

黄芩素对人肝癌 HepG2 细胞生长的抑制作用

王 方*(解放军第 153 中心医院药剂科, 郑州 450042)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)47-4430-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.47.05

摘要 目的:研究黄芩素对人肝癌 HepG2 细胞生长的抑制作用。方法:在培养 HepG2 细胞的 96 孔板上加入药物,使黄芩素的终浓度分别为 0、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ (即对照组与黄芩素①、②、③、④组)。采用 MTT 法检测细胞的存活情况,分光光度法检测含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)-3、8、9 的活性,并检测丙二醛(MDA)含量,超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。结果:与对照组比较,培养 24、48、72 h 时,黄芩素②、③、④组各时间点的吸光度降低;培养 24 h 时,Caspase-3、8、9 活性增强,MDA 含量增加,SOD、GSH-Px 活性减弱,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论:黄芩素对 HepG2 细胞生长具有抑制作用,其机制与增强 Caspase-3、8、9 活性,增加 MDA 含量,减弱 SOD、GSH-Px 活性有关。

关键词 黄芩素;肝癌;HepG2 细胞;MTT 法;含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶;丙二醛;超氧化物歧化酶;谷胱甘肽过氧化物酶

Study on the Inhibitory Effect of Baicalein on the Growth of HepG2 Cell

WANG Fang (Dept. of Pharmacy, No. 153 Central Hospital of PLA, Zhengzhou 450042, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effect of baicalein on the growth of HepG2 cell. METHODS: The drugs were added into 96-well plate that cultivated HepG2 cells, so that the baicalein extract concentration were 0, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{mol/L}$ (namely blank control group and baicalein ①, ②, ③, ④ group). MTT method was adopted to detect cell inhibition ratio. Spectrophotometric method was adopted to detect the activity of Caspase-3, 8, 9; the content of MDA, the activity of SOD and GSH-Px were all determined. RESULTS: Compared with normal control group, the absorbance of baicalein group ②, ③, ④ decreased, the activity of 24 h Caspase-3, 8, 9, and the content of MDA increased; while the activity of SOD and GSH-Px decreased; there was statistical significance ($P < 0.01$). CONCLUSIONS: Baicalin can inhibit the growth of HepG2 cells. The mechanism is related to the increase of inhibition ratio, the activity of Caspase-3, 8, 9 and the content of MDA, and the decrease of the activity of SOD and GSH-Px.

KEYWORDS Baicalein; Liver cancer; HepG2 cell; MTT; Caspase; MDA; SOD; GSH-Px

黄芩素又名 5,6,7-三羟基黄酮、黄芩苷元、黄芩黄素、三羟黄酮,是自唇形科植物高黄芩(*Scutellaria altissima* L.)根部

的提取物,黄色针状结晶,分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$,分子质量为 270.24。黄芩素有多种药理活性,如抑菌^[1]、解热镇痛^[2-3]、保护

- [9] 宋书辉,徐旭,于冰,等.当归总苯酞活血化痰作用的实验研究[J].中草药,2012,43(5):952.
- [10] Yang F, Xiao YS, Zhang FF. High performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis of Radix Angelicae Scienis[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 41(11): 1 078.
- [11] Huang WY, Sheu SJ. Separation and identification of the organic acids in Angelicae Radix and Ligustici Rhizoma by HPLC and CE[J]. *J Sep Sci*, 2006, 29(17): 2 616.
- [12] Zuo AH, Wang L, Xiao HB, et al. Identification of the absorbed components and metabolites in rat plasma after oral administration of Rhizoma Chuanxiong decoction by HPLC-ESI-MS/MS[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 56(5): 1 046.
- [13] Wu YY, Wang L, Liu GX. Characterization of principal compositions in the roots of Angelica sinensis by HPLC-ESI-MSn and chemical comparison of its different parts [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2014, 23(6): 393.
- [14] 冯雪科,徐振文,温中明. UPLC-MS/MS 法同时测定人血浆中阿魏酸和芍药苷的含量[J]. 中国药房, 2014, 25(3): 218.
- [15] 梁静,徐风,尚明英,等. 赤芍化学成分没食子酸丙酯在大鼠体内的代谢研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(22): 3 970.
- [16] Liang J, Xu F, Zhang YZ, et al. The profiling and identification of the metabolites of (+)-catechin and study on their distribution in rats by HPLC/DAD-ESI-IT-TOF-MSn technique[J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(3): 401.
- [17] Jackson GM, Hosney RC. fate of ferulic acid in over-mixed wheat flour doughs: partial characterization of a cysteine-ferulic acid adduct[J]. *J Cereal Sci*, 1986, 4(1): 87.
- [18] Ru Y, Nga Ling Ko, Li, SL, et al. Pharmacokinetics and metabolism of ligustilide, a major bioactive component in rhizoma chuan xiong in the rat[J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36(2): 400.

