

· 基础研究 ·

甘草酸二铵对人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖和 p53 表达的影响*

张剑锋¹, 李浩², 李超乾^{1△}, 赵春菱¹, 唐华民¹, 严若谷²

(广西医科大学第一附属医院:1. 急诊科;2. 研究生院, 南宁 530007)

摘要:目的 探讨甘草酸二铵(DG)对人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖的抑制作用及对 p53 表达的影响。方法 实验分对照组及 DG 干预组,采用 MTT 比色法测定细胞的生长情况,检测 DG 对细胞增殖的抑制作用;RT-PCR 检测 DG 对 p53 mRNA 表达水平的影响;通过 Western blot 测定 DG 对 p53 蛋白表达的影响。结果 DG(0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00 mg/L)呈浓度依赖性降低人肝癌细胞存活率,作用 48 h 时 IC₅₀ 值为(4.31±0.21)mg/L;DG 可明显抑制肝癌细胞增殖,剂量为 4.00、8.00、16.00 mg/L 时,其抑制率分别为 44.52%、66.78%、91.24%;低、中、高浓度组 DG(2.0、4.0、8.0 mg/L)可明显提高肝癌细胞中 p53 mRNA 及其蛋白表达,并呈浓度依赖性增强。结论 DG 对人肝癌细胞 SMMC-7721 具有明显细胞毒性和抑制增殖作用,其机制可能与上调 p53 表达有关。

关键词:甘草酸;肝肿瘤,实验性;基因,p53;细胞增殖

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.27.023

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)27-2852-02

Effect of diammonium glycyrrhizinate on proliferation in liver cancer cell SMMC-7721 and p53 expression*

Zhang Jianfeng¹, Li Hao², Li Chaoqian^{1△}, Zhao Chunling¹, Tang Huamin¹, Yan Ruogu²

(1. Department of Emergency; 2. Graduate College, First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530007, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibiting effect of diammonium glycyrrhizinate(DG) on proliferation of liver cancer cell SMMC-7721 in vitro and its effect on p53 expression. **Methods** Two groups were set up: the study group(DG intervention) and the control group without DG. MTT assay was used to measure the cell growth and the inhibiting effect of DG on SMMC-7721 cells. P53 mRNA was quantified by real-time fluorescence quantitative PCR, followed by Western blot for detecting p53 protein expression. **Results** The survival rate of SMMC-7721 cell was decreased by DG(0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 8.00, 16.00 mg/L) in a concentration-dependent manner, and the IC₅₀ value for 48 h was(4.31±0.21) mg/L. The inhibition rate was respectively 44.52%, 66.78% and 91.24% in 4.00, 8.00, 16.00 mg/L treatment groups. The gene and protein expressions of p53 were obviously up-regulated after exposure to DG in 2.00, 4.00, 8.00 mg/L treatment groups. **Conclusion** DG inhibits the growth of liver cancer cell SMMC-7721 obviously. And its mechanism may be related to up-regulate p53 expression.

Key words: glycyrrhizic acid; liver neoplasms, experimental; genes, p53; cell proliferation

甘草酸二铵(diammonium glycyrrhizinate, DG)是从中药甘草(glycyrrhiza)中提取的一种有效活性单体化合物^[1],具有较强的抗炎、抑制肝纤维化和肝炎病毒增殖的作用^[2-6]。据国内外文献报道,长期使用复方甘草酸苷能预防肝硬化的发生,且明显减少肝癌的发病率^[7-8],但 DG 对肿瘤是否具有抑制增殖作用,目前尚缺乏相关研究。本实验拟通过体外实验,探讨 DG 对人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞体外增殖的抑制作用,以及其对抑癌基因 p53 表达的影响。

