

齐墩果酸诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡及其作用机制研究

苗俊秋¹, 王效蕊¹, 董秀山², 何素海¹, 梁泰刚^{1*}, 李青山¹

1. 山西医科大学 药学院, 山西 太原 030001

2. 山西大医院 普外科, 山西 太原 030032

摘要: **目的** 探讨齐墩果酸对人肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用和诱导凋亡作用, 并考察其作用机制。**方法** 采用 MTT 法检测齐墩果酸对 HepG2 细胞增殖的影响, 吖啶橙/溴化乙锭 (AO/EB) 双重染色法进行细胞形态学观察, 流式细胞仪检测细胞凋亡、活性氧 (ROS) 水平和线粒体膜电位 (MMP) 的变化。**结果** 随着齐墩果酸浓度的升高, 抑制率显著增加, 呈现明显的时间与剂量相关性; 齐墩果酸在 25.0、50.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$ 作用 12 h 时, 细胞形态学发生改变, 细胞的总凋亡率随着齐墩果酸浓度的增加而升高, 细胞中 ROS 水平随着齐墩果酸浓度的增加而升高, 细胞内的 MMP 水平随着齐墩果酸浓度的增加而降低。**结论** 齐墩果酸通过调节 ROS 和 MMP 体外抑制人肝癌 HepG2 细胞的增殖和诱导其凋亡

关键词: 齐墩果酸; HepG2 细胞; 细胞凋亡; 活性氧; 线粒体膜电位

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2016)07 - 0934 - 05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2016.07.002

Apoptosis-inducing effect of oleanolic acid on human hepatoma cell line HepG2 and its mechanism

MIAO Jun-qiu¹, WANG Xiao-rui¹, DONG Xiu-shan², HE Su-hai¹, LIANG Tai-gang¹, LI Qing-shan¹

1. School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

2. Department of General Surgery, Shanxi Dayi Hospital, Taiyuan 030032, China

Abstract: Objective To investigate the effect of oleanolic acid on proliferative inhibition and apoptotic induction against HepG2 cells, and explore its mechanism. **Methods** The cell inhibitory rates of oleanolic acid on HepG2 cells were assessed by MTT assay. The morphology of HepG2 cells was observed by acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) double staining. The rate of apoptosis, change of reactive oxidative species (ROS) level, and mitochondrial membrane potential (MMP) were measured by flow cytometer method. **Results** The proliferation of HepG2 cells was inhibited by oleanolic acid with higher concentrations in a dose and time dependent manner. After be treated with oleanolic acid (25, 50, and 100 $\mu\text{mol/L}$) for 12 h, the morphology changes of cell apoptosis significantly observed, total apoptotic rates of HepG2 cells were increased, and level of ROS were obviously increased, while MMP were decreased. **Conclusion** Oleanolic acid can inhibit the proliferation and induce apoptosis in HepG2 *in vitro*, which is related to change of ROS and MMP.

Key words: oleanolic acid; HepG2 cells; cell apoptosis; ROS; MMP

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一。近年来, 原发性肝癌的发病率和死亡率均呈上升趋势, 已成为目前主要的肿瘤病因。随着中药现代化研究的深入, 中药及其活性成分的抗肿瘤作用被不断发现, 日益引起人们的重视。齐墩果酸是一种天然的五环三萜类化合物, 主要来源于木犀科植物果实^[1]。

齐墩果酸具有广泛的生物学活性, 包括保肝^[2]、降糖^[3]、调脂^[4]、调节免疫^[5]、抗氧化^[6]、抗肿瘤^[7-9]。本研究以齐墩果酸作用于人肝癌细胞 HepG2, 探讨其对肿瘤细胞抑制增殖、诱导细胞凋亡的影响, 并分析凋亡过程中活性氧 (ROS) 及线粒体膜电位 (MMP) 的变化, 为进一步的研究提供依据。

收稿日期: 2016-04-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81101687)

