

醉香含笑树皮提取物诱导 HepG2 细胞凋亡的作用机制

宋晓凯¹, 曹志凌¹, 郭雷¹, 李志华^{1,2} (1. 淮海工学院, 江苏 连云港 222005; 2. 中国矿业大学, 江苏 徐州 221116)

摘要: 目的 探讨醉香含笑树皮提取物(extrat of barks of *Michelia macclurei* Dandy., EBMMMD)诱导人肝癌细胞 HepG2 凋亡的作用及相关机理。方法 采用倒置生物显微镜、流式细胞仪、Western-blotting 等技术, 考察 EBMMMD 对 HepG2 细胞凋亡及 COX-2 蛋白表达的影响。结果 流式细胞术分析可见, EBMMMD 能明显诱导 HepG2 细胞凋亡, 且呈浓度依赖关系; 倒置生物显微镜观察可见细胞凋亡的形态学改变; 随 EBMMMD 浓度增高, 细胞内 COX-2 蛋白的表达逐渐减少, 且当 EBMMMD 浓度达 25.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 能明显抑制 COX-2 蛋白表达。结论 EBMMMD 可以明显诱导 HepG2 细胞凋亡, 其作用机理可能与下调细胞内 COX-2 蛋白表达进而诱导其凋亡有关。

关键词: 醉香含笑树皮提取物; 人肝癌细胞 HepG2; 凋亡诱导机制

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)07-0777-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.001

Effect and Possible Mechanism of the Extract of Barks of *Michelia Macclurei* Dandy. on Apoptosis-inducing in HepG2 Cells

SONG Xiaokai¹, CAO Zhiling¹, GUO Lei¹, LI Zhihua^{1,2} (1. Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 2. China University of Mining and Technology, Xuzhou 221116, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effect and possible mechanism of the extract of barks of *Michelia macclurei* Dandy.(EBMMMD) on apoptosis-inducing in HepG2 cell lines *in vitro*. **METHODS** The effect of apoptosis-inducing of EBMMMD on HepG2 cell lines and expression of COX-2 protein were explored by inverted microscope and flow cytometry assay as well as Western-blotting assay. **RESULTS** The apoptosis-inducing of EBMMMD on HepG2 cells was observed in concentration-dependent manner by flow cytometry, and the cell morphology change was observed by inverted microscope. EBMMMD showed growing inhibitory effects on the expressions of COX-2 protein in concentration-dependent manner and significant inhibitory effect on the expression of COX-2 protein at a high concentration(25.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). **CONCLUSION** EBMMMD can significantly induce HepG2 cells apoptosis, the possible mechanism may relate to downregulate the expression of COX-2 protein to induce apoptosis.

KEY WORDS: extrat of barks of *Michelia macclurei* Dandy.; HepG2 cells; apoptosis-inducing mechanism

醉香含笑(*Michelia macclurei* Dandy.)又称火力楠, 木兰科含笑属常绿乔木, 系我国特有植物, 分布于我国福建、广西、广东及贵州等省。其花可提炼芳香油, 树皮、根、叶可作药用, 有清热解毒之功效, 种子油可作燃料用油^[1-2]。目前, 除本课题组先后报道的该植物树皮、根皮挥发性成分组成和对人肝癌细胞 HepG2、小鼠成纤维细胞 NIH3T3 生长抑制作用研究结果^[3-4], 及国内学者关于醉香含笑叶挥发油化学成分方面的报道外^[5], 未见其他报道。

本研究在本课题组已证实醉香含笑树皮对人

肝癌细胞 HepG2 具有生长抑制作用及细胞形态学改变作用等研究基础上^[3], 进一步研究了该植物树皮提取物诱导人肝癌细胞 HepG2 凋亡的相关机理, 尤其对 COX-2 蛋白表达的影响进行了研究, 为深入开发醉香含笑植物资源提供了科学依据。

1 仪器与试剂

流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司); CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司); 酶标定量测定仪(美国 Bio-Rad 公司); 倒置显微镜(Olympus 公司)。RPMI-1640 培养基(Gibco 公司); 小牛血清(杭州四季青生物制品厂); 人肝癌细胞 HepG2(南京凯基生

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20872110)

