

仙鹤草醋酸乙酯有效部位体外诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡及其机制研究

武晓丹¹, 金哲雄², 宛春雷², 金蕊²

1. 哈尔滨师范大学 化学化工学院, 黑龙江 哈尔滨 150025

2. 哈尔滨商业大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: **目的** 研究仙鹤草醋酸乙酯有效部位(总鞣质质量分数为 19.91%)对人肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用及其机制。**方法** 以不同质量浓度的仙鹤草醋酸乙酯有效部位作用于体外培养的 HepG2 细胞, MTT 法检测细胞生长抑制率; 流式细胞仪检测细胞凋亡; Fluo-3/AM 荧光探针观察肿瘤细胞内钙离子浓度的变化; 流式细胞仪检测肿瘤细胞内活性氧(ROS)的变化。**结果** 仙鹤草醋酸乙酯有效部位可显著抑制 HepG2 细胞的生长, 诱导细胞凋亡, 其 IC₅₀ 为 127.85 μg/mL。经该有效部位作用 48 h 后, HepG2 细胞数量明显减少; 在 Fluo-3/AM 荧光探针的作用下有较强的绿色荧光; 同时检测出细胞内 ROS 有较明显的增加。**结论** 仙鹤草醋酸乙酯有效部位能抑制 HepG2 细胞的生长, 诱导细胞发生凋亡。肿瘤细胞内钙离子的释放和细胞内 ROS 的增加可能是其作用机制。

关键词: 仙鹤草; HepG2 细胞; 细胞凋亡; 活性氧; 钙离子

中图分类号: 282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2011)02-0119-04

Hepatocellular carcinoma HepG2 cells apoptosis and its mechanism of acetic ether extract from *Agrimonia pilosa* in vitro

WU Xiao-dan¹, JIN Zhe-xiong², WAN Chun-lei², JIN Rui²

1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Harbin Normal University, Harbin 150025, China

2. College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

Abstract: Objective To study the antiproliferation effects of extract from *Agrimonia pilosa* (tannin 19.91%) on hepatocellular carcinoma HepG2 cells and their mechanisms. **Methods** HepG2 cells in culture medium were treated with different concentrations of extract of *A. pilosa*. The inhibitory rate of the cells was measured by MTT assay. Cell apoptotic rate was detected by flow cytometry (FCM). Fluo-3/AM fluorescent probe was used to observe the Ca²⁺ variation in the tumour cells. The variation of intracellular ROS was detected by FCM. **Results** The extract of *A. pilosa* could inhibit the growth of HepG2 cells and cause apoptosis significantly. The IC₅₀ was 127.85 μg/mL. The number of cells was decreased especially after the cells were treated 48 h by the extract of *A. pilosa*, and the green fluorescence was seen clearly by Fluo-3/AM fluorescent probe. The intracellular ROS was increased obviously. **Conclusion** The extract of *A. pilosa* could inhibit the growth of HepG2 cells and cause apoptosis. The releasing of the intracellular Ca²⁺ variation and the increasing of the intracellular ROS may be its anti-hepatocellular carcinoma mechanisms.

Key words: *Agrimonia Pilosa* Ledeb.; HepG2 cells; apoptosis; active oxygen; Ca²⁺

仙鹤草为蔷薇科多年生草本植物龙芽草 *Agrimonia pilosa* Ledeb. 的干燥地上部分, 别名为脱力草、石打穿、狼牙草等, 味苦、涩, 性平, 归肺、肝、脾经, 具有收敛止血、消炎、解毒杀虫、益气强心等功效^[1]。主要用于寒热虚实引起的身体各部位出血, 治疗痈疮肿、痔疮, 常用于各种血症及痢疾^[2]。现代研究证明, 仙鹤草具有诱导肿瘤细胞凋

亡的作用, 如其丙酮提取物正丁醇萃取层促进 HepG2 细胞和 BEL-7402 细胞发生凋亡, 其注射液对胃癌 BGC-803 和宫颈癌 HeLa 细胞株有生长抑制作用^[3-7]。本实验主要研究仙鹤草醋酸乙酯有效部位对人肝癌 HepG2 细胞的生长抑制及其诱导肿瘤细胞凋亡的作用, 并初步探讨其诱导肿瘤细胞凋亡的机制。

