 nm，观察细胞凋亡情况并拍照。

2.7 细胞周期的检测

将 SMMC-7721 细胞接种于 6 孔板中，密度为 2×10^4 个/mL。培养 24 h 后，给药组给予 PAHS，终质量浓度分别为 6.25、12.50、25.00 μg/mL，对照组加入等体积的 PBS。48 h 后收集细胞至流式管，用预冷的 PBS 洗 2 次，加入预冷的无水乙醇，4 ℃固定 16 h。离心收集细胞，加入 PI 缓冲液染色，37 ℃下孵育 10 min，用流式细胞仪检测细胞周期。

2.8 线粒体膜电位的检测

JC-1 作为一种检测线粒体膜电位的探针，能够在较高的线粒体膜电位下聚集于线粒体基质中，产生红色荧光；反之，则会以单体形式存在，产生绿色荧光。将 SMMC-7721 细胞接种于 24 孔板中，密度为 1×10^5 个/mL。培养 24 h 后，给药组给予 PAHS，终质量浓度分别为 6.25、12.50、25.00 μg/mL，对照组加入等体积的 PBS。加入 JC-1 染色液 37 ℃孵育 20 min，用 JC-1 染色缓冲液冲洗 2 次，再用 EPICS XL 流式细胞仪进行检测。绿色荧光通过 FL1 通道检测；红色荧光通过 FL2 通道检测，以红、绿荧光强度的相对比值来衡量线粒体膜电位去极化程度。

2.9 蛋白质提取与免疫印迹分析

收集细胞后，加入含 PMSF 的 RIPA，冰上裂解 30 min，细胞破碎仪超声破碎细胞，12 000 r/min 4 ℃离心 15 min，取上清液，采用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度。用 RIPA 和上样缓冲液将蛋白质量浓度调至 2 μg/μL，混匀并且在 95 ℃变性 10 min。等量蛋白（20 μg）先用 SDS-PAGE 胶 100 V 电泳分离后，PVDF 膜恒流 300 mA 湿转 2 h，5%的脱脂牛奶封闭 1 h，加入抗体 Bcl-2（1∶1 000）、Cytochrome C（1∶1 000）、Caspase-3（1∶500）、cleaved Caspase-3（1∶500），4 ℃摇床孵育过夜。TBST 洗 3 次，每次 10 min，加入辣根过氧化物酶标记的二抗（1∶5 000），室温摇床孵育 90 min，TBST 洗 3 次，每次 10 min，加入 ECL 工作液，采用全自动化学发光成像系统对条带进行分析。

2.10 体内抗肿瘤作用

2.10.1 小鼠肝癌细胞 H_{22} 荷瘤小鼠模型制备及给药 在无菌的条件下，抽取接种了 H_{22} 肝癌细胞小鼠的腹水，用 PBS 混匀后，1 000 r/min 离心 10 min 收集细胞并用 PBS 洗涤 2 次，再用生理盐水悬浮并稀释浓度至 2.5×10^6 个/mL。将细胞悬液 sc 接种于小鼠右侧腋下，每只 0.2 mL。将 ICR 小鼠随机分为模型组、CTX 组（30 mg/kg）及 PAHS 低、中、高剂量（50、100、200 mg/kg）组。术后第 2 天 PAHS 各组开始 ig 给药，每日 1 次，CTX 隔天 ip 给药，连续 10 d。第 11 天眼球取血进行血常规检测，并脱

颈处死小鼠，取小鼠的右腋皮下肿块、肝、脾和胸腺，并称质量。计算抑瘤率和脏器指数。

抑瘤率＝模型组平均瘤质量－给药组平均瘤质量/模型组平均瘤质量

脏器指数＝脏器质量/体质量×1 000

2.10.2　肿瘤细胞形态学观察　将各组肿瘤组织放入 10%福尔马林磷酸缓冲液中，用石蜡包埋，切片并用苏木精和伊红进行染色，放置在光学显微镜下观察。取各组小鼠肿瘤组织，经戊二醛-锇酸双重固定、丙酮脱水、包埋、切片后制成电镜标本，置于透射电镜观察并拍照。

2.11　统计分析

采用 SPSS 18 统计学软件进行 One-way ANOVA 方差分析，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析，t 检验进行显著性分析。

