

- [8] 贾彬, 汤泓, 黎玮, 等. 表皮生长因子对小鼠前列腺细胞雌激素受体表达的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(10): 1473-1475
- [9] Rice S, Mason H D, Whitehead S A. Phytoestrogens and their low dose combinations inhibit mRNA expression and activity of aromatase in human granulosa-luteal cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2006, 101(4-5): 216-225
- [10] Bencomo E, Pérez R, Arteaga M F, *et al.* Apoptosis of cultured granulosa-luteal cells is reduced by insulin-like growth factor 1 and may correlate with embryo fragmentation and pregnancy rate [J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(2): 474-480
- [11] Mai Z, Blackburn G L, Zhou J R. Soy phytochemicals synergistically enhance the preventive effect of tamoxifen on the growth of estrogen-dependent human breast carcinoma in mice [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(6): 1217-1223
- [12] Qian Y Y, Liu Y Q. Inhibition of *Celastrus orbiculatus* extracts on VEGF expression in hepatoma cells of mice [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 72-76
- [13] Tang J, Wang Z, Li X, *et al.* Human telomerase reverse transcriptase expression correlates with vascular endothelial growth factor-promoted tumor cell proliferation in prostate cancer [J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2008, 36(2): 83-93.
- [14] Jagadeesh S, Kyo S, Banerjee P P. Genistein represses telomerase activity via both transcriptional and posttranslational mechanisms in human prostate cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(4): 2107-2115
- [15] Xu J W, Yasui N, Ikeda K, *et al.* Isoflavones regulate secretion of leukemia inhibitory factor and transforming growth factor (beta) and expression of glycodelin in human endometrial epithelia cells [J]. *J Endocrinol*, 2008, 196(2): 425-433

枸杞多糖对人肝癌细胞 HepG2 生长的影响及其分子机制

黄霞, 肖丙秀*, 赵军伟, 毛芳, 姚吉, 郭俊明

(宁波大学医学院, 浙江 宁波 315211)

摘要:目的 探讨枸杞多糖 (*Lycium barbarum* polysaccharides, LBP) 对人肝癌细胞 HepG2 生长的影响及可能机制。方法 人肝癌 HepG2 细胞用 100~1 000 mg/L LBP 处理 1~5 d, 分别用 MTT 方法、流式细胞术检测细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡。用 Western blotting 分析周期蛋白 (cyclin) 和周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 表达的变化。结果 LBP 以质量浓度依赖方式抑制肝癌细胞的生长, 阻滞细胞在 G₀/G₁ 期, 并诱导细胞凋亡; 其分子机制为引起 cyclin D、cyclin E 和 CDK2 蛋白表达下降。结论 LBP 抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖的机制包括阻滞细胞周期和诱导细胞凋亡。

关键词: 枸杞多糖; 肝癌细胞; 细胞增殖; 细胞周期; 细胞凋亡

中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)09-1501-03

枸杞 *Lycium barbarum* L. 是我国传统的滋补中药, 它含有多种营养成分和微量元素, 具有滋补肝肾、益精明目、促进造血、调血脂等功效。枸杞多糖 (*Lycium barbarum* polysaccharides, LBP) 是枸杞中主要的生物活性成分, 具有广泛的药理作用, 如增强机体免疫力、延缓衰老等^[1]。近几年研究表明, LBP 可抑制人肺癌^[2]、宫颈癌^[3]、前列腺癌^[4] 和白血病^[5] 等多种肿瘤细胞的生长。肝癌是我国常见的肿瘤, 但 LBP 能否抑制肝癌细胞生长及其可能机制, 尚未完全阐明。本研究主要探讨 LBP 对人肝癌细胞 HepG2 生长的影响及其机制, 为 LBP 临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料: LBP 购自上海融禾医药科技发展有限公司^[6], MTT 购自美国 Sigma 公司, RPMI 1640 培

养液购自美国生命技术公司, 人肝癌 HepG2 细胞购于中国科学院上海生命科学研究院细胞库, 细胞周期和细胞凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司。

