

· 论 著 ·

竹节香附素 A 对人肝癌 HepG₂ 细胞 VEGF 基因表达的影响

林清标¹, 林小钦¹, 卓海燕¹, 陈琦¹, 史逸娴¹, 陈丽芳¹, 李东良², 王成东³

1. 福建医科大学孟超肝胆医院 福建医科大学附属传染病医院 福州市传染病医院肝病科, 福建 福州 350025;
2. 解放军福州总医院肝胆内科, 福建 福州 350025; 3. 连江县医院感染科, 福建 福州 350000

摘要: **目的** 观察竹节香附素 A 对人肝癌细胞株 HepG₂ 细胞血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。**方法** 体外培养 HepG₂ 细胞,将不同浓度的竹节香附素 A 与 HepG₂ 细胞共培养,采用酶联免疫吸附(ELISA)方法检测不同浓度竹节香附素 A 处理 HepG₂ 细胞 24 h 后细胞培养上清液中 VEGF 蛋白含量的变化;半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法和蛋白免疫印迹(Western blot)法分别检测竹节香附素 A 对 HepG₂ 细胞 VEGF mRNA 和蛋白相对表达水平(阳性条带灰度值/ β -actin 带灰度值)的影响。**结果** (1)不同浓度(5、10、20 μ g/ml)竹节香附素 A 处理 HepG₂ 细胞 24 h 后,细胞培养上清液中 VEGF 水平呈剂量依赖性降低($P=0.000$)。(2)竹节香附素 A 对 HepG₂ 细胞 VEGF mRNA 表达的影响:①不同浓度竹节香附素 A(0、5、10、20 μ g/ml)处理 HepG₂ 细胞 24 h 后,VEGF mRNA 的相对表达量呈剂量依赖性减少(0.96 ± 0.07 、 0.75 ± 0.09 、 0.55 ± 0.10 、 0.32 ± 0.11 , $P=0.000$)。②10 μ g/ml 竹节香附素 A 分别处理 HepG₂ 细胞 0、6、12、24 h 后,VEGF mRNA 的相对表达水平呈时间依赖性下降(0.77 ± 0.05 、 0.53 ± 0.09 、 0.32 ± 0.12 、 0.15 ± 0.04 , $P=0.000$)。(3)竹节香附素 A 抑制 HepG₂ 细胞 VEGF 蛋白的表达:①不同浓度竹节香附素 A(0、5、10、20 μ g/ml)处理 HepG₂ 细胞 24 h 后,VEGF 蛋白相对表达水平呈剂量依赖性下降(2.08 ± 0.28 、 1.43 ± 0.22 、 0.72 ± 0.15 、 0.17 ± 0.10 , $P=0.000$)。②10 μ g/ml 竹节香附素 A 分别处理 HepG₂ 细胞 0、6、12、24 h 后 VEGF 蛋白相对表达水平呈时间依赖性减少(2.47 ± 0.05 、 1.36 ± 0.02 、 0.30 ± 0.02 、 0.07 ± 0.02 , $P=0.000$)。**结论** 竹节香附素 A 能够下调 HepG₂ 细胞 VEGF 表达,这可能是其抑制肝癌细胞生长增殖的重要机制之一。

关键词: 竹节香附素 A; 人肝癌细胞株 HepG₂; 血管内皮生长因子; 核糖核酸; 蛋白

中图分类号: R 735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2017)09-1153-04

Effect of Raddeanin A on the expression of vascular endothelial growth factor gene in human hepatocellular carcinoma HepG₂ cells

* LIN Qing-biao, LIN Xiao-qin, ZHUO Hai-yan, CHEN Qi, SHI Yi-xian,

CHEN Li-fang, LI Dong-liang, WANG Cheng-dong

* Department of Hepatopathy, Mengchao Hepatobiliary Hospital of Fujian Medical University (Infectious Disease Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou Infectious Disease Hospital), Fuzhou, Fujian 350025, China