3　结果

3.1　PAHS 对 SMMC-7721 细胞的生长抑制作用

实验结果显示，PAHS 对 SMMC-7721 细胞增殖有明显的抑制作用，并且呈时间和剂量依赖性。用 50 μg/mL PAHS 处理 SMMC-7721 细胞 72 h 时，抑制率达到 85.2%。PAHS 作用 12、24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为（6.69±0.84）、（5.67±0.82）、（4.23±0.92）、（3.08±0.67）μg/mL。结果见图 1。

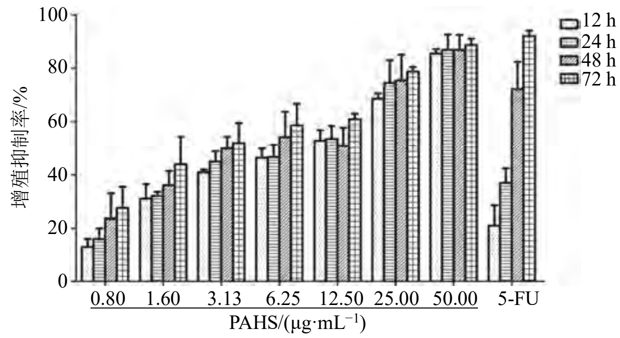


图 1　PAHS 对 SMMC-7721 细胞增殖的影响（$\bar{x} \pm s, n = 3$）

Fig. 1　Effects of PAHS on proliferation of SMMC-7721 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2　PAHS 对 SMMC-7721 细胞形态的影响

Giemsa 染色结果显示，用 PAHS（6.25 μg/mL）处理 SMMC-7721 后，细胞数量明显减少，细胞结构和形态发生改变，细胞内出现空泡，染色质凝集。这些结果表明，PAHS 在体外可以明显抑制 SMMC-7721 细胞的增殖。结果见图 2。

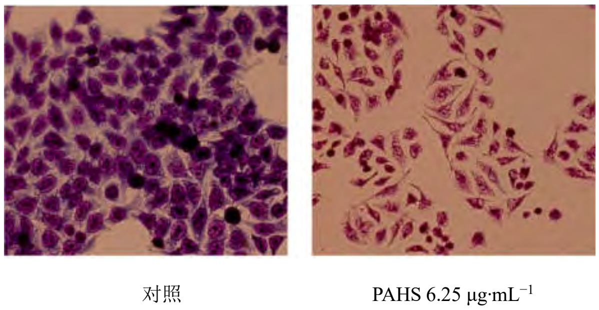


图 2　PAHS 对 SMMC-7721 细胞形态的影响（×40, Giemsa 染色）

Fig. 2　Effects of PAHS on morphological features of SMMC-7721 cells (× 40, Giemsa stainning)

3.3　PAHS 对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响

采用 FITC/PI 双染实验研究 PAHS 对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响。检测结果发现，对照组细胞凋亡率为（4.5±0.5）%，6.25 μg/mL PAHS 给药组细胞凋亡率为（6.6±1.0）%，12.50 μg/mL PAHS 给药组细胞凋亡率为（14.1±4.2）%，与对照组相比差异显著（$P<0.05$）；25.00 μg/mL PAHS 给药组细胞的凋亡率为（60.9±6.7）%，与对照组相比差异显著（$P<0.01$）。结果见图 3。

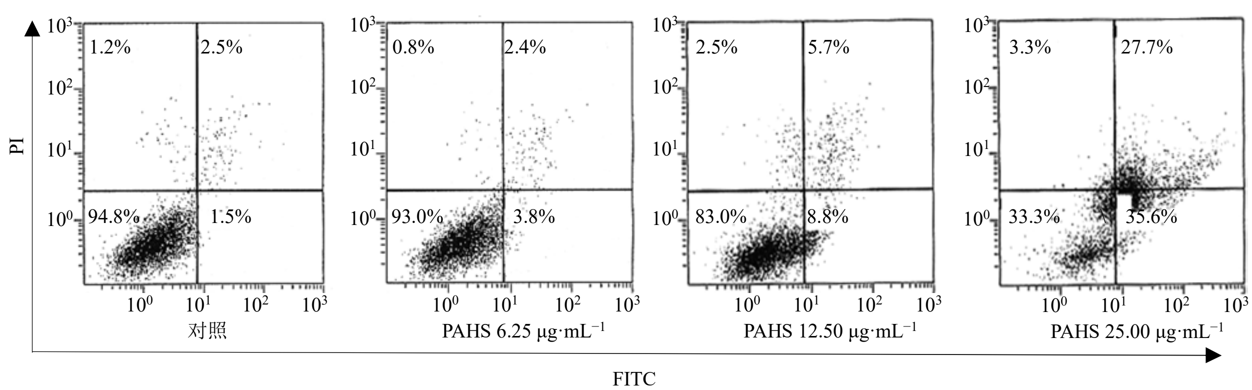


图 3　PAHS 对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响（$\bar{x} \pm s, n = 3$）

