

青藤碱对 HepG2 细胞的抑制作用

刘 斌^{1,2}, 杨 焱¹, 王福玲^{1,2}, 张 晶², 司岩岩¹, 王聪然¹, 辛国松^{1,2*}
(1. 哈尔滨商业大学药物工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要: **目的** 探究青藤碱对人肝癌 HepG2 细胞的抑制作用。**方法** 采用 CCK-8 试剂盒检测青藤碱对 HepG2 细胞增殖的抑制率, 在荧光显微镜、倒置显微镜下观察细胞形态, 流式细胞仪检测细胞凋亡率、ROS 水平、线粒体膜电位、MPTP, Western blot 法检测 Cyt-c、caspase-9、caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达。**结果** 青藤碱对 HepG2 细胞具有生长抑制作用, 72 h IC₅₀ 为 1.4 mmol/L。青藤碱作用 HepG2 细胞后, 细胞均出现不同程度凋亡现象, 在高浓度下效果更明显。青藤碱能诱导肿瘤细胞发生凋亡, 使肿瘤细胞内 ROS 水平升高, 线粒体 MPTP 孔开放, 促使线粒体膜电位差降低。青藤碱干预后, HepG2 细胞中 caspase-9、Bax、Cyt-c、caspase-3 蛋白表达升高, Bcl-2 蛋白表达降低, 可触发肿瘤细胞凋亡程序。**结论** 青藤碱对 HepG2 细胞具有生长抑制作用, 可升高细胞活性氧水平, 氧化损伤线粒体, 破坏线粒体膜结构功能, 释放细胞凋亡因子, 最终启动肿瘤细胞凋亡程序。

关键词: 青藤碱; 人肝癌 HepG2 细胞; 线粒体损伤; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)01-0237-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.01.044

青风藤在古籍中的记载最早可以追溯到《本草汇言》等著作中, 具有治疗风湿性关节炎的作用^[1-3]。青风藤中含有青藤碱、异青藤碱、短青藤次碱、双青藤碱等成分, 其中青藤碱是其含量较高的活性生物碱, 具有抗肿瘤、局麻、抗炎、降血压等药理作用^[4-6], 其中抗肿瘤作用尤为显著。文献显示, 青藤碱对人胆管癌细胞^[7]、人脑胶质瘤细胞^[8]、人骨肉瘤细胞^[9]、乳腺癌细胞^[10]、人结肠癌细胞^[11]、人胃癌 MGC803 细胞^[12-13]、人肺癌 A549 细胞^[14]、人肝癌 HepG2 细胞^[15]、人宫颈癌 Hela 细胞^[16]、人前列腺癌细胞^[17]、大鼠膀胱癌细胞^[18]、小鼠 S180 腹水瘤细胞^[19]具有抗增殖抑制作用, 但由于青藤碱抗肿瘤作用研究起步较晚, 研究深度不够, 其作用机制尚未明确, 本课题组前期研究发现青藤碱的抗肿瘤作用可能与对肿瘤细胞内活性氧水平的调节有关, 因此本研究以此为切入点深入探究青藤碱的抗肿瘤作用机制, 以期青藤碱的进一步开发应用提供理论基础和实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌 HepG2 细胞株, 由哈尔滨商业大学药物工程技术研究中心提供。

1.2 试剂与药物 青藤碱 (批号 115-53-7, 纯度 98%, 上

海阿拉丁生化科技股份有限公司); caspase-9 抗体 (批号 AC062)、caspase-3 抗体 (批号 AC030)、MPTP 检测试剂盒 (批号 C2009S)、活性氧检测试剂盒 (批号 S0033S)、丹明 123 荧光探针 (批号 092317140109)、Bcl-2 抗体 (批号 052317181107)、Bax 抗体 (批号 041518181130)、Cytchrome C 抗体 (批号 052318181124) (上海碧云天生物技术有限公司)。

