

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.01.007

## 青蒿素对肝癌细胞株 HepG2 细胞增殖的影响\*

黄俊玲<sup>1</sup>, 李广志<sup>1</sup>, 黄赞松<sup>1,2△</sup>, 尹毅霞<sup>1</sup>, 周喜汉<sup>1</sup>, 覃月秋<sup>1</sup>

(1. 右江民族医学院消化疾病研究所/附属医院消化内科, 广西百色 533000;

2. 广西医科大学研究生学院, 南宁 530021)

**摘要:**目的 探讨青蒿素对细胞株 HepG2 细胞增殖的影响。方法 采用 MTT 法检测青蒿素对 HepG2 细胞作用后的增殖抑制率, 流式细胞术检测药物作用 HepG2 后细胞周期及细胞凋亡的情况。结果 80 μmol/L 的青蒿素对肝癌细胞株 HepG2 具有增殖抑制作用, 其抑制率呈剂量、时间依赖效应, 可使 HepG2 细胞周期阻滞于 G<sub>0</sub>/S 期, 并诱导肝癌细胞发生凋亡。结论 青蒿素能抑制肝癌 HepG2 细胞增殖。

**关键词:**青蒿素; 肝肿瘤; 流式细胞术; 细胞周期; 细胞凋亡

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2015)01-0021-03

## The effect of artemisinin on the proliferation of human hepatoma cell line HepG-2\*

Huang Junling<sup>1</sup>, Li Guangzhi<sup>1</sup>, Huang Zansong<sup>1,2△</sup>, Yin Yixia<sup>1</sup>, Zhou Xihan<sup>1</sup>, Qin Yueqiu<sup>1</sup>

(1. Institute of Digestive Disease, Youjiang National Medical College/Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Youjiang National Medical College, Baise, Guangxi 533000, China; 2. School of Postgraduate Student, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of artemisinin on the proliferation of human hepatoma cell line HepG-2. **Methods** The inhibition effect of cell proliferation in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 of artemisinin was detected by MTT test, and the cell cycle and apoptosis were detected by Flow cytometry. **Results** Artemisinin at 80 μmol/L could effectively inhibited the proliferation of HepG-2 cell in a dose- and time-dependent manner; the drugs could block cells at G<sub>0</sub>/S phase, and induct the HepG-2 cell apoptosis. **Conclusion** Artemisinin could effectively inhibit the proliferation of HepG-2 cell.

**Key words:** artemisinin; liver neoplasms; flow cytometry; cell cycle; apoptosis

青蒿素是中药黄花蒿中提取的含有过氧基团的倍半萜内酯类药物, 二氢青蒿素、青蒿琥酯、蒿甲醚、蒿乙醚等是青蒿素的重要衍生物。黄花蒿为我国一种传统的中药, 其提取物青蒿素及其衍生物具有很强的抗疟疾、抗白血病和免疫调节功能的作用, 已经广泛用于治疗疟疾。近年来, 有学者发现青蒿素具有抗肿瘤活性, 可以抑制肿瘤细胞的增殖, 而且对正常细胞未见明显影响, 不良反应小, 其潜在的抗癌活性越来越受到关注, 成为当前研究热点之一<sup>[1-6]</sup>。研究还发现, 青蒿素对胃癌、结肠癌、胰腺癌、白血病、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、前列腺癌、非小细胞肺癌等肿瘤细胞都具有一定的增殖抑制或杀伤作用<sup>[1,2,5,7]</sup>, 但对肝癌的作用研究甚少。因此, 本研究旨在观察青蒿素对肝癌细胞株 HepG2 细胞增殖抑制作用、细胞生长曲线、细胞活力的影响, 为青蒿素作为一种新的抗肝癌中药提供实验依据。

## 1 材料与与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 实验菌株** 人肝癌 HepG2 细胞株, 购于中科院上海细胞生物研究所。

**1.1.2 试剂与仪器** 青蒿素由西安森卓生物科技有限公司提供; RPMI-1640 培养液由赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司提供; 小牛血清 GIBICO 公司提供; PBS 缓冲液(1×)由北京索莱宝科技有限公司提供; 胰酶-EDTA 混合液、青链霉素混合液(100×)由北京索莱宝科技有限公司提供; 噻唑蓝(MTT)由 Amresco 公司提供; 二甲基亚砜(DMSO)由北京索

