

重楼皂苷 I 对人肝癌细胞 MHCC97-H 增殖、周期、凋亡的影响*

曾普华¹, 叶书林², 王佳佳², 李 为², 刘 丹²,
贺佐梅², 邓天好¹, 周 芳¹, 郜文辉^{2△}

(1. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410026; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208)

摘要: **目的** 观察重楼皂苷 I 对人肝癌细胞 MHCC97-H 增殖、周期及凋亡的影响。**方法** 1. 将对数生长期的肝癌细胞 MHCC97-H, 加入不同浓度的重楼皂苷 I 和索拉菲尼, 24h 后 CCK8 法检测药物对细胞增殖的影响。2. 根据 CCK8 实验结果, 选取相应浓度的重楼皂苷 I 和索拉菲尼, 作用于细胞 24h, 观察细胞周期及凋亡情况。**结果** 重楼皂苷 I 及索拉菲尼作用于人肝癌细胞 MHCC97-H 的 IC₅₀ 的浓度分别是 5.7 μ g/mL、10 μ mol/mL。重楼皂苷 I 及索拉菲尼均能抑制 S 期, 将细胞阻滞于 G₀/G₁ 期, 能明显促进细胞凋亡, 与空白对照组比较具有显著差异 ($P < 0.01$)。**结论** 重楼皂苷 I 对人肝癌细胞 MHCC97-H 具有明显的抑制增殖及促进凋亡的作用。

关键词: 重楼皂苷; 索拉菲尼; 肝癌; MHCC97-H

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)03-0007-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.03.002

肝癌是世界上肿瘤引起病人死亡的主要原因之一^[1]。每年大约有 70 万人死于肝癌^[2]。大多数肝癌病人在发现时已失去手术治疗机会, 只能采取包括局部灌注化疗的综合治疗^[3]。目前从中草药中寻找天然抗肿瘤活性成分是抗癌药物研究的一个重要途径和研究热点, 近年来, 重楼在抗肿瘤方面的作用得到了广泛的重视, 一系列的体内体外实验表明其具有抗肿瘤和肿瘤预防作用^[4-7]。我们在实验中发现, 重楼皂苷 I (Polyphyllin I) 对人肝癌细胞 MHCC97H 增殖及细胞周期都具有明显的影响, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

MHCC97-H 细胞购自于北京北纳创联生物技术研究院。

1.1.2 药物

重楼皂苷 I: 购自南通飞宇生物科技有限公司。

索拉菲尼, 购自德国拜耳医药保健公司, 批号:

700632, 规格: 200mg/片。

1.1.3 主要试剂

DMEM 高糖培养基: 美国 Hyclone 公司; FBS 胎牛血清: 浙江天杭生物科技有限公司; PBS 磷酸缓冲液: 美国 Hyclone 公司; 0.25% 胰蛋白酶: 美国 Hyclone 公司; 细胞增殖-毒性检测试剂盒 (cck-8): 日本同仁化学研究所; 二甲基亚砜 (DMSO): 美国 Hyclone 公司。

1.1.4 主要仪器

超净工作台: SW-CJ-1FD, 苏州苏洁净化设备有限公司; 恒温孵育箱: Heracell, 离心机: TD5A, 长沙英泰仪器有限公司; 倒置显微镜: XDS-1B, 重庆光电北京有限公司; -80℃ 超低温冰箱: DW-HL538, 中科美菱; 流式细胞仪: BD FACSCalibur。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。

1.2.2 药物制备

重楼皂苷 I: 取 20mg 溶于 0.2mL 二甲基亚砜

* 基金项目: 国家自然科学基金(81603603); 湖南省教育厅优秀青年项目(14B135); 湖南省研究生创新基金(CX2014B364); 湖南省科技计划项目(2016SK2051); 湖南省研究生创新项目(2016CX31)

收稿日期: 2017-05-18

作者简介: 曾普华(1976-), 男, 湖南娄底人, 副主任医师, 研究方向: 恶性肿瘤的中西医结合诊治。

△通信作者: 郜文辉, E-mail: 476541034@qq.com

(DMSO)、9.8mLPBS 中,配制成重楼皂苷 I 母液 (2mg/mL);0.22 μ m 微孔滤膜过滤分装,-20℃冰箱保存,DMSO 终浓度小于 0.1%。

索拉菲尼:研磨器碾成粉末,称取 50mg,溶于 0.5mLDMSO、9.5mLPBS 中,配制成索拉菲尼母液 (5mg/mL);0.22 μ m 微孔滤膜过滤分装,-20℃冰箱保存,DMSO 终浓度小于 0.1%。

