

臭牡丹总黄酮介导 Wnt/ β -catenin 信号转导 诱导人肝癌细胞 HepG2 的凋亡

胡 琦 谭小宁 余 娜 朱 沛 陈思勤 朱克俭

(湖南省中医药研究院附属医院,长沙,410006)

摘要 目的:探讨臭牡丹总黄酮诱导肝癌细胞凋亡的作用及机制。方法:体外培养 HepG2 细胞,流式细胞术检测臭牡丹总黄酮对细胞凋亡的影响;RT-PCR 法检测臭牡丹总黄酮作用于 HepG2 细胞 48 h 后对 β -catenin、Tcf-4、CD44v6 mRNA 表达的影响。结果:流式细胞术结果显示:随着臭牡丹总黄酮剂量的增加,细胞凋亡比例亦相应增加。PT-PCR 结果显示不同剂量臭牡丹总黄酮作用下 β -catenin、Tcf-4、CD44v6 mRNA 的表达均降低,与对照组相比具有统计学意义。结论:臭牡丹总黄酮诱导 HepG2 凋亡,能下调 β -catenin、Tcf-4、CD44v6 基因的表达,其作用机制可能与调控 Wnt/ β -catenin 信号通路并抑制其关键基因有关。

关键词 臭牡丹总黄酮;肝癌;Wnt/ β -catenin 信号通路;凋亡

Research on the Medicate Effect of Clerodendron Bungei Flavonoids on Wnt/ β -catenin in Inducing the Apoptosis of HepG2

Hu Qi, Tan Xiaoning, Yu Na, Zhu Pei, Chen Siqin, Zhu Kejian

(Affiliated Hospital of HuNan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, China)

Abstract Objective: To discuss the apoptotic effect of Clerodendron bungei flavonoids on liver tumor cells and the possible mechanism. **Methods:** To culture HepG2 cells in vitro, and investigate the apoptotic effect of clerodendron bungei flavonoids on by flow cytometry. The mRNA expression levels of proteins β -catenin, Tcf-4 and CD44v6 of HepG2 tumor cells were detected by RT-PCR after 48h treatment of flavonoids. **Results:** Flow cytometry indicates that along with the rising dose of Clerodendron bungei flavonoids, the apoptosis rate of HepG2 cancer cells begin to grow. After 48h treatment of flavonoids, the mRNA expression levels of proteins β -catenin, Tcf-4 and CD44v6 of HepG2 tumor cells were down-regulated significantly, and compared with the control group, significant difference exist. **Conclusion:** Clerodendron bungei flavonoids can induce the apoptosis of HepG2 tumor cells and decrease the mRNA expression levels of proteins β -catenin, Tcf-4 and CD44v6. This might relate to its regulating effect on Wnt/ β -catenin pathway and inhibit the key gene's expression.

Key Words Clerodendron bungei flavonoids; Liver cancer; Wnt/ β -catenin pathway; Apoptosis

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.06.004

肝癌是我国仅次于肺癌的第2大癌症杀手。近年来中医药在我国肝癌防治研究方面发挥着越来越重要且独特的作用。臭牡丹是根据著名中医药学家欧阳锜研究员,发掘湖南民间治疗恶性肿瘤单方,通过多年的反复临床、科研实践筛选出来并习用的一味中草药。其性平,味辛、苦,具有健脾养血、解毒散瘀之效。前期研究表明,臭牡丹具有镇痛、催眠、抑菌、抗炎及抗肿瘤的药理作用^[1]。其茎叶含有大量黄酮成分,目前分离出来的黄酮类化合物有明显抗肿瘤活性^[2-3],但其抗肿瘤机制相关研究颇少。Wnt/ β -catenin 信号通路作为细胞信号转导系统之一,参与肿瘤发生发展的机制涉及细胞凋亡等多方

面。本研究选择人肝癌细胞 HepG2 细胞株为实验对象,观察臭牡丹总黄酮对 HepG2 细胞凋亡以及对 Wnt/ β -catenin 信号传导通路的影响,以从一定角度探讨臭牡丹总黄酮抗肝癌的具体机制。