作者简介: 苗俊秋 (1990—), 男, 黑龙江省海伦人, 硕士研究生。E-mail: miaojunqiu@qq.com

*通信作者 梁泰刚 (1978—), 男, 山西省文水人, 教授, 硕士生导师, 从事基于机制的药物设计与合成研究。E-mail: ltaigang@163.com

1 材料

1.1 细胞

人肝癌细胞株 HepG2 购自中国科学院上海生命科学研究所生物化学与细胞生物学研究所。

1.2 试剂

齐墩果酸(货号 O5504, 质量分数 $\geq 97\%$)、二甲基亚砜(DMSO, 货号 V900090)、噻唑蓝试剂(MTT 货号 V900888)购自美国 Sigma 公司; 标准胎牛血清 FBS(货号 PYG0001)、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 货号 PYG0003)购自武汉博士德生物工程有限公司; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(货号 KGA107)、细胞凋亡线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1, 货号 KGA603)、吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)双荧光染色试剂盒(货号 KGA501)均购自南京凯基生物科技发展有限公司; 活性氧检测试剂盒(DCFH-DA, 上海碧云天生物科技公司, 货号 S0033)。

1.3 仪器

HP-90 型二氧化碳培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司); 双人单面垂直净化工作台(上海博讯实业有限公司); BDS200-PH 型倒置生物显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司); BX-51 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司); BS124S 型精密电子天平(德国赛多利斯公司); Varioskan Flash 型全波长多功能酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司), Accuri C6 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

HepG2 细胞培养于含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液中, 置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。1~2 d 传代 1 次, 取对数生长期 HepG2 细胞进行实验。

2.2 MTT 法检测细胞增殖抑制率^[10]

取对数生长期的 HepG2 细胞, 以 5×10^4 个/mL 的密度、100 μ L/孔接种于 96 孔细胞培养板中。实验设对照组、齐墩果酸组。齐墩果酸组分别加入终浓度为 12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 μ mol/L 齐墩果酸溶液; 对照组加相同体积的培养液, 每组设 6 个复孔, 分别孵育 12、24、48 h 后, 每孔加入 20 μ L MTT 继续孵育 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 100 μ L DMSO, 振荡器充分震荡 10 min 后, 用酶标仪测定 570 nm 波长处吸光度(A)值, 实验重复 3 次, 计算细胞增殖抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{对照}}$$

2.3 光学显微镜下观察细胞形态变化

取对数生长期的 HepG2 细胞以 5×10^4 个/mL 的密度种于 6 孔板内, 孵育 24 h 至细胞贴壁, 设置对照组、齐墩果酸组。齐墩果酸组分别加入终浓度为 25.0、50.0、100.0 μ mol/L 齐墩果酸溶液, 对照组加入相同体积的培养液, 孵育 12 h 后, 在光学显微镜下观察细胞形态变化。

2.4 荧光显微镜下观察 AO/EB 染色细胞形态变化

细胞处理方法同 2.3 操作, 每孔用磷酸缓冲盐(PBS)洗涤 3 次后, 再加入 1 mL 培养基及 5 μ L AO/EB 混合液, 避光孵育 5~10 min, 荧光显微镜下观察细胞形态变化。

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

细胞处理方法同 2.3 操作, 用不含 EDTA 的胰酶消化, 用预冷的 PBS 缓冲液洗涤两次, 1 000 r/min 离心 5 min 收集 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞, 分别加入 5 μ L 荧光探针 Annexin V-FITC、碘化丙啶(PI), 并混匀, 室温、避光、孵育 5~10 min, 1 h 内采用流式细胞仪在 488 nm 激发波长、530 nm 发射波长下进行检测。凋亡分析以右下象限早期凋亡细胞及右上象限晚期凋亡细胞作为凋亡细胞, 凋亡细胞数与总细胞数的比值即为细胞的凋亡率。实验重复 3 次。

2.6 流式细胞仪检测细胞内 ROS^[11]

