

黄荆子木脂素3对人肝癌HepG2细胞增殖的抑制作用及对蛋白激酶Akt、ERK1/2信号通路的影响

李一春^{1*}, 杨文军², 陈艳¹(1.南华大学附属第二医院妇产科, 湖南衡阳 421001; 2.南华大学附属第二医院普外科, 湖南衡阳 421001)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)33-3099-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.33.10

摘要 目的:研究黄荆子木脂素3对人肝癌HepG2细胞增殖的抑制作用,及其与丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(Akt)、细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)信号通路的关系。方法:以人肝癌HepG2细胞为研究对象,采用MTT法检测空白对照组和0.1、0.3、1.0、3.0、10.0、30.0 μmol/L黄荆子木脂素3组($n=3$)细胞作用48 h后的增殖抑制率;采用细胞计数法检测黄荆子木脂素3(10.0 μmol/L)组、5-氟尿嘧啶(5-FU, 10.0 μmol/L)组、溶媒(含0.1%二甲基亚砜的完全培养基)组、空白对照组($n=3$)细胞作用24、48、72 h后的活细胞数量;采用蛋白印迹法检测溶媒组、黄荆子木脂素3(10.0 μmol/L)组、磷脂酰肌醇3-激酶抑制剂LY294002(10.0 μmol/L)组及其混合组($n=3$)细胞作用24 h后的磷酸化(p-Akt)和p-ERK1/2蛋白表达。结果:与空白对照组比较,1.0~30.0 μmol/L黄荆子木脂素3组对细胞的抑制率明显升高($P<0.01$);与溶媒组和空白对照组比较,黄荆子木脂素3组作用不同时间的活细胞数量均明显减少($P<0.01$);与5-FU组比较,黄荆子木脂素3组作用72 h后的活细胞数量明显增加($P<0.01$);与溶媒组比较,黄荆子木脂素3组、LY294002组及其混合组细胞内p-Akt和p-ERK1/2蛋白表达均明显降低($P<0.01$),但后3组间差异无统计学意义。结论:黄荆子木脂素3呈浓度和时间依赖性抑制HepG2细胞的增殖,其机制可能与抑制Akt、ERK1/2蛋白磷酸化水平有关。

关键词 人肝癌HepG2细胞;黄荆子木脂素3;细胞增殖;丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶;细胞外调节蛋白激酶1/2;蛋白表达

Effects of *Vitex negundo* Lignans-3 on the Proliferation Inhibition of Human Hepatic Cancer HepG2 Cells and Protein Kinase Akt and ERK1/2 Signal Pathway

LI Yi-chun¹, YANG Wen-jun², CHEN Yan¹(1.Dept. of Gynaecology and Obstetrics, The Second Affiliated Hospital of University of South China, Hunan Hengyang 421001, China; 2.Dept. of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of University of South China, Hunan Hengyang 421001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study inhibitory effects of *Vitex negundo* lignans-3 on the proliferation of human hepatic cancer HepG2 cells, and relationship of it with Akt and ERK1/2 signal pathway. METHODS: Human hepatic cancer HepG2 cells were as subject, after 48 h treatment the inhibitory rate of cell proliferation was determined by MTT assay in blank control group and 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 and 30.0 μmol/L *Vitex negundo* lignans-3 group ($n=3$); the viable count of cells were determined by cell count assay in *Vitex negundo* lignans-3 (10.0 μmol/L) group, 5-FU (10.0 μmol/L) group, solvent (complete medium containing 0.1% DMSO) group and blank control group ($n=3$) after treated for 24, 48 and 72 h; after 24 h treatment, the expressions of p-Akt and p-ERK1/2 protein were determined by Western blotting assay in solvent group, *Vitex negundo* lignans-3 (10.0 μmol/L) group, phosphatidylinositol-3-kinase blocker LY294002 (10.0 μmol/L) group and mixture group ($n=3$). RESULTS: Compared with blank control group, the inhibitory rate of cells increased significantly in 1.0-30.0 μmol/L *Vitex negundo* lignans-3 groups ($P<0.01$); compared with solvent group and blank control group, the viable count of cells decreased significantly in *Vitex negundo* lignans-3 group after treated for different time ($P<0.01$); compared with 5-FU group, the viable count of cells increased significantly in *Vitex negundo* lignans-3 group after treated for 72 h ($P<0.01$); compared with solvent group, the expressions of p-Akt and p-ERK1/2 protein decreased significantly in *Vitex negundo* lignans-3 group, LY294002 group and mixture group ($P<0.01$), but there was no significant difference among the latter 3 groups. CONCLUSIONS: *Vitex negundo* lignans-3 inhibits the proliferation of HepG2 cells in concentration and time-dependent manner, associating with the inhibition of Akt and ERK1/2 protein phosphorylation.

