

杠柳毒苷体外抑制肝癌细胞和乳腺癌细胞增殖的实验研究

丁菲菲, 张晓静, 邓雁如*

天津中医药大学, 天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 探讨杠柳毒苷在体外对人乳腺癌 MDA-MB-468 细胞和人肝癌 HepG2 细胞增殖的影响。方法 MTT 法观察杠柳毒苷对人乳腺癌 MDA-MB-468 细胞和人肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用, 流式细胞术观察杠柳毒苷对两种肿瘤细胞的细胞增殖周期作用。结果 与对照组比较, 杠柳毒苷能明显抑制两种肿瘤细胞的增殖, 其抑制率与药物浓度和作用时间呈正相关。流式细胞仪检测发现, 杠柳毒苷对乳腺癌 MDA-MB-468 细胞和肝癌 HepG2 细胞持续作用 24 h 后, 可以使 G₀/G₁ 期细胞增多, G₂/M 期细胞减少。结论 杠柳毒苷具有抑制乳腺癌 MDA-MB-468 细胞和肝癌 HepG2 细胞增殖的作用, 并可将乳腺癌 MDA-MB-468 细胞和肝癌 HepG2 细胞的细胞生长周期阻滞在 G₀/G₁ 期。

关键词: 杠柳毒苷; 香加皮; 乳腺癌 MDA-MB-468 细胞; 肝癌 HepG2 细胞; G₀/G₁ 期阻滞; 细胞增殖

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2014)01-0030-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.01.007

Inhibition of periplocin on human hepatoma carcinoma and breast carcinoma cells *in vitro*

DING Fei-fei, ZHANG Xiao-jing, DENG Yan-ru

Tianjin Key laboratory of Chemistry and Analysis of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To discuss the effect of periplocin on the proliferation of the breast carcinoma MDA-MB-468 cells and hepatocellular carcinoma HepG2 cells *in vitro*. **Methods** MTT method was used to examine the proliferation of MDA-MB-468 and HepG2 cells, and flow cytometry was used to observe the effect of periplocin on cell cycle of the two kinds of tumor cells. **Results** Compared with the control group, periplocin could obviously inhibit the proliferation of two kinds of cells, and the inhibitory rate was positively correlated with drug level and action time. By flow cytometry, it was found that after 24 h treatment, periplocin induced cell cycle (G₀/G₁) arrest in MDA-MB-468 and HepG2 cells. **Conclusion** Periplocin could inhibit the proliferation of the breast carcinoma MDA-MB-468 and hepatocellular carcinoma HepG2 cells, and block their cell cycle in G₀/G₁ phase.

Key words: periplocin; *Periploca sepium* Bunge; breast carcinoma MDA-MB-468 cells; hepatoma carcinoma HepG2 cells; G₀/G₁ phase arrest; cell proliferation

香加皮为萝藦科杠柳属植物杠柳 *Periploca sepium* Bunge 的干燥根皮, 又称北五加皮、杠柳皮、臭五加、山五加皮、香五加皮等。其味辛、苦, 性温, 有毒, 具有利尿消肿、祛风湿、强筋骨的功效, 主要用于风寒湿痹、腰膝酸软、心悸气短、下肢水肿等^[1]。化学成分研究表明香加皮中含有 C₂₁ 甾类、强心苷类、三萜类等多种化学成分^[2-3]。近年来研究显示香加皮提取物及其中一些化学成分可抑制肝癌、肺癌、食管癌、膀胱癌、宫颈癌、乳腺癌等多

种癌细胞的生长^[4-8]。杠柳毒苷又名杠柳苷 G、萝藦毒苷 (periplocin, periploside G), 为强心苷类成分, 是香加皮治疗慢性充血性心力衰竭和心脏性浮肿的有效成分之一, 分子式为 C₃₆H₅₆O₁₃, 相对分子质量为 696, 既往研究表明杠柳毒苷可明显抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖, 使细胞周期停滞在 G₂/M 期, 并能够诱导 SMMC-7721 细胞凋亡^[9], 杠柳毒苷还具有抑制食管鳞癌细胞 TE-1、TE-10、TE-13、Eca-109 及乳腺癌 MCF-7 增殖的活性^[10-11]。

