

青天葵甲醇提取物通过 ERK 通路抑制人肝癌细胞增殖并诱导其凋亡

周燕园^{1a}, 李亚洲^{1a}, 祥春², 赵超超^{1b}, 吕良^{1a}, 周越菡^{1a*} (1. 桂林医学院, a. 药学院, b. 公共卫生学院, 广西 桂林 541199; 2. 广西壮族自治区南溪山医院, 广西 桂林 541002)

摘要: 目的 研究青天葵甲醇提取物(*Nervilia fordii* methanol extracts, NFME)体外对人肝癌 SMMC7721 和 HepG2 细胞的凋亡作用及其作用机制。方法 紫外-可见分光光度法测定青天葵中总黄酮和总多酚的含量; MTT 法检测不同浓度(0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 mg·mL⁻¹) NFME 处理 24 h 对 SMMC7721、HepG2 和 LO2 细胞生长抑制率的影响; 克隆形成试验观察 NFME 对 SMMC7721 和 HepG2 细胞克隆形成率的影响; Hoechst 凋亡染色观察 NFME 对 SMMC7721 细胞凋亡的影响; 流式细胞术检测 NFME 对 SMMC7721 细胞凋亡和细胞周期的影响; Western blotting 测试 NFME 作用下 caspase3、PARP、ERK1/2 和 c-Raf 蛋白磷酸化水平的变化。结果 NFME 中总多酚含量为(4.25±0.46)mg·g⁻¹, 总黄酮含量为(4.72±0.13)mg·g⁻¹; MTT 试验结果显示, 与对照组相比, 在给药 24 h 时 0.5 mg·mL⁻¹ 的 NFME 就能抑制 SMMC7721 和 HepG2 细胞的增殖($P<0.001$); 克隆形成试验表明, 0.125 mg·mL⁻¹ 的 NFME 能够抑制 SMMC7721 和 HepG2 细胞集落的形成($P<0.001$); Hoechst 凋亡染色观察到 0.25 mg·mL⁻¹ 的 NFME 作用 24 h 能够观察到 SMMC7721 细胞发生凋亡($P<0.05$); 流式细胞试验结果证实 0.5 mg·mL⁻¹ 的 NFME 能够诱导 SMMC7721 细胞的凋亡($P<0.01$), 凋亡率 14.43%, 阻滞细胞周期于 S 期; Western blotting 结果表明 NFME 能使 SMMC7721 细胞中 caspase3 发生剪切, 随着给药浓度增加其剪切作用越明显($P<0.05$), 活化的 caspase3 剪切下游 PARP 的表达; 同时 NFME 能够降低 SMMC7721 细胞中 ERK1/2 和 c-Raf 蛋白的磷酸化水平($P<0.05$)。结论 NFME 能抑制人肝癌 SMMC7721 和 HepG2 细胞的活性并诱导其发生凋亡, 其作用机制可能与抑制 ERK 信号通路从而诱导细胞凋亡有关。

关键词: 青天葵甲醇提取物; 肝癌; SMMC7721; HepG2; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)12-1409-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.12.001

引用本文: 周燕园, 李亚洲, 祥春, 等. 青天葵甲醇提取物通过 ERK 通路抑制人肝癌细胞增殖并诱导其凋亡[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(12): 1409-1415.

Nervilia Fordii Methanol Extracts Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of Human Hepatic Carcinoma Through ERK Signaling Pathway

ZHOU Yanyuan^{1a}, LI Yazhou^{1a}, XIANG Chun², ZHAO Chaochao^{1b}, LYU Liang^{1a}, ZHOU Yuehan^{1a*} (1. Guilin Medical University, a. College of Pharmacy, b. College of Public Health, Guilin 541199, China; 2. Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the apoptosis effect and mechanism of *Nervilia fordii* methanol extracts(NFME) on human hepatic carcinoma SMMC7721 and HepG2 cells *in vitro*. **METHODS** UV-visible spectrophotometric method was used to determine total flavonoids and total polyphenols in NFME. The growth inhibition rate of SMMC7721, HepG2 and LO2 treated with different concentrations(0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 mg·mL⁻¹) of NFME for 24 h were detected by MTT. The effect of NFME on the colony formation rate of SMMC7721 and HepG2 cells was observed by clonal test. The effect of NFME on SMMC7721 cell apoptosis was observed by Hoechst apoptosis staining. The effect of NFME on SMMC7721 cell apoptosis and cell cycle were detected by flow cytometry. The phosphorylation level expression of caspase3 and ERK1/2 and c-Raf protein were detected by Western blotting. **RESULTS** The total polyphenol content in NFME was (4.25±0.46)mg·g⁻¹, and the total flavonoid content was (4.72±0.13)mg·g⁻¹. The results of MTT experiments showed that compared with the control group, 0.5 mg·mL⁻¹ NFME could inhibit the proliferation of SMMC7721 and HepG2 cells($P<0.001$); the experiment of clonal formation ability showed that 0.125 mg·mL⁻¹ NFME could inhibit the formation of SMMC7721 and HepG2 cell colonies($P<0.001$); Hoechst apoptosis staining observed that 0.25 mg·mL⁻¹ NFME induced apoptosis of SMMC7721 cells for 24 h($P<0.05$); the flow cytometry results