收稿日期: 2010-09-01

基金项目: 黑龙江省留学回国人员重点科技项目(黑人发[2009]23号)

作者简介: 武晓丹(1981—), 女, 河南省台前县人, 讲师, 主要从事植物药抗肿瘤作用研究。

Tel: 15945182103 E-mail: smile_200325@163.com

1 材料

1.1 药物与试剂

仙鹤草采自哈尔滨市帽儿山, 由哈尔滨商业大学药学院金哲雄教授鉴定为龙芽草 *Agrimonia pilosa* Ledeb. 全草。取仙鹤草粉末, 加 8 倍体积的 70% 丙酮溶液, 用组织破碎法提取 2 次, 抽滤, 合并滤液, 浓缩, 再用醋酸乙酯萃取, 浓缩, 干燥, 即得仙鹤草丙酮提取物醋酸乙酯萃取层粉末 (以下均称仙鹤草醋酸乙酯有效部位), 经干酪素法^[7]测得总鞣质质量分数为 19.91%。

Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) 购于 Invitrogen Corporation; 胎牛血清购于浙江杭州四青生物材料厂; 注射用盐酸多柔比星 (ADM) 购于浙江海正药业股份有限公司; 二甲基亚砜 (DMSO) 和四甲基偶氮唑盐 (MTT) 购于上海华美公司; 胰酶、Rnase A、HEPES、Triton X-100 和 PI 染料均购于美国 Sigma 公司; FLUO-3/AM 购于联科生物技术有限公司; DCFH-DA 购于碧云天生物技术研究。丙酮, 批号 20080522, 购于天津市永大化学试剂厂; 醋酸乙酯, 批号 20071201, 购于天津市光复精细化工研究所。

1.2 仪器

SANYO MC0175 型 CO₂ 培养箱, 日本三洋公司; SUNRISE 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; PAS 型流式细胞仪, 德国 Partec 公司; C1 型激光共聚焦显微镜, 日本 Nikon 公司。

1.3 细胞

人肝癌细胞株 HepG2 由哈尔滨商业大学药学院细胞培养室传代保种, 培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 置于 CO₂ 培养箱 (温度 37 °C, 5% CO₂, 相对湿度 95%) 培养。2、3 d 传代 1 次, 取对数生长期细胞进行实验。

2 方法

2.1 仙鹤草醋酸乙酯有效部位对肿瘤细胞增殖的影响

仙鹤草醋酸乙酯有效部位用灭菌后的蒸馏水溶解 (下同), 使其终质量浓度分别为 50、100、150、200、250、300 μg/mL。将 1×10⁵ 个对数生长期的 HepG2 肿瘤细胞接种于 96 孔板中, 24 h 后分别加入上述不同质量浓度的仙鹤草醋酸乙酯有效部位及阳性对照药阿霉素 (用灭菌后的蒸馏水溶解, 使其终质量浓度为 10 μg/mL), 空白对照组加相同体积的培养液, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。72 h

后, 倒去培养基和药液后, 分别加入 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液 100 μL, 继续培养 4 h, 然后吸去上清液, 每孔加入 DMSO 150 μL, 轻轻振荡以使溴代噻唑蓝完全溶解。约 5 min 后在 620 nm 波长处用酶标仪测其吸光度 (A) 值。计算药物对肿瘤细胞的抑制率 [细胞生长抑制率=(1-给药组 A 值/空白对照组 A 值)], 并按中效方程计算 IC₅₀。

另将 1×10⁶ 个对数生长期细胞接种于 6 孔培养板中, 24 h 后分别加入仙鹤草醋酸乙酯有效部位 65、130、260 μg/mL 及阿霉素 20 μg/mL, 空白对照组加相同体积的培养液。48 h 后细胞用胰蛋白酶消化, PBS 洗 2 次, 离心, 将细胞重悬于质量浓度为 50 μg/mL 的 PI 染液 800 μL 中, 于 4 °C 冰箱放置 30 min, 滤过后用流式细胞仪检测, 检测细胞数为 1×10⁴ 个, 激发波长 488 nm, 发射波长 630 nm。