细胞处理方法同 2.3 操作, 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 再用 PBS 缓冲液漂洗 1 次, 离心。装载探针按照 1:1 000 用无血清培养基稀释荧光探针 DCFH-DA, 终浓度为 10.0 μ mol/L, 将收集好的细胞悬浮于 DCFH-DA 中, 细胞培养箱内孵育 20 min, 再用无血清的培养基或 PBS 缓冲液洗涤 3 次。细胞内的 ROS 可将无荧光的 DCFH 氧化成发出绿色荧光的 DCF, 绿色荧光强度与细胞内 ROS 水平呈正比, 采用 488 nm 激发波长、525 nm 发射波长, 流式细胞仪进行荧光强度检测, 并经 BD Accuri C6 软件分析细胞内活性氧的水平。实验重复 3 次。

2.7 流式细胞仪检测细胞 MMP^[12]

细胞处理方法同 2.3 操作, 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 再用 PBS 漂洗 1 次, 离心。将收集好的细胞悬浮于 500 μ L 荧光探针 JC-1 中, 培养箱中孵育 20 min 后, 培养缓冲液(1 \times Incubation Buffer)洗涤两次, 采用 488 nm 激发波长、530 nm 发射波长下流式细胞仪检测红色和绿色荧光强度,

并经 BD Accuri C6 软件分析, 根据红绿荧光比值考察线粒体膜电位的变化。实验重复 3 次。

2.8 统计学分析

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 通过 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 齐墩果酸对 HepG2 细胞增殖的影响

齐墩果酸在浓度为 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 时即对 HepG2 细胞产生抑制作用。随着齐墩果酸浓度的升高, 抑制率显著增加, 呈现明显的时间与剂量相关性, 见表 1。根据预试验及 MTT 法筛选结果, 选择齐墩果酸作用 HepG2 细胞 12 h, 浓度为 25.0、50.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$ 的条件进行以下的实验。

表 1 齐墩果酸对 HepG2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Inhibition effects of oleanic acid on growth of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	抑制率/%		
	12 h	24 h	48 h
12.5	18.25 \pm 2.34	20.5 \pm 3.25	31.65 \pm 2.13
25.0	37.45 \pm 4.21	43.96 \pm 3.65	51.29 \pm 5.12
50.0	45.52 \pm 6.14	54.03 \pm 3.27	72.57 \pm 4.17
100.0	61.67 \pm 5.13	70.78 \pm 2.46	83.05 \pm 4.31
200.0	82.35 \pm 6.43	95.30 \pm 4.51	95.48 \pm 4.38

3.2 光学显微镜下的细胞形态变化

正常 HepG2 细胞贴壁生长良好、排列紧密且轮廓清楚; 经不同浓度齐墩果酸处理后, 细胞形态均发生变化, 细胞变圆漂浮、间隙增大且碎片增多, 并随着浓度的升高, 细胞形态有明显变化, 见图 1。

3.3 荧光显微镜下 AO/EB 染色后细胞形态变化

正常细胞发绿色荧光且形态完整; 经过齐墩果酸处理后的细胞发黄色荧光且形态模糊, 并随着齐墩果酸浓度升高, 早期凋亡细胞数量增加, 见图 2。

3.4 齐墩果酸对 HepG2 细胞凋亡的影响

与对照组早期细胞凋亡率 0.62%、晚期细胞凋亡率 3.80% 比较, 齐墩果酸组凋亡率显著升高。细胞总凋亡率随着齐墩果酸浓度增加而升高, 见表 2。

HepG2 细胞在 25.0 $\mu\text{mol/L}$ 齐墩果酸作用 12 h 后, 早期细胞凋亡率为 1.53%, 晚期细胞凋亡率为 6.96%; 在 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 齐墩果酸时, 早期细胞凋亡率为 1.71%, 晚期细胞凋亡率为 14.24%; 在 100.0 $\mu\text{mol/L}$ 齐墩果酸时, 早期细胞凋亡率为 2.37%, 晚期细胞凋亡率为 21.29%。见图 3。