* 副主任药师。研究方向:药学。电话:0371-60653550。
E-mail: yxk153happy@163.com

(收稿日期:2014-06-06 修回日期:2014-08-02)

损伤细胞等^[4]。有研究表明,黄芩素还具有一定的抗肿瘤活性^[5]。本研究通过黄芩素作用于肝癌 HepG2 细胞,探讨黄芩素对肝癌 HepG2 细胞的抑制作用及其机制。

1 材料

1.1 仪器

SW-GJ-2FD 型洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); Gallios 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司); Multiskan MK3 型酶标仪(美国 Thermo 公司); 二氧化碳(CO₂)培养箱(上海三腾仪器有限公司); 24、96 孔培养板(美国 Corning 公司); DMEM 培养基(美国 Gibco 公司)。

1.2 试剂

黄芩素对照品(中国药品生物制品检定研究院,批号: 0715-200112); 青霉素、链霉素、谷氨酰胺、胰蛋白酶、甲基噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)、胎牛血清(FBS)均购于美国 Sigma 公司; 超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)均购于南京建成生物工程研究所。

1.3 细胞株

人肝细胞癌 HepG2 细胞株源自美国模式菌种收集中心(ATCC)。

2 方法

2.1 细胞的培养

将 HepG2 细胞以 $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 接种于含 100 u/ml 青霉素、100 u/ml 链霉素、10 mmol/l Hepes 缓冲液、2 mmol/L L-谷氨酰胺的 DMEM 培养基中(pH 7.2), 37 °C、5% CO₂ 孵育。细胞为多角形贴壁生长,每 2~3 d 传代 1 次,取对数生长期的细胞株用于实验。

2.2 细胞存活率的检测

取对数生长期的 HepG2 细胞以 $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 接种于 96 孔板上,培养 24 h,待细胞贴壁后,分为 5 组,每组加入不同浓度的黄芩素 200 μl ,使黄芩素终浓度分别为 0、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ (即对照组与黄芩素①、②、③、④组)。分别培养 24、48、72 h 后,加入 MTT 20 μl /孔,置 CO₂ 培养箱中继续培养 4 h 后终止培养。小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 DMSO 150 μl ,充分振荡,使蓝紫色沉淀充分溶解。在 30 min 内用酶联免疫检测仪测定 570 nm 波长处的吸光度(A_{570})。不同时间点不同浓度的黄芩素对 HepG2 细胞增殖的抑制率=(对照组 A_{570} -用药组 A_{570})/对照组 $A_{570} \times 100\%$ 。以上实验重复 3 次。

2.3 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)-3、8、9 活性的检测

分组与药物浓度同“2.2”项下方法。HepG2 细胞培养 24 h 后,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 1 遍,加入 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)消化,制成细胞悬液,于 4 °C 下,以离心半径为 13.5 cm、4 000 r/min 离心 5 min,收集细胞,用 PBS 洗 1 遍,加入细胞裂解液(150 mmol/L NaCl、150 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA、1% Triton X-100, pH 8.0)使细胞裂解^[6]。于 4 °C 下,以离心半径为 13.5 cm、4 000 r/min 离心 1 h,

收集上清液,采用分光光度法检测 Caspase-3、8、9 的活性(具体过程按试剂盒说明完成),用酶标仪测定 405 nm 波长处的 A ,以此表示 Caspase-3、8、9 的相对活性。