1 材料与方

1.1 材料 人肝癌细胞 SMMC-7721 购自中国科学院上海细胞库, DG 注射液购自江苏正大天晴制药有限公司; RPMI1640 培养液购自 Thermo Scientific 公司, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料技术有限公司, 琼脂糖购自上海生工生物工程技术有限公司, Trizol 购自美国 Invitrogen 公司, PCR 扩增引物购自上海生工生物工程技术有限公司, 逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司, 蛋白提取试剂购自上海碧云天生物技术研究所, 鼠抗-p53 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 辣根过氧化物酶(HRP)标记抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥试剂公司。CO₂ 培养箱购自美国 Forma scientific Inc 公司, 超净工作台购自苏州净化设备厂, 酶联免疫检测仪 Model-450 购自

美国 Bio-Rad 公司, 倒置相差显微镜购自日本 Olympus 公司, Gel doc 2000 凝胶成像分析系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 肝癌细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养, 并加入青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 μg/L, 置于 37 °C 含 5% CO₂ 孵箱中培养。实验用细胞均处于对数生长期, 常规苔盼蓝计数活细胞大于 95%。实验细胞分为对照组及 DG 干预组, 其中对照组(DG 0)未采用任何药物干预, 而 DG 干预组则加入 DG 终浓度分别为 0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00 mg/L 进行共同孵育。

1.2.2 MTT 法测定细胞增殖抑制率 取处于对数生长期的细胞用胰蛋白酶消化后, 离心, 接种于 96 孔板, 培养 12 h, 分别加入不同浓度 DG, 孵育 48 h 后加入 10 μL MTT(5 mg/mL), 继续培养 4 h 后加入二甲亚砜(DMSO)150 微升/孔, 酶标仪 570 nm/630 nm 测定吸光度值(OD 值), 计算细胞存活率。存活率(%) = 用药组 OD 值/对照组 OD 值 × 100%。用软件 Bliss 计算 IC₅₀。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 测定 p53 基因的表达

1.2.3.1 引物设计与合成 从 Gene Bank 中查找 p53 及内参 GAPDH 基因的全长序列, 采用软件 Primer5.0 和 oligo 6.0 设

* 基金项目: 广西教育厅科研课题资助项目(201012MS057); 广西医疗卫生重点科研课题资助项目(重 2011092)。△ 通讯作者, E-mail: lichaoqian@yahoo.com.cn。

计上、下游引物。p53 上游: 5'-GGC CCA CTT CAC CGT ACT AA-3', 下游: 5'-GTG GTT TCA AGG CCA GAT GT-3'; GAPDH 上游: 5'-AAC GGA TTT GGT CGT ATT G-3', 下游: 5'-CTG GAA GAT GGT GAT GGG-3', 并通过 Gene Bank 进行 blast 比对。

1.2.3.2 样品制备 收集 DG 0.00(对照组)、2.00(低浓度组)、4.00(中浓度组)、8.00(高浓度组) mg/L 处理 48 h 后的 SMMC-7721 细胞, 采用总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 然后逆转录成 cDNA, 得到的样品作为 PCR 模板。

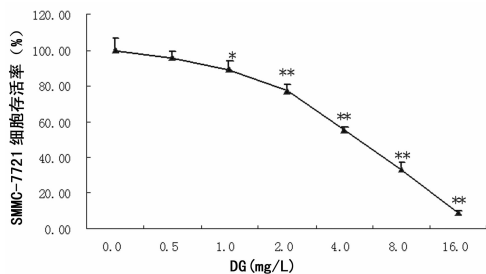
1.2.3.3 RT-PCR 法检测 p53 mRNA 表达 RT-PCR 反应体系反应条件为: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 59 °C 45 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环。测定样品 p53 和 GAPDH 的 Ct 值, $\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因}$ 。根据 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{干预组} - \Delta Ct_{对照组}$, 计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.2.4 Western blot 测定 p53 蛋白表达 收集经 DG 预处理的细胞, 加入 0.20 mL 蛋白裂解液冰上裂解 30 min, 4 °C 12 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 测定蛋白样品浓度, 取 60 μ g 总蛋白上样, 100 °C 5 min, 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 2 h, 加入鼠抗人 p53 单克隆抗体, 4 °C 孵育过夜, 加入 HRP 标记抗鼠 IgG, 同时加入 HRP 标记鼠抗 GAPDH 的单克隆抗体作为内参。室温孵育 1 h, 暗房进行压片、显影、定影, 底片经 LEICA Q2550IW 图像处理系统分析, 测定各条带的光密度值, 进行定量分析^[9]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DG 对 SMMC-7721 细胞增殖的影响 DG 对 SMMC-7721 细胞具有明显的增殖抑制作用。DG 呈浓度依赖性降低细胞的存活率(图 1)。DG 剂量为 4.00、8.00、16.00 mg/L 时其抑制率分别为 44.52%、66.78%、91.24%。倒置显微镜下观察, 与对照组比较, DG 作用后, 细胞形态逐渐变得不规则, 细胞质内出现空泡, 大部分细胞贴壁不良, 细胞膜出现皱缩、细胞变圆、脱落凋亡, 且此现象随着 DG 浓度增大而更为明显, DG 0、2.0、4.0、8.0 mg/L 作用细胞 48 h 显微镜观察图片见图 2。DG 作用 SMMC-7721 细胞 48 h 的 IC₅₀ 值为 (4.31 ± 0.21) mg/L。

