

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.24.011

白及多糖联合5-氟尿嘧啶对人肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响

温艳¹, 张强², 曹涵博^{1△}

(1. 陕西省食品药品检验研究院, 陕西 西安 710065; 2. 陕西省药品疫苗检查中心, 陕西 西安 710065)

摘要:目的 探讨白及多糖(BSP)联合5-氟尿嘧啶(5-FU)对人肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响。方法 以0, 50, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSP 分别培养细胞 24, 48, 72 h, 采用 CCK-8 法, 测定细胞活力, 确定 BSP 最优培养质量浓度。另设对照组(等体积生理盐水)、BSP 组(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、5-FU 组(0.02 mol/L)、BSP + 5-FU 组(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 0.02 mol/L), 培养细胞 48 h, 测定细胞活力; 采用流式细胞术检测细胞凋亡情况; 采用荧光定量聚合酶链式反应法检测半胱氨酸蛋白酶 8(Caspase-8)、B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(BAX)mRNA 水平; 采用 Western blot 法检测 Caspase-8、Bcl-2 和 BAX 蛋白表达水平。结果 与 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 比较, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSP 作用 48 h 后细胞活力开始显著降低($P < 0.05$)。与 5-FU 组及 BSP 组比较, BSP + 5-FU 组细胞活力均显著减低($P < 0.05$); 细胞凋亡率均显著升高($P < 0.05$); Caspase-8 和 BAX mRNA 和蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$), Bcl-2 mRNA 和蛋白表达水平均有所降低。结论 BSP 联合 5-FU 可诱导 HepG2 细胞凋亡, 其机制可能与 Caspase-8 介导的细胞凋亡有关。

关键词: 白及多糖; 5-氟尿嘧啶; 人肝癌 HepG2 细胞; 细胞凋亡; Caspase-8

中图分类号: R932; R285

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)24-0047-04

Effect of *Bletilla Striata* Polysaccharide Combined with 5-Fluorouracil on Apoptosis of Human Hepatoma HepG2 Cells

WEN Yan¹, ZHANG Qiang², CAO Hanbo¹

(1. Shaanxi Institute for Food and Drug, Xi'an, Shaanxi, China 710065; 2. Shaanxi Provincial Drug and Vaccine Inspection Center, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract: Objective To investigate the effect of *Bletilla striata* polysaccharide (BSP) combined with 5-fluorouracil (5-FU) on the apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. **Methods** The cells were cultured at 0, 50, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of BSP for 24, 48 and 72 h, respectively. The cell viability was measured by CCK-8 method to determine the optimal concentration of BSP. The control group (equal volume of distilled water), BSP group (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 5-FU group (0.02 mol/L), and BSP + 5-FU group (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 0.02 mol/L) were set up, and the cells in those groups were cultured for 48 h to measure the cell viability. The apoptosis of cells was detected by flow cytometry. The expression levels of Caspase-8, B lymphocytoma 2 (Bcl-2) and Bcl-2 related X protein (BAX) mRNA were detected by fluorescence quantitative polymerase chain reaction. The expression levels of Caspase-8, Bcl-2 and BAX proteins were detected by Western blot. **Results** Compared with treatment with 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of BSP, the cell viability began to decrease significantly after 48 h of treatment with 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of BSP ($P < 0.05$). Compared with those in the 5-FU group and BSP group, the cell viability in the BSP + 5-FU group decreased significantly ($P < 0.05$), the apoptosis rate in the BSP + 5-FU group significantly increased ($P < 0.01$), the levels of Caspase-8 and BAX mRNA and protein increased significantly ($P < 0.05$), while the level of Bcl-2 mRNA and protein decreased. **Conclusion** BSP combined with 5-FU can induce apoptosis of HepG2 cells, which may be related to Caspase-8 pathway.

