

红芪超滤物对人肝癌 HepG2 细胞辐射敏感性的影响

寇 炜^{1,2} 李应东^{1,2} 刘 凯² 郭晓莹² 董玉梅²

摘要 目的 观察红芪超滤物(UEMHP)对人肝癌 HepG2 细胞辐射增敏的作用,并探讨其可能机制。**方法** 用 CCK-8 法检测 UEMHP 对 HepG2 细胞生长抑制的影响;克隆形成实验检测 UEMHP 对 HepG2 的辐射增敏作用;通过流式细胞仪检测 HepG2 细胞周期分布的变化和凋亡率;采用 RT-PCR 法检测 Survivin mRNA 表达。**结果** 在 5~50 mg/L 浓度范围内,UEMHP 对 HepG2 细胞的生长抑制作用呈时间和剂量依赖性($P < 0.05$);加药辐射组与单纯辐射组比较,克隆存活曲线显示加药辐射组各剂量点的存活分数均低于单纯辐射组($P < 0.05$),UEMHP 能抑制 HepG2 细胞克隆形成,对 HepG2 有辐射增敏作用;流式细胞仪检测显示 UEMHP 具有去 G_2/M 周期阻滞效应,加药辐射组细胞凋亡率($21.42\% \pm 3.74\%$)高于对照组($5.35\% \pm 0.41\%$)、单纯药物组($10.36\% \pm 1.75\%$)和单纯辐射组($10.58\% \pm 2.01\%$, $P < 0.01$);RT-PCR 显示加药辐射组 Survivin mRNA (0.31 ± 0.02)表达低于对照组(0.82 ± 0.06)和单纯辐射组(0.58 ± 0.04),差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** UEMHP 对人肝癌 HepG2 细胞具有辐射增敏作用,其辐射增敏机制可能通过下调 Survivin mRNA 的表达与促进细胞凋亡有关。

关键词 红芪超滤物;HepG2 细胞;辐射增敏

Effects of the Ultra-filtration Extract Mixture from *Hedysarum Polybotrys* on Human Liver Cells HepG2 Radiosensitivity KOU Wei^{1,2}, LI Ying-dong^{1,2}, LIU Kai², GUO Xiao-ying², and DONG Yu-mei² 1 Basic Medical College of Lanzhou University, Lanzhou (730000), China; 2 Faculty of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou (730000), China

ABSTRACT Objective To investigate the effects of the ultra-filtration extract mixture from *Hedysarum Polybotrys* (UEMHP) on the radiosensitivity of HepG2 cells, and to explore its possible mechanisms. **Methods** The proliferation inhibition effects of UEMHP on HepG2 cells was detected by CCK-8 assay. The colony formation assay was used for the survival fraction (SF) analysis. The distribution of the cell cycle and the apoptosis rate were detected using flow cytometry (FCM). The survivin mRNA expression level was detected using reverse transcription-PCR assay. **Results** The inhibition of UEMHP on HepG2 cells was time- and dose-dependent at the concentration ranging between 5–50 mg/L ($P < 0.05$). The parameters of the two curve for SF ($P < 0.05$) showed statistical difference between the irradiation group and the UEMHP irradiation group. UEMHP could inhibit the clone formation of HepG2 cells and enhance the radiosensitivity of HepG2 cells. The results of FCM showed that UEMHP could induce G_2/M phase arrest. The apoptosis rate in the UEMHP irradiation group ($21.42\% \pm 3.74\%$) was higher than that in the control group ($5.35\% \pm 0.41\%$), the only UEMHP group ($10.36\% \pm 1.75\%$), or the irradiation group ($10.58\% \pm 2.01\%$) ($P < 0.01$). RT-PCR showed that the survivin mRNA expression level was lower in the UEMHP irradiation group (0.31 ± 0.02) than in the control group (0.82 ± 0.06) and the irradiation group (0.58 ± 0.04) respectively, showing statistical difference ($P < 0.01$). **Conclusion** UEMHP can enhance the radiosensitivity of HepG2 cells, and its possible mechanisms might be correlated to down-regulating the survivin mRNA expression and promoting the apoptosis.

