

柠檬酚对人肝癌 HepG₂ 细胞增殖的影响

刘 瑛, 陆国寿*, 卢文杰, 王 丽, 黄周锋

广西中药质量标准研究重点实验室 广西壮族自治区中医药研究院, 南宁 530022

摘要: 为了探讨柠檬酚对人肝癌 HepG₂ 细胞增殖的影响, 本文利用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法、细胞生长曲线以及细胞克隆形成实验检测了柠檬酚对细胞生长和克隆形成的影响, 并应用 HE、吖啶橙染色、流式细胞术以及激光扫描共聚焦显微镜分别观察和检测了不同浓度柠檬酚作用后细胞形态、细胞周期和细胞骨架蛋白 F-actin 的变化。结果显示, 柠檬酚能明显抑制人 HepG₂ 细胞生长, 且呈浓度依赖性, 其 IC₅₀ 值为 79.14 μmol/L, 柠檬酚给药组细胞克隆率明显明显低于空白对照组; 不同浓度的柠檬酚在作用 HepG₂ 细胞 24h 后, 细胞均出现了明显的皱缩、胞浆空泡化和细胞核固缩的形态学改变; 同时, 70 μmol/L 和 80 μmol/L 的柠檬酚处理组 G2/M 期细胞比例显著高于对照组 (22.72 ± 1.07, 28.68 ± 1.36 vs 16.34 ± 0.66, *P* < 0.01); 而共聚焦显微镜观察发现, 柠檬酚能引起 HepG₂ 细胞骨架蛋白 F-actin 的解聚和断裂。综上, 推测柠檬酚可能是通过破坏细胞的 Actin 骨架, 阻止细胞有丝分裂, 细胞周期阻滞在 G2/M 期, 从而抑制人肝癌 HepG₂ 细胞的增殖。

关键词: 柠檬酚; HepG₂ 细胞; 增殖抑制; 细胞周期; 细胞骨架蛋白

中图分类号: R963

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.1.026

Effect of Citrusinol on Proliferation of Human Hepatocellular Carcinoma Cells HepG₂

LIU Ying, LU Guo-shou*, LU Wen-jie, WANG Li, HUANG Zhou-feng

Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning 530022, China

Abstract: In order to study the effect of citrusinol on human hepatocellular carcinoma cells HepG₂, tetrazolium salt colorimetry assay (MTT), cell growth curve and colony formation assay was used to detect the proliferation and colony formation. The morphology of cells was observed by HE staining and Acridine orange staining. Cell cycle changes were detected by Flow Cytometry (FCM). The morphological changes of cytoskeletal protein F-actin were observed by laser confocal microscopy. The results showed that citrusinol inhibited HepG₂ cells proliferation and colony formation in a dose-dependent manner. IC₅₀ of citrusinol was 79.14 μmol/L after 24 hours. The morphology of HepG₂ cells was changed, showing cell shrinkage, cytoplasm vacuoles and nuclear chromatin pyknosis. The percentage of G2/M phase of HepG₂ cells treated with 70, 80 μmol/L citrusinol was significantly higher than that of the control group (22.72 ± 1.07, 28.68 ± 1.36 vs 16.34 ± 0.66, *P* < 0.01). F-actin cytoskeletal protein was showed from polymerization to depolymerization after citrusinol treatment. Based on the experimental results, it was concluded that citrusinol can prevent cell mitosis to arrest the cell cycle in G2/M phase, by disrupting Actin cytoskeleton, which may be one of the mechanisms of citrusinol's anti-tumor effect.

Key words: citrusinol; HepG₂ cell; antiproliferation; cell cycle; cytoskeletal protein

广西是我国肝癌最高发的几个省市地区之一, 作为广西的常见病和多发病, 肝癌占广西恶性肿瘤

死亡率的 40.04%, 严重威胁着人民群众的健康和生命安全^[1]。目前临床上肝癌的治疗是手术配合化疗^[2], 但传统的化疗药物多为细胞毒性药物, 存在着毒副作用大、耐药性强、效果不佳、价格昂贵的弊端, 极大的限制了其应用。近年来的实践表明, 天然植物来源的抗肿瘤药物有其独特的优势, 机制独特、毒副作用低且疗效显著, 已经日益受到国内外医