KEY WORDS Human hepatic cancer HepG2 cells; *Vitex negundo* lignans-3; Cell proliferation; Akt; ERK1/2; Protein expression

随着人们对肿瘤分子机制认识的加深,许多抑制细胞增殖或促进细胞凋亡的分子已经成为肿瘤治疗的新靶点。生长因子的细胞内信号转导通路同肿瘤生长转移等密切相关,其中磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶体蛋白(Phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mammalian target

of rapamycin, PI3K/Akt/mTOR)信号转导通路的研究取得了一定成果。黄荆子(*Vitex negundo* L.)含有多种具有广泛生物学活性的化学成分,近年来,其所含的抗肿瘤活性成分得到了较深入的研究。有研究^[1]表明,从黄荆子中得到的黄酮类化合物如紫花牡荆素对多种肿瘤细胞有细胞毒作用。笔者前期实验^[2]也证实从黄荆子中得到的6种提取物(EVn-10、EVn-20、EVn-30、EVn-40、EVn-50、EVn-60)对人卵巢癌(CoC1)细胞的

*副主任医师,硕士。研究方向:妇科肿瘤。电话:0734-8899694。
E-mail: Lijichun2001@126.com

增殖具有不同程度的抑制作用,从黄荆子乙酸乙酯提取物中分级分离得到的黄荆子木脂素3(*Vitex negundo lignans-3*)具有抑制人肝癌HepG2细胞增殖的作用^[3],但机制不清楚。PI3K/Akt通路激活与细胞外信号调节激酶1/2(Extracellular signal-regulated kinase1/2, ERK1/2)的激活密切相关,因此本试验拟以Akt为靶点,研究黄荆子木脂素3的作用机制,为黄荆子木脂素3作为一种新型抗肝癌活性先导物的研发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

ELX-800型酶标仪(美国Bio-Tek公司);Alphaimager TM2200凝胶图像分析软件(美国Alpha Innotech公司)。

1.2 药品与试剂

黄荆子木脂素3[黄色粉末,中南大学药学院天然药物化学研究室周应军博士惠赠,化学名:6-羟基-4-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3-羟甲基-5-甲氧基-3,4-二氢(3*R*,4*S*)-2-醛基萘,分子量:354,纯度:>98%];二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司);5-氟尿嘧啶(5-FU)注射液(南通精华制药有限公司,批号:090608,规格:100 mg:10 ml);鼠抗人Akt、磷酸化(p-)Akt、 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体和兔抗人ERK1/2多克隆抗体以及山羊抗兔免疫球蛋白G(ImmunglobulinG, IgG)或山羊抗鼠IgG抗体均由美国Santa Cruz公司出品;LY294002(PI3K抑制剂,美国Calbiochem公司,批号:BCP0070,纯度:>99%)。

1.3 细胞

人肝癌HepG2细胞系购于中国典型培养物保藏中心(中国武汉市)。

2 方法

2.1 细胞培养

取HepG2细胞用含10%小牛血清的RPMI 1640培养基,置于5%CO₂、37℃、饱和湿度条件下培养,每2~3d传代1次,取对数生长期细胞,加入0.25%胰蛋白酶消化,用含10%小牛血清的RPMI培养基配成5 000 ml⁻¹的细胞悬液,接种于培养板中,每孔200 μ l,于37℃、5%CO₂、饱和湿度培养24 h。