KEYWORDS the ultra-filtration extract mixture from *Hedysarum Polybotrys*; HepG2 cell; radiosensitivity

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81160478); 甘肃省 2009 年科技重大专项(No.092NKDA017)

作者单位: 1. 兰州大学基础医学院(兰州 730000); 2. 甘肃中医学院中西医结合系(兰州 730000)

通讯作者: 寇 炜, Tel: 13893483407, E-mail: yxkw@xbmu.edu.cn

恶性肿瘤是一类严重威胁人类健康的疾病,放射治疗是治疗恶性肿瘤的重要手段之一,临床约 70% 的恶性肿瘤患者需要放射治疗。但放疗在保护正常组织前提下照射剂量受限,导致辐射抗性的肿瘤再次复发。辐射增敏药与放疗的联合使用可以更好地提高疗效,同时降低放射剂量,从而减轻高剂量放射引起的副作用。部分中药有效部位具有肯定的增强机体免疫功能及抗肿瘤、增加放射敏感性的作用^[1]。红芪为多序岩黄芪的根,为甘肃道地药材,具有扶正祛邪、益气固本的功效。本研究拟探讨红芪超滤膜提取物(UEMHP)对增强肝癌 HepG2 细胞的辐射敏感性及其可能的作用机制。

材料与方法

1 细胞 人肝癌 HepG2 细胞购自中国科学院上海细胞库,由本实验室保存并传代。用含 10% 小牛血清、10 g/L 双抗(100 mg/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素)的 DMEM 全培养液置于 37 ℃ 含 50 mL/L CO₂ 温箱内培养,48 ~ 72 h 换液 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

2 药物 红芪采自甘肃宕昌,经甘肃中医学院药学院生药学教研室鉴定为系豆科岩黄芪属植物多序黄芪(*hedysarum polybotrys hand-Mazz*)的干燥根茎,UEMHP 由甘肃省膜科学研究院与甘肃中医学院科研实验中心联合制备^[2,3]。

3 试剂及仪器 DMEM(批号:NXB0528)、胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司(批号:110809),CCK-8(Cell Counting Kit-8)试剂盒购自碧云天研究所(批号:C0038),碘化嘧啶(PI, Sigma 产品),RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 购自 Takara 公司,RNA 引物由上海生工合成。二氧化碳培养箱(Sanyo),流式细胞仪(美国 Beckman coulter 公司),PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),PRIMUS 型医用电子直线加速器(德国 Siemens 公司)。

4 CCK-8 法检测细胞增殖抑制 收集处于对数生长期的 HepG2 细胞,制成单细胞悬液,以 5×10^3 个/孔,接种到 96 孔板,分别加入不同浓度的 UEMHP (5、10、25、50、100 mg/L) 培养 12、24、48、72 h,同时设置空白对照组(加入等量 DMEM)以及阴性对照组(加等量 0.1% DMSO 溶液)。药物作用结束前 1 h,各孔加入 CCK-8 0.01 mL,继续培养 2 h,酶标仪测 450 nm 处吸光度(A),重复 3 次,抑制率(%) = $1 - (\text{UEMHP 组 A450} - \text{空白对照组 A450}) / (\text{阴性对照组 A450} - \text{空白对照组 A450}) \times 100\%$ 。