收稿日期: 2016-04-15 接受日期: 2016-12-23

基金项目: 广西自然科学基金 (2012GXNSFAA053175); 广西科技研究与开发项目重大专项计划 (桂科重 135500148); 广西中药质量标准研究重点实验室主任基金 (桂中重科 201101)

* 通讯作者 Tel: 86-771-5868986; E-mail: luguoshou@foxmail.com

学界的关注^[3,4]。

柠檬酚(Citrusinol)是从广西壮、瑶药材小槐花中分离得到的活性成分之一^[5],属于黄酮类化合物。研究报道,黄酮类化合物具有良好的抗肿瘤活性^[6],但针对柠檬酚的抗肝癌作用还未见报道。为了填补该研究空白,本实验建立人肝癌 HepG₂ 细胞体外模型,初步观察柠檬酚对 HepG₂ 细胞生长、增殖的影响及相关生物学指标的变化,探索其抗肝癌作用及机制,为其进一步深入开发利用提供有力的实验依据和理论支持。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人肝癌细胞株 HepG₂, 购于湘雅医学院细胞库。

1.2 药物及试剂

柠檬酚由广西中医药研究院化学所陆国寿分离获得,黄色结晶,用 DMSO 溶解成 10 μmol/mL 储备液,过滤除菌,实验时用 DMEM 培养基稀释;DMEM 高糖培养基,博士德公司;胎牛血清、二甲基亚砷(DMSO),Giobco 公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT),biotopped 公司;HE 染色试剂盒、吖啶橙染色试剂盒,碧云天生物技术研究;细胞周期检测试剂盒,联科公司;4% 多聚甲醛、Triton X-100,成都科龙化工试剂厂;ActinGreen 488 Reddypromes reagent 染液、DAPI 染液,life 公司;抗荧光淬灭封片剂,碧云天生物技术研究。

1.3 仪器

二氧化碳培养箱,Thermo,美国;全波长酶标仪,Thermo,美国;EVOS FL Auto 荧光显微镜,Life,美国;流式细胞仪,BD,美国;高速常温离心机,Eppendorf,德国;激光共聚焦扫描显微镜,Nikon A1,日本。

1.4 方法

1.4.1 HepG₂ 细胞的培养

细胞于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中,以含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基在培养瓶内常规单层传代培养,取对数生长期的细胞进行实验。

1.4.2 MTT 法检测细胞增殖抑制率

细胞消化计数,10⁵ 个/孔接种于 96 孔板,贴壁生长 24 h。加入不同浓度的柠檬酚:100、90、80、60、50 μmol/L,每个浓度平行 4 孔,空白对照组加入等体积的 DMEM 培养基,溶剂对照组加入相应浓度的 DMSO 溶液,作用 24 h。每孔加入 20 μL MTT(5 g/L)溶液,培养箱中孵育 4 h,弃上清,每孔加入 100

μL DMSO,溶解结晶,酶标仪 490 nm 检测吸光度 OD 值,按公式计算抑制率和 IC₅₀。

增殖抑制率 = 1 - (实验组 OD 值/对照组 OD 值) × 100%

1.4.3 细胞生长曲线检测细胞增殖

细胞消化计数,10⁴ 个/孔接种于 24 孔板,参考方法 1.4.2,采用 MTT 法,分别检测空白对照组、实验组(柠檬酚 60、80 μmol/L)换液培养 24、48、72、96h 后细胞存活率,绘制细胞的生长曲线。

细胞存活率 = 实验组 OD 值/对照组 OD 值 × 100%

1.4.4 细胞克隆形成实验

细胞消化计数,10³ 个/孔接种于培养瓶中,设置空白对照组和实验组(柠檬酚 60、80 μmol/L),实验组柠檬酚作用 24 h 后更换培养基,37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中静置培养 14 d,每日观察,至出现肉眼可见克隆时,终止培养,弃去培养基,PBS 清洗,甲醇固定 15 min,吉姆萨染液染色 40 min,流水冲洗,晾干,于显微镜下观察并计数细胞数大于 50 的克隆数。