作者简介: 宋晓凯, 男, 博士, 教授 Tel: (0518)85895408

E-mail: sxk581214@163.com

物科技有限公司); Annexin V/PI 双标试剂盒(南京凯基生物科技有限公司, 批号: KGB510)。

醉香含笑全株植物于 2011 年 7 月采自浙江省金华市金西花木场, 经淮海工学院宋晓凯教授鉴定为木兰科含笑属植物醉香含笑 *Michelia macclurei* Dandy。

2 方法与结果

2.1 醉香含笑树皮提取物的制备及分组

醉香含笑树皮醇提取物的制备: 称取醉香含笑树皮 1.1 kg, 自然晾干后, 剪碎, 先后分 4 批置于 2 000 mL 圆底磨口烧瓶中, 加入 1 000 mL 95% 乙醇, 以玻璃塞封闭圆底烧瓶口, 浸泡 48 h; 接回流提取装置, 以恒温电热套加热至沸腾, 开始计时, 沸腾持续 1.5 h 后, 用 4 层纱布封住瓶口, 滤出各批提取液。再加入 95%乙醇, 加入量以淹过树皮为准, 再加热提取 1 次, 时间仍为 1.5 h。合并 2 次粗提液, 用中速定性滤纸、循环水式多用真空泵抽滤, 滤除粗提取液中的杂质颗粒, 再用旋转蒸发仪浓缩抽滤液, 水浴烘干后, 制成醉香含笑树皮醇提取物(extrat of barks of *Michelia macclurei* Dandy., EBMMMD)湿浸膏, 放入烘箱烘烤 8 h, 制成干浸膏共 87.69 g, 4 °C 冰箱冷藏备用。

精确称取醉香含笑树皮干浸膏 200.0 mg, 用 100 mL 三蒸水稀释并以 DMSO 使其充分溶解, 配成 2 mg·mL⁻¹ EBMMMD, 用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过除菌, 作为母液置于 4 °C 冰箱备用。

实验组分别为各终浓度 EBMMMD(6.25, 12.50, 25.00 μg·mL⁻¹, 依次为低、中、高浓度组), 于 4 °C 保存; 阴性对照组培养液(未经 EBMMMD 处理组)为含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 其中 DMSO 终浓度<0.1%。

2.2 细胞培养及细胞悬液的制备

人肝癌细胞 HepG2 培养于含 10%新生牛血清的 DMEM 培养液中, 置 37 °C、5% CO₂ 的培养箱, 取对数生长期细胞用于实验。

2.3 流式细胞仪分析细胞凋亡

收集未处理及以不同浓度 EBMMMD 处理 72 h 后的 HepG2 细胞(细胞数为 1.0×10⁶ 个), 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清, 以 PBS 缓冲液清洗 2 次。

用双蒸水 1:4 稀释结合缓冲液, PBS 洗涤样品细胞后, 以稀释的结合缓冲液重悬细胞, 并调整细胞浓度为 2×10⁵~5×10⁵·mL⁻¹。取 195 μL 细胞悬液, 加入 5 μL Annexin V 混匀, 室温反应

10 min, PBS 洗细胞一次, 再以 190 μL 稀释的结合缓冲液重悬, 按 Annexin V/PI 双标试剂盒说明书操作, 依次加入 RNA 酶和溴化乙啶(PI)染色, 室温避光放置 30 min, 过 400 目筛网, 用流式细胞仪分析, 激发波长 488 nm 测定细胞凋亡率, 采用 Cellquest 软件分析结果。

2.4 Western-blotting 考察 EBMMMD 对 HepG2 细胞 COX-2 蛋白表达的影响

取复苏后传代至第 2~3 代细胞接种于培养皿中, 待细胞长到 70%~80%时换无血清 DMEM 培养 24 h。药物处理组分别为各终浓度 EBMMMD (6.25, 12.50, 25.00 μg·mL⁻¹), 阴性对照组为含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基。收集经 EBMMMD 处理 72 h 的细胞, 冰预冷 PBS 洗 2 次, 加入 100 μL 细胞裂解液提取蛋白。以 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白。40 mA 电流强度电泳 120 min。电泳后以 400 mA 转膜 3 h。5% TBS 脱脂奶粉封闭液封闭 30 min, TBS 液清洗 1 次, 每次 5 min; 转印至硝酸纤维素膜后, 依次加小鼠抗人 COX-2 单抗和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗孵育, ECL 显色(A 液: B 液=1:1)。以 β-actin 作为内参照, X 光片灰密度比值作为蛋白半定量相对值。试验重复 3 次。

