

网络出版时间: 2015-12-30 14:38 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20151230.1438.036.html

黄芪皂苷Ⅱ增加 5-氟尿嘧啶对人肝癌细胞株 HepG2 增殖抑制作用

武超¹, 许杜娟^{1,2}, 杨翠¹, 夏泉^{1,2}, 张医浩¹

摘要 目的 探讨黄芪皂苷Ⅱ增加 5-氟尿嘧啶对人肝癌细胞株(HepG2)增殖抑制作用及其可能机制。方法 采用 MTT 方法检测 5-氟尿嘧啶单独或联合黄芪皂苷Ⅱ作用于细胞后,5-氟尿嘧啶对 HepG2 的抑制率; Hoechst33342 染色检测细胞凋亡; Western blot 检测丝裂原活化蛋白激酶(ERK1/2)、磷酸化丝裂原活化蛋白激酶(p-ERK)以及凋亡蛋白多聚 ADP-核糖聚合酶(PARP)、活化凋亡蛋白多聚 ADP-核糖聚合酶(Cleaved PARP)、活化半胱氨酸蛋白酶蛋白-3(Cleaved caspase 3)、活化半胱氨酸蛋白酶蛋白-9(Cleaved caspase 9)的表达。结果 MTT 法结果显示,5-氟尿嘧啶呈浓度和时间依赖性抑制肝癌 HepG2 细胞增殖,联用黄芪皂苷Ⅱ可以显著增加 5-氟尿嘧啶对 HepG2 细胞增殖抑制作用($P < 0.05$); Western blot 法结果显示,联合使用黄芪皂苷Ⅱ和 5-氟尿嘧啶能增加 Cleaved PARP 表达($P < 0.05$); Hoechst33342 验证联合用药组较 5-氟尿嘧啶组细胞凋亡水平升高;此外,Western blot 结果还显示,黄芪皂苷Ⅱ抑制 p-ERK1/2 蛋白表达;联用 ERK1/2 特异性抑制剂 PD98059 明显增加 5-氟尿嘧啶诱导的细胞凋亡率以及凋亡蛋白 Cleaved caspase3、Cleaved caspase9 表达($P < 0.05$)。阻断 ERK1/2 后,黄芪皂苷Ⅱ促进 5-氟尿嘧啶诱导的凋亡蛋白 Cleaved caspase3、Cleaved caspase9 表达以及细胞凋亡水平并未明显增加。结论 黄芪皂苷Ⅱ增加 5-氟尿嘧啶对人肝癌细胞株 HepG2 增殖抑制作用,其机制可能与抑制 p-ERK1/2 的表达有关。

关键词 黄芪皂苷Ⅱ; 5-氟尿嘧啶; HepG2; 细胞凋亡

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)01-0078-05

肝癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,死亡率占我国恶性肿瘤的第 2 位,每年约有 22 万人死于原发性肝癌^[1]。5-氟尿嘧啶常用于治疗胃肠道恶性肿瘤,其对肿瘤抑制率降低是制约其疗效的重要原因。黄芪作为传统中草药,有补气升阳、利尿托毒、排脓

生肌等功效^[2]。研究^[3]显示黄芪提取物有抗肿瘤活性,黄芪注射液、黄芪精口服液等药物已被广泛应用于临床参与联合抗肿瘤治疗^[4],但其具体抗肿瘤活性成分及机制仍不清楚。黄芪皂苷Ⅱ为黄芪皂苷的主要成分^[5],是否能有效联合抗肿瘤药物 5-氟尿嘧啶抑制肝癌细胞株 HepG2 增殖、增加其疗效目前尚未见报道。该研究旨在探讨黄芪皂苷Ⅱ增加 5-氟尿嘧啶对人肝癌细胞株 HepG2 增殖抑制作用及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株、药品与试剂 人肝癌细胞株 HepG2 (中国科学院上海生命科学院); DMEM 高糖培养基 (美国 Hyclone 生物技术有限公司); 胎牛血清 (浙江天杭生物科技股份有限公司); 黄芪皂苷Ⅱ (南京泽朗有限公司,纯度 98%); 5-氟尿嘧啶 (天津金耀氨基酸有限公司); Hoechst33342、甲基偶氮唑蓝 (MTT)、ERK1/2 特异性抑制剂 PD98059 (美国 Sigma 公司); 山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗、 β -actin 抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 丝裂原活化蛋白激酶 (ERK1/2)、磷酸化丝裂原活化蛋白激酶 (p-ERK1/2)、活化半胱氨酸蛋白酶蛋白-3 (Cleaved caspase 3)、活化半胱氨酸蛋白酶蛋白-9 (Cleaved caspase 9)、凋亡蛋白多聚 ADP-核糖聚合酶 (PARP) 抗体 (美国 Cell Signaling 公司)。