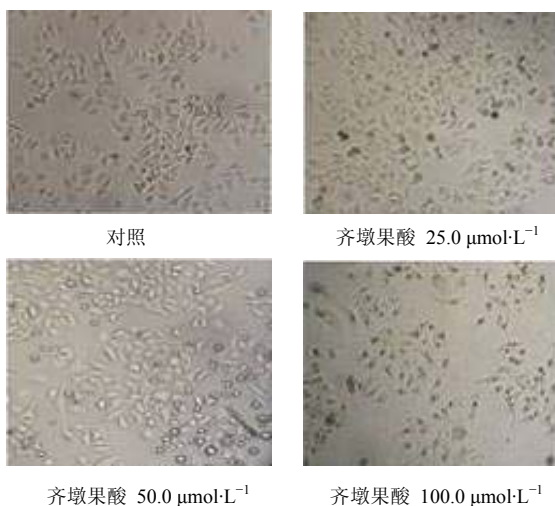


图 1 光学显微镜下 HepG2 细胞的形态变化
Fig. 1 Morphology of HepG2 cells under optical microscope

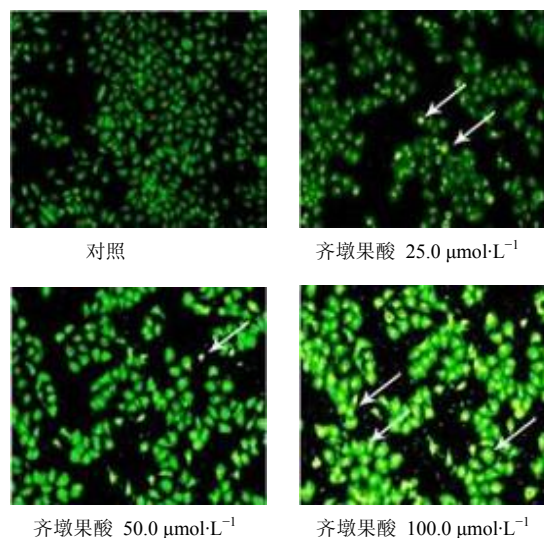


图 2 荧光显微镜下 HepG2 细胞的形态变化
Fig. 2 Morphology of HepG2 cells under fluorescence microscopy

表 2 齐墩果酸对 HepG2 细胞细胞凋亡影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Effects of oleanic acid on apoptosis of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	正常细胞率/%	细胞总凋亡率/%
对照	—	94.43 \pm 5.76	4.42 \pm 0.23
齐墩果酸	25.0	81.62 \pm 4.21*	8.49 \pm 1.19*
	50.0	70.58 \pm 4.34**	15.95 \pm 0.74**
	100.0	62.21 \pm 3.13*	23.66 \pm 1.16*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

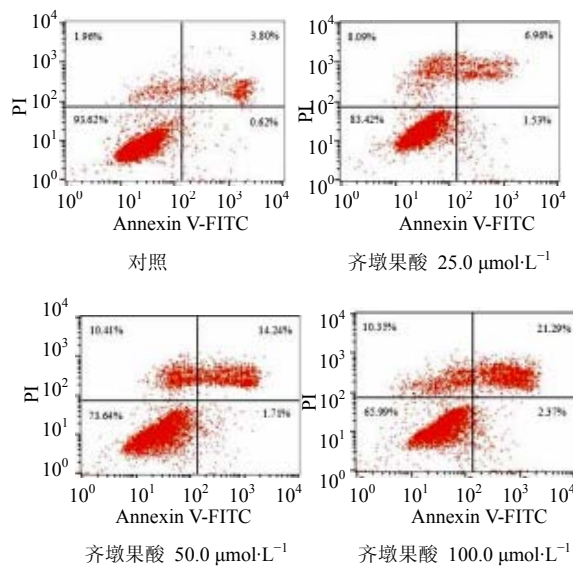


图3 齐墩果酸诱导 HepG2 细胞凋亡的流式细胞仪分析结果
Fig. 3 Results of flow cytometry on apoptosis of HepG2 cells treated with OA