2.5 统计学处理

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 17.0 软件, 采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2.6 结果

2.6.1 EBMMMD 对 HepG2 细胞形态的影响 在倒置显微镜下, 对照组 HepG2 细胞大小均匀, 细胞核呈圆形或椭圆形, 细胞膜完整、轮廓明显, 核仁清晰, 细胞间连接紧密, 在普通光镜下透明度强, 结果见图 1A。经 EBMMMD 处理后的细胞生长状态较差, 随 EBMMMD 浓度增加及作用时间延长, 可见到明显细胞凋亡形态学改变。6.25 μg·mL⁻¹ EBMMMD 处理 HepG2 细胞 72 h, 细胞间隙增宽, 底色模糊, 结果见图 1B; 12.50 μg·mL⁻¹ 的 EBMMMD 处理 72 h 后细胞体积变小、变形, 胞质颗粒增多, 见空泡, 胞核浓缩, 少许漂浮细胞, 结果见图 1C; 25.00 μg·mL⁻¹ EBMMMD 处理 HepG2 细胞 72 h, 大部分贴壁细胞出现皱缩、变圆、脱落呈悬浮状, 存活细胞减少, 出现大量细胞碎片, 结果见图 1D。

2.6.2 EBMMMD 对 HepG2 细胞凋亡的影响 流式

细胞仪检测 HepG2 细胞凋亡率发现, 经 EBMMMD (6.25~25.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 干预后, 均可诱导 HepG2 细胞发生凋亡, 细胞凋亡率随作用时间的延长和

EBMMMD 浓度加大而逐渐明显增加, 6.25, 12.5, 25.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ EBMMMD 凋亡百分率分别为 10.60%, 44.70%, 80.30%, 结果见图 2。

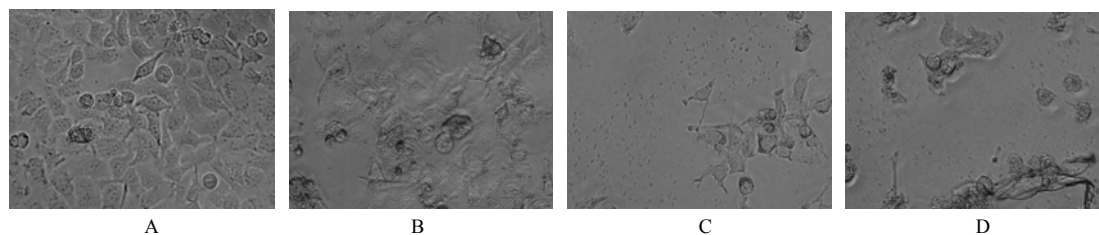


图 1 EBMMMD 对 HepG2 细胞形态的影响(EBMMMD 处理 72 h)(400 $\times$)

A-阴性对照组; B-EBMMMD 低浓度组; C-EBMMMD 中浓度组; D-EBMMMD 高浓度组

Fig. 1 Effects of EBMMMD on morphology change of HepG2 cells (treatment of EBMMMD for 72h) (400 $\times$)

A-negative control group; B-EBMMMD low concentration group; C-EBMMMD middle concentration group; D-EBMMMD high concentration group

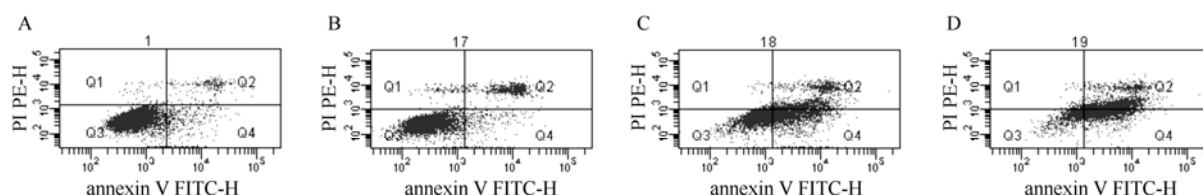


图 2 不同浓度 EBMMMD 对 HepG2 细胞凋亡的影响

A-阴性对照组; B-EBMMMD 低浓度组; C-EBMMMD 中浓度组; D-EBMMMD 高浓度组

Fig. 2 Effects of different concentrations of EBMMMD on apoptotic rate of HepG2 cells

