

本文引用:胡琦,蒋佳红,李游,邓知敏,石媛媛,卢丹阳,朱克俭.臭牡丹含药血清对人肝癌 MHCC97-H 细胞周期和凋亡的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(12):1444-1448.

臭牡丹含药血清对人肝癌 MHCC97-H 细胞 周期和凋亡的影响

胡琦¹,蒋佳红¹,李游¹,邓知敏¹,石媛媛¹,卢丹阳¹,朱克俭^{2*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南省中医药研究院附属医院,湖南长沙 410006)

[摘要] **目的** 观察臭牡丹含药血清对 B 淋巴细胞瘤/白血病-2(Bcl-2)和 Bcl-2 相关 x 蛋白(Bax)蛋白表达及人肝癌 MHCC97-H 细胞周期、凋亡的影响,探讨其抗肝癌的可能机制。**方法** 15%臭牡丹高、中、低剂量含药血清作用于 MHCC97-H 细胞,显微镜下观察细胞形态的变化;AnnexinV-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡;流式细胞仪检测细胞周期;Western blot 法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的变化。**结果** 不同剂量臭牡丹含药血清作用于细胞后,细胞形态发生稀疏杂乱、折光性增强等改变;流式细胞术结果显示,随含药血清浓度的增加,细胞的凋亡比例和 G2/M 期细胞比例亦相应增加,S 期细胞比例降低,中、高剂量组与模型组比较,差异显著($P<0.05$);Western blot 法结果显示不同浓度臭牡丹含药血清干预下各组 Bax 蛋白的表达水平上调,Bcl-2 蛋白的表达降低($P<0.01$)。**结论** 臭牡丹含药血清可以促进 MHCC97-H 肝癌细胞凋亡并阻止其细胞周期,机制可能与上调 Bax 蛋白,下调 Bcl-2 蛋白,影响 Bax/Bcl-2 比值有关。

[关键词] 臭牡丹;B 淋巴细胞瘤/白血病-2;Bcl-2 相关 x 蛋白;细胞周期;细胞凋亡

[中图分类号]R285.5;R735.7;R73-3 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.12.005

Effects of Drug-containing Serum of *Clerodendrum Bungei* on Cell Cycle and Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma MHCC97-H

HU Qi¹, JIANG Jiahong¹, LI You¹, DENG Zhimin¹, SHI Yuanyuan¹, LU Danyang¹, ZHU Kejian^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of *Clerodendron Bungei* drug-containing serum on B lymphocyte/leukemia-2 (Bcl-2) and Bcl-2 related X protein (Bax) protein expression and cell cycle and apoptosis of human hepatocarcinoma MHCC97-H, and to explore its possible mechanism. **Methods** The medicinal serum of 15% *Clerodendron Bungei* high, medium and low dose drug-containing serum was applied to MHCC97-H cells. The changes in cell morphology were observed using a microscope; The apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI double staining method. The flow cytometry was used to detect cell cycle; Western blot was used to detect Bcl-2 and Bax protein expression. **Results** After different doses of *Clerodendron Bungei* drug-containing serum were acting on cells, and the cell morphology was sparse and disordered, and the refractive index was enhanced. The results of flow cytometry showed that with the increase of serum concentration, the proportion of cells in apoptosis and the proportion of cells in G2/M phase increased, and the proportion of cells in S phase decreased. The difference

[收稿日期]2019-01-15

[基金项目]国家中医药管理重大项目(国中医药人教函[2012]228号);湖南中医药大学校级科研项目(2017XJJJ21);湖南中医药大学大学生创新创业项目(2019-71)。

[作者简介]胡琦,女,博士,讲师,研究方向:恶性肿瘤的中医药防治研究。

[通讯作者]*朱克俭,男,研究员,博士研究生导师,E-mail:zkjo0731@263.net。

between medium and high dose groups was significantly different from that of the model group ($P<0.05$). The results of Western blot showed that the expression levels of Bax protein in each group were up-regulated and the expression of Bcl-2 protein was decreased ($P<0.01$). **Conclusion** The drug-containing serum of *Clerodendron Bungei* can promote the apoptosis of MHCC97-H hepatoma cells and prevent its cell cycle. The mechanism may be related to up-regulating Bax protein, down-regulating Bcl-2 protein and affecting the ratio of Bax/Bcl-2.