1.2.3 CCK-8 法检测不同浓度药物对人肝癌细胞 MHCC97-H 增殖的影响

(1) 取生长良好的对数期 MHCC97 细胞,0.25%胰酶消化,培养基重悬,按细胞数为 5×10^3 密度,以 100 μ L 每孔接种于 96 孔板培养。设实验组(重楼皂苷、索拉菲尼)、对照组(100 μ L 细胞悬液)、空白组(100 μ L 培养液)。培养 24h 后实验组加入不同浓度的重楼皂苷 I (终浓度分别为 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 μ g/mL)、索拉菲尼(终浓度分别为 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 μ g/mL),每次处理 5 个复孔。

(2) 继续孵育 24h 后,每孔加入 10 μ L CCK8 试剂培养 1~4h,选择酶标仪检测 450nm 处吸光度(A),记录结果,去掉最高值和最低值后取平均值,计算细胞增殖抑制率。GraphPad Prism 6.0 计算 IC50 值。

增殖抑制率(%)=[1-(A 实验组-A 空白组)/(A 对照组-A 空白组)] $\times$ 100%;GraphPad Prism 6.0 绘制增殖抑制曲线,计算 IC50。

(3) 实验独立重复 3 次。

1.2.4 流式细胞术检测对人肝癌细胞 MHCC97-H 周期及凋亡的影响

取对数生长期细胞,分实验组和对照组进行干预。实验组重楼皂苷 I、索拉菲尼干预浓度分别为 5.7 μ g/mL、10 μ mol/mL,对照组为正常培养的 MHCC97 细胞。干预 24h 后收集细胞,流式细胞术检测药物组干预后对 MHCC97 细胞周期及凋亡的影响。

1.2.5 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行数据处理,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组之间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 不同浓度重楼皂苷 I、索拉菲尼对人肝癌细胞 MHCC97-H 的抑制率及 IC50

CCK-8 结果表明,重楼皂苷 I 浓度梯度分别 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 μ g/mL,其 24h 抑制率分别为 18.41%, 66.06%, 76.15%, 98.33 及 99.34%;重楼皂苷

I 干预 24h 的 IC50 值为 5.7 μ g/mL。见表 1、图 1。

表 1 重楼皂苷 I 对 MHCC97 的抑制率及 IC50 ($\bar{x} \pm s$)

重楼皂苷 I 浓度/(μ g $\cdot$ mL $^{-1}$)	抑制率/%	IC50/(μ g $\cdot$ mL $^{-1}$)
3.125	18.41 $\pm$ 0.11	5.7
6.25	66.06 $\pm$ 3.55	
12.5	76.15 $\pm$ 3.64	
25	98.33 $\pm$ 0.23	
50	99.34 $\pm$ 0.60	

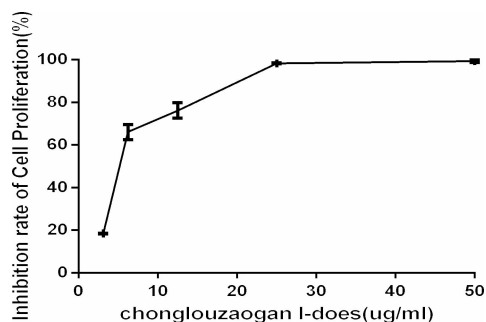


图 1 重楼皂苷 I 增殖抑制曲线图

索拉菲尼浓度梯度分别 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 μ mol/mL,其 24h 抑制率分别为 18.41%, 66.06%, 76.15%, 98.33 及 99.34%;索拉菲尼干预 24h 的 IC50 值为 10 μ mol/mL。见表 2、图 2。

表 2 索拉菲尼对 MHCC97 的抑制率及 IC50 ($\bar{x} \pm s$)

索拉菲尼浓度/(μ mol $\cdot$ mL $^{-1}$)	抑制率/%	IC50/(μ mol $\cdot$ mL $^{-1}$)
3.125	27.36 $\pm$ 7.23	10
6.25	46.39 $\pm$ 7.02	
12.5	70.89 $\pm$ 6.62	
25	96.71 $\pm$ 0.34	
50	98.21 $\pm$ 0.36	

