

复方木鸡颗粒联合顺铂对人肝癌 HepG2 细胞增殖及凋亡的机制研究

胡超¹, 肖幸华^{1*}, 唐林², 刘检²

1. 湘雅常德医院 药剂科, 湖南 常德 415000

2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

摘要: **目的** 探讨复方木鸡颗粒联合顺铂对人肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响及其潜在的作用机制。**方法** 体外培养人肝癌 HepG2 细胞, 取对数生长期细胞, 将其消化后随机分为对照组, 复方木鸡颗粒高、低 (10、5 mg/mL) 剂量组, 顺铂组 (1 mg/mL) 和复方木鸡颗粒 (5 mg/mL) 联合顺铂 (1 mg/mL) 组, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖情况, 采用 Hoechst 染色法检测细胞凋亡情况, 采用免疫荧光联合激光共聚焦分别检测各组细胞中凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、蛋白天冬氨酸蛋白水解酶-9 (Caspase-9)、细胞色素 C 氧化酶 (Cyt-C) 表达水平。**结果** 与对照组比较, 复方木鸡颗粒 10、5 mg/mL 组及顺铂组、联合组的细胞活力显著降低 ($P < 0.01$), 细胞凋亡显著增加, 细胞内 Bcl-2 蛋白表达显著下调 ($P < 0.05$ 、 0.01), 而 Bax、Caspase-9、Cyt-C 蛋白显著上调 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且联合组在抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖、促进其凋亡、调控凋亡相关蛋白表达的作用效果最佳。**结论** 复方木鸡颗粒可显著抑制 HepG2 细胞增殖并促进其凋亡, 其与顺铂联合起到协同增效的效果, 其作用机制可能与下调人肝癌 HepG2 细胞内抑凋亡蛋白 Bcl-2, 上调促凋亡蛋白 Bax、Caspase-9、Cyt-C 表达水平有关。

关键词: 复方木鸡颗粒; 顺铂; 肝癌; 细胞增殖; 细胞凋亡; B 淋巴细胞瘤-2; Bcl-2 相关 X 蛋白; 蛋白天冬氨酸蛋白水解酶-9; 细胞色素 C 氧化酶

中图分类号: R966

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2020)08-1512-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.08.002

Effects of Compound Muji Granules combined with cisplatin on proliferation and apoptosis of human hepatoma HepG2 and its potential mechanism

HU Chao¹, XIAO Xing-hua¹, TANG Lin², LIU Jian²

1. Department of Pharmacy, Xiangya Changde Hospital, Changde 415000, China

2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

Abstract: **Objective** To discuss the effects of Compound Muji Granules combined with cisplatin on proliferation and apoptosis of human hepatoma HepG2 and its potential mechanism. **Methods** HepG2 cells were cultured *in vitro*, and then were divided into the control group, Compound Muji Granules high and low (10 and 5 mg/mL) groups, cisplatin group (1 mg/mL), Compound Muji Granules (5 mg/mL) + cisplatin (1 mg/mL) group. The cell proliferation inhibition was detected by CCK-8. Hoechst staining was used to detect the apoptosis of HepG2 cells, and the immunofluorescent staining was used to detect the protein expressions of Bcl-2, Bax, Caspase 9, and Cyt C in HepG2 cells. **Results** Compared with the control group, the cell viability of Compound Muji Granules 10 and 5 mg/mL groups, cisplatin group, and Compound Muji Granules + cisplatin group was significantly reduced ($P < 0.01$), while the apoptosis of HepG2 cells was increased, and the relative expression of Bcl-2 protein was decreased, but the relative expression of Bax, Caspase 9, and Cyt C protein was significantly increased ($P < 0.05$, 0.01). And Compound Muji Granules + cisplatin group had the best effect on inhibiting the proliferation, promoting the apoptosis and regulating the expression of apoptosis-related proteins of HepG2 cells. **Conclusion** Compound Muji Granules inhibits the proliferation and promotes the apoptosis of HepG2 cells, and the effect enhanced while combined with cisplatin by reducing Bcl-2 and increasing Bax, Caspase-9, and Cyt C.

