

秦皮乙素的制备及对人肝癌细胞 SMMC-7721 体外增殖的影响

王晶^a, 王洪新^b, 李红玉^{a*}, 吴国强^b (辽宁医学院 a. 药学院, b. 新药研究所, 辽宁 锦州 121000)

摘要: 目的 制备秦皮乙素并探讨其对入肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖的影响。方法 采用聚酰胺柱层析法分离纯化秦皮乙素, 采用薄层色谱法进行定性鉴别, 高效液相色谱法进行纯度检测。采用 MTT 比色法观察秦皮乙素对人肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖的影响。采用流式细胞仪分析秦皮乙素对 SMMC-7721 细胞周期及细胞凋亡的影响。结果 高效液相色谱法检测秦皮乙素的纯度为 95%。MTT 结果显示, IC_{50} 为 $2.24 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 并呈现时间-剂量依赖关系。流式细胞仪(FCM)检测表明, G2/M 期细胞的比例减少, S 期细胞的比例增加, 与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。结论 秦皮乙素可抑制人肝癌细胞株 SMMC-7721 的增殖, 阻滞于 S 期, 诱导肝癌细胞凋亡。

关键词: 秦皮乙素; 人肝癌细胞株 SMMC-7721; 细胞周期; 细胞凋亡

中图分类号: R284.2; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2009)06-0439-04

Prepare Esculetin and Study the Effect of Esculetin on Proliferation of Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line SMMC-7721 *in Vitro*

WANG Jing^a, WANG Hongxin^b, LI Hongyu^{a*}, WU Guoqiang^b (a. Faculty of Pharmacy, b. Department of New Drug Research, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare Esculetin and study the effect of Esculetin on proliferation of SMMC-7721 cell. **METHODS** Esculetin was isolated by polyamide chromatography. Esculetin was identified by TLC. The content of esculetin

作者简介: 王晶, 女, 硕士研究生 *通信作者: 李红玉, 女, 教授 Tel: 15004162307 E-mail: wangjing2006050@126.com

was tested by HPLC. MTT assay was adopted to evaluate cell proliferation. Distribution of cell cycle and apoptotic cell death were analyzed by flow cytometry. **RESULTS** The purity of Esculetin was 95% which was tested by HPLC. MTT assay showed that the inhibitory concentration 50% (IC₅₀) of Esculetin was 2.24 mmol·L⁻¹. Esculetin strongly inhibited growth of SMMC-7721 cell with dose-time dependent relationship. The result of FCM showed that G2/M phrase decreased and S phrase increased in SMMC-7721 cells with significant difference ($P<0.05$). **CONCLUSION** Esculetin could inhibit SMMC-7721 cell proliferation, disturb the cell cycle progression and induce apoptosis.

KEY WORDS: Esculetin; hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells; cell cycle; apoptosis

秦皮乙素是从植物秦皮中提取、分离出来的一种内酯类化合物^[1], 是秦皮的主要有效成分之一, 具有抗菌、消炎、镇痛等药理作用^[2]。近年研究显示, 秦皮乙素还具有抗肿瘤作用, 有报道显示秦皮乙素对胸部肿瘤及人类白血病细胞均具有明显抑制作用^[3-4], 但有关秦皮乙素对肝癌细胞的作用及机制的研究却罕见报道。为此本研究针对秦皮乙素对人肝癌细胞增殖、细胞周期及细胞凋亡作用的影响, 并初步探讨其抗肝癌的作用机制。

1 实验材料

1.1 细胞株

人肝癌细胞株 SMMC-7721 由辽宁医学院科学实验中心提供。

1.2 药物

秦皮由锦州奥鸿药业有限责任公司质量部照中国药典 2005 年版一部秦皮质量标准检验, 符合规定。秦皮乙素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110741-200506)。5-氟脲嘧啶(5-Fu)(江苏南通精华制药厂, 批号: 071217)。

1.3 试剂

四甲基偶氮唑蓝, 二甲基亚砷, 碘化丙啶 (Amresco 公司), 小牛血清(杭州四季清生物制品公司), Annexin V-FITC 凋亡试剂盒(北京宝赛生物公司), RPMI1640 培养基干粉(GIBCO 公司), 胰蛋白酶(Hyclone 公司)。

