

• 药理与临床 •

人参皂苷肠道代谢物诱导人肝癌 BEL-7402 细胞凋亡

明艳林^{1,2}, 郑志忠², 陈良华², 童庆宣^{2*}

(1. 厦门大学 肿瘤细胞与分子生物学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. 厦门华侨亚热带植物引种园

天然产物研发中心, 福建 厦门 361002)

摘要:目的 探讨一种新的人参稀有皂苷 20-O-(β -D-吡喃葡萄糖)-20(S)-原人参二醇皂苷 (IH-901) 对人肝癌 BEL-7402 细胞的增殖抑制效果和诱导凋亡作用。方法 以 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100 μ mol/L 的 IH-901 作用于体外培养的 BEL-7402 细胞, 通过 MTT 法检测 IH-901 对细胞生长的抑制作用, 相差显微镜观察细胞形态变化, AO/EB 的荧光核染色观察凋亡细胞形态, 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡。结果 MTT 实验显示 IH-901 抑制 BEL-7402 细胞的生长, 呈时间及浓度依赖的方式; 显微镜下观察到典型的凋亡形态变化和生化特征: 细胞固缩, 核染色质凝聚, 出现凋亡小体; AO/EB 的荧光核染色后, 观察到典型的凋亡细胞; 流式细胞仪可以检测到凋亡峰, 且细胞被阻滞在 G₀/G₁ 期。结论 IH-901 能通过诱导细胞凋亡的方式有效地抑制人肝癌 BEL-7402 细胞的生长, 稀有皂苷 IH-901 可能成为一种潜在的抗肝癌药物。

关键词: 20-O-(β -D-吡喃葡萄糖)-20(S)-原人参二醇皂苷 (IH-901); 人肝癌 BEL-7402 细胞; 增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)10-1511-04

Apoptosis induced by a novel intestinal metabolite of ginseng saponin in human hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells

MING Yan-lin^{1,2}, ZHENG Zhi-zhong², CHEN Liang-hua², TONG Qing-xuan²

(1. Key Laboratory for Tumor Cell and Molecular Biology Engineering, Ministry of Education, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Natural Products Research Center, Xiamen Overseas

Chinese Subtropical Plant Introduction Garden, Xiamen 361002, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of 20-O-(β -D-glucopyranosyl)-20(S)-protopanaxadiol (IH-901) on the human hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells in terms of inhibition of proliferation and induction of apoptosis. **Methods** BEL-7402 Cells in cultural medium *in vitro* were given 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, and 100 μ mol/L IH-901. The inhibitory rate of cells was measured by MTT assay, morphology of cell apoptosis was observed by AO/EB fluorescent staining, cell apoptotic rate and cell phase were detected by flow Cytometry (FCM). **Results** The results indicated that IH-901 could inhibit the proliferation of BEL-7402 cells significantly. The suppression was both in a time- and dose-dependent manner. Morphological examination of IH-901-treated samples showed cells with chromatin condensation, cell shrinkage, and all typical characteristics of apoptotic cells. Marked morphological changes of cell apoptosis was observed very clearly by AO/EB fluorescent staining. The increase in the apoptotic sub-G₁ fraction in a concentration-dependent manner and cell cycle arrest at the G₀/G₁ phase were detected by FCM. **Conclusion** The results demonstrate that IH-901 dramatically suppresses BEL-7402 cell growth by inducing programmed cell death. These results may provide a pivotal mechanism for the use of IH-901 in the prevention and treatment of human hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells, the antiproliferation, and the apoptosis

Key words: 20-O-(β -D-glucopyranosyl)-20(S)-protopanaxadiol (IH-901); human hepatocellular BEL-7402; proliferation; cell apoptosis

肝癌是世界上最恶性的肿瘤之一, 全世界每年 新增患者不少于 100 万, 每年因肝癌死亡的人数估

收稿日期: 2007-02-16

基金项目: 厦门市科技创新基金重点项目 (3502Z20062008)

作者简介: 明艳林 (1974-), 男, 湖北黄冈人, 厦门大学在读博士, 主要从事天然产物化学及抗肿瘤新药研究。

Tel: (0592) 2063215 E-mail: xmyanlin@yahoo.com.cn

* 通讯作者 童庆宣 Tel: (0592) 2063215 E-mail: xmqingxuan@yahoo.com.cn

计有50万^[1]。由于肝癌转移、肝硬化和肝软组织的其他病变,外科切除手术和局部治疗的效果十分有限,在已经接受过早期肝癌治疗的肝硬化患者中,治疗后每年的复发率达20%~25%^[2]。因此,开发出一种以诱导凋亡为目标的治疗和预防措施有可能在控制肝癌的增殖和侵袭转移、晚期肝癌的预后方面发挥积极作用。