5 克隆集落形成法检测 UEMHP 辐射增敏作用

取对数生长期 HepG2 细胞制成单细胞悬液,调整细胞浓度至 1×10^6 /mL,照射剂量取 1、2、4、6、8、10 Gy 6 个放射剂量点,分单纯药物组和加药辐射组(含药培养终浓度为 50 mg/L),辐照前 48 h 对加药辐射组进行给药。照射后用 PBS 清洗 2 次,用胰酶消化制成细胞悬液。根据不同的照射剂量,按 500 ~ 10 000 个细胞的预置数将细胞悬液接种到直径 60 mm 的培养皿中(每组设 3 个平行),待细胞贴壁后,加药辐射组更换成含药培养基,继续在 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,再更换成无药培养基。在培养箱培养 14 d 后经 PBS 漂洗、甲醇固定、Gimsa 染色,显微镜下计数 50 个细胞以上的细胞克隆集落数。根据细胞存活率(SF) = (实验组集落形成率/对照组集落形成率) × 100%,按线性二次方程 $\ln SF = \alpha D + \beta D^2$ 拟合并绘制细胞的存活曲线,D 表示单次照射剂量, α 为单击所产生的细胞死亡,即为细胞存活曲线的初斜率, β 为损伤累积而导致细胞死亡, α/β 反应肿瘤对剂量反应性的差别,用 Graph Pad 公司 Prism5.0 软件拟合生存曲线,同时计算辐射增敏比(SER) = 对照组 SF/实验组 SF × 100%。

6 FCM 检测细胞周期和凋亡率 取对数生长期 HepG2 细胞制成单细胞悬液,调整细胞浓度至 1×10^6 /mL,对照组不做处理,单纯药物组和加药辐射组均在辐照前 48 h 给药(含药培养终浓度为 50 mg/L),然后单纯辐射组与加药辐射组接收 2.0 Gy 照射剂量,照射后,以上各组分别在 0、12、24、36、48、72 h 收集细胞,离心弃上清,用 PBS 洗涤 2 次,弃上清,将细胞沉淀悬起,加入体积分数为 70% 的乙醇振荡混匀后 -20 ℃ 固定 30 min,离心弃上清,将沉淀悬起,加入 100 μ L PI 染料,振荡混匀后室温避光染色 30 min,用流式细胞分析仪分析细胞周期和凋亡率。

7 Survivin mRNA 表达检测 采用 RT-PCR 检测。Survivin(436 bp)上游引物:5'-GGACCAC-CGCATCTCTACAT-3',下游引物:5'-GACAGA AAGGAAAGCGCAAC-3',内参 β -actin(294 bp)上游引物:5'-GGCATCGTGATGGACTCCG-3',下游引物:5'-GCTGGAAGGTGGACAGCGA-3',RT-PCR 严格按照试剂盒说明进行;RNA 经逆转录反应合成 cDNA;经 PCR 反应合成双链 DNA,反应条件为:95 ℃ 预变性 2 min,94 ℃ 30 s,60 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环,经凝胶成像系统分析,计算 Survivin mRNA 相对表达量。

8 统计学方法 采用 SPSS 11.5 软件,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两因素采用单因素方差分析,两样本均数采用 t 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 UEMHP 对 HepG2 细胞的增殖抑制作用(图 1) UEMHP 单独作用于肝癌细胞株 HepG2 具有较强的生长抑制作用,其抑制程度与药物的作用浓度有关系,且在一定时间(48 h)范围内,在 5 ~ 50 mg/L 浓度范围内,其抑制作用随着药物浓度增加而增强。

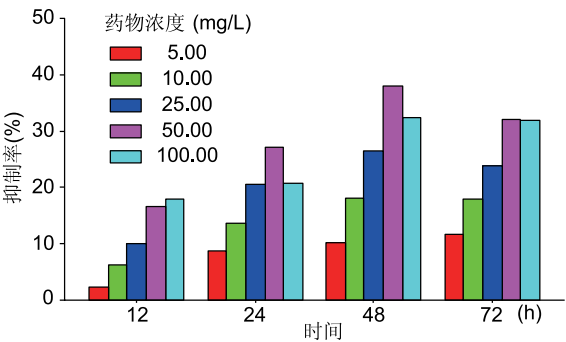


图 1 UEMHP 对 HepG2 的增殖抑制

2 单纯辐射组与加药辐射组克隆形成率曲线各参数比较(图 2) 两条曲线明显分开呈一定的距离,加药辐射组曲线低剂量区“肩区”与单纯辐射组“肩区”