3.5 齐墩果酸对 HepG2 细胞内 ROS 的影响

齐墩果酸在 25.0~100.0 μmol/L 浓度时, 细胞中 ROS 水平随着齐墩果酸浓度的增加而升高, 在 100.0 μmol/L 浓度时 ROS 水平升高到 145.15%, 见图 4。

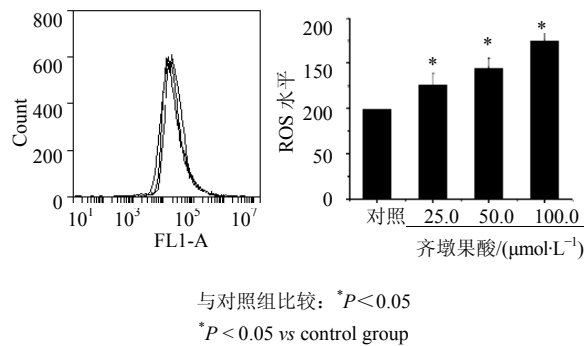


图4 齐墩果酸对 HepG2 细胞内 ROS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 4 Effects of oleanolic acid on intracellular ROS levels of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 齐墩果酸对 HepG2 细胞 MMP 的影响

细胞内的 MMP 水平随着齐墩果酸浓度的增加而降低, 在 100.0 μmol/L 浓度时 MMP 降到正常值的 51.79%, 见表 3。

4 讨论

齐墩果酸作为一种天然的五环三萜类化合物, 具有较好的抗肿瘤活性, 能对多种肿瘤细胞发挥作

表3 齐墩果酸对 HepG2 细胞内 MMP 影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Effects of oleanolic acid on MMP levels of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/(μmol·L ⁻¹)	红绿荧光比值	MMP 水平/%
对照	—	7.86 ± 0.37	100
齐墩果酸	25.0	6.69 ± 0.59**	85.28 ± 3.52*
果酸	50.0	4.89 ± 0.55*	62.20 ± 4.97**
	100.0	4.06 ± 0.78**	51.79 ± 4.74**

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01
*P<0.05 **P<0.01 vs control group

用, 如白血病 HL-60 细胞^[13]、人肺巨细胞癌 PGCL3^[14]、人肝癌细胞 HuH7^[15]。本研究探讨了齐墩果酸诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡及其作用机制。

线粒体作为细胞能量产生的主要场所, 在细胞有氧呼吸过程中会产生许多含氧物质, 其中 ROS 作为一个典型代表, 即线粒体是 ROS 产生的重要场所。有报道表明 ROS 在凋亡发生过程中起着重要的作用, 许多抗肿瘤药物如多柔比星^[16]、长春新碱^[17]能够通过增加 ROS 水平诱导肿瘤细胞凋亡。同时大量文献也证实^[18], 线粒体膜电位在细胞凋亡中发挥关键的作用, 并受到 ROS 水平的影响, 线粒体在 ROS 产生过多或受到损伤时, 会使孔道开放膜通透转变, 造成线粒体膜电位下降, 从而诱导细胞不可逆走向凋亡, 发生系列的级联反应。本研究结果显示齐墩果酸能抑制 HepG2 细胞的增殖生长, 对细胞生长抑制作用呈浓度和时间相关性, 随着浓度的增加及作用时间的延长, 抑制作用明显增强; 细胞凋亡及形态学结果表明, 齐墩果酸对 HepG2 细胞的增殖抑制作用是诱导其凋亡产生的, 同时凋亡过程中伴有 ROS、MMP 的变化, 表明齐墩果酸对 HepG2 细胞的抑制增殖和诱导凋亡可通过调节细胞中 ROS 和 MMP 发挥作用, 而具体的凋亡信号通路和相关蛋白还有待进一步研究。

