

健脾消癥方诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡的作用研究

吴 坚 张星星 顾培青 刘亚军 孙庆敏 叶 柏

(南京中医药大学附属医院, 江苏南京 210029)

摘 要 目的:探讨健脾消癥方对肝癌细胞 HepG2 凋亡的影响及机制。方法:MTT 法观察健脾消癥方对肝癌细胞株 HepG2、SMMC-7721 增殖的影响,Hoechst 33342 染色、透射电镜观察健脾消癥方对 HepG2 细胞超微结构的改变作用,DCFH-DA 探针法观察健脾消癥方对 HepG2 活性氧水平的影响,Western blot 检测健脾消癥方对 HepG2 的凋亡相关半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)、Caspase-9 表达的影响。结果:健脾消癥方作用 HepG2 48h 后,细胞形态及超微结构出现典型的凋亡特点,细胞内活性氧浓度升高,Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达上调。结论:健脾消癥方对 HepG2 有较好的诱导凋亡的作用,其作用机制可能与其增加细胞活性氧(ROS)水平及下调 Caspase-3、Caspase-9 蛋白有关。

关键词 健脾消癥方 细胞活性氧 Caspase 家族 肝癌细胞株 细胞凋亡 病理学 体外实验

中图分类号 R235.7 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2017)02-0079-04

我国肝癌发病率、死亡率在所有恶性肿瘤中居第 2 位^[1-2]。流行病学预测,全球肝癌的发病(死亡)绝对数会持续升高,到 2030 年将增加 60%^[3]。肝癌起病隐匿,约 90% 的肝癌患者首诊时已属中晚期,西医治疗方法有限。而中医中药因在预防肿瘤复发转移、减轻化疗后不良反应、改善生存质量等方面取得了良好效果且价格低廉,已被广泛用于肝癌治疗的各环节以及中晚期肝癌的独立治疗。我院消化科叶柏主任结合多年临床实践,根据肝癌脾肝两伤、湿热血瘀的病机特点,创立了健脾消癥方。该方在临床有良好的改善肝癌患者生存质量、协同控制肝癌生长的效果,但相关实验研究尚未开展。本实验观察健脾消癥方在体外对肝癌细胞株增殖、凋亡的作用并探讨相关机制,以期为本方抗肝癌临床用药提供实验依据。

1 实验材料

1.1 实验药物及其制备 健脾消癥方(生黄芪 20g、白术 10g、赤芍 15g、白芍 15g、当归 10g、薏苡仁 30g、醋柴胡 6g、炙鸡内金 15g、白毛夏枯草 15g、炮山甲 10g、垂盆草 30g、地锦草 10g、半枝莲 30g、白花蛇舌草 15g),用 10 倍蒸馏水加热回流提取 2 次,每次 1h,合并提取药液,水浴浓缩,配成 2g/mL 的水提液,灭菌备用。

1.2 实验试剂及设备 RPMI-1640 培养液购自 GIBCO 公司,批号:12633012;小牛血清购自四季青公司,批号:140902;胰蛋白酶购自 Biosharp 公司,批号:BL501A;Hoechst 33342 购自碧云天公司,批号:C1022;活性氧试剂盒购自碧云天公司,批号:S0033;鼠抗人 β -actin 单抗购自 Cell Signaling Technology 公司,批号:82559;兔抗人半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)购自 Cell Signaling Technology 公司,批号:9668;鼠抗人 Caspase-9 单抗,购自 Cell Signaling Technology 公司,批号:9508;二抗,购自中杉生物技术公司,批号:zdr5102。

CO₂ 培养箱,HERA cell 150i,Thermo 公司;生物安全柜,1300 A2,Thermo 公司;倒置显微镜,IX51,Olympus 公司;超纯水机,Milli Q,Millipore 公司;紫外分光光度计,biophotometer plus,ABI 公司;涡旋混合器,Thermolyne 公司;电泳仪、转印槽,MP-4, BIORAD 公司;化学发光成像仪,XRS+,BIORAD 公司;冷冻离心机,5804R,eppendorf 公司;超低温冰箱,MDF-38,三洋公司。

1.3 实验细胞株 人肝癌 HepG2 细胞株:江苏省中医院中心实验室常规培养,含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养,0.25%胰酶消化传代,选取对数生长期细胞进行实验。

基金项目:国家自然科学基金(81473605);江苏省中医院院级课题(Y14074);江苏省中医消化病临床医学研究中心(BL2014100)