1.4.5 HE、吖啶橙染色观察细胞形态

消化细胞,5 × 10⁵ 个/孔爬片,贴壁 24 h 后加入不同浓度的柠檬酚作用 24 h。

HE 染色:弃上清,95% 乙醇固定 20 min,PBS 清洗 2 次。取出盖玻片,苏木素染色 5 min,伊红染色 2 min,甘油封片,显微镜下观察。

吖啶橙染色:弃上清,95% 乙醇固定 20 min,取出盖玻片,1% 醋酸作用 30 s,0.02% 吖啶橙染色 1 min,CaCl₂ 作用 2 min,PBS 漂洗,甘油封片,荧光显微镜下观察。

1.4.6 流式细胞术(FCM)检测细胞周期

不同浓度柠檬酚作用 24 h 后收集细胞,1300 rpm 离心 5 min,弃上清,加入 1 mL PBS 重悬洗涤细胞,1300 rpm 离心 5 min,弃上清,重复洗涤 1 次,弃上清,加入预冷的 75% 乙醇 4 °C 固定过夜。1300 rpm 离心 15 min 弃去固定液,加入 1 mL PBS 洗涤 1 次,1300 rpm 离心 20 min,弃上清,留 100 μL PBS 重悬细胞,加入 10 μL RNaseA 酶(10 mg/mL),37 °C 水浴 30 min,加入 300 μL PI 染色,4 °C 染核 30 min,过筛网,流式细胞仪检测细胞周期。

1.4.7 免疫荧光法检测细胞骨架蛋白

取对数生长期的细胞 10⁶ 个接种于共聚焦专用培养皿中,贴壁 24 h。加入不同浓度的柠檬酚作用

24 h。4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 清洗, 0.2% Triton X-100 透化 15 min, PBS 清洗, 封闭 30 min, PBS 清洗, ActinGreen 488 Reddypromes reagent 20 ~ 25 °C 孵育 30 min, PBS 清洗, DAPI 避光孵育 5 min, PBS 清洗, 抗荧光淬灭封片剂封片。激光共聚焦扫描显微镜采用完美对焦系统动态双向扫描模式, 选择激发波长 488 nm 发射波长 530 nm, 激光功率 9.0 mW, 光电倍增管电压 110 V 条件下摄图。

2 实验结果

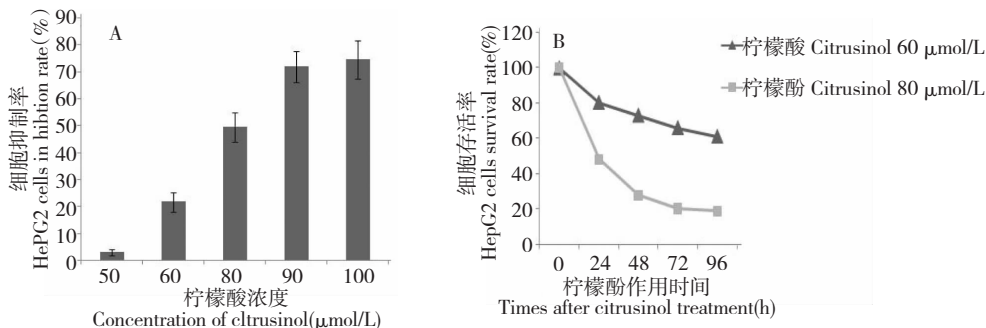


图 1 柠檬酚对 HepG₂ 细胞生长的影响

Fig. 1 Effect of citrusinol on the proliferation of HepG₂ cell

2.2 柠檬酚对 HepG₂ 细胞克隆形成能力的影响

柠檬酚作用 HepG₂ 细胞后, 细胞的克隆形成能力较空白对照组明显受到抑制, 抑制作用呈剂量依

2.1 柠檬酚对 HepG₂ 细胞生长的影响

MTT 检测结果显示, 柠檬酚作用细胞 24 h, 在 50 ~ 100 μmol/L 浓度范围内对 HepG₂ 细胞的增殖有抑制作用, 抑制率随着柠檬酚浓度的增加而增强, 呈现剂量依赖性, 见图 1A。柠檬酚作用于 HepG₂ 细胞 24 h 的 IC₅₀ 值为 79.14 μmol/L。绘制细胞生长曲线, 如图 1B, 随着培养时间的延长, 添加了柠檬酚的培养液培养的 HepG₂ 细胞存活率逐渐降低, 浓度越高, 存活率降低的速度越快。