1.3 仪器 DL-CJ-1N 型超净工作台 (北京东联哈尔仪器制造有限公司); BD 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); ECO-170P-230 型细胞培养箱 (美国 NBS 公司); 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); 荧光显微镜 (德国 Leica 公司); GIS-2019 型 Tannon 凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率 取指数生长期细胞, 胰蛋白酶液消化收集, 将悬液细胞密度调至 3×10^4 /mL, 接种于 96 孔板中, 培养 24 h, 依次加入 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 mmol/L 青藤碱溶液 (100 μ L/孔), 阳性对照组加入相同体积 0.7 mmol/L 羟基喜树碱 (HCPT) 溶液, 阴性对照组加入相同体积不含血清的 RPMI-1640 培养基。

收稿日期: 2021-03-18

基金项目: 中国博士后面上项目 (2019M651296); 中央支持地方高校改革发展基金优秀青年人才项目 (2020YQ12); 黑龙江省自然科学基金优秀青年项目 (YQ2022H002); 研究生科研创新项目 (YJSCX2022-753HSD); 黑龙江省博士后科研启动项目 (LBH-Q20026); 哈尔滨商业大学青年创新人才项目 (18XN024, 2019CX37)

作者简介: 刘 斌 (1985—), 男, 硕士, 助理研究员, 从事抗肿瘤中药药理学研究。Tel: 15331941150

* 通信作者: 辛国松 (1984—), 男, 博士, 副研究员, 从事抗肿瘤中药药理学研究。E-mail: 13766801150@163.com

网络出版日期: 2022-01-20

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220119.1746.012.html>

每个浓度设 6 个平行孔，培养 72 h。在培养至 70 h 时，各组细胞中加入 CCK-8 试剂（10 μL/孔），继续培养 2 h，在 450 nm 波长处检测光密度（OD）值，避光操作，重复 3 次，计算细胞增殖抑制率。

2.2 倒置显微镜观察肿瘤细胞形态 取指数生长期细胞，胰蛋白酶液消化收集，将悬液细胞密度调至 3×10⁵/mL，接种于 6 孔板中，每孔 1 mL，置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h，分别加入 0.7、1.4、2.8 mmol/L 青藤碱溶液，阳性对照组加入相同体积 0.7 mmol/L 羟基喜树碱，阴性对照组加入相同体积培养液，继续培养 48 h 后，在倒置显微镜下观察细胞形态并拍照，每组至少采集 5 个视野的照片。

2.3 荧光显微镜观察细胞凋亡形态 按“2.2”项下方法对细胞进行处理和给药，培养 48 h 后收集细胞，加入固定液 [甲醇-冰醋酸（3：1）]，4 ℃ 固定 10 min，加入 5 mg/L Hoechst33258 荧光探针染色，置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 15 min，制成细胞悬液，将孔中盖玻片取出，取相应细胞悬液滴在涂有甘油的载玻片上，在荧光倒置显微镜下观察细胞形态并拍照，每组至少采集 5 个视野的照片，其中呈圆形皱缩状为凋亡细胞。

2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率 按“2.2”项下方法对细胞进行处理和给药，培养 48 h 后收集细胞，调整细胞密度至 1×10⁶/mL，70% 冷乙醇固定，4 ℃ 放置过夜（固定时间大于 12 h），检测前离心除去乙醇，PBS 洗涤 2 次，加 1 g/L 核糖核酸酶 A（RNase A）200 μL，37 ℃ 水浴孵育 30 min，加 800 μL PI 染液混匀，4 ℃ 避光染色 30 min，过 200 目尼龙网，上流式细胞仪检测（激发波长 488 nm），重复 3 次。

2.5 流式细胞仪检测活性氧（ROS）水平 按“2.2”项下方法对细胞进行处理和给药，培养 48 h 后收集细胞，加入 5 μmol/L DCFH-DA 染液 0.2 mL，室温染色 20 min，用培养基清洗 1 次（1 500 r/min 离心 10 min），过 200 目尼龙网，流式细胞仪进行检测（激发光波长为 488 nm），重复