2 实验方法

2.1 MTT 法测健脾消癥方对 HepG2、SMMC-7721 增殖的影响 取对数生长期的 HepG2、SMMC-7721 细胞,接种于 96 孔板中。细胞贴壁后,实验组加入含不同浓度的健脾消癥方培养液(4、2、1、0.5、0.25mg/mL),每组 3 个复孔。分别培养 24h、48h 后,弃上清,每孔加入 20 μ L 噻唑蓝(MTT)溶液,继续培养 4h 后弃上清,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷(DMSO),振荡 10min,计算细胞增殖抑制率。

2.2 Hoechst 33342 染色观察健脾消癥方对 HepG2 凋亡细胞形态的影响 取洁净载玻片清洗风干后,置于六孔板内。取对数生长期的 HepG2,以 3×10^5 个/mL,每片 1mL 的密度接种于六孔板的载玻片上。细胞贴壁后,每孔加 3mL 的完全培养液,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中继续培养细胞 24h 后,给药组弃上清,分别加入含健脾消癥方浓度为 2mg/mL、1mg/mL 的完全培养液继续培养 48h。48h 后,弃上清液,磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗 2 遍,加入 Hoechst 33342 溶液染色 0.5mL,染色 15min,PBS 洗 3 次,将盖玻片取出,加 1 滴抗荧光淬灭剂于玻片上,盖上载玻片,避光保存。荧光显微镜下观察,拍照。

2.3 透射电镜观察健脾消癥方对 HepG2 凋亡超微细胞结构的影响 消化收集对数生长期的 HepG2,以 1.5×10^5 个/mL 密度接种于培养皿中,每皿 3mL 细胞悬液,细胞贴壁后,加含 2mg/mL 健脾消癥方的完全培养液,继续培养 48h。消化收集细胞,预冷的 PBS 洗 2 次,2000r/min,5min 离心后弃上清,细胞在含 2.5%戊二醛、4%多聚甲醛、1%四氧化锇的 PBS 溶液中固定 24h,脱水,环氧树脂镶嵌。细胞切成 80 μ m 的薄片,铅铀酰乙酸盐染色。电子显微镜检测。

2.4 DCFH-DA 探针法观察健脾消癥方对 HepG2 活性氧水平的改变 取洁净载玻片清洗风干后,置六孔板内。对数生长期 HepG2,以 3×10^5 个/mL,每片 1mL 的密度接种于六孔板的载玻片上。细胞贴壁后,每孔分别加含健脾消癥方浓度为 2mg/mL、1mg/mL 的完全培养液继续培养 48h。收集细胞,预冷 PBS 洗 2 次,1000r/min,5min 离心后,弃上清,每片加入 500 μ L 稀释好的 DCFH-DA,使

终浓度为 10 μ mol/L,细胞培养箱内孵育 30min,每隔 3min 颠倒混匀 1 次,使探针和细胞充分接触。用无血清培养液洗涤细胞 3 次,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA 探针。将盖玻片取出,加 1 滴抗荧光淬灭剂于玻片上,荧光显微镜下检测。

2.5 Western blot 检测健脾消癥方对 HepG2 细胞 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达的影响 收集对数生长期的 HepG2,向直径 10cm 的培养皿中接种 2×10^6 个细胞培养 24h 后,加入终浓度分别为 2mg/mL、1mg/mL 的含健脾消癥方的完全培养液,以正常培养的 HepG2 为阴性对照,含 50 μ g/mL 5-氟尿嘧啶(5-FU)培养液的 HepG2 为阳性对照,继续培养 48h 后,弃上清,PBS 洗 2 次,消化细胞,提取细胞总蛋白。Bradford 法测蛋白浓度,每个样取 20 μ g 上样。经 SDS PAGE 分离后转到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉溶液封闭 1h,一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗室温孵育后,PBST 漂洗,使用 ECL 液进行发光和条带分析。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐性检验后,组间比较用方差分析检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 健脾消癥方对 HepG2、SMMC-7721 的增殖抑制作用 不同浓度的健脾消癥方分别作用于人肝癌细胞株 HepG2、SMMC-7721 24h、48h 后,随着药物浓度的增大及作用时间的增加,其对细胞的增殖抑制率也逐渐增强,与空白组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1、表 2。同等时间下,健脾消癥