赖性, 见图 2A, GIEMSA 染色后计数克隆并统计分析, >50 个细胞的克隆数目显著降低 ($P < 0.05$), 见图 2B, 表明柠檬酚可抑制 HepG₂ 细胞的克隆形成能力。

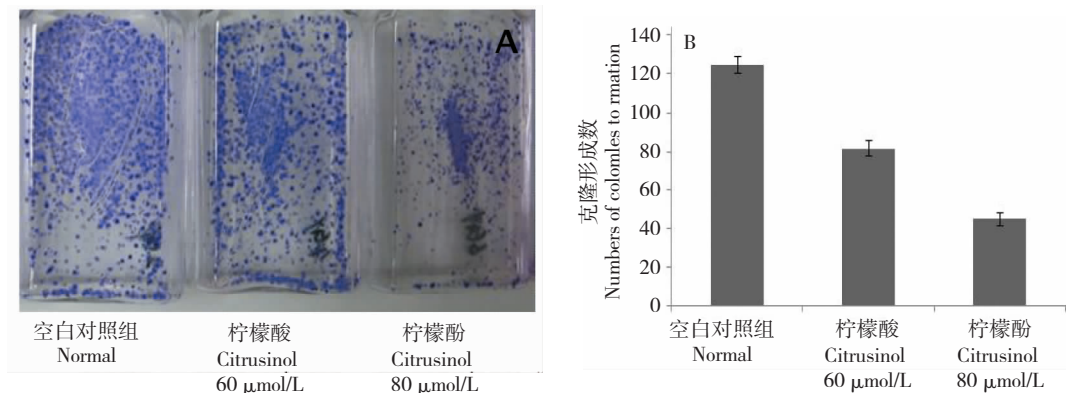


图 2 柠檬酚对 HepG₂ 细胞克隆形成的影响

Fig. 2 Effect of citrusinol on the colonies formation of HepG₂ cell

2.3 柠檬酚对 HepG₂ 细胞形态学的影响

HE 染色显示, 空白对照组细胞呈不规则梭形, 胞浆丰富, 核分裂像明显。柠檬酚作用 HepG₂ 细胞 24 h 后细胞数量明显减少, 胞体呈细长型, 胞浆减少, 胞浆内有较多空泡, 可见明显细胞核固缩。见图 3。

吖啶橙荧光染色显示, 空白对照组细胞胞膜完整光滑, 胞浆丰富, 细胞核形态饱满, 呈均匀绿染。柠檬酚作用 HepG₂ 细胞 24 h 后细胞数量减少, 胞膜皱缩, 染色质浓集, 荧光明明显增强。见图 4。

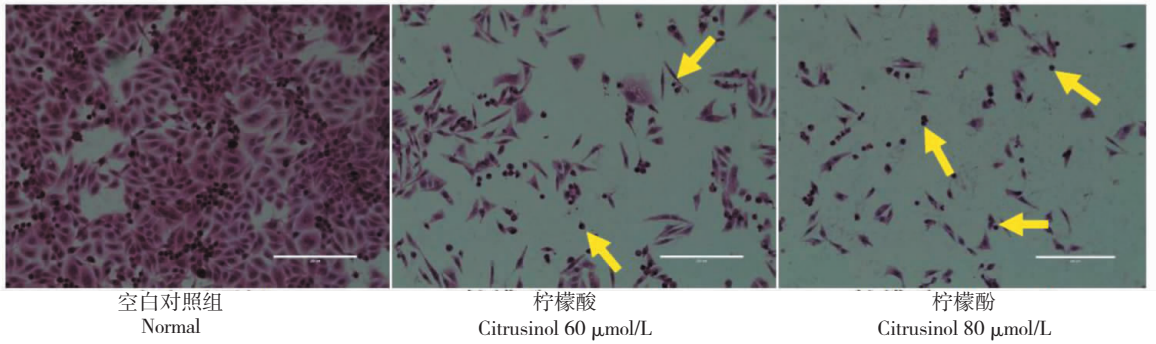


图3 柠檬酚对 HepG₂ 细胞形态的影响(HE × 100)