基金项目: 国家自然科学基金项目(81860767); 广西自然科学基金资助项目(2018GXNSFAA281104)

作者简介: 周燕园, 女, 硕士, 教授 Tel: (0773)3662065 E-mail: zhou_yanyuan@163.com *通信作者: 周越菡, 女, 博士, 副教授 Tel: (0773)2303442 E-mail: yuehanchou2012@163.com

confirmed that $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ NFME could induce apoptosis of SMMC7721 cells ($P < 0.01$), and apoptosis rate reached 14.43%, blocked cell cycle in S phase; Western blotting results showed that NFME could make caspase3 in SMMC7721 cells undergo shearing, the shear effect became more pronounced with concentration increasing ($P < 0.05$), and activated caspase3 shears downstream PARP expression; meanwhile, NFME could reduce the phosphorylation level of ERK1/2 and c-Raf proteins in SMMC7721 cells ($P < 0.05$). **CONCLUSION** The NFME can inhibit the activity of human hepatocellular carcinoma SMMC7721 and HepG2 cells and induces apoptosis. The mechanism of induces apoptosis may be related to the inhibition of ERK signaling pathway.

KEYWORDS: *Nervilia fordii* methanol extracts; hepatic carcinoma; SMMC7721; HepG2; apoptosis

肝癌是全球癌症发病率排名第 6 位, 是肿瘤相关性死因的第 2 位^[1]。目前早期肝癌的治疗主要以外科手术切除为首选, 但是, 大部分早期肝癌没有明显症状, 患者就诊时已发生转移和扩散, 失去最佳手术机会^[2], 且术后复发率高, 预后较差。化疗是晚期肝癌患者的基础治疗, 但是由于化疗药物不良反应较大, 有很多已经产生耐药性, 晚期肝癌患者预后极差, 5 年生存率只有 10% 左右^[3]。因此, 从天然中草药中寻找对原发性肝癌治疗有效且不良反应小的药物是近年来的研究热点。

青天葵是中国传统中药, 是毛唇芋兰的全草和块茎, 属于兰科植物。主要产于广东、广西、云南、四川等地。青天葵性寒味甘, 具有润肺止咳、清热解毒、消瘀止痛的作用^[4]。有文献报道青天葵的有效成分有甾体类化合物, 黄酮类化合物, 挥发油类及氨基酸类化合物等^[5]。已有研究显示青天葵的乙酸乙酯提取物及甲醇提取物具有良好的抗氧化活性^[6-7], 青天葵的水提物与乙醇提取物对 5 种真菌在体外具有抑菌活性。甄汉深等^[8]的研究也表明青天葵的石油醚和乙酸乙酯部位是体内抗肿瘤的有效部位。本研究先选用 2 种肝癌细胞 SMMC7721 和 HepG2 作为研究对象, 确定青天葵甲醇提取物(*Nervilia fordii* methanol extracts, NFME)在体外对肝癌细胞 SMMC7721 和 HepG2 的抑制作用, 探讨 NFME 诱导 SMMC7721 凋亡的作用, 初步研究其抗肿瘤机制, 为后续青天葵的开发与利用奠定理论依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

KQ5200DE 超声仪(东莞科桥超声设备有限公司); EYELAN-1001S 旋转蒸发器(东京理化器械株式会社); ELx800 酶标仪(美国 BioTek); LA2-4A1 超净台(新加坡 ESCO); 371 细胞培养箱(美国 Thermo scientific); 1-14 型离心机(美国 Sigma); 5404FG7 冷冻离心机(德国 Eppendorf); IX71-A12FL/PH 倒置荧光显微镜(日本 Olympus);

WD-9405D 脱色摇床(北京六一仪器设备有限公司); PowerPac Basic 电泳仪、552BR14 蛋白转印系统(美国 Bio Rad); GeneGnomeXRQ 显影仪(美国 Syngene); CL-32L 高压灭菌锅(日本 ALP); 9240 干燥箱(上海一恒仪器设备有限公司); SHZ 循环水真空泵(上海亚荣生化仪器)。

1.2 试剂

青天葵购买于广西壮族自治区玉林市药材市场, 经广西中医药大学药学院廖月葵高级实验师鉴定为广西产青天葵 *Nervilia fordii* (Hance) Schltr. 全草, 阴干备用; 无水碳酸钠(货号: 10019260)、福林酚试剂(货号: 7310486)、无水氯化铝(货号: 10000862)购自国药集团化学试剂有限公司; DMEM 培养基(Gibco, 货号: C11885500BT); 胎牛血清(Aus GeneX, 货号: FBSSA500-S); 噻唑蓝(MTT, 货号: M8180)、0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液(货号: T1300)、Tris(货号: T8060)、甘氨酸(货号: G8200)均购自 Solarbio; 二甲基亚砜(Sigma-Aldrich, 货号: 190102); 冰醋酸(广东西陇化工有限公司, 货号: 170527); 青霉素-链霉素溶液 100×(货号: C0222)、结晶紫(货号: C0121)、Hoechst 33258 凋亡染色试剂盒(货号: C0003)、细胞周期检测试剂盒(货号: C1052)、BCA 蛋白定量试剂盒(货号: P0012)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(货号: P0012A)、RIPA 蛋白裂解液(货号: P0013C)、GAPDH(货号: AG019)均购自碧云天; 细胞凋亡检测试剂盒(BD, 货号: 556507); caspase3(货号: 9662S)、ERK1/2(货号: 4695)、p-ERK1/2(货号: 9101)、p-c-Raf(货号: 9421)均购自 CST; 无水甲醇(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20180122); SDS(Sangon, 货号: A922BA0023); 没食子酸对照品(批号: 110831-201605; 纯度 $\geq 98\%$)、芦丁对照品(批号: 10080-201811; 纯度 $\geq 98\%$)均购自中国药品生物制品检定所。