表 1 健脾消癥方对人肝癌细胞株 HepG2 的增殖抑制率

组别	剂量 (mg/mL)	24h		48h	
		OD 值($\bar{x} \pm s$)	抑制率	OD 值($\bar{x} \pm s$)	抑制率
健脾消癥方组	4	0.47 $\pm$ 0.02 [#]	60.91%	0.31 $\pm$ 0.01 [#]	83.64%
	2	0.65 $\pm$ 0.01 [#]	46.17%	0.69 $\pm$ 0.05 [#]	62.96%
	1	0.92 $\pm$ 0.003 [#]	24.08%	1 $\pm$ 0.01 [#]	46.58%
	0.5	1.14 $\pm$ 0.06	6.01%	1.51 $\pm$ 0.02 [#]	19.43%
	0.25	1.2 $\pm$ 0.01	0.25%	1.84 $\pm$ 0.03	3.03%
空白对照组		1.21 $\pm$ 0.01		1.87 $\pm$ 0.03	

注:与空白对照组比较,[#] $P < 0.05$ 。

表 2 健脾消癥方对人肝癌细胞株 SMMC-7721 的增殖抑制率

组别	剂量 (mg/mL)	24h		48h	
		OD 值($\bar{x} \pm s$)	抑制率	OD 值($\bar{x} \pm s$)	抑制率
健脾消癥方组	4	0.47 $\pm$ 0.01 [#]	61.71%	0.46 $\pm$ 0.01 [#]	71.48%
	2	0.65 $\pm$ 0.01 [#]	31.49%	0.71 $\pm$ 0.01 [#]	56.36%
	1	0.92 $\pm$ 0.01 [#]	14.70%	1.07 $\pm$ 0.07 [#]	34.14%
	0.5	1.14 $\pm$ 0.01	5.56%	1.41 $\pm$ 0.01 [#]	12.92%
	0.25	1.2 $\pm$ 0.05	0.57%	1.51 $\pm$ 0.01	6.69%
空白对照组		1.21 $\pm$ 0.04		1.62 $\pm$ 0.02	

注:与空白对照组比较,[#] $P < 0.05$ 。

方对 HepG2 的抑制作用强于 SMMC-7721 细胞,因此选用 HepG2 细胞株完成后续实验。

3.2 健脾消癥方对 HepG2 凋亡细胞形态的影响 与空白组比较,健脾消癥方大、小剂量组作用 HepG2 细胞 48h 后,大剂量组的细胞核收缩变圆,核染色质浓缩、边聚,呈典型凋亡改变,小剂量组无明显改变。见图 1。

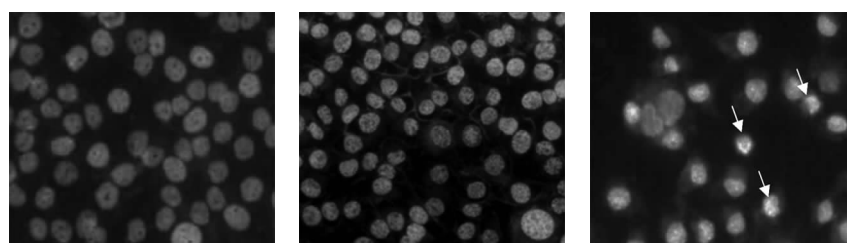
3.3 健脾消癥方对 HepG2 凋亡超微结构的影响 透射电子显微镜(8000 $\times$)下,与空白组细胞相比,健脾消癥方作用后,细胞形态完整,细胞质液泡化,内质网扩张和染色质边聚,表明细胞出现凋亡。横线长度为 2 μ m。见图 2。

3.4 健脾消癥方对 HepG2 活性氧(ROS)水平的改变 与空白组相比,健脾消癥方作用 HepG2 48h 后,大剂量组细胞荧光强度增高,表明细胞内活性氧水平增高,小剂量组变化不明显。见图 3。

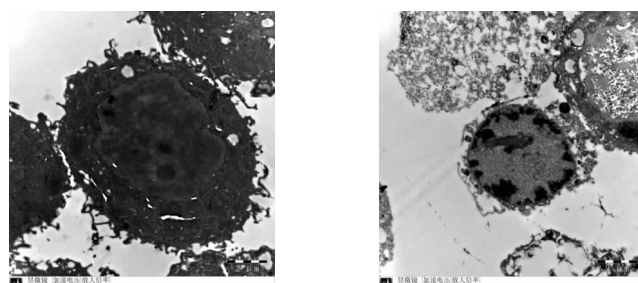
3.5 健脾消癥方对 HepG2 细胞 caspase-3、caspase-9 蛋白表达的影响 与空白组比较,阳性对照组和健脾消癥方大、小剂量组 caspase-3、caspase-9 蛋白表达均上调。见图 4、表 3。