Key words: Compound Muji Granules; cisplatin; liver cancer; proliferation; apoptosis; Bcl-2; Bax; Caspase-9; Cyt-C

收稿日期: 2020-05-23

基金项目: 湖南省自然科学基金科卫联合项目 (2018JJ6078)

作者简介: 胡超, 硕士, 初级药师, 从事中药制剂的质量与评价研究。E-mail: 348009051@qq.com

*通信作者 肖幸华, 硕士, 主管药师, 从事中药天然产物的研究。E-mail: 526567585@qq.com

肝癌是常见的恶性肿瘤,具有发病隐匿、致死率高的特点^[1-2]。由于化疗药物不良反应较多且易耐药,目前西医尚无控制肝癌细胞增殖及转移的特效药物。因此,越来越多研究将传统中草药作为癌症治疗研究的重点。复方木鸡颗粒是著名满药,该药自1985年投放市场以来,在解放军第三〇二医院、上海复旦大学附属华山医院等多家三甲医院临床应用30多年,用于治疗肝癌疗效突出^[3-5]。既往研究显示复方木鸡颗粒具有较强的抗肿瘤及调节免疫活性,但该药抗肝癌活性机制尚不明确,这可能限制其在临床的进一步发展。因此,本实验将研究复方木鸡颗粒对人肝癌HepG2细胞增殖、凋亡的影响,初步探讨该药及其联合顺铂的抗肝癌机制,为该药在抗肿瘤领域的进一步开发利用奠定实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人肝癌HepG2细胞株,批号CL-0103,购于武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药品与试剂

复方木鸡颗粒(丹东药业集团有限公司,4 g/袋,批号180802);顺铂(齐鲁制药有限公司,10 mg/瓶,批号8CD214B02);胎牛血清(美国Gibco公司,批号10270106);DMEM培养基(美国Gibco公司,批号8119002);CCK-8(Bioss公司,批号A108014117);DAPI(Solarbio公司,批号20161111);Hoechst 33258(Solarbio公司,批号B8030);Bcl-2相关X蛋白(Bax,货号50599-2-1g,proteintech);蛋白天冬氨酸蛋白水解酶-9(Caspase-9,货号10380-1-AP,proteintech);细胞色素C氧化酶(Cyt-C,货号10933-1-AP,proteintech);B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2,货号AH08099535, Bioss公司)。

1.3 主要仪器

Enspire 全波长多功能酶标仪(美国Perkinelmer公司);HERACE 二氧化碳细胞培养箱(英国Thermo公司);LSM800 超高分辨率激光共聚焦显微镜(德国Zeiss公司);TDZ5-WS 低速离心机(湖南湘仪仪器公司)。

1.4 细胞培养与分组

取人肝癌HepG2细胞,采用DMEM高糖培养基(其中含10%FBS和1%双抗)于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养,取对数生长期细胞,用胰蛋白酶消化后,按适宜密度将细胞随机分为5组:对照组,复方木鸡颗粒高、低(10、5 mg/mL)剂量组,

顺铂组(1 mg/mL)和复方木鸡颗粒(5 mg/mL)联合顺铂(1 mg/mL)组。

1.5 CCK-8 法检测 HepG2 细胞活力

待HepG2细胞生长至70%~80%融合程度时,0.25%胰蛋白酶消化后,调整细胞密度,按每孔5 000个细胞接种于96孔培养板,静置培养18~24 h,待细胞充分贴壁后,弃掉孔内液体,除对照组外,其余各组加入相应药物。继续培养24 h后,弃掉孔内液体,然后加入完全培养基190 μL,同时每孔加入10 μL CCK-8溶液,于细胞培养箱中继续培养4 h,最后用酶标仪于450 nm波长下测定各孔的吸光度(A)值,扣除底板值,并计算各组细胞的相对存活率及药物抑制率。

细胞抑制率=(对照组细胞存活率-给药组细胞存活率)/对照组细胞存活率

1.6 Hoechst 染色法检测 HepG2 细胞凋亡

待HepG2细胞生长至70%~80%融合程度时,0.25%胰蛋白酶消化后,调整细胞密度,按每孔5 000个细胞接种于黑色96孔培养板,静置培养18~24 h,待细胞充分贴壁后,弃掉孔内液体,除对照组外,其余各组加入相应药物。继续培养24 h后,弃掉孔内液体,冷0.01 mol/L PBS润洗2次,4%多聚甲醛固定45 min,弃液,冷0.01 mol/L PBS润洗3次,0.25%Triton-100处理15 min,弃液,冷0.01 mol/L PBS润洗2次,每孔加入80 μL Hoechst 33258工作液,室温避光孵育15 min,弃液,冷0.01 mol/L PBS润洗5次,最后每孔加入50 μL PBS,与激光共聚焦显微镜上进行荧光检测。

