

白头翁皂苷B4对肝癌细胞Huh-7及其荷瘤裸鼠肿瘤的抑制作用及机制研究^Δ

薛淑一^{1,2*}, 李明春^{2#}, 苗青², 周煜^{2,3} (1. 青岛大学药学院药理学系, 山东青岛 266021; 2. 中国人民解放军海军第九七一医院药剂科, 山东青岛 266071; 3. 大连医科大学药学院, 辽宁大连 116044)

中图分类号 R965;R735.7 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)05-0601-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.05.06

摘要 目的: 研究白头翁皂苷B4(AB4)对肝癌细胞Huh-7及其荷瘤裸鼠肿瘤的抑制作用及机制。方法: 将Huh-7细胞分为AB4给药组、阴性对照组(等体积培养液)、阳性对照组(5-氟尿嘧啶50 μmol/L), 运用MTT法检测0、3、6、12、25、50、100、200、400、800、1 600 μmol/L AB4作用Huh-7细胞12、24、36、48 h的增殖抑制率, 计算半数抑制浓度(IC₅₀); 克隆形成试验评估50 μmol/L AB4作用Huh-7细胞24 h的克隆细胞数; 膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)染色检测50 μmol/L AB4作用Huh-7细胞24 h的细胞凋亡率; Western blot法检测50 μmol/L AB4作用Huh-7细胞24 h后B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、胱天蛋白酶3(Caspase-3)、活化胱天蛋白酶3(Cleaved Caspase-3)、活化多腺苷二磷酸核糖聚合酶(Cleaved PARP)等凋亡蛋白的表达。将荷瘤裸鼠随机分为阴性对照组(生理盐水)、阳性对照组(5-氟尿嘧啶50 mg/kg)和AB4低、中、高剂量组(25、50、100 mg/kg), 每组3只, 每天腹腔注射相应药物1次, 连续19 d, 观察裸鼠肿瘤生长情况, 计算抑瘤率; 苏木精-伊红(HE)染色观察肿瘤细胞形态变化。结果: AB4对Huh-7细胞的增殖抑制率随给药浓度的增加而增加, 但50 μmol/L后增加不明显, 随作用时间的延长而增加, 但作用24 h后增加不明显, AB4的IC₅₀为(56.76 ± 1.756) μmol/L。与阴性对照组比较, 50 μmol/L AB4作用Huh-7细胞24 h的克隆细胞数明显减少、Bcl-2蛋白表达明显减弱(P < 0.05), 细胞凋亡率和Bax、Caspase-3、Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP蛋白表达均明显增加(P < 0.05或P < 0.01), 且与阳性对照组差异无统计学意义。与阴性对照组比较, AB4低、中、高剂量组和阳性对照组荷瘤裸鼠的瘤体体积明显减小(P < 0.05), 肿瘤细胞轮廓逐渐模糊, 出现核固缩、核质不清晰、核碎裂现象, 其抑瘤率分别为25.93%、39.15%、46.26%、42.83%。结论: AB4对Huh-7细胞及其荷瘤裸鼠均有抑制作用, 其机制可能与上调Bax/Bcl-2比例、活化Caspase-3、裂解PARP、诱导细胞发生凋亡有关。

关键词 白头翁皂苷B4; 肝癌细胞Huh-7; 荷瘤裸鼠; 抑制作用; 机制

- (4):331-336.
- [17] 辛华雯, 吴笑春, 李馨, 等. 盐酸小檗碱及其与环孢素A合用对大鼠肝脏和小肠CYP3A2表达影响[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(5):353-356.
- [18] STAATZ CE, TETT SE. Clinical pharmacokinetics of once-daily tacrolimus in solid-organ transplant patients[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2015, 54(10):993-1025.
- [19] VALBUENA H, SHIPKOVA M, KLIESCHS M, et al. Comparing the effect of isotopically labeled or structural analog internal standards on the performance of a LC-MS/MS method to determine ciclosporin A, everolimus, sirolimus and tacrolimus in whole blood[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2016, 54(3):437-446.
- [20] PARK JS, CHO HR, KANG MJ, et al. A rapid and sensitive method to determine tacrolimus in rat whole blood using liquid-liquid extraction with mild temperature ultrasonication and LC-MS/MS[J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(1):73-82.
- [21] RAMAKRISHNA NV, VISHWOTTAM KN, PURAN S, et al. Liquid chromatography-negative ion electrospray tandem mass spectrometry method for the quantification of tacrolimus in human plasma and its bioanalytical applications[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, 805(1):13-20.
- [22] SHIPKOVA M, SVINAROV D. LC-MS/MS as a tool for TDM services: where are we?[J]. *Clin Biochem*, 2016, 49(13/14):1009-1023.
- [23] VAN EECKHAUT A, LANCKMANS K, SARRE S, et al. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(23):2198-2207.
- [24] BODNAR-BRONIARCZYK M, PAWINSKI T, KUICKI PK. Isotope-labeled versus analog internal standard in LC-MS/MS method for tacrolimus determination in human whole blood samples-A compensation of matrix effects[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019. DOI:10.1016/j.jchromb.2018.11.026.
- [25] 薛新平. 五酯片对细胞色素P₄₅₀ 3A和P-糖蛋白活性影响的研究[D]. 广州: 中山大学, 2010.

