

引用:殷悦,邹勇,程彬彬.积雪草酸对人肝癌SMMC-7721细胞增殖、迁移及凋亡的影响[J].中医导报,2019,25(20):80-83.

积雪草酸对人肝癌SMMC-7721细胞增殖、迁移及凋亡的影响*

殷悦¹ 邹勇² 程彬彬²

(1.潍坊医学院临床医学系,山东 潍坊 261053;

2.第二军医大学长海医院中医系,上海 200433)

[摘要] 目的:观察积雪草酸对人肝癌SMMC-7721细胞增殖、迁移及凋亡的影响。方法:用不同浓度的积雪草酸处理人肝癌SMMC-7721细胞,MTT法检测积雪草酸对人肝癌SMMC-7721细胞增殖的影响,流式细胞术检测积雪草酸对人肝癌SMMC-7721细胞凋亡的影响,Transwell小室法检测积雪草酸对肝癌细胞迁移的影响,Western blot法检测积雪草酸对凋亡相关基因Bcl-2和Bax及上皮间质转化标志基因E-cadherin表达的影响。结果:与对照组比较,25、50、100 μmol/L的积雪草酸对人肝癌SMMC-7721细胞增殖均有明显的抑制作用,差异均有统计学意义($P<0.01$)。流式细胞术结果显示,50 μmol/L的积雪草酸处理后,肝癌细胞凋亡率显著增加,与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。Transwell小室法检测结果发现,TGF-β能显著促进人肝癌SMMC-7721细胞迁移,与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。1、10 μmol/L的积雪草酸处理能够显著抑制TGF-β诱导的肝癌细胞迁移。积雪草酸处理后,人肝癌SMMC-7721细胞Bcl-2蛋白水平显著下降,Bax蛋白水平显著上调。TGF-β处理24 h后,SMMC-7721细胞E-cadherin表达水平显著降低,而不同浓度的积雪草酸均能抑制TGF-β诱导的E-cadherin表达水平下调。结论:积雪草酸能显著抑制人肝癌SMMC-7721细胞增殖和迁移,诱导细胞凋亡。

[关键词] 积雪草酸 原发性肝癌 人肝癌SMMC-7721细胞 增殖 迁移 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2019)20-0080-04

DOI:10.13862/j.cnki.cn43-1446/r.2019.20.021

Effects of Asiatic Acid on Proliferation, Migration and Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line SMMC-7721

YIN Yue¹, ZOU Yong², CHENG Bin-bin²

(1.Department of Clinical Medicine, Weifang Medical College, Weifang Shandong 261053, China; 2.Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] Objective: To observe the effect of asiatic acid (AA) on the proliferation, migration and apoptosis of human hepatoma cells SMMC-7721. Methods: SMMC-7721 cells were treated with different concentrations of AA, and then MTT assay was performed to determine the proliferation of SMMC-7721 cells. Flow cytometry was used to detect the apoptosis of SMMC-7721 cells. The migration of hepatoma cells was determined by transwell assay. The expression of Bcl-2, Bax and E-cadherin protein was examined by Western blot. Results: Compared with the control group, AA showed significant inhibitory effect on the proliferation of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells ($P<0.01$). The results of flow cytometry showed that the apoptotic rate of hepatoma cells increased significantly after treatment with 50 mol/L of AA ($P<0.01$). Transwell chamber results showed that TGF-β significantly promoted the migration of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells ($P<0.01$). And 1, 10 mol/L of AA treatment significantly inhibited TGF-β induced hepatoma cell migration. After the treatment of AA, the level of Bcl-2 decreased significantly, while the level of Bax increased significantly. TGF-β treatment for 24 h significantly decreased E-cadherin expression in SMMC-7721 cells, while different concentrations of AA inhibited the down-regulation of E-cadherin expression induced by TGF-β. Conclusion: AA can inhibit the proliferation and migration and induce the apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells.

[Keywords] asiatic acid; primary liver cancer; Smmc-7721 cells of human liver cancer; proliferation; migrate; apoptosis

*基金项目 国家自然科学基金重点项目(81430101) 项目名称 从肿瘤炎症微环境角度探讨清热解毒法在原发性肝癌治疗中的价值

通讯作者 程彬彬 E-mail :bb8202@126.com

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)简称肝癌,是我国最常见的恶性肿瘤之一^[1-3]。由于肝癌早期无明显的症状,发现时往往已到晚期,而且肝癌细胞对放化疗均不敏感,因此肝癌的治疗效果一直不佳。