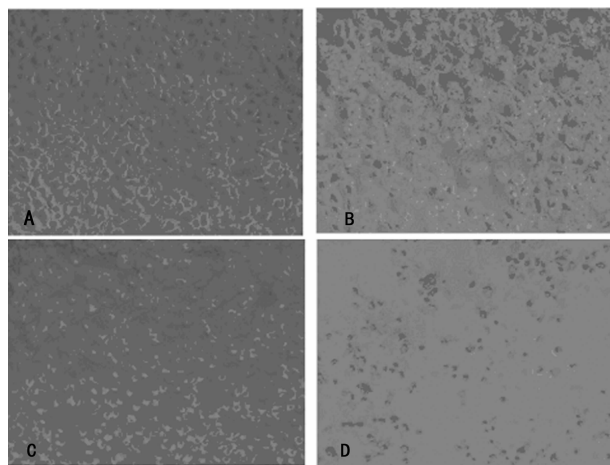


*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与对照组(DG 0.00)比较。

图 1 DG 对 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用

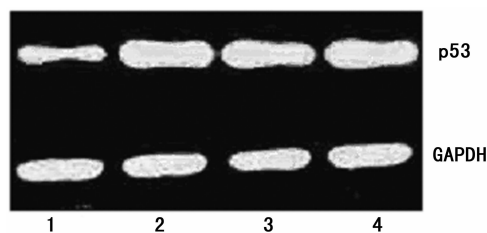
2.2 p53 mRNA 表达水平的变化 DG 2.00、4.00、8.00 mg/L 预处理 48 h 后, p53 mRNA 表达明显上调, 分别为 2.12 ± 0.186 、 2.56 ± 0.102 、 2.68 ± 0.211 , 与对照组(1.08 ± 0.211)比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 p53 蛋白表达的变化 与对照组比较, DG (2.00、4.00、8.00 mg/L) 预处理 SMMC-7721 细胞 48 h 后, p53 蛋白表达明显提高, 见图 3。



A: 对照组; B: 低浓度组; C: 中浓度组; D: 高浓度组。

图 2 各组 SMMC-7721 细胞显微镜观察图像(10×10)



1: 对照组; 2: 低浓度组; 3: 中浓度组; 4: 高浓度组。

图 3 Western blot 检测 p53 蛋白表达

3 讨 论

肝癌为世界上恶性程度极高的恶性肿瘤之一, 其预后极差。每年全球约有 125 万人患病, 而在我国肝癌处于恶性肿瘤病死率的第 2 位, 广西尤其为肝癌高发地区, 对人民群众健康造成极大威胁。近年来, 肝癌的病因学研究已取得很大进展, 认为肝癌的发生是在遗传易感性的基础上, 各种环境致癌因子的作用, 以致体细胞多种原癌基因激活及抑癌基因的失活, 最终导致细胞生长、增殖、分化发生紊乱的结果^[10]。如能寻找有效药物抑制原癌基因激活或者抑癌基因的失活, 则可能对肝癌的治疗效果有显著提高。