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81703768, 81803400); 山东省自然科学基金资助项目(No.ZR2018BH045)

* 药师, 硕士研究生。研究方向: 肿瘤药理学。电话: 0532-51872904。E-mail: xsy9401@163.com

通信作者: 主任药师, 教授, 硕士。研究方向: 时辰药理学。电话: 0532-51870086。E-mail: lmc401y@163.com

(收稿日期: 2018-11-28 修回日期: 2019-01-07)

(编辑: 林静)

Inhibitory Effects and Mechanism of Anemoside B4 on Hepatocellular Carcinoma Huh-7 Cells and Tumor-bearing Nude Mice

XUE Shuyi^{1,2}, LI Mingchun², MIAO Qing², ZHOU Yu^{2,3} (1. Dept. of Pharmacology, School of Pharmacy, Qingdao University, Shandong Qingdao 266021, China; 2. Dept. of Pharmacy, No. 971 Hospital of the Navy of PLA, Shandong Qingdao 266071, China; 3. College of Pharmacy, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the anti-tumor effect of anemoside B4 (AB4) on hepatocellular carcinoma Huh-7 and tumor-bearing nude mice and its mechanism. **METHODS:** Huh-7 cells were divided into AB4 treatment group, negative control group (constant volume of culture medium) and positive control group (5-fluorouracil 50 $\mu\text{mol/L}$). The inhibitory rate of Huh-7 cell proliferation was tested by MTT after treated with 0, 3, 6, 12, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1 600 $\mu\text{mol/L}$ AB4 for 12, 24, 36, 48 h; IC_{50} were calculated. The number of clone cells was evaluated by clone formation tests after Huh-7 cells were treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ AB4 for 24 h. The apoptosis rate of Huh-7 cells was tested by Annexin V-FITC/PI double staining after treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ AB4 for 24 h. The expression of apoptotic proteins such as Bcl-2, Bax, Caspase-3, Cleaved Caspase-3 and Cleaved PARP were tested by Western blot after Huh-7 cells were treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ AB4 for 24 h. Tumor-bearing nude mice were randomly divided into negative control group (normal saline), positive control group (5-fluorouracil 50 mg/kg), AB4 low-dose, medium-dose and high-dose groups (25, 50, 100 mg/kg), with 3 mice in each group. They were given relevant medicine intraperitoneally, once a day, for consecutive 19 d. The growth of tumor was observed, and anti-tumor rate was also calculated. HE staining was used to observe the morphology of tumor cells. **RESULTS:** The inhibition rate of AB4 on Huh-7 cell proliferation increased with the increase of concentration of AB4, but it did not increase significantly after reaching 50 $\mu\text{mol/L}$; it increased with the increase of time, but it did not increase significantly after 24 h. The IC_{50} of AB4 was $(56.76 \pm 1.756) \mu\text{mol/L}$. Compared with negative control group, the number of clone cells was decreased significantly after Huh-7 cells were treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ AB4 for 24 h, while the protein expression of Bcl-2 was decreased significantly ($P < 0.05$); the apoptotic rate, the protein expression of Bax, Caspase-3, Cleaved Caspase-3 and Cleaved PARP were increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), there was no statistical significance, compared with positive control group. Compared with negative control group, the volume of tumor was decreased significantly in AB4 low-dose, medium-dose and high-dose groups, positive control group ($P < 0.05$); the outline of tumor cells become more and more blurred; there were nuclear pyknosis, unclear nucleoplasm and nuclear fragmentation; its anti-tumor rates were 25.93%, 39.15%, 46.26%, 42.83%, respectively. **CONCLUSIONS:** AB4 inhibits Huh-7 cells and tumor-bearing mice, the mechanism of which may be associated with up-regulating the proportion of Bax/Bcl-2, activating Caspase-3, cracking PARP and inducing apoptosis.

KEYWORDS Anemoside B4; Hepatocellular carcinoma Huh-7; Tumor-bearing nude mice; Inhibitory effect; Mechanism

肝癌是常见的恶性肿瘤,发病率位于世界总癌症的第6位,病死率位于第4位,是导致男性死亡的第二大癌症^[1]。导致肝癌发生的危险因素主要包括以乙型、丙型肝炎病毒为代表的病毒因素;遗传、变质食物中的黄曲霉毒素、水质污染导致泛滥的蓝绿藻类毒素、过度吸烟饮酒、非酒精性脂肪肝等非病毒因素^[2]。中国是肝癌高发地区,尤其是乙肝导致的肝癌^[1]。目前索拉非尼是美国FDA唯一批准的晚期肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)治疗的药物^[3],一旦耐药,就没有其他标准治疗方案适用^[4]。为此,寻找能够治疗肝癌的新的化学结构实体并研究其作用机制尤为重要。白头翁皂苷B4 (Anemoside B4, AB4)来源于毛茛科的植物白头翁,传统医学记载,白头翁有清热解毒、凉血止痢的功效^[5],其主要成分为三萜皂苷、三萜酸、胡萝卜苷、木脂素等^[6]。白头翁皂苷(*Pulsatilla chinensis* saponin)作为一种三萜皂苷,具有抗肿瘤活性,中国民间有应用其治疗乙肝的实例^[7]。而单体AB4是白头翁皂苷的主要活性成分,但其抗癌活性与机制尚不清楚。因此,本研究拟从体内和

体外探究AB4对肝癌细胞Huh-7的潜在抑制作用,并初步探讨其分子机制,以期AB4更好地开发利用提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