1.2 细胞培养: HepG2 细胞在 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养, RPMI 1640 培养液含有 10% 小牛血清、50 U/mL 青霉素和 50 μg/mL 链霉素。选择对数生长期细胞用于实验, 细胞分别用 100、200、400、800、1 000 mg/L LBP 处理^[6], 对照组为不含 LBP 的培养液。

1.3 MTT 法测定细胞生长情况: 以每孔 1.5 × 10⁴ 个将细胞接种入 96 孔板, 24 h 后分别加入不同质量浓度的 LBP 处理 1~5 d, 每个质量浓度设 8 个平行孔。待处理时间达到要求时, 将 15 μL MTT (5 mg/mL) 加入到培养孔中继续培养 4 h, 再小心加入 150 μL 二甲基亚砷 (DMSO)。水平摇床震荡

* 收稿日期: 2009-11-15

基金项目: 宁波大学大学生科研创新计划 (SRIP-2009); 宁波大学创新性开放实验建设项目 (Cxxkf2008-066)

作者简介: 黄霞 (1987—), 女, 四川人, 本科生, 主要从事抗癌药物研究。Tel: (0574) 87600759 E-mail: xiaobingxiu@nbu.edu.cn

* 通讯作者 肖丙秀

10~ 15 min, 用酶标仪 (美国 Labsystems 公司) 检测 490 nm 波长处吸光度 (*A*) 值, 计算细胞存活率。实验重复 3 次。

细胞存活率= (*A* 实验 / *A* 对照) × 100%

1. 4 流式细胞仪测定细胞周期和细胞凋亡: 将 HepG2 细胞接种于 50 mL 培养瓶中 24 h 后, 加入不同质量浓度的 LBP 处理 48 h, 胰酶消化后用 PBS 漂洗, 调整细胞浓度为 1 × 10⁶ 个/mL。70% 乙醇固定过夜, RNase A 作用, 810 μL 碘化丙啶 (PI) 作用 15 min 以上。用 Calibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司) 分析细胞周期的分布。细胞凋亡的检测按照 BD 公司 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒说明书进行。

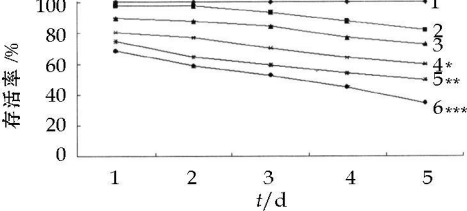
1. 5 Western blotting 检测: 将对照组和 4 个不同质量浓度 (200、400、800、1 000 mg/L) LBP 处理 48 h 的细胞分别提取蛋白质, 然后按照文献方法^[7] 检测细胞周期相关蛋白的表达差异。

1. 6 统计学分析: 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 软件包 13.0 对组间差异进行单因素方差分析。

2 结果

2. 1 人肝癌 HepG2 细胞生长情况观察: 显微镜下观察到, 对照组细胞生长快、贴壁情况好、细胞形态规则、密度高; 而 LBP 处理组的细胞呈不同程度的不规则形态、贴壁细胞数量少、密度低, 高质量浓度组可见培养瓶内悬浮死细胞。

2. 2 LBP 抑制肝癌细胞的生长: MTT 结果表明, LBP 对人肝癌 HepG2 细胞有明显抑制作用。LBP 质量浓度越大对细胞生长的抑制程度越大, 呈现时间-剂量依赖方式抑制肝癌细胞的生长 (*P* < 0. 05、0. 01、0. 001)。结果见图 1。



1-对照组 2~ 6 100、200、400、800、1 000 mg · L⁻¹ LBP
1-control group 2~ 6 100, 200, 400, 800, and 1 000
mg · L⁻¹ LBP
与对照组比较: * *P* < 0. 05 ** *P* < 0. 01 *** *P* < 0. 001
* *P* < 0. 05 ** *P* < 0. 01 *** *P* < 0. 001 vs control group

图 1 LBP 对 HepG2 肝癌细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)
Fig. 1 Effect of LBP on growth of hepatocellular
carcinoma HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

2. 3 LBP 使肝癌 HepG2 阻滞在 G₀/G₁ 期: 为阐明 LBP 抑制 HepG2 细胞生长的机制, 分析其对细胞周期的影响。400、800 mg/L LBP 使 G₀/G₁ 期的细胞明显增加 (*P* < 0. 05、0. 01), 见表 1。