A-negative control group; B-EBMMMD low concentration group; C-EBMMMD middle concentration group; D-EBMMMD high concentration group

2.6.3 EBMMMD 对 HepG2 细胞 COX-2 蛋白表达的影响 Western-blotting 结果显示, 不同浓度 EBMMMD 对 HepG2 细胞作用 12, 24, 48 h 后, COX-2 蛋白表达随着药物浓度和时间增加而减弱, 呈浓度和时间依赖性, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 EBMMMD 对 COX-2 蛋白表达有明显抑制作用, 结果见图 3。

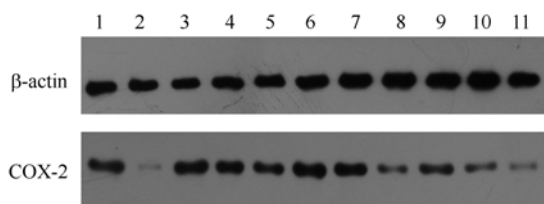


图 3 不同浓度 EBMMMD 对 HepG2 细胞 COX-2 蛋白表达的影响

1-阴性对照组; 2-紫杉醇组; 3~5-EBMMMD 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 处理 12, 24, 48 h; 6~8-EBMMMD 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 处理 12, 24, 48 h; 9~11-EBMMMD 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 处理 12, 24, 48 h

Fig. 3 Effects of different concentrations of EBMMMD on the expression of COX-2 protein in HepG2 cells

1-negative group; 2-taxol group; 3~5-EBMMMD 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ treated for 12, 24, 48 h; 6~8-EBMMMD 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ treated for 12, 24, 48 h; 9~11-EBMMMD 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ treated for 12, 24, 48 h

3 讨论

本课题组前期研究表明, EBMMMD 可显著抑制人肝癌细胞 HepG2 生长, 其作用具有一定量效

关系^[3]。本次研究发现, 不论是 EBMMMD 诱导 HepG2 细胞凋亡, 还是抑制 HepG2 细胞中 COX-2 蛋白表达, 均呈现药物浓度和时间依赖性。即当低浓度 EBMMMD 处理时, 诱导 HepG2 细胞凋亡和抑制细胞中 COX-2 蛋白表达作用均不明显。随着 EBMMMD 浓度逐渐升高, HepG2 细胞凋亡率呈上升趋势, 对 COX-2 蛋白表达的抑制作用也逐渐明显, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ EBMMMD 能明显抑制 HepG2 细胞中 COX-2 蛋白表达。由此表明, EBMMMD 有可能通过抑制 COX-2 蛋白表达途径诱导 HepG2 细胞凋亡, 提示 EBMMMD 对人肝癌细胞 HepG2 的抑制作用与 COX-2 途径有关, 并推测 EBMMMD 有可能是通过诱导 HepG2 细胞凋亡而产生对细胞的生长抑制作用。

致谢: 文中部分实验内容由南京凯基生物科技发展有限公司协助完成, 在此致谢。

REFERENCES

- [1] ZHONG Y H. Cultivation technique of *Michelia macclurei* Dandy. [J]. Guangxi Forest Sci(广西林业), 2005(4): 42-43.
- [2] MING J, GU W C. Research advances on *Michelia* Linn. in China [J]. J Cent South Forest Univ(中南林业学院学报), 2004, 24(5): 147-152.
- [3] SONG X K, LU C L, HU K, et al. GC-MS analysis of volatile

components from barks of *Michelia macclurei* and their inhibition on *in vitro* growth of HepG2 cells [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2011, 42(11): 2213-2215.

- [4] SONG X K. GC-MS analysis of volatile components from roots of *Michelia Macclurei* Dandy. and growth inhibition of NIH 3T3 cell Line [J]. Chin JMAP(中国现代应用药学), 2011,

28(12): 1122-1125

- [5] HUANG R Z, TAN D F, ZHENG Y S, et al. Chemical constituents of the volatile oils from leaves of *Michelia macclurei* Dandy. [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2009, 17(4): 406-408.

收稿日期: 2013-10-10