DG 是从中药甘草中提取的一种有效成分, 现代研究表明, DG 具有抗炎, 抗病毒(肝炎病毒、艾滋病病毒等), 防治肿瘤和保护肝细胞等多方面作用^[11-13], 临床应用广泛。但其对肝癌细胞增殖是否有抑制作用, 目前未见相关报道。本实验采用不同浓度的 DG 作用于肝癌细胞 SMMC-7721, MTT 法测定结果显示细胞生长受到明显的抑制, 作用细胞 48 h 后的 IC₅₀ 值为 (4.31 ± 0.21) mg/L, 表明 DG 具有较强抑制肿瘤细胞增殖作用, 且这种抑制作用具有浓度依赖性。

为了进一步阐明 DG 抑制肝癌细胞增殖的作用机制, 本实验选取了与肝癌发生过程有着密切联系的 p53 基因进行分子水平研究。p53 基因与肿瘤发生有很高的相关性^[14]。本研究结果显示, DG 上调了 p53 基因及其蛋白的表达, 但其具体调节机制尚未明确。p53 是细胞凋亡反应和细胞周期调控的重要因子, 在人类多种肿瘤中均具有较高的突变率, 将 p53 用于肿瘤基因治疗可能具有潜在应用价值。不少证据表明 p53 与肝癌发生的过程有着密切的联系^[15-16]。本研究小组将对 DG 调控 p53 的具体调节机制进一步研究, 下一步将建立肝癌在体动物模型, 以证实 DG 对肝癌作用的特异性与有效性, 以期尽早明确 DG 对肝癌的可能治疗作用及其机制。(下转第 2856 页)

不当而诱导产生多重耐药菌株。

参考文献:

- [1] 肖永红,王进,朱燕,等. Mohnarin 2008 年度报告:肺与肺泡灌洗液分离菌耐药性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(8):614-619.
- [2] 杨启文,王辉. 抗菌药物敏感性试验最新动向:2010 年 CLSI M100-S20 主要更新内容[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(6):488-491.
- [3] 赵云根,盛建华,吴承,等. 支气管肺泡灌洗术在下呼吸道感染诊治中的应用价值[J]. 临床医学, 2005, 25(11):30-31.
- [4] 潘磊. 纤维支气管镜支气管-肺泡灌洗术在 COPD 机械通气患者下呼吸道感染病原学诊断中的应用[J]. 中国内镜杂志, 2006, 12(5):553-554.
- [5] 张祎捷,胡艳秋. 铜绿假单胞菌对亚胺培南的耐药性分析及机制探讨[J]. 中国药房, 2008, 19(17):1317-1318.
- [6] 孙珊,张莉萍. 1 274 株铜绿假单胞菌在临床细菌感染中的分布及耐药性分析[J]. 重庆医学, 2011, 40(3):226-228.
- [7] 夏景洋,何刘媛,陈建江,等. 多药耐药铜绿假单胞菌的 MexAB2Op rM 表达水平研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(2):221-223.
- [8] 孙震,李家斌. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药机制研究[J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(1):24.
- [9] 蒋冬香,陈刚,王玉春,等. 产 ESBLs 大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌的临床分布与耐药性[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(2):371-373.
- [10] 许文芳,金法祥. 产超广谱 β_2 内酰胺酶肺炎克雷伯菌耐药性及基因分型[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(1):8-10.
- [11] 戴玮,罗鹏,张莉. 726 株肺炎克雷伯菌的分布特征及耐药性分析[J]. 重庆医学, 2011, 40(3):232-236.
- [12] 马序竹,吕媛. 鲍曼不动杆菌对主要抗菌药物耐药机制[J]. 中国临床药理学杂志, 2009, 25(1):90-94.
- [13] 程霞,钮博,时淑慧. 鲍曼不动杆菌在医院感染中的地位及耐药性研究[J]. 中华全科医学, 2011, 9(1):120-121.
- [14] 张晓文,邵海枫,王卫萍,等. 导致氨基糖苷类药物双圈耐药型鲍曼不动杆菌的相关携带基因研究[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(1):19-21.
- [15] 牟洪,杨思芸,王凤,等. 某院 2009 年鲍曼不动杆菌感染及耐药情况分析[J]. 中国药房, 2011, 22(2):146-148.
- [16] 蒋景华,庄晓伟. 重症监护病房鲍曼不动杆菌医院感染危险因素[J]. 中国消毒学杂志, 2011, 28(1):38-41.