收稿日期: 2013-09-11

基金项目: 天津市卫生局课题 (2005075)

作者简介: 丁菲菲 (1989—), 女, 硕士, 从事中药有效成分研究。

*通信作者 邓雁如, 教授。Tel: (022)59596221 E-mail: dyanru@sina.com

为进一步探究杠柳毒苷对肿瘤细胞增殖的抑制作用,本研究将杠柳毒苷作用于人肝癌 HepG2 细胞和人乳腺癌 MDA-MB-468 细胞,观察其对这两种肿瘤细胞株增殖的抑制作用,以及对细胞周期或凋亡的影响,为开发和利用香加皮及杠柳毒苷提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及药物

人乳腺癌 MDA-MB-468 细胞和人肝癌 HepG2 细胞均购自中国医学科学院基础医学研究所。杠柳毒苷由本实验室分离纯化,经 HPLC 检测,质量分数达到 98%以上。

1.2 试剂和仪器

RPMI1640 培养基(美国 Gibco 公司,批号 11875-093),特级胎牛血清(FBS,澳洲血源,以色列 Bioind 公司,批号 04-001AUS-1A);青/链霉素(P/S,美国 Hyclone 公司,批号 SV30010);胰蛋白酶(0.05%)-EDTA(美国 Gibco 公司,批号 25300);MTT(美国 Solarbio 公司,批号 M8180);甲醇、乙腈(色谱纯,天津市康科德科技有限公司);其他试剂为分析纯;水为超纯水。Forma 3110 CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo 公司);DC300F 倒置相差显微镜(美国 Leica 公司);BT125D 电子分析天平(德国赛多利斯公司);KQ—500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Allegra 64R centrifuge 高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司)

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将乳腺癌 MDA-MB-468 细胞及肝癌 HepG2 细胞培养于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中,培养液为含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基,隔天更换培养液,0.25%的胰蛋白酶消化液进行消化传代,待细胞呈对数生长时即开始试验。

1.3.2 MTT 法检测杠柳毒苷对乳腺癌 MDA-MB-468 细胞及肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用 将乳腺癌 MDA-MB-468 细胞及肝癌 HepG2 细胞制成 1×10⁵/mL 单细胞悬液,分别接种于 96 孔板,每孔加细胞悬液 100 μL。加入用培养基溶解的不同质量浓度的杠柳毒苷(终质量浓度分别为 1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 ng/mL) 100 μL,每个浓度设 6 个重复孔,并设空白对照孔(仅加入 100 μL 的 1640 培养液)于 37 ℃,5% CO₂ 的培养箱中分别培养 24、48、72 h 后,每孔加入 MTT 100 μL

(5 mg/mL),孵育 4 h,测定前弃上清,每孔用 100 μL 二甲基亚砷溶解结晶,振荡 1 min,于酶标仪上,选取波长 490 nm 处测定其吸光度(A)值。计算药物对细胞生长的抑制率。

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

1.3.3 流式细胞仪检测细胞周期分布 将乳腺癌 MDA-MB-468 细胞及肝癌 HepG2 细胞制成 1×10⁵/mL 单细胞悬液,分别接种于 25 cm² 的培养瓶中,每瓶加入 5 mL 培养液,同步化 24 h 后,设空白对照组以及不同质量浓度的杠柳毒苷组(终质量浓度分别为 5.00、10.00、20.00 ng/mL),分别作用 24 h 后,弃去原瓶中培养液,将细胞用 D-Hank's 液清洗两次,加入 2 mL 胰酶进行消化,收集细胞,并用 D-Hank's 液清洗两次,离心弃去清洗液。用 70%预冷乙醇固定过夜。离心弃去乙醇液并用 D-Hank's 液清洗一次,弃去清洗液,加入终质量浓度为 25 ng/mL 的 PI 液 1 mL,4 ℃暗染 30 min,流式细胞仪检测细胞周期分布情况。

1.3.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行数据处理,数据统计采用方差分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 杠柳毒苷对乳腺癌 MDA-MB-468 细胞及肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用