YXQ-LS-50A型全自动立式电热压力蒸汽灭菌器(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司);CB型CO₂培养箱(德国Binder公司);XDS-1B型显微镜(上海光学仪器厂);SW-CJ-2F型超净工作台(上海苏净实业有限公司);HH-2型数显恒温水浴锅(常州亿通分析仪器制造有限公司);TGL16型离心机(长沙英泰仪器有限公司);ELx800型酶标仪(美国Bio-Tek公司);Accuri C6型流式细胞仪(美国BD公司);910型凝胶成像系统(上海山富科学仪器公司);Mini-Protean Tetra型垂直电泳槽(美国Bio-Rad公司);WH-1型微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂)。

1.2 药品与试剂

AB4(上海爱必信生物科技有限公司,批号:

wkq16032901,纯度:98%);5-氟尿嘧啶(5-FU,北京索莱宝科技有限公司,批号:F8301,纯度:98.0%~102.0%);DMEM培养基、胰蛋白酶、青霉素/链霉素双抗(美国Hyclone公司,批号:AD16191267、J170046、J170042);胎牛血清(澳大利亚AusGeneX公司,批号:FBSSA01016-2);Matrigel胶(美国BD公司,批号:356234);B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)兔单克隆抗体、Bcl-2相关X蛋白(Bax)兔多克隆抗体、胱天蛋白酶3(Caspase-3)兔多克隆抗体、活化多腺苷二磷酸核糖聚合酶(Cleaved PARP)兔多克隆抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)兔单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)(美国CST公司,批号:3498、2772、9662、5625、8457、7074);四甲基偶氮唑盐(MTT)试剂盒、膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒、苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:C0009、C1062、C0105);HRP底物化学发光液(美国Millipore公司,批号:1702302)。

1.3 细胞

人肝癌细胞Huh-7购自中国科学院典藏培养物保藏委员会上海细胞库。

1.4 动物

BALB/c 裸鼠, SPF级, δ , 4周龄(28~34 d), 体重15~18 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(京)2016-0006; 将裸鼠置于22~26℃、湿度40%~60%的环境中, 自由摄食与饮水, 笼具等均经高压灭菌处理后使用, 保持垫料干燥清洁, 适应性饲养1周后用于实验。本实验遵守实验动物福利与伦理原则, 经解放军海军第九七一医院伦理委员会批准, 编号为401LL-2017010。

2 方法与结果

2.1 细胞培养

将Huh-7细胞置于含有10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素双抗溶液的DMEM培养基中, 于37℃、5% CO₂饱和湿度培养箱中培养。2~3 d传代, 取对数生长期细胞进行试验。

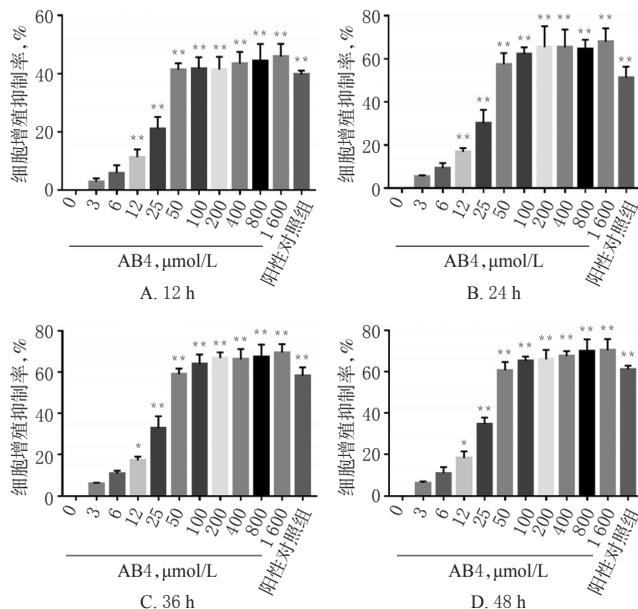
2.2 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素和双因素方差分析, 组间两两比较采用Dunnett's *t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2.3 MTT试验检测细胞增殖抑制率

收集对数生长期的Huh-7细胞, 用0.25%的胰酶消化, 调整细胞悬液的浓度至 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, 以每孔5 000个/200 μL 的接种量接种于96孔板, 放回培养箱中继续培养, 待细胞贴壁融合至70%~80%, 加入磷酸盐缓冲液(PBS)配制的AB4(终浓度分别为0、3、6、12、25、50、100、200、400、800、1 600 $\mu\text{mol/L}$), 同时设置空白对照组(无细胞)、阳性对照组(50 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU), 每组3个复

孔。药物与细胞作用12、24、36、48 h后, 每孔加入5 mg/mL的MTT溶液10 μL , 继续孵育4 h, 加入100 μL Formazan溶解液, 混匀后孵育4 h, 光学显微镜下观察紫色结晶全部溶解, 用酶标仪在570 nm波长处测定吸光度(*A*), 试验重复3次, 计算细胞增殖抑制率[细胞增殖抑制率(%) = $(1 - A_{\text{给药组}}/A_{\text{阴性对照组}}) \times 100\%$]和半数抑制浓度(IC₅₀)。不同浓度AB4对Huh-7细胞增殖抑制率的影响见图1, AB4作用不同时间对Huh-7细胞增殖抑制率的影响见图2。