2 方法

2.1 NFME 的制备

取干燥的青天葵样品粉碎后过 60 目筛备用。室温下, 取 10 g 青天葵粉加入 75% 甲醇(200 mL) 超声提取 60 min^[9]。过滤液经 3 000 ×g 离心 15 min 后弃沉淀收集上清, 旋转蒸发仪在 50 °C 真空减压蒸发后, 制成 NFME, 收率为 12.24%, -20 °C 储藏备用。取 100 mg NFME 溶于 5 mL DMEM 完全培养基中, 超声使 NFME 完全溶解制成 20 mg·mL⁻¹ 的 NFME 母液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, -20 °C 储存备用, 用完全培养基稀释至所需浓度用于后续细胞试验。

2.2 NFME 中总多酚和总黄酮含量

NFME 中总多酚和总黄酮含量按紫外-可见分光光度法测定。总多酚含量测定采用 0.1 mL 样品中加入 10% 碳酸钠溶液 2 mL 反应 5 min, 再加入 0.1 mL 福林酚试剂置避光处反应 30 min, 于 765 nm 处以没食子酸为标准, 测定反应液的吸光度, 通过标准曲线计算并以 mg·g⁻¹ 为单位。总黄酮含量测定采用 0.5 mL 样品与 2 mL 蒸馏水混合, 加入 10% 氯化铝溶液(0.15 mL)后, 于 420 nm 处以芦丁为标准, 测定溶液吸光度, 结果表示为 mg·g⁻¹。

2.3 细胞培养

人肝癌细胞系 SMMC7721、HepG2 和 LO2 用含 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养基, 在 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养, 取对数生长期细胞进行试验。

2.4 MTT 法检测药物对 CNE-2 细胞活性影响

取对数生长期肝癌 SMMC7721、HepG2 细胞和正常肝细胞 LO2 接种于 96 孔板中, 每孔 5×10³ 个细胞, 每孔 100 μL, 贴壁后分别加入 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg·mL⁻¹ 的 NFME 处理细胞。对照组加入无药物的 DMEM 完全培养基, 即 NFME 浓度为 0。每组均设置 5 个复孔。培养 24, 48 h 后, 加入 10 μL 的 MTT 溶液, 再培养 4 h 后, 吸出上清液每孔加入 150 μL DMSO 震荡使沉淀溶解, 酶标仪在 490 nm 处测每孔的吸光度值(OD 值)。计算细胞存活率=给药组 OD 值/对照组 OD 值×100%。

2.5 平板克隆形成试验

取对数生长期 SMMC7721 和 HepG2 细胞接种于 6 孔板中, 每孔 500 个细胞, 待细胞贴壁后, 将培养基替换为含不同 NFME 浓度的新鲜培养基(0, 0.125, 0.25, 0.5 mg·mL⁻¹), 每组均设 3 个复孔, 药物持续作用 10 d 后, 弃培养基, 每孔用 PBS 洗 3 次,

用甲醇:冰醋酸(3:1)固定液固定 15 min, 静置干燥。加入 1 mL 0.1% 结晶紫染色 15 min 后, 用 PBS 洗去多余染料, 室温干燥。计数每孔>50 个细胞的集落, 计算克隆形成率=克隆数/接种细胞数×100%。

2.6 Hoechst 凋亡染色观察细胞形态

取对数生长期的 SMMC7721 细胞种于 6 孔板中, 加入 0, 0.125, 0.25 和 0.5 mg·mL⁻¹ 的 NFME 处理 24 h, 固定后用 Hoechst 33258 染色, 5 min 后用 PBS 洗去染色液, 用倒置显微镜观察各组细胞染色情况并拍照。

2.7 流式细胞术检测 SMMC7721 细胞凋亡和细胞周期

SMMC7721 细胞种于 6 孔板中, 每孔 2×10⁵ 个细胞, 分别加入 0, 0.25, 0.5, 1.0 mg·mL⁻¹ NFME 处理 24 h; 用胰酶消化收集细胞, PBS 洗涤细胞 1 次(800 r·min⁻¹, 5 min), 每组加入 Binding Buffer 300 μL, 混匀细胞, 每组加入 Annexin V-FITC 5 μL 和 Propidium Iodide 5 μL, 混匀; 避光反应 15 min 后流式细胞仪检测。

