

马钱苷对肝癌细胞 HepG2 增殖与凋亡的影响及机制研究[△]

张聪^{1*}, 胡娜¹, 李珊², 郑国华³, 邱振鹏^{1#}(1.湖北中医药大学药学院, 武汉 430065; 2.湖北医药学院基础医学院, 湖北十堰 442000; 3.湖北中医药大学中药资源与中药复方教育部重点实验室, 武汉 430065)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)07-0782-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.07.04

摘要 目的:研究马钱苷对肝癌细胞 HepG2 增殖及凋亡的影响,并探讨其作用机制。方法:运用 CCK-8 法检测不同质量浓度(10、25、50、100、150、200、300、400 μg/mL)的马钱苷作用 24、48 h 对 HepG2 细胞增殖活性的影响。将 HepG2 细胞分为对照组和马钱苷低、中、高浓度组(50、100、150 μg/mL),加药作用 24 h 后,采用 Hoechst 33342 荧光染色法检测细胞凋亡形态学变化;采用流式细胞术检测细胞凋亡和周期分布情况;采用 Western blotting 法检测各组细胞中 G₁/S-特异性周期蛋白 D1(Cyclin D1)、增殖细胞核抗原(PCNA)、B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2)、胱天蛋白酶 3(Caspase-3)、活化的 Caspase-3(Cleaved-Caspase-3)、Caspase-9、Cleaved-Caspase-9 蛋白的表达水平。结果:马钱苷对 HepG2 细胞增殖具有抑制作用,且呈浓度依赖趋势。与对照组比较,马钱苷低、中、高浓度组细胞出现核固缩、碎裂等凋亡现象,细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$);细胞主要阻滞于 S 期;马钱苷低、中、高浓度组细胞中 Cyclin D1、PCNA、Caspase-3 蛋白的相对表达量均显著降低、Cleaved-Caspase-3 蛋白的相对表达量均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),马钱苷中、高浓度组细胞中 Cleaved-Caspase-9 蛋白的相对表达量均显著升高、Bcl-2 和 Caspase-9 蛋白的相对表达量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:马钱苷对 HepG2 细胞的增殖具有明显的抑制作用,并可诱导其凋亡,其作用机制可能与抑制 Bcl-2 蛋白表达,促进 Caspase-3、Caspase-9 活化有关。

关键词 马钱苷;肝癌细胞 HepG2;增殖;凋亡;机制

Study on the Effects of Logenin on the Proliferation and Apoptosis of Liver Cancer HepG2 Cells and Its Mechanism

ZHANG Cong¹, HU Na¹, LI Shan², ZHENG Guohua³, QIU Zhenpeng¹(1.College of Pharmacy, Hubei University of TCM, Wuhan 430065, China; 2.College of Basic Medicine, Hubei University of Medicine, Hubei Shiyan 442000, China; 3.Key Laboratory of Chinese Medicine Resource and Compound Prescription, Ministry of Education, Hubei University of TCM, Wuhan 430065, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of logenin on the proliferation and apoptosis of liver cancer HepG2 cells, and to explore its mechanism. METHODS: CCK-8 assay was used to detect the effects of different concentrations (10, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400 μg/mL) of logenin on the proliferation activity of HepG2 cells for 24 and 48 h. HepG2 cells were divided into control group, logenin low-concentration, medium-concentration and high-concentration groups (50, 100, 150 μg/mL). After treated for 24 h, morphological changes of apoptosis of cells were detected by Hoechst 33342 fluorescence staining. The apoptosis and cycle distribution of cells were detected by flow cytometry. Western blotting was used to detect protein expression of Cyclin D1, PCNA, Bcl-2, Caspase-3, Cleaved-Caspase-3, Caspase-9 and Cleaved-Caspase-9. RESULTS: Logenin inhibited the proliferation of HepG2 cells, in concentration-dependent trend. Compared with control group, apoptosis as pyknosis and fragmentation occurred, and the apoptosis rate increased significantly in logenin low-concentration, medium-concentration and high-concentration groups ($P < 0.01$); the cell were mainly blocked in S phase; relative protein expression of Cyclin D1, PCNA and Caspase-3 were significantly decreased, while that of Cleaved-Caspase-3 were significantly increased in logenin low-concentration, medium-concentration and high-concentration groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); relative protein expression of Cleaved-Caspase-9 were increased significantly, while that of Bcl-2 and Caspase-9 were decreased significantly in logenin medium-concentration and high-concentration groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: Logenin can significantly inhibit the proliferation and induce apoptosis of HepG2 cells, the mechanism of which may be associated with inhibiting Bcl-2 protein expression and promoting Caspase-3, Caspase-9 activation.