3 次。

2.6 流式细胞仪检测线粒体膜通道转换孔活性 按“2.2”项下方法对细胞进行处理和给药，培养 48 h 后收集细胞，加入 500 μL Reagent A 染液混匀，1 000 r/min 离心 10 min，弃上清，避光加入染色工作液，37 ℃ 避光孵育 20 min，1 000 r/min 离心 10 min，弃上层清液，加入 500 μL 37 ℃ Reagent A 染液清洗细胞，再加入 500 μL 37 ℃ Reagent A 染液，将细胞吹打均匀，过 200 目尼龙网，流式细胞仪检测（激发波长 495 nm，发射波长 515 nm），重复 3 次。

2.7 流式细胞仪检测线粒体膜电位 按“2.2”项下方法对细胞进行处理和给药，培养 48 h 后无钙台式液洗涤 1 次，胰酶细胞消化液消化，收集细胞，加入 4 μg/mL 罗丹明 123 荧光探针 200 μL，37 ℃ 避光温育 30 min，流式细胞仪检测膜电位阳性表达率 [激发波长 488~505 nm，发射波长 515~575 nm（一般为 530 nm）]，重复 3 次。

2.8 Western blot 法检测 Bax、Bcl-2、caspase-3、caspase-9、Cyt-c 蛋白表达 按“2.2”项下方法对细胞进行处理和给药，培养 48 h 后收集细胞，PBS 洗涤 2 次，加入细胞裂解液，冰上孵育 30 min，将细胞从培养瓶瓶壁上缓慢吹打转移至 EP 管中，超声处理 30 min，4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min，分离上清，采用 BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白浓度进行定量，采用 SDS-PAGE 凝胶电泳，转膜，孵育一抗、二抗，免疫显色，以 β-actin 为内参，采用 Image J 软件分析印迹灰度值，计算目的蛋白相对表达。

2.9 统计学分析 通过 SPSS21.0 软件进行处理，数据以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，多样本均数比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 青藤碱对 HepG2 细胞增殖的影响 与阴性对照组比较，阳性对照组和不同浓度青藤碱组 HepG2 细胞增殖抑制率降低（ $P<0.01$ ），72 h IC₅₀ 为 1.4 mmol/L，见表 1。

表 1 青藤碱对 HepG2 细胞增殖的影响（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=6$ ）

组别	浓度/(mmol·L ⁻¹)	OD 值	抑制率/%
阴性对照组	—	0.984±0.019	—
阳性对照组	0.7	0.337±0.051 **	65.75
青藤碱组	0.2	0.883±0.027 **	17.15
青藤碱组	0.4	0.664±0.028 **	33.82
青藤碱组	0.8	0.502±0.042 **	42.62
青藤碱组	1.6	0.587±0.009 **	53.47
青藤碱组	3.2	0.313±0.011 **	66.92
青藤碱组	6.4	0.218±0.009 **	79.64

注：与阴性对照组比较，** $P<0.01$ 。

3.2 青藤碱对 HepG2 细胞形态的影响（倒置显微镜） 阴性对照组细胞轮廓清晰，细胞呈梭型、多角形，细胞形态比较饱满，排列紧密，贴壁生长；不同浓度青藤碱组细胞随着浓度增加，漂浮细胞逐渐增多，贴壁生长的细胞数量减少，细胞排列逐渐稀疏，其中 2.8 mmol/L 组出现皱缩变圆，见图 1。

3.3 青藤碱对 HepG2 细胞形态的影响（荧光显微镜） 阴性对照组细胞轮廓清晰，细胞核形状正常，呈圆形，染色均匀；不同浓度青藤碱组细胞随着浓度增加，细胞生长逐渐变稀疏，细胞碎裂现象逐渐变明显，细胞轮廓逐渐变模糊，细胞核固缩形成凋亡小体，发出较强荧光，并且逐渐增多，见图 2。