SMMC7721 细胞种于 6 孔板中, 每孔 2×10⁵ 个细胞, 分别加入 0, 0.25, 0.5, 1.0 mg·mL⁻¹ NFME 处理 24 h; 用胰酶消化收集细胞, 预冷 PBS 洗涤细胞 1 次(800 r·min⁻¹, 5 min), 每组加入预冷的 70% 乙醇 1 mL, 混匀细胞, 4 °C 固定 2 h。离心后用预冷 PBS 重悬细胞, 加入 PI 染色液, 37 °C 避光孵育 30 min 后上机检测。

2.8 Western blotting 检测蛋白

取对数增长期细胞种于 60 mm 皿中, 待细胞贴壁后, 加入 0, 0.25, 0.5, 1.0 mg·mL⁻¹ NFME 处理 24 h; 收集细胞并提蛋白定量后进行 SDS-PAGE 电泳; 湿转法将蛋白转至 NC 膜; 用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h; 稀释抗体 p-ERK1/2、p-c-Raf、GAPDH, 4 °C 孵育过夜; 第 2 天用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 二抗室温孵育 2 h 后, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; ECL 化学检测。条带使用 Image J 分析条带灰度。

2.9 统计学分析

所有数据采用 GraphPad Prism5 进行分析, 多组比较采用单因素方差分析, 2 组间比较采用 *t* 检验, 以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 NFME 中总多酚和总黄酮含量

NFME 中含有总多酚(按没食子酸计)[(4.25±0.46)mg·g⁻¹]和总黄酮(按芦丁计)[(4.72±0.13)mg·g⁻¹]。

结果见表 1。

表 1 NFME 中总多酚和总黄酮含量($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 1 Total polyphenols and total flavonoids in NFME ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

物质	标准曲线	R^2	含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
总多酚	$Y=99.087X+0.0297$	0.999	4.25 ± 0.46
总黄酮	$Y=72.576X-0.0053$	0.999	4.72 ± 0.13

3.2 NFME 抑制 SMMC7721, HepG2 和 LO2 细胞增殖

不同浓度 NFME 处理 SMMC7721 和 HepG2 细胞 24 h 后, 给药浓度与细胞抑制率关系见图 1。

与对照组相比, 对 SMMC7721 细胞给药 24 h 时, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组差异有统计学意义($P < 0.001$), IC_{50} 为 $(0.819 \pm 0.121) \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。可见在给药相同时间下, 随着 NFME 浓度的增加 SMMC7721 细胞抑制率越高。

与对照组相比, 对 HepG2 细胞给药 24 h 时, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组差异有统计学意义($P < 0.001$), IC_{50} 为 $(3.157 \pm 0.261) \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。可见在给药相同时间下, 随着 NFME 浓度的增加 SMMC7721 细胞抑制率越高。

与对照组相比, 对 LO2 细胞给药 24 h 时, NFME 对 LO2 差异没有统计学意义, NFME 对正常肝细胞没有药物毒性。

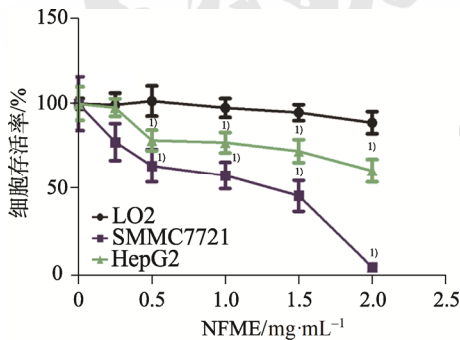


图 1 不同浓度的 NFME 处理 SMMC7721, HepG2 和 LO2 细胞 24 h 对细胞存活率影响
与对照组($0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ NFME)相比, $^{1)}P < 0.001$ 。

Fig. 1 Effect of different concentrations of NFME on the survival rate of SMMC7721, HepG2 and LO2 cells for 24 h Compared with control group($0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ NFME), $^{1)}P < 0.001$.

3.3 NFME 抑制肝癌细胞 SMMC7721 和 HepG2 的集落的形成

不同浓度的 NFME 对 SMMC7721 和 HepG2 细胞的克隆形成均有明显抑制作用, 且浓度越高, 克隆形成率越低, 对细胞生长的抑制作用越明显, 结

果见图 2。与对照组相比, 0.125, 0.25, 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 NFME 能抑制 SMMC7721 和 HepG2 细胞集落的形成, 差异具有统计学意义($P < 0.001$)。同时可以看出相同浓度的 NFME 对肝癌细胞 SMMC7721 的抑制作用比对 HepG2 的抑制作用更明显。结果与图 1 结果符合, 所以接下来课题组研究了 NFME 对 SMMC7721 细胞的凋亡作用及其作用机制。