积雪草酸(asiatic acid, AA)是一种五环三萜酸类化合物,广泛存在于很多中草药中,如积雪草、石见穿等^[4]。研究表明,积雪草酸除了有保肝、抑菌、治疗皮肤创伤和改善认知的药理作用外,对结肠癌细胞、黑色素瘤细胞等^[5-7]恶性肿瘤细胞有显著的抑制作用。然而,积雪草酸对肝癌的作用目前还未完全阐明。因此,本实验拟观察积雪草酸对人肝癌SMMC-7721细胞的增殖、迁移及凋亡的影响,并探讨其作用的分子机制。

1 材料与方 法

1.1 试剂 积雪草酸购自上海源叶生物科技有限公司(CAS号:464-92-6)。人肝癌SMMC-7721细胞购自中科院上海细胞所,由第二军医大学附属长海医院中医系实验室传代保存。胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)、DMEM培养基、0.25% Trpsine-EDTA、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)购自GIBCO公司。3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]购自Sigma-Aldrich。转化生长因子(transforming growth factor beta, TGF- β)购自R&D公司。Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司。SDS凝胶配制试剂盒、细胞裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒均购自碧云天生物。其余未特殊注明的试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 主要仪器 流式细胞仪, CO₂细胞培养箱, 酶标仪, 普通台式离心机, 电热恒温水浴箱, 电热干燥箱, 高压灭菌机, 超净工作台, 普通及低温冰箱, 烘干机, 普通及电子天平, 酶标仪。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 SMMC-7721细胞用含10%FBS的DMEM培养基培养于37℃、5% CO₂、饱和湿度的孵箱(HERA cell 240i)中, 2~3 d传代1次。

1.3.2 MTT法检测积雪草酸对人肝癌SMMC-7721细胞增殖的影响 取处于对数生长期的人肝癌SMMC-7721细胞, 胰酶消化制成细胞悬液, 调整浓度至 1×10^5 个/mL。将制备好的细胞悬液加入96孔板, 100 μ L/孔。37℃培养24 h后, 分别加入不同浓度的积雪草酸(1、10、25、50、100 μ mol/L), 每个浓度设置6个复孔, 24 h后每孔加入10 μ L MTT溶液(5 mg/mL), 放入培养箱中孵育4 h, 加三联液(100 μ L/孔), 37℃过夜。酶标仪(ELX 800)570 nm处测定OD值。增殖率=(OD加药组-OD本底)/(OD对照组-OD本底) $\times 100\%$ 。

1.3.3 Transwell检测积雪草酸对肝癌细胞迁移的影响 为进一步观察积雪草酸是否能够抑制人肝癌细胞迁移, 选用对肝癌细胞无明显增殖抑制作用的1、10 μ mol/L的积雪草酸进行实验。将对数生长期SMMC-7721肝癌细胞按常规培养方法消化后, 吹打混匀成单细胞混悬液, 1200 r/min离心5 min。弃上

清, 无血清DMEM培养基重悬细胞, 调整细胞浓度为 2×10^5 /mL, 每孔100 μ L加至Transwell小室上室中, 同时加入TGF- β (10 ng/mL)和不同浓度的积雪草酸(1、10 μ mol/L), 下室中加入含10%FBS的DMEM完全培养基血清, 500 μ L/孔。37℃、5% CO₂恒温培养箱培养24 h, 甲醇固定, 结晶紫染色, 漂洗晾干后于倒置显微镜下拍照、计数。

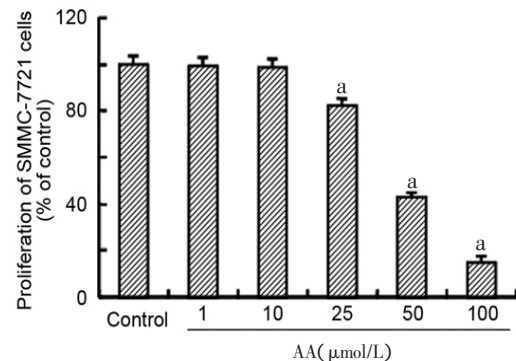
1.3.4 流式细胞术检测积雪草酸对人肝癌SMMC-7721细胞凋亡的影响 将处于对数生长期的SMMC-7721细胞铺于6孔板, 2×10^5 个/孔。24 h后加入不同浓度的积雪草酸(10、25、50 μ mol/L)处理24 h。采用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒、流式细胞仪(BD FACSCalibur)检测细胞凋亡情况。