2.2 细胞增殖活性检测

采用MTT比色法^[4]的方法,取对数生长期HepG2细胞,0.25%胰蛋白酶消化,用含10%小牛血清的RPMI培养基配成5 000 ml⁻¹的细胞悬液,接种于培养板中,每孔200 μ l,于37℃、5%CO₂、饱和湿度培养24 h。再分为空白对照组和0.1、0.3、1.0、3.0、10.0、30.0 μ mol/L黄荆子木脂素3组($n=3$),吸弃培养基,黄荆子木脂素3组换含终浓度为0.1、0.3、1.0、3.0、10.0、30.0 μ mol/L的黄荆子木脂素3的培养基,每孔200 μ l,空白对照组换含等体积溶剂的培养基,培养48 h。吸弃培养基,每孔加入200 μ l新鲜配制的含0.5 mg/ml MTT的无血清培养基,继续培养4 h,加入100 μ l的DMSO,振荡混匀,酶标仪检测570 nm波长处(参比波长450 nm)的光密度(OD)值。按公式计算黄荆子木脂素3对HepG2细胞的增殖抑制率[IR=(1-黄荆子木脂素3组OD值/空白对照组OD值) \times 100%],采用Prism程序计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.3 细胞活力检测

采用细胞计数法^[5],取对数生长期HepG2细胞,用完全培养基调整细胞浓度为2.0 \times 10⁴ ml⁻¹,以每孔1 ml接种于6孔板

中,再将其分为溶媒组、空白对照组($n=3$),每孔分别加入100 μ l的药液,使黄荆子木脂素3组、5-FU组终浓度分别为10.0 μ mol/L(黄荆子木脂素3)和10.0 μ mol/L(5-FU),溶媒组每孔加入同体积的含0.1% DMSO的完全培养基。细胞作用24、48、72 h后,台盼蓝染色,计数活细胞数(活细胞不着色,死细胞为淡蓝色),取平均数,绘制生长曲线。

2.4 蛋白表达检测

采用蛋白印迹法^[6],取对数生长期HepG2细胞分为溶媒组、黄荆子木脂素3(10.0 μ mol/L)组、LY294002(10.0 μ mol/L)组及其混合组,按“2.3”项下方法,加入对应的药液作用细胞24 h后,加细胞裂解液裂解,提取总蛋白,进行蛋白定量。每组取25 μ g蛋白样品加入等体积上样缓冲液,100℃加热10 min,10%或6%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后转移(100 mA,3 h)至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。用含5%脱脂牛奶的TBST室温下封闭2 h,分别加入适当浓度的Akt、p-Akt、ERK1/2、p-ERK1/2抗体,4℃孵育过夜,TBST洗膜3次,每次10 min,加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗抗体,室温孵育1 h后,TBST洗膜3次,每次15 min。化学发光剂显色、胶片显影,用凝胶图像分析软件测定各组细胞中p-Akt、p-ERK1/2蛋白表达的OD值。

2.5 统计学分析

各组数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用SPSS 15.0 for Windows evaluation软件,以One Way ANOVA行方差分析;均数间比较采用LSD法,以 $P<0.01$ 表示具有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞增殖情况

与空白对照组比较,1.0~30.0 μ mol/L黄荆子木脂素3组对HepG2细胞的IR明显升高($P<0.01$),黄荆子木脂素3的IC₅₀值为13.86 μ mol/L,提示黄荆子木脂素3抑制HepG2细胞增殖具有统计学意义,且呈浓度依赖性。各组细胞的IR比较见表1。

