

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.01.011

· 基础研究 ·

## 海芒果种子提取物 nerifolin 对人肝癌细胞系 HepG2 增殖和凋亡的影响

陈若华<sup>1</sup>, 蒲瑾<sup>1</sup>, 戴焱焱<sup>1</sup>, 黄才国<sup>2△</sup>, 楼国良<sup>1</sup>(1. 第二军医大学长海医院特需诊疗科上海200433; 2. 第二军医大学基础部生化与分子生物学教研室, 上海200433)

[摘要] 目的: 观察来源于海芒果种子的皂苷类化合物 nerifolin 对人肝癌细胞 HepG2 增殖及凋亡的影响, 初步探讨其作用机制。方法: MTT 法检测不同质量浓度 nerifolin 对 HepG2 细胞增殖的影响, 流式细胞术检测 nerifolin 对 HepG2 细胞周期和凋亡的影响。Caspase 试剂盒检测 nerifolin 对 HepG2 细胞 caspase-3 酶活化的影响。结果: Nerifolin 可时间和剂量依赖性抑制 HepG2 细胞增殖, 作用 24、48、72 h 的 IC<sub>50</sub> 分别为 (2.34 ± 0.08)、(0.13 ± 0.01)、(0.06 ± 0.01) μg/ml。随着 nerifolin (0.1 μg/ml) 作用时间的延长, HepG2 细胞 S 期百分比逐渐增多, 而 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期百分比逐渐减少 (P < 0.01), nerifolin 阻滞 HepG2 细胞于 S 期。Nerifolin 作用后, HepG2 细胞早期凋亡率上升至 22.65%, caspase-3 活性比对照组明显升高 (P < 0.01)。结论: Nerifolin 可通过 S 期阻滞抑制 HepG2 细胞的增殖, 通过 caspase-3 依赖途径诱导 HepG2 细胞的凋亡。

[关键词] 肝癌 HepG2; nerifolin; 增殖; 凋亡; 细胞周期; caspase-3

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)01-0051-04

## Effects of nerifolin, an isolate from seeds of *Cerbera manghas* L., on proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells

CHEN Ruo-hua<sup>1</sup>, PU Jin<sup>1</sup>, DAI Yan-yan<sup>1</sup>, HUANG Cai-guo<sup>2△</sup>, LOU Guo-liang<sup>1</sup>(1. VIP Clinical Department, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of nerifolin, an isolate from the seeds of *Cerbera manghas* L., on the proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and the related mechanism. **Methods:** Effect of nerifolin on the proliferation of HepG2 cells was examined by MTT assay, and its effects on cell cycle and apoptosis of HepG2 cells were assessed by flow cytometry. Effect of nerifolin on caspase-3 activation in HepG2 cells was examined by caspase detecting kit. **Results:** Nerifolin inhibited the proliferation of HepG2 cells in a dose- and time-dependent manner, with the IC<sub>50</sub> values being (2.34 ± 0.08), (0.13 ± 0.01) and (0.06 ± 0.01) μg/ml after nerifolin treatment for 24, 48, and 72 h, respectively. The proportion of HepG2 cells in S phase increased with the prolongation of nerifolin treatment, and the proportion in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase gradually decreased (P < 0.05), indicating that nerifolin blocked HepG2 cells in S phase. Early apoptosis rate of HepG2 cells increased to 22.65%, and caspase-3 activity was significantly increased after nerifolin treatment (P < 0.01). **Conclusion:** Nerifolin can inhibit the proliferation of HepG2 cells by inducing S phase arrest and can trigger apoptosis via caspase-3 dependent pathway.

[Key words] liver cancer HepG2; nerifolin; proliferation; apoptosis; cell cycle; caspase-3

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(1): 51-54]

[基金项目] 国家高科技研究发展计划(863计划)项目资助(No. 2006AAD9Z447)。Project supported by the National High Science and Technology Research and Development Program (863 Program) of China (No. 2006AAD9Z447)

[作者简介] 陈若华(1964-), 浙江省宁波市人, 主任医师, 教授, 主要从事临床肿瘤治疗的研究

[通信作者] 楼国良(LOU Guo-liang, corresponding author), E-mail: Drlougliang@hotmail.com; 黄才国(HUANG Cai-guo, co-corresponding author), E-mail: huangcaigao@hotmail.com。△共同通信作者

[网络出版] 2011-01-25; http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110125.1120.017.html