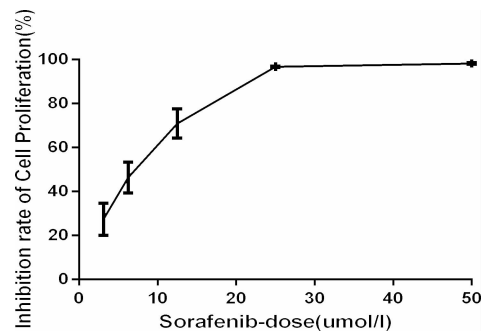


图 2 索拉菲尼增殖抑制曲线图

2.2 对人肝癌细胞 MHCC97-H 周期的影响

流式细胞仪检测细胞周期分布,经方差分析,结果显示:细胞处理 24h 后,重楼皂苷组及索拉菲尼组

与空白对照组相比较,均能抑制 S 期,将细胞阻滞于 G0/G1 期($P<0.01$)。见表 3、图 3。

2.3 对人肝癌细胞 MHCC97-H 凋亡的影响

表 3 药物处理后细胞周期分布($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	G0/G1	S	G2/M
空白对照组	29.66 $\pm$ 0.31	42.92 $\pm$ 0.87	27.43 $\pm$ 0.69
索拉菲尼组	50.43 $\pm$ 2.90*	34.46 $\pm$ 1.01*	13.32 $\pm$ 0.49
重楼皂苷 I 组	43.88 $\pm$ 0.63*	34.02 $\pm$ 1.06*	22.11 $\pm$ 0.49

注:与空白对照组比较,* $P<0.01$

表 4 药物处理后细胞凋亡($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	细胞凋亡率
空白对照组	5.27 $\pm$ 0.13
索拉菲尼组	20.32 $\pm$ 0.46*
重楼皂苷 I 组	32.98 $\pm$ 0.50*

注:与空白对照组比较,* $P<0.01$

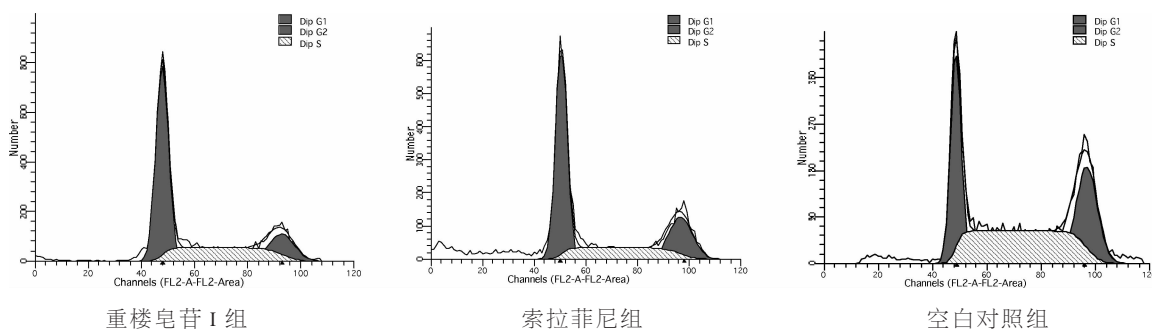


图 3 流式细胞术检测细胞周期

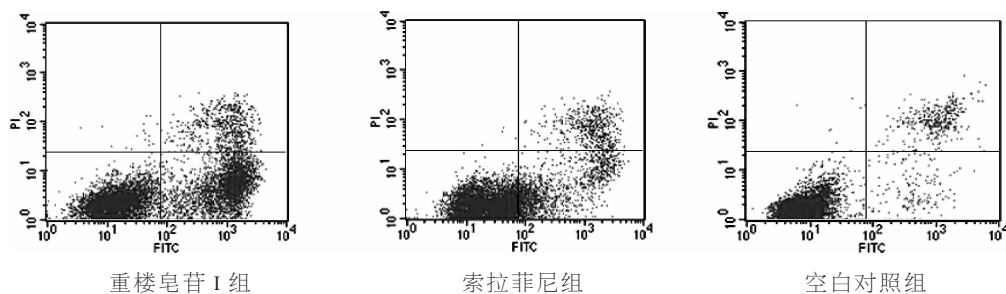


图 4 流式细胞术检测细胞凋亡

3 讨论

重楼最早载于《神农本草经》,名为蚤休,后《滇南本草》开始以重楼作为正式药名。味苦,微寒,有小毒,归肝经,清热解毒,消肿止痛,凉肝定惊。用于痈肿疔疮,咽喉肿痛,毒蛇咬伤,惊风抽搐,跌打损伤^[8-9]。在杀伤和抑制癌细胞、调节机体免疫功能、阻遏癌症的发生和转移、诱导癌细胞分化、抑制肿瘤血管生成、逆转癌细胞的耐药性等方面都具有良好的活性^[10]。其主要成份包括甾体皂苷类、植物蜕皮激素类、甾醇类及黄酮类等,皂苷类化合物结构复杂,种类繁多,其中甾体皂苷为其主要活性成分^[11-12]。研究表明重楼皂苷 I 可通过下调 Cyclin D1 和 Cyclin E 蛋白的表达,阻滞肝癌细胞 SMMC-7721 的 DNA 的复制,同时通过促进 Fas、Bax 蛋白的表达,抑制 Bcl-2 蛋白的表