Fig. 3　Effects of PAHS on apoptosis rate of SMMC-7721 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Hoechest 是一类特异性的 DNA 染料，可以少量的渐进性地透过正常细胞膜，所以在显微镜下呈现弥散均匀的低蓝色荧光。当细胞发生凋亡时，细胞膜的通透性增加，染色质凝集，Hoechest 与 DNA 的结合增多，发出强蓝色荧光。PAHS 给药组可见浓染致密的颗粒块状强蓝色荧光，并且具有剂量依赖性，表明 PAHS 对 SMMC-7721 增值的抑制作用可能与其促进细胞的凋亡有关。结果见图 4。

3.4 PAHS 对 SMMC-7721 细胞周期的影响

为了进一步探究 PAHS 诱导细胞凋亡的方式，进一步利用 PI 染色分析 PAHS 对细胞周期的影响。结果显示，PAHS 6.25、12.50、25.00 μg/mL 组的细胞处于 S 期的比例明显上升，且呈剂量依赖性，并且与对照组比较差异显著（P<0.01）。结果表明 PAHS 可将 SMMC-7721 的生长阻滞在 S 期。结果见图 5。

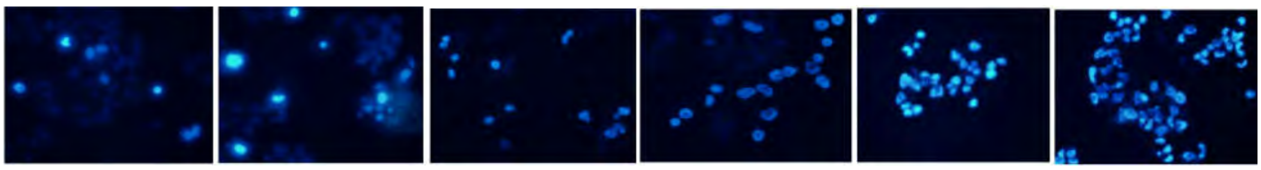
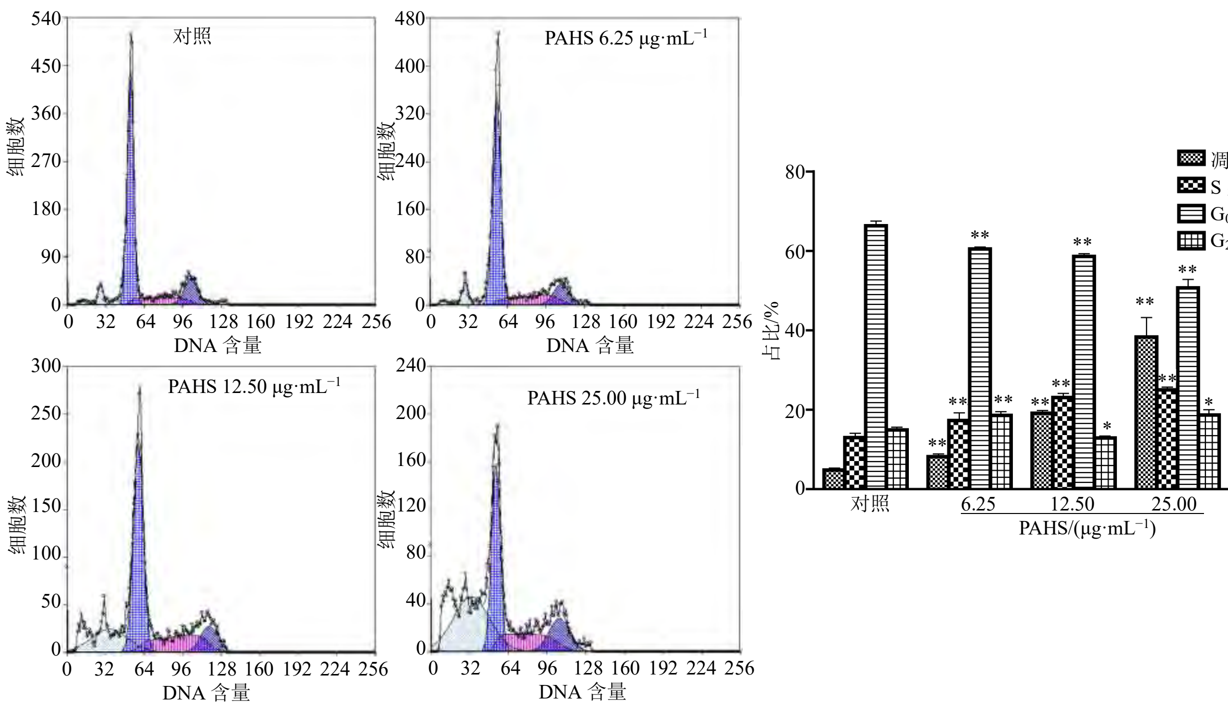