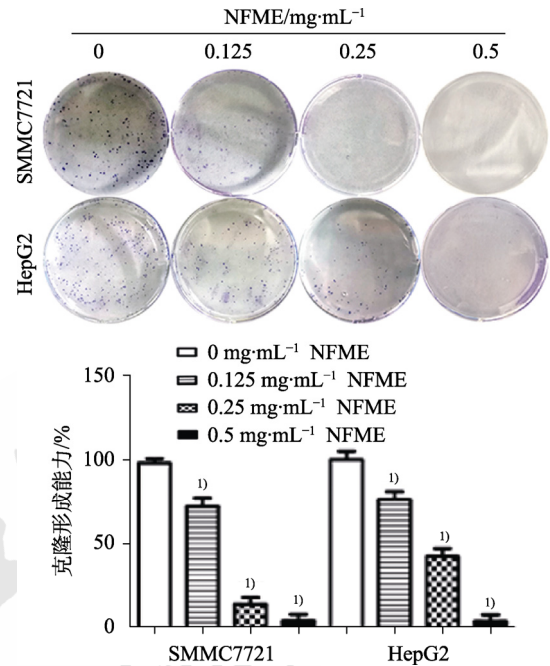


图 2 克隆形成试验检测 NFME 对人肝癌 SMMC7721 和 HepG2 细胞克隆形成能力的影响
与对照组($0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ NFME)相比, $^{1)}P < 0.001$ 。

Fig. 2 Effects of different concentrations of NFME on the formation capacity of SMMC7721 and HepG2 cell clones Compared with control group($0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ NFME), $^{1)}P < 0.001$.

3.4 Hoechst 凋亡染色观察细胞形态变化

Hoechst 染色检测细胞凋亡, 结果见图 3, 对照组中 SMMC7721 细胞核呈现均匀的荧光, 核饱满, 胞浆丰富。0.125 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 NFME 作用 SMMC7721 细胞 24 h, 有少数细胞的细胞核出现破裂。0.25 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组的 SMMC7721 细胞在 NFME 作用 24 h 后, 细胞分散, 细胞核裂解, 染色质聚集, 呈现较强荧光。与对照组相比, 0.25 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 NFME 对 SMMC7721 细胞有凋亡作用, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。说明青天葵的甲醇提取物能够诱导 SMMC7721 细胞发生凋亡。

3.5 流式细胞术检测 NFME 对 SMMC7721 细胞凋亡的影响

与对照组相比, 0.5, 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 NFME

处理 SMMC7721 细胞 24 h 后, 出现凋亡, 凋亡细胞随着药物浓度增加由 4.7% 增加到 14.43%, 差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。进一步说明 NFME 能够诱导肝癌细胞 SMMC7721 的凋亡。结果见图 4。

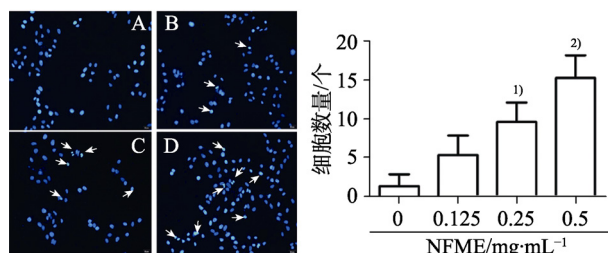


图3 倒置荧光显微镜下不同浓度 NFME 处理 SMMC7721 细胞株 24 h 后形态变化(200×)

A-对照组(0 mg·mL⁻¹ NFME); B-0.125 mg·mL⁻¹ NFME; C-0.25 mg·mL⁻¹ NFME; D-0.5 mg·mL⁻¹ NFME; →指凋亡细胞。与对照组(0 mg·mL⁻¹ NFME)相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Morphological changes of SMMC7721 cell line treated with different concentrations of NFME under inverted fluorescence microscope for 24 h(200×)

A-control group(0 mg·mL⁻¹ NFME); B-0.125 mg·mL⁻¹ NFME; C-0.25 mg·mL⁻¹ NFME; D-0.5 mg·mL⁻¹ NFME; →meant apoptotic cell. Compared with control group(0 mg·mL⁻¹ NFME), ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3.6 NFME 阻滞 SMMC7721 细胞周期于 S 期

NFME 处理 SMMC7721 细胞 24 h 后, G1 期比例下降, S 期比例增加, 可见 SMMC7721 细胞

周期阻滞于 S 期, 与对照组相比, 1.0 mg·mL⁻¹ NFME 组的 G0+G1 期($P<0.01$)和 S 期($P<0.001$)细胞差异有统计学意义。进一步说明 NFME 不只能诱导肝癌细胞 SMMC7721 的凋亡, 还能阻滞细胞周期于 S 期, 进而影响细胞的增殖。结果见图 5。

3.7 NFME 激活 SMMC7721 细胞中 caspase3 和多聚 ADP-核糖聚合酶[poly(ADP-ribose)polymerase, PARP]的表达

与对照组相比, NFME 作用 SMMC7721 细胞 24 h 后, caspase3 随着浓度增加蛋白表达下调, 而 cleaved-caspase3 表达增加, 与对照组相比, 0.25, 0.5, 1.0 mg·mL⁻¹ NFME 组差异具有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.001$), 说明 NFME 激活凋亡作用的标志性蛋白 caspase3 的表达。同时检测 PARP 蛋白, 发现 cleaved-PARP 的表达随着 NFME 浓度增加而激活($P<0.01$ 或 $P<0.001$), 说明 NFME 可能是通过激活 caspase3 的表达, 剪切下游的 PARP, 从而诱导细胞凋亡。结果见图 6。