(收稿日期:2012-01-08 修回日期:2012-05-22)

(上接第 2853 页)

综上所述, DG 能明显抑制肝癌细胞的过度增殖, 其可能通过上调 p53 基因和蛋白表达, 加速细胞凋亡, 从而达到抑制肿瘤细胞恶性增殖的效果, 但其对 p53 的具体调控机制尚待进一步研究明确。

参考文献:

- [1] Wu P, Zhang Y, Liu Y, et al. Effects of glycyrrhizin on production of vascular aldosterone and corticosterone[J]. Horm Res, 1999, 51(4):189-192.
- [2] 万军,何基德. 甘草酸二铵注射液联合肝炎灵注射液治疗慢性乙型肝炎的疗效[J]. 浙江中医药大学学报, 2007, 31(3):319-321.
- [3] 观晓辉. 甘草酸二铵联合丹参治疗高原地区慢性乙型肝炎的疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(12):1541-1542.
- [4] 苏茜. 甘草酸二铵注射液联合多烯磷脂酰胆碱治疗脂肪肝临床观察[J]. 中外健康文摘, 2007, 4(8):128-130.
- [5] 刘思纯,马博. 甘草酸二铵治疗急性药物性肝损伤的疗效观察[J]. 中国处方药, 2006, 55(10):62-64.
- [6] 许伟华,刘斌,林森,等. 甘草酸二铵治疗肝纤维化的动态观察[J]. 中国新药与临床杂志, 2003, 22(6):352-354.
- [7] 余细球,程芳洲,何小飞. 甘草酸二铵三七总苷等联合治疗活动性肝硬化[J]. 医药导报, 2002, 21(4):210-212.
- [8] Arase Y, Ikeda K, Murashima N, et al. The long term efficacy of glycyrrhizin in chronic hepatitis C patients[J]. Cancer, 1997, 79(8):1494-1500.
- [9] Kettritz R, Choi M, Rolle S, et al. Integrins and cytokines activate nuclear transcription factor-kappa B in human neutrophils[J]. J Biol Chem, 2004, 279(4):2657-2665.
- [10] 肖文华,刘为纹,房殿春,等. 重庆地区肝细胞癌 p53 基因突变模式的研究[J]. 重庆医学, 2001, 30(5):392-393.
- [11] Takei M, Kobayashi M, Li XD, et al. Glycyrrhizin inhibits R5 HIV replication in peripheral blood monocytes treated with 1-methyladenosine[J]. Pathobiology, 2005, 72(3):117-123.
- [12] Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, et al. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus[J]. Lancet, 2003, 361(9374):2045-2046.
- [13] Sato H, Goto W, Yamamura J, et al. Therapeutic basis of glycyrrhizin on chronic hepatitis B[J]. Antiviral Res, 1996, 30(2/3):171-177.
- [14] Melissa RJ, Anthony NK, Daniel G, et al. Selective activation of p53-mediated tumour suppression in high-grade tumors[J]. Nature, 2010, 468(7323):567-571.
- [15] 陈漫霞,陈思东,陈漫容,等. 原发性肝细胞癌拓扑异构酶 II α 表达及其与 p53 和 AFP 之间的关系[J]. 重庆医学, 2011, 40(26):2625-2628.
- [16] 余舒亮,王东,张沁宏,等. 重组人 p53 腺病毒增强肝癌放疗敏感性的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(9):784-786.

(收稿日期:2012-01-09 修回日期:2012-04-22)