Corresponding author: LI Dong-liang, E-mail: dongliangli93@163.com

Abstract: Objective To observe the effect of Raddeanin A on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene in human hepatocellular carcinoma HepG₂ cells. **Methods** HepG₂ cells were cultured with different concentrations of Raddeanin A in vitro. Enzyme-linked immuno sorbent assay(ELISA) was used to detect VEGF level in cell culture supernatant after HepG₂ cells treated with different concentration of Raddeanin A for 24 h. Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) and protein immunoblot (western blot) were used to detect the relative expression level of messenger ribonucleic acid (mRNA) and protein (the ratio of gray scale value of the positive band to the β -actin) of VEGF in HepG₂ cells respectively. **Results** (1) After HepG₂ cells were treated by different concentrations (5, 10 and 20 μ g/ml) of Raddeanin A, the level of VEGF protein in cell culture supernatant decreased in a dose dependent

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2017.09.001

基金项目: 福建省自然科学基金(2012J01399); 福州市科技计划项目(2016-S-124-6); 福建中医药大学校管科研课题临床专项(XB2015070)

通讯作者: 李东良, E-mail: dongliangli93@163.com

manner($P=0.000$). (2) The relative expression level of VEGF mRNA decreased in a dose dependent manner after HepG₂ cells treated with 0,5,10 and 20 $\mu\text{g/ml}$ Raddeanin A for 24 h (0.96 ± 0.07 vs 0.75 ± 0.09 vs 0.55 ± 0.10 vs 0.32 ± 0.11 , $P=0.000$). The relative expression level of VEGF mRNA decreased in a time dependent manner after HepG₂ cells treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ Raddeanin A for 0,6,12 and 24 h (0.77 ± 0.05 vs 0.53 ± 0.09 vs 0.32 ± 0.12 vs 0.15 ± 0.04 , $P=0.000$). (3) The relative expression level of VEGF protein decreased in a dose dependent manner after HepG₂ cells treated with 0,5,10 and 20 $\mu\text{g/ml}$ Raddeanin A for 24 h (2.08 ± 0.28 vs 1.43 ± 0.22 vs 0.72 ± 0.15 vs 0.17 ± 0.10 , $P=0.000$). The relative expression level of VEGF protein decreased in a time dependent manner after HepG₂ cells treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ Raddeanin A for 0,6,12 and 24 h (2.47 ± 0.05 vs 1.36 ± 0.02 vs 0.30 ± 0.02 vs 0.07 ± 0.02 , $P=0.000$). **Conclusion** Raddeanin A could down-regulate the expression of VEGF gene in HepG₂ cells, which may be one of the important mechanisms to inhibit the growth and proliferation of liver cancer cells.

Key words: Raddeanin A; Human hepatocellular carcinoma HepG₂ cells; Vascular endothelial growth factor; Messenger ribonucleic acid; Protein

竹节香附素 A 是抗肿瘤类中药两头尖的主要有效成分之一,被证实是一种具有抑制肝癌、胃癌等肿瘤细胞生长增殖、促进肿瘤细胞凋亡作用的潜在抗肿瘤药物,但其作用机制仍有待深入探讨^[1]。近来研究发现,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在肝癌中高表达,对肝癌的发生、发展中起到重要作用,可促进肝癌新生血管形成、调控肿瘤生长和转移^[2]。本课题组前期在细胞水平研究中发现竹节香附素 A 对肝癌细胞增殖具有较强抑制效果^[3]。本研究拟通过体外细胞实验,探讨竹节香附素 A 对肝癌细胞 VEGF 基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 竹节香附素 A(成都曼思特生物科技,质量分数 $\geq 98\%$),用二甲基亚砜(DMSO,上海化学试剂公司)配成 100 mg/ml 储存液,置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) Kit(TaKaRa 公司); Trizol 试剂(美国 Invitriogeng); M-PER(R) 哺乳动物蛋白质抽提试剂(PIERCE 公司); VEGF 酶联免疫吸附(ELISA) Kit(武汉博士德生物); 抗 β -actin 单克隆抗体(Santa Cruz 公司); 抗 VEGF 单克隆抗体(abcam 公司); 辣根过氧化物标记的山羊抗鼠 IgG(HRP-IgG, PIERCE 公司); 免疫印迹(Western-Blot) 试剂(Amersco 公司); 硝酸纤维素膜(NC 膜, Millipore 公司)。