[**Keywords**] *Clerodendron Bungei*; B cell lymphoma/leukemia-2; Bcl-2-associated X protein; cell cycle; apoptosis

肝癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,《全球癌症报告 2018》中数据显示,我国肝癌新增患病人数居世界首位,5 年实际生存率仅约为 33%,死亡人数高达全球死亡人数的 42%^[1]。目前肝癌治疗首选是手术,但因其起病隐匿、进展迅速,往往发现时就已是中晚期,失去手术机会,即使 10%~20%小部分行手术切除患者,术后复发的比例仍然高达 57%~81%,术后 2 年复发率甚至达 70%以上^[2]。所以寻找对肝癌低毒高效的药物是改善肝癌疗效及预后的重要研究方向之一。臭牡丹是我国著名中医药学家欧阳锜研究员发掘出的民间治疗恶性肿瘤单方,一直被湖湘欧阳氏杂病流派传承人习用于各种恶性肿瘤的治疗。其效活血散瘀、祛风解毒、消肿止痛,与肝癌“化瘀解毒、消瘤散结”的中医治疗原则相符合。课题组结合多年的临床经验和科研实践,通过前期体内外实验研究,发现臭牡丹可以抗肝癌的发生发展^[3-6],但细胞凋亡相关机制较少涉及,也罕见文献报道。本研究选取人肝癌 MHCC97-H 细胞株,从细胞凋亡因子 Bcl-2 和 Bax 为切入点,观察臭牡丹含药血清对肝癌 MHCC97-H 细胞凋亡和周期的影响并探讨其抗肝癌的可能机制,为其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

实验动物选取 20 只 6~8 周龄 SPF 级雄性健康 SD 大鼠,采购于湖南斯莱克景达实验动物公司,体质量控制在 250~280 g,动物许可证号:SYXK(湘)2013-0005。

1.2 细胞

人肝癌细胞株 MHCC97-H(库号:ZQ0020)采购于上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.3 药物

从湖南省中医药研究院附属医院中药房购臭牡丹饮片,依照《湖南省中药材标准》,鉴定为马鞭草科

大青属植物臭牡丹 *Clerodendrum bungei* Steud. 的地上部分。

1.4 主要试剂与仪器

胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号:10099141),胰酶消化液(碧云天公司,批号:C0201),DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号:11965-092),Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基,批号:KGA106),Bcl-2、Bax、 β -actin 抗体(美国 Proteintech 公司,货号分别为:60178-1-Ig、50599-2-Ig、60008-1-Ig)。电泳仪(美国 Bio-rad 公司,164-5050),DSZ2000X 倒置生物显微镜(中国北京中显恒业仪器厂),Cyto FLEX 流式细胞仪(美国 Beckman 公司),DYCZ-40A 转膜仪(中国北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 臭牡丹提取物的制备

用臭牡丹饮片适量,加水回流提取 2 次,第 1 次加 12 倍量水,浸泡 1 h,回流提取 1 h,第 2 次加 7 倍量水,回流提取 1 h,滤过,合并滤液,浓缩至每毫升相当于 2 g 生药,加入 95%乙醇,调整含醇量为 60%,沉淀 24 h 后进行抽滤,滤液回收乙醇至无醇味,继续浓缩至每毫升浸膏相当于 5 g 生药(经换算,每 1 g 浸膏相当于臭牡丹生药 4.14 g),灌装,灭菌,即得。

2.2 含药血清的制备

20 只雄性 SD 大鼠随机分成 4 组,每组 5 只。即模型组和臭牡丹提取物高、中、低剂量组。臭牡丹提取物根据 60 kg 成人体质量 0.5 g/kg 臭牡丹生药用量计算,高、中、低剂量分别为 2.18、1.09、0.55 g/kg,模型组给予生理盐水。小鼠每日进行 2 次灌胃,第 3 天末次给药 1 h 之后,乙醚进行常规麻醉,然后腹主动脉取血,分离血清。将同组大鼠血清混合均匀,过滤后储存以供之后实验使用。