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81603338);武当特色中药研究湖北省重点实验室开放课题(No.WDCM2018006)

* 硕士研究生。研究方向:中药新制剂、新剂型。E-mail: zzyyc520@126.com

通信作者:副教授,硕士生导师。研究方向:天然药物药理学与毒理学。E-mail: wuhuqq@hotmail.com

KEYWORDS Logenin; Liver cancer HepG2 cells; Proliferation; Apoptosis; Mechanism

肝癌是临床上常见的肝脏恶性肿瘤,其发病率居世界肿瘤发病率第 5 位^[1],病死率仅次于肺癌,位居世界恶性肿瘤病死率的第 2 位^[2-3]。流行病学研究报告显示,

2018年世界癌症新增病例中,肝癌患者的占比高达8.2%^[4];我国肝癌发病率居世界首位^[5],每年新增肝癌患者人数占全球新增肝癌患者人数的50%以上^[6],现已成为严重威胁国民生命健康的重大问题。肝癌具有恶性程度高、易转移、易复发等特点^[7],临床治疗难度大。目前,临床上肝癌主要以药物治疗为主,但是索拉菲尼等肝癌一线治疗药物长期使用易使患者产生耐受和多种不良反应(如高血压、肝功能异常、肾毒性等)^[8-9],严重影响药物的疗效及患者的预后。因此,探寻有效防治肝癌的药物是一个亟待解决的问题。

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.)的干燥成熟果实,是被湖北省非物质文化遗产“武当山道教医药”代表性传承人陈吉炎教授建议优先发展的道地药材之一^[10]。该药材主要含有环烯醚萜苷、鞣质、有机酸等化学成分^[11-12]。其中,马钱苷(Loganin)是山茱萸中主要的环烯醚萜苷类成分^[13],同时也是山茱萸质量控制指标之一,其具有抗氧化、抗炎、调节免疫等多种药理学作用^[14-15]。现代药理学研究表明,山茱萸具有降血糖、调节免疫、抗炎、抗氧化等作用,对肝癌、肺癌、胃癌等多种恶性肿瘤也具有抑制作用^[16-17]。马钱苷作为山茱萸中主要的活性成分,对结肠癌细胞、人恶性黑色素瘤细胞均具有抑制作用^[18-19],提示该化合物具有开发成抗肿瘤药物的潜力。已有研究表明,山茱萸提取物能够抑制B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)的表达,同时活化胱天蛋白酶3(Caspase-3)从而诱导人肝癌细胞HepG2细胞凋亡^[20-21]。为了进一步证明马钱苷是否同样也具有诱导肝癌细胞凋亡的作用,本研究以肝癌细胞HepG2为模型,考察不同浓度马钱苷对HepG2细胞增殖及凋亡的影响,并初步探讨其可能的作用机制,以期马钱苷防治肝癌提供理论研究基础。

1 材料

1.1 仪器

MCO-15AC型CO₂细胞培养箱(日本Sanyo公司);Trans-Blot® Turbo™型全能型蛋白转膜仪、Power Pac Basic型电泳仪、xMark型酶标仪、TC20型细胞计数仪(美国Bio-Rad公司);Allegra 64R型高速冷冻离心机(美国Beckman公司);NoVoCyte D2060R型流式细胞仪(艾森生物科技有限公司);CKX31型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);XB 220A型分析天平(瑞士Sartorius公司);G: BOX型成像分析系统(英国Syngene公司);MK-10型干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

马钱苷对照品(上海诗丹德标准技术服务有限公司,批号:4917,纯度:>98%);胎牛血清(美国Gibco公司);CCK-8试剂盒(日本Dojindo公司,批号:CK04);兔G₁/S-特异性周期蛋白D1(Cyclin D1)单克隆抗体、小鼠增殖细胞核抗原(PCNA)单克隆抗体、小鼠Bcl-2单克隆

抗体、兔Caspase-3单克隆抗体、兔活化的胱天蛋白酶3(Cleaved-Caspase-3)单克隆抗体、兔Caspase-9单克隆抗体、兔Cleaved-Caspase-9单克隆抗体、兔β肌动蛋白(β-actin)单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗、HRP标记羊抗小鼠IgG二抗(美国CST公司,批号:2978、2586、15071、9665、9664、9508、7237、4970、7074、7076);Hoechst 33342荧光染料(北京索莱宝科技有限公司,批号:B8040);磷脂酰丝氨酸蛋白抗体-荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号:KGA107、KGA512);BCA蛋白定量试剂盒、ECL超敏化学发光液、M-PERTM哺乳动物蛋白抽提试剂(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号:23227、34580、78501);十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶试剂盒(上海雅酶生物科技有限公司,批号:18D250);DMEM培养基、磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.2~7.4)、胰蛋白酶、青霉素、链霉素均购自美国Hyclone公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为超纯水。

1.3 细胞

HepG2细胞株购自中国科学院生物化学与细胞生物研究所。

2 方法

2.1 细胞培养

取HepG2细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基(以下简称“培养基”),于37℃、5%CO₂培养箱中培养(以下细胞培养条件相同)。

2.2 马钱苷对照品母液配制

精密称取马钱苷对照品20.0 mg,溶于1 mL培养基中,配成质量浓度为2×10⁴ μg/mL的马钱苷对照品母液,经0.22 μm微孔滤膜滤过,置于-20℃保存,备用。