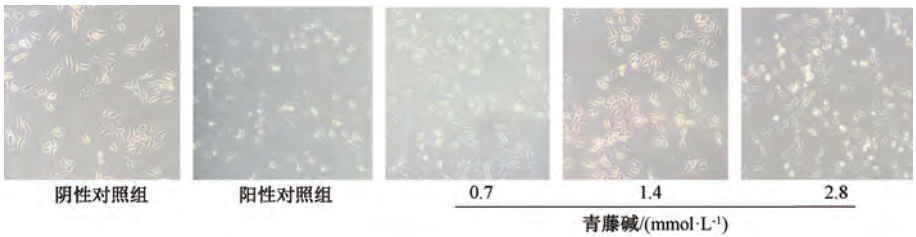


图 1 倒置显微镜下各组细胞形态 (×400)

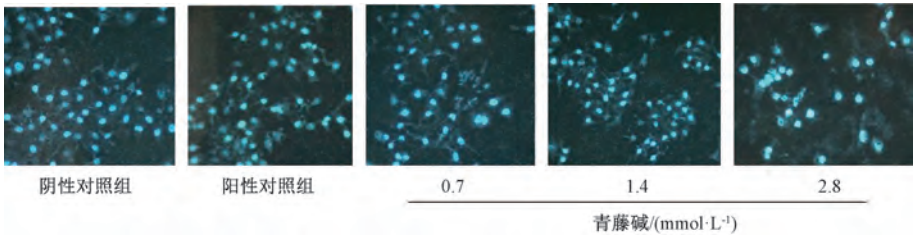
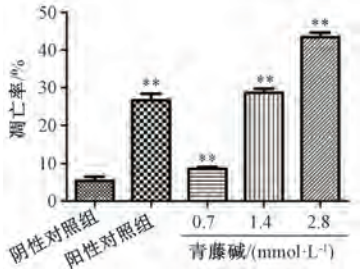


图 2 荧光显微镜下各组细胞形态 (×400)

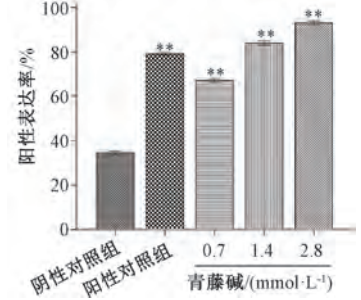
3.4 青藤碱对 HepG2 细胞凋亡的影响 与阴性对照组比较, 阳性对照组和不同浓度青藤碱组细胞凋亡率升高 ($P<0.01$), 且青藤碱组作用呈浓度依赖性, 见图 3。



注: 与阴性对照组比较, ** $P<0.01$ 。

图 3 各组细胞凋亡率 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.5 青藤碱对 HepG2 细胞 ROS 水平的影响 与阴性对照组比较, 阳性对照组和不同浓度青藤碱组细胞 ROS 水平升高 ($P<0.01$), 且青藤碱组作用呈浓度依赖性, 见图 4。

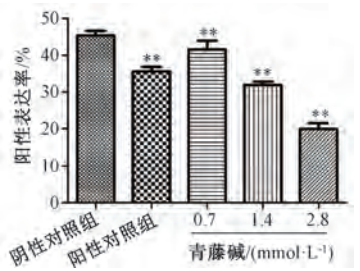


注: 与阴性对照组比较, ** $P<0.01$ 。

图 4 各组细胞 ROS 水平 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.6 青藤碱对 HepG2 细胞 MPTP 活性的影响 与阴性对照组比较, 阳性对照组和不同浓度青藤碱组细胞阳性表达率降低 ($P<0.01$), 即 MPTP 活性逐渐增强, 见图 5。

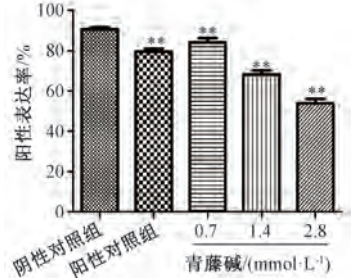
3.7 青藤碱对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响 与阴性对