1 材料

1.1 药物 臭牡丹饮片湖南省中医药研究院附属医院中药房提供,经湖南省中医药研究院中药研究所鉴定、提取。提取采用溶剂萃取法,取臭牡丹地上部分,加入10倍量蒸馏水煮沸20 min后过滤,剩余残渣再用蒸馏水加热提取,将两次滤过液合并,浓缩后用3倍量95%乙醇静置48 h后,减压过滤并回收滤液中乙醇至无醇味。溶液依次使用氯仿、乙酸乙

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81503452)

通信作者:谭小宁(1987—),女,助理研究员,研究方向:中药抗肿瘤成分及其作用机制;朱克俭(1955.12—),男,研究员,研究方向:内科疑难病证辨治方法,E-mail:0731zkjo@263.net

酯、正丁醇萃取,取乙酸乙酯提取液浓缩、干燥。干膏粉黄酮总含量 65%,1 g 相当于生药 30 g。

1.2 试剂 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);0.25% 胰蛋白酶(美国 Amresco 公司);胎牛血清(上海博谷生物科技有限公司);MTT(德国 biomol 公司);二甲基亚砷(德国 biomol 公司产品);Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(凯基生物);逆转录试剂盒(Fermentas);Trizol(Invitrogen)。

1.3 细胞 人肝癌细胞株 HepG2,由中南大学细胞中心提供,于湖南省中医药研究院附属医院中心实验室传代培养。

1.4 设备 超净工作台(上海净化设备厂);二氧化碳孵箱(德国 Heraeus 公司);22R 型低温高速离心机(知信仪器);流式细胞仪(美国 BD 公司);荧光定量 PCR 仪(Roche 480)。

2 方法

2.1 人肝癌细胞株 HepG2 的体外培养 HepG2 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中,于 37 ℃,5% CO₂ 条件下恒温恒湿培养箱中培养。根据细胞生长情况,细胞汇合率达 70% ~ 80%,待细胞生长达饱和状态时,进行消化传代,选择对数生长期细胞进行实验。

2.2 药物配制 准确称取 50 mg 臭牡丹总黄酮,溶于 2 mL 二甲基亚砷(DMSO)溶液中,滤器过滤,得储液为 25 mg/mL。用完全培养基稀释成工作浓度:10 μg/mL,25 μg/mL,40 μg/mL。

2.3 流式细胞术检测臭牡丹总黄酮对 HepG2 细胞凋亡作用的影响 实验分为空白组,臭牡丹总黄酮低剂量组(10 μg/mL)、臭牡丹总黄酮中剂量组(25 μg/mL)、臭牡丹总黄酮高剂量组(40 μg/mL),用不含 EDTA 的胰酶消化收集,用 PBS 洗涤细胞 2 次,每次 2 000 r/min 离心 5 min,收集约 1 ~ 5 × 10⁵ 细胞,加入 500 μL 的 Binding buffer 悬浮细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μL Propidium Iodide,混匀,室温、避光,反应 5 ~ 15 min,在 1 h 内用流式细胞仪观察检测细胞凋亡情况。

2.4 荧光定量 PCR 检测臭牡丹总黄酮对 Wnt/β-catenin 通路中关键因子 β-catenin, Tcf-4, CD44v6 基因表达的影响 将空白组、低剂量组(10 μg/mL)、高剂量组(40 μg/mL)细胞收集,Trizol 提取细胞总 RNA,紫外分光光度计测定提取的总 RNA 浓度,以组织总 mRNA 为模板,逆转录成 cDNA,逆转录反应体系 20 μL(0.2 mL 无酶 PCR tube 管):1 μL RNA,1 μL Random primer,10 μL 无菌 DEPC 处理水,70 ℃

加热 5 min,迅速插入冰中冷却。再依次加入:4 μL 5 × Reaction buffer,2 μL dNTP,1 μL RNase inhibitor、37 ℃ 加热 5 min。再加入:1 μL M-MLV 逆转录酶(200units),42 ℃,1.5 h;72 ℃ 反应 10 min。所得 cDNA 于 -20 ℃ 冻存。

SYBR 法检测基因表达,实时定量 PCR(每个样本每个指标 3 个孔,共 30 μL 体系,每孔 10 μL)体系组成:1 μL cDNA,0.5 μL Primer A(10uM),0.5 μL Primer B(10uM),15 μL 2X SYB GREEN PCR Master Mix,13 μL PCR H₂O。反应条件:95 ℃ 10 min,95 ℃ 10 s,59 ℃ 50 s,读板,共 40 个循环。引物序列见下表 1。