Key words: *Bletilla striata* polysaccharide; 5-fluorouracil; HepG2 cells; apoptosis; Caspase-8

肝癌是我国较常见及高发肿瘤^[1]。化学合成药物对其疗效良好,但不良反应较明显;传统中药因其疗效较好和不良反应较少的优点在治疗癌症方面具有一定优势^[2]。白及为我国传统中药,是兰科植物白及的干燥块茎,药用历史悠久、价值高,有止血、收敛、生肌、消肿等功效,主要化学成分包括联苕类、菲类、二氢菲类、萜类化合物等^[3]。白及多糖(BSP)为从中药白及中提取获得的甘葡聚糖,药理学研究结果表明具有抗炎、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤等作用,在医药领域具有较高价值^[4-5]。

5-氟尿嘧啶(5-FU)是目前常用于胃癌、食管癌、肠癌等癌症的治疗^[6]。细胞凋亡受多基因的严格控制,如 B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2)家族,半胱氨酸蛋白酶 8(Caspase)家族、原癌基因 C-myc 等^[7]。有研究报道多糖对化学药物治疗(简称化疗)药物有增效作用^[8]。本研究选取合适质量浓度的 BSP,联合 5-FU 作用于体外培养的肝癌细胞株,并对其进行活力检测,分析作用后凋亡相关蛋白基因及蛋白表达的变化,为 BSP 抗肝癌的作用机制提供实验证据。现报道如下。

第一作者:温艳,女,大学本科,主管药师,研究方向为食品、药品、化妆品检验检测,(电子信箱)342696232@qq.com。

△通信作者:曹涵博,女,博士研究生,主管药师,研究方向为食品、药品、化妆品质量控制,(电子信箱)hannecao@163.com。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂及细胞

仪器: DNM - 9606 型酶联免疫检测仪(德国 Thermo 公司); MA - 6000 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司); Tanon 5200 型化学发光仪(赛默飞世尔科技公司); Attune Nxt 型流式细胞仪(美国 BD 公司); SHB - 1600A2 型生物安全柜(苏州净化设备仪器厂)。

试剂: DMEM 基础培养基、胎牛血清(美国 Hyclone 公司,批号分别为 AG29719232, AF29548181); 青霉素 - 链霉素(美国 Gibco 公司,批号为 171334); BSP(陕西师范大学生命科学学院实验室,以生理盐水溶解); 5 - FU(美国 MCE 公司,批号为 HY-90006); CCK - 8 试剂(美国 Sigma 公司,批号为 91963); Annexin V - FITC / PI 凋亡检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号为 CA1050); Caspase - 8、B 淋巴细胞 Bcl - 2、Bcl - 2 相关 X 蛋白(BAX)、GAPDH、山羊抗兔 IgG(H + L)、山羊抗小鼠 IgG(H + L) 抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab32397, ab32124, ab32503, ab8245, b205718, ab205719)。

细胞: 人肝癌 HepG2 细胞, 购自中国科学院上海生命科学研究院。

1.2 方法

细胞活力: 采用 CCK - 8 法。取对数生长期的 HepG2 细胞, 接种于 96 孔板, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜, 待细胞贴壁后, 加入不同质量浓度(50, 100, 200, 400, 800 μg / mL) 的 BSP, 另设空白对照(等体积生理盐水)。每孔加入培养基 100 μL, 每组设 5 个复孔, 分别培养 24, 48, 72 h 后加入 CCK - 8 试剂 10 μL, 37 °C 反应 30 min, 以酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度(OD) 值。另设对照组(等体积生理盐水)、BSP 组(400 μg / mL)、5 - FU 组(0.02 mol / L)、BSP + 5 - FU 组(400 μg / mL + 0.02 mol / L), 培养细胞 48 h, 同法操作。

细胞凋亡: 采用流式细胞术。取对数生长期的 HepG2 细胞, 接种于 24 孔板, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜, 待细胞贴壁后, 同“细胞活力”项分组, 分别进行相应处理 48 h, 用 Annexin V - FITC / PI 凋亡检测试剂盒严格按说明书进行染色, 以流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