1.2 细胞培养 人肝癌细胞株 HepG₂ 购于美国国立癌症研究所,福建省肿瘤医院免疫实验室传代保存。HepG₂ 细胞在含 10% 胎牛血清(HyClone 公司)的 RPMI1640 培养液(Gibco 公司)中,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度条件下培养,隔天换液 1 次,2.5 g/L 胰酶/二乙胺四乙酸(EDTA)消化传代。取对数生长期细胞制备单细胞悬液进行实验。

1.3 实验分组 设竹节香附素 A 不同浓度组,使其

终浓度分别为 5、10、20 $\mu\text{g/ml}$; 另设不同时间组即 10 $\mu\text{g/ml}$ 药物作用细胞 6、12、24 h,同时设阴性对照(不加药物)。

1.4 ELISA 法检测细胞培养上清液中 VEGF 蛋白含量 采用 ELISA 技术,按试剂盒说明书操作,样品及 VEGF 标准品均采用复孔,在酶标仪上测量双波长 450 nm 处和 630 nm 处的光密度(OD)值。根据标准曲线所得方程式测定 VEGF 蛋白含量。

1.5 RT-PCR 法检测 VEGF mRNA 相对表达量 收集不同处理组的细胞,提取总 RNA,按照试剂盒说明书合成互补脱氧核糖核酸(cDNA)。根据 GenBank 提供的资料设计 VEGF 和 β -actin 的引物,并经 GenBank BLAST 进行同源性检索后,由 Invitrogen 公司合成。引物序列如下: VEGF[F:5'GAA GTG GTG AAG TTC ATG GAT GTC 3'; R:5' CGA TCG TTC TGT ATC AGT CTT TCC 3' VEGF121(408 bp)和 VEGF165(541 bp)]; β -actin(F:5' ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG 3'; R:5' CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC 3'; 838 bp)。PCR 条件,VEGF $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s,共 35 个循环。同时扩增 β -actin 基因。扩增产物在 1.2 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,凝胶图像分析系统(BIO-RAD 公司)分析结果。计算目的基因与 β -actin 带灰度值的比值(A/A_0)。

1.6 Western blot 法检测 VEGF 蛋白相对表达量 收集细胞,细胞裂解液裂解细胞提取蛋白,各组细胞取总蛋白 60 μg 上样。浓缩胶(5%)电压为 80 V,分离胶(10%)电压为 200 V,直至溴酚蓝位于分离胶底部约 1~5 mm 处,断开电源。采用全湿法(BIO-RAD 电泳仪)稳流 130 mA,3.5 h 左右将分离胶上的蛋白条带转移至 NC 膜上 SDS-PAGE 后转膜,用含 5% 脱脂奶粉的 TBS 包被 2 h,浸入加有一抗(抗 β -actin 单克隆抗体 1:2 000 稀释,抗 VEGF 单克隆抗体 1:

1 000 稀释) 的新鲜配置的封闭液中, 4 °C 过夜。次日, 加入溶于封闭液的二抗 HRP-IgG (1: 10 000 稀释) 室温 2 h。将 ECL 中试剂 A 和 B 各吸出 0.5 ml, 混匀后将膜浸入 2 min, 于压片盒中 X 光片曝光。采用 BandScan 图象分析软件测定条带灰度值, 减去底片基础灰度值, 计算其与内参 β -actin 的比值。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计学软件包进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用多因素方差分析及两两比较的 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 竹节香附素 A 对 HepG₂ 细胞上清液 VEGF 蛋白含量的影响 竹节香附素 A 可减少 HepG₂ 细胞培养上清液中 VEGF 蛋白含量, 且随着药物剂量的增大其含量递减, 呈明显的剂量依赖 (P = 0.000), 见图 1。为排除细胞增殖状态对 VEGF 分泌量的影响, 我们又采用 10 μ g/ml 竹节香附素 A 处理 HepG₂ 细胞 6、12、24 h 检测细胞上清液中 VEGF 含量变化。结果显示, 用竹节香附素 A 作用 HepG₂ 细胞 24 h 后, 对细胞的增殖无显著影响 (P = 0.194), 见图 2。

2.2 不同浓度竹节香附素 A 对人肝癌 HepG₂ 细胞 VEGF mRNA 和蛋白表达的影响 5、10 和 20 μ g/ml 3 种不同浓度竹节香附素 A 处理 HepG₂ 细胞 24 h 后, 对照组可见 VEGF mRNA 和蛋白高表达, 不同浓度药物处理组 VEGF mRNA 和蛋白表达下调, 且随药物浓度增加, 表达量逐渐减少, 该抑制作用表现出剂量依赖性(表 1、图 3、图 5)。

2.3 不同时间竹节香附素 A 对人肝癌 HepG₂ 细胞 VEGF 基因和蛋白表达的影响 10 μ g/ml 特定浓度竹节香附素 A 处理人肝癌 HepG₂ 细胞 6、12、24 h 后, VEGF mRNA 和蛋白呈时间依赖性下调(见表 2、图 4、图 6)。

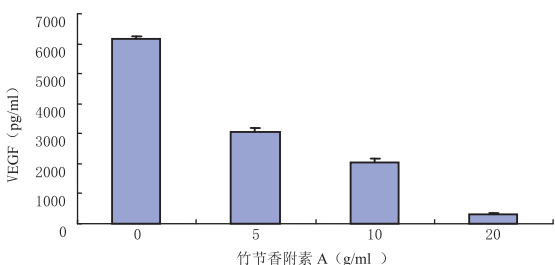


图 1 不同浓度竹节香附素 A 处理 24 h 后 HepG₂ 细胞培养上清液 VEGF 蛋白含量

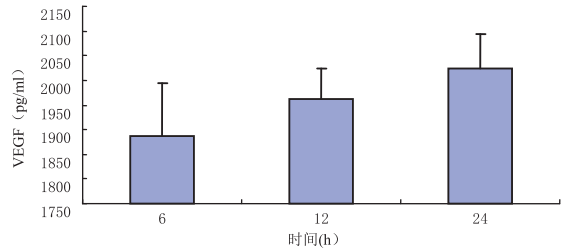


图 2 10 μ g/ml 竹节香附素 A 处理后不同时间 HepG₂ 细胞培养上清液 VEGF 蛋白含量

表 1 不同浓度竹节香附素 A 作用 24 h 对 HepG₂ 细胞 VEGF 基因表达的影响

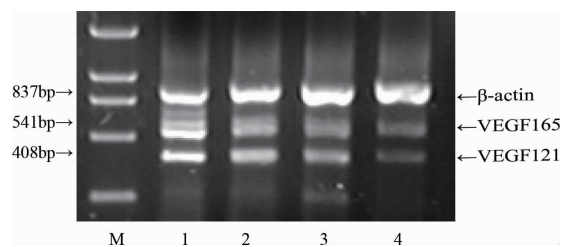
竹节香附素 A 浓度	VEGF	
	mRNA	蛋白
对照组	0.96 ± 0.07	2.08 ± 0.28
5 μ g/ml	0.75 ± 0.09 ^a	1.43 ± 0.22 ^a
10 μ g/ml	0.55 ± 0.10 ^a	0.72 ± 0.15 ^a
20 μ g/ml	0.32 ± 0.11 ^a	0.17 ± 0.10 ^a
P 值	0.000	0.000