莱宝科技有限公司提供; 周期试剂盒和凋亡试剂盒均由美国 BD Biosciences 提供; 全自动酶标仪 Multiskan MK3(USA); BD FACSCanto II TM(USA)流式细胞仪。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与实验分组** 体外培养人肝癌 HepG2 细胞, 以含 100 U/mL 青霉素, 100 U/mL 链霉素, 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液在 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养, 取生长良好并处于对数生长期的 HepG2 细胞进行实验。实验分成对照组及青蒿素组。

**1.2.2 MTT 法检测青蒿素对细胞增殖抑制率的影响** 取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 细胞浓度为 1×10<sup>4</sup> 个/L, 按每孔 100 μL/孔接种于 96 孔细胞培养板, 待 4 h 细胞贴壁后, 分别加入预先制备好的含青蒿素 20、40、60、80、160、200 μmol/L 的完全培养液, 每孔设 4 个复孔, 对照组加等量的 RPMI-1640 培养液。分别培养 20、44、68 h 后, 每孔加入 MTT(5 mg/mL) 20 μL, 继续培养 4 h, 吸取并丢弃上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 于恒温振荡仪中以 100 r/min 避光室温下振荡 10 min, 最后在酶标仪中以波长为 490 nm 测定每孔光密度(D 值)。实验重复 4 次, 按公式计算出细胞生长抑制率, 以青蒿素各浓度组为横坐标, 抑制率为纵坐标绘制抑制曲线, 抑制率(%) = (1 - D 实验组/D 对照组) × 100%

**1.2.3 流式细胞仪测定细胞周期及细胞凋亡情况** 于 75 cm 培养瓶中培养 HepG2 细胞, 以 MTT 结果选有效药物浓度 80

\* 基金项目: 广西自然科学基金课题(桂科自 0542119); 广西医疗卫生重点科研课题(桂卫重 200887); 广西中医药管理局课题(桂卫中 gzzc0955)。作者简介: 黄俊玲(1980—), 主治医师, 在读硕士, 主要从事中药抗消化系统肿瘤实验方面研究。△ 通讯作者, Tel: 13517764638; E-mail: huangzansong@hotmail.com。

$\mu\text{mol/L}$  青蒿素处理 48 h 后,胰酶消化、离心并收集实验组细胞及对照组细胞。按细胞周期试剂盒及凋亡试剂盒的说明书进行操作,最后上机检测。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

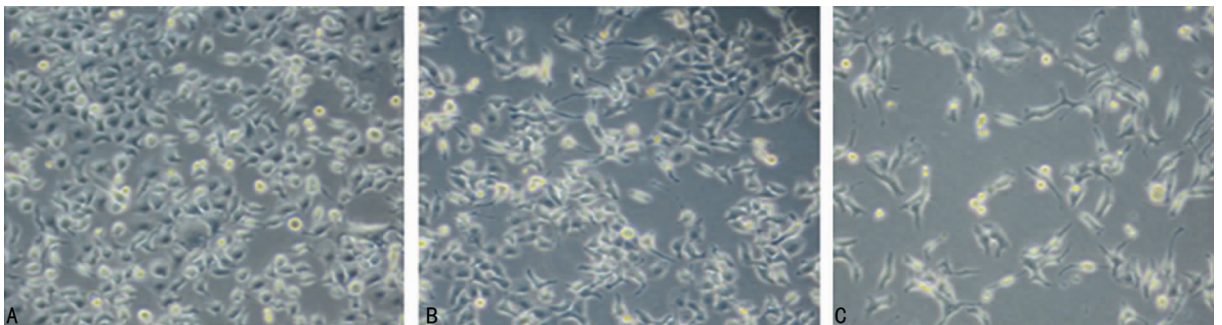
**2.1 MTT 法检测青蒿素作用于 HepG2 细胞增殖影响及绘制细胞增殖抑制率** 青蒿素对 HepG2 细胞有增殖抑制作用且呈现量效、时间依赖性。同一作用时间的药物浓度越高,细胞增殖抑制率也随着增高;同一药物浓度的不同作用时间的延长,细胞增殖抑制率也随着增高。不同青蒿素浓度之间比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );不同作用时间相比较,差异也有统