图 4 PAHS 对 SMMC-7721 细胞凋亡形态的影响（×100）

Fig. 4 Effects of PAHS on apoptosis features of SMMC-7721 cells (× 100)



与对照组比较：$^*P$<0.05 $^{**}P$<0.01，图 6、7 同

$^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ *vs* control group, same as Fig. 6 and 7

图 5 PAHS 对 SMMC-7721 细胞周期的影响（$\bar{x} \pm s, n = 3$）

Fig. 5 Effects of PAHS on cell cycle of SMMC-7721 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 PAHS 对 SMMC-7721 细胞线粒体膜电位的影响

线粒体凋亡途径是经典的细胞凋亡途径之一，表现为凋亡早期线粒体跨膜电位下降，膜通透性发生改变。因此，采用 JC-1 检测给药后细胞膜电位的变化来进一步探究 PAHS 是否通过线粒体凋亡途径诱导细胞凋亡。如图所示，与对照组相比，PAHS 组红色荧光强度与绿色荧光强度的比值呈剂量依赖性的下降，PAHS 12.50 μg/mL 与对照组相比差异显著（P<0.05），PAHS 25.00 μg/mL 与对照组相比差异显著（P<0.01）。结果见图 6。

3.6 PAHS 对线粒体信号通路蛋白水平的影响

本实验进一步研究 PAHS 对线粒体凋亡途径相

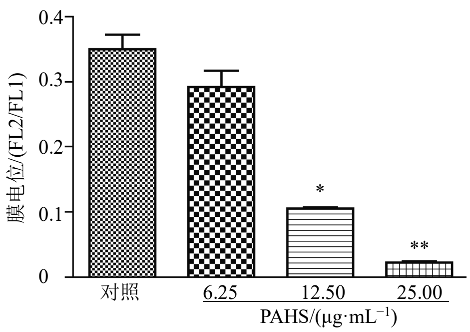


图 6　PAHS 对 SMMC-7721 细胞线粒体膜电位的影响

Fig. 6　Effects of PAHS on mitochondrial membrane potential in SMMC-7721 cells

关蛋白的影响。实验结果发现 PAHS 6.25、12.50、25.00 μg/mL 组可以剂量依赖性地上调胞浆中 Cytochrome C、cleaved Caspase-3 的表达和下调 Bcl-2、Caspase-3 的表达。上述结果表明，PAHS 很可能通过线粒体途径来诱导细胞凋亡。结果见图 7。

3.7　PAHS 体内抗肿瘤作用

3.7.1　PAHS 对 H_{22} 荷瘤小鼠的影响　为了进一步确证 PAHS 的抗肿瘤活性，采用小鼠肝癌 H_{22} 荷瘤模型评价 PAHS 的抗肿瘤药效。实验结果表明，与模型组相比，PAHS 各组均可以减少 H_{22} 肝癌小鼠的瘤质量，且高剂量组的抑瘤率达到 43.7%，与模型组比差异显著（P＜0.05）。结果见表 1。