4 讨论

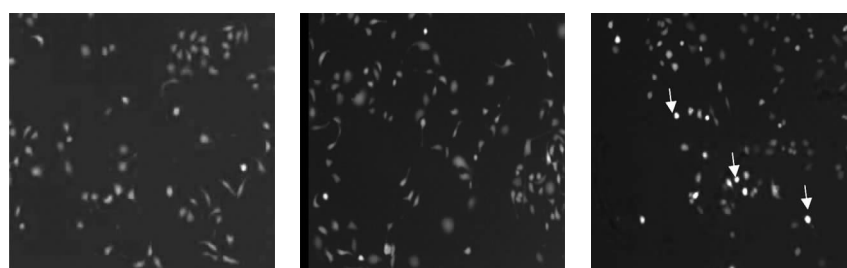
中医学认为,肝癌的主要病理特点是正虚邪陷。正虚主要是指脾气亏虚,肝气郁滞,脏腑功能失调;邪实是指湿热阻滞、瘀毒结聚^[4]。我院叶柏主任结合多年治疗肝癌的临床实践,创立了健脾消癥方。该方以生黄芪、炒白术、炒白芍、薏苡仁、炙鸡内金健脾益气扶正,赤芍、当归、醋柴胡、炮山甲、垂盆草、地锦草活血化瘀消癥,白毛夏枯草、半枝莲、白花蛇舌草清热凉血解毒,在临床有缓解肝癌临床症状、协同化疗和抑制肝癌生长的效果。



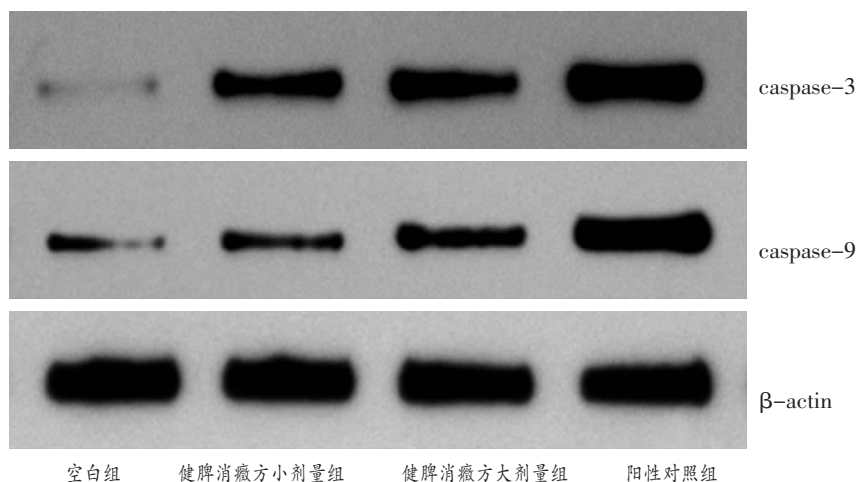
空白组 健脾消癥方小剂量组 健脾消癥方大剂量组
图 1 健脾消癥方作用 HepG2 细胞 48h 后细胞形态的变化(200 $\times$)



空白组 健脾消癥方组
图 2 健脾消癥方作用 HepG2 48h 后细胞超微形态的变化(8000 $\times$)



空白组 健脾消癥方小剂量组 健脾消癥方大剂量组
图 3 健脾消癥方作用 HepG2 细胞 48h 后 ROS 水平的变化(100 $\times$)



空白组 健脾消癥方小剂量组 健脾消癥方大剂量组 阳性对照组
图 4 健脾消癥方对肝癌细胞 HepG2 凋亡相关蛋白的影响

表 3 健脾消癥方对肝癌细胞 HepG2 凋亡相关蛋白灰度比值的影响

	空白组	健脾消癥方小剂量组	健脾消癥方大剂量组	阳性对照组
caspase3/β-actin	0.02	0.23	0.30	0.62
caspase9/β-actin	0.09	0.15	0.29	0.78