从海洋生物及其代谢产物中筛选和提取具有特异化学结构的天然活性物质已成为抗肿瘤药物开发的重要来源。红树植物(mangrove plants)是热带、亚热带海区特有高等植物<sup>[1]</sup>,我国利用红树植物作药用已有较长的历史,尤其民间用药<sup>[1]</sup>。海芒果(*Cerbera manghas L.*)是分布在海岸边的一种红树林植物,前期研究<sup>[2]</sup>显示,海芒果提取物对体外培养的乳腺癌、肺癌、表皮样癌细胞都有很强的增殖抑制作用。本研究以海芒果的果实中提取的皂苷类化合物 nerifolin 为研究对象,研究其对肝癌 HepG2 细胞的作用及可能的抗肿瘤机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株和主要试剂

人肝癌细胞株 HepG2 购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所细胞库,常规培养于 MEM 培养基(含 10% 灭活的胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素),置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养,取对数生长期细胞用于实验。MTT、DMSO、5-FU 均购自 Amresco 公司。MEM、青霉素/链霉素混合液(青霉素 100 U/ml,链霉素 100 μg/ml)购自 Gibco 公司。胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。碘化丙啶(propidium iodide, PI)、Annexin V-FITC 购自晶美生物公司,Caspase-3 活性检测试剂盒购自碧云天公司。

### 1.2 Nerifolin 的配制方法

海芒果样品采于我国广西北海,由中国科学院上海药物研究所沈金贵副研究员鉴定为海芒果(*Cerbera manghas L.*)。海芒果中皂苷类化合物 nerifolin 的分离纯化由中国科学院上海生命科学研究院药物研究所国家新药研究重点实验室郭跃伟研究员课题组完成,nerifolin 结构如图 1<sup>[3]</sup>所示。液相色谱与质谱联用(LC-MS)分析表明,nerifolin 的纯度大于 99%。Nerifolin 用 DMSO 溶解,再用 PBS 稀释,使 DMSO 终质量分数小于 0.1%。

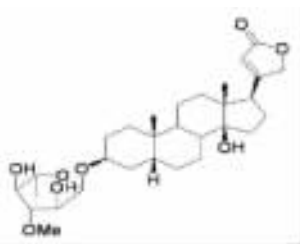


图 1 Nerifolin 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of nerifolin

### 1.3 MTT 法检测 nerifolin 对 HepG2 细胞存活率的影响

参考文献[4],取对数生长期 HepG2 细胞,经 0.25% 胰蛋白酶消化,再加入含有 10% 胎牛血清的 MEM 培养基,以每孔  $1 \times 10^4$  个细胞铺于 96 孔培养板中,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养,24 h 后换液。Nerifolin 组加入 nerifolin 使其终质量浓度分别为 0.05、0.1、0.5、1、2、4、8 μg/ml,另设 5-FU (25 μg/ml)阳性对照组、不加药物的阴性对照组和不接种细胞的空白对照组。每个浓度、每个时间点均设 5 个复孔。分别培养 24、48、72 h 后;每孔加入 MTT 溶液(1 mg/ml)50 μl,37 °C 孵育 4 h 后弃培养基;每孔加入 150 μl DMSO 振荡 10 min,使结晶物完全溶解,用酶标仪在 550 nm 处测定光密度值(D)。细胞存活率(%) = [(药物处理组  $D_{550}$  - 空白组  $D_{550}$ ) / (阴性对照组  $D_{550}$  - 空白组  $D_{550}$ )] × 100%。

### 1.4 流式细胞术检测 nerifolin 对 HepG2 细胞周期的影响

取对数生长期的 HepG2 细胞,以每孔  $1 \times 10^6$  细胞接种于 6 孔培养板中,细胞贴壁后,弃上清,各组加入终质量浓度为 0.1 μg/ml 的 nerifolin,孵育 0、12、24、48 h。然后,用 0.25% 胰酶消化收集所有细胞,用预冷的 0.1 mol/L PBS(pH 7.4)清洗 1 次,弃上清,加入 1 ml 预冷的 70% 乙醇固定,4 °C 过夜。收集所有固定细胞标本,离心弃上清,用 PBS 清洗 1 次,加入 1 mg/ml 的 RNase A,用 PI 染液(50 μg/ml)室温下避光染色 30 min,流式细胞仪进行细胞周期分析。