2.3 细胞形态的观察

常规培养 MHCC97-H 细胞至对数生长期,次日加入 15%浓度的高、中、低剂量组含药血清进行培养,48 h 后显微镜下观察各组含药血清干预后细胞的形态学变化。

2.4 细胞凋亡的检测

待药物分别干预 48、72 h 后,用 PBS 洗后,过 300 目筛,重悬细胞于 Binding Buffer 中,加入 5 μ L Annexin V-FITC 及 Propidium Iodide 混匀,在避光条件下室温反应 5~15 min,1 h 内进行流式细胞仪检测。

2.5 细胞周期的检测

待药物干预细胞 72 h 之后,对细胞悬液进行收集,离心后得细胞沉淀,用 PBS 液洗涤 2~3 次,加入预冷的 100%乙醇 1.2 mL,使其终浓度为 75%,4 $^{\circ}$ C 放置过夜固定。固定后将乙醇溶液去掉,加入 PI(碘化丙啶)工作液 150 μ L,在 4 $^{\circ}$ C 避光条件下染色 30 min。转至流式检测管,进行检测。

2.6 Western blotting 测定 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达水平

待药物干预细胞 72 h 之后,严格遵照 BCA 蛋白定量试剂盒(Wellbio)的操作步骤进行实验,将细胞总蛋白进行分离和提取,用苯二甲苄基氯化铵蛋白浓度测定法对蛋白进行定量。用化学发光试剂曝光显影,扫描底片,蛋白相对表达量以灰度值比值表示。

2.7 统计学处理

SPSS 21.0 统计软件处理,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,并进行正态性及方差齐性检测,符合正态性及方差齐性则使用单因素方差分析,如不满足,则进行秩和检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 臭牡丹含药血清 MHCC97-H 细胞形态的影响

倒置显微镜下,模型组 MHCC-97H 细胞贴壁良好,胞浆丰富,呈多边形,相邻细胞生长融合成片;臭牡丹各组干预后,细胞形态发生变化,细胞变得稀疏杂乱、折光性增强,培养基中漂浮的细胞增多,中、高剂量组尤为明显。见图 1。

3.2 臭牡丹含药血清对 MHCC97-H 细胞凋亡的影响

高剂量组与模型组相比,MHCC97-H 细胞的凋

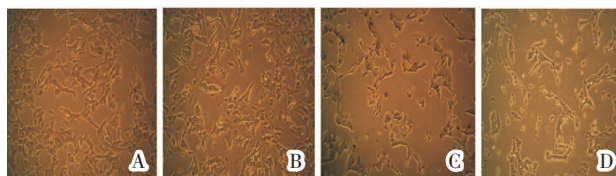
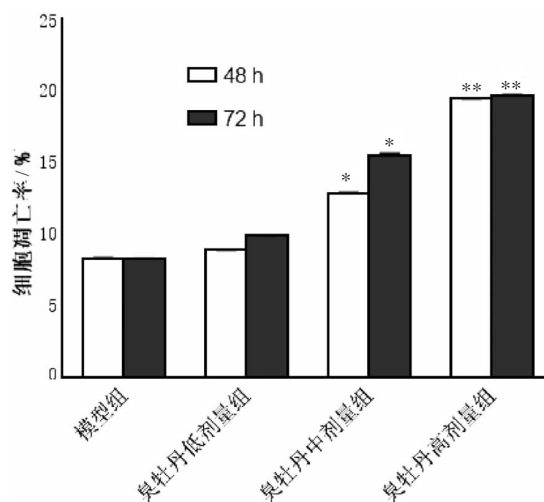


图 1 倒置显微镜下各组 MHCC97-H 细胞图像($\times 100$)

亡比例明显增加。相同剂量药物干预 48 h 和 72 h 诱导凋亡的效果差异不明显,模型组 48 h 和 72 h 的凋亡率分别为 8.35%、8.31%,与臭牡丹组各时间段最大凋亡率 19.48%、19.72%比较,差异显著($P<0.05$)。见图 2 和图 3。