计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 青蒿素对 HepG2 细胞的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$ )

作用时间	青蒿素浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )				
	40	60	80	160	200
24 h	9.49 $\pm$ 3.52	14.63 $\pm$ 1.85	19.31 $\pm$ 4.73	29.01 $\pm$ 1.70	35.07 $\pm$ 4.19
48 h	19.38 $\pm$ 1.63	25.38 $\pm$ 1.11	33.27 $\pm$ 2.00	38.88 $\pm$ 3.00	46.12 $\pm$ 1.13
72 h	26.61 $\pm$ 1.64	36.21 $\pm$ 2.97	46.83 $\pm$ 1.75	54.62 $\pm$ 3.47	58.47 $\pm$ 0.73

**2.2 青蒿素对 HepG2 细胞增殖抑制率** 用高倍显微镜观察 80  $\mu\text{mol/L}$  青蒿素对 HepG2 细胞增殖抑制率的影响。青蒿素对 HepG2 细胞有增殖抑制作用,可使肿瘤细胞发生肿胀、缩小、裂解、坏死,作用时间愈长愈明显,其镜下表现见图 1。



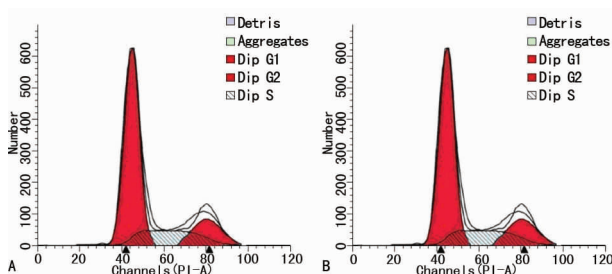
A: 药物作用 24 h 后细胞生长情况; B: 药物作用 48 h 后细胞生长情况; C: 药物作用 72 h 后细胞生长情况。

图 1 高倍显微镜下细胞生长情况 ( $\times 100$ )

**2.3 青蒿素对 HepG2 细胞细胞周期的影响** 检测 80  $\mu\text{mol/L}$  青蒿素作用 HepG2 细胞 48 h 后,与对照组相比,可使细胞周期明显阻滞于  $G_0/S$  期。两组之间比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 2、图 2。

表 2 80  $\mu\text{mol/L}$  青蒿素作用于 HepG2 细胞 48 h 对细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$ )

组别	细胞周期		
	$G_0/G_1$ 期	S 期	$G_2/M$ 期
对照组	64.57 $\pm$ 2.24	11.25 $\pm$ 2.16	24.18 $\pm$ 2.22
青蒿素组	71.08 $\pm$ 1.98	12.05 $\pm$ 1.47	16.87 $\pm$ 1.52



A: 对照组; B: 青蒿素组。

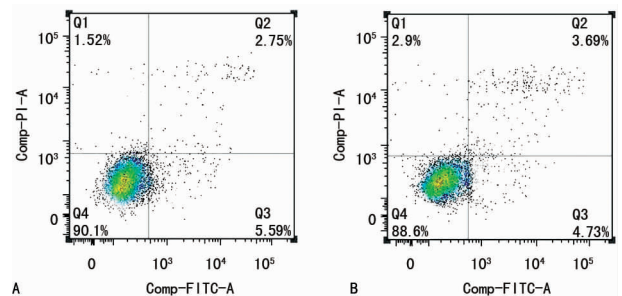
图 2 80  $\mu\text{mol/L}$  青蒿素作用于 HepG2 细胞 48 h 流式细胞周期检测图

**2.4 青蒿素对 HepG2 细胞凋亡的影响** 检测 80  $\mu\text{mol/L}$  青蒿素作用 HepG2 细胞,使细胞发生凋亡,在双染法流式细胞术检测图中 Q1 (Annexin V-/PI+) 代表坏死细胞; Q2 (Annexin V+/PI+) 代表晚期凋亡细胞和继发坏死细胞; Q3 (Annexin V+/PI-) 代表早期凋亡的细胞; Q4 (Annexin V-/PI-) 代表

正常活细胞,在本实验中可见药物作用后其凋亡实相发生于早期凋亡及晚期凋亡,两组之间比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 3、图 3。