1.2 检测指标和方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌细胞株 HepG2 采用 10% 胎牛血清、100 IU/ml 青霉素和 100 g/L 链霉素的高糖 DMEM 培养基置于 37 °C、5% 的 CO₂ 培养箱中贴壁生长,取对数期生长的细胞进行实验。

1.2.2 MTT 法测定细胞活力 取对数生长期 HepG2 细胞株,0.25% 胰酶消化后用 DMEM 培养基制成单细胞悬液,以 5×10^3 个/孔细胞接种于 96 孔板,待细胞贴壁后吸弃上清液,加入预定药物培养;每组设 5 个复孔,每孔加入 200 μ l 含药培养基。培养预定时间后,加入 20 μ l 浓度为 5 g/L 的 MTT 溶液,继续在培养箱中培养 4 h,吸弃上清液后每孔加

2015-09-30 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 11040606M222)

作者单位: ¹安徽医科大学药学院,合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院药剂科,合肥 230022

作者简介: 武超,男,硕士研究生;

许杜娟,女,博士,主任药师,责任作者, E-mail: 1465102325

@qq.com

入 150 μL DMSO, 微振荡器振荡 10 min。以酶标仪于 550 nm 波长检测相应的吸光度, 取各组均值, 实验重复 3 次。

1.2.3 Hoechst33342 法检测细胞凋亡 取对数生长期的 HepG2 细胞, 调整细胞数量至 3×10^5 个/孔, 以每孔 2 ml 接种于 6 孔板, 分组为对照组、5-氟尿嘧啶 (10 $\mu\text{mol/L}$) 组、5-氟尿嘧啶 (10 $\mu\text{mol/L}$) + 黄芪皂苷 II (20 $\mu\text{mol/L}$) 组、5-氟尿嘧啶 (10 $\mu\text{mol/L}$) + 黄芪皂苷 II (40 $\mu\text{mol/L}$) 组、5-氟尿嘧啶 (10 $\mu\text{mol/L}$) + 黄芪皂苷 II (80 $\mu\text{mol/L}$) 组, 处理 48 h 后, 弃去培养基, 用 PBS 洗涤 2 次, 4% 低聚甲醛固定 15 min, 每孔加入 PBS 溶解的 2 mg/L Hoechst33342 1 ml, 避光 15 min 后, 吸弃溶液, 用 PBS 洗涤 2 次, 荧光显微镜观察染色并拍照。

1.2.4 Western blot 检测 PARP、Cleaved PARP、ERK1/2、p-ERK1/2、Cleaved caspase3、Cleaved caspase9 蛋白表达 收集各组 HepG2 细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 洗涤 3 次, 加入 400 μL 蛋白裂解液 (含 100 mmol/L 的 PMSF 4 μL), 置于冰上裂解 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min, 取蛋白上清液, 加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液混合后煮沸 10 min, 收集总蛋白。SDS-PAGE 凝胶中进行电泳分离蛋白, 然后转印至硝酸纤维素膜 (PVDF) 上。用 5% 脱脂牛奶封闭 3 h 后, 加入常规一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜。TBST 洗涤 3 次, 加入相应二抗孵育 1 h 后, TBST 洗涤 3 次, ECL 化学发光显影, Bio-Rad 照相系统进行照相并用 Image-J 软件进行图片分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 定量资料多组比较采用单因素方差分析, 两组比较采用 LSD- t 检验。

2 结果

2.1 黄芪皂苷 II 增加 5-氟尿嘧啶对肝癌 HepG2 细胞增殖抑制作用 5-氟尿嘧啶按相应浓度 (0、0.04、0.2、1、5、25、125、625 $\mu\text{mol/L}$) 分别作用肝癌 HepG2 细胞 24、48、72 h 后, 对肝癌 HepG2 细胞增殖呈浓度和时间依赖性抑制, 见图 1。黄芪皂苷 II (20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 联用 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-氟尿嘧啶作用 48 h 后, 可以显著增加 5-氟尿嘧啶对 HepG2 细胞的抑制作用 ($F = 87.43, P < 0.05, P < 0.01$), 见图 2。