注: 与AB4 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. AB4 0 $\mu\text{mol/L}$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图1 不同浓度AB4对Huh-7细胞增殖抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 1 Effects of different concentrations of AB4 on inhibition rate of Huh-7 cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

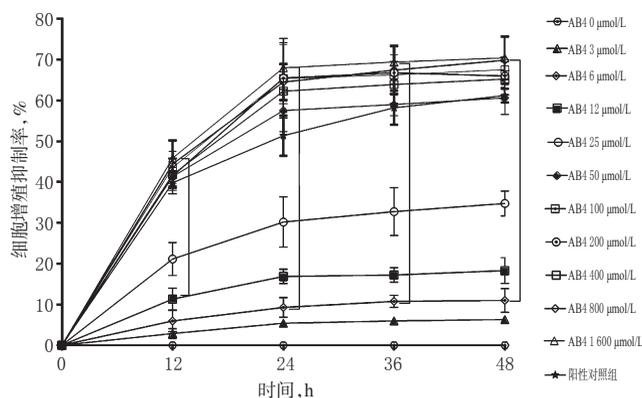


图2 AB4作用不同时间对Huh-7细胞增殖抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 2 Effects of AB4 on inhibition rate of Huh-7 cell proliferation after treated for different time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

由图1可知,与AB4 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较,AB4 6~1 600 $\mu\text{mol/L}$ 作用12、24、36、48 h对Huh-7细胞增殖均有抑制作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其增殖抑制率均随AB4给药浓度的增加而增加,6~50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度间增加幅度较大,50~1 600 $\mu\text{mol/L}$ 浓度间细胞抑制率增加幅度减小。其中50 $\mu\text{mol/L}$ AB4的细胞增殖抑制率与阳性对照组最接近。因此后续试验中AB4的给药浓度均定为50 $\mu\text{mol/L}$ 。

由图2可知,AB4对Huh-7细胞的增殖抑制率随作用时间的延长而增加,作用24 h后增殖抑制率的增加幅度减缓,因此后续试验作用时间定为24 h。根据以上结果,计算50 $\mu\text{mol/L}$ AB4作用24 h对Huh-7细胞的 IC_{50} 为(56.76 ± 1.756) $\mu\text{mol/L}$ 。

2.4 克隆形成试验评估AB4的长期抑制效果

将Huh-7细胞以 2.5×10^6 个/孔的密度接种在6孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育24 h,加入50 $\mu\text{mol/L}$ 的AB4(AB4组),同时设置阴性对照组(等体积培养液)、阳性对照组(50 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU),作用24 h后,台盼蓝染色计数,以每孔1 000个细胞重新铺板到6孔板中,孵育14 d,用冷PBS洗涤2次,4%多聚甲醛固定20 min,0.1%结晶紫染色20 min后流水清洗染色液,放置空气中干燥,肉眼计数。结果显示,与阴性对照组比较,AB4组和阳性对照组均能够显著抑制Huh-7细胞的克隆形成,AB4的抑制效果与5-FU无明显差异。各组细胞的克隆形成图见图3。

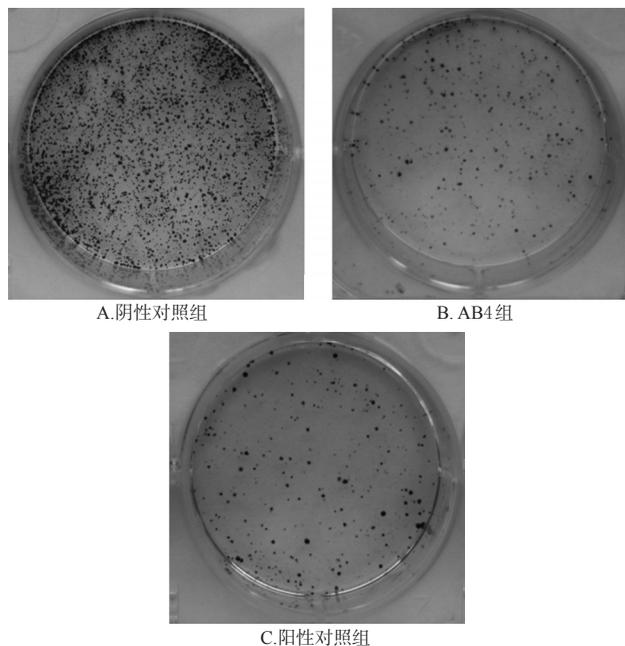


图3 各组细胞的克隆形成图

Fig 3 Colony formation of cells in each group

2.5 Annexin V-FITC/PI染色评估细胞凋亡率

收集对数生长期的Huh-7细胞,以 2.5×10^5 个/孔接种到24孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育过夜后,加入50 $\mu\text{mol/L}$ 的AB4(AB4组),同时设置阴性对照组(等体积培养液)、阳性对照组(50 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU),作用24 h后,

PBS清洗2次,以 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 重悬至结合缓冲液(Binding buffer),加入Annexin V-FITC和PI混匀,室温避光孵育10~30 min,随后置于冰浴中,上流式细胞仪检测,试验重复3次,计算细胞凋亡率(凋亡细胞数/细胞总数 $\times 100\%$)。结果显示,阴性对照组、AB4组、阳性对照组的细胞凋亡率分别为2.99%、68.63%、64.94%。与阴性对照组比较,AB4组和阳性对照组的细胞凋亡率明显增加($P < 0.01$),AB4组与阳性对照组的细胞凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$)。这表明AB4可显著提高Huh-7细胞凋亡率。各组细胞凋亡的分布图见图4。