2.3 马钱苷的细胞毒性考察

采用CCK-8法检测。取对数生长期HepG2细胞,按5 000个/孔接种于96孔板中,将细胞随机分为对照组和马钱苷不同浓度组,每组设6个复孔。马钱苷各浓度组细胞分别加入马钱苷终质量浓度分别为10、25、50、100、150、200、300、400 μg/mL(浓度设置参考胡小红等^[22]研究方法)的含药培养基100 μL,对照组细胞加入等体积培养基,另设不含细胞只含培养基的空白组。分别于培养24、48 h时,各孔加入CCK-8试剂10 μL,继续培养2 h,随后使用酶标仪于450 nm波长处测定各孔的吸光度(A),计算细胞存活率:细胞存活率(%)=(A_{给药组}-A_{空白组})/(A_{对照组}-A_{空白组})×100%。上述试验重复3次。

2.4 马钱苷对细胞凋亡的影响考察

采用Hoechst 33342荧光染色法检测细胞凋亡形态变化。取对数生长期的HepG2细胞,按1×10⁶个/孔接

种至6孔板中,将细胞随机分为对照组和马钱苷低、中、高浓度组,每组设3个复孔。细胞培养至单层细胞密度约90%左右时,弃去培养基,马钱苷低、中、高浓度组细胞分别加入马钱苷终质量浓度分别为50、100、150 $\mu\text{g/mL}$ 的含药培养基5 mL,对照组细胞加入等体积培养基,培养24 h。收集细胞,经Hoechst 33342荧光染料避光染色10 min后,用PBS清洗5 min \times 3次,使用荧光显微镜观察各组细胞的形态变化。采用流式细胞术检测细胞凋亡率。另取HepG2细胞同上述方法分组,给药、培养24 h后,收集细胞,用细胞凋亡检测试剂盒中的Binding buffer 500 μL 重悬,并加入Annexin V-FITC和PI染液各5 μL ,轻轻混匀,室温下避光孵育10~15 min,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率:细胞凋亡率=早期凋亡率+晚期凋亡率。上述试验重复3次。

2.5 马钱苷对细胞周期分布的影响考察

采用流式细胞术检测细胞周期分布。取对数生长期的HepG2细胞,按照“2.4”项下方法分组、给药,每组设3个复孔。培养24 h后,收集细胞,加入细胞周期试剂盒中的PI染液500 μL 重悬,并避光孵育30 min后,使用流式细胞仪检测细胞周期分布。上述试验重复3次。

2.6 马钱苷对细胞增殖和凋亡相关蛋白表达的影响考察

采用Western blotting法检测蛋白表达。取对数生长期的HepG2细胞,按 2×10^6 个/皿接种至细胞培养皿中,按“2.4”项下方法分组。细胞培养至单层细胞密度约90%时,弃去培养基,马钱苷低、中、高浓度组细胞加入含马钱苷终质量浓度分别为50、100、150 $\mu\text{g/mL}$ 的含药培养基10 mL,对照组细胞加入等体积培养基。培养24 h后,收集细胞,用M-PERTM哺乳动物蛋白抽提试剂提取细胞蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度。将提取的细胞蛋白置于干式恒温器中于95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 min后即得蛋白样品。取蛋白样品40 μg 经过SDS-PAGE分离后,转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜(0.45 μm)上,以5%脱脂牛奶封闭1 h后,分别加入兔Cyclin D1单克隆抗体、小鼠PCNA单克隆抗体、小鼠Bcl-2单克隆抗体、兔Caspase-3单克隆抗体、兔Cleaved-Caspase-3单克隆抗体、兔Caspase-9单克隆抗体、兔Cleaved-Caspase-9单克隆抗体、兔 β -actin单克隆抗体(稀释度均为1:1 000),于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;TBST清洗10 min \times 3次,再分别加入相应二抗(HRP标记羊抗兔IgG二抗对应Cyclin D1、Caspase-3、Cleaved-Caspase-3、Caspase-9、Cleaved-Caspase-9、 β -actin蛋白,HRP标记羊抗小鼠IgG二抗对应PCNA、Bcl-2蛋白,稀释度均为1:10 000),室温孵育1 h;用TBST清洗10 min \times 3次,经ECL试剂显色后采用成像分析系统成像,使用Image J 1.8.0图像软件处理,以目标蛋白与内参(β -actin)条带的灰度比值作为目标条带的相对表达量。上述试验重复3次。

2.7 统计学方法

采用GraphPad Prism 7.0软件进行统计分析。计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用*t*检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 马钱苷对细胞增殖的影响

与对照组比较,不同浓度马钱苷作用24、48 h后,细胞的存活率均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且呈浓度依赖趋势。当马钱苷质量浓度为50 $\mu\text{g/mL}$ 、作用24 h时的细胞存活率为(73.10 \pm 2.23)%,提示该条件下马钱苷具有明显的细胞毒性,故以50 $\mu\text{g/mL}$ 作为后续试验中马钱苷给药的最低浓度,依次选择100、150 $\mu\text{g/mL}$ 作为马钱苷给药的中浓度和高浓度,并选择24 h为作用时间。不同浓度马钱苷对HepG2细胞增殖的影响详见表1。