表 1 LBP 对 HepG2 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 3)
Table 1 Effect of LBP on cell cycle of HepG2 cells
($\bar{x} \pm s$, *n* = 3)

LBP/ (mg · L ⁻¹)	细胞周期比例/ %					
	G ₀ /G ₁		S		G ₂ /M	
0 (对照)	70	71 ± 0. 34	26	28 ± 1. 20	3	01 ± 0. 23
200	71	27 ± 0. 63	24	42 ± 1. 52	4	31 ± 0. 65
400	73	12 ± 0. 45*	17	82 ± 1. 24**	9	06 ± 0. 42
800	78	82 ± 0. 58**	20	27 ± 0. 64**	0	91 ± 0. 29*

与对照组比较: * *P* < 0. 05 ** *P* < 0. 01
* *P* < 0. 05 ** *P* < 0. 01 vs control group

2. 4 LBP 对细胞周期相关蛋白表达的影响: 由于细胞周期受到周期蛋白 (cyclin) 和周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 的精确调控, 为探讨 LBP 阻滞细胞周期的分子机制, 相关调控蛋白的表达情况采用 Western blotting 技术进行了分析。结果显示, 当肝癌细胞被 800、1 000 mg/L LBP 处理后, cyclin D、cyclin E 和 CDK2 的表达水平下降 (*P* < 0. 05); 其他低质量浓度未见明显的影响, 见表 2。

表 2 LBP 对 HepG2 细胞周期调控相关蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s$, *n* = 3)

Table 2 Effect of LBP on related protein expression
of cell cycle regulators in HepG2 cells
($\bar{x} \pm s$, *n* = 3)

LBP/ (mg · L ⁻¹)	平均吸光度		
	cyclin D	cyclin E	CDK2
0 (对照)	0. 610 ± 0. 043	0. 554 ± 0. 046	0. 607 ± 0. 027
200	0. 623 ± 0. 054	0. 560 ± 0. 146	0. 611 ± 0. 042
400	0. 602 ± 0. 035	0. 548 ± 0. 073	0. 612 ± 0. 014
800	0. 435 ± 0. 072*	0. 459 ± 0. 055*	0. 431 ± 0. 048*
1 000	0. 386 ± 0. 063*	0. 358 ± 0. 087*	0. 212 ± 0. 034*

与对照组比较: * *P* < 0. 05 ** *P* < 0. 01
* *P* < 0. 05 ** *P* < 0. 01 vs control group

2. 5 LBP 诱导肝癌细胞凋亡: 为了解 LBP 抑制肝癌细胞生长的可能机制, 分析了其是否引起细胞凋亡。流式细胞检测结果显示, 高质量浓度 LBP 既可引起肝癌细胞 HepG2 早期凋亡, 也可引起晚期凋亡, 见表 3。

3 讨论

受环境和饮食等因素的影响, 消化道肿瘤的发病率居高不下。肝癌是我国较常见的恶性肿瘤之一, 近年来其发病率呈现上升趋势。至今对肝癌尚

表 3 LBP 诱导 HepG2 细胞凋亡的作用($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 3 Apoptosis effect induced by LBP on HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

LBP/ (mg · L ⁻¹)	细胞周期比例/ %	
	早期凋亡	晚期凋亡
0(对照)	1.53 ± 0.46	5.60 ± 1.42
200	5.74 ± 0.63	10.21 ± 0.29
400	12.45 ± 0.55*	14.03 ± 0.74*
800	20.22 ± 0.84**	23.86 ± 0.76**

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

无有效的根治措施,寻找一种对肿瘤细胞有高效的杀伤或抑制作用而又对正常细胞无毒性或有保护作用的化疗药物显得比较重要和迫切^[2]。从具有滋补功效的中草药中提取抗肿瘤成分引起了人们的广泛关注,其中 LBP 就是代表性的一种^[7]。LBP 不仅对机体细胞有较强的保护作用,使受损的细胞恢复正常功能;而且具有明显的抗肿瘤活性^[3]。研究发现,LBP 对放射性治疗有明显的增敏和防护作用,与抗癌药物联合应用可起到增效、减毒的效果^[6]。