### 1.5 Annexin V-PI 法检测 nerifolin 对 HepG2 细胞凋亡的影响

将 6 孔板中的各处理组 HepG2 细胞用 0.25% 胰酶消化,1 500 × g 离心 15 min,然后用 4 °C 预冷的 PBS 洗细胞 1 次,用 250 μl 结合缓冲液重新悬浮细胞,调节细胞密度至  $1 \times 10^6$ /ml;取 100 μl 的 HepG2 细胞悬液于 5 ml 的流式管中,加入 5 μl 的 Annexin V-FITC 和 20 μg/ml 的 PI 10 μl,混匀后室温避光孵育 15 min,然后加入 400 μl PBS,流式细胞仪进行检测。

### 1.6 HepG2 细胞 caspase-3 活性的检测

取对数生长期的 HepG2 细胞,以每孔  $1 \times 10^6$  的数量接种于 6 孔培养板中,各组加入终质量浓度为 0.1 μg/ml 的 nerifolin,孵育 3、6、12、24 h 后,使用 caspase-3 活性检测试剂盒检测 caspase-3 活性,按试剂盒说明书进行操作。

### 1.7 统计学处理

计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS10.0 统计软件,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Nerifolin 抑制 HepG2 细胞的增殖

MTT 结果显示,不同质量浓度 Nerifolin 处理后分别培养 12、24、48、72 h, Nerifolin 对 HepG2 细胞增殖具有抑制作用,且其抑制作用具有时间和剂量依赖性(图 2)。Nerifolin 对 HepG2 细胞的半数抑制质量浓度  $IC_{50}$  在 12、24、48、72 h 时分别为(  $2.34 \pm 0.08$  )、(  $0.13 \pm 0.01$  )、(  $0.15 \pm 0.01$  )、(  $0.06 \pm 0.01$  )  $\mu\text{g/ml}$ 。

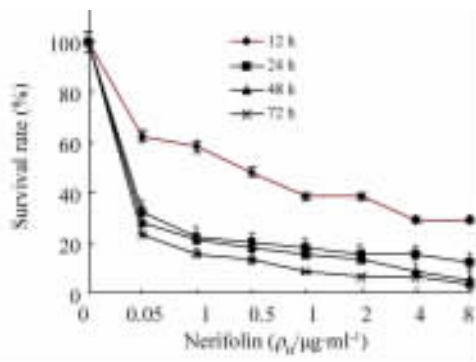


图 2 Nerifolin 抑制 HepG2 细胞的增殖

Fig. 2 Nerifolin inhibited proliferation of HepG2 cells

### 2.2 Nerifolin 对 HepG2 细胞细胞周期的影响

流式细胞仪检测 nerifolin 对 HepG2 细胞周期的影响,结果如图 3 所示,与对照组相比,0.1  $\mu\text{g/ml}$  nerifolin 作用于肝癌 HepG2 细胞 12 h 后,S 期的 HepG2 细胞开始累积(27.58%),这种累积作用一直持续到 nerifolin 处理细胞 48 h(71.4%,  $P < 0.01$ )。同时也观察到与对照组相比, $G_2/M$  期 HepG2 细胞也相应增加,其中处理 48 h 时, $G_2/M$  期 HepG2 细胞比例(22.9%)与对照组(4.87%)相比显著增加( $P < 0.01$ ), $G_0/G_1$  期的 HepG2 细胞比例减少( $P < 0.01$ )。提示 nerifolin 可以阻遏 HepG2 细胞从 S 到  $G_2$  以及  $G_2$  到 M 期的进入,使肝癌 HepG2 细胞阻滞在 S 与  $G_2/M$  期,抑制 HepG2 细胞的有丝分裂,且这种阻滞作用具有时间依赖性。

### 2.3 Nerifolin 诱导 HepG2 细胞凋亡

Annexin V 是检测细胞早期凋亡的灵敏染色剂之一<sup>[5]</sup>,为了进一步证实 nerifolin 是否能诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡,通过 Annexin V-PI 双染色进行检测。结果(图 4)显示,随着 nerifolin 作用时间的延长,HepG2 细胞早期凋亡率逐渐升高,nerifolin 处理 6 h 时,HepG2 细胞的凋亡并不明显;在处理 24 h 后与对照组(3.04%)相比,neri-

folin 组的早期凋亡细胞比例明显升高(9.69%);处理 48 h 后与对照组(4.46%)相比,nerifolin 组的早期凋亡细胞比例继续上升(22.65%)。以上结果说明,nerifolin 能诱导 HepG2 细胞凋亡,且该作用呈时间依赖性(图 4)。