综上所述, 本研究通过对齐墩果酸体外诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡, 发现齐墩果酸可通过调节 ROS 和 MMP 抑制肿瘤细胞的增殖和诱导其凋亡, 因此本研究可为肝癌药物的研发及疾病治疗提供有效依据, 并有望为临床治疗提供新的途径。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
[2] Kim K A, Lee J S, Park H J, et al. Inhibition of cytochrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes [J]. Life Sci, 2004,

- 74(22): 2769-2779.
- [3] Castellano J M, Guinda A, Delgado T, *et al.* Biochemical basis of the antidiabetic activity of oleanolic acid and related pentacyclic triterpenes [J]. *Diabetes*, 2013, 62(6): 1791-1799.
- [4] Yunoki K, Sasaki G, Tokuji Y, *et al.* Effect of dietary wine pomace extract and oleanolic acid on plasma lipids in rats fed high-fat diet and its DNA microarray analysis [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(24): 12052-12058.
- [5] Raphael T J, Kuttan G. Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system [J]. *Phytomedicine*, 2003, 10(6): 483-489.
- [6] Somova L O, Nadar A, Rammanan P, *et al.* Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension [J]. *Phytomedicine*, 2003, 10(2): 115-121.
- [7] Shanmugam M K, Dai X, Kumar A P, *et al.* Oleanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical evidence [J]. *Cancer Lett*, 2014, 346(2): 206-216.
- [8] 孟艳秋, 聂慧慧, 王晓晨, 等. 齐墩果酸衍生物的合成及抗肿瘤活性的研究 [J]. *药学学报*, 2011, 46(10): 1215-1220.
- [9] 魏鉴腾. 齐墩果酸的抗肿瘤作用及其作用机制研究 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2012.
- [10] Shan J, Xuan Y, Ruan S, *et al.* Proliferation-inhibiting and apoptosis-inducing effects of ursolic acid and oleanolic acid on multi-drug resistance cancer cells *in vitro* [J]. *Chin J Integr Med*, 2011, 17(8): 607-611.
- [11] Wei J, Liu M, Liu H, *et al.* Oleanolic acid arrests cell cycle and induces apoptosis via ROS-mediated mitochondrial depolarization and lysosomal membrane permeabilization in human pancreatic cancer cells [J]. *J Appl Toxicol*, 2013, 33(8): 756-765.
- [12] Tang X H, Gao J, Fang F, *et al.* Hepatoprotection of oleanolic acid is related to its inhibition on mitochondrial permeability transition [J]. *Am J Chin Med*, 2005, 33(4): 627-637.
- [13] 张鹏霞, 李鸿梅, 陈东, 等. 齐墩果酸诱导人白血病 HL-60 细胞凋亡及细胞周期阻滞 [J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(10): 1909-1911.
- [14] 黄炜, 黄济群, 张东方, 等. 维甲酸、甘草酸和 18 β -甘草次酸抗人肺癌细胞增殖和侵袭的作用 [J]. *中国肿瘤*, 2003, 12(11): 665-668.
- [15] Shyu M H, Kao T C, Yen G C. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in HuH7 human hepatocellular carcinoma cells through a mitochondrial-dependent pathway and downregulation of XIAP [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(10): 6110-6118.
- [16] Mizutani H, Tada-Oikawa S, Hiraku Y, *et al.* Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide [J]. *Life Sci*, 2005, 76(13): 1439-1453.
- [17] Groninger E, Boer M D, De Graaf S S N, *et al.* Vincristine induced apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cells: a mitochondrial controlled pathway regulated by reactive oxygen species [J]. *Int J Oncol*, 2002, 21(6): 1339-1345.
- [18] Lucken-Ardjomande S, Martinou J C. Newcomers in the process of mitochondrial permeabilization [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(3): 473-483.