Fig. 3 Effect of citrusinol on morphology of HepG₂ cells by HE staining, 100 ×

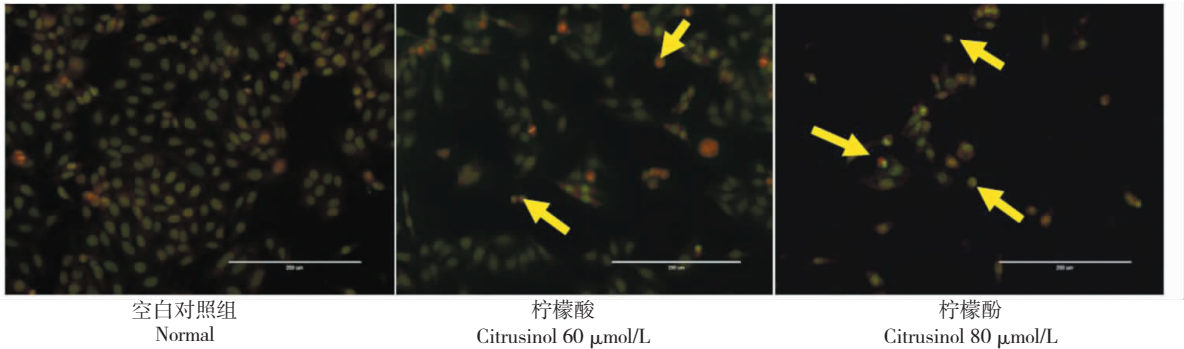


图4 柠檬酚对 HepG₂ 细胞形态的影响(吖啶橙 × 100)

Fig. 4 Effect of citrusinol on morphology of HepG₂ cells by acridine orange staining, 100 ×

2.4 柠檬酚对 HepG₂ 细胞周期的影响

柠檬酚作用 HepG₂ 细胞 24 h 使细胞周期发生改变,其中 G₂/M 期细胞比例增多,组间差异有统计

学意义($P < 0.05$),见表 1、图 5。细胞周期阻滞作用随着药物浓度的增加而增强。

表 1 柠檬酚对 HepG₂ 细胞周期的影响

Table 1 Effect of citrusinol on cell cycle of HepG₂ cells

分组 Group	G ₀ / G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)
空白对照组 Normal	63.21 ± 3.24	20.45 ± 1.22	16.34 ± 0.66
柠檬酚 Citrusinol 60 μmol/L	66.69 ± 3.18	15.82 ± 0.96	17.49 ± 1.24
柠檬酚 Citrusinol 70 μmol/L	66.97 ± 4.35	10.30 ± 0.81	22.72 ± 1.07 * *
柠檬酚 Citrusinol 80 μmol/L	49.26 ± 2.14 * *	22.06 ± 2.17	28.68 ± 1.36 * *

