

白花丹醌对肝癌细胞 Hep G2 增殖及血管内皮生长因子表达的影响

朱芳¹, 伍钢^{1*}, 何远桥², 李振宇¹, 彭纲¹, 任精华¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 肿瘤中心, 湖北 武汉 430022; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 泌尿外科, 湖北 武汉 430022)

摘要:目的 研究白花丹醌对人肝癌细胞 Hep G2 的增殖、克隆形成及血管内皮生长因子 (VEGF) 表达的影响。方法 MTT 法检测白花丹醌对人肝癌细胞 Hep G2 的增殖抑制率; 平板克隆形成实验检测白花丹醌对 Hep G2 细胞克隆形成率的影响; RT-PCR 及免疫荧光细胞化学检测白花丹醌对 Hep G2 细胞 VEGF mRNA 和蛋白表达的影响。结果 MTT 法结果显示白花丹醌对人肝癌细胞 Hep G2 的增殖有抑制作用, 且随着药物浓度增加 (2、8、32、128 $\mu\text{mol/L}$) 和作用时间 (24、48、72 h) 延长, 其抑制作用逐渐增强, 与细胞对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$); 平板克隆形成实验显示白花丹醌对 Hep G2 细胞克隆形成有显著抑制作用 ($P < 0.05$); RT-PCR 及免疫荧光细胞化学均显示随白花丹醌药物浓度增高, Hep G2 细胞 VEGF mRNA 及蛋白表达水平下调。结论 白花丹醌对人肝癌细胞 Hep G2 的增殖、克隆形成及 VEGF 表达均有显著抑制作用, 其可能成为一种新的抗肿瘤药物。

关键词: 白花丹醌; 肝癌; 细胞增殖; 克隆形成; 血管内皮生长因子 (VEGF)

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2010)05-0775-04

白花丹为蓝雪科植物白花丹 *Plumbago zeylanica* L. 的干燥根、根茎及全草, 为东南亚多个国家及中国常用药材; 在我国, 其主要生长于四川、福建、广西、广东等地区; 主要具有祛风散瘀、解毒杀虫、消肿止痛等作用^[1,2]。白花丹醌 (plumbagin) 为白花丹的主要活性成分^[3], 具有广泛的药理作用, 如抗炎、抗凝等。目前有细胞及动物实验表明白花丹醌对卵巢癌^[4]、乳腺癌^[5]、胃肠道肿瘤等具有一定的抗肿瘤活性。肝癌为一种人类常见的高度恶性肿瘤, 其浸润和转移能力强, 预后差。本研究旨在通过体外实验检测白花丹醌对人肝癌细胞 Hep G2 的生长、增殖及血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 表达的影响, 研究其对肝癌细胞的抗肿瘤活性。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂与仪器: 白花丹醌购自 Sigma 公司, 用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 配成 0.1 mol/L 储备液, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。RPMI 1640 及小牛血清购自 Gibco 公司, 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 及 DMSO 购自 Sigma 公司, RNA 抽提试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司, MMLV 逆转录酶购自 TOYOBO 公司, TaqDNA 聚合酶购自美国 Fermentas 公司, DNA marker I 购自北京天根时代公司, VEGF 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, PCR 引物由上海生工公司合成。PCR 仪、电泳仪为 Biometra 公司产品, UV-Pro 凝胶成像分析系统为

Uvitec 公司产品。

1.2 细胞培养: 人肝癌细胞 Hep G2 为华中科技大学附属协和医院肿瘤中心实验室保存。取 Hep G2 细胞冻存液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中解冻 1 min, 培养于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 将培养瓶置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温细胞培养箱内培养, 每 1~2 天换液传代 1 次, 取对数生长期细胞进行实验。

1.3 MTT 比色法检测白花丹醌对 Hep G2 细胞增殖的影响: 将 100 μL 细胞悬液加入 96 孔板中, 每孔 1×10^4 个细胞, 设空白对照组 (培养基)、细胞对照组 (培养基 + Hep G2 细胞) 及实验组 (培养基 + Hep G2 细胞 + 白花丹醌)。实验组设 4 个浓度梯度, 分别为 2、8、32、128 $\mu\text{mol/L}$, 每组设 4 个复孔。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 分别培养 24、48、72 h 后, 弃上清, 每孔加入含 10 μL MTT (5 g/L) 的无血清培养基 100 μL , 继续培养 4 h 后, 吸去培养基, 每孔加入 DMSO 200 μL , 振荡 10 min 后, 置于酶标仪上于 570 nm 波长处检测吸光度 (A) 值。计算细胞增殖抑制率, 实验重复 3 次。