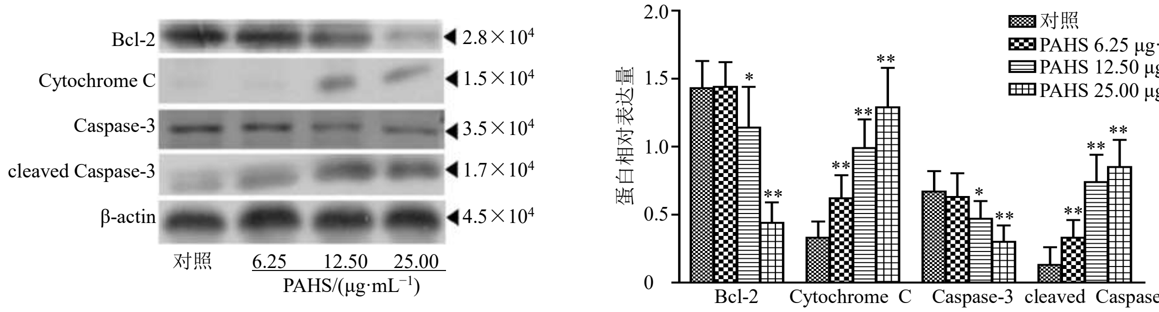


图 7　PAHS 对 SMMC-7721 中 Bcl-2、Cytochrome C、Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

Fig. 7　Effect of PAHS on protein expression of Bcl-2, Cytochrome C, Caspase-3, and cleaved Caspase-3 in SMMC-7721 cells ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

表 1　PAHS 对 H_{22} 荷瘤小鼠瘤质量和脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

Table 1　Effects of PAHS on tumor weights and organ index in H_{22} tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

组别	剂量/(mg·kg⁻¹)	体质量/g (给药前/给药后)	瘤质量/g	抑瘤率/%
模型	—	23.0/33.4	3.14±1.09	—
CTX	30	21.4/31.3	1.57±0.66**	49.9
PAHS	50	21.4/30.0	2.50±1.08	18.7
	100	21.8/28.4	2.50±0.97	20.3
	200	21.8/27.9	1.77±0.79*	43.7

与模型组比较：*P＜0.05　**P＜0.01

*P < 0.05　**P < 0.01 *vs* model group

3.7.2　肿瘤组织病理学观察　取上述实验的瘤体组织，用苏木精和伊红染色，检测给药组与模型组瘤组织的病理学改变。实验结果显示，模型组的肿瘤细胞状态良好，数量较多，大小不等，排列紧密规则，核畸形，胞核深染，核浆比失常。PAHS 高、中、低剂量组和阳性对照药组的细胞明显凋亡，核质皱缩，细胞轮廓不规则。结果见图 8。

电镜结果显示，模型组肿瘤细胞结构完整，PAHS 高、中、低剂量组和阳性对照药组的细胞均出现明显的凋亡特征，细胞体积变小，细胞核破碎，染色质边集。结果表明，PAHS 可能通过诱导肿瘤细胞凋亡从而抑制肿瘤增长。结果见图 9。

4　讨论

现如今，癌症是威胁人类健康的重要因素之一，其中肝癌发病率排名全球第 5，且死亡率排名第 3。据统计，每年大约有 50 万人死于肝癌。我国是全球肝癌病发的重点区域，约占全球比例的 50%[14-16]。肝癌恶性程度高、病程快，治疗十分困难。前人研

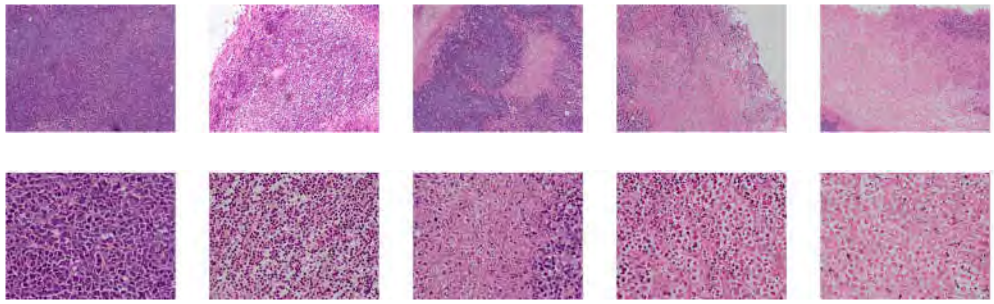


图 8 PAHS 对 H_{22} 荷瘤小鼠的肿瘤组织形态学的影响

Fig. 8 Effect of PAHS on histopathological change of tumor tissue of H22 cell-xenografted mice