注: 与阴性对照组比较, ** $P<0.01$ 。

图 5 各组细胞 MPTP 活性 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

照组比较, 阳性对照组和不同浓度青藤碱组细胞线粒体膜电位阳性表达率降低 ($P<0.01$), 即膜电位逐渐减弱, 见图 6。



注: 与阴性对照组比较, ** $P<0.01$ 。

图 6 各组细胞线粒体膜电位 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.8 青藤碱对 HepG2 细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 与阴性对照组比较, 阳性对照组和不同浓度青藤碱组 Bcl-2/Bax 比值降低 ($P<0.01$), 且青藤碱组作用呈浓度依赖性, 见图 7。

3.9 青藤碱对 HepG2 细胞 caspase-3、caspase-9、Cyt-c 蛋白表达影响 与阴性对照组比较, 阳性对照组和不同浓度青藤碱组细胞 caspase-3、caspase-9、Cyt-c 蛋白表达升高 ($P<0.01$), 且青藤碱组作用呈浓度依赖性, 见图 8。

4 讨论

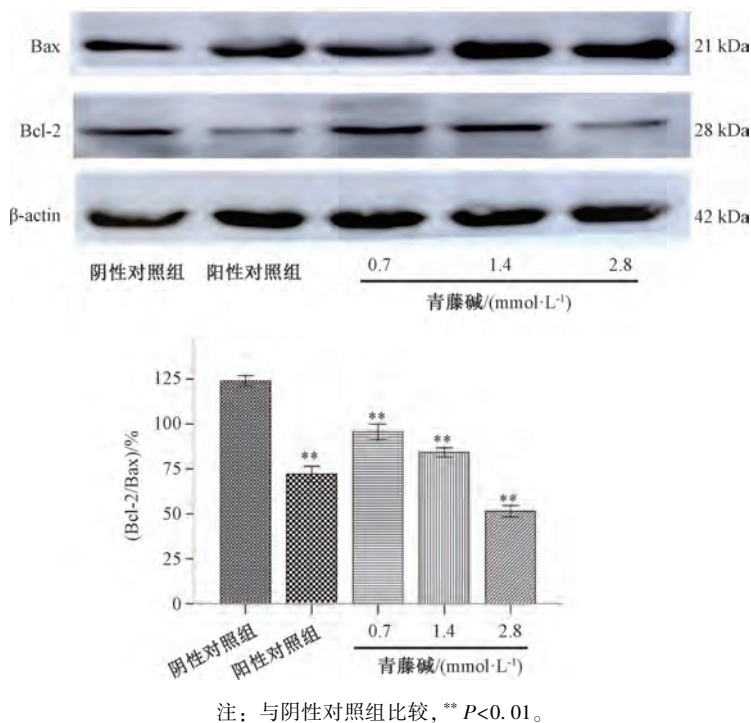


图 7 各组细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

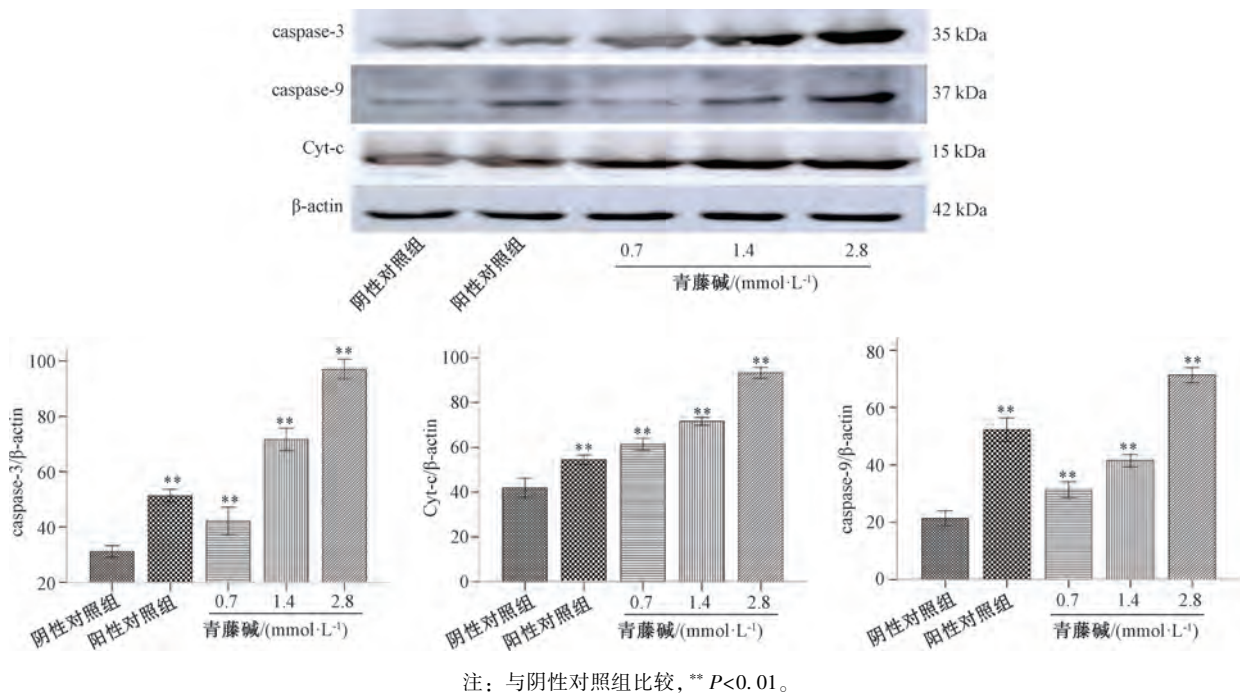


图 8 各组细胞 caspase-3、caspase-9、Cyt-c 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

青藤碱抗肿瘤作用良好，但由于其抗肿瘤作用发现较晚，研究深度不够，导致其机制仍未阐述清楚。本研究以青藤碱为研究对象，对青藤碱抗肿瘤机制进行了系统深入研究。研究发现青藤碱能够抑制 HepG2 细胞生长，并诱导肿瘤细胞发生凋亡，且细胞出现明显的凋亡形态，说明青藤碱对人肝癌 HepG2 细胞具有很好的抗肿瘤作用。此外，青藤碱能够升高肿瘤细胞内 ROS 水平，使线粒体发生氧化