1.7 免疫荧光染色法检测 HepG2 细胞内凋亡相关蛋白表达水平

待HepG2细胞生长至70%~80%融合程度时,0.25%胰蛋白酶消化后,调整细胞密度,按每孔3 000个细胞接种于96孔培养板,静置培养18~24 h,待细胞充分贴壁后,弃掉孔内液体,除对照组外,其余各组加入相应药物。继续培养24 h后,弃掉孔内液体,冷0.01 mol/L PBS润洗2次,4%多聚甲醛固定45 min,弃液,冷0.01 mol/L PBS润洗3次,0.25%Triton-100处理15 min,弃液,冷0.01 mol/L PBS润洗2次,5%BSA封闭10 min,弃液,冷0.01 mol/L PBS润洗1次,分别加入兔抗人Bcl-2、Bax、Caspase-9、Cyt-C一抗稀释液(体积比1:100),4℃避光孵育过夜,弃液,冷0.01 mol/L PBS润洗5次,加入FITC标记的山羊抗兔二抗稀释液(体积比1:400),

37 ℃避光孵育 30 min, 弃液, 冷 0.01 mol/L PBS 润洗 5 次, 加入 DAPI 稀释液 (体积比 1:800), 室温避光孵育 15 min, 弃液, 冷 0.01 mol/L PBS 洗 4 次, 最后于激光共聚焦显微镜进行荧光检测, 并以细胞平均荧光强度值反映各蛋白相对表达水平。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 复方木鸡颗粒联合顺铂对人肝癌 HepG2 细胞增殖的影响

CCK-8 检测结果显示, 与对照组比较, 复方木鸡颗粒 10、5 mg/mL 组及顺铂组、复方木鸡颗粒+顺铂组人肝癌 HepG2 细胞活力均显著降低 ($P < 0.01$); 且与单纯顺铂组比较, 复方木鸡颗粒+顺铂组更能有效抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 复方木鸡颗粒联合顺铂对人肝癌 HepG2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Effect of Compound Muji Granules combined with cisplatin on proliferation of human hepatoma HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/(mg·mL ⁻¹)	抑制率/%
对照	—	0.00 ± 5.55
复方木鸡颗粒	10	67.21 ± 4.75**
	5	26.99 ± 6.53**
顺铂	1	54.09 ± 4.68**
复方木鸡颗粒+顺铂	5+1	77.17 ± 3.20**#

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与顺铂组比较: # $P < 0.05$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs cisplatin group

2.2 复方木鸡颗粒联合顺铂对人肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响

与对照组比较, 复方木鸡颗粒 10、5 mg/mL 组及顺铂组、复方木鸡颗粒+顺铂组人肝癌 HepG2 细胞凋亡显著, 细胞核浓缩、聚集, 深染, 同时呈现马蹄形或半月牙状的典型细胞凋亡特征, 各组中尤以复方木鸡颗粒+顺铂组促进细胞凋亡作用更明显, 见图 1。

2.3 复方木鸡颗粒联合顺铂对人肝癌 HepG2 细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响

与对照组比较, 复方木鸡颗粒 10、5 mg/mL 组及顺铂组、复方木鸡颗粒+顺铂组人肝癌 HepG2 细胞内 Bcl-2 荧光强度值显著降低, 而细胞内 Bax、Caspase-9、Cyt-C 荧光强度值明显升高。由于荧光强度值与蛋白表达水平呈正比, 这提示复方木鸡颗粒能显著下调 HepG2 细胞内抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01), 同时上调 HepG2 细胞内促凋亡蛋白 Bax、Caspase-9、Cyt-C 表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01)。与顺铂组比较, 复方木鸡颗粒+顺铂组更能起到协同增效的作用, 其作用机制可能与调控人肝癌 HepG2 细胞内凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-9、Cyt-C 表达水平有关。见图 2、表 2。