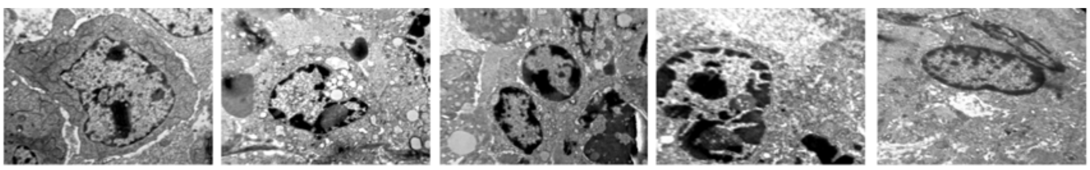


图 9 PAHS 对 H_{22} 荷瘤小鼠的肿瘤细胞超微结构的影响 (×4 000)

Fig. 9 Effects of PAHS on ultrastructure of tumor cells of H_{22} cell-xenografted mice (× 4 000)

究表明，广谱抗癌的化学合成药物往往会带来一系列严重的副作用[17-18]，而中药因其具有多靶点、多环节、低毒性等特点，在替代化学合成药物治疗癌症方面具有很大的研究潜力，而从中药中寻找出新型安全有效的抗肝癌药物已经成为新的研究热点[19-20]。

细胞活性测定是体外筛选抗肿瘤药物常用方法之一，MTT 实验结果显示 PAHS（0～50.00 μg/mL）能够抑制人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞的增殖且呈剂量依赖性，表明其有很好的抗肝癌活性。

细胞凋亡又称为程序性死亡，在许多生物学过程中起着重要的作用，和细胞增殖一起维持内环境的稳定[21]。有研究显示，肿瘤的发生与细胞凋亡的调控障碍有关。因此，诱导细胞凋亡是许多抗肿瘤药物发挥疗效的作用机制，也是抗肿瘤治疗的重要策略[22]。Hoechst33258 染色结果显示，PAHS 会引起细胞核固缩和碎裂，表现出明显的细胞凋亡特征。流式细胞仪的结果也表明，PAHS 以剂量依赖的方式诱导细胞凋亡。

线粒体凋亡是经典的细胞凋亡通路之一。在细胞凋亡的早期阶段，线粒体膜通透性发生改变，膜电位下降；当线粒体膜电位完全丢失时，细胞凋亡则无法逆转[23-24]。有研究表明，线粒体膜通透性的改变会导致细胞色素 C 的释放[25]，从而激活 Caspase 家族。Caspase 家族被激活后发生的级联放大反应是细胞凋亡过程的中心环节。下游的 Caspase 被激活后可以通过切割特异性底物导致细胞凋亡。Caspase-3 在其中起关键作用[26]。此外，Bcl-2 家族被称为细胞凋亡的关键调节器，可以通过线粒体途径诱导细胞凋亡[27]。本研究结果显示，用 PAHS 处理 SMMC-7721 细胞 48 h 后，线粒体膜电位下降，Cytochrome C 和 cleaved Caspase-3 的表达显著上调，Bcl-2 和 Caspase-3 的表达下调。这些结果表明，PAHS 诱导细胞凋亡是通过线粒体途径介导的。细胞凋亡信号转导途径是极其复杂和精细的调控网络，涉及众多的信号分子，PAHS 是如何影响 Cytochrome C 的释放及其作用靶点，还有待于进一步的实验研究。

许多抗肿瘤药物由于缺乏主动选择性，采用大剂量用药才能达到治疗效果。然而，高剂量用药往往导致严重的毒副作用，这一劣势也限制了此种药物的使用。与化学合成药物相比，天然药物毒性较低，有潜力成为新型治疗药物的重要来源。在体内模型实验中，PAHS 抑制 H_{22} 肝癌小鼠肿瘤的生长，并且呈现出明显的剂量依赖性。