增殖抑制率 = [(细胞对照组 A 值 - 空白对照组 A 值) - (实验组 A 值 - 空白对照组 A 值)] / (细胞对照组 A 值 - 空白对照组 A 值) $\times 100\%$

1.4 平板克隆形成实验检测白花丹醌对 Hep G2 细胞克隆形成能力的影响: 取对数生长期细胞, 以

①收稿日期: 2009-07-13

作者简介: 朱芳 (1982—), 女, 湖北荆州人, 博士在读, 研究方向为抗肿瘤血管新生。

0.25 % 胰酶消化并吹打成单个细胞,以 200 个细胞/孔分别接种于含 4 mL 完全培养基的 6 孔板中,轻轻转动,使细胞分散均匀,设细胞对照组和实验组,实验组设 4 个浓度梯度,分别为 4、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$,每组设 4 个复孔。将 6 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 的培养箱中培养,中途未换液,药物未洗脱,2 周后弃去培养液,用 PBS 小心浸洗 2 次,加纯甲醇 5 mL 固定细胞 15 min 后,加适量 Mayer's 苏木素染细胞核 1 min,然后用流水缓慢洗去染色液,空气干燥。将 6 孔板底部置一张带网格的透明胶片,低倍显微镜 ($\times 40$) 下计数克隆,以 50 个细胞以上形成的细胞集落为 1 个克隆,计算克隆形成率。

克隆形成率 = 克隆数 / 接种细胞数 $\times 100\%$

1.5 RT-PCR 检测白花丹醌对 Hep G2 细胞 VEGF mRNA 表达水平的影响:将 6 孔板中细胞以不同浓度白花丹醌 (分别为 0、4、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$) 干预 24 h 后,每孔细胞以 Trizol 提取液按说明书提取总 RNA,紫外分光光度仪测定纯度 (A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0) 及浓度以定量。逆转录获取 cDNA。VEGF 引物设计参照人 VEGF cDNA 基因文库^[6]。上游引物:5'-CGAAGTGGTGAA GTTCATG GATG-3',下游引物:5'-TTCTGTATCA GTCTTCCTGGTGAG-3'。VEGF₁₂₁ 和 VEGF₁₆₅ cDNA 的扩增片段分别为 403、535 bp。参照基因 GAPDH 上游引物:5'-ACCACAGTCCATG C-ATCAG-3';下游引物:5'-TCCACCACCCTGTT-GCTGTA-3',cDNA 的扩增片段为 451 bp。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 解链,94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s 变性,VEGF₁₆₅ 54 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s 退火,GAPDH 55 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s 退火,72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min 延伸,重复变性、退火、延伸,共 38 个循环,再以 72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 充分延伸结束。取每例 PCR 产物 5 μL ,置于 2 % 琼脂糖凝胶中,以 100 V 电压电泳 20 min,结果经 UVIpro 凝胶成像分析系统分析。样本 VEGF mRNA 的 PCR 产物条带扫描量与 GAPDH PCR 产物扫描量的比值,为该亚型 VEGF mRNA 在组织中的相对量。每孔设 4 个复孔,取平均值进行统计学分析。

1.6 免疫荧光细胞化学检测白花丹醌对 Hep G2 细胞 VEGF 蛋白水平表达的影响:将经多聚赖氨酸预处理的盖玻片置于 6 孔板中,将 Hep G2 细胞接种于 6 孔板内。经不同浓度白花丹醌 (分别为 0、4、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 后,以 4 % 多聚甲醛固定细胞 15 min,用 PBS 冲洗 2 次,加入 0.25 %

加入 1 % 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭 30 min,加入兔抗人 VEGF 一抗 (1 % BSA 以 1 :300 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日 37 $^{\circ}\text{C}$ 回温 1 h 后, PBS 洗 3 次,加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG (1 % BSA 以 1 :500 的比例稀释),室温下避光孵育 30 min, BPS 再次洗涤 3 次,用 Hoechst 33258 10 μL 室温下染色 5 min,缓冲甘油封片,荧光显微镜 ($\times 100$) 下观察、拍片,以 IPP 6.0 软件分析各组 VEGF 表达的 A 值,每组设 4 个复孔。