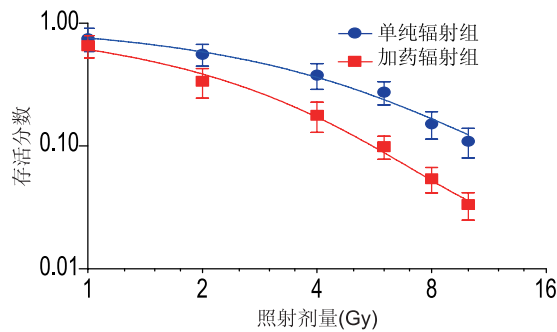


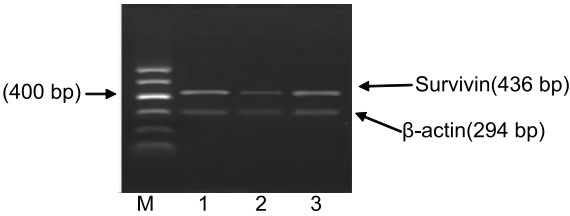
图 2 按线性二次方程拟合的生存曲线

比较,缩小变窄,且加药照射组各剂量点的存活分数均低于单纯辐射组($P < 0.05$)。

3 单纯辐射组与加药辐射组克隆形成率曲线各参数比较(表 1) 与单纯辐射组比较,加药辐射组克隆形成率曲线各参数差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

4 各组 Survivin mRNA 表达比较(图 3) 与对照组、单纯辐射组比较,加药辐射组 Survivin mRNA 表达逐渐降低,加药辐射组(0.31 ± 0.02)与对照组(0.82 ± 0.06)、单纯辐射组(0.58 ± 0.04)比较出现 Survivin mRNA 的表达下调($P < 0.01$)。

5 各组各时间点细胞 G_2/M 期比率比较(表 2, 图 4) 单纯辐射组引起 HepG2 细胞的 G_2/M 期阻滞由($12.17\% \pm 1.16\%$)开始上升,在 24 h 达到最高峰,然后逐渐下降,72 h 后基本恢复至正常,而加药辐射组,同样也出现了 G_2/M 期细胞阻滞比例的上升,在 12 h 达到最高峰($P < 0.05$);先用 UEMHP 处理 HepG2 细胞 48 h 后,细胞凋亡实验结果显示:除单纯药物组($10.36\% \pm 1.75\%$)与单纯辐射组($10.58\% \pm 2.01\%$)的凋亡率无差异外($P = 0.093$),加药辐射组($21.42\% \pm 3.74\%$)与对照组($5.35\% \pm 0.41\%$)、单纯药物组、单纯辐射组的凋亡率比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。