2.2 黄芪皂苷 II 增加 5-氟尿嘧啶对肝癌 HepG2 细胞促凋亡作用 Western blot 结果显示 5-氟尿嘧啶

(10 $\mu\text{mol/L}$) + 黄芪皂苷 II (20 $\mu\text{mol/L}$) 组、5-氟尿嘧啶 (10 $\mu\text{mol/L}$) + 黄芪皂苷 II (40 $\mu\text{mol/L}$) 组、5-氟尿嘧啶 (10 $\mu\text{mol/L}$) + 黄芪皂苷 II (80 $\mu\text{mol/L}$) 组较 5-氟尿嘧啶 (10 $\mu\text{mol/L}$) 组凋亡相关蛋白 PARP 出现明显裂解 ($F = 517.3, P < 0.05, P < 0.01$), 见图 3。Hoechst33342 染色分析各组细胞凋亡情况, 结果显示 5-氟尿嘧啶 (10 $\mu\text{mol/L}$) + 黄芪皂苷 II (20 $\mu\text{mol/L}$) 组、5-氟尿嘧啶 (10 $\mu\text{mol/L}$) + 黄芪皂苷 II (40 $\mu\text{mol/L}$) 组、5-氟尿嘧啶 (10 $\mu\text{mol/L}$) + 黄芪皂苷 II (80 $\mu\text{mol/L}$) 组较 5-氟尿嘧啶 (10 $\mu\text{mol/L}$) 组细胞凋亡水平升高, 见图 3。

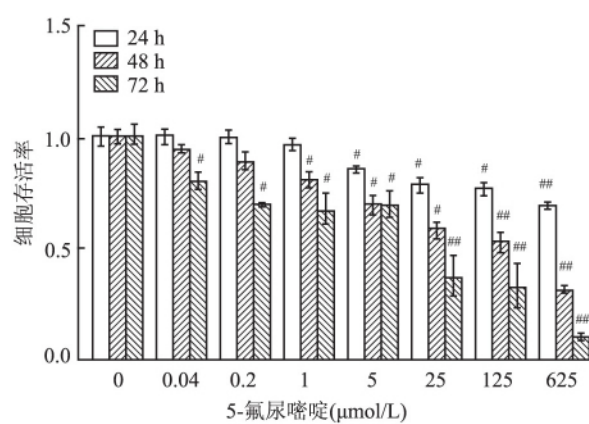


图1 5-氟尿嘧啶对肝癌 HepG2 细胞增殖抑制作用
与同一时间点 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-氟尿嘧啶组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

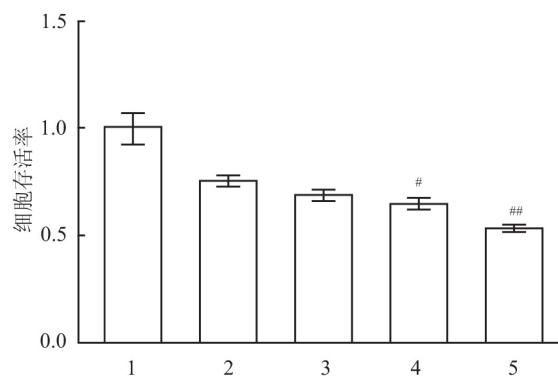


图2 黄芪皂苷 II 联合 5-氟尿嘧啶对肝癌 HepG2 细胞增殖抑制作用
1: 对照组; 2: 5-氟尿嘧啶 (10 $\mu\text{mol/L}$) 组; 3: 5-氟尿嘧啶 (10 $\mu\text{mol/L}$) + 黄芪皂苷 II (20 $\mu\text{mol/L}$) 组; 4: 5-氟尿嘧啶 (10 $\mu\text{mol/L}$) + 黄芪皂苷 II (40 $\mu\text{mol/L}$) 组; 5: 5-氟尿嘧啶 (10 $\mu\text{mol/L}$) + 黄芪皂苷 II (80 $\mu\text{mol/L}$) 组; 与 5-氟尿嘧啶 (10 $\mu\text{mol/L}$) 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.3 黄芪皂苷 II 抑制 p-ERK1/2 的表达 40 $\mu\text{mol/L}$ 黄芪皂苷 II 分别作用 HepG2 细胞 3、6、12、24、48 h 后, Western blot 检测各组 p-ERK1/2、ERK1/2