为了探讨 LBP 对人类肝癌细胞的作用,了解其抗肿瘤机制,本实验应用不同质量浓度的 LBP 处理人肝癌 HepG2 细胞。结果发现,LBP 对人肝癌细胞呈剂量依赖方式的抑制作用。当 1 000 mg/L LBP 处理 HepG2 细胞 3 d 时,细胞抑制率可达到 60% 以上。

由于许多中草药成分的抗癌机制是影响细胞周期^[6,8],为此,本研究重点考察了 LBP 对肝癌细胞周期的影响机制。在细胞增殖过程中, G_0/G_1 期是准备期,期间会合成相关的 RNA 和蛋白质。本研究运用蛋白质印迹技术发现,LBP 明显抑制了肝癌细胞 cyclin D、cyclin E 和 CDK2 的表达。在 G_0/G_1 期,主要的细胞周期调控因子是 cyclin D、cyclin E 和 CDK2。cyclin E 结合 CDK2 后促进了细胞越过 G_1/S 期转折点^[9]。如果 cyclin E 和 CDK2 的表达下降,细胞将被阻止在 G_0/G_1 期。cyclin D 除在 G_0/G_1 期发挥作用外,还具有癌基因的活性^[10]。因

此,LBP 引起肝癌细胞中 cyclin D、cyclin E 和 CDK2 表达的下降对于其抗癌活性的发挥起着重要作用。

本研究同时还发现,LBP 可诱导肝癌细胞早期凋亡和晚期凋亡。事实上,LBP 也可引起前列腺癌细胞^[4]和白血病细胞凋亡^[5]。这说明,LBP 有较广泛的抗癌谱,LBP 通过阻止细胞周期和诱导细胞凋亡等方式抑制了多种肿瘤细胞的生长。

综上所述,LBP 通过调控细胞周期相关蛋白的表达而阻止细胞周期的进行,同时诱导细胞凋亡,最终抑制肝癌细胞的生长,说明 LBP 可能是一种新的有应用前景的抗癌药物。

参考文献:

- [1] Xin Y F, Zhou G L, Deng Z Y, et al. Protective effect of *Lycium barbarum* on doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Phytother Res*, 2007, 21(11): 1020-1024
- [2] 肖琳,白秀珍,杨学东.枸杞多糖对人肺癌 A549 细胞影响的研究[J].数理医药学杂志,2006,19(2):130-131
- [3] 崔晓燕,罗琼,杨明亮,等.枸杞多糖对宫颈癌细胞生长及细胞凋亡影响[J].中国公共卫生,2006,22(12):1411-1412
- [4] Luo Q, Li Z, Yan J, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides induce apoptosis in human prostate cancer cells and inhibits prostate cancer growth in a xenograft mouse model of human prostate cancer [J]. *J Med Food*, 2009, 12(4): 695-703
- [5] 甘璐,王建华,罗琼,等.枸杞多糖对人白血病细胞株凋亡的影响[J].营养学报,2001,23(3):220-224
- [6] Miao Y, Xiao B, Jiang Z, et al. Growth inhibition and cell cycle arrest of human gastric cancer cells by *Lycium barbarum* polysaccharide [J]. *Med Oncol*, 2009, DOI10.1007/s12032-009-9286-9
- [7] 黄文书,杨海燕,武运,等.枸杞多糖的提取及其体外抗肿瘤作用研究[J].中国食物与营养,2008(5):38-39
- [8] 肖丙秀,郭俊明,刘东海,等.芦荟大黄素抑制胃癌细胞生长与细胞周期阻滞的关系[J].中草药,2008,39(5):729-732
- [9] McDonald ERIH, El-Deiry W S. Checkpoint genes in cancer [J]. *Ann Med*, 2001, 33(2): 113-122
- [10] McIntosh G G, Anderson J J, Milton I, et al. Determination of the prognostic value of cyclin D1 overexpression in breast cancer [J]. *Oncogene*, 1995, 11(5): 885-891