表1 不同浓度马钱苷对细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Tab 1 Effects of loganin at different concentrations on cell proliferation ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	细胞存活率, %	
	培养24 h	培养48 h
对照组	99.02 \pm 2.95	99.62 \pm 3.33
马钱苷10 $\mu\text{g/mL}$ 组	92.42 \pm 2.12*	85.42 \pm 4.27**
马钱苷25 $\mu\text{g/mL}$ 组	80.76 \pm 3.77**	79.76 \pm 2.75**
马钱苷50 $\mu\text{g/mL}$ 组	73.10 \pm 2.23**	68.10 \pm 4.07**
马钱苷100 $\mu\text{g/mL}$ 组	64.06 \pm 3.40**	60.06 \pm 3.95**
马钱苷150 $\mu\text{g/mL}$ 组	50.62 \pm 2.47**	45.62 \pm 2.49**
马钱苷200 $\mu\text{g/mL}$ 组	38.48 \pm 2.15**	35.48 \pm 2.31**
马钱苷300 $\mu\text{g/mL}$ 组	23.62 \pm 3.21**	22.62 \pm 2.70**
马钱苷400 $\mu\text{g/mL}$ 组	17.64 \pm 2.64**	8.64 \pm 2.43**

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

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

3.2 马钱苷对细胞凋亡的影响

Hoechst 33342染色结果显示,对照组细胞呈圆形或椭圆形,细胞核完整,边缘清晰,未见亮蓝色细胞核(核固缩)。经不同浓度马钱苷作用24 h后,各组细胞中细胞数均减少,且均出现不同程度的核固缩、碎裂等凋亡现象,其中高浓度组细胞此现象最显著。各组细胞凋亡形态学的显微镜图详见图1(图中箭头所指为凋亡细胞)。

与对照组比较,马钱苷低、中、高浓度组细胞的凋亡率均显著升高,且呈浓度依赖趋势($P<0.01$)。各组细胞凋亡的散点图详见图2,凋亡率详见表2。

3.3 马钱苷对细胞周期分布的影响

经不同浓度马钱苷作用24 h后,马钱苷低、中、高浓度组的S期细胞百分比均较对照组显著升高, G_2/M 期细胞百分比均较对照组显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);而 G_0/G_1 期细胞百分比与对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组细胞周期分布的流式细胞图详见图3,细胞周期分布百分比详见表2。

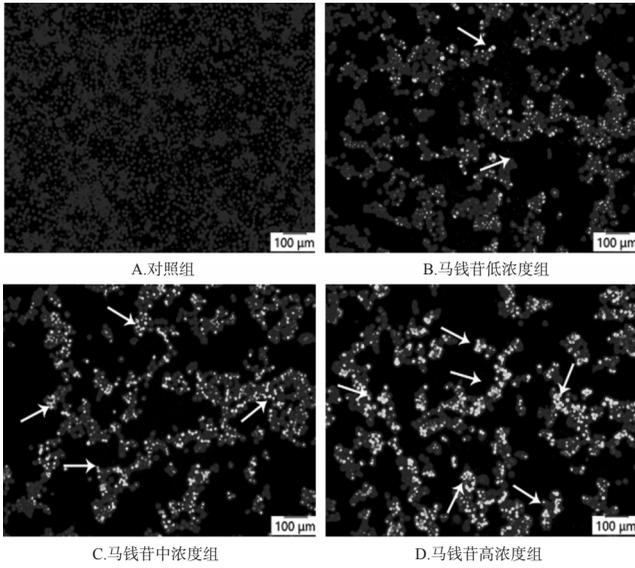


图1 各组细胞凋亡形态学的显微镜图(Hoechst 33342染色, ×100)

Fig 1 Micrographs of cell apoptosis morphology in each group (Hoechst 33342 staining, ×100)

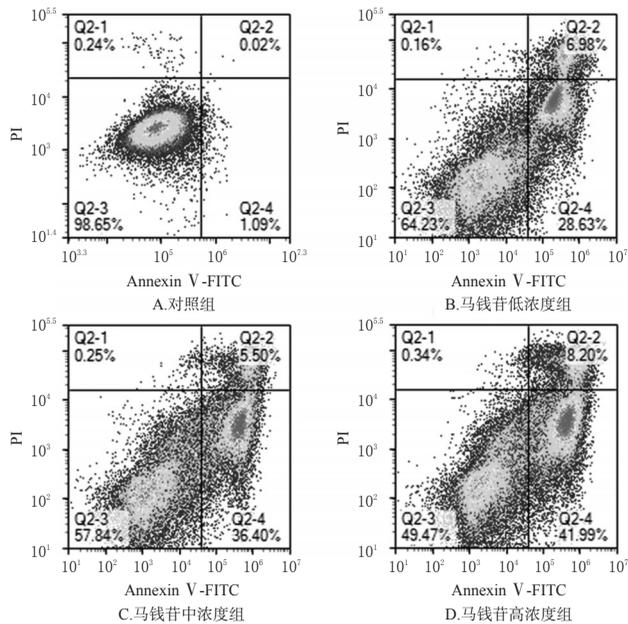


图2 各组细胞凋亡的散点图

Fig 2 Scatter plot of cell apoptosis in each group

表2 各组细胞凋亡率和周期分布百分比($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Apoptosis rate and cell cycle distribution percentage of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	凋亡率, %	周期分布, %		
		G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
对照组	1.08 ± 0.16	30.23 ± 0.79	17.97 ± 1.17	30.26 ± 1.36
马钱苷低浓度组	35.24 ± 3.55**	31.57 ± 0.51	26.55 ± 0.80**	25.67 ± 0.31*
马钱苷中浓度组	41.71 ± 3.10**	32.13 ± 0.35	31.23 ± 0.60**	18.61 ± 0.40**
马钱苷高浓度组	49.43 ± 2.81**	32.21 ± 0.48	34.59 ± 1.24**	17.54 ± 0.79**