2.2 仙鹤草醋酸乙酯有效部位对肿瘤细胞内钙离子浓度的影响

将 2×10⁵ 个对数生长期细胞接种于 24 孔培养板中, 24 h 后分别加入仙鹤草醋酸乙酯有效部位 65、130、260 μg/mL 及阳性对照药阿霉素 10 μg/mL, 空白对照组加相同体积的培养液。48 h 后吸出培养皿中的培养液, 用无钙台式液洗一遍, 加入质量浓度为 4 μg/mL 的 Fluo-3/AM 荧光探针 200 μL, 37 °C 避光温育 30 min, 激光共聚焦显微镜扫描观察, 激发波长 488 nm, 发射波长 540~570 nm。

2.3 仙鹤草醋酸乙酯有效部位对肿瘤细胞内活性氧自由基 (ROS) 的影响

将 1×10⁶ 个对数生长期细胞接种于 6 孔培养板中, 24 h 后分别加入仙鹤草醋酸乙酯有效部位 65、130、260 μg/mL 及阳性对照药阿霉素 10 μg/mL, 空白对照组加相同体积的培养液。48 h 后细胞用胰蛋白酶消化, PBS 洗 2 次, 离心, 加入终浓度为 10 μmol/L 的 DCFH-DA 200 μL, 37 °C 孵育 30 min, 孵育期间不断振荡, 使 DCFH-DA 探针和细胞充分接触, 30 min 后加培养液洗 2 次, 离心, 弃上清液, 加 800 μL 培养液, 吹匀细胞, 滤过后激光共聚焦显微镜检测, 激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm。

2.4 统计学分析

采用 SPSS windows 16.0 软件 One Way ANOVA 方式行方差分析; 两两比较采用 Students' *t* 检验。

3 结果

3.1 仙鹤草醋酸乙酯有效部位对 HepG2 细胞增殖的影响

MTT 法检测结果显示,以不同质量浓度的仙鹤草醋酸乙酯有效部位作用于 HepG2 细胞 72 h 后,细胞生长受到抑制且与试药质量浓度呈正相关,与空白组比较,差异均具有显著性 ($P < 0.05$), IC_{50} 为 127.85 $\mu\text{g/mL}$ 。结果见表 1。

表 1 仙鹤草醋酸乙酯有效部位对 HepG2 细胞生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Inhibition effects of *A. pilosa* extract on growth of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	A 值	抑制率 /%
空白对照	—	0.335±0.021	—
仙鹤草醋酸乙酯有效部位	50	0.291±0.030*	13.13
	100	0.203±0.015*	39.40
	150	0.133±0.009*	60.30
	200	0.090±0.010*	73.13
	250	0.072±0.004*	78.51
	300	0.066±0.003*	80.30
阿霉素	10	0.096±0.007*	71.34

与空白对照组比较: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs blank control group

流式细胞仪检测结果显示,以不同质量浓度的仙鹤草醋酸乙酯有效部位作用于 HepG2 细胞 48 h 后,可促进肿瘤细胞凋亡,其中高剂量作用最明显,

与空白组比较差异有显著性 ($P < 0.05$),进一步证明仙鹤草醋酸乙酯有效部位可诱导肿瘤细胞发生凋亡。结果见表 2。

表 2 仙鹤草醋酸乙酯有效部位对 HepG2 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of *A. pilosa* extract on HepG2 cells apoptosis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞凋亡率 / %
空白对照	—	10.80±0.34
仙鹤草醋酸乙酯有效部位	65	57.40±1.29*
	130	73.96±1.31*
	260	79.71±1.31*
阿霉素	20	70.23±1.12*

与空白对照组比较: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs blank control group