注:M:marker; 1:对照组;2:加药辐射组;3:单纯辐射组

图 3 各组 Survivin mRNA 表达比较

表 1 单纯辐射组与加药辐射组克隆形成率曲线各参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

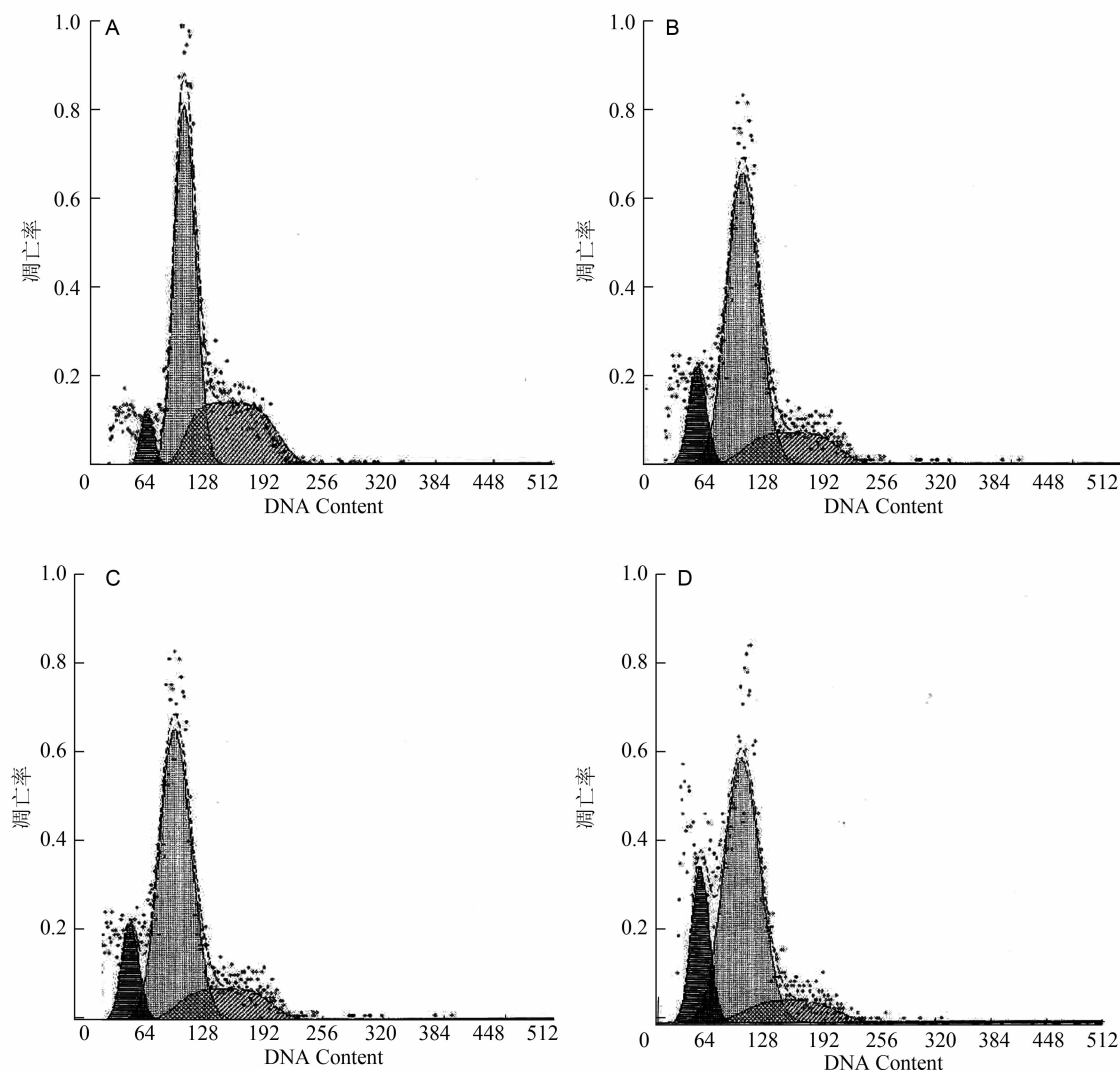
组别	n	SF	SER	α	β	α/β
单纯辐射	3	0.5300 ± 0.1120	1.8871 ± 0.1120	0.2710 ± 0.0010	0.0160 ± 0.0110	16.9370 ± 2.1450
加药辐射	3	$0.4766 \pm 0.0910^*$	$2.0981 \pm 0.1281^*$	$0.4987 \pm 0.0012^*$	$0.0172 \pm 0.0032^*$	$23.1800 \pm 0.6854^*$

注:与单纯辐射组比较,* $P < 0.01$

表 2 各组各时间点细胞 G_2/M 期比率比较 (%)