杠柳毒苷分别作用于乳腺癌 MDA-MB-468 细胞和肝癌 HepG2 细胞 24、48 和 72 h 后,在一定质量浓度范围内,随着药物质量浓度的增加,细胞增殖的抑制率呈剂量相关性,即药物质量浓度越高,对肿瘤细胞的抑制率越高,同时随着时间的延长,抑制效果更明显。结果见表 1、2。

表 1 杠柳毒苷对乳腺癌 MDA-MB-468 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Inhibition of periplocin on proliferation of breast carcinoma MDA-MB-468 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

剂量/ (ng·mL ⁻¹)	抑制率/%		
	24 h	48 h	72 h
1.25	0.2±0.3	1.9±0.3	3.2±0.2
2.50	4.6±0.3**	4.1±0.3**	6.1±0.3**
5.00	8.6±0.4**	9.5±0.2**	9.8±0.3**
10.00	11.9±0.3**	16.4±0.3**	20.2±1.2**
20.00	18.5±2.3**	27.0±2.3**	35.5±3.4**

同一作用时间下,与前一剂量比较: ***P* < 0.01
at the same time, ***P* < 0.01 vs former dosage

表2 杠柳毒苷对肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用
($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Inhibition of periplocin on proliferation of
hepatocellular carcinoma HepG2 cells
($\bar{x} \pm s, n = 6$)

剂量/ng·mL ⁻¹	抑制率/%		
	24 h	48 h	72 h
1.25	4.3 ± 1.3	7.4 ± 0.4	6.5 ± 0.3
2.50	5.7 ± 0.3	9.1 ± 0.4**	10.3 ± 0.3**
5.00	9.7 ± 1.0**	12.2 ± 0.6**	19.3 ± 0.7**
10.00	12.0 ± 1.1	17.7 ± 0.5**	34.7 ± 1.0**
20.00	28.2 ± 0.8**	36.7 ± 2.0**	35.8 ± 2.4

同一作用时间下, 与前一剂量比较: ** $P < 0.01$

at the same time, ** $P < 0.01$ vs former dosage

2.2 杠柳毒苷对乳腺癌 MDA-MB-468 细胞及肝癌 HepG2 细胞周期的作用

乳腺癌 MDA-MB-468 细胞及肝癌 HepG2 细胞给药 5、10、20 ng/mL 并进行 PI 染色后使用流式细胞仪进行检测分析。杠柳毒苷作用于乳腺癌 MDA-MB-468 细胞后, 随着作用浓度的增大, 处于 G₀/G₁ 期的细胞百分比不断增高, 当作用浓度为 20 ng/mL 时, 由初期的 62.52% 上升为 74.10%, G₂/M 期细胞百分比减少, 由初期的 15.97% 减少至 6.92%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 这表明杠柳毒苷能将乳腺癌 MDA-MB-468 细胞阻滞于 G₀/G₁ 期, 使细胞周期停滞于 G₀/G₁ 期, 减少 DNA 合成和有丝分裂, 抑制癌细胞的增殖 (表 3)。杠柳毒苷作用于肝癌 HepG2 细胞 24 h 后, 处于 G₀/G₁ 期的细胞由最初的 65.52% 分别增加至 82.29% (5 ng/mL)、85.42% (10 ng/mL) 和 89.54% (20 ng/mL), G₂/M 期的细胞减少, 由最初的 15.97% 减少至 5.21% (5 ng/mL)、5.44% (10 ng/mL) 和 4.66% (20 ng/mL), 统计结果分析, 给药组与对照组相比均有显著性差异 ($P < 0.05$), 但各浓度组之间没有明显差异。

表3 杠柳毒苷作用于 MDA-MB-468 细胞 24 h 后细胞周期的分布 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Distribution of periplocin on cell cycle of breast carcinoma MDA-MB-468 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(ng·mL ⁻¹)	G ₀ /G ₁ 期	G ₂ /M 期
对照	—	62.52 ± 2.78	15.97 ± 2.73
杠柳毒苷	5	68.01 ± 3.38	10.42 ± 2.72
	10	72.66 ± 3.64*	8.40 ± 2.86*
	20	74.10 ± 3.42*	6.92 ± 2.60*