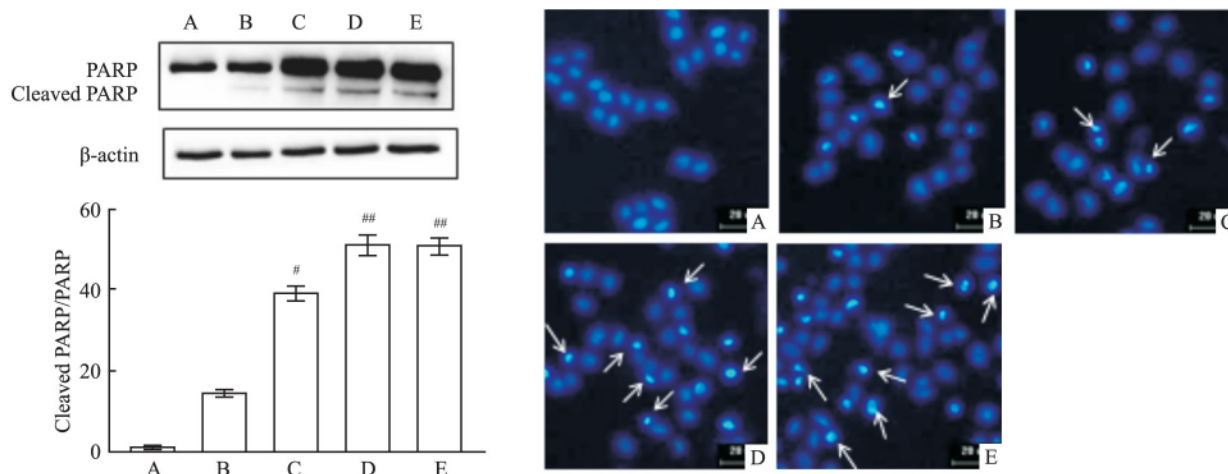


图3 黄芪皂苷Ⅱ联合5-氟尿嘧啶对肝癌 HepG2 细胞促凋亡作用

A: 对照组; B: 5-氟尿嘧啶(10 μmol/L) 组; C: 5-氟尿嘧啶(10 μmol/L) + 黄芪皂苷Ⅱ(20 μmol/L) 组; D: 5-氟尿嘧啶(10 μmol/L) + 黄芪皂苷Ⅱ(40 μmol/L) 组; E: 5-氟尿嘧啶(10 μmol/L) + 黄芪皂苷Ⅱ(80 μmol/L) 组; 与 5-氟尿嘧啶(10 μmol/L) 组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

表达,结果显示 p-ERK1/2 随作用时间增加而减少 ($F = 35.48, P < 0.05$),见图4。

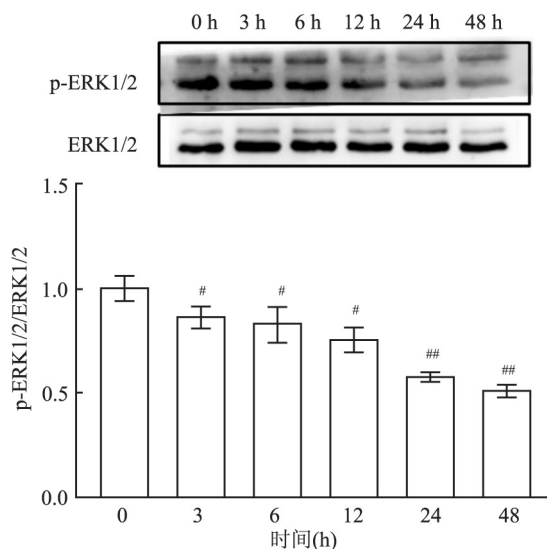


图4 黄芪皂苷Ⅱ抑制 p-ERK1/2 蛋白的表达
与 0 h 比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