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

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

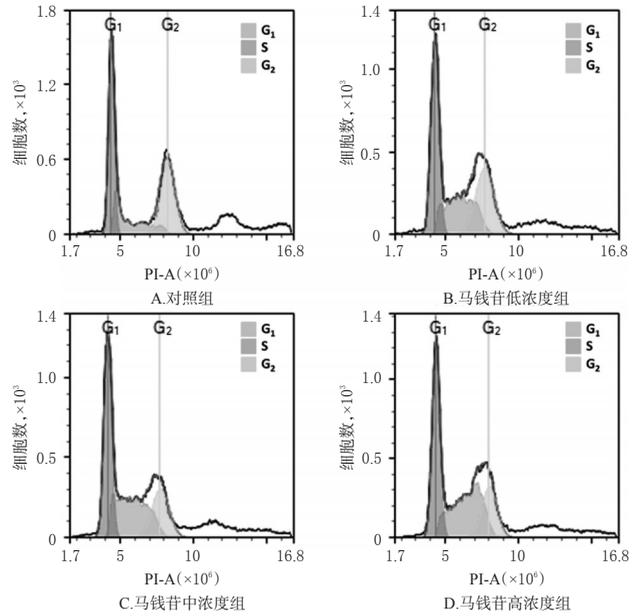


图3 各组细胞周期分布的流式细胞图

Fig 3 Flow cytometry of cell cycle distribution in each group

3.4 马钱苷对细胞中 Cyclin D1、PCNA 蛋白表达的影响

与对照组比较,马钱苷低、中、高浓度组细胞中 Cyclin D1、PCNA 蛋白的相对表达量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且呈浓度依赖趋势。各组细胞中 Cyclin D1、PCNA 蛋白表达的电泳图详见图4,相对表达量详见表3。

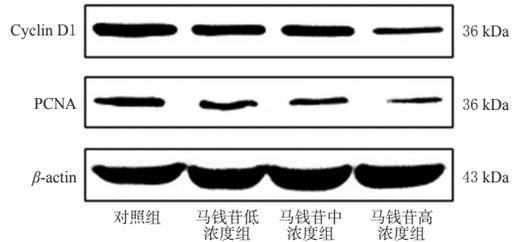


图4 各组细胞中 Cyclin D1、PCNA 蛋白表达的电泳图
Fig 4 Electrophoretogram of the protein expression of Cyclin D1 and PCNA in cells of each group

表3 各组细胞中 Cyclin D1、PCNA 蛋白的相对表达量($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Relative protein expression of Cyclin D1 and PCNA in cells of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Cyclin D1/β-actin	PCNA/β-actin
对照组	0.58 ± 0.03	0.31 ± 0.03
马钱苷低浓度组	0.40 ± 0.03**	0.20 ± 0.03*
马钱苷中浓度组	0.38 ± 0.31**	0.15 ± 0.02**
马钱苷高浓度组	0.18 ± 0.02**	0.09 ± 0.04**

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

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

3.5 马钱苷对细胞中凋亡相关蛋白表达的影响

与对照组比较,马钱苷低、中、高浓度组细胞中

Cleaved-Caspase-3 蛋白的相对表达量均显著升高、Caspase-3 蛋白的相对表达量均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；马钱苷中、高浓度组细胞中 Cleaved-Caspase-9 蛋白的相对表达量均显著升高、Bcl-2 和 Caspase-9 蛋白的相对表达量均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组细胞中凋亡相关蛋白表达电泳图详见图 5，相对表达量详见表 4。

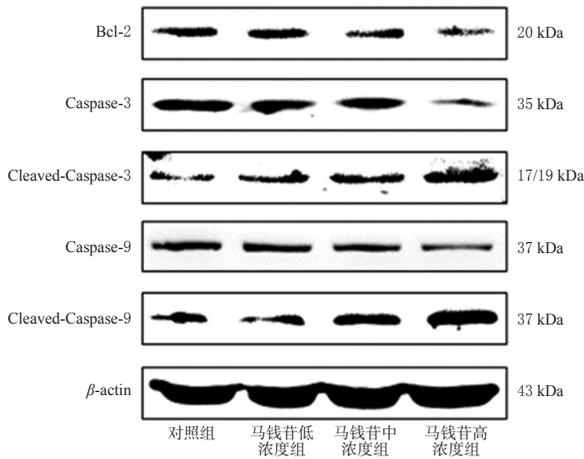


图 5 各组细胞中凋亡相关蛋白表达电泳图

Fig 5 Electrophoretogram of expression of proliferation-related proteins in cells of each group