综上所述，PAHS 在体内外均可以抑制肝癌细胞的生长，其作用机制与激活线粒体凋亡途径有关。因此，PAHS 有望成为治疗肝癌的新型药物。

参考文献

[1] Cheng L, Zhang M, Zhang P, *et al*. Silver complexation

and tandem mass spectrometry for differentiation of triterpenoid saponins from the roots of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom Rcm*, 2010, 22(23): 3783-3790.
[2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
[3] Glebko L I, Krasovskaj N P, Strigina L I, *et al*. Triterpene glycosides from *Pulsatilla chinensis* [J]. *Cheminformation*, 2003, 34(16): 1945-1950.
[4] Mimaki Y, Yokosuka A, Kuroda M, *et al*. New bisdesmosidic triterpene saponins from the roots of *Pulsatilla chinensis* [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64(9): 1226-1229.
[5] Zhang Q W, Ye W C, Che C T, *et al*. Triterpene saponins from *Pulsatilla cernua* [J]. *Acta Pharm Sin*, 2000, 35(10): 756.
[6] Xu Q M, Shu Z, He W J, *et al*. Antitumor activity of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel saponins in human liver tumor 7402 cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Phytomed Int J Phytother Phytopharmacol*, 2012, 19(3/4): 293-300.
[7] 罗颖颖. 白头翁皂苷抗肿瘤作用及机制研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.
[8] 岳文华, 徐 坤, 冯育林, 等. 白头翁皂苷 D 体外抗肝癌作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3295-3301.
[9] 徐 坤, 舒 展, 王永林, 等. 白头翁皂苷 D 抗肝癌作用的药效学研究 [J]. 中成药, 2014, 36(2): 240-244.
[10] 胡 超, 岳文华, 彭翠平, 等. 白头翁皂苷 D 对乳腺癌 MCF-7 细胞的体内外抗肿瘤作用研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(4): 418-423.
[11] Bang S, Lee J, Song G, *et al*. Antitumor activity of *Pulsatilla koreana* saponins and their structure-activity relationship [J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(11): 1451-1454.
[12] Xu K, Shu Z, Xu Q M, *et al*. Cytotoxic activity of *Pulsatilla chinensis* saponins and their structure-activity relationship [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2013, 15(6): 680-686.
[13] 季秀美, 舒 展, 许琼明, 等. HPLC-ELSD 法测定白头翁总皂苷碱水解产物中 8 种皂苷 [J]. 中草药, 2013, 44(11): 1416-1419.
[14] Yu C Y, Wang Y M, Li N M, *et al*. *In vitro* and *in vivo* evaluation of pectin-based nanoparticles for hepatocellular carcinoma drug chemotherapy [J]. *Mol Pharm*, 2014, 11(2): 638-644.
[15] Jiang J, Tang Y L, Liang X H. EMT: A new vision of hypoxia promoting cancer progression [J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11(8): 714-723.
[16] Greco O, Marples B, Joiner M C, *et al*. How to overcome (and exploit) tumor hypoxia for targeted gene therapy [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 197(3): 312-325.
[17] Park H S, Park K I, Lee D H, *et al*. Polyphenolic extract isolated from Korean *Lonicera japonica* Thunb. induce G_2/M cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells: Involvements of PI3K/Akt and MAPKs [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(7): 2407-2416.
[18] Raza A, Sood G K. Hepatocellular carcinoma review: Current treatment, and evidence-based medicine [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(15): 18059-18060.
[19] Zhao J. Nutraceuticals, nutritional therapy, phytonutrients, and phytotherapy for improvement of human health: A perspective on plant biotechnology application [J]. *Recent Patents Biotechnol*, 2007, 1(1): 75-97.
[20] Newman D J, Cragg G M, Snader K M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981—2002 [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66(7): 1022-1037.
[21] Renault T T, Chipuk J E. Death upon a kiss: Mitochondrial outer membrane composition and organelle communication govern sensitivity to BAK/BAX-dependent apoptosis [J]. *Chem Biol*, 2014, 21(1): 114-123.
[22] Kamal A, Faazil S, Malik M S. Apoptosis-inducing agents: A patent review (2010—2013) [J]. *Expert Opin Therap Patents*, 2014, 24(3): 339-354.
[23] Solá S, Morgado A L, Rodrigues C M. Death receptors and mitochondria: Two prime triggers of neural apoptosis and differentiation [J]. *Biochim Biophys*, 2013, 1830(1): 2160-2166.
[24] Zou J, Chen Q, Jin X, *et al*. Olaquindox induces apoptosis through the mitochondrial pathway in HepG2 cells [J]. *Toxicology*, 2011, 285(3): 104-113.
[25] Simon H U, Hajyehia A, Levischaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction [J]. *Apoptosis*, 2000, 5(5): 415-418.
[26] 赵瑞杰, 李引乾, 王 会, 等. Caspase 家族与细胞凋亡的关系 [J]. 中国畜牧杂志, 2010, 46(17): 73-78.
[27] Antonsson B, Martinou J C. The Bcl-2 protein family [J]. *Exper Cell Res*, 2000, 256(1): 50-57.