

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.26.001

岩白菜素对肝癌的抑制作用*

陈业文¹, 张 灏², 甘亚平¹, 张 伟¹, 吴 吉¹, 谌启敏¹, 张 静¹, 王 斌¹, 刘复兴¹, 宁志丰^{1,2△}

(1. 湖北科技学院基础医学院, 湖北咸宁 437100; 2. 汕头大学医学院, 广东汕头 515041)

[摘要] **目的** 评价岩白菜素对肝癌 HepG2 细胞和大鼠肝癌模型的抑制作用。**方法** 使用一定浓度梯度的岩白菜素(0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L)与肝癌 HepG2 细胞共孵育,评价岩白菜素对 HepG2 细胞增殖、平板克隆、迁移和侵袭能力的影响,同时利用二乙基亚硝胺(DEN)连续喂饲的方法构建大鼠肝癌模型,在离建模成功的 2 周开始,实验组予以 10 mg/kg 岩白菜素连续灌胃 2 周,对照组只喂饲等量岩白菜素溶剂二甲基亚砷(DMSO),观察岩白菜素对大鼠肝癌大小、大鼠存活时间的影响。**结果** 岩白菜素能显著抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖($P=0.0299$)、克隆形成($P<0.01$)、迁移和侵袭能力($P=0.0098$ 和 $P=0.0069$),并呈剂量依赖性。岩白菜素亦能抑制大鼠肝癌的生长,使肝癌体积减少($P<0.01$),大鼠存活时间延长($P<0.05$)。**结论** 岩白菜素对肝癌有抑制作用。

[关键词] 岩白菜素;肝肿瘤;抑制**[中图分类号]** R735.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)26-3365-03

Inhibitory role of bergenin on hepatic cancer*

CHEN Yewen¹, ZHANG Hao², GAN Yaping¹, ZHANG Wei¹, WU Ji¹, SHEN Qimin¹,ZHANG Jing¹, WANG Yu¹, LIU Fuxing¹, NING Zhifeng^{1,2△}

(1. School of Basic Medicine, Hubei Science and Technology College, Xianning, Hubei 437100, China;

2. Medical School of Shantou University, Shantou, Guangdong 515041, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the inhibitory role of bergenin on hepatic cancer HepG2 cells and rat liver cancer model. **Methods** A certain concentration gradient of bergenin(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mmol/L) was used to incubate with human liver cancer cell line HepG2. The effects of bergenin on the proliferation of HepG2 cells, plate clone, migration and invasion ability were evaluated. Meanwhile the diethylnitrosamine (DEN) continuous feeding method was utilized to construct liver cancer rat model. Rat liver cancer model was used to test the inhibitory role of bergenin on liver cancer. At 2 weeks from the beginning of model construction success, the experimental group was given 10mg/kg bergenin by continuous gavage for 2 weeks, while the control group was fed only by equal quantity of bergenin solvent dimethyl sulfoxide (DMSO). Then the effects of bergenin on liver cancer size and survival time were observed. **Results** Bergenin could significantly suppress the proliferation of liver cancer cells ($P=0.0299$), colony forming ($P<0.01$), migration and invasion ability ($P=0.0098$ and $P=0.0069$), moreover which showed the dose dependent manner. Bergenin also could inhibit the growth of rat liver cancer, made its volume to be decreased($P<0.01$) and rat survival time to be prolonged ($P<0.05$). **Conclusion** Bergenin has the inhibitory effect on liver cancer.

[Key words] bergenin; liver neoplasms; inhibition

岩白菜素是从矮虎耳草植物中提取的一种活性成分,具有抗炎、收敛、解痉的作用,近年来,有少数报道指出岩白菜素有抗肿瘤的作用。在本文中,作者报道了岩白菜素对肝癌的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料 肝癌 HepG2 细胞购自美国培养物典藏中心(ATCC),RPMI1640 培养基、胎牛血清

(FBS)购自美国 Gibco 公司, DEN、DMSO、岩白菜素购自美国 Sigma 公司,双抗购自 Hyclone 公司, Wistar 大鼠购自湖北省实验动物中心,其他试剂为生化分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 使用 RPMI1640 培养基添加 10% FBS 和 100 U/mL 青霉素及 100 μg/mL 链霉素在

* 基金项目:广东省医学科研基金资助项目(A2015523);湖北省自然科学基金资助项目(2015CFB470);湖北科技学院 2014 年省级大学生创新创业项目(201410927003)。 作者简介:陈业文(1964—),实验师,本科,主要从事抗肿瘤药物研究。 △ 通信作者, E-mail: ningzhifeng0225@126.com。