3 讨论

肝癌是高发病率和高死亡率的恶性肿瘤, 目前手术治疗及放化疗存在一定的弊端, 而中药对肿瘤存在多成分、多靶点的作用, 在控制病情发展、改善症状等方面的优势日益凸显。复方木鸡颗粒由云芝、山豆根、菟丝子、核桃楸皮 4 味药组成。木鸡 (云芝提取物) 养肝散结, 健脾除湿, 为“君药”; 核桃楸皮和山豆根清热解毒, 为“臣药”; 菟丝子保肝明目, 为佐使药, 佐制山豆根的苦寒太过。各味

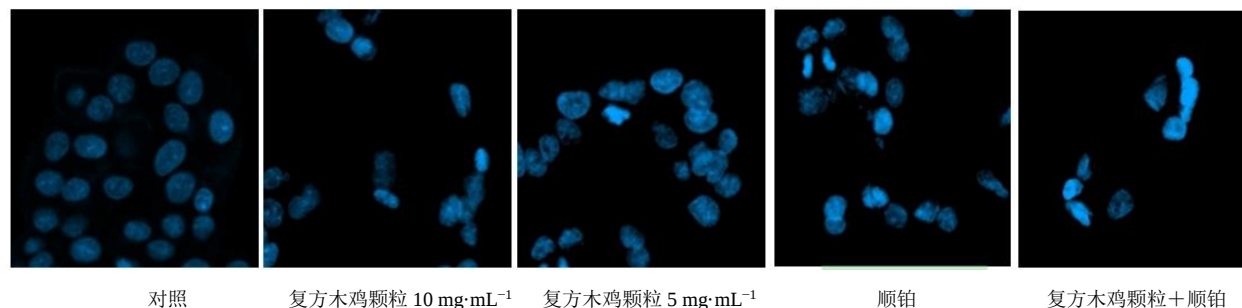


图 1 复方木鸡颗粒联合顺铂对人肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响

Fig. 1 Effect of Compound Muji Granules combined with cisplatin on apoptosis of human hepatoma HepG2 cells