Caspase - 8, BAX, Bcl - 2 mRNA 表达: 采用荧光定量聚合酶链式反应。将 HepG2 细胞接种于 6 孔板处理 48 h, 加入 Trizol 裂解液, 再加入氯仿 200 μL, 4 °C 下 12 000 g 离心 15 min, 加入等体积异丙醇, 4 °C 下 12 000 g 离心 10 min, 按 Takara 反转录试剂盒说明书进行反转录和 PCR 扩增。PCR 扩增条件: 94 °C, 5 min;

94 °C 40 s, 56 °C 50 s, 72 °C 10 min, 45 个循环; 72 °C 10 min。在引物由上海金唯智公司合成, 定量 PCR 结果通过 2^{-ΔΔC_t} 计算, 以 GAPDH 为内参, 各组设 3 个复孔。

表 1 引物信息

Tab. 1 Primer information

引物	序列(5'→3')
GAPDH	正向引物: AGAGAGGCCAGCTACTCG
	反向引物: GGCCTGCACAAGAAGATGC
Caspase - 8	正向引物: CTCGGAGACCAGATTCTGCC
	反向引物: CAGGCTCAGGAACCTTGAGGG
BAX	正向引物: GGCCCTTTTCTTCAGGGGAT
	反向引物: TCCCGGAGGAAGTCCAATGT
Bcl - 2	正向引物: ATAACGGAGGCTGGGTAGCT
	反向引物: TTTATTTCCGGCTCCACA

Caspase - 8, BAX, Bcl - 2 蛋白表达: 采用 Western blot 法。将细胞接种于 100 mm 细胞培养皿中, 按“细胞凋亡”项下分组分别处理 48 h, 加入细胞裂解液, 测定蛋白浓度, 加入蛋白上样缓冲液, 100 °C 煮沸, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 封闭, 一抗 4 °C 孵育过夜, 洗脱, 二抗室温孵育 1 h, 洗脱。用增强型化学发光试剂(ECL) 显影, 成像, 目的条带与内参(GAPDH) 条带灰度比值作为各目的蛋白相对表达量。

1.3 数据处理

采用 GraphPad 6 软件进行数据分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行独立样本或配对样本 *t* 检验, 以及单因素方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同质量浓度 BSP 对细胞活力的影响

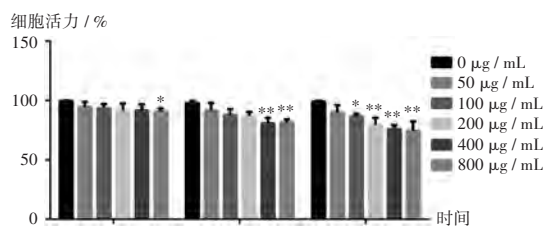
结果见图 1。处理细胞 24 h 后, 质量浓度为 800 μg / mL 的 BSP 对细胞活力有显著抑制作用($P < 0.05$); 处理细胞 48 h 后, 质量浓度为 400 μg / mL 和 800 μg / mL 的 BSP 对细胞活力有显著抑制作用($P < 0.01$), 400 μg / mL 时的抑制率约为 20%; 处理细胞 72 h 后, 质量浓度分别为 100, 200, 400, 800 μg / mL 的 BSP 对细胞活力均有显著抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$)。综合考虑, 选择 BSP 质量浓度为 400 μg / mL, 细胞处理时间为 48 h。

2.2 BSP + 5 - FU 对细胞活力的影响

400 μg / mL BSP 和 0.02 mol / L 5 - FU 对 HepG2 细胞活力的抑制率分别为 23% 及 45%, 联用后达 56%, 与两者单独作用比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。详见图 2。

2.3 细胞凋亡结果

BSP + 5 - FU 组的细胞凋亡率为(47.46 ± 5.15)%, 显著高于 BSP 组的(17.10 ± 1.45)% ($P < 0.01$) 及 5 -