与对照组比较: * $P < 0.05$

$P < 0.05$ vs control group

3 讨论

香加皮水提取物及杠柳毒苷的抗肿瘤活性已有报道, 但尚未见杠柳毒苷对乳腺癌 MDA-MB-468 细胞及肝癌 HepG2 的细胞作用及机制的研究报道。本研究探讨了杠柳毒苷对这两种癌细胞增殖的影响, 结果显示 1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 ng/mL 的杠柳毒苷对两种肿瘤细胞的增殖具有明显的抑制作用。

肿瘤的发生是一个多步骤的复杂过程, 肿瘤细胞的典型特征脱离了正常细胞增殖的调控体系而自主的无限生长, 因此抑制肿瘤细胞增殖是抗肿瘤治疗的重要环节。MTT 法分析结果表明, 杠柳毒苷以剂量和时间相关方式, 抑制乳腺癌 MDA-MB-468 细胞及肝癌 HepG2 细胞的增殖。

细胞增殖的过程也是细胞周期循环的过程 (包括 G₀/G₁ 期、S 期和 G₂/M 期), 细胞周期的紊乱是肿瘤最主要的发生机制, 因此细胞增殖的抑制可能是细胞周期循环停滞的结果^[12]。流式细胞仪分析结果表明杠柳毒苷作用于乳腺癌 MDA-MB-468 细胞和肝癌 HepG2 细胞后, G₀/G₁ 期细胞明显增加, G₂/M 期细胞明显减少, 细胞周期被阻滞在 G₀/G₁ 期, 但杠柳毒苷作用于肝癌 HepG2 细胞后, 没有剂量相关性, 可能是杠柳毒苷抑制癌细胞增殖的分子机制有所不同。进一步的杠柳毒苷抑制乳腺癌 MDA-MB-468 细胞及肝癌 HepG2 细胞增殖的作用机制及其体内抑瘤机制的研究正在进行中。

志谢: 感谢天津中医药大学张密霞老师对肿瘤细胞的提供。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2010.
- [2] 王利萍, 刘建利. 香加皮的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 493-496.
- [3] 卫银盘, 赵丽迎, 邓雁如. 杠柳的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2009, 28(3): 165-166.
- [4] 刘洋, 刘虹, 王小莹, 等. 香加皮不同提取部位体外抗肿瘤活性实验研究 [J]. 天津中医药, 2008, 25(2): 153-156.
- [5] 赵连梅, 王晓华, 颜晰, 等. 香加皮宝霍甙-I 抑制人食管癌细胞增殖的机制 [J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(6): 662-666.
- [6] 王丽芳, 卢安, 孟凡茹, 等. 香加皮三萜类化合物对实验性大鼠食管癌的阻断作用及机制 [J]. 肿瘤防治研

- 究, 2012, 39(1): 23-27.
- [7] 单保恩, 李俊新, 张 静. 香加皮水提取物诱导人胃癌细胞 BGC-823 凋亡及其作用机制 [J]. 中草药, 2005, 36(8): 1184-1188.
- [8] Zhang J, Gao W Y, Wang J, *et al.* Improvement of growth and periplocin yield of *Periploca sepium* adventitious root cultures by altering nitrogen source supply [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(3): 226-231.
- [9] 赵振军, 左连富, 单保恩, 等. 香加皮杠柳苷抑制 Stat5 信号通路诱导 SMMC-7721 细胞凋亡的实验研究 [J]. 临床检验杂志, 2008, 26(1): 46-48.
- [10] 赵连梅, 艾 军, 张 倩, 等. 香加皮杠柳苷诱导人食管癌细胞凋亡及其作用机制的研究 [J]. 肿瘤, 2009, 29(11): 1025-1030.
- [11] 张 静, 杨 光, 单保恩, 等. 香加皮杠柳苷对 MCF-7 细胞周期及 p21WAF1/CIP1 表达的影响 [J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(8): 864-868.
- [12] 李志琴, 章静波. 细胞周期调控与肿瘤 (2) [J]. 癌症进展杂志, 2004, 2(2): 146-150.