表1 各组细胞的IR比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab 1 Comparison of IR in each group($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	OD值	IR, %
空白对照组	1.064 \pm 0.026	0
0.1 μ mol/L黄荆子木脂素3组	0.957 \pm 0.031	6.45 \pm 0.19
0.3 μ mol/L黄荆子木脂素3组	0.908 \pm 0.019	9.67 \pm 0.56
1.0 μ mol/L黄荆子木脂素3组	0.707 \pm 0.030	22.22 \pm 0.32*
3.0 μ mol/L黄荆子木脂素3组	0.506 \pm 0.025	35.32 \pm 0.54*
10.0 μ mol/L黄荆子木脂素3组	0.487 \pm 0.016	43.29 \pm 0.44*
30.0 μ mol/L黄荆子木脂素3组	0.334 \pm 0.018	58.18 \pm 0.79*

与空白对照组比较: * $P<0.01$

vs. blank control group: * $P<0.01$

3.2 细胞活力评价结果

各组细胞作用不同时间后活细胞数量-时间曲线见图1。

由图1可知,黄荆子木脂素3对HepG2细胞作用强度与5-FU相当。

3.3 HepG2细胞中p-Akt、p-ERK1/2蛋白表达比较

溶媒组、LY294002组、黄荆子木脂素3组及其混合组HepG2细胞中p-Akt蛋白表达的相对OD值分别为1.000 \pm 0.033、0.879 \pm 0.014、0.935 \pm 0.007、0.815 \pm 0.012, p-ERK1/2蛋

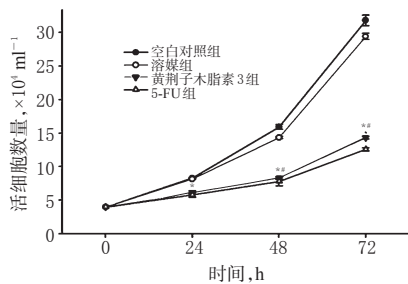


图1 各组细胞作用不同时间后活细胞数量-时间曲线
与溶媒组比较: * $P < 0.01$; 与5-FU组比较: # $P < 0.01$

Fig 1 The viable count of cells-time curves in each group after treated for different time

vs. solvent group: * $P < 0.01$; vs. 5-FU group: # $P < 0.01$

白表达的相对OD值分别为 1.000 ± 0.000 、 0.881 ± 0.023 、 0.942 ± 0.013 、 0.827 ± 0.024 。与溶媒组比较,其余3组HepG2细胞中p-Akt、p-ERK1/2蛋白表达均明显降低($P < 0.01$)。说明黄荆子木脂素3与LY294002具有相同的作用特性,能有效抑制HepG2细胞的Akt、ERK1/2蛋白活性。各组细胞中p-Akt、p-ERK1/2蛋白表达电泳图见图2。

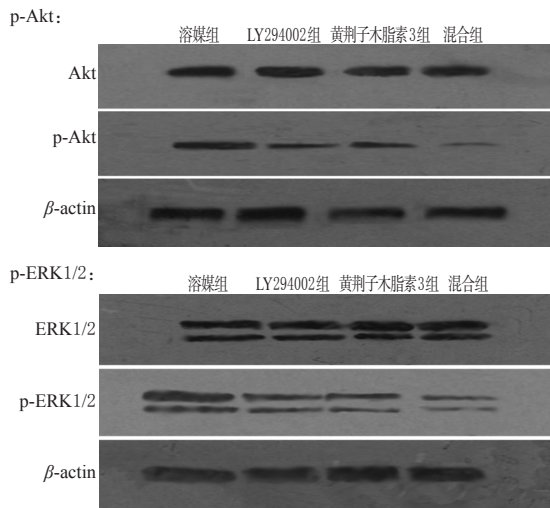


图2 各组细胞中p-Akt、p-ERK1/2蛋白表达电泳图

Fig 2 Electrophoretogram of p-Akt and p-ERK1/2 protein expression in each group

4 讨论

黄荆系被子植物马鞭草科的牡荆属植物,别名荆柴、牡荆和黄荆条,广泛分布于我国20余省,以秦巴山区资源最为丰富。黄荆果实(子)、叶、枝及根可入药,其味辛苦、性温,有清热解表、利湿解毒、止咳祛痰及缓解支气管痉挛的作用,主治感冒、咳嗽、哮喘、疟疾、中暑、风湿、跌打肿痛等。黄荆子是黄荆的果实,为载入《中国药典》的中药材品种^[7]。