2.4 联用 PD98059 增加 5-氟尿嘧啶对 HepG2 细胞的促凋亡作用 20 μmol/L PD98059 联合 10 μmol/L 5-氟尿嘧啶增加 HepG2 细胞内凋亡蛋白 Cleaved caspase3、Cleaved caspase9 的表达 ($F = 195.5, P < 0.05$); PD98059 阻断 ERK1/2 通路后,黄芪皂苷Ⅱ对 Cleaved caspase3、Cleaved caspase9 促进作用并未明显增加。Hoechst33342 染色分析结果与上诉结果一致,见图5。

3 讨论

化疗作为治疗肿瘤的重要手段被广泛运用于临床,而肿瘤细胞对化疗药物抵抗是造成疗效降低的重要原因。联合给药是解决临床化疗药物抵抗的重要方法之一,有较好的运用前景。黄芪作为传统中草药,其抗肿瘤的作用受到学者的广泛重视。黄芪多糖、黄芪皂苷等黄芪提取物的抗肿瘤特性已经成为目前抗肿瘤治疗的研究热点之一。

ERK1/2 属于有丝分裂原激活蛋白激酶家族,作为肿瘤治疗的新靶点被广泛认知^[6-7]。研究^[8]表明 ERK1/2 可以通过细胞内信号转导级联参与细胞生长、增殖、分化、凋亡等一系列生理活动。冯丹等^[9]发现抑制 ERK1/2 表达可以增加 5-氟尿嘧啶抗人胃癌细胞增殖作用,谭雪梅等^[10]发现 5-氟尿嘧啶联用 ERK1/2 特异性抑制剂 PD98059 可以增加 5-氟尿嘧啶对小鼠黑色素瘤细胞的促凋亡作用。

本研究结果显示黄芪皂苷Ⅱ通过下调 p-ERK1/2 的表达增加 5-氟尿嘧啶对人肝癌细胞 HepG2 增殖抑制作用。合用 ERK1/2 特异性抑制剂 PD98059 后,黄芪皂苷Ⅱ对凋亡蛋白 Cleaved caspase 3、Cleaved caspase 9 的表达促进作用并未显著增加, Hoechst33342 染色结果也表明阻断 ERK1/2 可以增加 5-氟尿嘧啶对 HepG2 的促凋亡作用。而 PD98059 作用后,黄芪皂苷Ⅱ对 HepG2 促凋亡作用并未显著增加。综上所述,黄芪皂苷Ⅱ增加 5-氟尿嘧啶对人肝癌细胞株 HepG2 增殖抑制作用,其机制