由于人参具有独特的生物学特性,在亚洲地区一直被当作非常重要的药用植物,广泛用于强身壮体、提高免疫力及预防治疗众多疾病。研究表明,人参皂苷是人参中主要的生物活性和药用活性的体现者^[3]。最近,科学家在研究人参皂苷在动物体内的代谢机制中,发现动物体内的结肠菌可以将人参皂苷Rb₁等二醇型人参皂苷代谢为一种新的人参皂苷20-O-(β-D-吡喃葡萄糖)-20(S)-原人参二醇皂苷(即M1或化合物K或IH-901)^[4,5]。进一步研究表明,IH-901无毒,不仅具有抗突变、抗氧化和抗炎等功效,而且能够抑制肿瘤细胞摄取葡萄糖,具有广泛的抗肿瘤活性^[6]。由于口服人参皂苷后,在血液中同样也可以检测到IH-901,故推测IH-901不仅是人参提取物在人和鼠肠道内的肠道菌群代谢产物中的一个主要成分,而且人参皂苷的抗肿瘤活性很可能就是通过IH-901来实现的,IH-901将是一个很有前途的抗肿瘤预防药物。所以,近几年IH-901成为国内外许多制药公司关注的焦点之一。本研究通过IH-901对人肝癌细胞BEL-7402细胞生长的抑制以及诱导细胞凋亡的研究,旨在探讨IH-901体外对肝癌作用效果,为其进一步应用于临床治疗肝癌提供有力的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器:人肝癌细胞系BEL-7402购自中国科学院上海细胞研究所,稀有人参皂苷IH-901由厦门华侨亚热带植物引种园天然产物研究中心提供,经HPLC检测质量分数大于98%。细胞培养基RPMI-1640(美国Promega公司)、MTT、吡啶橙/溴乙啶(AO/EB)、二甲基亚砜(DMSO)、碘化丙啶(PI)均购自Sigma公司。流式细胞仪(美国Coulter公司),酶联免疫检测仪(美国Thermo Electron公司),荧光倒置显微镜(德国Leica DM IRB)。

1.2 细胞培养:人肝癌细胞BEL-7402常规培养于含10%热灭活的胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的RPMI-1640培养液中,37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下培养,取对数生长期细胞进行各项实验。

1.3 MTT法测细胞存活率:实验设0 μmol/L IH-901为对照组,以及浓度分别为6.25、12.5、25、50、75、100 μmol/L IH-901为实验组。取对数生长期BEL-7402细胞,0.25%胰酶消化,用细胞培养液制成5×10⁴/mL单细胞悬液接种于96孔板,每孔100 μL,培养24 h后,吸去细胞培养液,分别加入100 μL培养液(对照组)及含人参皂苷IH-901的培养液(实验组),每组4个重复孔,分别继续培养12、24、48、72 h后,吸去培养液,每孔加入200 μL MTT (0.5 mg/mL),再继续培养4 h,吸去上清液,加200 μL抽提缓冲液(90% DMSO, 10% 0.1 mol/L Glycine-NaOH, pH 10),振荡10 min,使结晶充分溶解,在酶标仪上读取570 nm处吸光度A值,计算细胞存活率。

细胞存活率=实验组A值/对照组A值×100%

1.4 细胞形态学观察:实验设0 μmol/L IH-901为对照组,以及浓度为50 μmol/L的IH-901为实验组。细胞接种在含载玻片的6孔板上,50 μmol/L的IH-901处理48 h后,收集对照组和实验组细胞,PBS小心清洗后,室温下3%甲醛固定10 min,PBS小心清洗后,倒置显微镜下观察对照组和实验组细胞形态变化并拍照。