3.8 NFME 抑制 SMMC7721 细胞中 ERK 的表达

与对照组相比, NFME 作用 SMMC7721 细胞 24 h 后, 检测 p-ERK1/2、p-c-Raf 蛋白, 发现 p-ERK1/2、p-c-Raf 表达随着 NFME 浓度增加而下调, 其中, 0.5, 1.0 mg·mL⁻¹ NFME 的 p-c-Raf 有

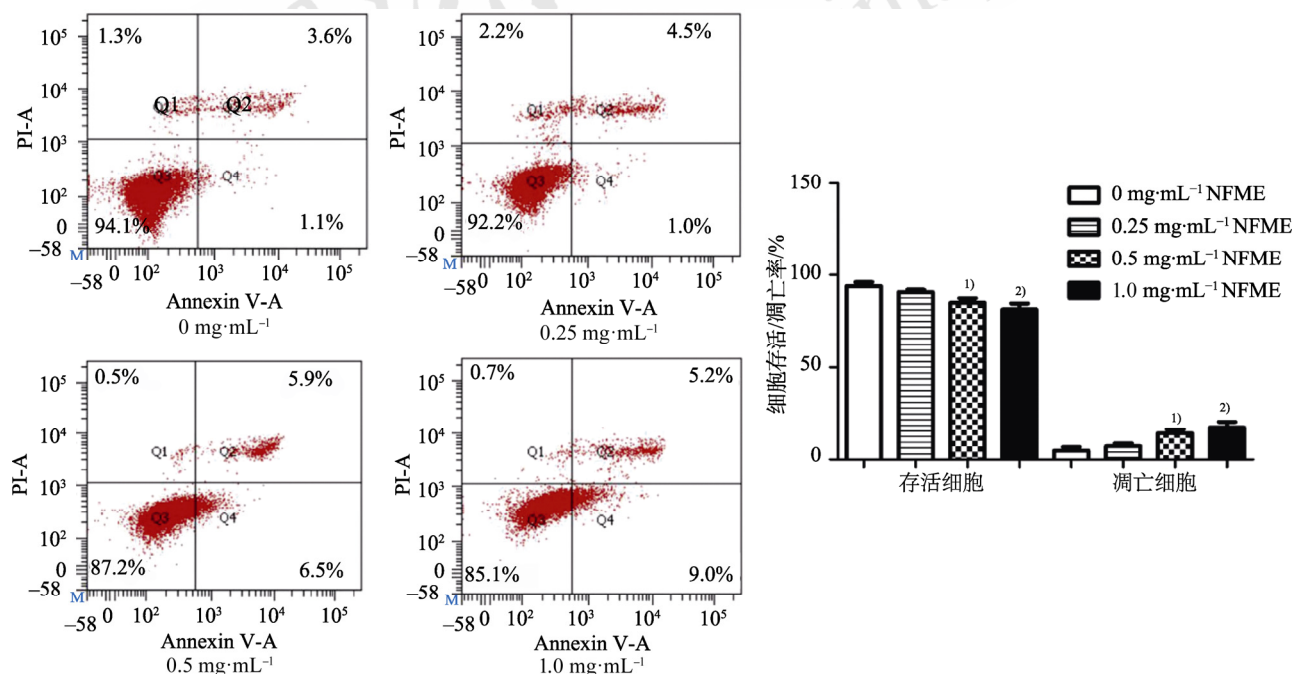


图4 流式细胞术检测 NFME 对 SMMC7721 细胞凋亡率的影响

与对照组(0 mg·mL⁻¹ NFME)相比, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 4 Changes of NFME on the apoptosis rate of SMMC7721 cells by flow cytometry

Compared with control group(0 mg·mL⁻¹ NFME), ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$.