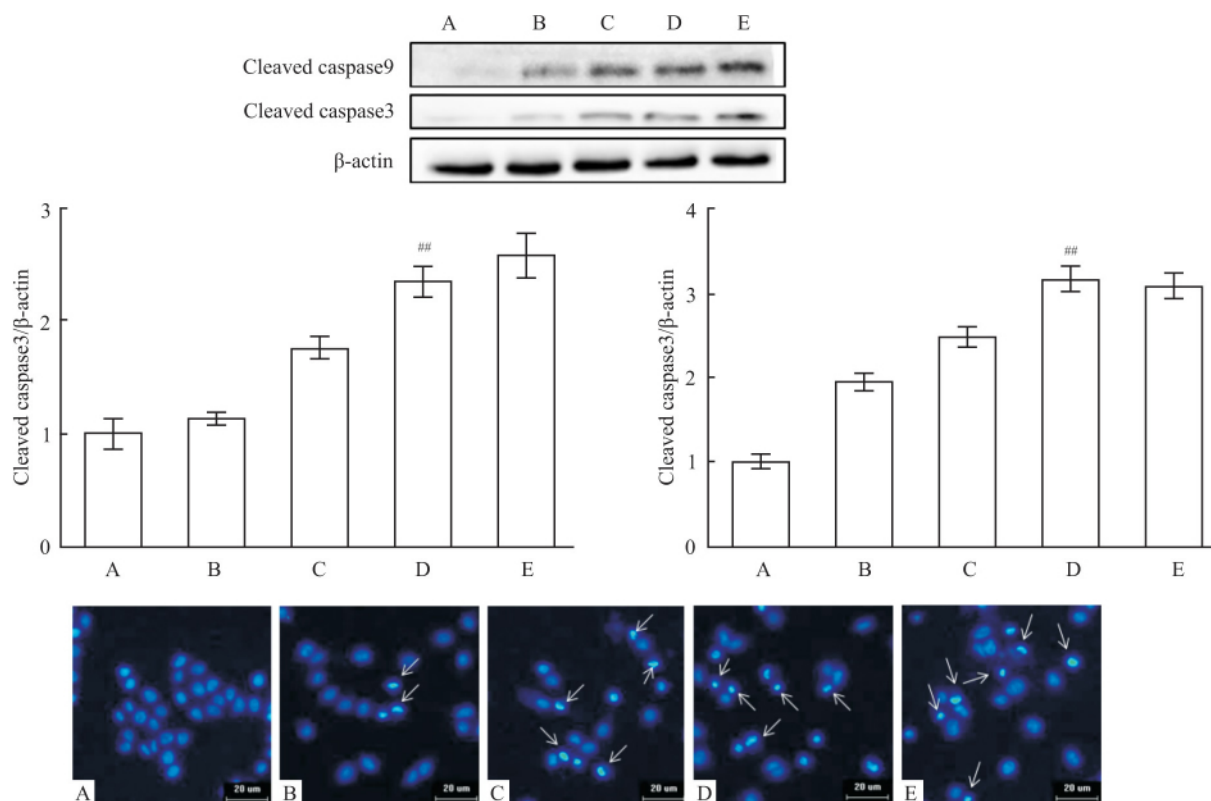


图5 联用PD98059增加5-氟尿嘧啶对HepG2细胞的促凋亡作用

A: 对照组; B: 5-氟尿嘧啶(10 μmol/L)组; C: 5-氟尿嘧啶(10 μmol/L) + 黄芪皂苷II(40 μmol/L)组; D: 5-氟尿嘧啶(10 μmol/L) + PD98059(20 μmol/L)组; E: 5-氟尿嘧啶(10 μmol/L) + 黄芪皂苷II(40 μmol/L) + PD98059(20 μmol/L)组; 与5-氟尿嘧啶(10 μmol/L)组比较, ^{##}*P* < 0.01

可能与抑制 p-ERK1/2 的表达有关。

参考文献

- 陈冬, 王仁本. 原发性肝癌外放疗临床应用现状[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(1): 76-80.
- 刘畅, 刘平, 慕永平, 等. 黄芪汤治疗慢性肝病研究进展[J]. 世界中医药, 2015, 10(2): 157-61.
- 谢晶, 夏瑞祥. 黄芪总苷诱导NB4凋亡过程中死亡受体通路分子变化[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(1): 12-5.
- 张虎, 李治. 黄芪注射液对慢性心力衰竭患者血清肿瘤坏死因子-α、白细胞介素-6及血管紧张素II的影响[J]. 实用临床医药杂志, 2014, 18(23): 17-9.
- Huang C, Xu D, Xia Q, et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of human hepatic cancer cells by Astragaloside II[J]. J Pharm Pharmacol, 2012, 64(12): 1741-50.
- 李磊, 程丰伟, 王芳, 等. TLR7激活对Hela细胞增殖的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(7): 910-2, 922.
- Esmaili M A, Farimani M M, Kiaei M. Anticancer effect of calycopterin via PI3K/Akt and MAPK signaling pathways, ROS-mediated pathway and mitochondrial dysfunction in hepatoblastoma cancer (HepG2) cells[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 397(1-2): 17-31.
- 冯丹, 刘静, 曲秀娟, 等. MEK/ERK抑制剂影响胃癌细胞对5-FU敏感性及其机制的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18(5): 321-4.
- 谭雪梅, 郑辉, 洪学军. ERK1,2抑制剂联合5-FU对B16细胞增殖和凋亡的影响[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2009, 30(6): 606-9.