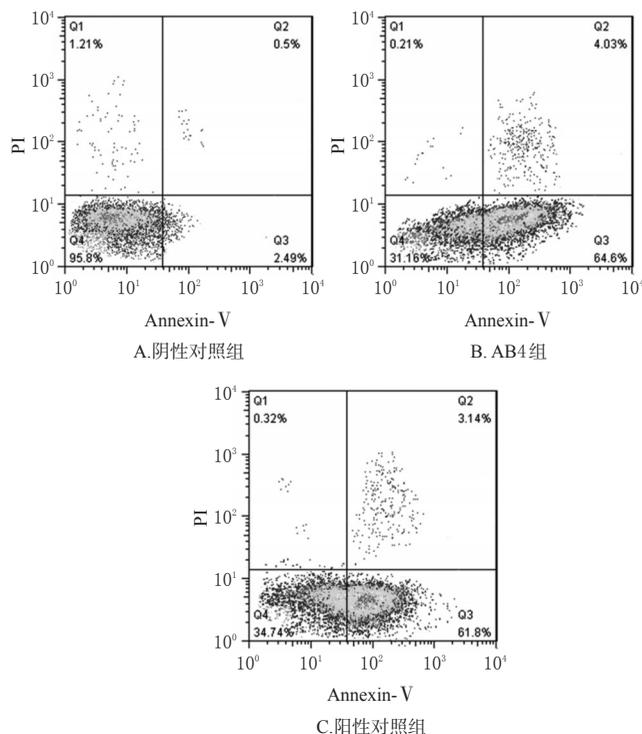


图4 各组细胞凋亡的分布图

Fig 4 Distribution of cell apoptosis in each group

2.6 Western blot法检测Bcl-2、Bax、Caspase-3、Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP蛋白表达水平

将Huh-7细胞接种于6孔板中,继续培养至细胞贴壁融合至70%~80%,加入50 $\mu\text{mol/L}$ 的AB4(AB4组),同时设置阴性对照组(等体积培养液)、阳性对照组(50 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU),作用24 h,用细胞裂解液裂解各组细胞获得细胞总蛋白,BCA试剂盒测定总蛋白含量,100 $^{\circ}\text{C}$ 下5 min蛋白变性后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,湿转至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,加入凋亡相关蛋白Bcl-2兔单克隆抗体、Bax兔多克隆抗体、Caspase-3兔多克隆抗体、Cleaved PARP兔多克隆抗体、 β -actin兔单克隆抗体(稀释比例均为1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。隔日加入HRP标记山羊抗兔IgG(稀释比例为1:1 000),室温孵育1 h,将增强型化学发光(ECL)显色剂覆盖于膜的蛋白面,于化学发光凝胶成像仪中显影拍照,用Image J对蛋白条带进行分析,

以目标蛋白灰度值与 β -actin蛋白灰度值的比值评价目标蛋白的表达量,将阴性对照组各蛋白相对表达量设为“1”,评价其他组各蛋白的相对表达量,试验重复3次。各组细胞凋亡相关蛋白的电泳图见图5,测定结果见图6。

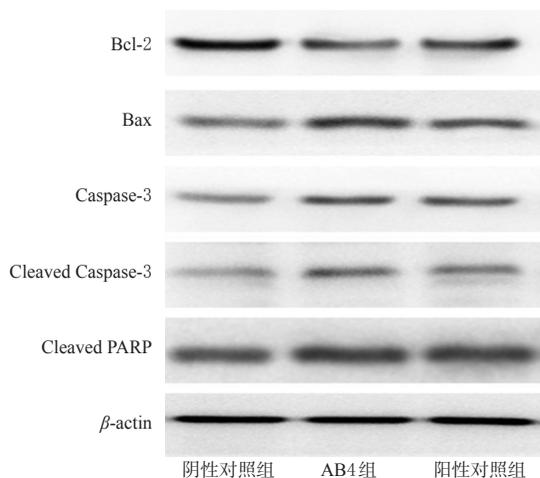
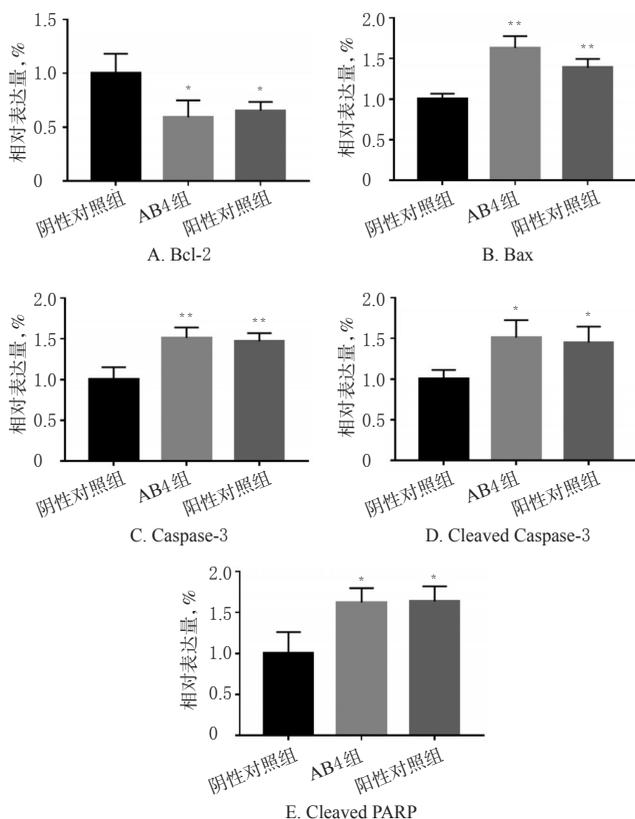