1.3.5 Western blot检测积雪草酸对人肝癌SMMC-7721细胞Bcl-2和Bax表达的影响 将处于对数生长期的SMMC-7721细胞铺于6孔板, 2×10^5 个/孔。24 h后加入不同浓度的积雪草酸(10、25、50 μ mol/L)处理24 h。以Ripa裂解液提取细胞总蛋白, BCA法测定蛋白浓度, 取等量(20 μ g)蛋白进行SDS-PAGE电泳, 电泳结束后将蛋白质转移至PVDF膜, 5% BSA室温封闭2 h。后分别采用封闭液稀释的人Bcl-2(1:1000)、Bax(1:1000)及 β -actin一抗孵育(1:5000), 室温孵育1 h后, 4℃封闭过夜。TBST洗膜, HRP标记的羊抗鼠Ig二抗稀释液室温孵育2 h。采用化学发光法在凝胶成像仪(G:BOX iChemi XL Syngene)中检测目的蛋白表达。

1.3.6 统计学方法 实验数据采用SPSS 18.0统计软件进行统计分析, 计量资料以“均数 \pm 标准差”($\bar{x} \pm s$)表示。计量资料采用单因素方差分析, 两两比较采用SNK-q检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

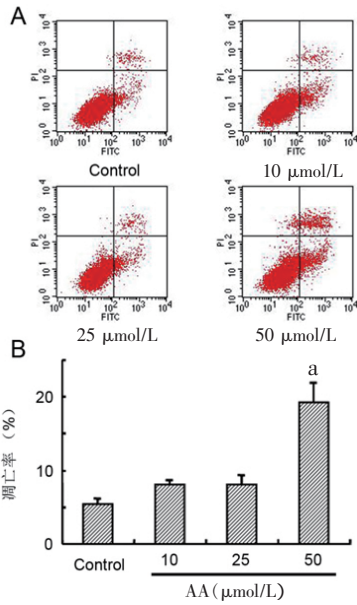
2.1 积雪草酸对SMMC-7721人肝癌细胞增殖的影响 1、10 μ mol/L的积雪草酸对人肝癌SMMC-7721细胞增殖无明显抑制作用。25、50、100 μ mol/L的积雪草酸对人肝癌SMMC-7721细胞增殖均有明显抑制作用, 作用呈浓度依赖性($P < 0.01$)。(见图1)



注:与对照组比较, $^*P < 0.01$

图1 积雪草酸对肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的影响 ($n=6$)

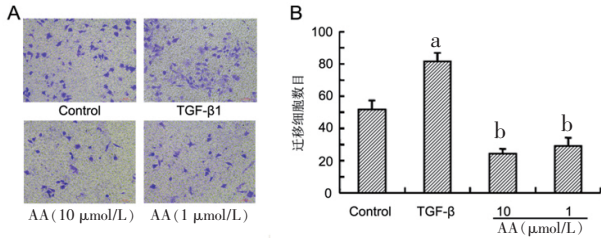
2.2 积雪草酸对SMMC-7721人肝癌细胞凋亡的影响 10、25 μ mol/L的积雪草酸处理24 h后, 肝癌细胞凋亡率升高, 与对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。50 μ mol/L的积雪草酸处理24 h后细胞凋亡率显著增加, 与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。(见图2)



注:与对照组比较, ^a*P*<0.01

图2 积雪草酸对SMMC-7721细胞凋亡的影响 (*n*=3)

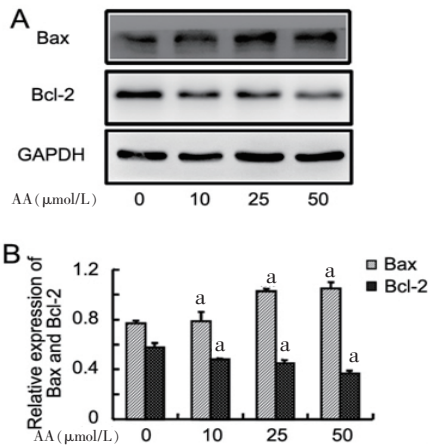
2.3 积雪草酸对SMMC-7721人肝癌细胞迁移的影响 与对照组比较,TGF-β能够显著促进人肝癌SMMC-7721细胞迁移,差异有统计学意义(*P*<0.01)。1、10 μmol/L的积雪草酸处理能够显著抑制TGF-β诱导的肝癌细胞迁移。(见图3)



注:与对照组比较, ^a*P*<0.01;与TGF-β组比较, ^b*P*<0.01

图3 积雪草酸对肝癌SMMC-7721细胞迁移的影响 (*n*=3)