亡比例明显增加。相同剂量药物干预 48 h 和 72 h 诱导凋亡的效果差异不明显,模型组 48 h 和 72 h 的凋亡率分别为 8.35%、8.31%,与臭牡丹组各时间段最大凋亡率 19.48%、19.72%比较,差异显著($P<0.05$)。见图 2 和图 3。



注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图 2 各组 MHCC97-H 细胞凋亡率比较

3.3 臭牡丹含药血清对 MHCC97-H 细胞周期的影响

臭牡丹含药血清干预后各剂量组 S 期细胞比例降低,与模型组比较,有显著差异($P<0.05$),中、高剂量组 G2/M 期细胞明显增多($P<0.05$)。各剂量组 G0/G1 期细胞与模型组比较,无明显变化,提示臭牡丹含药血清阻滞细胞由 G2/M 期进入 G0/G1 期,进一步减少 S 期,干扰 DNA 复制,从而抑制细胞增殖。见表 1。

3.4 臭牡丹含药血清对凋亡相关因子 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达的影响

Western blotting 结果显示,Bax 蛋白表达量显著增加,以中、高剂量组尤为明显($P<0.01$)。而 Bcl-2 蛋白的表达量均减少,高剂量组最为明显,与模型组相比差异显著($P<0.01$)。各给药组 Bax/Bcl-2 蛋白比值呈现上升趋势,与模型组比较,差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表 2 和图 4。

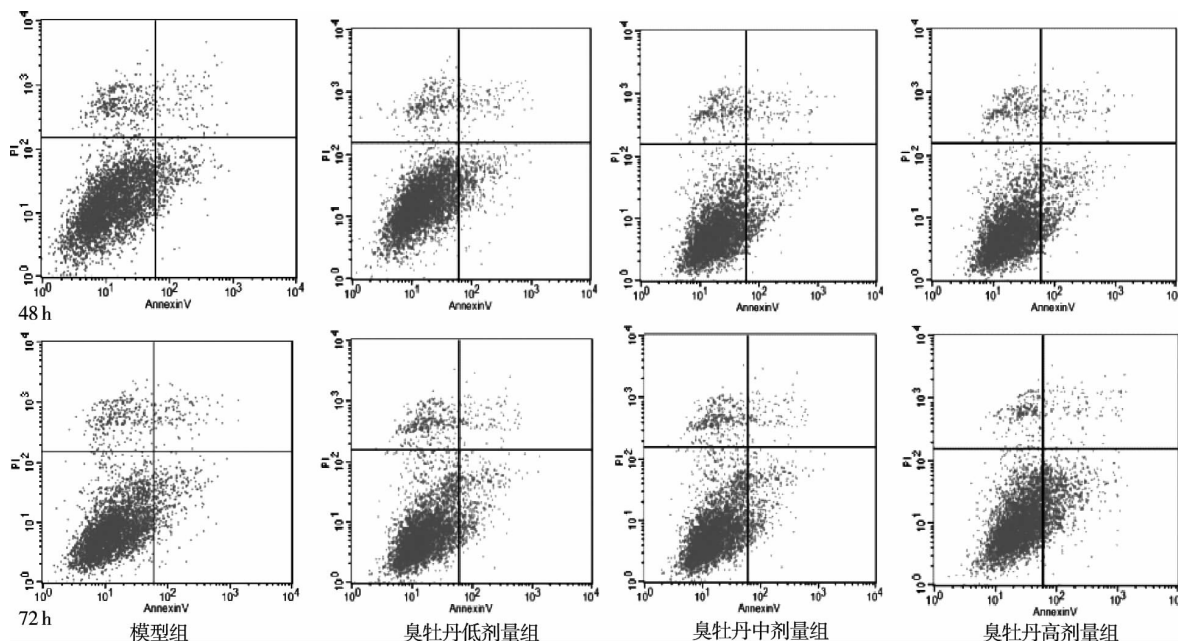


图 3 各组 MHCC97-H 细胞凋亡检测图

表 1 各组 MHCC97-H 细胞周期分布($\bar{x}\pm s, n=3$)