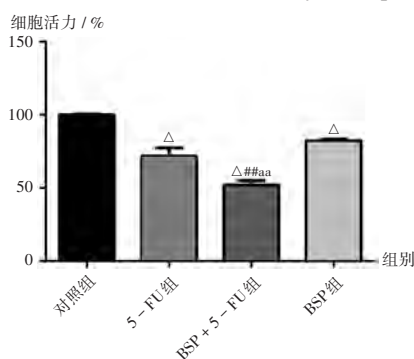


注:与0 μg/mL比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图1 BSP对HepG2细胞活力的影响

Note:Compared with 0 μg/mL,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

Fig.1 Effect of BSP on the viability of HepG2 cells



注:与对照组比较, $\Delta P < 0.01$;与5-FU组比较,* $P < 0.05$,
$P < 0.01$;与BSP组比较,^a $P < 0.05$,^{aa} $P < 0.01$ 。图3至图5同。

图2 不同药物对HepG2细胞活力的影响

Note:Compared with those in the control group, $\Delta P < 0.01$;Compared with those in the 5-FU group,* $P < 0.05$,## $P < 0.01$;Compared with those in the BSP group,^a $P < 0.05$,^{aa} $P < 0.01$ (for Fig.2-5).

Fig.2 Effects of different drugs on the viability of HepG2 cells

FU组的(31.03 ± 2.5)%($P < 0.01$)。详见图3。

2.4 Caspase-8, BAX, Bcl-2 mRNA 表达结果

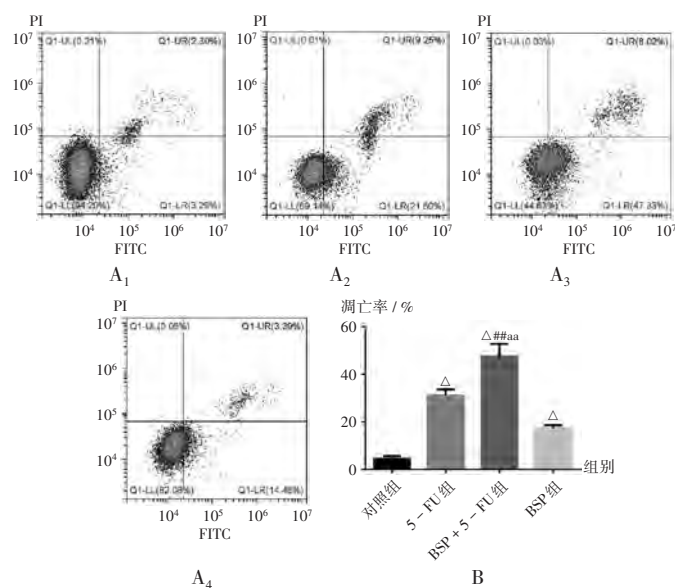
与对照组比较,BSP+5-FU组 Caspase-8, BAX mRNA 表达水平显著升高($P < 0.01$), Bcl-2 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.01$)。与5-FU组和BSP组比较,BSP+5-FU组 Caspase-8, BAX mRNA 的表达水平显著升高($P < 0.01$); Bcl-2 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.01$)。详见图4。

2.5 Caspase-8, BAX, Bcl-2 蛋白表达结果

与对照组比较,BSP+5-FU组 Caspase-8, BAX 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$)。与5-FU组和BSP组比较,BSP+5-FU组 Caspase-8, BAX 蛋白的表达水平显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); Bcl-2 蛋白表达水平无显著差异($P > 0.05$)。详见图5。