2.4 MDA 含量和 SOD、GSH-Px 活性的检测

按“2.3”项下方法裂解细胞,收集上清液。参照说明书测定细胞内 MDA 含量和 SOD、GSH-Px 活性。SOD 活性单位:每 1 mg 组织蛋白在 1 ml 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 酶活力为一个酶活力单位(U); GSH-Px 活性单位:每 1 mg 蛋白质每分钟扣除非酶反应,使反应体系中 GSH 浓度降低 1 $\mu\text{mol/L}$ 为一个活力单位(U)。蛋白质定量采用考马斯亮蓝比色法测定。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件处理分析实验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,然后以 LSD 法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芩素对 HepG2 细胞的抑制作用

与对照组比较, HepG2 细胞培养 24、48、72 h 时,黄芩素、②、③、④组的 A 降低,差异有统计学意义($P < 0.01$); 各组细胞的抑制率随黄芩素浓度增大而升高。黄芩素对 HepG2 细胞的抑制作用见表 1。

表 1 黄芩素对 HepG2 细胞的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The inhibitory effect of baicalein on HepG2($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h		48 h		72 h	
	A	抑制率, %	A	抑制率, %	A	抑制率, %
对照组	0.625 ± 0.34	0	0.903 ± 0.42	0	1.569 ± 0.73	0
黄芩素①组	0.583 ± 0.16	6.72	0.854 ± 0.19	5.43	1.504 ± 0.41	4.14
黄芩素②组	0.347 ± 0.13*	44.48	0.416 ± 0.20*	53.93	0.632 ± 0.21*	59.72
黄芩素③组	0.275 ± 0.18*	56.00	0.377 ± 0.17*	58.25	0.579 ± 0.18*	63.10
黄芩素④组	0.208 ± 0.15*	66.72	0.281 ± 0.16*	68.88	0.425 ± 0.17*	72.91

与对照组比较: * $P < 0.01$

vs. control group: * $P < 0.01$

3.2 黄芩素对 HepG2 细胞 Caspase-3、8、9 活性的影响

与对照组比较,黄芩素②、③、④组的 Caspase-3、8、9 活性增强,差异有统计学意义($P < 0.01$)。黄芩素对 HepG2 细胞 Caspase-3、8、9 活性的影响见表 2。

表 2 黄芩素对 HepG2 细胞 Caspase-3、8、9 活性的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 The effect of baicalein on the activity of Caspase-3, 8, 9 in HepG2 cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9
对照组	100	100	100
黄芩素①组	109 ± 12	104 ± 9	107 ± 14
黄芩素②组	233 ± 18*	129 ± 8*	144 ± 11*
黄芩素③组	186 ± 15*	146 ± 10*	175 ± 12*
黄芩素④组	375 ± 16*	172 ± 11*	218 ± 16*

与对照组比较: * $P < 0.01$

vs. control group: * $P < 0.01$

3.3 黄芩素对 HepG2 细胞 MDA 含量和 SOD、GSH-Px 活性

的影响

与对照组比较,黄芩素②、③、④组的MDA含量增加,SOD、GSH-Px活性减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$)。黄芩素对HepG2细胞MDA含量和SOD、GSH-Px活性的影响见表3。

表3 黄芩素对HepG2细胞MDA含量和SOD、GSH-Px活性的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The effect of baicalcin on the MDA, SOD and GSH-Px levels of HepG2 cells($\bar{x} \pm s$)

分组	MDA, nmol/mg	SOD, U/mg	GSH-Px, U/mg
对照组	19.97 ± 5.34	182.17 ± 7.36	56.41 ± 4.34
黄芩素①组	22.48 ± 5.76	175.41 ± 6.93	53.57 ± 4.31
黄芩素②组	86.39 ± 7.35*	139.35 ± 5.22*	40.83 ± 3.25*
黄芩素③组	103.84 ± 9.07*	112.54 ± 5.85*	31.69 ± 3.40*
黄芩素④组	135.62 ± 11.28*	80.47 ± 6.45*	22.16 ± 4.19*