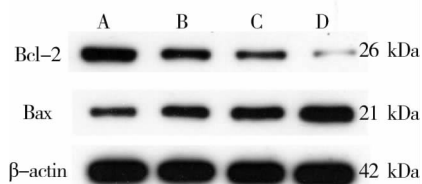
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	G0/G1/%	S/%	G2/M/%
模型组	-	42.94±1.87	37.93±1.01	19.97±1.49
臭牡丹低剂量组	0.55	44.61±1.63	34.09±1.06	21.65±1.89
臭牡丹中剂量组	1.09	39.39±0.78	33.74±1.02*	23.68±2.54*
臭牡丹高剂量组	2.18	46.35±0.92	29.23±2.61*	25.42±2.62*

注:与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01

表 2 各组 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin	Bax/Bcl-2
模型组	-	0.454±0.006	0.221±0.021	0.487±0.008
臭牡丹低剂量组	0.55	0.293±0.011*	0.381±0.025*	1.300±0.012**
臭牡丹中剂量组	1.09	0.201±0.004**	0.452±0.018**	2.249±0.014**
臭牡丹高剂量组	2.18	0.061±0.005**	0.623±0.023**	10.213±0.104**

注:与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01



注:A.模型组;B.臭牡丹低剂量组;C.臭牡丹中剂量组;D.臭牡丹高剂量组

图 4 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达电泳图

4 讨论

肝癌在全球恶性肿瘤中发病率居第 5 位,病死率居第 3 位^[7],因其发病快、发现难及预后差等特点,严重威胁人类健康。随着医学科学的不断发展,虽然一部分早期肝癌病人能得到妥善和规范的手术治疗。但是,由于大部分患者确诊时已到中

晚期,且大多伴有肝硬化等严重并发症,能够进行早期手术切除治疗者毕竟是小部分^[8]。近年来传统中医药治疗肿瘤方面显示出的独特优势而日益被重视,不仅可以改善肿瘤患者的症状、提高患者生活质量,而且在延长生存期方面有一定效果。研究初步提示许多单味中药都能一定程度抑制原发性肝癌的发生发展^[9]。臭牡丹是著名中医药学家欧阳錡研究员发掘,湖湘欧阳氏杂病流派传承人治疗恶性肿瘤的习用中药,具有“活血散瘀、祛风解毒、消肿止痛”之功,是符合肝癌中医用药原则的中草药。

近年来多项研究表明,肿瘤的发生、发展与细胞凋亡过程关系颇为密切,凋亡过程的异常可能导致或促进肿瘤的发生^[10-11]。Bcl-2 和 Bax 蛋白是细胞凋亡过程中的关键因子,在肝癌等多种肿瘤中表达异常,已成为当今多种抗癌药物的作用靶点之一^[12]。在有“死亡开关”之称的 Bax/Bcl-2 比值中,Bcl-2 基因可抑制细胞凋亡,而 Bax 基因作为 Bcl-2 的同源基因,能促进细胞凋亡,该比值在细胞接受刺激信号后是否存活起关键作用。换言之,Bcl-2/Bax 比值越低,细胞亡率高,反之,细胞生存率高。因此,无论是上调 Bax,或下调 Bcl-2 都可以促进包括肝癌在内的多种肿瘤细胞的凋亡^[13]。如郭芳等^[14]实验证明莪术醇能体内外诱导乳腺癌 MCF-7 细胞的凋亡,其机制与调控 Bcl-2 蛋白表达和 Bax 蛋白表达,下调 Bcl-2/Bax 比例有关;另有研究发现,乳腺癌、淋巴瘤及肝癌等多种恶性肿瘤的发生发展都与 Bcl-2 的异常表

达关系密切^[15-16];国外也有研究发现,敲除 Bax 等促凋亡基因后正常细胞发生癌变的几率大大增加^[17-18]。

根据前期研究基础和现状分析,在本实验中,我们从细胞凋亡角度探讨臭牡丹含药血清对 MHCC97-H 肝癌细胞周期、凋亡的影响。首先通过镜下观察 MHCC97-H 细胞形态的变化,然后检测细胞的周期和凋亡情况。结果显示,与模型组相比,臭牡丹含药血清组干预后,细胞出现稀疏杂乱、折光性增强等改变,且细胞凋亡率和 G2/M 期细胞比例亦相应增加,S 期细胞比例降低,提示臭牡丹含药血清可以有效抑制 MHCC97-H 肝癌细胞增殖,促进其凋亡并阻止其细胞周期。为进一步探讨其抑制肝癌细胞增殖并促进其凋亡的分子机制,我们通过对肿瘤细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达强度的检测,发现 Bax/Bcl-2 蛋白比值呈现上升趋势($P<0.01$),以高剂量组最为明显。初步提示臭牡丹提取物可能通过提高 Bax/Bcl-2 蛋白表达水平而促进肝癌细胞凋亡。课题组将更为深入和清晰的探讨臭牡丹抗肝癌的具体机制,为其治疗肝癌提供更充足的科学依据。