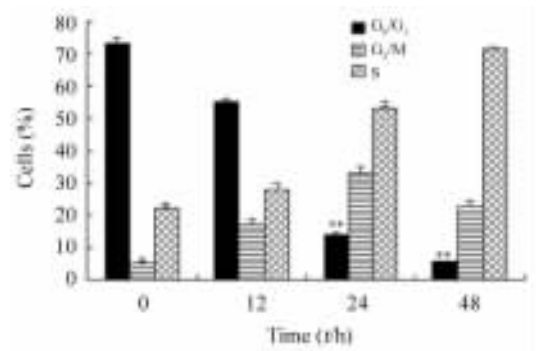


图 3 Nerifolin 对 HepG2 细胞周期分布的影响

Fig. 3 Effect of nerifolin on cell cycle distribution of HepG2 cells

\*  $P < 0.5$ , \*\*  $P < 0.01$  vs  $G_0/G_1$

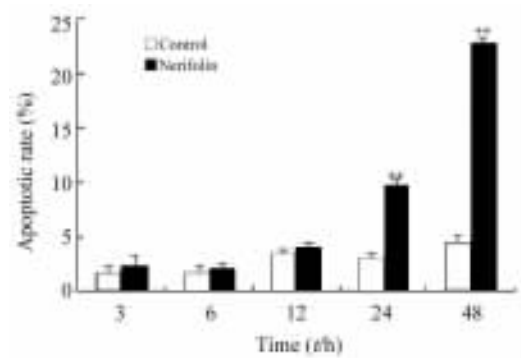


图 4 Nerifolin 作用诱导 HepG2 细胞早期凋亡

Fig. 4 Nerifolin induced apoptosis in early stage of HepG2 cells

\*  $P < 0.5$ , \*\*  $P < 0.01$  vs contl

### 2.4 Nerifolin 诱导 HepG2 细胞中 caspase-3 活化

Caspase-3 活性检测结果显示,0.1  $\mu\text{g/ml}$  的 nerifolin 处理 HepG2 细胞 3 h 时,caspase-3 酶的活性显著增加(为对照组的 3.33 倍, $P < 0.05$ ),且随着 nerifolin 作用时间的延长,caspase-3 活性明显增加,在 6、12、24 h 时 caspase-3 活性分别为对照组的 5.26、(  $P < 0.05$  )、12.25(  $P < 0.01$  )、和 23.84 倍(  $P < 0.01$  )。

## 3 讨论

红树植物为耐盐、常绿乔木或灌木,全球有红树

植物约 24 科 83 种(或变种), 主要分布于东南亚各国, 其中我国分布约 20 科 37 种<sup>[1]</sup>。近年来对红树植物海芒果提取物抗肿瘤作用的研究已引起了广泛的关注<sup>[9]</sup>。本课题前期研究<sup>[10-12]</sup>显示, 海芒果提取物对体外培养的乳腺癌、肺癌、表皮样癌细胞都具有很好的增殖抑制作用, 而对人正常肝细胞 Chang Liver 显示较低的毒性。本实验发现, 海芒果提取物 nerifolin 可诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡, 其作用具有时间和剂量依赖性, 这一特点使 nerifolin 有可能成为新一代的抗肿瘤药物。

细胞周期阻滞和诱导细胞凋亡是药物抑制肿瘤细胞增殖的两大主要机制。MTT 结果显示, nerifolin 在质量浓度为 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时, 随着作用时间的延长,  $G_0/G_1$  期的 HepG2 细胞减少, S 进入与  $G_2/M$  期的细胞增加, 说明 nerifolin 可以阻遏细胞周期从 S 进入  $G_2$  和  $G_2$  进入 M 期, 可抑制 HepG2 细胞的有丝分裂, 造成 HepG2 细胞在 S 与  $G_2/M$  期阻滞, 且这种阻滞具有时间依赖性。

细胞凋亡是机体为维持内环境稳定, 由基因调控的细胞自主的、有序的死亡, 是为更好地适应环境而进化出的一种主动死亡<sup>[6]</sup>, 它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等。细胞凋亡有其非常精巧的自杀通路, 采用诱导细胞凋亡的方法抑制肿瘤细胞比非凋亡方式具有优势, 在凋亡基础上的癌症治疗策略成为近年来研究的热点<sup>[7-8]</sup>。