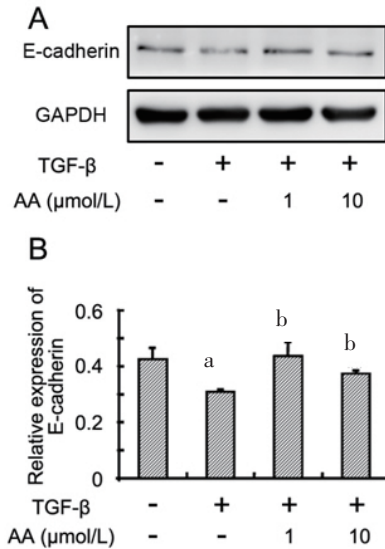
2.4 积雪草酸对肝癌SMMC-7721细胞Bcl-2和Bax表达的影响 积雪草酸处理组Bcl-2表达水平降低,而Bax的表达增强,其作用具有一定的浓度依赖性。(见图4)



注:与对照组比较, ^a*P*<0.01

图4 积雪草酸对肝癌SMMC-7721细胞Bax/Bcl-2蛋白表达的影响 (*n*=3)

2.5 积雪草酸对TGF-β诱导的上皮间质转化(EMT)的影响 TGF-β处理24 h后,E-cadherin表达水平低于对照组(*P*<0.01),而联合采用不同浓度的积雪草酸处理后,E-cadherin表达水平高于单独使用TGF-β处理(*P*<0.01)。(见图5)



注:与对照组比较, ^a*P*<0.01;与TGF-β组比较, ^b*P*<0.01

图5 积雪草酸对TGF-β诱导的肝癌SMMC-7721细胞EMT的影响 (*n*=3)

3 讨论

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,对化学药物治疗不敏感。因此,中医药在肝癌的治疗中占有重要地位。

原发性肝癌预后较差,与肿瘤细胞过度增殖、术后易发生侵袭转移密切相关。本研究发现,积雪草酸能抑制SMMC-7721肝癌细胞增殖,其作用具有一定的剂量依赖性。凋亡和坏死是肿瘤细胞死亡的两种主要方式。其中,凋亡又称为程序性死亡,是细胞为维持内环境稳定,由一系列的基因控制的细胞自主有序死亡^[8]。因此,诱导肿瘤细胞发生凋亡是大多数药物发挥抗肿瘤作用的主要作用机制之一。流式细胞术结果显示,50 μmol/L的积雪草酸能诱导肝癌细胞凋亡。结果提示抑制肝癌细胞增殖、诱导其凋亡是积雪草酸发挥抗肝癌作用的主要途径之一。为进一步明确积雪草酸是否能够抑制肝癌细胞转移,本实验采用对肝癌细胞无明显增殖抑制作用的药物浓度,利用Transwell小室法观察了其对肝癌细胞迁移的影响。结果发现,1、10 μmol/L的积雪草酸均能显著抑制TGF-β诱导的肝癌细胞迁移,提示积雪草酸不仅能抑制肝癌细胞增殖、诱导凋亡,还可能具有抑制肝癌细胞转移的作用。

细胞凋亡是一个多基因参与的复杂过程,其中Bcl-2家族具有重要的调控作用^[9-10]。Bcl-2是一种最为主要的抗凋亡蛋白,能够通过抑制氧化应激引起的凋亡,影响细胞内钙内流,抑制线粒体细胞色素C释放,进而抑制Caspase级联反应,发挥抗凋亡的作用^[11]。Bax是一种主要的促凋亡蛋白,可以通过与位于线粒体内膜的腺苷转位因子或位于线粒体外膜的电压依赖性阴离子通道结合介导线粒体膜通透性转运孔的开放,线粒体基质中释放出致凋亡活性物质,如细胞凋亡诱

导因子和细胞色素C等,这些物质进入细胞质,可激活Cas-pase级联反应,最终导致细胞凋亡^[12-13]。研究表明,Bcl-2/Bax比例失衡是凋亡发生的主要机制之一^[14]。因此,针对Bcl-2/Bax的调节是抗肿瘤药物发挥促进肿瘤细胞凋亡的主要分子机制^[15-16]。本研究结果表明,积雪草酸能下调Bcl-2,上调Bax表达水平,提示调控Bcl-2/Bax,进而启动细胞凋亡进程是积雪草酸诱导肝癌细胞凋亡的分子机制之一。

EMT被认为是肝癌侵袭、转移的关键细胞学基础^[17]。其中,TGF- β 通过激活Smad依赖或者非Smad依赖的信号通路引起EMT促进肿瘤浸润和转移^[18]。E-cadherin是EMT的关键标志分子^[19-20]。本研究结果显示,积雪草酸能部分抑制TGF- β 诱导的E-cadherin下调,提示其可能是通过抑制肝癌细胞EMT发挥抑制其侵袭转移作用的。