5% CO₂、饱和湿度、37 °C 恒温培养箱中培养肝癌 HepG2 细胞,待细胞密度达 80% 左右时予以传代。

1.2.2 大鼠肝癌模型的建立 在 SPF 级环境中饲养 4 周龄雄性 Wistar 大鼠,适应性培养 1 周后将 30 只大鼠分成两组,每组各 15 只,对照组予以常规喂养,实验组在常规喂养的基础上饮用水中添加 0.01% DEN,18 周末将大鼠脱颈处死,75% 乙醇浸泡后取肝脏,计算结节大小和数目,比较实验组和对照组的差异。

1.2.3 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法 常规培养 HepG2,待细胞密度达 85% 左右时终止培养,消化、离心、重悬浮为单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^6 / mL,以每孔 10 000 个细胞种入 96 孔板,岩白菜素设置浓度梯度为 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L,每个浓度设置 5 个复孔,常规培养 72 h,吸去培养液,每孔加 MTT(5 g/L)20 μ L,继续孵育培养 4 h 后,弃上清液,每孔加入二甲基亚砷 150 μ L,震荡 10 min,结晶溶解充分,酶标仪 490 nm 处测定吸光度(A)值。

1.2.4 平板克隆形成实验 常规培养 HepG2,待细胞密度达 85% 左右时终止培养,消化、离心、重悬浮为单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^6 / mL,以每孔 300 个细胞种入 6 孔板,岩白菜素设置浓度梯度为 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L,常规培养 2 周,待大多数克隆大于 50 μ mol/L 时终止培养,吸去旧的培养基后,PBS 洗 3 次,甲醇固定 15 min,0.1% 结晶紫染色 20 min 后流水轻轻洗去结晶紫,在 100 倍光学显微镜下计算克隆形成率,克隆形成率 = 阳性克隆数/种板细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.5 Transwell 迁移和侵袭实验 常规培养 HepG2,待细胞密度达 85% 左右时终止培养,消化、离心、用无血清 RPMI 1640 培养基重悬浮为单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^6 / mL,以每孔 100 000 个细胞种入 12 孔板的 Transwell 小室上室,下室加入 500 μ L 含 20% FBS 的完全培养基,上下室内均加入岩白菜素,设浓度梯度为 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L,常规培养约 36 h,终止培养,取出小室,用棉签轻轻蘸去上室内底部未穿出细胞后,对小室予以染色,在光学显微镜下计算每高倍视野下小室底部穿出细胞数。侵袭实验:除小室底部铺有 50 μ L Matrigel(5 mg/L)外,其余步骤同迁移实验。

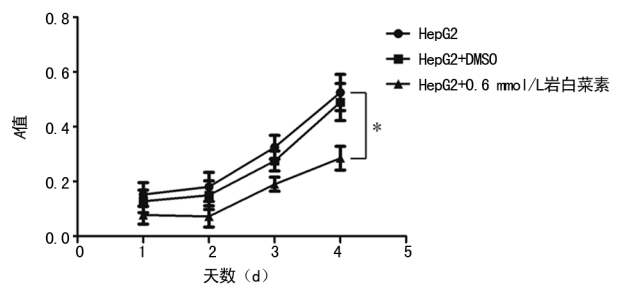
1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 进行统计学分析,计数资料采用率表示,用 χ^2 检验,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Students' *t* 检验或 ANOVA,所有实验重复 3 次,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 岩白菜素抑制肝癌 HepG2 细胞的存活能力

本研究选用 0.6 mmol/L 的一定浓度梯度的岩白菜素来检测对肝癌 HepG2 细胞存活能力的影响,发现岩白菜素能显著抑制 HepG2 细胞的存活能力($P =$

0.029 9),见图 1。



* : $P < 0.05$

图 1 岩白菜素抑制肝癌 HepG2 细胞的存活能力

2.2 岩白菜素抑制了肝癌 HepG2 细胞的平板克隆形成能力 一定浓度梯度的岩白菜素(0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L)抑制了肝癌 HepG2 细胞的平板克隆形成能力($P < 0.01$),见图 2。