表 4 各组细胞中凋亡相关蛋白的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 4 Relative expression of proliferation-related proteins in cells of each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	Bcl-2/ β -actin	Caspase-3/ β -actin	Cleaved-Caspase-3/ β -actin	Caspase-9/ β -actin	Cleaved-Caspase-9/ β -actin
对照组	0.23 \pm 0.02	0.40 \pm 0.03	0.12 \pm 0.02	0.30 \pm 0.03	0.16 \pm 0.05
马钱苷低浓度组	0.21 \pm 0.02	0.32 \pm 0.02*	0.21 \pm 0.02*	0.28 \pm 0.05	0.18 \pm 0.04
马钱苷中浓度组	0.15 \pm 0.01**	0.27 \pm 0.04*	0.24 \pm 0.04*	0.21 \pm 0.03*	0.27 \pm 0.02*
马钱苷高浓度组	0.08 \pm 0.02**	0.08 \pm 0.03**	0.31 \pm 0.04**	0.12 \pm 0.03**	0.38 \pm 0.04**

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

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

4 讨论

肝癌恶性程度高，但早期症状轻微，不易察觉，故临床上肝癌早期诊断率较低，即使在发达国家，肝癌早期诊断患者也仅占 30% 左右，大部分肝癌患者在确诊时已进入晚期，这造成肝癌临床治疗难度大，严重影响患者生存质量^[23-24]。虽然随着科学技术的进步，近年来我国肝癌发生率有所降低，但肝癌依然严重威胁人类生命健康。肿瘤细胞异常增殖和抗凋亡在肿瘤发生发展过程中发挥着重要作用，因此针对肿瘤细胞的异常增殖和凋亡失衡对其进行干预性调节成为了干预肿瘤发生发展的重要治疗策略。

有研究表明，马钱苷在体外对人恶性黑色素瘤、乳腺癌、结肠癌细胞的恶性增殖均具有一定抑制作用^[18-19,25]，但是关于马钱苷抑制肝癌细胞增殖并诱导凋亡的相关

研究较少。本研究结果表明，不同浓度马钱苷对 HepG2 细胞增殖均具有抑制作用，且其抑制作用随马钱苷浓度增加呈现增大的趋势。通过 Hoechst 33342 荧光染色法与流式细胞术分析发现，不同浓度的马钱苷均能显著诱导 HepG2 细胞凋亡，同时将细胞周期阻滞于 S 期。

Cyclin D1 是高度保守的细胞周期家族基因，能够调控细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDKs) 从而协调细胞增殖^[26]，其在细胞周期过程中主要调控细胞周期 G₁/S 期^[27]。有研究表明，Cyclin D1 在肝癌、乳腺癌、膀胱癌中呈过表达^[28-29]，从而改变细胞周期进程，促使肿瘤发生。PCNA 是反映细胞增殖状态的良好指标，能够促进肿瘤细胞的异常增殖^[30]。本研究结果表明，马钱苷能够通过抑制 Cyclin D1、PCNA 基因蛋白的表达水平将细胞阻滞于 S 期，从而抑制 HepG2 细胞增殖。

肿瘤的发生、发展是一个复杂过程，在肿瘤形成过程中激活抗凋亡信号通路和/或抑制促凋亡信号能够促进细胞恶性转化，加速肿瘤形成^[31]。目前研究得较为深入的与肿瘤发生发展密切相关的凋亡相关基因主要有 Bcl-2 家族、Caspases 家族等，其中 Bcl-2 是重要的抗凋亡因子，能够增强细胞抵抗力，是肿瘤发生发展过程中重要的抗凋亡基因；而 Caspases 家族则是重要的诱导凋亡因子，其中 Caspase-9 是诱导凋亡的主要基因，Caspase-3 是参与介导细胞凋亡的重要基因^[32]。Caspase-3、Caspase-9 能够降解 DNA 修复酶聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (PARP)，从而直接参与细胞凋亡^[33-34]。Cleaved-Caspase-3、Cleaved-Caspase-9 是 Caspase-3、Caspase-9 活化后的剪切形式，在细胞凋亡过程中 Caspase-3、Caspase-9 活化为其剪切形式进而发挥诱发细胞凋亡的作用。有研究指出，激活 Caspases、抑制 Bcl-2 的表达能够促进肿瘤细胞凋亡从而发挥抗肿瘤作用^[35]。因此，调节肿瘤细胞凋亡相关蛋白的表达可作为诱导肿瘤细胞凋亡的一种策略。本研究结果表明，不同浓度的马钱苷能够抑制 Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 等蛋白的表达，促进 Cleaved-Caspase-3、Cleaved-Caspase-9 蛋白的表达，提示马钱苷诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡的作用可能与抑制 Bcl-2 蛋白的表达，促进 Caspase-3、Caspase-9 活化有关。山茱萸在我国多地均有分布，自然资源丰富，山茱萸既可食用又是中医临床上应用广泛的药物，具有巨大药用价值和功能食品开发潜能。马钱苷作为山茱萸中的主要活性成分，本研究为山茱萸抗肿瘤物质基础研究和应用开发提供了理论依据。接下来，本课题组将在动物实验中进一步研究马钱苷抑制肝癌的作用并探讨其作用机制，为马钱苷及山茱萸防治肝癌提供更多的理论依据。

参考文献

[1] SUN X, LI L, MA H, et al. Bisindolylmaleimide alkaloid BMA-155Cl induces autophagy and apoptosis in human