表 1 引物序列

actin-F;	5'-CATCTGCGCTCTGGACCTGG-3'
actin-R;	5'-TAATGTCACGCACGATTTC-3'
β-catenin-F;	5'-GCCAAGTGGGTGCTATAGAGG-3'
β-catenin-R;	5'-CGGGACAAAGGGCAAGAT-3'
CD44V6-F;	5'-GTCACAGACCTGCCCAATG-3'
CD44V6-R;	5'-CCTCCTGAAGTGCTGCTCC-3'
Tcf-4-F;	5'-CAGAAGGCAGAGCGTGAG-3'
Tcf-4-R;	5'-TTTGAAAGCCTCGTTGATGT-3'

2.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件。计量样本采用 *t* 检验比较,不符合正态分布的样本采用秩和检验;计数样本采用秩和检验,构成比之间比较用 χ^2 检验,检验水平 $P < 0.05$ 。

3 结果

3.1 臭牡丹总黄酮对 HepG2 凋亡的影响 流式细胞仪观察结果显示用不同浓度臭牡丹总黄酮干预后,细胞凋亡比例发生相应变化,低、中、高剂量组的凋亡比例分别为:(16.33 ± 4.73)%、(21.36 ± 8.44)%、(15.42 ± 13.48)%,其中中剂量臭牡丹总黄酮干预后凋亡比例最大,与正常对照组(5.84 ± 2.33)% 比较有统计学意义($P < 0.01$),提示臭牡丹总黄酮可以促进 HepG2 细胞凋亡(见图 1,图 2)。

3.2 臭牡丹总黄酮对 β-catenin、Tcf-4、CD44v6 基因表达的影响 β-catenin、Tcf-4、CD44v6 及 actin 的实时荧光扩增曲线图提示扩增曲线基本拟合较好,表明各组 PCR 反应体系稳定可靠;β-catenin、Tcf-4、CD44v6 及 actin 的实时荧光溶解曲线图均有单一主峰,且重复多次所得到的溶解温度均值上下不超过 1 ℃,表明扩增产物具有特异性。

各组 HepG2 细胞 β-catenin、Tcf-4 和 CD44v6 mRNA 表达量,分析显示总的组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步两两比较发现:与空白组比较,臭牡丹总黄酮高剂量组 β-catenin、Tcf-4 mRNA