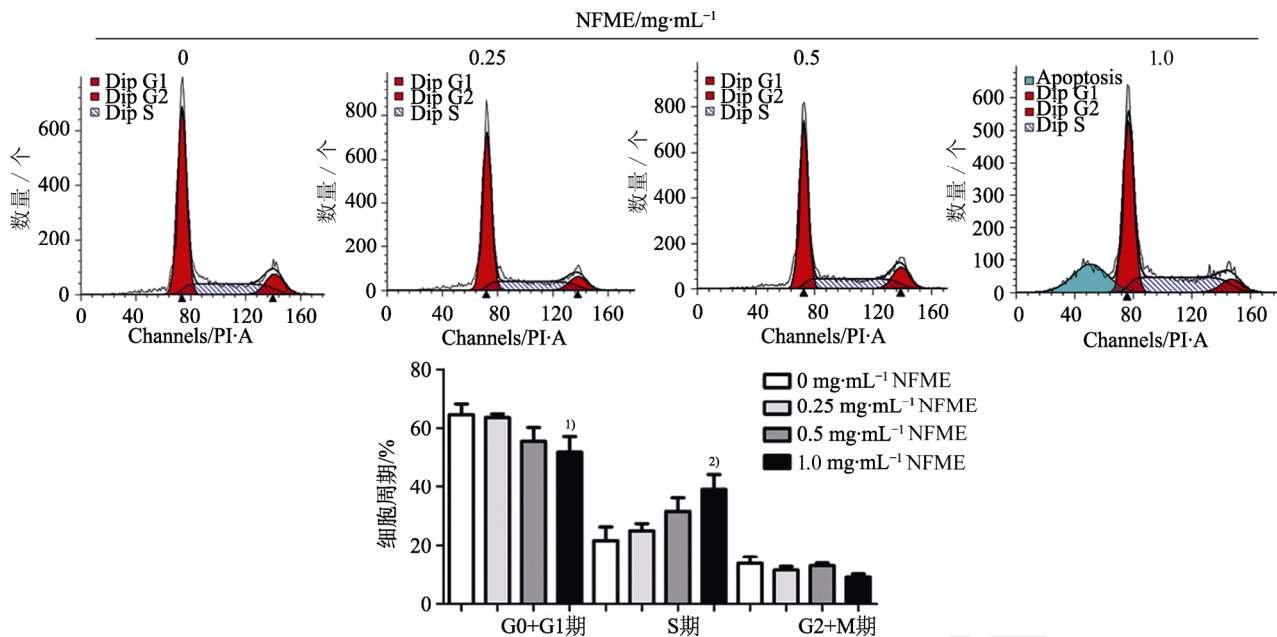


图5 流式细胞术检测 NFME 对 SMMC7721 细胞周期的影响

与对照组(0 mg·mL⁻¹ NFME)相比, ¹⁾P<0.01, ²⁾P<0.001。

Fig. 5 Effect of NFME on the cell cycle of SMMC7721 cells by flow cytometry Compared with control group(0 mg·mL⁻¹ NFME), ¹⁾P<0.01, ²⁾P<0.001.

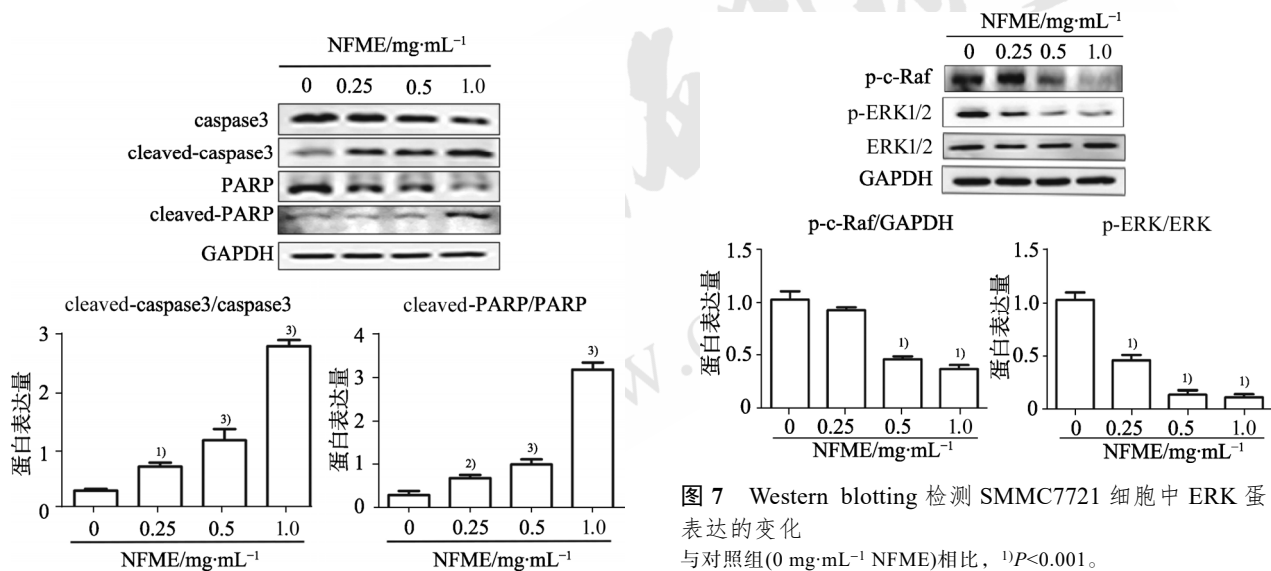


图6 Western blotting 检测 SMMC7721 细胞中 caspase3 和 PARP 蛋白表达的变化

与对照组(0 mg·mL⁻¹ NFME)相比, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.001。

Fig. 6 Expression of caspase3 and PARP protein in SMMC7721 cells by Western blotting

Compared with control group(0 mg·mL⁻¹ NFME), ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.001.

显著性差异($P<0.001$), 0.25, 0.5, 1.0 mg·mL⁻¹ 的 NFME p-ERK 有显著性差异($P<0.001$), 这表明 NFME 可能是通过抑制 ERK 和 c-Raf 的磷酸化, 从而抑制 ERK 信号通路, 诱导 SMMC7721 细胞的凋亡。结果见图 7。

图7 Western blotting 检测 SMMC7721 细胞中 ERK 蛋白表达的变化

与对照组(0 mg·mL⁻¹ NFME)相比, ¹⁾P<0.001。

Fig. 7 Expression of ERK protein in SMMC7721 cells by Western blotting

Compared with control group(0 mg·mL⁻¹ NFME), ¹⁾P<0.001.