- hepatocarcinoma HepG2 cells through the NF- κ B p65 pathway[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2017, 38 (4) : 524-538.
- [2] ARE C, MEYER B, STACK A, et al. Global trends in the burden of liver cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2017, 115 (5) : 591-602.
- [3] ZHOU J, SUN H, WANG Z, et al. Guidelines for diagnosis and treatment of primary liver cancer in China: 2017 edition[J]. *Liver Cancer*, 2018, 7(3) : 235-260.
- [4] 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.
- [5] WANG F, FAN J, ZHANG Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. *Hepatology*, 2014, 60(6) : 2099-2108.
- [6] FU J, WANG H. Precision diagnosis and treatment of liver cancer in China[J]. *Cancer Letters*, 2018. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.10.008 .
- [7] HIROKAWA F, HAYASHI M, ASAKUMA M, et al. Risk factors and patterns of early recurrence after curative hepatectomy for hepatocellular carcinoma[J]. *Surg Oncol*, 2016, 25(1) : 24-29.
- [8] SANTONI M, CONTI A, DE GIORGI U, et al. Risk of gastrointestinal events with sorafenib, sunitinib and pazopanib in patients with solid tumors: a systematic review and meta-analysis of clinical trials[J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(4) : 763-773.
- [9] RANDRUP HC, GRIMM D, BAUER J, et al. Effects and side effects of using sorafenib and sunitinib in the treatment of metastatic renal cell carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2017. DOI: 10.3390/ijms18020461.
- [10] 陈吉炎, 王雪芹, 安志斌, 等. 武当山地区道地药材的发展模式研究[J]. *中国药房*, 2011, 22(43) : 4123-4125.
- [11] 冀麟麟, 王欣, 钟祥健, 等. 山茱萸的化学成分及其抗氧化活性[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(5) : 137-143.
- [12] 叶贤胜, 赫军, 张佳琳, 等. 山茱萸的化学成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(24) : 4605-4609.
- [13] 雷小小, 苏艳莹, 李美云, 等. 山茱萸环烯醚萜苷中马钱苷和莫诺苷的研究进展[J]. *上海中医药杂志*, 2018, 52(1) : 104-108.
- [14] HE K, SONG S, ZOU Z, et al. The hypoglycemic and synergistic effect of loganin, morroniside, and ursolic acid isolated from the fruits of cornus officinalis[J]. *Phytother Res*, 2016, 30(2) : 283-291.
- [15] KIM MJ, BAE GS, JO IJ, et al. Loganin protects against pancreatitis by inhibiting NF-kappaB activation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.09.019.
- [16] HWANG K, HWANG Y, SONG J. Antioxidant activities and oxidative stress inhibitory effects of ethanol extracts from Cornus officinalis on raw 264.7 cells[J]. *BMC Complement Altern M*, 2016. DOI: 10.1186/s12906-016-1172-3.
- [17] HUANG J, ZHANG Y, DONG L, et al. Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of cornus officinalis sieb. et zucc[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018. DOI: 10.1016/j.jep.2017.11.010.
- [18] 党文军. 马钱苷抑制人恶性黑色素瘤A375细胞的作用及机制研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2016.
- [19] 胡小红, 王美玲, 湛江城, 等. 马钱苷对结肠癌SW480细胞增殖的影响及机制初探[J]. *广东药学院学报*, 2015, 31(1) : 80-83.
- [20] HOSSEINPOUR-JAGHDANI F, SHOMALI T, GHOLIPOUR-SHAHRAKI S, et al. Cornus mas: a review on traditional uses and pharmacological properties[J]. *J Complement Integr Med*, 2017. DOI: 10.1515/jcim-2016-0137.
- [21] 赵建龙, 李世朋. 山茱萸果核醇提取物诱导肝癌细胞HepG2凋亡的研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(13) : 1276-1278.
- [22] 胡小红, 王美玲, 湛江城, 等. 马钱苷对结肠癌SW480细胞增殖的影响及机制初探[J]. *广东药学院学报*, 2015, 31(1) : 80-83.
- [23] FU J, WANG H. Precision diagnosis and treatment of liver cancer in China[J]. *Cancer Letters*, 2018. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.10.008.
- [24] DELLA CORTE C, TRIOLO M, IAVARONE M, et al. Early diagnosis of liver cancer: an appraisal of international recommendations and future perspectives[J]. *Liver International*, 2016, 36(2) : 166-176.
- [25] KHAN M, GARG A, SRIVASTAVA SK, et al. A cytotoxic agent from Strychnos nux-vomica and biological evaluation of its modified analogues[J]. *Med Chem Res*, 2012, 21(10) : 2975-2980.
- [26] QIE S, DIEHL JA. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment[J]. *J Mol Med*, 2016, 94(12) : 1313-1326.
- [27] 林宇静, 郭瑞珍, 王海青. 细胞周期调控系统相关因子Cyclin D1-CDK4-p21在瘢痕癌中的表达及意义[J]. *医学研究生学报*, 2014, 27(9) : 923-927.
- [28] QIU Z, ZHANG C, ZHOU J, et al. Celecoxib alleviates AKT/c-Met-triggered rapid hepatocarcinogenesis by suppressing a novel COX-2/AKT/FASN cascade[J]. *Mol Carcinog*, 2019, 58(1) : 31-41.
- [29] BURANDT E, GRUENERT M, LEBEAU A, et al. Cyclin D1 gene amplification is highly homogeneous in breast cancer[J]. *Breast Cancer*, 2016, 23(1) : 111-119.
- [30] JURIKOVA M, DANIHEL L, POLAK S, et al. Ki67, PCNA, and MCM proteins: markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer[J]. *Acta Histochemica*, 2016, 118