图5 各组细胞凋亡相关蛋白的电泳图

Fig 5 Electropherogram of apoptotic associated proteins in each group



注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. negative control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图6 各组细胞凋亡相关蛋白的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

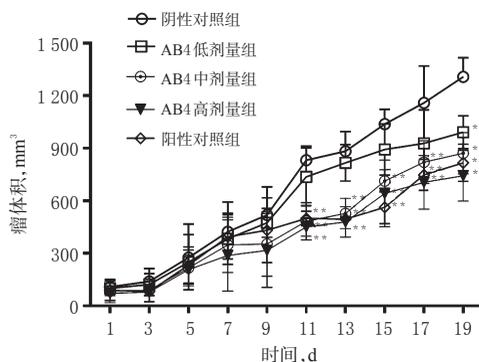
Fig 6 Determination of apoptotic associated proteins in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

由图6可知,与阴性对照组比较,AB4组和阳性对照

组细胞中 Bcl-2 蛋白相对表达量明显降低($P < 0.05$), Bax、Caspase-3、Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP 蛋白相对表达量均明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且 AB4 组与阳性对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。由此表明,AB4 抑制肝癌细胞增殖的作用可能与细胞凋亡有关。

2.7 荷瘤裸鼠的抑瘤作用检测

收集对数生长期的 Huh-7 细胞,1 000 r/min 离心 5 min 后重悬于 PBS 中,与 Matrigel 胶等体积混合,调整细胞浓度为 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$,皮下注射于裸鼠右侧腋下部位,接种量为 0.2 mL,5 d 后,裸鼠右上肢腋下观察有黄豆大小肿瘤生成(体积约为 $20 \sim 40 \text{ mm}^3$),即为造模成功。随后,用游标卡尺测量肿瘤长径与短径,计算瘤体积 = (长 \times 宽 2)/2。待裸鼠瘤体积长至 $100 \sim 150 \text{ mm}^3$,将荷瘤裸鼠随机分为阴性对照组(生理盐水)、阳性对照组(50 mg/kg 5-FU)和 AB4 低、中、高剂量组(25、50、100 mg/kg),每组 3 只,按预实验结果设置给药剂量,每日腹腔注射相应药物 1 次,给药体积均为 10 mL/kg,连续给药 19 d。从第 1 次腹腔注射药物开始,每隔 1 d 测量 1 次肿瘤的长径与短径,并计算瘤体积。末次给药后处死裸鼠,剥离肿瘤,称体质量,计算抑瘤率,同时将肿瘤组织放入 10% 甲醛中固定待用。抑瘤率(%) = (1 - 给药组瘤质量/阴性对照组瘤质量) $\times 100\%$ 。结果显示,注射药物 19 d 后,荷瘤裸鼠无中毒症状,体质量无明显差异($P > 0.05$)。与阴性对照组比较,AB4 低、中、高剂量组和阳性对照组荷瘤裸鼠瘤体积明显减小($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),第 19 天的瘤体积分别减小了 24.18%、33.31%、43.20%、37.57%;抑瘤率分别为 25.93%、39.15%、46.26%、42.83%。不同给药时间后各组荷瘤裸鼠瘤体积的变化曲线见图 7。



注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. negative control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图7 不同给药时间后各组荷瘤裸鼠瘤体积的变化曲线($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 7 Growth curve of tumor volume in tumor-bearing nude mice of each group after different administration time($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.8 肿瘤组织病理学检查

将固定在 10% 甲醛中的肿瘤组织进行脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、贴片等步骤后,进行 HE 染色并封片,

光镜下观察肿瘤组织结构的改变。病理切片显示,阴性对照组细胞核大小较均一,无明显的形态学改变;AB4低、中、高剂量组和阳性对照组肿瘤组织细胞轮廓模糊,细胞边界不清晰,形状不规则,大小不一,出现核固缩、核质不清晰、核碎裂等现象,上述现象随AB4剂量的增加越明显。各组荷瘤裸鼠肿瘤细胞的形态图见图8。

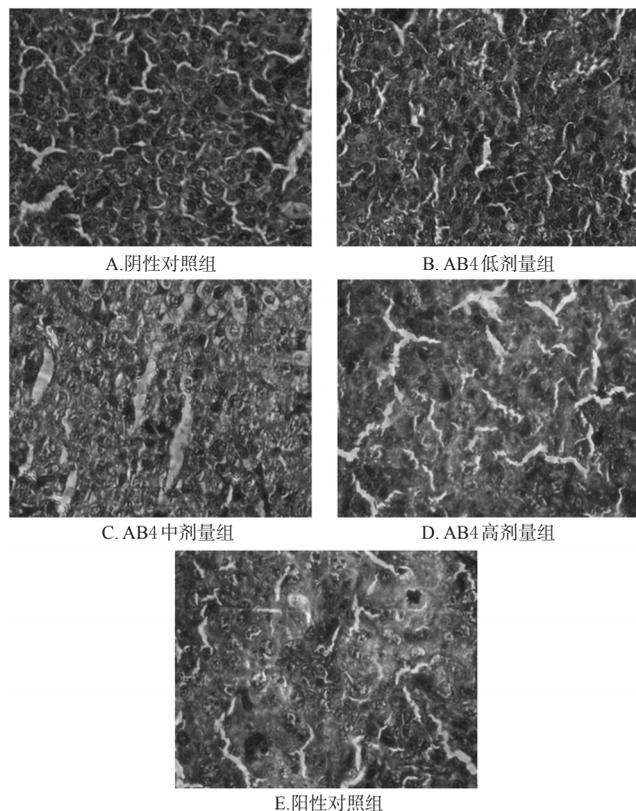


图8 各组荷瘤裸鼠肿瘤细胞的形态图(HE,×200)