1.5 AO/EB荧光染色:实验设0 μmol/L IH-901为对照组,以浓度50 μmol/L的IH-901为实验组。细胞接种在含载玻片的6孔板上,50 μmol/L的IH-901处理48 h后,取各组细胞用PBS洗涤并制成1×10⁷/mL的细胞悬液,取95 μL细胞悬液加入5 μL AO/EB (100 mg/L)染液,混匀,10 min后,吸1滴置载玻片上,加上盖玻片,在荧光显微镜下观察细胞凋亡形态并拍照。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡:实验设0 μmol/L IH-901为对照组,以及浓度分别为25、50、75 μmol/L的IH-901为实验组,药物作用24 h后,分别收集对照组和实验组细胞各1×10⁶个,加入70%冷乙醇1 mL,4℃固定过夜。染色前800~1 000 r/min离心5 min,除去固定液,PBS洗2~3次,加500 μL PBS重悬细胞,加入RNaseA和PI (PI终质量浓度50 μg/mL, RNaseA终质量浓度20 μg/mL),37℃避光水浴30 min,流式细胞仪检测细胞周期各阶段细胞的百分率和凋亡细胞百分率。

1.7 统计学处理:数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计学软件SPSS11.5进行统计学分析。

2 结果

2.1 MTT试验结果:IH-901对BEL-7402细胞生

长的抑制作用见图 1。IH-901 能明显抑制 BEL-7402 细胞的生长,且随药物浓度增加和作用时间延长,其抑制作用也增强,具明显的时间和剂量依赖性。

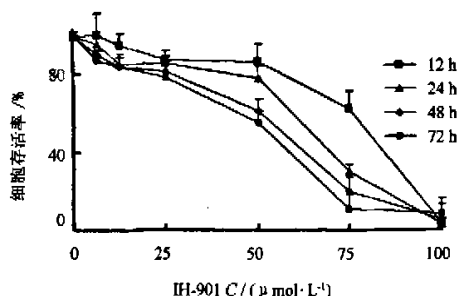
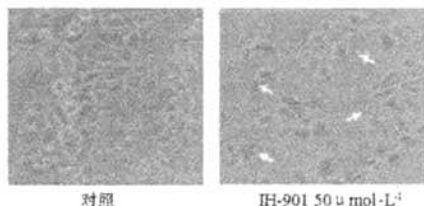


图 1 IH-901 对 BEL-7402 细胞生长的抑制作用
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Inhibitory effect of IH-901 on BEL-7402 cells growth ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.2 细胞形态学改变:倒置显微镜下观察可见,未经药物处理的肿瘤细胞呈梭形或不规则形,贴壁生长。经 50 $\mu\text{mol/L}$ IH-901 作用 48 h 后,细胞先变圆、变小,折光性增强,许多细胞脱落成漂浮生长状态,出现细胞气泡化及细胞碎片,同时能观察到典型的凋亡细胞小体,见图 2。



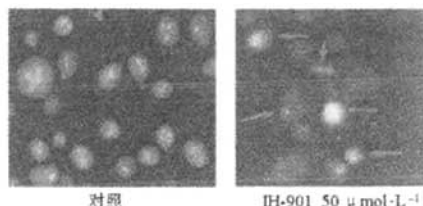
箭头所示为凋亡细胞
Arrows indicate cells undergoing apoptosis

图 2 IH-901 对 BEL-7402 细胞形态变化的影响
Fig. 2 Effect of IH-901 on morphological change of BEL-7402 cells

2.3 AO/EB 染色结果:细胞在 50 $\mu\text{mol/L}$ IH-901 作用 48 h,AO/EB 染色后在荧光显微镜下观察,对照组肝癌细胞的细胞核 DNA 呈绿色荧光,核饱满、大小均匀;实验组细胞核呈橘黄色或红色浓集荧光或荧光减弱,核固缩大小不均匀,呈现明显细胞凋亡形态,见图 3。

2.4 流式细胞仪检测结果:0、25、50、75 $\mu\text{mol/L}$ IH-901 作用 24 h 后,流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞周期分析,结果见表 1。随着作用药物浓度增加,尤其当药物浓度增加到 50 $\mu\text{mol/L}$ 后, G_0/G_1 期细胞显著增多 ($P<0.05$),S 和 G_2/M 期细胞明显减少 ($P<0.05$),表明 IH-901 使肝癌 BEL-7402 细

胞阻滞于 G_0/G_1 期。凋亡细胞检测表明,凋亡细胞随着药物浓度的增加而增加,凋亡率从 $(0.72 \pm 1.06)\%$ 上升至 $(30.27 \pm 3.34)\%$,且 G_1 期细胞前出现明显的凋亡峰,见图 4。