PI3K/Akt/ERK信号通路的激活在癌症的发生、发展中起了重要的作用^[8-9]。Akt是一个在进化上高度保守的丝苏氨酸蛋白激酶,在人类消化道肿瘤中经常异常组成性激活。Akt异常激活意味着肿瘤细胞对于凋亡诱导的耐受,以及细胞增殖、生长、代谢的异常增加。在哺乳动物细胞中存在着3种Akt异构体(Akt1~3),这3种由不同基因编码的蛋白拥有80%的序列一致性,并且功能大部分相同。Akt被PI3K依赖激酶1

(PI3K-dependent kinase 1, PDK1)在催化区的苏氨酸308位点磷酸化,同时被另一个未知的PI3K依赖激酶2(PI3K-dependent kinase2, PDK2)在碳末端疏水区丝氨酸473位点磷酸化,这两个位点同时磷酸化是Akt激活的必要条件^[10]。激活的Akt又能够促进下游ERK1/2磷酸化,ERK1/2的激活可以活化一连串信号级联反应,从而促进细胞增殖。抑制PI3K的磷酸化可以阻碍下游Akt-ERK1/2信号通路的活化,从而促进细胞凋亡^[11-12]。本文结果显示,黄荆子木脂素3与LY294002均能有效抑制Akt和ERK1/2蛋白的磷酸化,两者合用存在增强效应,提示黄荆子木脂素3可能以不同于LY294002的作用方式阻断PI3K/Akt/ERK信号传导通路的功能发挥,从而抑制HepG2细胞的增殖。

参考文献

- [1] Diaz F, Chávez D, Lee D, *et al*. Cytotoxic flavone analogues of vitexicarpin, a constituent of the leaves of *Vitex negundo*[J]. *J Nat Prod*, 2003, 66(6): 865.
- [2] 杨文军,周应军,夏红,等.VBE-3对肝癌HepG2细胞生长的影响[J].湖南师范大学学报:医学版,2008,5(3):20.
- [3] 陈艳华.黄荆子活性成分木脂素-3对肝癌HepG2细胞增殖和凋亡的实验研究[J].免疫学杂志,2011,27(6):547.
- [4] Cao JG, Tang XQ, Shi SH. Multidrug resistance reversal in human gastric carcinoma cells by neferine[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(20): 3 062.
- [5] Tang XQ, Hu B, Feng JQ, *et al*. Effect of curcumin on multidrug resistance in resistant human gastric carcinoma cell line SGC7901/VCR[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(8): 1 009.
- [6] Chen GG, Lee JF, Wang SH, *et al*. Apoptosis induced by activation of peroxisome proliferator activated receptor-gamma is associated with Bcl-2 and NF-kappaB in human colon cancer[J]. *Life Sci*, 2002, 70(22): 2 631.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:252-253.
- [8] Sarkar S, Mazumdar A, Dash R, *et al*. ZD6474, a dual tyrosine kinase inhibitor of EGFR and VEGFR-2, inhibits MAPK/ERK and AKT/PI3K and induces apoptosis in breast cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(8): 592.
- [9] 唐静,祖旭宇.乳腺癌靶向治疗药物的研究进展[J].中国药房,2011,22(41):3 909.
- [10] Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?[J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 16): 2 903.
- [11] Zhang W, Xu W, Xiong S. Macrophage differentiation and polarization via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-ERK signaling pathway conferred by serum amyloid P component[J]. *J Immunol*, 2011, 187(4): 1 764.
- [12] 黄必义.LY294002对多药耐药急性白血病细胞株HL60/VCR的凋亡及细胞周期的影响研究[J].中国药房,2008, 19(22): 1 709.

(收稿日期:2012-12-11 修回日期:2013-02-25)