表 3 80  $\mu\text{mol/L}$  青蒿素作用于 HepG2 细胞 48 h 对细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$ )

组别	象限			
	Q1	Q2	Q3	Q4
对照组	1.55 $\pm$ 0.07	2.00 $\pm$ 0.36	2.43 $\pm$ 0.24	89.10 $\pm$ 0.61
青蒿素组	1.62 $\pm$ 0.23	2.95 $\pm$ 0.14	5.71 $\pm$ 0.31	87.10 $\pm$ 0.51



A: 对照组; B: 青蒿素组。

图 3 检测 80  $\mu\text{mol/L}$  青蒿素作用于 HepG2 细胞 48 h 的流式细胞凋亡图

## 3 讨论

肝癌是消化系统恶性肿瘤,其细胞增殖能力极强,恶性程度高<sup>[8]</sup>。目前肝癌的主要治疗方法是手术切除、肝移植,但手术切除后的复发率高,晚期肝癌治疗是以化疗为主,而目前肝癌对西药常用化疗药物极易出现多重耐药性<sup>[9]</sup>。因此探索抗癌

中药是目前治疗肝癌的非手术治疗途径之一,中药治疗肝癌具有一定优势<sup>[10]</sup>。本实验就青蒿素对肝癌细胞生长的影响进行进一步研究。

青蒿素是从中药植物黄花蒿中提取的一种生物有效成分,其在抗疟疾治疗上有确切的疗效,青蒿素抗疟疾的作用机制是通过铁离子介导而形成内过氧化桥,并产生活性氧离子(ROS)和以碳为核心的自由基,后者的作用是能使细胞发生分子损伤和细胞死亡。铁是细胞内的重要元素,特别在增殖旺盛的癌细胞中含量极其丰富,在一定条件下高价态的铁可转变为亚铁状态。恶性肿瘤细胞生长过程中需要大量的  $Fe^{2+}$  作为合成去氧核糖的原料,因此癌细胞表面存在着大量的铁转运蛋白受体。肝癌细胞作为一种恶性肿瘤细胞,其  $Fe^{2+}$  含量要较正常肝细胞大得多,并且铁转运蛋白受体只存在于恶性肿瘤细胞的表面,因此利用青蒿素与癌细胞的铁转运蛋白受体结合,可起到靶位点的作用,从而提高药物在肿瘤细胞中的浓度而起到毒杀作用<sup>[11-12]</sup>。邓小荣等<sup>[13]</sup>的实验发现,青蒿素可使肝癌细胞发生死亡,在癌细胞中加入全转铁蛋白后,敏感性有所增强,故青蒿素对人肝癌细胞的选择性增强,毒性强于对照组。Singh 等<sup>[14]</sup>已经成功地用  $Fe^{2+}$  青蒿素处理人白血病 Mol-t4 细胞,发现它可以有选择性且有效地杀灭肿瘤细胞,而青蒿素对正常细胞几乎无毒性。因此,青蒿素与肿瘤细胞结合具有一定的靶向性。

本研究用流式细胞术分析青蒿素作用 48 h 对细胞周期及凋亡影响的结果显示:与阴性对照组相比, $G_0/G_1$  期、S 期细胞比例增高,而  $G_2/M$  期比例下降,表明青蒿素可阻滞细胞周期使癌细胞生长出现停滞。说明青蒿素类药物可以阻滞细胞周期,使细胞停止生长,诱导细胞进一步发生凋亡,但具体的作用机制仍需进一步探讨。

本实验发现青蒿素作用于 HepG2 细胞,使细胞发生凋亡,其凋亡实相发生于早期凋亡及晚期凋亡。Disbrow 等<sup>[15]</sup>经体外实验证实,二氢青蒿素和青蒿琥酯对 HeLa 细胞具有较强的毒性作用,其机制是通过激活线粒体 Caspase 途径起到诱导细胞凋亡的作用。Dell'Eva 等<sup>[16]</sup>还证实,青蒿琥酯可以诱导 Kaposi 肉瘤细胞发生凋亡,并呈现出剂量依赖性,而正常细胞并不被青蒿琥酯诱导凋亡。董海鹰等<sup>[17]</sup>用青蒿素处理 HeLa 细胞后得出,HeLa 细胞发生凋亡,并在电镜下观察发现细胞中可见到典型的凋亡小体,而且细胞凋亡率在一定范围内与药物浓度(20~80  $\mu\text{mol/L}$ )呈正相关。因此青蒿素类药物诱导细胞凋亡发生的机制仍需进一步研究。

