

用户名: 密码:

登入

注册

▶ J Hepatol (中文版)

- 主委提示
- 学会活动
- ▶ 专家观点
- ▶ 国际学术动态
- ▶ 热点综述
- ▶ 热门话题
- ▶ 临床研究
- ▶ 流行病学
- ▶ 基础研究
- ▶ 研究快报
- ▶ 学术争鸣
- ▶ 新思维/好idea
- ▶ 好文推荐/奇文共析
- ▶ 指南讨论
- 学组镜像
 - 病毒性肝炎学组
 - 脂肪肝酒精性肝病
 - 肝衰竭及人工肝
 - 肝纤维化学组
 - 肝癌学组
 - 药物性肝病学组
- ▶ 病例报告
- ▶ 药物不良反应
- ▶ 会议精选
- 新书预告与推荐
- ▶ 基础医学与临床
- ▶ 继续教育
- ▶ 诊疗指南
- ▶ 专家会诊
- ▶ 基层声音
- 重点学科介绍
- 国外学会介绍

首页 -> [临床研究](#) -> 柴胡皂甙-d对HepG2细胞恶性表型的逆转作用

柴胡皂甙-d对HepG2细胞恶性表型的逆转作用

祝葆华 蒲荣 张国平 李明意 王兰天 苑进凯

【摘要】 目的 探讨柴胡皂甙-d (SSd) 对人肝癌细胞株HepG2细胞恶性表型的逆转作用及其机制。方法 常规培养HepG2细胞至对数生长期, 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法观察SSd不同浓度、作用不同时间对HepG2细胞增殖情况的影响。实验组选择10 mg/L的SSd作用HepG2细胞48 h, Giemsa染色法观察细胞形态学改变; 化学发光法测定细胞上清液中甲胎蛋白 (AFP) 浓度; 放射免疫法检测细胞上清液中白蛋白浓度; transwell小室实验观察细胞迁移率; RT-PCR检测p27基因mRNA表达。并与空白对照组做比较。数据在多组间比较采用随机分组单因素方差分析, 在两组间比较采用t检验。结果 10 mg/L的SSd作用48 h, 对HepG2细胞的生长抑制最明显 ($F = 265.06, P < 0.01$)。实验组HepG2细胞形态倾向于正常分化, 形态变小、变圆, 核变小、变圆或卵圆形, 核/质比例缩小。与对照组比较, 实验组穿膜细胞数明显减少[(50.60±4.04)个与(41.00±4.64)个, $t = -7.32, P < 0.01$]; 细胞上清液中白蛋白含量明显增多[(24.7±2.8)×10⁻³g/L与(31.1±4.9)×10⁻³g/L, $t = 7.83, P < 0.05$]; AFP含量明显减少[(118.2±15.6)×10³μg/L与(70.3±5.7)×10³μg/L, $t = -10.72, P < 0.01$]。实验组p27基因mRNA的相对表达量明显多于对照组 ($t = 22.00, P < 0.05$)。结论 SSd对人肝癌细胞株HepG2细胞恶性表型具有明显的逆转作用, 其机制可能与SSd上调HepG2细胞p27基因mRNA表达使其进入分化过程有关。

【关键词】 癌, 肝细胞; 恶性表型; 柴胡皂甙-d; p27

Effect of Saikosaponins-d on reversing malignant phenotype of HepG2 cells in vitro ZHU Bao-hua, PU Rong, ZHANG Guo-ping, LI Ming-yi, WANG Lan-tian, YUAN Jin-kai. Department of Surgery, the First Clinical School, Guangdong Medical College, Dongguan Guangdong Province 523808, China
Email: baohuazhu@126.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of SSd on reversing the malignant phenotype of HepG2 cells and to investigate its mechanism in order to prove that SSd is a new choice to prevent and treat HCC. Methods HepG2 cells were cultured and treated by different concentrations (0 mg/L, 2.5 mg/L, 5.0 mg/L, 10.0 mg/L and 20.0 mg/L) of SSd for 24 h, and treated by 10 mg/L of SSd for 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72h respectively. The cell inhibition rates were measured by MTT assay. Then cells were treated by 10 mg/L SSd for 48 hr in experimental group and treated by no SSd as a control, their morphological changes were observed by contrast phase microscope. The concentrations of ALB and AFP in clear supernatant liquid of cells were detected by radioimmunity and chemiluminescence. The cell migration rates were observed by transwell method, the relative expression levels of p27 mRNA were measured by RT-PCR. Results The inhibitive effect of 10 mg/L SSd was the most significant among different concentrations ($F = 265.06, P < 0.01$). The shape of HepG2 from experimental group turned into small and round, and their volume ratios of nucleus to plasma decreased. ALB in supernatant liquid of HepG2 was higher ($t = 7.83, P < 0.05$, and its AFP was lower ($t = -10.72, P < 0.01$) as compared to control group. Cells migrated were fewer and p27 mRNA expression of HepG2 was higher in experimental group than that in control group ($t = 22.00, P < 0.05$). Conclusion SSd could reverse the malignant phenotype of HepG2 cells. It was suggested that the up-regulation of p27 mRNA expression play an important role in the differentiation of HepG2 cells treated by SSd.