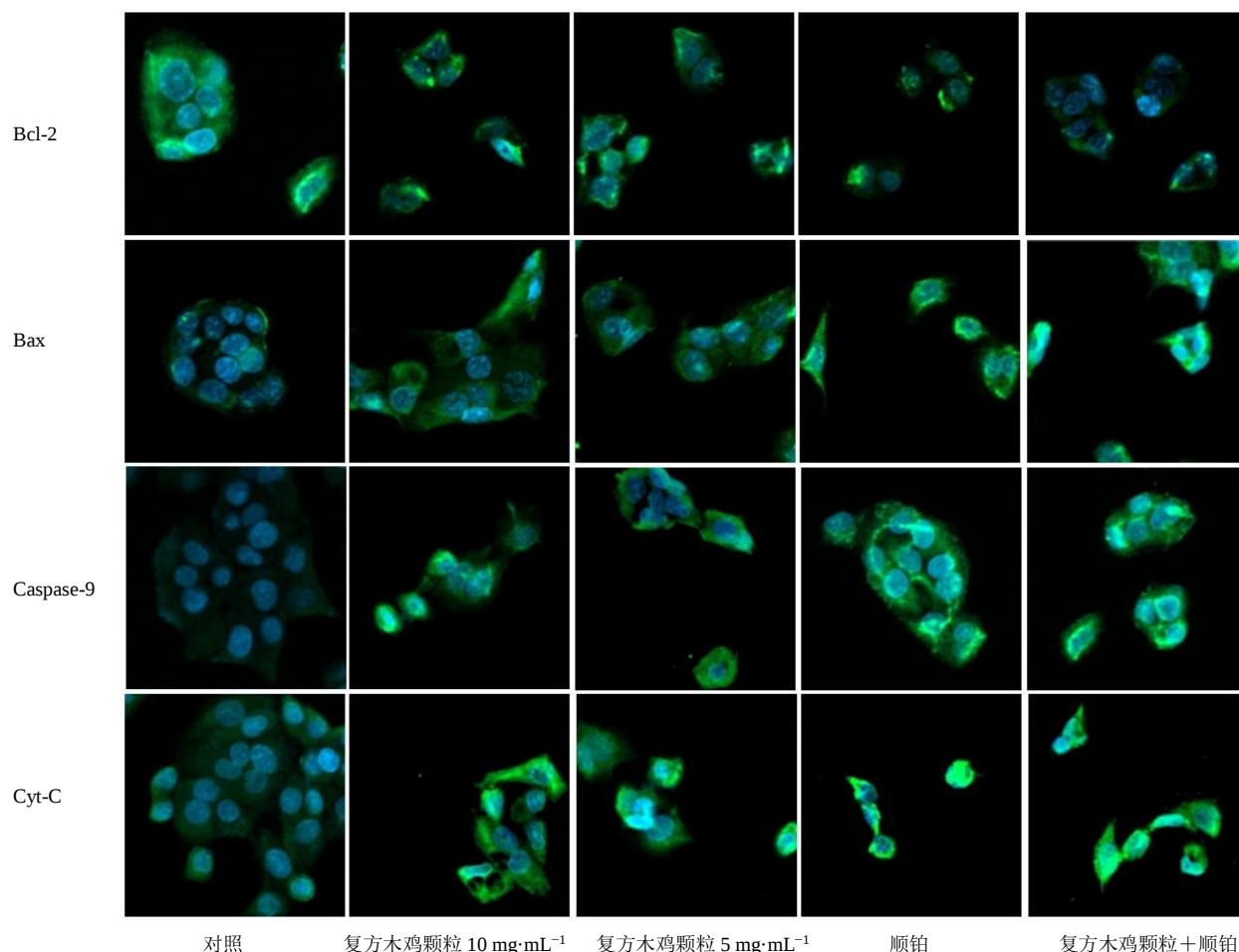


图2 复方木鸡颗粒联合顺铂对人肝癌 HepG2 细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响

Fig. 2 Effect of Compound Muji Granules combined with cisplatin on expression levels of apoptosis-related proteins of human hepatoma HepG2 cells

表2 复方木鸡颗粒联合顺铂对人肝癌 HepG2 细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Tale 2 Effect of Compound Muji Granules combined with cisplatin on expression levels of apoptosis-related proteins of human hepatoma HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/(mg·mL ⁻¹)	Bcl-2	Bax	Caspase-9	Cyt-C
对照	—	2 281.4±185.5	1 569.2±129.3	1 989.9±195.9	2 361.6±284.3
复方木鸡颗粒	10	1 578.7±117.8**	2 784.7±319.3**	2 667.6±194.1*	3 849.3±408.0**
	5	1 812.4±159.1*	2 318.8±245.3**	2 537.1±202.4*	3 263.2±329.4*
顺铂	1	1 439.8±139.6**	3 080.6±311.7**	3 061.3±284.6**	3 964.5±360.7**
复方木鸡颗粒+顺铂	5+1	1 286.8±115.9**	3 421.2±362.8**	3 729.2±386.9**	4 586.4±424.5**

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

药相结合共收扶正固本, 解毒散结之功效, 临床常作为肝癌治疗药物^[6-10]。细胞凋亡是一种由基因调控的细胞程序性死亡过程, 与细胞增殖共同维持机体与细胞自身的稳态^[11]。Bcl-2 家族蛋白是细胞凋

亡调节过程中的一类重要蛋白, 该家族主要包括凋亡抑制蛋白 Bcl-2 和凋亡促进蛋白 Bax^[12]。研究发现在外源性或内源性凋亡信号的刺激下, Bcl-2 可通过与 Bax 结合形成 Bcl-2-Bax 异源二聚体, 以抑制

细胞凋亡过程的发生,此外 Bax 可通过转位并紧密结合到线粒体膜上,导致线粒体中的促凋亡蛋白细胞色素 C (Cyt C) 大量释放,并募集 Caspase-9 前体产生凋亡小体,激活凋亡执行 Caspase-9,通过信号级联放大后,并以 Caspase 依赖性信号途径诱导细胞凋亡^[13-15]。

顺铂为临床常用的化疗药物,在肝癌的化学药物治疗中占有极其重要的地位,但由于其肾毒性、骨髓抑制等严重的毒副作用限制了其进一步推广使用^[16-17]。为了探讨复方木鸡颗粒联合顺铂能否有效抑制人肝癌 HepG2 细胞,本文从细胞增殖和细胞凋亡两个层次验证了其作用效果及潜在机制。结果发现,与对照组比较,复方木鸡颗粒 10、5 mg/mL 组、顺铂组、联合组细胞活力均显著降低、细胞凋亡显著增加,细胞内 Bcl-2 蛋白表达显著下调,而 Bax、Caspase-9、Cyt-C 蛋白显著上调,且复方木鸡颗粒联合顺铂在抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖、促进其凋亡、调控凋亡相关蛋白表达的作用效果更佳,这提示复方木鸡颗粒可显著抑制 HepG2 细胞增殖并促进其凋亡,且复方木鸡颗粒与顺铂联合起到协同增效减毒的作用,顺铂通过与复方木鸡颗粒配伍应用,能够降低顺铂的使用剂量,减少其毒副作用,为临床两药的合理配伍使用治疗肝癌提供了实验依据。