损伤，促使线粒体膜 MPTP 孔开放^[20-21]，MPTP 孔开放直接导致线粒体膜电位差降低，线粒体膜通透性发生改变，破坏了膜内外离子均衡，导致细胞质向线粒体内流，线粒体体积发生膨胀，严重时线粒体外膜会发生破裂，释放膜内外间凋亡因子^[22-24]。本实验结果还发现，青藤碱能够升高促凋亡蛋白 Bcl-2、Cyt-c、caspase-9 蛋白表达，降低抑凋亡蛋白 Bax 表达，激活 caspase 家族蛋白级联反应，并最终

激活凋亡启动蛋白 caspase-3 蛋白，启动细胞凋亡程序，发挥青藤碱抗肿瘤作用。

参考文献：

[1] 宋万平,陈华国,周 欣. 苗药青风藤研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47(11): 946-953.

[2] 唐 琳,林 也,刘乐平,等. 青藤碱抗肿瘤作用与分子机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4): 175-185.

[3] Gao T L, Li T, Jiang W, *et al.* Antinociceptive effects of sinomenine combined with ligustrazine or paracetamol in animal models of incisional and inflammatory pain[J]. *Front Physiol*, 2021, 11: 523769.

[4] Gao L N, Zhong B, Wang Y. Mechanism underlying antitumor effects of sinomenine[J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(11): 873-878.