注: 与对照组相比, ^aP < 0.01。

表 2 不同时间竹节香附素 A 对 HepG₂ 细胞 VEGF 基因表达的影响 (A/AO)

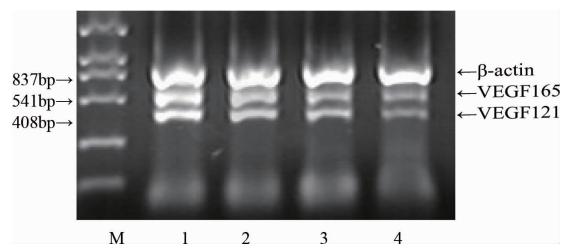
竹节香附素 A (10 μ g/ml)	VEGF	
	mRNA	蛋白
对照组	0.77 ± 0.05	2.47 ± 0.05
6 h	0.53 ± 0.09 ^a	1.36 ± 0.02 ^a
12 h	0.32 ± 0.12 ^a	0.30 ± 0.02 ^a
24 h	0.15 ± 0.04 ^a	0.07 ± 0.02 ^a
P 值	0.000	0.000

注: 与对照组相比, ^aP < 0.01。



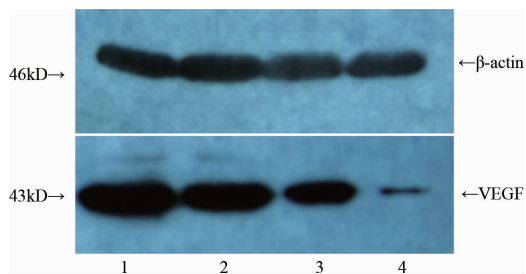
注: M: 标记物; 1: 对照组; 2: 5 μ g/ml 处理组; 3: 10 μ g/ml 处理组; 4: 20 μ g/ml 处理组。

图 3 不同浓度竹节香附素 A 处理 HepG₂ 细胞 24 h 后的 VEGF mRNA 表达变化



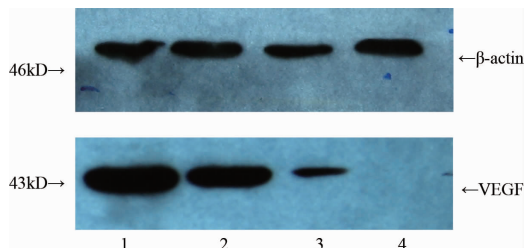
注: M: 标记物; 1: 对照组; 2: 药物处理 6 h 组; 3: 药物处理 12 h 组; 4: 药物处理 24 h 组。

图 4 10 μ g/ml 竹节香附素 A 处理 HepG₂ 细胞不同时间后的 VEGF mRNA 表达变化



注:1:对照组;2:5 μg/ml 处理组;3:10 μg/ml 处理组;4:20 μg/ml 处理组;

图5 不同浓度竹节香附素 A 处理 HepG₂ 细胞 24 h 后的 VEGF 蛋白表达变化



注:1:对照组;2:药物处理 6 h 组;3:药物处理 12 h 组;4:药物处理 24 h 组。

图6 10 μg/ml 竹节香附素 A 处理 HepG₂ 细胞不同时间后的 VEGF 蛋白表达变化

3 讨论

竹节香附素 A 是中药两头尖(又称竹节香附)中提取的一种三萜皂苷类天然生物活性物质,具有抑制多种肿瘤细胞生长和诱导细胞凋亡的作用。早在清代,王子接编著的《绛雪园古方选注》中就有关于采用中药两头尖治疗乳岩(乳腺癌)的记载。目前,体外细胞实验或动物体内实验也进一步证实竹节香附素 A 对肝癌、肺癌、胃癌和结直肠癌等恶性肿瘤具有显著抑制作用,是一种潜在的抗肿瘤药物^[4-5]。但在肝癌中的研究相对较少,且其作用机制尚不明确。