达水平从而诱导肝癌细胞 SMMC-7721 的凋亡^[13]。其能抑制胰腺癌 PANC-1 细胞的体外增殖,诱导细胞凋亡,机制可能与降低 PI3K、p Akt、Bcl-2 蛋白表达,增加 Bax 及 caspase-3 蛋白表达有关^[14]。重楼皂苷影响 JAK/STAT3 通路诱导结直肠癌细胞凋亡^[15]。中药重楼皂苷联合顺铂后可增加 caspase-3 基因的表达,诱导细胞凋亡^[16]。目前多集中于单一机制的探索,是否多种途径在此过程中起了协同作用还有待进一步阐明。

本实验研究证实重楼皂苷 I 对人肝癌细胞 MHCC97-H 具有抑制其增殖、诱导凋亡的作用,其作用机制有待于进一步深入研究。

参考文献:

[1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics

- [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: a global view [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010, 7(8): 448-458.
- [3] Falkson G, Macintyre JM, Moertel CG, et al. Primary liver cancer. An Eastern Cooperative Oncology Group Trial. Cancer. 1984, 54(6): 970-977.
- [4] Siu FM, Ma DL, Cheung YW, et al. Proteomic and transcriptomic study on the action of a cytotoxic saponin (Polyphyllin D): induction of endoplasmic reticulum stress and mitochondria-mediated apoptotic pathways [J]. Proteomics, 2008, 8(15): 3105-3117.
- [5] 朱燕, 谢丽, 杨觅, 等. 重楼抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 癌症进展, 2015, 13(2): 164-166.
- [6] Xiao X, Bai P, Bui Nguyen TM, et al. The antitumoral effect of Paris Saponin I associated with the induction of apoptosis through the mitochondrial pathway [J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2009, 8(5): 1179-1188.
- [7] 赵保胜, 朱寅荻, 马勇, 等. 中药重楼研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 267-270.
- [8] 国家药典委员会, 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 243.
- [9] 清·顾观光辑, 杨鹏举校注. 神农本草经[M]. 北京: 学苑出版社, 2002: 2601.
- [10] 王飞, 杨宇, 范丽梅, 等. 重楼皂苷抗肿瘤的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(18): 5303-5305.
- [11] Vincken JP, Heng L, de Groot A, et al. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom [J]. Phytochemistry, 2007, 68(3): 275-297.
- [12] Guclu-Ustundag O, Mazza G. Saponins: properties, applications and processing [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2007, 47(3): 231-258.
- [13] 萧梅芳, 戴霞红, 贺新春, 等. 重楼皂苷 I 对肝癌细胞的增殖及凋亡的影响[J]. 生命科学研究[J]. 2011, 15(6): 519-523.
- [14] 江皓, 赵鹏军, 马胜林. 重楼皂苷 I 通过 PI3K/Akt 途径诱导胰腺癌 PANC-1 细胞凋亡的研究 [J]. 肿瘤学杂志, 2014, 20(2): 127-130.
- [15] 滕文静, 周超, 曹晓靖, 等. 重楼皂苷影响 JAK/STAT3 通路诱导结直肠癌细胞凋亡 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(4): 808-811.
- [16] 张嘉玲, 郑长军, 杨瑞琦, 等. 重楼皂苷 VII 联合顺铂通过内质网应激诱导卵巢癌细胞凋亡 [J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(1): 6-9.

(编辑: 徐建平)

Effects of Polyphyllin I and Sorafenib on the Proliferation and Cell Cycle and Apoptosis of MHCC97-H

ZENG Puhua¹, YE Shulin², WANG Jiajia², LI Wei², LIU Dan², HE Zuomei², DENG Tianhao¹, ZHOU Fang¹, GAO Wenhui²

(1. Hunan Traditional Chinese Medicine Research Institute, Changsha 410026, China;

2. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe effects of Polyphyllin I and Sorafenib on the proliferation and cell cycle and apoptosis of MHCC97-H. **Methods** MHCC97H cells of logarithmic growth phase was detected for cell proliferation by adding different concentrations of Polyphyllin I and sorafenib for 24 hours. 2. According to the results of CCK8, the concentration of IC₅₀ of Polyphyllin I and Sorafenib on MHCC97-H cells was selected and interfering cells for 24 hours to observe the cell cycle and apoptosis. **Results** IC₅₀ of Polyphyllin I and sorafenib on MHCC97H cells was 5.7 μg/ml, 10 μmol/ml. compared with blank control group, Polyphyllin I and Sorafenib can inhibit S period, blocked the cells in G₀/G₁ phase, can obviously promote the cell apoptosis. There was a significant difference compared with the blank control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Polyphyllin I can significantly inhibit the proliferation of MHCC97H and promote its apoptosis.

KEY WORDS: polyphyllin I; sorafenib; cancer of the liver; MHCC97-H