1.7 统计学方法:各计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.5 统计分析软件进行统计,组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 对 Hep G2 细胞增殖的影响:分别以 2、8、32、128 $\mu\text{mol/L}$ 白花丹醌作用 Hep G2 细胞后,各处理组细胞增殖活性明显低于细胞对照组,其作用 24 h 的 IC_{50} 值为 (27.08 $\pm$ 0.40) $\mu\text{mol/L}$,随药物作用时间延长,其 IC_{50} 值逐渐减小,作用 48、72 h 的 IC_{50} 值分别为 (12.18 $\pm$ 0.51)、(6.76 $\pm$ 0.37) $\mu\text{mol/L}$ 。结果见图 1,白花丹醌在 2~128 $\mu\text{mol/L}$ 范围内对 Hep G2 细胞的增殖抑制作用呈剂量和时间依赖性。

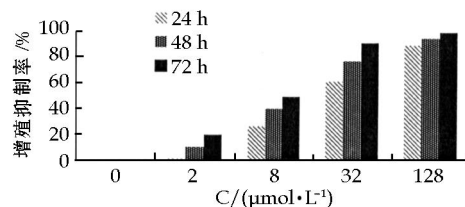


图 1 白花丹醌对 Hep G2 细胞增殖的抑制作用 ($n=4$)

Fig. 1 Inhibition of plumbagin on proliferation of Hep G2 cells ($n=4$)

2.2 对 Hep G2 细胞克隆形成的影响:不同浓度 (4、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$) 的白花丹醌对 Hep G2 细胞克隆形成均有抑制作用, Hep G2 细胞的克隆形成率随白花丹醌浓度升高而下降,见表 1 及图 2。

表 1 白花丹醌对 Hep G2 细胞克隆形成率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 1 Effect of plumbagin on clone formation rate of Hep G2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	C/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	克隆形成数	克隆形成率/ %
对照	0	122.0 $\pm$ 0.2	61.0 $\pm$ 5.1
白花丹醌	4	72.0 $\pm$ 9.4	36.0 $\pm$ 4.7 *
	8	34.0 $\pm$ 6.1	17.0 $\pm$ 3.1 *
	16	7.0 $\pm$ 2.3	3.5 $\pm$ 1.2 *
	32	0	0

与对照组比较: * $P < 0.05$

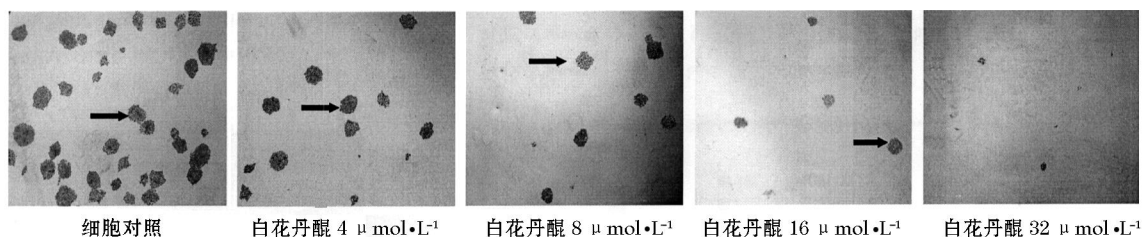


图 2 白花丹醌对 HepG2 细胞克隆形成的影响

Fig. 2 Effect of plumbagin on clone formation of HepG2 cells

2.3 对 HepG2 细胞 VEGF mRNA 表达的影响: 对照组 HepG2 细胞 VEGF mRNA 高表达, 不同浓度的白花丹醌对 VEGF 两个亚型 VEGF₁₆₅、VEGF₁₂₁ 表达均有抑制作用, 见图 3。以灰度分析软件计算 VEGF₁₆₅/GAPDH、VEGF₁₂₁/GAPDH 值, 结果显示随着药物浓度的升高, VEGF₁₆₅、VEGF₁₂₁ 表达呈下降趋势。即白花丹醌在 4~32 μmol/L 范围内, 呈浓度依赖性抑制 VEGF 表达。各组与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.05$)。

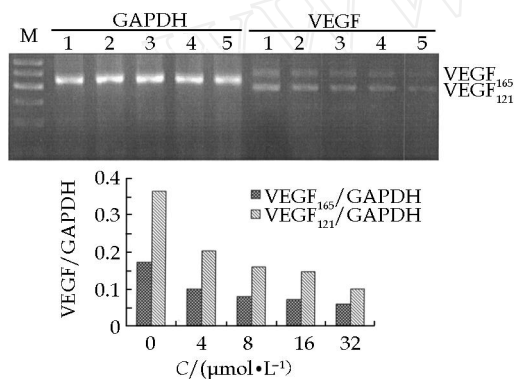


图 3 白花丹醌对 HepG2 细胞 VEGF mRNA 表达的影响 (n = 4)