3 讨论

中医药可在缓解肝癌患者的临床症状、提高其生活质量和免疫功能、预防复发转移、延缓肿瘤进展、延长生存时间等方面发挥显著作用,其作用机制主要体



A₁. 对照组 A₂. 5-FU组 A₃. BSP+5-FU组 A₄. BSP组

A. 流式细胞图 B. 数据统计

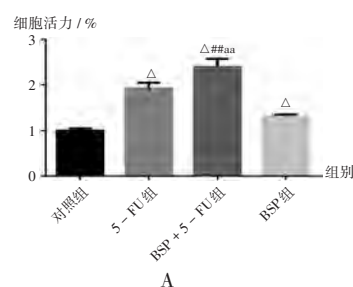
图3 不同药物对细胞凋亡的影响

A₁. Control group A₂. 5-FU group A₃. BSP+5-FU group

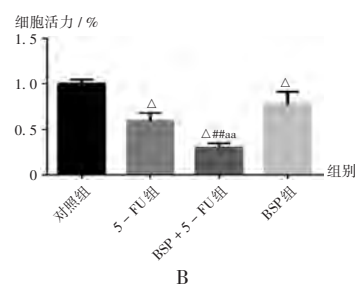
A₄. BSP group

A. Flow cytometry B. Data statistics

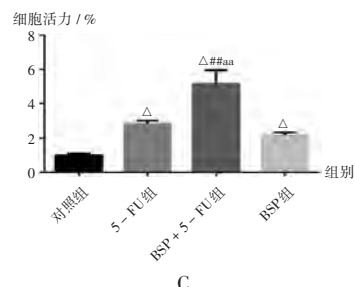
Fig.3 Effects of different drugs on the apoptosis of HepG2 cells



A



B



C

A. BAX B. Bcl-2 C. Caspase-8

图4 BAX, Bcl-2, Caspase-8 mRNA 表达水平

A. BAX B. Bcl-2 C. Caspase-8

Fig.4 Expression levels of BAX, Bcl-2, Caspase-8 mRNA

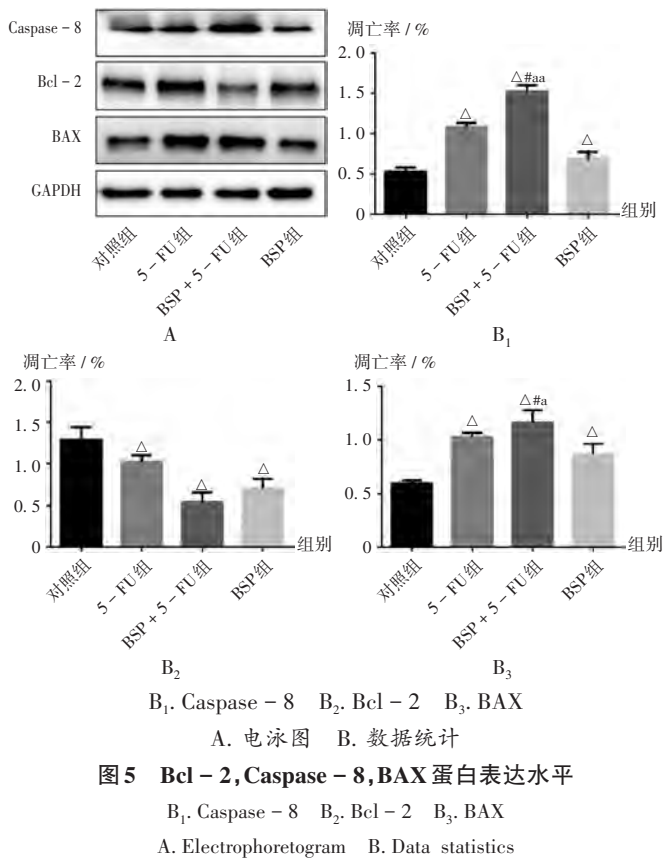


图5 Bcl-2, Caspase-8, BAX蛋白表达水平

Fig. 5 Expression levels of Bcl-2, Caspase-8, BAX protein

现在诱导细胞凋亡、自噬、阻滞细胞周期、调节免疫功能、抑制转移和血管生成、逆转耐药、增强化学药物治疗(简称化疗)效果等方面^[9-11]。20世纪70年代多糖就被发现参与调控细胞生命活动,并具有重要的生理活性^[12]。白及可用于治疗消化道黏膜损伤、溃疡、出血、跌打损伤和烧伤。大量研究表明,BSP具有较强的抗肿瘤活性^[13],可增强血管内皮细胞的增殖和血管内皮生长因子的表达^[14]。