猪苓多糖的PMP柱前衍生化-HPLC指纹图谱研究^Δ

赖戈娜*,贾文玉,罗思婉,周昌园,黎雄,张娴,曾星[#](广东省中医院/广州中医药大学第二临床医学院,广州 510006)

中图分类号 R282;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)07-0788-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.07.05

摘要 目的:建立猪苓多糖的柱前衍生化-高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并测定其主要单糖组分含量,为猪苓药材的质量评价提供参考。方法:11批不同产地猪苓药材经水提醇沉、Sevage除蛋白后得到猪苓多糖。多糖经三氟乙酸(TFA)水解和1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)衍生化后,进行HPLC分析。色谱柱为Hypersil BDS C₁₈,流动相为0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.84)-乙腈(84:16, V/V),检测波长为254 nm,柱温为30 ℃,流速为1 mL/min,进样量为20 μL。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A版)建立11批多糖样品的指纹图谱并进行相似度评价,通过与对照品比对进行色谱峰指认,再采用SPSS 23.0软件进行聚类分析,并测定多糖中主要单糖组分的含量。结果:11批猪苓多糖样品HPLC指纹图谱中共呈现出3个共有峰,分别指认为甘露糖、葡萄糖和半乳糖,各批次样品的相似度均大于0.94。聚类分析将11批多糖样品分为3类,药材编号为S1~S6、S8的样品聚为一类,药材编号为S7、S10、S11的样品聚为一类,药材编号为S9的样品单独聚为一类。含量测定结果显示,11批样品中甘露糖含量为1.571~8.771 mg/g、葡萄糖含量为26.072~132.194 mg/g、半乳糖含量为3.420~36.593 mg/g。结论:本研究建立的柱前衍生化-HPLC指纹图谱方法可为猪苓的药材质量评价提供参考;不同批次猪苓多糖中单糖组成相同,指纹图谱特征峰与药材的产地无明显相关性,药材之间的单糖含量存在明显差异。

关键词 猪苓多糖;单糖;1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮;柱前衍生化;高效液相色谱法;指纹图谱

Study on PMP Pre-column Derivatization-HPLC Fingerprint of Polyporus Polysaccharide

LAI Gena, JIA Wenyu, LUO Siwan, ZHOU Changyuan, LI Xiong, ZHANG Xian, ZENG Xing (Guangdong Province Hospital of TCM/The Second Clinical Medical College, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish pre-column derivatization-HPLC fingerprint of Polyporus polysaccharide, and to determine the contents of main monosaccharide components, so as to provide reference for quality evaluation of *Polyporus umbellatus*. METHODS: Polyporus polysaccharide was extracted with boiling water and precipitated by ethanol and deproteinized by Sevage from 11 batches of *P. umbellatus* from different producing areas. The samples were firstly hydrolyzed with trifluoro-acetic acid (TFA) and then derivatized by 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP). HPLC analysis was then conducted. The determination was carried out on Hypersil BDS C₁₈ column with mobile phase composed of 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 6.84)-acetonitrile (84:16, V/V) by gradient elution at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 254 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 20 μL. The similarity of 11 batches of Polyporus polysaccharide was evaluated by using *TCM Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System* (2012A edition), and the contents of main

(5):544-552.

- [31] WANG Y, LI YJ, HUANG XH, et al. Liensinine perchlorate inhibits colorectal cancer tumorigenesis by inducing mitochondrial dysfunction and apoptosis[J]. *Food Funct*, 2018, 9(11):5536-5546.
- [32] 杨涛,费振海,钟兴明. Caspase家族与细胞凋亡的研究进展[J]. *浙江医学*, 2018, 40(18):2083-2087.
- [33] MOYA A, SAKAMAKI K, MASON BM, et al. Function-

al conservation of the apoptotic machinery from coral to man: the diverse and complex Bcl-2 and caspase repertoires of *Acropora millepora*[J]. *BMC Genomics*, 2016. DOI:10.1186/s12864-015-2355-x.

- [34] CHOUDHARY GS, AL-HARBI S, ALMASAN A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis[J]. *Methods Mol Biol*, 2015. DOI: 10.1007/978-1-4939-1661-0_1.
- [35] LI WH, WU HJ, LI YX, et al. MicroRNA-143 promotes apoptosis of osteosarcoma cells by caspase-3 activation via targeting Bcl-2[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.03.001.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81573769);广东省中医院中医药科学技术研究专项(No.YN2019MJ02)

* 硕士研究生。研究方向:中药大分子物质基础及其吸收机制。E-mail:1115461221@qq.com

通信作者:研究员,博士生导师,博士。研究方向:中药基础药理与临床。电话:020-39318571。E-mail:zengxing-china@163.com

(收稿日期:2019-10-08 修回日期:2019-12-29)

(编辑:邹丽娟)