Fig 8 Morphology of tumor cell in tumor-bearing nude mice of each group(HE,×200)

3 讨论

原发性肝癌包括HCC、肝内胆管细胞癌(Intrahepatic cholangi-Ocarcinoma, ICC)和混合性肝细胞胆管癌(Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma, CHC)^[8],其中最常见的是HCC。当前对肝癌的治疗方法主要有手术治疗^[9]、放射治疗^[10]、化学^[11]及生物治疗^[12]等,尽管我国一直致力于对肝癌的研究,并在肝癌的检测和治疗方面取得进展,但由于肝癌发病机制复杂、早期诊断困难、治疗水平限制及肿瘤进展迅速且易转移等,导致患者复发率高、预后较差^[13]。关于肝癌的药物治疗现况,目前主要是化疗药物与小分子靶向药物及之间的联合用药。化疗药物毒性大、特异性差,在杀死癌细胞时,往往正常细胞也会“受灾”;小分子靶向药物特异性强、毒性小,但是仍存在耐药问题。这主要是因为细胞信号通路非常复杂,抑制一种信号通路,很可能会使其他信号通路产生代偿性改变。

Bax和Bcl-2是参与Caspase依赖性细胞凋亡过程中

的相关蛋白,Bax作为促凋亡蛋白,Bcl-2作为抑凋亡蛋白,共同调节细胞凋亡过程^[14-15]。Bax可单独形成同源二聚体,促进细胞发生凋亡;也可以与Bcl-2一起形成异同源二聚体,抑制细胞发生凋亡,同源二聚体的稳定性小于异同源二聚体^[16]。研究发现,Bcl-2和Bax的比例关系对于细胞凋亡至关重要^[17],降低抗凋亡蛋白Bcl-2蛋白水平的表达,增强促凋亡蛋白Bax蛋白水平的表达,从而使Bax/Bcl-2比例升高,可促使细胞发生凋亡。另外,Caspase家族是细胞凋亡过程中重要的半胱氨酸蛋白酶,其中Caspase-3蛋白酶是凋亡级联反应中的主要角色。Bcl-2是通过抑制细胞色素C释放^[18],从而抑制Caspase家族相关蛋白酶激活,阻止细胞凋亡发生;相反,作为线粒体膜的离子通道成分的Bax能促使细胞色素C释放入线粒体,激活Caspase家族,活化Caspase-3,裂解PARP^[19],使其失去生物活性,损伤核内DNA,引发细胞凋亡发生^[17]。本研究初步发现,AB4可能通过下调Bcl-2,上调Bax,增大Bax/Bcl-2比例,激活Caspase家族,活化Caspase-3,作用于PARP,进而促使肝癌细胞发生凋亡,从而发挥抗肿瘤作用,其诱导凋亡的具体关系机制则需进一步研究。

本试验结果发现,AB4作为白头翁皂苷的主要活性成分,具有抗肝癌活性。先前研究表明,从*P. chinensis* saponins中提取的其他活性化合物也具有抗肿瘤活性,如白头翁皂苷A(PSA)、白头翁皂苷D(PSD)及23-羟基白桦酸(23-HBA)。PSA通过诱导DNA损伤,调节p53、细胞周期蛋白B(Cyclin B)和Bcl-2蛋白表达诱导细胞发生凋亡^[20]。PSD的分离物SB365能通过抑制Akt、mTOR和p70S6K的磷酸化,调节PI3K/Akt/mTOR通路抑制细胞生长和血管生成^[21],该通路在细胞凋亡方面占据重要地位^[22]。23-HBA的衍生物B4G2则能增强活性氧介导的细胞内钙积累,刺激线粒体Ca²⁺渗透性转换孔开放,导致线粒体形态改变,引发线粒体依赖的细胞凋亡,抑制肝癌细胞增殖^[23]。因此,可尝试采用AB4联合白头翁皂苷其他活性成分,通过作用不同的通路共同诱导肝癌细胞发生凋亡,产生协同作用。另外,白头翁皂苷提取的活性产物还能与化疗药物联合用药。研究表明,SB365能协同化疗药物增强对宫颈癌细胞HeLa的敏感性,增强其抗癌活性^[24];23-HBA与阿霉素有协同抗癌作用^[25],若将AB4与化疗药物联用,也会为化疗药物联合用药多提供了一种选择。这表明AB4未来可能是一种很有价值的抗癌药。

当前,来源于植物的天然产物已在临床上有广泛的应用,是目前的研究热点,特别是应用于临床无法治愈的恶性肿瘤,因此,AB4具有良好的开发应用前景。本研究率先证明AB4能够抑制肝癌细胞Huh-7的增殖,抑制肝癌裸鼠异种移植模型肿瘤的生长,并初步探索了其诱导凋亡的机制,这为AB4将来在临床上可能作为一种