组别	n	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
对照	3	11.36 ± 1.14	11.35 ± 1.13	11.58 ± 1.14	12.07 ± 1.21	11.69 ± 1.15	11.54 ± 1.14
单纯辐射	3	12.17 ± 1.16	$35.17 \pm 3.18^*$	$50.34 \pm 3.95^{**}$	40.17 ± 3.12	29.15 ± 2.75	16.28 ± 1.88
单纯药物	3	12.14 ± 1.15	12.56 ± 1.22	11.24 ± 1.13	20.36 ± 2.36	32.89 ± 2.98	$23.73 \pm 2.65^{**}$
加药辐射	3	13.12 ± 1.20	47.24 ± 3.63	$41.54 \pm 3.25^{**}$	36.21 ± 3.21	31.02 ± 2.87	$26.54 \pm 2.78^{**}$

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$



注:A 对照组;B 单纯药物组;C 单纯辐射组;D 加药辐射组

图4 不同实验组凋亡率的流式图

讨 论

红芪为豆科岩黄芪属植物,《中国药典》2000 年版收载的常用中药红芪为多序岩黄芪的根,因与黄芪药效相近,所以在我国很多地区以红芪代黄芪入药,红芪具有扶正祛邪、益气固本的功效,其主要成分有红芪多糖、黄芪总黄酮(TFA)等活性组分。李云志等^[4]采用硅胶柱色谱及 Sephadex LH-20 等方法分离其成分,其中首次研究并确定化合物IX为紫檀烷类化合物,结果显示其对 HepG2 具有一定的抗肿瘤活性。雷丰丰等^[5]研究表明,红芪多糖可以通过升高细胞内钙离子浓度、自由基含量及降低线粒体膜电位诱导小鼠 S180 瘤细胞凋亡。

本实验利用 CCK-8 法检测 UEMHP 作用于肝癌细胞株 HepG2,发现其在 48 h 范围内,其抑制作用随

着药物浓度的增加而增强,其中在 50 mg/L 浓度时,其抑制作用最强。按线性二次方程拟合并绘制细胞的存活曲线向右下约呈弧度的曲线,两条曲线明显分开呈一定的距离,参数显示 UEMHP 对肝癌细胞株 HepG2 具有放射增敏作用($P < 0.05$)。

Survivin 是 1997 年新发现的最强的凋亡抑制基因,定位于人染色体 17q25,其基因编码由 142 个氨基酸组成,分子量为 16.5kD 的细胞内蛋白,是凋亡抑制蛋白家族中最简单的成员。它主要通过抑制 Caspase-3, Caspase-7 而阻断细胞的凋亡,促进肿瘤快速增殖、促进实体瘤血管形成等特点^[6]。Survivin 还可对抗 G₂/M 期凋亡的诱导,在肿瘤细胞中的过度表达可使细胞克服凋亡的关卡,通过有丝分裂促进细胞的异常增殖^[7]。Rodel F 等^[8]发现 Survivin 水平与放射诱导的凋亡及放射敏感性均呈现负相关的关系。也就是说,高

表达 Survivin 的细胞表现出低放射诱导的凋亡率,同时表现出强放射抗性最低,在放射抗性结肠癌细胞系中使用 siRNA 使 Survivin 表达下调能够引起自发凋亡和辐射诱导的凋亡都增加^[9],本实验用 FCM 分析,发现 UEMHP 对放射后的 HepG2 细胞具有去 G₂/M 期阻滞的效应,细胞凋亡率较单纯辐射组、单纯药物组也相应增加,同时 RT-PCR 结果显示加药辐射组与对照组、单纯辐射组比较均出现 Survivin mRNA 表达下调。由此可见,我们认为 UEMHP 可以增加对肝癌细胞株 HepG2 的辐射增敏作用,其作用机理可能是通过抑制凋亡抑制基因 Survivin,使 Survivin 表达下调,增加辐射诱导的凋亡,同时通过去 G₂/M 期阻滞的效应而提高辐射敏感性,但是否还通过其他途径提高辐射敏感性,尚有待于进一步研究。

综上所述,UEMHP 具有增加对肝癌细胞株 HepG2 的辐射增敏作用,其作用机制可能对放射后的 HepG2 细胞具有去 G₂/M 期阻滞和使 survivin mRNA 表达下调,增加 HepG2 细胞凋亡率有关,从而有希望利用中药 UEMHP 增加对肿瘤放射治疗的敏感性,降低放射对患者的副作用。但本实验有待对 UEMHP 的辐射增敏作用机制进一步深入的探讨和明确。

参 考 文 献

[1] 杨莹,张宇忠.天然中药抗肿瘤机制的研究进展[J]. 医

学综述, 2010, 16(3): 363-365.