与对照组比较: * $P < 0.01$

vs. control group: * $P < 0.01$

4 讨论

目前,临床使用的抗肿瘤化学治疗药物均有不同程度的毒副作用,有些严重的毒副反应甚至限制了药物的临床使用。其在杀伤肿瘤细胞的同时,又杀伤正常组织的细胞,尤其是杀伤人体中生长发育旺盛的血液、淋巴组织细胞等。天然药物由于其临床毒副作用低,资源丰富,已成为肿瘤化疗替代药物的研究热点之一。本研究结果表明,黄芩素对人肝癌HepG2细胞具有明显的细胞毒作用,MTT实验表明,当黄芩素浓度在40~160 $\mu\text{mol/L}$ 范围内对HepG2细胞的生长具有明显的抑制作用。

细胞凋亡过程中Caspase家族的激活起着关键的作用^[7]。在细胞凋亡的信号传导中,Caspase处于凋亡诱导信号传导、Caspase级联反应、下游效应因子作用这一凋亡过程的中心位置。有研究发现,启动Caspase(如Caspase-8、9)和效应Caspase(如Caspase-3、7)分别参与上述凋亡的启动和执行过程^[8];而Caspase-9主要参与诱导线粒体损伤从而介导细胞凋亡。Caspase-3被称为执行者,Caspase-8、9被称为发起者^[9]。Caspase-8、9直接或间接激活下游的效应分子Caspase-3、6、7,再激活核酸内切酶,导致DNA片段化。本研究结果表明,黄芩素对人肝癌HepG2细胞Caspase-3、8、9具有增强作用,且黄芩素浓度在40~160 $\mu\text{mol/L}$ 范围内对HepG2细胞Caspase-3、8、9活性具有明显的增强作用。

MDA、SOD、GSH-Px均为体内氧化应激程度的经典指标,MDA含量、SOD、GSH-Px活性发生明显变化,表明HepG2细

胞的细胞核内DNA已外泄,且细胞内的脂质和酶系都发生了变化。本研究结果表明,黄芩素对人肝癌HepG2细胞MDA含量和SOD、GSH-Px活性均有影响,当黄芩素浓度在40~160 $\mu\text{mol/L}$ 范围内可增加HepG2细胞MDA含量,减弱SOD、GSH-Px的活性,从而直接导致细胞进一步损伤。

综上所述,黄芩素对HepG2细胞有抑制作用,对Caspase-3、8、9的活性有增强作用,可增加MDA含量,减弱SOD、GSH-Px活性。本研究结果对寻找更好的天然肿瘤化疗替代药物、促进肝细胞凋亡、提高肝癌治疗效果有一定的意义。

参考文献

- [1] 刘国华,张延敏.黄芩有效化学成分及抑菌作用分析[J].中国实用医药,2012,7(6):168.
- [2] 李倩楠,葛晓群.黄芩苷的解热作用及对细胞因子的影响[J].中国中药杂志,2010,35(8):1068.
- [3] 杨鹤松,刘延华,刘艳华,等.黄芩茎叶总黄酮对热刺激引起小鼠疼痛反应的抑制作用[J].承德医学院学报,2010,27(4):439.
- [4] 颜明,刘洁婷,李洪志,等.黄芩苷对 H_2O_2 诱导的SHSY-5Y细胞损伤的保护作用及其对Trx表达的影响[J].中国生化药物杂志,2012,33(5):574.
- [5] 毛捷,徐善水,盛莉莉,等.黄芩素的抗肿瘤作用及机制的研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2009,14(10):1178.
- [6] 王璇,黄波,李东阳,等.锌对人肝癌细胞氧化应激水平的影响[J].南华大学学报,2007,35(3):338.
- [7] Chen JC, Lu KW, Lee JH, et al. Gyp enosides induced apoptosis in human colon cancer cells through the mitochondria-dependent pathways and activation of caspase3[J]. *Anticancer Res*, 2006,26(6B):4313.
- [8] Liu XS, Zou H, Slauqter C, et al. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis[J]. *Cell*, 1997, 89(2):175.
- [9] Cain K, Bratton SB, Langlais C, et al. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes[J]. *J Biol Chem*, 2000,275(9):6067.

(收稿日期:2014-06-12 修回日期:2014-10-23)