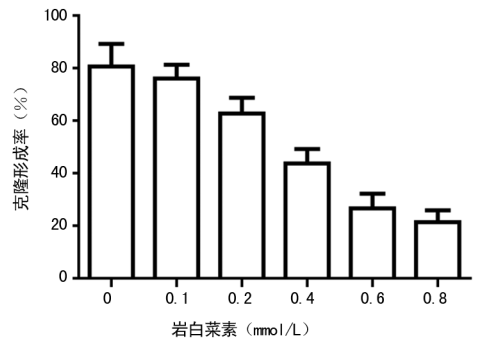
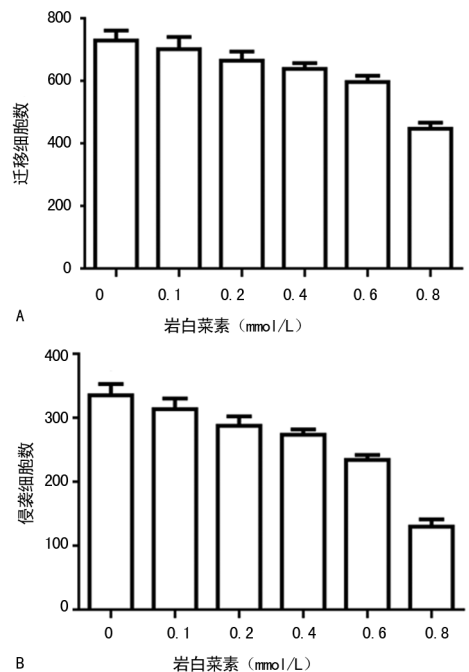


图 2 平板克隆形成实验

2.3 岩白菜素抑制了肝癌 HepG2 细胞的迁移和侵袭能力 一定浓度梯度的岩白菜素(0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L)抑制了肝癌 HepG2 细胞的迁移($P = 0.009 8$)和侵袭能力($P = 0.006 9$),见图 3。

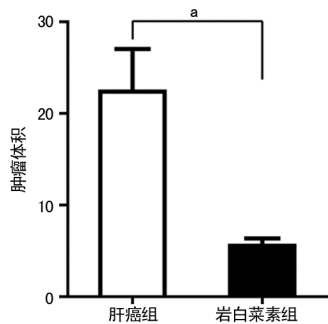


A: 迁移细胞数; B: 侵袭细胞数

图 3 Transwell 小室迁移和侵袭实验

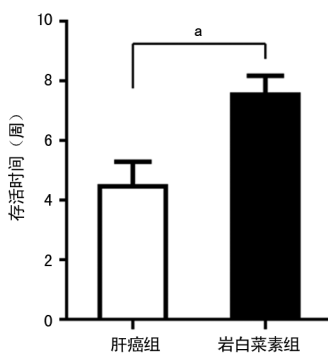
2.4 岩白菜素抑制了大鼠肝癌模型的生长 成功构

建大鼠肝癌模型,发现 10 mg/kg 的岩白菜素灌胃 2 周可以显著减慢肝癌的生长见图 4,延长存活时间见图 5。



^a: $P < 0.01$

图 4 两组大鼠肝癌模型肿瘤总体积



^a: $P < 0.05$

图 5 两组大鼠肝癌模型存活时间

3 讨论

越来越多的研究表明,氧化应激及由此产生的活性氧类(ROS)与各种常见疾病如动脉粥样硬化^[1]、癌症发生^[2-3]、衰老^[4-5]、糖尿病^[6]等有关,人体在细胞有氧代谢、持续的应激、暴露于紫外线或 X 射线可产生各种 ROS^[7-8],这些 ROS 在细胞信号和对细胞因子、生长因子、激素作用、转录、离子转运、神经调节、免疫调节和凋亡的调节中起重要的作用^[9]。因此,人们将目光转向食物中具有治疗此类疾病的抗氧化物。岩白菜素即是从植物矮虎耳草中提取的天然抗氧化物。2002 年,SUMINO 等^[10]报道从紫金牛属植物中分离出岩白菜素和去甲氧岩白菜素以及其他 13 种化合物,发现这些化合物具有清除二苯基苦味酰基苯肼自由基,对鼠乳腺癌细胞系 FM3A 有细胞毒性作用。2003 年,MISHIMA 等^[11]发现印度龙脑香的乙醇提取物对小鼠肉瘤 180 细胞有显著抑制作用,半数抑制浓度(IC₅₀)仅 29.5 μmol/L,这些乙醇提取物中含有较高比例的岩白菜素。2010 年,NEWELL 等^[12]报道了从 6 种紫金牛属植物中提炼出的化合物中岩白菜素、苈贝素、槲皮素均对肝癌 HepG2 细胞有较强的细胞毒性作用,其中以岩白菜素的抑瘤作用最强,初步研究发现其可能机制为引起细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期,进而引起细胞凋亡,但是对于岩白菜素的抑肝癌作用没有系统研究。2012 年,RIGHESCHI 等^[13]发现他们实验室合成的岩白菜素对 T 淋巴细胞白血病