1.4 仪器

超净工作台(江苏吴县市净化技术研究所), 二氧化碳培养箱(Sheldon Manufacturing IncUSA), XD-101 型倒置显微镜 (OLYMPUS TOKYO JAPAN), TDL-4 型离心机(上海安亭科学仪器厂), 高纯水蒸馏器(江苏金坛中大仪器厂), 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司), 旋转蒸发器(上海亚荣仪器厂), 高效液相色谱仪(日本岛津 LC-20AT)流式细胞仪(美国 BD 公司), KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声波仪器公司), UV-5 型手提式紫外观测灯(北京亚力恩科学器材公司), 旋转蒸发器

RE52-05(上海亚荣生化仪器厂), 玻璃层析柱($\phi 45$ mm \times 600 mm), 硅胶板: GF254(青岛海洋化工厂)。

2 实验方法

2.1 秦皮乙素的制备

2.1.1 秦皮乙素的分离纯化 取秦皮药材粗粉 500 g, 根据作者已有实验 L₉(3⁴)正交试验, 筛选的最佳提取工艺。即加入 95%乙醇 6 倍量, 乙醇回流提取 3 次, 第 1 次 2 h, 第 2、3 次各 1 h, 合并提取液, 滤过, 减压回收乙醇, 浓缩至稠膏, 加水至 200 mL, 加热溶解, 趁热过滤, 取滤液 15 mL, 加入到聚酰胺柱上, 以蒸馏水洗脱, 流速 3.5 mL·min⁻¹, 以手提式紫外灯跟踪检测, 合并秦皮乙素收集液, 减压浓缩至 50 mL, 待析晶。

2.1.2 秦皮乙素的纯度检测 采用薄层色谱法进行定性鉴别, 采用高效液相色谱法进行纯度检测^[5]。

2.2 细胞培养

常规复苏, 传代, SMMC-7721 细胞用含 10% 小牛血清的 RPML-1640 培养基, 在 5%CO₂, 37 °C 细胞培养箱内常规培养。0.25%胰蛋白酶消化传代, 待细胞长至 80%融合时进行实验^[6]。

2.3 MTT 法检测

取对数生长期细胞, 以 RPMI 1640 培养液制成细胞悬液, 进行细胞计数, 调整细胞密度为 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。培养液悬浮后每孔 1×10^4 个接种在 96 孔板中($100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$), 5% CO₂ 饱和湿度 37 °C 培养。待 24 h 后实验组加入 RPML 1640 完全培养基稀释的秦皮乙素至终浓度分别为 0.28, 0.56, 1.12, 2.24, 4.48 mmol·L⁻¹, 每种浓度设 5 个平行孔。溶剂对照组加入与各剂量组对应的完全培养基, 每孔终体积为 200 μL , 分别培养 24, 48, 72 h, 于实验终止前 4 h 加入 MTT 储存液 20 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$, 继续孵育至实验终止, 吸弃上清, 每孔加入二甲基亚砷(DMSO)150 μL , 振荡 10 min 使结晶充分溶解后上酶标仪 490 nm 处测 A 值。抑制率 IR(%)=(1-实验组 A 值 / 对照孔 A 值) \times 100%。实验重复 3 次, 计算平均抑制率。

2.4 流式细胞仪分析细胞周期分布

将 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的肝癌细胞接种于 25 mL 培养瓶中常规培养 24 h, 取对数生长期细胞, 分实验组(秦皮乙素组: 终浓度为分别为 1.12, 2.24 和 4.48 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 阳性对照组(5-Fu $0.77 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)和空白对照组。48 h 后收集各组细胞, 以 PBS 洗涤, 用 70% 的冷乙醇在 4 °C 以下固定 24 h 以上, 离心弃去固定液, 3 mL PBS 重悬, 离心($800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)6 min, 弃去 PBS, 用 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PI(碘化丙啶)1 mL 染液染色, 4 °C 避光 30 min, 流式细胞仪分析细胞周期^[7]。

2.5 流式细胞仪分析细胞凋亡

细胞分组、处理及收集同“2.4”, 按试剂盒操作说明进行。采用 Annexin V~FITC 染色, 加入 10 μL AnnexinV-FITC 和 5 μL PI, 轻轻混匀, 在 1 h 内用流式细胞仪进行测定。所得数据经 Bioconsort 专用软件处理, 分析细胞凋亡率^[8]。

2.6 统计学处理

实验结果用 SPSS 13.0 统计分析软件处理, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

3 结果

表 1 不同浓度秦皮乙素作用不同时间 SMMC-7721 的 A 值和生长抑制率 IR

Tab 1 Effects of different concentration of Esculetin on the Value A and IR of SMMC-7721 in different time