的表达水平明显下调($P < 0.01$),低剂量组 β -catenin、Tcf-4 和 CD44v6 mRNA 的表达水平轻度下调(P

< 0.05)。提示臭牡丹总黄酮可降低 β -catenin、Tcf-4 和 CD44v6 mRNA 的表达水平(见图3)。

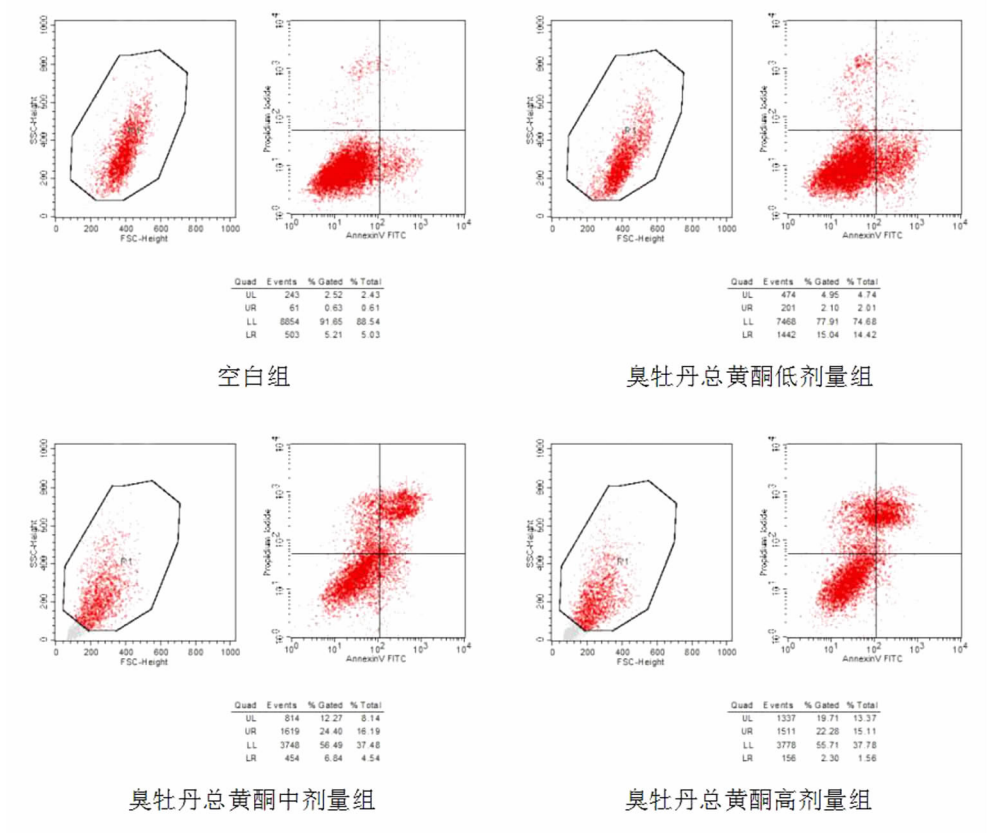


图1 流式细胞术检测 HepG2 凋亡图

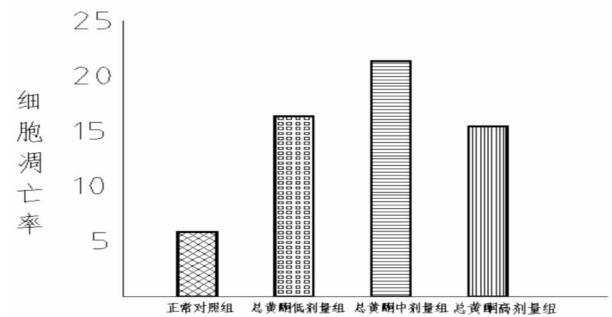


图2 不同剂量臭牡丹总黄酮对 HepG2 细胞凋亡率的影响

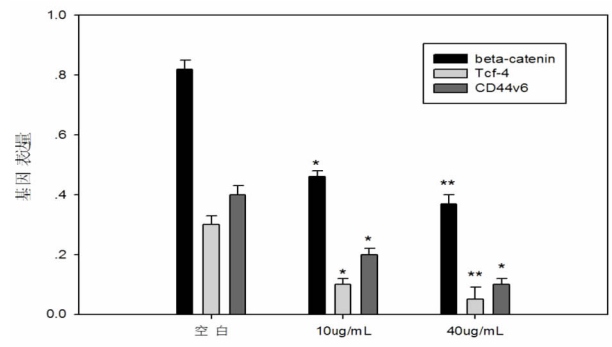


图3 不同质量浓度的臭牡丹总黄酮对 HepG2 细胞 β -catenin、Tcf-4 和 CD44v6 mRNA 的表达 mRNA 表达的影响

4 讨论

自 1963 年美国化学家瓦尼 (M. C. Wani) 和沃

尔 (Monre E. Wall) 首次从太平洋杉 (Pacific Yew) 的树皮和木材中分离到的紫杉醇粗提物对离体培养的鼠肿瘤细胞有较高活性开始,随着现代医学对肿瘤治疗理念的深入与改变,植物有效成分等天然药物提取物越来越受到肿瘤学家与药理学家的高度重视。

国内外相关研究证实,臭牡丹具有良好抗肿瘤活性,且其不良反应小,因此具有良好应用前景。其茎叶含有大量黄酮成分,臭牡丹目前分离出来的黄酮类化合物具有明显抗肿瘤活性。黄酮类发挥抗肿瘤作用主要通过以下途径:对细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDKS) 产生抑制、对蛋白质磷酸化和去磷酸化过程进行调节、逆转肿瘤细胞多药耐药、诱导细胞凋亡等^[4-5]。

细胞凋亡是一种细胞主动性死亡模式,在肿瘤的形成和演变过程中起着重要的作用^[6]。Wnt/ β -catenin 信号传导途径作为与肿瘤密切相关的经典通路,与人类多种癌症的发病过程都密切相关。肝细胞癌的产生、发展与 Wnt/ β -catenin 信号通路关系密切。Wnt/ β -catenin 信号通路影响细胞行为的作用主要和调节 TCF 家族的 DNA 结合蛋白转录性质有关,胞质内 β -catenin 表达稳定是其核心。 β -cate-

nin 作为通路中的关键因子,一方面其表达程度与肝癌的发生发展及转移呈正相关,另一方面其可以激活下游转录因子 4 (Tcf-4)^[7] 基因和靶基因之一的 CD44v6 基因^[8] 调节细胞凋亡、细胞周期以及细胞黏附等肿瘤发生的多种机制。