细胞 CCRF-CEM 及其耐药株有较强的抑制作用。2013 年,ZHANG 等^[14]证实从双翼豆科木的水提取物中分离出来的岩白菜素和没食子酸对淋巴瘤 Raji 细胞和 α-黑素细胞刺激激素(α-MSH)刺激产生的 B16 黑色素瘤细胞均有抑制作用,其中对淋巴瘤的抑制作用是通过激活 EB 病毒早期抗原(EBV-EA)提高机体免疫力来实现的。

岩白菜素不溶于水,但是可溶于 DMSO。本研究发现,使用 DMSO 做溶剂,低于 1.0 mmol/L 的岩白菜素即可抑制肝癌 HepG2 细胞的恶性生物学行为。在抗增殖实验中,岩白菜素能够抑制肝癌 HepG2 的存活能力,并呈时间和剂量依赖性,克隆形成能力是肿瘤细胞所具有的一种特性,反映单个细胞的集落形成能力。在平板克隆形成实验中,本研究发现一定浓度范围内的岩白菜素能够抑制肝癌 HepG2 的集落形成能力。肝癌是高度恶性肿瘤,具有较强的迁移和侵袭能力,在 Transwell 迁移和侵袭实验中,发现较低浓度的岩白菜素能够明显抑制肝癌 HepG2 细胞的迁移和侵袭能力。本研究利用 DEN 构建了 Wistar 大鼠肝癌模型,发现 10 mg/kg 的剂量能够显著改善大鼠肝癌模型的存活状态,如毛发的光亮程度、活动度,减慢了大鼠肝癌的生长,延长了大鼠的存活时间。

总之,本研究已初步发现岩白菜素能够抑制肝癌,包括细胞株和动物模型,在临床上,岩白菜素被用来治疗支气管炎和哮喘,该发现将有望拓展岩白菜素的治疗范围。

参考文献

- PERROTTA I, AQUILA S. The role of oxidative stress and autophagy in atherosclerosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 130315(10): 18.
- PLUCHINO L A, CHOUDHARY S, WANG H C. Reactive oxygen species-mediated synergistic and preferential induction of cell death and reduction of clonogenic resistance in breast cancer cells by combined cisplatin and FK228[J]. *Cancer Lett* 2016, 381(1): 124-132.
- 肖强,毛盛名,张斌,等. 黄连素促进肝癌细胞凋亡的氧化应激 Wntβ-catenin 信号通路机制研究[J]. *临床和实验医学杂志*, 2016, 15(16): 1586-1589.
- ZHANG W, HUANG C, SUN A, et al. Hydrogen alleviates cellular senescence via regulation of ROS/p53/p21 pathway in bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vivo[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 1126-1134.
- NARASIMHAN M, RAJASEKARAN N S. Exercise, Nrf2 and antioxidant signaling in cardiac aging[J]. *Front Physiol*, 2016, 7: 241.
- 魏倩萍,邓华聪. 活性氧簇调控的信号通路与糖尿病肾病[J]. *重庆医学*, 2005, 34(3): 446-448.
- SCHIEBER M, CHANDEL N S. ROS function in redox signaling and oxidative stress[J]. *Curr Biol*, 2014, 24(10): 34.

(下转第 3371 页)

本实验研究结合了临床臂丛神经损伤机理及解剖结构,采用一侧兔臂丛神经根性切断造模方法。结果表明,肱骨失神经化营养支配后,骨密度、干重明显降低,骨的力学强度指标较对照侧明显减弱,骨小梁致密度、小梁间吻合、骨皮质厚度、孔隙、髓腔、破骨细胞数目及新生胶原纤维数量在不同的废用时间点与对照侧相比差异均有统计学意义。故本研究结果显示,臂丛神经切断术是有效建立废用性骨质疏松动物模型的方法,为废用性骨质疏松研究提供了良好的实验载体,也为骨科今后对骨质失神经营养方面的基础研究及临床防治提供了较为稳定可靠的实验基础。