分 组	浓度 / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h		48 h		72 h	
		A 值	IR/%	A 值	IR/%	A 值	IR/%
空白对照组	0	0.791 ± 0.05	0	0.825 ± 0.03	0	0.957 ± 0.01	0
秦皮乙素组	4.48	$0.395 \pm 0.00^{2)}$	50	$0.297 \pm 0.01^{2)}$	73	$0.067 \pm 0.00^{2)}$	93
	2.24	$0.467 \pm 0.01^{2)}$	41	$0.404 \pm 0.01^{2)}$	51	$0.230 \pm 0.01^{2)}$	76
	1.12	$0.538 \pm 0.01^{1)}$	32	$0.503 \pm 0.01^{1)}$	39	$0.335 \pm 0.01^{1)}$	65
	0.56	0.712 ± 0.01	10	$0.594 \pm 0.01^{1)}$	28	$0.574 \pm 0.02^{1)}$	40
	0.28	0.751 ± 0.01	7	0.709 ± 0.01	14	$0.766 \pm 0.01^{1)}$	20
5-Fu 对照组	0.77	$0.585 \pm 0.02^{1)}$	26	$0.544 \pm 0.01^{1)}$	34	$0.392 \pm 0.01^{1)}$	59

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

表 2 秦皮乙素对 SMMC-7721 细胞周期分布的影响(%)

Tab 2 Effects of Esculetin on the cell cycle of SMMC-7721(%)

分 组	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
空白对照组	47.930 ± 0.03	4.740 ± 0.02	47.330 ± 0.04
5-Fu $0.77 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	45.390 ± 0.07	8.590 ± 0.05	46.020 ± 0.09
秦皮乙素 $1.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	45.238 ± 0.23	8.660 ± 0.05	46.090 ± 0.15
秦皮乙素 $2.24 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	45.500 ± 0.52	$19.490 \pm 0.06^{2)}$	$35.010 \pm 0.49^{1)}$
秦皮乙素 $4.48 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	49.587 ± 0.02	$22.210 \pm 0.42^{2)}$	$28.342 \pm 0.26^{1)}$

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

3.1 秦皮乙素的纯度检测

采用薄层色谱法进行定性鉴别, 在 365 nm 紫外分析灯下检测, 秦皮乙素为兰色荧光斑点, Rf 值为 0.6。采用高效液相色谱法进行纯度检测, 经高效液相色谱法检测秦皮乙素的纯度为 95%。

3.2 秦皮乙素对细胞增殖的影响

不同浓度的秦皮乙素对 SMMC-7721 细胞的增殖均有抑制作用, 同一浓度不同时间组及同一时间不同浓度组之间差异均具有显著性 $P < 0.05$ 。且呈现时间-剂量依赖关系。结果见表 1。

3.3 秦皮乙素对细胞周期的影响

流式细胞仪细胞周期检测发现秦皮乙素(1.12, 2.24, 4.48 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)浓度组作用 SMMC-7721 细胞 48 h 后, G₂/M 期细胞的比例减少, S 期细胞的比例增加。与对照组相比差异显著($P < 0.05$), 结果见表 2。

3.4 秦皮乙素对凋亡的影响

秦皮乙素可以诱导 SMMC-7721 细胞发生凋亡, 也呈剂量依赖性。与对照组相比差异显著($P < 0.05$), 结果见表 3。

表3 秦皮乙素对 SMMC-7721 细胞作用的 AnnexIn-V 分析
Tab 3 Effects of Esculetin on the apoptosis of SMMC-7721 with AnnexIn-V analysis

组 别	凋亡率/%
空白对照组	1.02±0.014
5-Fu 0.77 mmol·L ⁻¹	10.885±0.123 ¹⁾
秦皮乙素 1.12 mmol·L ⁻¹	10.883±0.097 ¹⁾
秦皮乙素 2.24 mmol·L ⁻¹	18.662±0.087 ¹⁾
秦皮乙素 4.48 mmol·L ⁻¹	27.193±0.016 ¹⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾P<0.01