本研究结果提示,积雪草酸可能通过抑制肝癌细胞增殖和迁移、诱导凋亡多种途径发挥抗肝癌作用。作用机制可能与调控Bcl-2/Bax比例,逆转EMT有关。因此在进一步研究中,应充分阐明积雪草酸诱导凋亡、逆转EMT的分子调控机制。

参考文献

- [1] ROXBURGH P, EVANS T R. Systemic therapy of hepatocellular carcinoma: are we making progress? [J]. *Adv Ther* 2008,25(11):1089-1104.
- [2] GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease study 2013 [J]. *Lancet* 2015,385 (9963):117-171.
- [3] LLOVET J M, ZUCMAN-ROSSI J, PIKARSKY E, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers* 2016,2:16018.
- [4] 薛菁,王楠,孟艳秋.积雪草酸衍生物的合成及抗肿瘤活性的研究[J].*沈阳化工大学学报* 2014,28(1):24-31.
- [5] 冯旭,郭飞飞,赵龙,等.积雪草酸药理作用及其结构修饰的研究进展[J].*中草药* 2014,45(7):1037-1042.
- [6] 刘华清,许青云,王天麟.积雪草酸的研究进展[J].*中国野生植物资源* 2014,33(4):30-33.
- [7] 孟艳秋,王楠,张良锋.积雪草酸生物活性的研究进展[J].*化学通报* 2013,76(8):721-724.
- [8] KERR J F, WINTERFORD C M, HARMON B V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy [J]. *Cancer* 2015,73(8):2013-2026.
- [9] MONDAL J, DAS J, SHAH R, et al. A homeopathic nosode, Hepatitis C 30 demonstrates anticancer effect against liver cancer cells (HepG2) in vitro by modulating telomerase and topoisomerase II activities as also by promoting apoptosis via intrinsic mitochondrial pathway[J]. *J Integr Med* 2016,14(3):209-218.
- [10] ZHANG Y H, WANG Y, YUSUFALI A H, et al. Cytotoxic genes from traditional Chinese medicine inhibit tumor growth both in vitro and in vivo[J]. *J Integr Med*, 2014,12(6):483-494.
- [11] 胡美茹,兰雨,张学敏,等. Caspase与Bcl-2在凋亡发生和调控中的相互作用机制[J]. *军事医学* 2000,24(2):126-129.
- [12] BOSE D, BANERJEE S, DAS S, et al. Heat Killed Attenuated Leishmania Induces Apoptosis of HepG2 Cells Through ROS Mediated p53 Dependent Mitochondrial Pathway[J]. *Cell Physiol Biochem* 2016,38(4):1303-1318.
- [13] 董雅洁,高维娟. bcl-2、bax、caspase-3在细胞凋亡中的作用及其关系[J]. *中国老年学* 2012,32(21):4828-4830.
- [14] 杨连君,曹雪涛,于益芝. bcl-2、bax与肿瘤细胞凋亡[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2003,10(3):232-234.
- [15] LI J, LIU F, JIANG S, et al. Berberine hydrochloride inhibits cell proliferation and promotes apoptosis of non-small cell lung cancer via the suppression of the MMP2 and Bcl-2/Bax signaling pathways[J]. *Oncol Lett*, 2018,15(5):7409-7414.
- [16] MIAO R, XU X, WANG Z, et al. Synergistic effect of nutlin-3 combined with aspirin in hepatocellular carcinoma HepG2 cells through activation of Bcl-2/Bax signaling pathway[J]. *Mol Med Rep* 2018,17(3):3735-3743.
- [17] 汤志杰,张茂娜,陈莉.肝癌和肝纤维化发生EMT及相关信号通路的分子机制[J]. *实用癌症杂志* 2014,29(1):113-116.
- [18] 叶英楠,王越,王扬,等.肝细胞肝癌上皮间质转化的相关分子机制[J]. *国际肿瘤学杂志* 2013,40(8):608-611.
- [19] YANG Y, ZHANG N, ZHU J, et al. Downregulated connexin32 promotes EMT through the Wnt/ β -catenin pathway by targeting Snail expression in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Oncol* 2017,50(6):1977-1988.
- [20] 汪一帆,柴可群,应栩华,等.中药抑肺饮对Lewis肺癌移植瘤生长及细胞EMT的影响[J]. *中华中医药学刊* 2017,35(8):1940-1942.

(收稿日期 2019-01-02 编辑 蒋凯彪)

去 伪 存 真 开 拓 创 新