参考文献

- [1] ALEXANDRE C, VICO L. Pathophysiology of bone loss in disuse osteoporosis[J]. *Joint Bone Spine*, 2011, 78(6): 572-576.
- [2] BRZOSKA M M, MAJEWSKA K, MONIUSZKO-JAKONIUK J. Bone mineral density, chemical composition and biomechanical properties of the tibia of female rats exposed to cadmium since weaning up to skeletal maturity[J]. *Food Chem Toxicol*, 2005, 43(10): 1507.
- [3] BRZOSKA M M, MONIUSZKO-JAKONIUK J. Weakness in the properties of the femur of growing female rats mechanically exposed to cadmium[J]. *Arch Toxicol*, 2005, 79(5): 277.
- [4] 张戈, 秦岭, 郑煜新, 等. 成年卵巢切除大鼠模型股骨近端 pQCT 和 DEXA 的相关分析[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2002, 8(2): 135-137.
- [5] CREASEY G H, HO C H, TRIOLO R J. Clinical applications of electrical stimulation after spinal cord injury[J]. *J Spinal Cord Med*, 2004, 27(4): 365.
- [6] SEO B I, KU S K, CHA E M. Effect of mornidae radix extracts on experimental osteoporosis in sciatic neurectomized mice[J]. *Phytother Res*, 2005, 19(3): 231.
- [7] JIANG S D, JIANG L S, DAI L Y. Mechanisms of osteoporosis in spinal cord injury[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2006, 65(5): 555.
- [8] RACHNER T D, RAUNER M. RANKL/OPG in breast cancer—extending its territory to BRCA mutation carriers[J]. *Biol Med*, 2015, 2(10): 1270-1271.
- [9] WANG Y, CAO Y, LI Y, et al. Genetic association of the ApoB and ApoA1 gene polymorphisms with the risk for alcohol-induced osteonecrosis of femoral head[J]. *Biological-Medicine*, 2015, 8(9): 1332-1339.
- [10] COUPAUD S, MCLEAN A N, PURCELL M, et al. Decreases in bone mineral density at cortical and trabecular sites in the tibia and femur during the first year of spinal cord injury[J]. *Bone*, 2015, 74(1): 69-75.
- [11] NABAVI N, KHANDANI A, CAMIRAND A, et al. Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion[J]. *Bone*, 2011, 49(5): 965-974.
- [12] 李明, 高建章, 刘植珊, 等. 中频电流预防废用性骨质疏松症的实验观察[J]. *中华理疗杂志*, 1991(4): 195-196.
- [13] BARON R, TROSS R, VIGNERY A. Evidence of sequential remodeling in rat trabecular bone: morphology, dynamic histomorphometry, and changes during skeletal maturation[J]. *Bone*, 1984, 208(1): 137-145.
- [14] THOMSEN J S, CHRISTENSEN L L, VEGGER J B, et al. Loss of bone strength is dependent on skeletal site in disuse osteoporosis in rats[J]. *Bone*, 2012, 90(4): 294-306.
- [15] ZENG Q Q, JEE W S, BIGONIA A E, et al. Time Responses of cancellous and cortical bones to sciatic neurectomy in growing female rat[J]. *Bone*, 1996, 19(10): 13-21.

(收稿日期: 2018-03-19 修回日期: 2018-05-16)

(上接第 3367 页)

- [8] MORIYAMA A, YAMADA I, TAKAHASHI J, et al. Oxidative stress caused by TiO₂ nanoparticles under UV irradiation is due to UV irradiation not through nanoparticles[J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 17(17): 31107-31109.
- [9] TANG J Y, FAROOQI A A, OU-YANG F, et al. Oxidative stress-modulating drugs have preferential anticancer effects—involving the regulation of apoptosis, DNA damage, endoplasmic reticulum stress, autophagy, metabolism, and migration[J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 24(18): 30084-30081.
- [10] SUMINO M, SEKINE T, RUANGRUNGSI N, et al. Ardisiphenols and other antioxidant principles from the fruits of *Ardisia colorata*[J]. *Chem Pharm Bull* 2002, 50(11): 1484-1487.
- [11] MISHIMA S, MATSUMOTO K, FUTAMURA Y, et al. Antitumor effect of stilbenoids from *Vateria indica* against allografted sarcoma S-180 in animal model[J]. *J Exp Ther Oncol*, 2003, 3(5): 283-288.
- [12] NEWELL A M, YOUSEF G G, LILA M A, et al. Comparative in vitro bioactivities of tea extracts from six species of *Ardisia* and their effect on growth inhibition of HepG2 cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130(3): 536-544.
- [13] RIGHESCHI C, EICHHORN T, KARIOTI A, et al. Microarray-based mRNA expression profiling of leukemia cells treated with the flavonoid, casticin[J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2012, 9(3): 143-151.
- [14] ZHANG J, NISHIMOTO Y, TOKUDA H, et al. Cancer chemopreventive effect of bergenin from *Peltophorum pterocarpum* wood[J]. *Chem Biodivers*, 2013, 10(10): 1866-1875.

(收稿日期: 2018-03-02 修回日期: 2018-04-26)