细胞凋亡涉及一系列特殊的蛋白酶, 由这些蛋白酶构成的级联反应是凋亡的核心过程<sup>[13]</sup>。这一类蛋白酶具有半胱氨酸蛋白酶活性, 统称为“caspase”。在细胞凋亡过程中, caspase-3 处于该级联反应的下游, 是细胞凋亡级联反应中的关键调节点, 通过降解细胞内相应底物诱导细胞凋亡<sup>[14-15]</sup>。在外源性细胞凋亡途径中, 细胞膜上特定的死亡受体与配体结合(如 Fas 受体与 FasL 配体)后, 通过跨膜信号转导把死亡信号转导入细胞内, 通过一系列接头蛋白(adaptor), 引起 caspase-8 酶原的水解和激活, 激活后的 caspase-8 可以继续激活下游 caspase-3, 使细胞发生凋亡。nerifolin 能使 HepG2 细胞 caspase-3 活性升高, 说明其可能通过外源性途径诱导 HepG2 细胞凋亡。

总之, 本研究发现, nerifolin 可通过 S 期阻滞抑制 HepG2 细胞增殖, 通过 caspase-3 依赖途径诱导 HepG2 细胞凋亡。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] 林鹏, 傅勤. 中国红树林环境生态及经济利用 [ M ]. 北京高等教育出版社, 1995: 12.
- [ 2 ] Laphookhieo S, Cheenpracha, Karalai C, et al. Cytotoxic cardenolide glycoside from the seeds of *Cerbera odollam* [ J ]. *Phytochemistry*, 2004, 65(4): 507-510.
- [ 3 ] Abe F, Yamauchi T. Studies on *Cerbera*. I. Cardiac glycosides in the seeds, bark, and leaves of *Cerbera manghas* [ J ]. *Chem Pharm Bull*, 1977, 25(25): 2744-2748.
- [ 4 ] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application and cytotoxicity assays [ J ]. *Immunol Met*, 1983, 65(1/2): 55-63.
- [ 5 ] 毛咏秋, 李喜荣, 雷松. 几种抗肿瘤药物诱导 Jurkat 细胞凋亡的研究 [ J ]. *中国实验血液学杂志*, 2006, 14(4): 681-685.
- [ 6 ] Reed J C. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery [ J ]. *Trends Mol Med*, 2001, 7(7): 314-319.
- [ 7 ] Frankfurt OS, Krishan A. Apoptosis-based drug screening and detection of selective toxicity to cancer cells [ J ]. *Anticancer Drugs*, 2003, 14(7): 555-561.
- [ 8 ] Pettersson F, Colston KW, Dalglish AG. Differential and antagonistic effects of 9-cis-retinoic acid and vitamin D analogues on pancreatic cancer cells *in vitro* [ J ]. *Br J Cancer*, 2000, 83(2): 239-245.
- [ 9 ] Leng CC, Joell JG, Krishna PLB, et al. Activity-guided isolation of constituents of *Cerbera manghas* with antiproliferative and antiestrogenic activities [ J ]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000, 10(21): 2431-2434.
- [ 10 ] Wang GF, Guo YW, Feng B, et al. Tanghinigenin from seeds of *Cerbera manghas L.* induces apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells [ J ]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2010, 30(1): 31-36.
- [ 11 ] 冯波, 郭跃伟, 黄才国, 等. GHSC-73 对人肝癌细胞系 HepG2 细胞增殖及细胞周期的影响 [ J ]. *第二军医大学学报*, 2009, 30(9): 1110-1114.
- [ 12 ] Feng B, Huang CG, Chen RH, et al. 2'-Epi-2'-O-acetylthevetin B induces apoptosis partly via  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated mitochondrial pathway in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [ J ]. *Cell Bio Int*, 2009, 33(6): 918-925.
- [ 13 ] Shah S, Gapor A, Sylvester P W. Role of caspase-8 activation in mediating vitamin E-induced apoptosis in murine mammary cancer cells [ J ]. *Nutri Cancer*, 2003, 45(2): 236-246.
- [ 14 ] Poter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis [ J ]. *Cell Death Differ*, 1999, 6(2): 99-104.
- [ 15 ] Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates and functions during apoptosis [ J ]. *Annual Rev Biochem*, 1999, 68(2): 383-424.

[ 收稿日期 ] 2010-10-20

[ 修回日期 ] 2010-12-22

[ 本文编辑 ] 韩丹