研究表明,超过 50%的肿瘤细胞存在凋亡缺陷,导致本该死亡的细胞被保留下来,其中异常突

变的细胞死亡下降,形成肿瘤^[5]。2011年,cell杂志把“抵抗细胞死亡”列为肿瘤十大生物学特征之一^[6]。细胞凋亡时,细胞形态结构会发生明显变化:细胞皱缩,染色质浓缩聚集核膜下,呈新月或碎片状;胞浆浓缩,内质网呈泡状扩张;线粒体和溶酶体保持完整;包膜内陷,将细胞分割成多个凋亡小体。细胞成分不外溢,细胞完整性未明显破坏,不引起周围组织炎症反应。因此,借助显微镜对细胞进行形态学观察,是明确细胞是否发生凋亡的重要检测方法。本实验中,Hoechst 33342染色后,镜下可见健脾消癥方组 HepG2 细胞出现典型凋亡改变。电镜也证实,健脾消癥方大剂量组 HepG2 细胞呈典型凋亡改变。以上实验证实,健脾消癥方可以诱导 HepG2 细胞的凋亡。

凋亡发生早期,线粒体功能下降,呼吸链缺陷,活性氧产生增加,线粒体膜脂质过氧化作用增强,破坏线粒体膜完整性,膜电位下降,诱使细胞膜间隙中的多种凋亡因子释放,进一步促进细胞凋亡^[7]。本实验通过 DCFH-DA 探针检测健脾消癥方对肝癌细胞 HepG2 中 ROS 水平的影响,结果表明,健脾消癥方作用 HepG2 48h 后 ROS 荧光强度明显高于空白组,证实健脾消癥方能升高肝癌细胞内活性氧的浓度。

在细胞凋亡中,非受体依赖型凋亡是指细胞受到刺激时,一些促凋亡蛋白,如 Cytochrome C 等,从线粒体释放入胞浆,活化 caspase-9,继而诱导活化下游 caspase-3,引发凋亡程序^[8]。因此,凋亡最终执行者主要是细胞内的效应 caspase 家族^[9]。本次实验 Western blot 表明,健脾消癥方能浓度依赖性地下调肝癌细胞中 Caspase-3、Caspase-9 的表达。

综上所述,我们认为健脾消癥方对 HepG2 有良好的诱导凋亡的作用,其作用机制可能与健脾消癥方增加细胞 ROS 水平及下调 Caspase-3、Caspase-9 蛋白有关。下一步,我们将在动物体内验证该复方

对肝癌的抑制作用及机制,并完善其对凋亡相关的信号通路影响的研究,为探索健脾消癥方对肝癌的治疗提供参考。

参考文献

- [1] CHEN W,ZHENG R,BAADE P D,et al.Cancer statistics in China,2015[J].CA Cancer J Clin,2016,66(2):130.
- [2] THORGEIRSSON S S,LEE J S,GRISHAM J W.Molecular prognostication of liver cancer:end of the beginning[J].J Hepatol,2006,44(4):803.
- [3] 陈建国.中国肝癌发病趋势和一级预防[J].临床肝胆病杂志,2012,28(4):257.
- [4] 王歌.王瑞平治疗原发性肝癌经验[J].中医杂志,2013,54(2):152.
- [5] ALTIERI D C.Survivin,cancer networks and pathway-directed drug discovery[J].Nat Rev Cancer,2008,8(1):61.
- [6] HANAHAN D,WEINBERG R A.Hallmarks of cancer:the next generation[J].Cell,2011,144(5):646.
- [7] CLIPPINGER A J,BOUCHARD M J.Hepatitis B virus HBx protein localizes to mitochondria in primary rat hepatocytes and modulates mitochondrial membrane potential[J].J Virol,2008,82(14):6798.
- [8] Qin L I,Guo Y L,Zhen L I,et al.The interference of picroside II on the expressions of Caspase-3 and PARP following cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J].Chinese Pharmacological Bulletin,2010,26(3):342.
- [9] NAOGHARE P K,KI H A,PAEK S M,et al.Simultaneous quantitative monitoring of drug-induced caspase cascade pathways in carcinoma cells[J].Integr Biol(Camb),2010,2(1):46.

第一作者:吴坚(1983—),女,博士研究生,助理研究员,研究方向为中医肿瘤基础与临床。

通讯作者:叶柏,医学硕士,主任医师,硕士研究生导师。yeb1961@163.com

收稿日期:2016-10-14

编辑:吴宁



编辑部现有《江苏中医药》1990—2016年期间各年度的合订本,价格分别为90元/本(1990—2008年)和114元/本(2009—2016年),邮购另加邮资23元/本。欢迎选购。地址:江苏省南京市汉中路282号,邮编:210029,电话:025-86612950。

《江苏中医药》编辑部