【Key words】 Carcinoma, hepatocellular; Malignant phenotype; Saikosaponins-d; p27

柴胡是具有抗肝癌作用的传统中草药之一, 柴胡皂甙-d (saikosaponin-d, SSd) 是其药理作用最强的三萜皂甙单体。通过诱导肝癌细胞分化逆转其恶性表型, 是肝癌防治研究的重要目标。有研究结果表明, SSd具有诱导肝癌细胞凋亡和逆转其多药耐药的作用[1-2]。目前, SSd对肝癌细胞恶性表型的影响尚鲜见报道。本研究观察了SSd对人肝癌细胞株HepG2细胞增殖、合成功能、侵袭能力及肿瘤细胞分化相关癌基因表达的影响, 探讨了其逆转肝癌细胞恶性表型的机制。

材料与方法

1.细胞株与试剂: 人肝癌细胞株HepG2细胞购自重庆医科大学病毒性肝炎研究所。SSd购自江西本草天工科技有限责任公司 (高效液相色谱检测纯度>98); RPMI 1640和胰蛋白酶购自美国Gibco公司;

新生牛血清购自杭州四季青生物材料工程公司；四甲基偶氮唑盐（MTT）购自北京华美生物工程公司。Trizol试剂（Cat: 15596-026）购自美国Invitrogen公司；一步法RT-PCR试剂盒（Cat: 210212）购自德国Qiagen公司；PCR引物由上海生工生物工程技术有限公司合成；100 bp DNA Ladder（Cat: MD 109）和6×loading 缓冲液购自北京天根生物公司。SYBR GREEN 1购自美国Amersco公司。

2. MTT法检测细胞增殖情况：常规培养HepG2细胞至对数生长期，接种于96孔板，每孔100μl（4000个细胞）。培养过夜后随机分为5组。分别加入含SSd终浓度为0（对照组）、2.5、5、10、20 mg/L的RPMI 1640培养液200μl/孔，每组5个复孔。培养24 h，加入新鲜配制0.5%的MTT储存液20μl/孔，继续培养4 h；弃上清液后加入二甲亚砷150μl/孔，低速震荡10 min，酶标仪检测各孔570 nm处吸光度（A）值，抑制率=（对照组A值-实验组A值）/对照组A值×100%。然后，选择终浓度为10 mg/L的SSd，分别作用于HepG2细胞0、6、12、24、48、72 h，按上述方法检测SSd抑制HepG2增殖的时间效应。

3. Giemsa染色法观察细胞形态变化：按每孔1ml（10 000个细胞）接种于6孔板，培养过夜，随机分为实验组及对照组，每组3个复孔。实验组加入含SSd终浓度为10 mg/L的RPMI 1640培养液3 ml/孔；对照组加入等体积不含SSd的RPMI 1640培养液。培养48 h，弃培养液，磷酸盐缓冲液（PBS）漂洗3次。用甲醇-冰醋酸固定液固定10 min，Giemsa染色液染色20 min，PBS洗3次，置空气中干燥后，于倒置相差显微镜下观察细胞形态变化。

4. Transwell小室法观察细胞迁移能力：Transwell小室使用前加入少量无血清的RPMI 1640培养液水化1 h。下室加入600μl含体积分数10%血清的RPMI 1640培养液，上室加入2×10⁶个/ml细胞悬液200μl/孔，每组3个复孔。实验组上室加入含SSd终浓度为10 mg/L的培养液，对照组加等体积不含SSd的培养液。37℃孵育18 h，PBS洗2遍；用4%多聚甲醛固定，结晶紫染色，PBS洗2遍；于镜下随机取上、下、左、右、中心5个视野，计数穿膜细胞数，取平均数表示肿瘤细胞的体外迁移能力。

5. 化学发光法和放射免疫法分别检测AFP及白蛋白浓度：常规培养HepG2细胞，制备细胞悬液4×10⁵个/ml，1 ml/孔接种于6孔板，培养过夜，随机分为两组，1 ml/孔每组6个复孔。实验组加入含SSd终浓度为10 mg/L的RPMI 1640培养液3 ml/孔，对照组加入等体积不含SSd的RPMI 1640培养液，培养48 h；收集细胞上清液，分别用化学发光法和放射免疫法检测AFP及白蛋白浓度。