- [2] 樊秦,李应东,舒畅,等.超滤膜分离纯化当归补血汤的研究[J]. 中成药, 2010, 32(8): 1438-1440.
- [3] 韩永萍,林强,何绪文.膜分离技术在传统中药生产中的应用[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(8): 1983-1985.
- [4] 李云志,黄静,郭弘川,等.红芪化学成分和抗肿瘤活性研究[J]. 中草药, 2009, 40(8): 1195-1198.
- [5] 雷丰丰,赵健雄,王学习,等.红芪总多糖诱导 S180 瘤细胞凋亡的实验研究[J]. 中成药, 2008, 30(7): 961-964.
- [6] Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin[J]. Nature, 1998, 396(6711): 580-586.
- [7] Ohashi H, Takaji H, Oh H, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt regulates angiotensin-II induced inhibition of apoptosis in microvascular endothelial cells by governing survivin expression Caspase-3 activity[J]. Circ Res, 2004, 94(6): 785-790.
- [8] Rodel F, Frey B, Leitmann W, et al. Survivin antisense oligonucleotides effectively radiosensitize colorectal cancer cells in both tissue culture and murine xenograft models[J]. Int J Radiation Oncol Biol Physics, 2008, 71(1): 247-255.
- [9] Rodel F, Hoffmann J, Distel L, et al. The role of survivin for radiation therapy - prognostic and predictive factor and therapeutic target [J]. Strahlenther Onkol, 2007, 183(11): 593-599.

(收稿:2012-03-11 修回:2012-09-24)

第二十五届全国中西医结合消化系统疾病学术会议征文通知

由中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会主办,江西中医学院、江西省中医院和江西省中西医结合消化系统疾病专业委员会承办的“第二十五届全国中西医结合消化系统疾病学术会议”拟定于 2013 年 6 月 20—23 日在江西省南昌市召开。会议将围绕中西医结合诊治消化系统疾病研究进展及临床应用进行学术交流,届时将邀请有关国内知名中西医结合专家、名老中医和著名西医消化病专家作学术报告。现将会议征文事宜通知如下。

征文内容 疑难性消化病的中西医结合诊断与治疗;HP 感染相关性胃病的中西医结合治疗;HP 感染与胃肿瘤相关性研究;功能性胃肠病和炎症性肠病的诊治;肝脏疾病中西医结合治疗;国家名老中医诊治脾胃病经验;内镜下中西医结合治疗胃肠疾病的新技术和新方法;食管、胆、胰腺等疾病的临床诊治与基础研究等。

征文要求 论文内容真实可靠,具备科学性、先进性、实用性,未在国内公开发行的刊物发表。稿件请附 800 字论文摘要,论文撰写格式请参照《中国中西医结合杂志》2012 年稿约要求。编排顺序为:文题、单位、邮编、姓名、摘要、正文。投稿方式:一律采用电子邮件投稿,请以 word 文档(A4 纸版式)发送至邮箱 507425037@qq.com。来稿请务必注明作者姓名、工作单位、通讯地址、邮编和联系电话。请在投稿邮件的“主题栏”标注“中西医结合消化会议征文”字样。联系地址:北京市丰台区方庄芳星园一区 6 号,北京中医药大学东方医院消化内科,邮编:100078。联系人:魏仕兵、齐梦、李军祥。联系电话:13811269618、15210990924。电子邮箱:507425037@qq.com。

截稿日期 2013 年 5 月 20 日(以电子邮箱发送时间为准)。