小分子靶向药物的辅助治疗药物提供了依据。下一步实验可补充AB4对肝癌的药效学及机制研究,全面进行AB4的药物代谢、生物毒性、稳定剂型的研究,以期研发一种治疗效果好、副作用小、质量稳定的中药新制剂。

参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6):394-424.
- [2] RAWLA P, SUNKARA T, MURALIDHARAN P, et al. Update in global trends and aetiology of hepatocellular carcinoma[J]. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2018, 22(3):141-150.
- [3] BRUIX J, RAOUL JL, SHERMAN M, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: subanalyses of a phase III trial[J]. *J Hepatol*, 2012, 57(4):821-829.
- [4] BAHMAN AA, ABAZA MSI, KHOUSHIASH SI, et al. Sequence-dependent effect of sorafenib in combination with natural phenolic compounds on hepatic cancer cells and the possible mechanism of action[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(3):1695-1715.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社, 2015:104.
- [6] LI W, SUN YN, YAN XT, et al. Isolation of nematocidal triterpenoid saponins from *Pulsatilla koreana* root and their activities against *Meloidogyne incognita*[J]. *Molecules*, 2013, 18(5):5306-5316.
- [7] YAO D, LI H, GOU Y, et al. Betulinic acid-mediated inhibitory effect on hepatitis B virus by suppression of manganese superoxide dismutase expression[J]. *Febs J*, 2009, 276(9):2599-2614.
- [8] SIA D, VILLANUEVA A, FRIEDMAN SL, et al. Liver cancer cell of origin, molecular class, and effects on patient prognosis[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(4):745-761.
- [9] LIU X, ZHOU J, ZHOU N, et al. SYNJ2BP inhibits tumor growth and metastasis by activating DLL4 pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016. DOI:10.1186/s13046-016-0385-0.
- [10] CUI J, GONG Z, SHEN HM. The role of autophagy in liver cancer: molecular mechanisms and potential therapeutic targets[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1836(1):15-26.
- [11] KHAN M, LI T, AHMAD KHAN MK, et al. Alantolactone induces apoptosis in HepG2 cells through GSH depletion, inhibition of STAT3 activation, and mitochondrial dysfunction[J]. *Biomed Res Int*, 2013. DOI: 10.1155/2013/719858.
- [12] ALLAIRE M, NAULT JC. Advances in management of hepatocellular carcinoma[J]. *Curr Opin Oncol*, 2017, 29(4):288-295.
- [13] ZHU JN, JIANG L, JIANG JH, et al. Hepatocyte nuclear factor-1beta enhances the stemness of hepatocellular carcinoma cells through activation of the notch pathway[J]. *Sci Rep*, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-04116-7.
- [14] 郝轩轩, 王新陆, 崔琳, 等. 加参方浸膏对H₂O₂诱导的H9c2心肌细胞凋亡的干预作用研究[J]. *中国药房*, 2018, 29(14):1898-1903.
- [15] MUKHOPADHYAY S, PANDA PK, SINHA N, et al. Autophagy and apoptosis: where do they meet?[J]. *Apoptosis*, 2014, 19(4):555-566.
- [16] POULIQUEN D, BELLOT G, GUIHARD G, et al. Mitochondrial membrane permeabilization produced by PTP, Bax and apoptosis: a ¹H-NMR relaxation study[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(2):301-310.
- [17] WANG Y, WANG H, GE H, et al. AG-1031 induced autophagic cell death and apoptosis in C6 glioma cells associated with notch-1 signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(7):5893-5903.
- [18] KIRAZ Y, ADAN A, KARTAL YM, et al. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(7):8471-8486.
- [19] 王晓霞, 刘天龙, 刘晶, 等. 黄芪甲苷对D-半乳糖诱导原代培养心肌细胞凋亡的保护作用及机制研究[J]. *中国药房*, 2018, 29(9):1189-1193.
- [20] LIU Q, CHEN W, JIAO Y, et al. Pulsatilla saponin A, an active molecule from *Pulsatilla chinensis*, induces cancer cell death and inhibits tumor growth in mouse xenograft models[J]. *J Surg Res*, 2014, 188(2):387-395.
- [21] HONG SW, JUNG KH, LEE HS, et al. SB365 inhibits angiogenesis and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma through modulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(11):1929-1937.
- [22] 田龙夫, 张琦, 王波涛, 等. 血根碱通过调控PI3K/Akt信号通路诱导胰腺癌细胞凋亡的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(19):166-171.
- [23] YAO N, LI YJ, ZHANG DM, et al. B4G2 induces mitochondrial apoptosis by the ROS-mediated opening of Ca²⁺-dependent permeability transition pores[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(3):838-852.
- [24] ZHANG Y, BAO J, WANG K, et al. Pulsatilla saponin D inhibits autophagic flux and synergistically enhances the anticancer activity of chemotherapeutic agents against HeLa cells[J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(8):1657-1670.
- [25] ZHENG Y, ZHOU F, WU X, et al. 23-Hydroxybetulinic acid from *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel synergizes the antitumor activities of doxorubicin in vitro and in vivo [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(3):615-622.

(收稿日期:2018-10-11 修回日期:2019-01-11)

(编辑:邹丽娟)