箭头所示为凋亡细胞

Arrows indicate cells undergoing apoptosis

图 3 IH-901 对 BEL-7402 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of IH-901 on apoptosis of BEL-7402 cells

表 1 IH-901 对 BEL-7402 细胞周期及凋亡率的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effects of IH-901 on cell cycle and apoptotic rate of BEL-7402 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	C/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	凋亡率/ %	细胞周期分布/%		
			G_0/G_1	S	G_2/M
对照	0	0.72 ± 1.06	42.28 ± 7.37	21.12 ± 4.19	36.74 ± 3.70
IH-901	25	$14.55 \pm 2.54^*$	$55.23 \pm 3.39^*$	$17.93 \pm 3.89^*$	$27.67 \pm 6.19^*$
	50	$23.37 \pm 2.22^{**}$	$73.80 \pm 2.26^{**}$	$9.46 \pm 2.16^{**}$	$18.64 \pm 4.17^{**}$
	75	$30.27 \pm 3.34^{**}$	$78.72 \pm 4.33^{**}$	$8.27 \pm 2.15^{**}$	$14.01 \pm 3.73^{**}$

与对照组比较: * $P<0.05$

与 25 $\mu\text{mol/L}$ IH-901 组比较: ** $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

** $P<0.05$ vs 25 $\mu\text{mol/L}$ IH-901 group

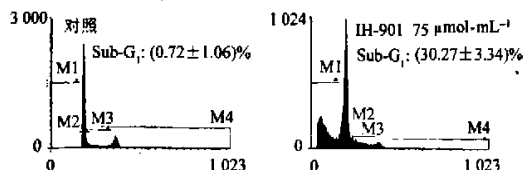


图 4 流式细胞仪分析细胞凋亡峰

Fig. 4 Sub-G₁ Peaks detected by FCM

3 讨论

研究表明,口服 IH-901 (1 或 10 mg/kg) 14 d 后,IH-901 能通过抑制血管生成从而对移植的结肠癌肿瘤生长有显著的抑制作用,其中剂量为 10 mg/kg 的 IH-901 能够显著抑制肿瘤的肝转移,结果显示 IH-901 在无毒或微毒浓度内有抗转移或抗癌作用^[7,8]。Lee 等^[9,10]报道,IH-901 体外能抑制人骨髓白血病 (HL-60)、肺腺癌 (PC-14)、胃腺癌 (MKN-45) 和肝细胞癌 (HepG2) 细胞系增殖,IH-901 还可通过使细胞色素 C 从线粒体内释放,在细胞质内积累,从而激活蛋白酶基因 caspase-3,诱导 HL-60

细胞凋亡。这些结果提示 IH-901 可能被开发为有效的抗癌药物。

普遍认为,对肿瘤细胞周期抑制和诱导凋亡是目前抗肿瘤药物主要作用机制之一。本研究通过 MTT 实验检测 IH-901 对人肝癌细胞株 BEL-7402 增殖抑制作用时,发现 IH-901 能明显抑制 BEL-7402 细胞的生长,且抑制作用具有明显的时间和剂量依赖性,当药物浓度达到 $100 \mu\text{mol/L}$ 时,其抑制率均为 100%;为进一步分析这种抑制作用是源于细胞毒作用引起的细胞坏死还是诱导细胞凋亡,本研究通过细胞形态分析,结果发现 IH-901 作用 BEL-7402 细胞后出现了大量的凋亡细胞。进一步用流式细胞仪对细胞周期和细胞凋亡率进行检测,结果发现有典型的凋亡峰出现,且峰值具有剂量依赖性;同时还检测到 G_0/G_1 期细胞随 IH-901 浓度的增加显著增多,S 期细胞明显减少,尤其当药物浓度达到 $50 \mu\text{mol/L}$ 后, G_0/G_1 期阻滞更加显著。因此,本研究结果表明,IH-901 能够抑制人肝癌细胞 BEL-7402 细胞的增殖并且诱导凋亡,且 IH-901 促使细胞凋亡的作用具有明显的剂量依赖性及细胞周期依赖性。

综上所述,IH-901 可抑制人肝癌细胞株 BEL-7402 生长,并具有量效关系;亦能诱导 BEL-7402 细胞的凋亡。诱导细胞凋亡可能是其防癌抗癌作用的主要机制之一,但其诱导凋亡的机制值得深入研究。