4 讨论

细胞凋亡是组织稳态的关键调节因子, 受通路激活和抑制相互作用的调控, 细胞凋亡的调控异常与神经退行性疾病、慢性炎症性疾病、自身免疫性疾病等相关^[10], 这种主动诱导细胞死亡是中药抗肿瘤治疗的重要机制之一^[11]。

本研究探讨了 NFME 抑制肝癌细胞的增殖及诱导肝癌细胞 SMMC7721 凋亡的作用及其机制。MTT 和平板克隆试验结果显示, NFME 能够抑制

SMMC7721 和 HepG2 细胞的增殖,但是 NFME 对 SMMC7721 的抑制作用明显高于 HepG2。进而对 SMMC7721 进行 Hoechst 凋亡染色和流式细胞术试验,结果表明随着给药浓度的递增,凋亡细胞数增多,说明 NFME 能够诱导 SMMC7721 细胞的凋亡。细胞凋亡主要表现为 caspase 家族的活化, DNA 损伤,线粒体膜电位的改变^[12]。细胞凋亡的途经主要有内源性和外源性途经诱导凋亡,而无论是内源性还是外源性引起的凋亡最终都会活化 caspase3,进而作用下游 PARP 等,最终导致 DNA 断裂,蛋白破坏,细胞凋亡^[12]。Western blotting 试验也证实凋亡作用的标志性蛋白 caspase3 的表达随着浓度增加而增强。说明 NFME 是通过诱导 SMMC7721 细胞凋亡和阻滞细胞周期来抑制细胞增殖。

丝裂原活化蛋白激酶包括 JNK、p38 和 ERK,其中 ERK1/2 能被各种生长因子、离子射线、过氧化氢等磷酸化而激活,进入细胞核促进某些基因的转录与表达,与细胞的增殖分化密切相关。在 ERK 传递链中 Ras 和 Raf 是上游激活蛋白,整个途径即: Ras-Raf-MEK-ERK^[13]。ERK 通路如果被异常激活可导致细胞生长分化能力下降及调节凋亡能力紊乱,继而使细胞向恶性生长方向发展,最终形成肿瘤^[14]。通过对 SMMC7721 细胞中 ERK1/2 蛋白的检测发现 p-ERK1/2 随着给药浓度的增加蛋白表达降低,其上游蛋白 p-c-Raf 的表达也是随着给药浓度增加而下降,说明了 NFME 可能是通过抑制 ERK 信号通路诱导肝癌细胞 SMMC7721 的凋亡。

综上所述, NFME 可以抑制肝癌细胞的增殖,并能诱导 SMMC7721 细胞的凋亡,其机制可能与抑制 ERK 信号通路有关,本研究为后续开发广西特产药材青天葵提供了重要的理论参考。

REFERENCES

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA: A Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.

- [2] EL-SERAG H B. Hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2011, 365(12): 1118-1127.
- [3] BRUIX J, GORES G J, MAZZAFERRO V. Hepatocellular carcinoma: Clinical frontiers and perspectives[J]. Gut, 2014, 63(5): 844-855.
- [4] 唐美琼, 李小勇, 翟勇进, 等. 不同栽培基质对青天葵生长及生理特性的影响[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 250-252.
- [5] HUANG F Y, ZHEN D D, QIU Q, et al. Research survey on effective components and quality of *Nervilia fordii*[J]. Guangzhou Chem Ind(广州化工), 2017, 45(14): 37-39.
- [6] LI D M, PAN H M, HUANG P L, et al. Inhibition effect of *Nervilia fordii* (Hance) Schltr on five kinds of fungi *in vitro*[J]. J Guangxi Med Univ(广西医科大学学报), 2017, 34(11): 1550-1552.
- [7] ZHOU Y Y, LIU Q H, YAN H L, et al. *In vitro* antioxidant activities of *Nervilia fordii* methanol extracts[J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技), 2018, 34(9): 122-128.
- [8] ZHEN H S, ZHOU Y Y, YUAN Y F, et al. Study on anticancer effect *in vivo* of active fraction from *Nervilia fordii*[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2007, 30(9): 1095-1098.
- [9] FANG M D, WEN C P. To explore the disease "prevention theory" from the intestinal health[J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med(天津中医药大学学报), 2016, 35(4): 221-224.
- [10] PENG Y T, CHEN P, OUYANG R Y, et al. Multifaceted role of prohibitin in cell survival and apoptosis[J]. Apoptosis, 2015, 20(9): 1135-1149.
- [11] GAO L, HAO J, NIU Y Y, et al. Network pharmacology dissection of multiscale mechanisms of herbal medicines in stage IV gastric adenocarcinoma treatment[J]. Medicine: Baltimore, 2016, 95(35): e4389. Doi: 10.1097/MD.0000000000004389.
- [12] GAO W, HOU W, LI W, et al. Research progress on cell apoptosis mechanism[J]. China Animal Husb Vet Med(中国畜牧兽医), 2014, 41(10): 150-156.
- [13] FUTRAN A S, LINK A J, SEGER R, et al. ERK as a model for systems biology of enzyme kinetics in cells[J]. Curr Biol, 2013, 23(21): R972-R979.
- [14] WANG A X, QI X Y. Targeting RAS/RAF/MEK/ERK signaling in metastatic melanoma[J]. IUBMB Life, 2013, 65(9): 748-758.

收稿日期: 2020-03-29

(本文责编: 李艳芳)