[5] Gao Z X, Lin Y C, Zhang P, *et al.* Sinomenine ameliorates intervertebral disc degeneration *via* inhibition of apoptosis and autophagy *in vitro* and *in vivo* [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(9): 5956-5966.

[6] 王文博,罗 灿,吴志皎,等. 青藤碱对 PKC- α /NF- κ B-p65 通路的抑制作用及机制[J]. 南京医科大学学报 (自然科学版), 2020, 40(11): 1583-1589; 1602.

[7] 吕彦霖,朱昌毫,潘耀振,等. 青藤碱对体外人胆管癌细胞的抑制作用[J]. 中成药, 2019, 41(11): 2601-2608.

[8] 姜宇懋. 青藤碱抑制人脑胶质瘤细胞增殖、侵袭和迁移的作用及机制研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2018.

[9] 谢 涛. 青藤碱通过 ROS 诱发内质网应激导致骨肉瘤凋亡并抑制骨肉瘤增殖、侵袭、转移 [D]. 杭州: 浙江大学, 2016.

[10] 张慧敏. 盐酸青藤碱诱导血管正常化抑制乳腺癌生长和转移的机制研究[D]. 西安: 西安交通大学, 2018.

[11] 杨海波,施 展,马艳春,等. 青藤碱对人结肠癌细胞株 SW480 增殖和细胞周期的影响[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(7): 72-75.

[12] 王 新,张 旭,李雅睿,等. 盐酸青藤碱通过线粒体凋亡途径诱导胃癌细胞死亡[J]. 西安交通大学学报 (医学

版), 2020, 41(6): 854-858; 866.

[13] 陈伟毅. 青藤碱对胃癌 MGC803 细胞增殖的抑制作用及机制探讨[D]. 衡阳: 南华大学, 2014.

[14] 薛佩妮. 青藤碱与顺铂对肺癌 A549 细胞增殖抑制及协同作用的研究[D]. 延安: 延安大学, 2012.

[15] 何晶晶. 青藤碱对人肝癌细胞 HepG2 侵袭和转移能力的影响[D]. 兰州: 兰州大学, 2012.

[16] 施荣东,田秀珠. 青藤碱联合顺铂对宫颈癌 Hela 细胞增殖作用的影响 [J]. 中国药物与临床, 2010, 10(10): 1117-1119.

[17] Xu F, Li Q, Wang Z Y, *et al.* Sinomenine inhibits proliferation, migration, invasion and promotes apoptosis of prostate cancer cells by regulation of miR-23a [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 9(112): 108592.

[18] 汤 敏. 青藤碱对大鼠膀胱癌的肿瘤免疫及细胞凋亡的影响[D]. 衡阳: 南华大学, 2020.

[19] 任 强. 青藤碱诱导 S180 腹水瘤细胞凋亡及其相关机制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2009.

[20] Drahota Z, Endlicher R, Kucera O, *et al.* Factors affecting the function of the mitochondrial membrane permeability transition pore and their role in evaluation of calcium retention capacity values[J]. *Physiol Res*, 2020, 69(3): 491-499.

[21] Ma X Q, Yu M X, Hao C X, *et al.* Shikonin induces tumor apoptosis in glioma cells *via* endoplasmic reticulum stress, and Bax/Bak mediated mitochondrial outer membrane permeability [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 263: 113059.

[22] Fang X M, Zhang X T, Li H X. Oxidative stress and mitochondrial membrane potential are involved in the cytotoxicity of perfluorododecanoic acid to neurons[J]. *Toxicol Ind Health*, 2020, 36(11): 892-897.

[23] Sugano E, Endo Y, Sugai A, *et al.* Geranylgeranyl acetone prevents glutamate-induced cell death in HT-22 cells by increasing mitochondrial membrane potential [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 883: 173193.

[24] 王春芳, 巩月红, 王建华, 等. 去氢骆驼蓬碱衍生物 DH-330 体外对细粒棘球蚴线粒体凋亡通路中 Cyt-C 和 Caspase-3 的影响 [J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(12): 1370-1374; 1385.