注:与空白对照组比较, * * $P < 0.01$
Note: Compare with control, * * $P < 0.01$

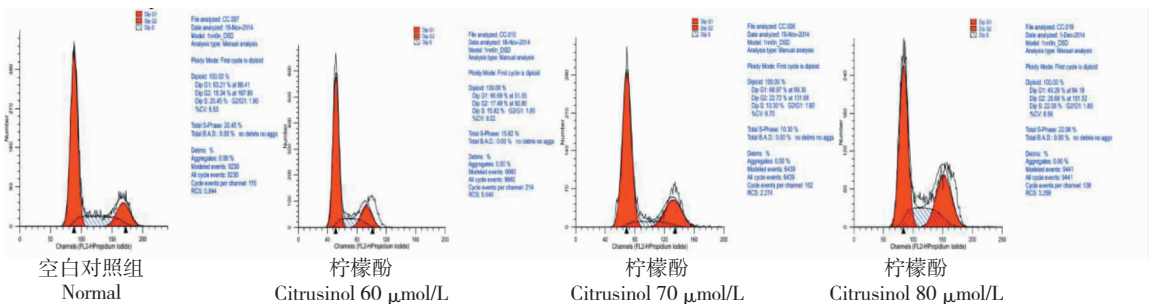


图5 柠檬酚阻滞 HepG₂ 细胞周期的作用

Fig. 5 Effect of citrusinol on cell cycle of HepG₂ cells

2.5 柠檬酚对 HepG₂ 细胞骨架蛋白 F-actin 的影响

Actingreen 488 能和细胞内的纤维肌动蛋白 F-actin 特异性结合,与 FITC 偶联呈绿色荧光,主要分布在细胞膜和细胞质内。激光共聚焦扫描显微镜下观察,空白对照组 HepG₂ 细胞胞质内可见清晰的细胞骨架结构,F-actin 纤维蛋白呈长条细丝状,从胞

核到胞膜放射状排列,呈均匀的绿色荧光。柠檬酚作用 24 h 后,细胞缩小变细长,胞质减少,F-actin 纤维蛋白丝状结构断裂,排列紊乱,破损的 F-actin 纤维断裂端呈堆积状,导致绿色荧光强弱不均,胞浆可见明显空泡化改变。见图 6。

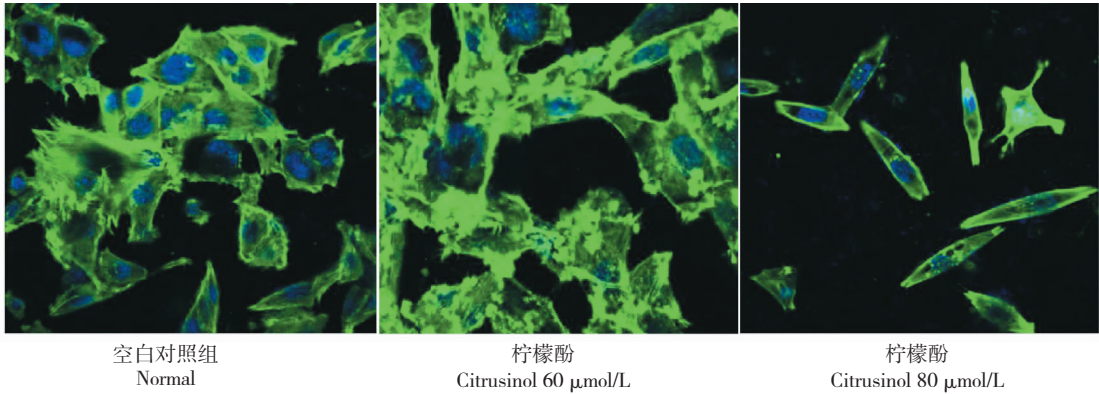


图 6 柠檬酚对 HepG₂ 细胞骨架蛋白 F-actin 的影响

Fig. 6 Effect of citrinsinol on cytoskeletal protein F-actin of HepG₂ cells

3 讨论与结论

本实验以人肝癌 HepG₂ 细胞为体外模型,采用多种实验方法观察中药单体柠檬酚对肿瘤细胞的影响。结果显示,柠檬酚可以显著抑制肝癌 HepG₂ 细胞的生长和克隆形成能力,并呈剂量依赖性;进一步观察柠檬酚对细胞形态的影响,发现给药组细胞有典型的胞体细长缩小、胞浆空泡和胞核固缩现象;流式细胞仪检测结果显示,柠檬酚可将 HepG₂ 细胞阻滞于 G₂/M 期,且随着柠檬酚剂量的提高,G₂/M 期细胞所占比例也随之升高。这一系列实验结果表明柠檬酚可以通过诱导细胞周期阻滞从而抑制人肝癌 HepG₂ 细胞的增殖。

细胞可因周期阻滞而发生有丝分裂灾难^[7],最终导致细胞凋亡,这是目前研究化疗药抗肿瘤作用机制的热点之一^[8]。细胞骨架系统是细胞质内的一种纤维状蛋白基质,包括微管、微丝和中间纤维。微丝是其中最细的,主要由 actin 组成,以游离球状 actin(G-actin)和聚合纤维状 actin(F-actin)两种形式存在。有研究已证实,细胞周期进入分裂期的胞质分裂与 F-actin 有密切联系,破坏细胞内 F-actin 形成,改变细胞内微丝的形态结构,可使细胞分裂发生滞留,进而影响细胞周期,由此可产生抑癌或抗癌的作用^[9,10]。