本研究结果显示,BSP、5-FU单独作用时均可对HepG2细胞的活力产生抑制作用,两者联用产生的抑制作用较单用更明显,细胞出现明显的凋亡,Caspase-8、BAX mRNA表达水平显著升高,其蛋白表达水平亦显著升高,Bcl-2 mRNA水平和蛋白表达水平明显降低,这可能是BSP+5-FU对肝癌细胞促凋亡作用的重要机制之一,仍待进一步研究。GAO等^[15]的研究表明,多糖与肿瘤细胞膜具有良好的生物相容性,可能有增加药物进入细胞的能力,这可能是BSP能大幅增加5-FU活性的原因之一。

综上所述,在体外条件下,BSP+5-FU可明显抑制HepG2细胞增殖并诱导其凋亡,其主要机制可能是通过对凋亡相关蛋白Caspase-8、Bcl-2、BAX等基因的调控发挥作用,BSP可能通过Caspase途径促进HepG2细胞的凋亡来发挥抗肿瘤作用,但仍需进一步研究。

参考文献

- [1] CHEN JC, ZHANG SW. Liver cancer epidemic in China: Past, present and future[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2011, 21(1): 59-69.
- [2] 赵倩, 黄维, 彭成, 等. 中药有效成分调节自噬防治癌症研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(2): 663-666.
- [3] QU Y, LI C, ZHANG C, et al. Optimization of infrared-assisted extraction of *Bletilla striata* polysaccharides based on response surface methodology and their antioxidant activities[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 148: 345-353.
- [4] LAI YL, LIN YY, SADHASIVAM S, et al. Efficacy of *Bletilla striata* polysaccharide on hydrogen peroxide-induced apoptosis of osteoarthritic chondrocytes[J]. *Journal of Polymer Research*, 2018, 25(2): 49.
- [5] DONG L, XIA S, LUO Y, et al. Targeting delivery oligonucleotide into macrophages by cationic polysaccharide from *Bletilla striata* successfully inhibited the expression of TNF- α [J]. *Journal of Controlled Release*, 2009, 134(3): 214-220.
- [6] NAGASUE N, KOBAYASHI M, IWAKI A, et al. Effect of 5-fluorouracil on liver regeneration and metabolism after partial hepatectomy in the rat[J]. *Cancer*, 1978, 41(2): 435-443.
- [7] THOMPSON CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. *Science*, 1995, 267(5203): 1456-1462.
- [8] 杨丹, 颜琼, 罗德兰, 等. 大蒜素对5-氟尿嘧啶治疗肝癌的增效作用及机制[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(1): 72-75.
- [9] 李锦毅, 黄飞, 李德新. 中医药诱导肿瘤细胞凋亡的免疫学机制[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2001, 7(3): 40-41.
- [10] LIAO K, GONG LY, YANG Y, et al. A comprehensive review of research progress in Chinese medicines for primary liver cancer treatment[J]. *Tradit Med Res*, 2022, 7(2): 1-10.
- [11] FENG X, WANG Y, XU L. Mechanism of the use of four chemotherapeutic drugs for intestinal metaplasia in the treatment of precancerous gastric cancer lesions based on network pharmacology and molecular docking technology[J]. *Gastroenterol Hepatol Res*, 2022, 4(1): 7.
- [12] 贾可, 党亚锋, 陈美红, 等. 白及多糖药理作用研究[J]. *山西中医*, 2021, 37(5): 55-56.
- [13] 柯昌毅, 赵春景. 白及多糖对溃疡性结肠炎的作用研究[J]. *中国药房*, 2011, 22(23): 2132-2134.
- [14] DIAO H, XIN L, CHEN J, et al. *Bletilla striata* Polysaccharide Stimulates Inducible Nitric Oxide Synthase and Proinflammatory Cytokine Expression in Macrophages[J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2008, 105(2): 85-89.
- [15] GAO R, MCCORMICK CJ, ARTHUR MJ, et al. High efficiency gene transfer into cultured primary rat and human hepatic stellate cells using baculovirus vectors[J]. *Liver*, 2002, 22(1): 15-22.

(收稿日期: 2022-06-21)