6. RT-PCR检测p27 mRNA的表达：用NCBI查找p27基因cDNA序列，采用primer 5.0设计引物，p27上游引物：5' -GGATAAGTGAAATGGATACTAC ATC -3'，下游引物：5' -AAAAAGAGGGGAAA ACCTATTCTAC -3'，产物长度228 bp。内参照3-磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）上游引物：5' -AGGTCGGAGTCAACGGATTTG -3'，下游引物：5' -GTGATGGCATGGACTGTGGT -3'，产物长度532 bp。

分别收集实验组和对照组细胞，Trizol法提取总RNA。按试剂盒说明设置扩增条件。电泳检测p27扩增产物。采用Band Scan 5.0比较电泳条带的相对吸光度值。p27 mRNA相对表达量=目的条带吸光度值/内参照条带吸光度值。

7. 统计学方法：实验数据以均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，采用统计学软件SPSS11.5进行分析，多组间比较采用随机分组单因素方差分析，两组间比较采用t检验。以P<0.05为差异具有统计学意义。结果

1. SSd对HepG2细胞增殖的影响：经终浓度2.5、5、10、20 mg/L的SSd分别作用24 h后，HepG2细胞显示出不同程度的生长抑制效应，其生长抑制率分别为5.16%±0.80%、12.03%±1.19%、16.05%±1.30%、15.67%±1.23%；与对照组相比，差异有统计学意义（F=265.06, P<0.01），其中10 mg/L和20 mg/L两浓度抑制效应最大，但两者差异无统计学意义（t=1.38, P>0.05）。10 mg/L的SSd作用不同时间对HepG2的生长均有抑制作用，其中作用48 h抑制效果最明显（F=959.35, P<0.01），见图1。

图1 柴胡皂甙-d对HepG2细胞生长抑制作用的时间效应

2. SSd对HepG2细胞形态的影响：经10 mg/L SSd处理48 h后，HepG2细胞贴壁密度较对照组减少，细胞间连接变疏松，培养液中悬浮细胞数增加。Giemsa染色可见实验组HepG2形态倾向于正常分化，细胞形态变小、变圆，核变小、变圆或卵圆形，核/质比例缩小，核仁变少、变淡或不明显（图2）。

A：对照组；B：实验组

图2 柴胡皂甙-d处理48 h后HepG2细胞的形态变化 Giemsa×400

3. SSd对HepG2细胞侵袭能力的影响：经10 mg/L的SSd处理48 h后，实验组细胞穿过小室膜的细胞数为41.00±4.64，对照组为50.60±4.04；两组差异有统计学意义（t=-7.32, P<0.01），表明经SSd处理后HepG2细胞迁移能力明显降低（图3）。

4. SSd对HepG2细胞AFP和白蛋白分泌量的影响：经10 mg/L SSd处理48 h后，HepG2细胞上清液中AFP浓度为（70.3±5.7）×10³μg/L，对照组为（118.2±15.6）×10³μg/L，两者差异具有统计学意义（t=-10.72, P<0.01）；实验组白蛋白浓度为（31.1±4.9）×10⁻³g/L，对照组为（24.7±2.8）×10⁻³g/L，两者差异具有统计学意义（t=7.83, P<0.05）。表明经SSd处理后HepG2细胞表达AFP降低、合成白蛋白能力增强。

5. SSd对HepG2细胞p27基因mRNA表达的影响：实验组和对照组均有两条电泳条带，分别为216 bp的目的条带p27基因和532 bp的内参照条带3-GAPDH。两组间内参条带亮度一致，实验组p27基因相对吸光度值（0.566±0.015）明显强于对照组（0.335±0.011），t=22.00, P<0.05，见图4。

M: DNA相对分子质量标准; 1: 实验组; 2: 对照组
图4 柴胡皂甙-d对HepG2细胞p27基因mRNA表达的影响
讨论

中药及其有效成分在逆转肿瘤恶性表型方面具有潜在的优势。SSd是柴胡药理作用最强的三萜皂甙单体,可改变肝癌细胞的恶性表型,包括细胞增殖能力、形态学特征、合成分泌功能、浸润侵袭能力等。本研究采用Giemsa染色法,观察到经SSd处理后,人肝癌细胞株HepG2细胞形态变小、变圆,核变小、变圆或卵圆形,核/质比例缩小,核仁变少、变淡或不明显。肝癌细胞的迁移能力增强是其恶性表型的重要表现,高分泌AFP和低合成白蛋白亦是肝癌细胞恶性表型的重要指标。其中,AFP是公认的人肝癌细胞恶性表型标志物,当肝细胞或生殖腺胚胎组织发生恶性病变时,有关基因重新被激活,使已丧失合成AFP能力的细胞重新合成,以致血中AFP含量明显升高。另外,白蛋白由肝脏合成,是肝细胞分化成熟的重要标志物。两者是判断肝癌恶性表型的定量指标。本研究结果显示,经SSd处理后,HepG2细胞形态趋向于正常,AFP分泌降低,白蛋白合成能力提高,浸润侵袭能力下降,提示SSd能够诱导HepG2细胞向正常细胞方向分化,表明SSd具有逆转人肝癌细胞株HepG2细胞恶性表型的作用。