究。稀有人参皂苷 IH-901 可能成为一种潜在的抗癌药物。

References:

- [1] Howe H L, Wingo P A, Thun M J, *et al.* Annual report to the nation on the status of cancer (1973—1998), featuring cancers with recent increasing trends [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93: 824-842.
- [2] Ogunbiyi J O. Hepatocellular carcinoma in the developing world [J]. *Semin Oncol*, 2001, 28: 179-187.
- [3] Attelle S A, Wu J A, Yuan C S. Ginseng pharmacology, multiple constituents and multiple actions [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, 58: 1685-1693.
- [4] Bae E A, Choo M K, Park E K, *et al.* Metabolism of ginsenoside R_c by human intestinal bacteria and its related antiallergic activity [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25: 743-747.
- [5] Sung J H, Hasegawa H, Matsumiya S, *et al.* Metabolism of ginseng saponins by human intestinal bacteria [J]. *Korean J Pharmacog*, 1995, 26: 360-367.
- [6] Hasegawa H, Matsumiya S, Uchiyama M, *et al.* Inhibitory effect of some triterpenoid saponins on glucose transport in tumor cells and its application to *in vitro* cytotoxic and antiviral activities [J]. *Planta Med*, 1995, 60: 240-243.
- [7] Hasegawa H, Sung J H, Huh J D. Ginseng intestinal bacteria metabolite IH-901 as a new antimetastatic agent [J]. *Arch Pharm Res*, 1997, 20: 539-544.
- [8] Hasegawa H, Suzuki R, Nagaoka T, *et al.* Prevention of growth and metastasis of murine melanoma through enhanced natural-killer cytotoxicity by fatty acid-conjugate of protopanaxatriol [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25: 861-866.
- [9] Lee B H, Lee S J, Hur J H, *et al.* *In vitro* antigenotoxic activity of novel ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria [J]. *Planta Med*, 1998, 64: 500-503.
- [10] Lee S J, Ko W G, Kim J H, *et al.* Induction of apoptosis by a novel intestinal metabolite of ginseng saponin via cytochrome c-mediated activation of caspase-3 protease [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60: 677-685.

板蓝根总生物碱中表告依春在发热大鼠体内的药动学-药效学结合模型研究

黄 芳¹, 陈渊成², 刘晓东^{2*}

(1. 中国药科大学 中药药理教研室, 江苏 南京 210038; 2. 中国药科大学 药代动力学研究中心, 南京 江苏 210038)

摘要:目的 应用药动学与药效学结合模型, 研究板蓝根总生物碱中主要成分表告依春在酵母致热大鼠体内的药动学和药效学之间的关系。方法 给大鼠 ig 板蓝根总生物碱, 不同时间取血并对体温进行观察, 采用高效液相色谱法测定血浆中表告依春的浓度, 用一房室模型计算药动学参数, 采用 3 种药动学与药效学拟合模型, 分别对药效学参数进行拟合。结果 表告依春在正常大鼠和发热大鼠体内的主要药动学参数 $t_{1/2}$ 、 C_{max} 、AUC 分别为: $(4.94 \pm 0.84) \text{ h}$ 、 $(4.01 \pm 0.21) \mu\text{g/mL}$ 、 $(28.37 \pm 2.42) \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ 和 $(5.71 \pm 0.91) \text{ h}$ 、 $(4.15 \pm 0.25) \mu\text{g/mL}$ 、 $(30.35 \pm 2.58) \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ 。药理效应与效应室浓度之间的关系用间接反应中的药效产生抑制模型拟合较好, 相应的药效学参数分别为 K_{in} 为 $(0.70 \pm 0.10) \text{ h}^{-1}$, K_{out} 为 $(0.54 \pm 0.12) \text{ h}^{-1}$, R_0 为 1.33 ± 0.16 , IC_{50} 为 $(0.94 \pm 0.66) \text{ mg/L}$ 。结论 板蓝根总生物碱中表告依春在正常大鼠和发热大鼠体内的药动学行为无明显差异, 表告依春在发热大鼠体内药动学与药效学间符合间接反应中的药效产生抑制模型。

收稿日期: 2007-02-09

作者简介: 黄 芳 (1971—), 女, 江苏靖江人, 博士, 副教授, 研究方向为中药药动学。

Tel: (025) 85322891 E-mail: chengtianle007@163.com

* 通讯作者 刘晓东 E-mail: xdlu1960@hotmail.com