为探究柠檬酚是否通过破坏人肝癌 HepG₂ 细胞微丝结构,从而影响细胞周期,本实验采用免疫荧光染色技术对细胞中骨架蛋白 F-actin 进行染色。染色后观察到正常 HepG₂ 细胞内细丝状的 F-actin 细胞骨架,结构完整,染色均匀,处于分裂期的细胞还可见明显的放射状微丝结构。而实验组随着柠檬酚浓度的升高,细丝状的 F-actin 发生解聚,断裂的 F-actin 不规则的弥漫堆积在细胞内,导致染色深浅不一。由此可推测,柠檬酚可能通过解聚人肝癌 HepG₂ 细胞 F-actin 骨架,阻止细胞有丝分裂,将细胞周期阻滞在 G₂/M 期,从而抑制细胞增殖,是其抗肿瘤机制之一。

本实验首次从细胞骨架蛋白和细胞周期阻滞方面探索了柠檬酚抑制肝癌细胞增殖的机制,为柠檬酚的进一步深入开发和应用提供了可靠的理论基础和实验依据。

参考文献

- 1 Lafaro KJ, Demirjian AN, Pawlik TM. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am*, 2015, 24(1): 1-17.
- 2 Huppert P. Current concepts in transarterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma. *Abdom Imaging*, 2011, 36: 677-683.
- 3 Robles-Fernandez I, Rodriguez-Serrano F, Alvarez PJ, et al.

- Antitumor properties of natural compounds and related molecules. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2013, 8:203-215.
- 4 Qi FH(齐芳华), Li AY(李安源), Zhao L(赵琳), *et al.* Apoptosis-inducing effect of cinobufacini on human hepatoma cell line HepG2 and its mechanism of action. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2010, 45:318-323.
- 5 Lu WJ(卢文杰), Lu GS(陆国寿), Tan X(谭晓), *et al.* Chemical constituents of *Desmodium caudatum*. *J Chin Med Mater*(中药材), 2013, 36:1953-1956.
- 6 Kesarkar S, Bhandage AK, Deshmukh S, *et al.* Flavonoids: an overview. *J Pharm Res*, 2009, 2:1148-1154.
- 7 Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ*, 2008, 15: 1153-1162.
- 8 Mansilla S, Bataller M, Portugal J. Mitotic catastrophe as a consequence of chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem*, 2006, 6:589-602.
- 9 Shih JY, Lee YC, Yang SC, *et al.* Collapsin response mediator protein-1: a novel invasion-suppressor gene. *Clin Exp Metastasis*. 2003, 20(1):69-76.
- 10 Shen ZZ(沈志忠), Lin ZX(林志雄), Li MH(李曼红), *et al.* The effects of arsenic trioxide on the cell cycle and microfilament cytoskeleton in human nasopharyngeal carcinoma cell line. *Chin Arch Otolaryngol-Head Neck Surgery*(中国鼻咽癌喉头颈外科杂志), 2006, 13(1):9-12.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委(以姓氏笔划为序)

Members

丁克	王红兵	戈惠明	尹文兵	尹胜	吕兆林
DING Ke	WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LV Zhaolin
伍婉卿	刘相国	孙昊鹏	孙桂波	孙黔云	李芸霞
WU Wanqing	LIU Xiangguo	SUN Haopeng	SUN Guibo	SUN Qianyun	LI Yunxia
李良成	李国友	邱莉	汪海波	沐万孟	张炳火
LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo	MU Wanmeng	ZHANG Binghuo
陈益华	林茂祥	林昌俊	欧阳杰	易华西	罗应刚
CHEN Yihua	LIN Maoxiang	LIN Changjun	OU Yangjie	YI Huaxi	LUO Yinggang
周文	胡友财	袁涛	夏永刚	高慧敏	唐金山
ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang	GAO Huimin	TANG Jinshan
黄胜雄	韩淑燕	蓝蔚青	廖晨钟	潘卫东	薛永波
HUANG Shengxiong	HAN Shuyan	LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	PAN Weidong	XUE Yongbo