3.2 仙鹤草醋酸乙酯有效部位对 HepG2 肿瘤细胞内钙离子的影响

如图 1 所示,各组给以相应物质作用于 HepG2 细胞 48 h 后,空白对照组细胞无明显的荧光;阿霉素组细胞有较强的绿色荧光且细胞数明显减少;仙鹤草醋酸乙酯有效部位中、低剂量组荧光不明显,但高剂量组有明显的绿色荧光,细胞出现明显的凋亡形态,表明仙鹤草醋酸乙酯有效部位对 HepG2 细胞内钙离子有一定的影响。

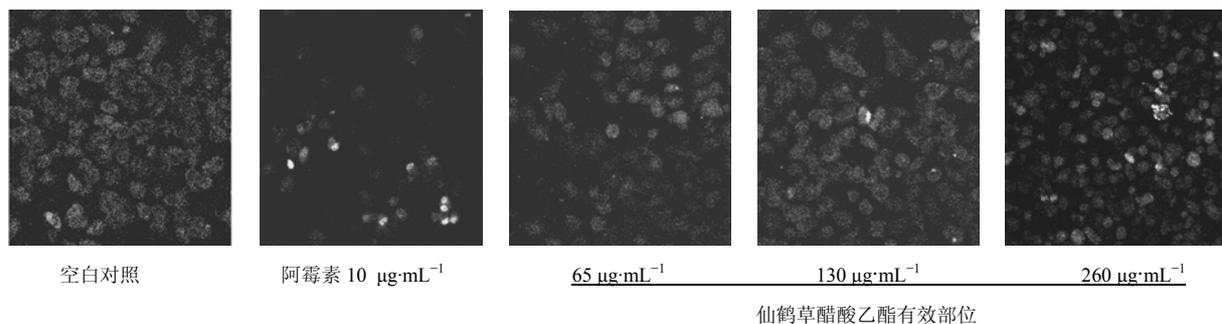


图 1 仙鹤草醋酸乙酯有效部位对 HepG2 细胞内钙离子的影响
Fig. 1 Effects of *A. pilosa* extract on Ca^{2+} in HepG2 cells

3.3 仙鹤草醋酸乙酯有效部位对 HepG2 肿瘤细胞内 ROS 的影响

如图 1 所示,仙鹤草醋酸乙酯有效部位 0、65、130、260 $\mu\text{g/mL}$ 作用于 HepG2 细胞 48 h 后,细胞内 ROS 逐渐增加,以高剂量组增加最明显,与空白组比较,差异有显著性 ($P < 0.05$),表明仙鹤草醋酸乙酯有效部位对 HepG2 细胞内 ROS 有较明显的影响。

4 讨论

本实验在选择提取溶剂时,遵循对鞣质具有良好的溶解能力、不与鞣质发生化学反应、浸出杂质少、易于分离以及低毒、安全、经济、易得的原则。70% 丙酮对鞣质溶解能力最强,能够打开鞣质-蛋白质的连接键,而且减压蒸发易除去丙酮。鞣质粗提物中含有大量的糖、蛋白质、脂类等杂质,加上鞣质本身是许多结构与理化性质十分接近物质的混合

表 3 仙鹤草醋酸乙酯有效部位对 HepG2 细胞内活性氧的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Effects of *A. pilosa* extract on intracellular ROS levels of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	活性氧/%
空白对照	—	13.85±0.97
仙鹤草醋酸乙酯有效部位	65	19.36±0.82*
	130	24.26±1.36*
	260	61.99±0.85*
阿霉素	10	65.40±0.91*

与空白组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs blank control group

物, 需进一步分离、纯化, 因此通常采用有机溶剂萃取的方法进行初步纯化。在本实验中采用醋酸乙酯萃取仙鹤草丙酮提取物(鞣质粗提物), 醋酸乙酯能够溶解多种水解鞣质及低聚的缩合鞣质。