Fig. 3 Effect of plumbagin on expression of VEGF mRNA in HepG2 cells (n = 4)

2.4 对 HepG2 细胞 VEGF 蛋白表达的影响: 以免疫荧光细胞化学检测白花丹醌干预 24 h 后, HepG2 细胞 VEGF 蛋白表达的影响, VEGF 主要表达于胞核, 部分表达于胞浆, 对照组呈强阳性表达, 以 IPP 6.0 软件分析各组 VEGF 表达的 A 值, 结果显示随着白花丹醌浓度升高, VEGF 蛋白表达呈下降趋势, 见图 4。

3 讨论

白花丹醌是一种小分子萘醌化合物, 其化学结

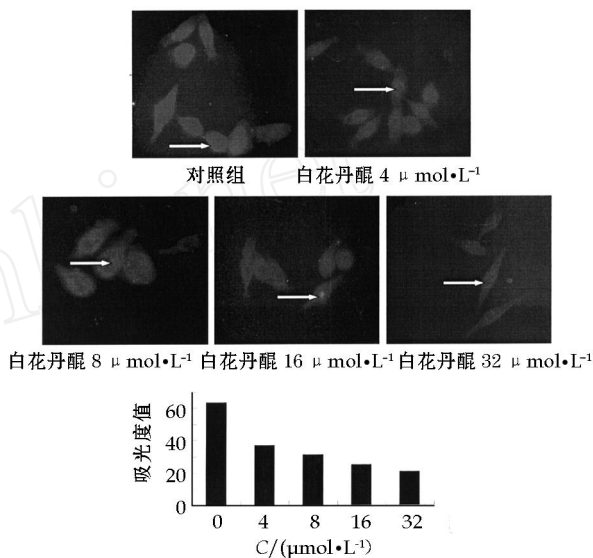


图 4 白花丹醌对 HepG2 细胞 VEGF 蛋白表达的影响 (n = 4)

Fig. 4 Effect of plumbagin on expression of VEGF protein in HepG2 cells (n = 4)

methy1-1,4-naphthoquinone)。其最早用于抗动脉粥样硬化、护肝、强心等。目前大量研究表明其对多种肿瘤细胞系有抗肿瘤作用。Sugie 等^[7]通过动物实验研究表明, 白花丹醌可显著抑制氧化偶氮甲烷诱发的小肠肿瘤; Sandur 等^[8]研究表明其可能通过抑制 NF-κB 通路达到抗肿瘤作用; Nair^[9]等研究表明白花丹醌可通过诱导凋亡增加宫颈癌细胞对放疗的敏感性。

肝癌是我国癌症死亡的第二大病因, 晚期患者中位生存期仅数月, 目前的治疗方法尚不能明显延长患者生存期。鉴于 MTT 法检测的是大量细胞在药物作用下存活的情况, 而平板克隆形成法是检测单个细胞增殖形成克隆的能力。本研究以 MTT 法和平板克隆形成法联合检测白花丹醌对 HepG2 细胞生长、增殖的影响, 发现随着药物浓度增加和作用时间延长, 细胞存活率和克隆形成率均下降, 结果一致。即白花丹醌可呈浓度依赖性抑制 HepG2 细胞

肿瘤的生长、浸润和转移均需依赖新生血管的形成。而 VEGF 为目前发现的最重要的促进肿瘤血管生成的细胞因子^[10],其可通过促进血管内皮细胞增殖、增加微血管通透性及改变细胞外基质等途径促进肿瘤血管新生。VEGF 有多种亚型,其中, VEGF₁₆₅ 和 VEGF₁₂₁ 在肿瘤血管新生中起主要作用。本研究通过 RT-PCR 及免疫荧光细胞化学实验表明,白花丹醌干预肝癌 Hep G2 细胞后,VEGF mRNA 及蛋白表达水平均随药物浓度增加而下调。