综上所述,青蒿素对肝癌 HepG2 细胞具有抑制增殖作用,其机制可能为与细胞内转铁蛋白结合而提高青蒿素在肝癌细胞中的含量,进一步阻滞肝癌细胞于  $G_0/S$  期,诱导肝癌细胞发生凋亡而起到抗肝癌的作用。说明青蒿素具有潜在的抗肝癌治疗的作用,但其确切作用机制仍有待进一步研究及探讨。

#### 参考文献:

[1] Efferth T, Sauerbrey A, Olbrich A, et al. Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines[J]. *Mol Pharmacol*, 2003, 64(2): 382-394.

[2] Lu JJ, Meng LH, Cai YJ, et al. Dihydroartemisinin induces apoptosis in HL-60 leukemia cells dependent of iron and p38 mitogen-activated protein kinase activation but independent of reactive oxygen species[J]. *Cancer Biol Ther*,

2008, 7(7): 1017-1023.

[3] Lu JJ, Chen SM, Zhang XW, et al. The anti-cancer activity of dihydroartemisinin is associated with induction of iron-dependent endoplasmic reticulum stress in colorectal carcinoma HCT116 cells[J]. *Invest New Drug*, 2011, 29(6): 1276-1283.

[4] Lu JJ, Meng LH, Shankavaram UT, et al. Dihydroartemisinin accelerates c-MYC oncoprotein degradation and induces apoptosis in c-MYC-overexpressing tumor cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(1): 22-30.

[5] Hou J, Wang D, Zhang R, et al. Experimental therapy of hepatoma with artemisinin and its derivatives; in vitro and in vivo activity, chemosensitization, and mechanisms of action[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(17): 5519-5530.

[6] Chen T, Li M, Zhang R, et al. Dihydroartemisinin induces apoptosis and sensitizes human ovarian cancer cells to carboplatin therapy[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(7): 1358-1370.

[7] Wang SJ, Gao Y, Chen H, et al. Dihydroartemisinin inactivates NF-kappaB and potentiates the anti-tumor effect of gemcitabine on pancreatic cancer both in vitro and in vivo[J]. *Cancer Lett*, 2010, 293(1): 99-108.

[8] 黄赞松, 仇仪英, 周喜汉. 原发性肝癌现代医学治疗的研究进展[J]. *医学综述*, 2012, 18(24): 4169-4172.

[9] 金小顺, 耿小平, 朱立新. 肝癌多药耐药的研究进展[J]. *肝胆外科杂志*, 2007, 15(3): 234-236.

[10] 黄赞松, 仇仪英. 中医药治疗原发性肝癌的研究现状[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(12): 2851-2853.

[11] 邓小荣, 余和平, 潘雷, 等. 青蒿素联合全转铁蛋白诱导肝癌细胞凋亡的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2009, 25(6): 802.

[12] 马镇坚, 张厚德, 杜冀晖. 青蒿素及其衍生物抗肿瘤的研究进展[J]. *医学综述*, 2008, 14(9): 1331-1333.

[13] 邓小荣, 潘雷, 余和平, 等. 青蒿素联合全转铁蛋白对肝癌的选择性抑制作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2009, 26(8): 1000-1001.

[14] Singh NP, Lai H. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells[J]. *Life Sci*, 2001, 70(1): 49-56.

[15] Disbrow GL, Baega AC, Kierpiec KA, et al. Dihydroartemisinin is cytotoxic to papillomavirus expressing epithelial cells invitro and in vivo[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23): 10854-10861.

[16] Dell'Eva R, Pfeiffer U, Vene R, et al. Inhibition of angiogenesis in vivo and growth of Kaposi's sarcoma xenograft tumors by the anti malarial artesunate[J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68(12): 2359-2366.

[17] 董海鹰, 宋维华, 孙建平, 等. 青蒿素对体外培养的 HeLa 细胞生长的影响[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2002, 6(36): 423-427.