细胞凋亡是多细胞有机体在细胞分化、发育中及在各种生理、病理条件下起重要作用的一种调节适应过程, 这个过程经历信号引发、调控执行和结构变化 3 个阶段^[8]。目前, 常采用流式细胞仪作为研究细胞凋亡的一种有效的手段^[9-10]。在本实验中, 通过 MTT 法检测可知, 仙鹤草醋酸乙酯有效部位可显著抑制 HepG2 细胞的生长, 抑制作用随药物质量浓度的增大而增强, 与空白对照组相比差异具有显著性 ($P < 0.05$), 其 IC_{50} 为 $127.85 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。通过流式细胞仪检测进一步发现, 仙鹤草醋酸乙酯有效部位能诱导 HepG2 细胞凋亡。细胞凋亡与 Ca^{2+} 的关系极其密切^[11-12], Ca^{2+} 可通过调节一些蛋白的活性引发凋亡, 如 Ca^{2+} 可激活磷脂酶 A_2 , 继而产生花生四烯酸及多聚不饱和脂肪酸, 它们的最终代谢产物有可能使细胞产生 ROS, 从而引发凋亡。 Ca^{2+} 本身也可以直接引发细胞凋亡, 如胞内 Ca^{2+} 超载将导致线粒体内 Ca^{2+} 超载, 从而使线粒体通透性发生改变, 释放促凋亡分子, 启动线粒体依赖的凋亡通路。激光共聚焦显微镜结果显示, Fluo-3/AM 作用于 HepG2 细胞后, 凋亡的肿瘤细胞有明显的绿色荧光, 表明不同质量浓度的仙鹤草醋酸乙酯有效部位可使细胞内游离 Ca^{2+} 水平升高。流式细胞仪检测结

果表明仙鹤草醋酸乙酯有效部位作用 HepG2 细胞后, 细胞内产生较多的 ROS。这些结果表明, 细胞内游离 Ca^{2+} 水平升高和细胞内 ROS 活性氧水平升高可能是仙鹤草醋酸乙酯有效部位诱导 HepG2 细胞发生凋亡的机制。

参考文献

- [1] 聂绍荃, 袁晓颖, 杨逢建. 黑龙江植物资源志 [M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2003: 343.
- [2] 丁维俊, 张天娥, 王宇, 等. 仙鹤草抗癌活性成分及机理探讨 [J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(2): 251-252.
- [3] 吴琳华, 郭劲柏, 刘红梅, 等. 仙鹤草注射液对人癌细胞生长抑制作用的研究 [J]. 中国中医药科技, 2005, 12(5): 297-298.
- [4] 马丽萍, 赵培荣, 王留兴, 等. 仙鹤草水提液对食管癌 Eca109 细胞生长的抑制作用 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2007, 42(1): 149-151.
- [5] 武晓丹, 金哲雄, 宛春雷, 等. 仙鹤草诱导肝癌 BEL-7402 细胞凋亡的研究 [J]. 航空航天医药, 2010, 21(6): 844-846.
- [6] 武晓丹, 金哲雄, 宛春雷, 等. 仙鹤草对人肝癌 HepG2 细胞凋亡作用研究 [J]. 中国中医药咨讯, 2010, 2(8): 189.
- [7] 胡人杰. 抗癌方剂实验研究与肿瘤相关基因表达 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(2): 139-143.
- [8] 李志猛, 李向日. 干酪素法测定不同产地金樱子中鞣质类成分的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(2): 230-232.
- [9] 许惠玉, 徐广友, 陈志伟, 等. 赤芍总苷诱导肿瘤细胞凋亡机制的研究 [J]. 中医药学刊, 2005, 23(10): 1798-1800.
- [10] 高小玲, 罗子国, 王丕龙, 等. 双氢青蒿素诱导前列腺癌 PC-3 细胞凋亡及其机制研究 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 81-85.
- [11] 孙胜男, 邹翔, 高鹏, 等. 莱菔硫烷诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的 p38MAPK 途径研究 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(1): 29-33.
- [12] 郭静, 蒲咏梅, 张东才. 钙离子信号与细胞凋亡 [J]. 生物物理学报, 2005, 21(1): 112-114.
- [13] 郭荣球, 李亚林. 钙稳态失衡与细胞凋亡的研究现状 [J]. 邵阳学院学报: 自然科学版, 2005, 2(2): 124-125.