本研究结果表明,白花丹醌体外可抑制肝癌 Hep G2 细胞生长、克隆形成及 VEGF 表达,其可能通过该途径抑制肿瘤生长、血管新生,达到抗肿瘤作用。然而,其在体内对肝癌生长、浸润等生物学行为的影响及其机制尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 郭晓庄. 有毒中草药大辞典 [M]. 天津:天津科技翻译出版公司, 1992.
- [2] 谭明雄, 王恒山, 陈振锋, 等. 白花丹化学成分和药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(2): 289-293.
- [3] 刘园, 刘超. RP-HPLC 法测定不同采收期白花丹中白花丹醌 [J]. 中草药, 2007, 38(8): 1258-1259.
- [4] Srinivas G, Annab L A, Gopinath G, et al. Antisense block of BRCA1 enhances sensitivity to plumbagin but not tamoxifen in BG1 ovarian cancer cells [J]. *Mol Carcinog*, 2004, 39(1): 15-25.
- [5] Ahmad A, Banerjee S, Wang Z, et al. Plumbagin-induced apoptosis of human breast cancer cells is mediated by inactivation of NF-kappaB and Bcl-2 [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 105(6): 1461-1471.
- [6] 王辅林, 陈乐真, 韦立新, 等. 血管内皮生长因子在肺癌组织中表达的定量观察 [J]. 中华病理学杂志, 1999, 28(4): 295.
- [7] Sugie S, Okamoto K, Rahman K M, et al. Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats [J]. *Cancer Lett*, 1998, 127(1-2): 177-183.
- [8] Sandur S K, Ichikawa H, Sethi G, et al. Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) suppresses NF-kappaB activation and NF-kappaB-regulated gene products through modulation of p65 and IkappaBalpha kinase activation, leading to potentiation of apoptosis induced by cytokine and chemotherapeutic agents [J]. *Biol Chem*, 2006, 281(25): 17023-17033.
- [9] Nair S, Nair R R, Srinivas P, et al. Radiosensitizing effects of plumbagin in cervical cancer cells is through modulation of apoptotic pathway [J]. *Mol Carcinog*, 2008, 47(1): 22-33.
- [10] Leung D W, Cachianes G, Ferrara N, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen [J]. *Science*, 1989, 246(4935): 1306-1309.

红豆杉多糖对 Beagle 犬心肌缺血再灌注模型心肌细胞凋亡及单核细胞趋化蛋白-1 与 NO 表达的影响

朱天民¹, 朱慧民², 李辉³

(1. 成都中医药大学, 四川 成都 610075; 2. 台州市中心医院, 浙江 台州 318000;
3. 成都大学医学院, 四川 成都 610081)

摘要:目的 观察红豆杉多糖对 Beagle 犬心肌缺血再灌注导致的心肌细胞凋亡及单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、NO 表达的影响。方法 将 30 只 Beagle 犬随机分为假手术组、模型组、红豆杉多糖 (89.5、357 mg/kg) 组、卡维地洛 (1 mg/kg) 对照组, 每组 6 只, 分别给药 7 d 后, 建立心肌缺血再灌注模型。TUNEL 染色法标记缺血再灌注区凋亡心肌细胞, 计算凋亡指数 (AI); Western blotting 法检测缺血再灌注区心肌 MCP-1 蛋白表达; 硝酸还原酶法检测心肌组织中 NO 水平。结果 模型组、红豆杉多糖低剂量组心肌细胞 AI 较假手术组显著升高 ($P < 0.01$); 红豆杉多糖高剂量组、卡维地洛组心肌细胞 AI 显著低于模型组和红豆杉多糖低剂量组 ($P < 0.05$), 与假手术组比较无显著差异 ($P > 0.05$)。模型组、红豆杉多糖低剂量组、卡维地洛组 MCP-1 蛋白表达较假手术组显著升高 ($P < 0.05$), 红豆杉多糖低、高剂量组, 卡维地洛组 MCP-1 蛋白表达较模型组显著下降 ($P < 0.01$), 红豆杉多糖高剂量组 MCP-1 蛋白表达显著低于低剂量组和卡维地洛组 ($P < 0.01$)。模型组及各治疗组心肌组织 NO 水平较假手术组显著升高 ($P < 0.01$), 红豆杉多糖高剂量组心肌 NO 显著低于模型组 ($P < 0.05$) 及低剂量组 ($P < 0.01$)。结论 红豆杉多糖可抑制缺血再灌注导致的心肌细胞凋亡, 其机制可能与降低心肌组织 MCP-1 蛋白表达及 NO 水平、抑制心肌细胞凋亡有关。

关键词: 红豆杉多糖; 心肌缺血再灌注; 细胞凋亡; 单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1); NO

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2010)05-0778-04