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.01

4 讨论

Chia-yihchu 等^[3]研究表明秦皮乙素对人类白血病细胞的生长有抑制作用, 秦皮乙素可促进人白血病 HL-60 细胞的凋亡。另有实验表明秦皮乙素可抑制人白血病 U937 细胞, 作用于细胞周期的 G₁ 期, 同时可抑制细胞周期蛋白。Noguchi 等^[4,9]研究了秦皮乙素对人类胸部癌细胞增长的抑制作用, 并初步探讨了抗肿瘤机制。主要机制为: 促进细胞色素 C 从线粒体中释放, 活化 caspass-9 诱导凋亡, 并且具有浓度和时间的依赖性。此外秦皮乙素是 caspass-3 的底物, 它可通过激活 caspass-3, 促使细胞凋亡。秦皮乙素作用 9 h 后, 可将 BCL-2 蛋白的表达减少至 58%, 秦皮乙素作用 24 h 后可剪切腺苷二磷酸核糖聚合酶(ADP-ribose)。

本实验结果表明, 秦皮乙素对人肝癌细胞有明显的抑制作用, MTT 法测定不同时间, 不同浓度秦皮乙素对肝癌细胞的增殖抑制作用。结果显示, 随着时间的增加及秦皮乙素浓度的增加, 肝癌细胞的存活率下降, 表现为时间、剂量依赖性, 与空白对照组比较有明显差异。

细胞凋亡与肿瘤的关系备受重视。正常细胞通过增生和凋亡来维持自身稳定, 若两者失衡, 则可导致肿瘤发生。恶性肿瘤的无限增殖与细胞增殖周期的失控有关^[10]。流式细胞术是细胞周期研究中常用的手段, 具有速度快, 精确度高, 准确性好的特点。是目前最先进的细胞定量分析技术。采用流式细胞仪对细胞周期进行分析, 表明秦皮乙素可以干扰肝癌细胞细胞周期的正常移行, 使细胞在 S 期的数目增加, G₂/M 期的数目减少, 将细胞阻滞于 S 期, 并且呈剂量依赖性, 造成大量的 S 细胞

堆积, 使其不能进入 G₂/M 期, 最终使癌细胞的体外增殖受到抑制^[11]。细胞的 DNA 在 S 期进行解旋、复制, 大量细胞堆积于 S 期, 使药物作用于 DNA 的位点增加, 易于引起基因型的改变, 从而影响细胞的代谢和功能^[12]。可见秦皮乙素具有抑制肝癌细胞生长的作用, 但其抗肝癌活性及作用机制均有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] WEI X L, YANG C H, LIANG J Y. Constituents of the barks of *Fraxinus chinensis* Roxb [J]. *Chin J Nat Med*(中国天然药物), 2005, 3(4): 228-230.
- [2] JIANG G X, YANG Y P. The progress of the barks of *Fraxinus* [J]. *World Phytomedicines*, 2007, 22(3): 108-111.
- [3] CHU C Y, TSAI Y Y, WANG C J, et al. Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 416: 25-32.
- [4] WANG C J, HSIEH Y J, CHU C Y, et al. Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esculetin [J]. *Cancer Lett*, 2002, 183: 163-168.
- [5] ZHANG F H, LI C, TIAN Q X. Quantitative determination of esculetine in dinglian tablets by RP-HPLC [J]. *J Chin Pharm*(中国药房), 2007, 18(3): 2602.
- [6] SITU Z Q, WU J Z. Cell culture(细胞培养技术) [M]. Xian: Xian Science and Technology Press, 2004: 26-38.
- [7] HUANGFU C S, MA Y C, FANG N. Effects of matrine on cell cycle and apoptosis of liver cancer SMMC-7721 cell line [J]. *J Henan Univ: Med Sci* (河南大学学报: 医学科学版), 2007, 26(3): 17-19.
- [8] CHAU R M W, CHAN S S W, LI M F, et al. Cell cycle and apoptosis [J]. *Prog Physiol Sci* (生理科学进展), 1996, 27(4): 319.
- [9] NOGUCHI M, EARASHI M, MINAMI M, et al. Effects of piroxicam and esculetin on the MDA-MB-231 human breast cancer cell line [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1995, 53: 325-329.
- [10] HARADA K, BANDO T, YOSHIDA H, et al. Characteristics of antitumour activity of cepharanthin against a human adenosquamous cell carcinoma cell line [J]. *Oral Oncol*, 2001, 37(8): 643-651.
- [11] REN M J, ZUO G Q. Effect of silibinin on proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 in vitro [J]. *J Mod Oncol* (现代肿瘤医学), 2007, 15(9): 1229-1231.
- [12] ZHANG C, LI B, HUANG X Q, et al. Inhibition of Melittin on Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cell Line BEL-7402 [J]. *J Zhejiang Univ Tradit Chin Med* (浙江中医药大学学报), 2007, 31 (5): 560-564.

收稿日期: 2008-08-20