Increasing inhibition of human hepatic cancer HepG2 cells to 5-fluorouracil by Astragaloside II

Wu Chao¹, Xu Dujuan^{1,2}, Yang Cui¹, et al

(¹College of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the Astragaloside II increasing inhibition of human hepatic cancer (HepG2)

网络出版时间: 2015-12-30 14:38 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20151230.1438.038.html>

◇ 临床医学研究 ◇

慢性 HBV 感染 HBsAg 含量与 T、B 淋巴细胞亚群及 NK 细胞相关性

聂琳¹, 杨丽莎², 彭德珍³, 张敏¹, 王君宜¹

摘要 目的 探讨慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染免疫不全状态(非活动期)乙型肝炎表面抗原(HBsAg)含量与外周血 T、B 淋巴细胞亚群及 NK 细胞的相关性。方法 收集慢性 HBV 感染免疫不全状态(非活动期)者 34 例、健康者 20 例,采用流式细胞仪检测其外周血 T、B 淋巴细胞亚群及 NK 细胞百分比,实时荧光探针定量-聚合酶链反应(FQ-PCR)方法检测 HBsAg 的含量。结果 HBsAg 的含量与 B 淋巴细胞百分比呈正相关性($P < 0.05$),高 HBsAg 含量组的 B 淋巴细胞高于健康组与低 HBsAg 含量组,差异有统计学意义($P < 0.05$),与 T 淋巴细胞及 NK 细胞无相关性。结论 在慢性 HBV 感染免疫不全状态(非活动期)的人群中,HBsAg 含量在一定程度上能反映患者的免疫状态,外周血淋巴细胞亚群和 NK 细胞检测对于了解患者免疫状态有一定的临床价值。**关键词** 乙肝病毒表面抗原含量; T 淋巴细胞; B 淋巴细胞;

自然杀伤细胞; 免疫不全状态(非活动期)

中图分类号 R 446.11; R 373.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)01-0082-04

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是全球性的健康问题。而乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)作为乙肝病毒的包膜蛋白是 HBV 感染的标志,在感染者体内大量存在,作为人体的异种蛋白,其持续存在对人体的作用了解的并不多。《慢性乙型肝炎防治指南(2010)年版》将婴幼儿时期 HBV 感染的自然史分为 4 个时期:免疫耐受期、免疫清除期、非活动或低(非)复制期、再活动期,但并不是所有的 HBV 感染者都经历以上时期^[1]。该实验通过检测非活动期的 HBV 感染人群的外周血 T、B 细胞亚群和 NK 细胞的百分比以及 HBsAg 含量,了解 HBsAg 含量对人体的免疫作用。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2014 年 9 月~2015 年 2 月在桂林医学院附属医院门诊体检的免疫不全状态(非

2015-10-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81260602)

作者单位: 桂林医学院附属医院¹ 消化内科、² 中医科、³ 检验科, 桂林 541001

作者简介: 聂琳,女,硕士研究生;

杨丽莎,女,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: yangsha@glmc.edu.cn

cells by 5-fluorouracil and its possible mechanism. **Methods** The HepG2 inhibiting rate by 5-fluorouracil after alone or jointly acting on cells was detected by MTT method; cells apoptosis was detected by Hoechst33342 staining. The expressions of ERK1/2, p-ERK1/2, PARP, Cleaved PARP, Cleaved caspase 3 and Cleaved caspase 9 proteins were measured by Western blot. **Results** MTT staining showed that 5-fluorouracil inhibited the proliferation of HepG2 cells and presented dose and time-dependence. Furthermore, combining the Astragaloside II with 5-fluorouracil could further significantly enhance the effect of 5-fluorouracil on cancer cells inhibition ($P < 0.05$). Western blot result proved that combining the Astragaloside II with 5-fluorouracil could increase the expression of Cleaved PARP ($P < 0.05$). Hoechst33342 staining result further validated the level of apoptosis cells was far more increased in the combination group than the 5-fluorouracil group. Moreover, Western blot result also showed that Astragaloside II inhibited the phosphorylation of ERK1/2. Combining the inhibitor of ERK1/2 (PD98059) with 5-fluorouracil may increase apoptosis rate and the expressions of apoptosis related proteins like Cleaved caspase3, Cleaved caspase 9 in HepG2 cells. Astragaloside II showed negative increasing trend of apoptosis rate and the expressions of apoptosis related proteins like Cleaved caspase 3, Cleaved caspase 9 by 5-fluorouracil after blocking ERK1/2 in HepG2 cells. **Conclusion** Astragaloside II could increase inhibition of human hepatic cancer HepG2 cells by 5-fluorouracil, and the mechanism may be related to inhibiting p-ERK1/2 pathway.

Key words Astragaloside II; 5-fluorouracil; HepG2 cells; cell apoptosis