目前,研究证实血管生成是恶性肿瘤侵袭和转移过程中的基本事件。近来,Guan 等^[6]研究发现,竹节香附素 A 可显著抑制人脐静脉血管内皮细胞的增殖、迁移和血管新生,并可抑制接种人结肠癌细胞小鼠的移植瘤生长,其作用机制可能与竹节香附素 A 有效抑制 VEGF 诱导的 VEGF 受体-2 及其下游信号分子的磷酸化有关,从而认为竹节香附素 A 可通过抑制 VEGF 受体-2 信号通路来发挥抗结肠癌血管生成作用。但是,目前尚未见在肝癌方面的类似研究。本研究观察了竹节香附素 A 对人肝癌 HepG₂ 细胞 VEGF 基因表达的影响,结果发现竹节香附素 A 可有效降低 HepG₂ 细胞培养上清液中 VEGF 蛋白的浓度,并证实竹节香附素 A 对 HepG₂ 细胞 VEGF 蛋白分泌的抑制作用不是单纯通过抑制细胞增殖而实现,

且具有直接抑制 HepG₂ 细胞分泌 VEGF 蛋白的作用。另外,本研究也从不同浓度和不同作用时间的角度,通过 RT-PCR 和蛋白免疫印迹技术,反复验证了竹节香附素 A 对人肝癌 HepG₂ 细胞 VEGF 基因的抑制作用,发现该抑制作用呈现剂量-时间依赖性。VEGF 信号转导途径被公认为是肿瘤血管生成过程中关键的调节通路,该途径激活可引发内皮细胞的生长、迁移和新生血管生成^[7]。阻断 VEGF、VEGF 受体的激活,可有效地抑制血管生成和肿瘤生长^[8]。临床研究证实,抗 VEGF 抗体(贝伐单抗)与化疗药物联合使用时,能显著改善进展期结直肠癌、泌尿系肿瘤患者的预后,从而进一步验证了 VEGF 通路抑制剂在肿瘤治疗中的重要地位^[9]。

综上所述,竹节香附素 A 能够下调 HepG₂ 细胞 VEGF 表达,这可能是其抑制肝癌细胞生长增殖的重要机制之一。

参考文献

- [1] Teng YH, Li JP, Liu SL, et al. Autophagy protects from Raddeanin A-induced apoptosis in SGC-7901 human gastric cancer cells[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016:9406758.
- [2] Blagotinsek K, Rozman D. Targeting signalling pathways in hepatocellular carcinoma[J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(1):170-175.
- [3] 林小钦, 李东良, 杨才生, 等. 竹节香附素 A 对人肝癌细胞 HepG₂ 增殖的抑制作用[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(1):49-51.
- [4] Li JN, Yu Y, Zhang YF, et al. Synergy of Raddeanin A and cisplatin induced therapeutic effect enhancement in human hepatocellular carcinoma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 485(2):335-341.
- [5] Xue G, Zou X, Zhou JY, et al. Raddeanin A induces human gastric cancer cells apoptosis and inhibits their invasion in vitro[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 439(2):196-202.
- [6] Guan YY, Liu HJ, Luan X, et al. Raddeanin A, a triterpenoid saponin isolated from Anemone raddeana, suppresses the angiogenesis and growth of human colorectal tumor by inhibiting VEGFR2 signaling[J]. Phytomedicine, 2015, 22(1):103-110.
- [7] Falcon BL, Chintharlapalli S, Uhlík MT, et al. Antagonist antibodies to vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) as anti-angiogenic agents[J]. Pharmacol Ther, 2016, 164:204-225.
- [8] Wang F, He Z, Dai W, et al. The role of the vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptors axis mediated angiogenesis in curcumin-loaded nanostructured lipid carriers induced human HepG₂ cells apoptosis[J]. J Cancer Res Ther, 2015, 11(3):597-605.
- [9] Narayanan S, Srinivas S. Incorporating VEGF-targeted therapy in advanced urothelial cancer[J]. Ther Adv Med Oncol, 2017, 9(1):33-45.