诱导肿瘤细胞分化主要通过抑制端粒酶活性、影响细胞信号转导通路、影响环磷酸腺苷(cAMP)的水平和作用于肿瘤基因等途径。其中,p27基因被认为是一种细胞分化相关基因,其蛋白是一个细胞周期素依赖蛋白激酶抑制蛋白,主要功能是参与细胞周期的负调控[3]。p27基因的主要作用机制是在G1末期与细胞周末素E/cdk2复合物结合,抑制cdk2的活性,从而使细胞不能越过G1/S期这个关键的细胞周期检验点(cell cycle check point),而使细胞从G1/S期中撤出而进入分化过程[4]。有临床研究结果表明,p27在肝癌中表达低于癌旁组织,p27在肝癌中的表达与AFP水平、病理分级、坏死以及转移相关[5];p27蛋白在肝癌组织中的表达减少和其恶性程度及侵袭性密切相关[6]。Fiorentino等[7]发现p27高表达与肝癌患者生存期延长相关,肝硬化与p27低表达有联系,并得出获得性p27显著表达和p27高表达是肝癌独立预后因子的结论。本实验结果显示,经SSd处理后,HepG2细胞p27基因mRNA的相对表达水平明显增高,表明SSd可以上调p27基因mRNA的表达,通过p27蛋白的上述作用机制,增强其对细胞周期的负性调控作用,从而逆转人肝癌HepG2细胞恶性表型并抑制其增殖。

本研究结果表明,SSd可在体外逆转人肝癌细胞株HepG2细胞的恶性表型,其机制与上调p27基因mRNA的表达及其引起的细胞周期分布改变有关,提示SSd是潜在的肝癌分化诱导剂,这有待于进一步的研究证实。

参 考 文 献

- [1] He SX, Luo JY, Zhao G, et al. Effect of saikosaponins-d on cyclooxygenase-2 expression of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi*, 2006,14: 712-714.(in Chinese)
和水祥,罗金燕,赵刚,等.柴胡皂甙d对肝癌SMMC-7721细胞环氧合酶-2表达的影响.中华肝病杂志, 2006, 14: 712-714.
- [2] Han XH, Gai XD, Xue YJ, et al. Effects of the extracts from Bupleurum Chinese DC on intracellular free calcium concentration and vincristine accumulation in human hepatoma BEL-7402 cells. *Zhongliu*, 2006, 26: 314-317.(in Chinese)
韩晓红,盖晓东,薛延军,等.柴胡提取物对人肝癌细胞BEL-7402细胞内游离钙离子浓度和细胞内VCR蓄积的影响. *肿瘤*, 2006, 26: 314-317.
- [3] Durand B, Fero ML, Roberts JM, et al. p27Kip1 alters the response of cells to mitogen and is part of a cell-intrinsic timer that arrests the cell cycle and initiates differentiation. *Curr Biol*, 1998, 8: 431-440.
- [4] Dash BC, El-Deiry WS. Cell cycle checkpoint control mechanisms that can be disrupted in cancer. *Methods Mol Biol*, 2004, 280: 99-161.
- [5] Wang Y, Chen L, Lu MD, et al. Expressions of Thr187 Phosphorylated p27 kip1 and Skp2 proteins in human hepatocellular carcinomas and their significances. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi*, 2007, 15: 943-944. (in Chinese)
王酉,陈莉,陆牡丹,等. Thr187磷酸化p27 kip1、Skp2在肝细胞癌中的表达及其意义. *中华肝病杂志*, 2007, 15: 943-944.
- [6] Wang K, Wang XH, Zhang F. The expression and significance of p27 in hepatocellular carcinoma. *Gandan Waike Zazhi*, 2002, 10: 71-72. (in Chinese)
王科,王学浩,张峰. P27蛋白在肝细胞肝癌组织中的表达及意义. *肝胆外科杂志*, 2002, 10: 71-72.
- [7] Fiorentino M, Altamari A, D'Errico A, et al. Acquired expression of p27 is a favorable prognostic indicator in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2000, 6: 3966-3972.

(收稿日期: 2010-12-20)

(本文编辑: 朱红梅)

中华医学会肝病杂志版权