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]. A Cancer Journal for Clinicians, 2018, 68(6):394-424.
- [2] 宋书红,郭俊,邹灿.肝癌手术切除术后复发相关因素分析[J].实用肝脏病杂志,2017,20(2):203-206.
- [3] 胡琦,朱克俭,谭小宁,等.臭牡丹总黄酮对人肝癌 HepG2 细胞增殖作用的实验研究[J].湖南中医杂志,2015,4(2):166-168.
- [4] 胡琦,谭小宁,余娜,等.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[J].世界中医药,2016,6(2):954-957.
- [5] 胡琦,朱定耀,谭小宁,等.臭牡丹提取物对 H22 荷瘤小鼠体内抑瘤作用及机制研究[J].中国临床药理学杂志,2019,35(14):1459-1462.
- [6] 胡琦,朱定耀,谭小宁,等.臭牡丹提取物对 H22 荷瘤小鼠体内抑瘤作用及对相关蛋白表达的影响[J].药物评价研究,2019,42(7):1309-1313.
- [7] 诸佳瑜,陈闯,欧杰,等.中医辨证治疗原发性肝癌的研究进展[J].当代医药论丛,2017,15(10):32-34.
- [8] BATTETT M, NATHAN H, VANKAYALA H, et al. Recurrence of hepatocellular carcinoma at surgical incision site: case series and review of literature[J]. Ann R Coll Surg Engl, 2017, 99(6):77-119.
- [9] 林慧,梅全喜.单味中药及其复方制剂抗肿瘤血清药理学研究进展[J].中国药房,2016,27(4):550-552.
- [10] 郭慧敏,李祎亮,刘振.重楼皂苷 II 联合喜树碱对肺癌 H460、H446 细胞凋亡及信号通路的影响[J].天津中医药,2019,36(2):165-170.
- [11] WEINLICH R, OBERST A, BEERE H M, et al. Necroptosis in development, inflammation and disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017,18(2):127-136.
- [12] FAZEKAS B, CARTY M P, NEMETH I, et al. Hu COP1 contributes to the regulation of DNA repair in keratinocytes[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2017, 427(12):103-109.
- [13] LI H, LV B, KONG L, et al. Mediates resistance of rat pheochromocytoma cells to hypoxia-induced apoptosis via the Bax/Bcl-2/caspase-3 pathway[J]. International Journal of Molecular, 2017,40(4):1125-1133.
- [14] 郭芳,黎莉莉,臧林泉.莪术醇通过下调 Bcl-2 蛋白表达介导抗乳腺癌的机制研究[J].中国临床药理学杂志,2018,34(10):1175-1178.
- [15] KADERI M A, NORBERG M, MURRAY F, et al. The BCL-2 promoter (-938C>A) polymorphism does not predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia[J]. Leukemia, 2008,22(2):339-343.
- [16] WILLIARAS M M, COOK R S. Bcl-2 family proteins in breast development and cancer: could Mcl-1 targeting overcome therapeutic resistance[J]. Oncotarget, 2015,6(6):3519-3530.
- [17] EGGLE A, HARRIS A W, BOUILLET P, et al. Bim is a Suppressor of Myc-induced Mouse B Cell Leukemia[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Of America, 2004,101(16):6164-6169.
- [18] EISCHEN C M, ROUSSEL M F, KORSMEYER S J, et al. Bax loss impairs Myc-induced apoptosis and circumvents the selection of p53 mutations during Myc-mediated lymphomagenesis [J]. Molecular And Cellular Biology, 2001,21(22):7653-7662.