综上所述,复方木鸡颗粒可显著抑制 HepG2 细胞增殖并促进其凋亡,与顺铂联合起到协同增效的作用效果,其作用机制可能与调控内源性凋亡途径 Bcl-2/Bax-Cyt-C/Caspase-9 有关,后续将进一步研究其深层作用机制。

参考文献

- [1] 吕桂帅,陈磊,王红阳.我国肝癌研究的现状与前景[J].生命科学,2015,27(3):237-248.
- [2] 高苗苗,徐芳野,木合布力·阿布力孜.肝癌治疗靶点及肝靶向抗癌药物研究进展[J].新疆医科大学学报,2012,35(2):146-152.
- [3] 刘永久,杨良.复方木鸡颗粒治疗肝炎 AFP 低持阳者疗效分析[J].中成药,2001,23(4):302-303.
- [4] 金黎明,胡文忠,侯梦阳.满药复方木鸡颗粒防治肝病的研究进展[J].广州中医药大学学报,2017,34(2):292-296.
- [5] 吴海江,崔宁,曹弛,等.介入治疗加服复方木鸡冲剂治疗原发性肝癌的临床观察[J].中国医药,2008,3(12):792-793.
- [6] 刘瑞,侯亚义,张伟云,等.云芝子实体提取物的抗肿瘤作用研究[J].医学研究生学报,2004,17(5):413-415.
- [7] 吴宜艳,郑科文,侯甲福,等.核桃楸含药血清对体外培养肝癌细胞增殖的影响[J].中国中医药科技,2012,19(2):128.
- [8] 常乐,孟楠,雷涛,等.核桃楸皮药理作用的研究概述[J].中国医药导报,2013,10(1):23-24.
- [9] 肖正明,宋景贵,徐朝晖,等.山豆根水提物对体外培养人肝癌细胞增殖及代谢的影响[J].山东中医药大学学报,2000,24(1):62-64.
- [10] 牟洪香,王李鸣,刘大伟,等.菟丝子对 D-半乳糖致衰大鼠肝脏氧化损伤保护作用的研究[J].黑龙江医药科学,2014,37(4):25-26.
- [11] Wawryk-Gawda E, Chylińska-Wrzos P, Lis-Sochocka M, et al. P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells[J]. *Protoplasma*, 2014, 251(3): 525-533.
- [12] Liang M, Li A, Lou A, et al. Advanced oxidation protein products promote NADPH oxidase-dependent β -cell destruction and dysfunction through the Bcl-2/Bax apoptotic pathway[J]. *Lab Invest*, 2017, 97(7): 792-806.
- [13] Liang S, Sun K, Wang Y, et al. Role of Cyt-C/Caspases-9,3,Bax/Bcl-2 and the FAS death receptor pathway in apoptosis induced by zinc oxide nanoparticles in human aortic endothelial cells and the protective effect by alpha-lipoic acid[J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 258: 40-51.
- [14] Wang Q Q, Zhang L L, Yuan X D, et al. The relationship between the Bcl-2/Bax proteins and the mitochondria-mediated apoptosis pathway in the differentiation of adipose-derived stromal cells into neurons[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0163327.
- [15] Shao X T, Chen Q X, Dou X X, et al. Lower range of molecular weight of xanthan gum inhibits cartilage matrix destruction via intrinsic Bax-mitochondria cytochrome C-caspase pathway[J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 198: 354-363.
- [16] Shaloam Dasari, Paul Bernard Tchounwou. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 740: 364-378.
- [17] Daniel J Crona, Aimee Faso, Tomohiro F NishijimaA, et al. Systematic review of strategies to prevent cisplatin-induced nephrotoxicity[J]. *Oncologist*, 2017, 22(5): 609-619.