本研究通过流式细胞检测得出的臭牡丹总黄酮处理 HepG2 细胞后细胞凋亡率明显增加。不同浓度臭牡丹总黄酮分别干预 HepG2 细胞 48 h 后,发现随药物浓度的增加, β -catenin、Tcf-4、CD44v6 表达下降程度越高,说明臭牡丹总黄酮可以抑制 β -catenin 的表达,进而抑制相关因子 Tcf-4 和 CD44v6 转录而发挥其抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡的作用,表明臭牡丹总黄酮抗肝癌 HepG2 的机制可能与阻碍 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

参考文献

- [1] 马玲,彭丽花. 中药臭牡丹与气道高反应[J]. 现代中西医结合杂志,2009,18(26):3264-3266.
- [2] 常徽. 植物黄酮抗肿瘤研究进展[J]. 国外医学,2006,33(5):

296-300.

- [3] 杨博,李志裕,尤启冬. 黄酮类化合物的抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 药学进展,2008,32(9):391-397.
- [4] Motoo Y, Sawabu N. Antitumor effects of saikosaponins, baicalin and baicalein on human hepatoma cell lines[J]. Cancer Lett, 1994, 86(1):91-95.
- [5] 绳娟,杨振,姜红柳,等. 黄芩总黄酮对 S180、Hep-A-22 和 Bcap-37 肿瘤细胞的抑制作用[J]. 吉林大学学报,2008,34(3):401-404.
- [6] Lin L, Wang P, Zhao XL. Study on curcumin-induced apoptosis in ovarian cancer resistant cell lines COC1/DDP[J]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2012, 43(3):335-339.
- [7] Zhang CY, Zhang L, Yu HX, et al. Curcumin inhibits the metastasis of K1 papillary thyroid cancer cells via modulating E-cadherin and matrix metalloproteinase-9 expression[J]. Biotechnol Lett, 2013 Mar 9. [Epub ahead of print].
- [8] Sun H1, He S, Wen B, et al. Effect of Biejiajian Pills on Wnt signal pathway molecules β -catenin and GSK-3 β and the target genes CD44v6 and VEGF in hepatocellular carcinoma cells[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2014, 34(10):1454-1458.

(2016-05-25 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 953 页)

与证候积分差值 Pearson 相关亦均有统计学意义($P < 0.05$)。提示止痒与改善证候具有同步性,即对证与辨证治疗的必要性。瘙痒与阴虚风燥证各症及主、次症治疗前后积分或评分差值相关性分析结果则说明,瘙痒症状的改善与证候主症密切相关,这助于分析确定治疗药物的临床特点及定位。非典型症与典型症瘙痒与证候积分治疗前后变化相关性分析进一步论证了使用润燥止痒方对症处理时辨证准确与否的重要性。

综上所述,本临床研究采用对症处理与辨证论治相结合的方法,对润燥止痒方的止痒效应及其特点进行了评价,同时对中医证候结合评价对症处理药物疗效的临床研究模式进行了初步的探讨与实

践,希望能够为建立以证为主,证证或证或/及病结合的疗效评价模式提供有益的思路与方法。

参考文献

- [1] 朱克俭. 欧阳锜研究员病证结合诊疗经验[J]. 中国农村医学, 1996, 24(8):51-53.
- [2] 戴恩来. 病证结合,优势互补-构建中西医结合的临床基本模式[J]. 甘肃中医学院学报, 2013, 30(3):91-92.
- [3] 朱克俭. 中医新药适应病症(证)与方案设计有关问题探讨[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(2):73-76.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则(第三辑)[S]. 北京:中国医药科技出版社, 1997:99-100.
- [5] 陆德铭. 中医外科学(普通高等教育中医药类规划教材)[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1997:147-151.
- [6] 周长江, 钱学治. 现代临床医学诊断标准丛书·口腔、皮肤科疾病诊断标准[M]. 北京:科学出版社, 2001:348-350.

(2016-05-25 收稿 责任编辑:洪志强)