

紫杉醇对肝癌细胞 HEPG2 的抑制作用初探

袁程昱¹, 刘远河², 柴小翠², 康薇^{2,3,*}¹湖北大学化学与化工学院, 武汉 430062; ²矿区环境污染控制与修复湖北省重点实验室; ³湖北理工学院环境科学与工程学院, 黄石 435003

摘要: 紫杉醇是红豆杉属植物产生的一种次生代谢产物, 由于紫杉醇对多种疾病具有较好的疗效, 成为国内外研究的热点。为了探讨紫杉醇对肝癌细胞 HEPG2 的毒力, 本实验采用溶剂浸提法从红豆杉叶片中提取紫杉醇, 提取物中紫杉醇浓度可达 1.436 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。经红外光谱证实, 红豆杉提取物中的主要成分为紫杉醇。紫杉醇含量为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 肝癌细胞 HEPG2 的相对死亡率最高, 达到 37.80%。经红豆杉叶片提取物处理的肝癌细胞 HEPG2, 培养至 24 h, 细胞开始变圆, 膨大, 分布松散, 细胞褶皱, 漂浮; 培养至 48 h, 可明显观察到细胞坏死和碎片状, 表现出较强的抑制作用。实验结果显示, 红豆杉叶片提取物在治疗肝癌细胞 HEPG2 的药物开发方面具有研究的潜力。

关键词: 红豆杉; 紫杉醇; 肝癌细胞 HEPG2; 毒力测定

中图分类号: R113

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.038

Inhibitory Effect of Paclitaxel to the Liver Cancer Cell HEPG2

YUAN Cheng-yu¹, LIU Yuan-he², CAI Xiao-cui², KANG Wei^{2,3,*}¹School of Chemistry and Chemical Engineering, Hubei University, Wuhan 430062, China;²Hubei Provincial Key Laboratory of Mining Area Environmental Pollution Control and Remediation, Hubei Polytechnic University, Huangshi 435003, China; ³School of Environmental Science and Engineering, Hubei Polytechnic University, Huangshi 435003, China

Abstract: Paclitaxel is a secondary metabolite produced by plants of the genus *taxuschinensis*, has good curative effect for a variety of disease, which makes it become a hot spot in domestic and abroad. It is extracted from *Taxus Linn* leaves by the solvent-extraction method to explore the poisonous force of paclitaxel on liver cancer cell HEPG2, the content of paclitaxel in extractive is 1.436 $\mu\text{g}/\text{mg}$. The main composition of *taxuschinensis* extract is paclitaxel, which has been confirmed by HTIR. When the concentration of paclitaxel is 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ the relative death rates of HEPG2 cells are the highest, to be 37.80%. The HEPG2 cells are handled by the *taxuschinensis* extract, the cells begin to turn round, enlargement, loosely arranged, cell fold, floating after 24 hours, the cells are necrosis and fragmented in 48 hours, which shows the extractive has the strong inhibition to the HEPG2 cells. The experimental results reveal that the *taxuschinensis* extract has the potential in the study of drug development for the treatment of liver cancer cell HEPG2.

Key words: *Taxus Linn*; paclitaxel; liver cancer cell HEPG2; toxicity determination

紫杉醇 (Paclitaxel), 别称紫杉碱, 属于二萜类化合物, 是红豆杉属植物产生的一种次生代谢产物, 1856 年德国科学家 Lucas 从浆果红豆杉的叶片中首次分离获得。由于红豆杉 (紫杉醇) 具有独特的药用效果, 一经问世即受到人们的普遍关注。据《本草纲目》记载, 红豆杉具有治疗霍乱、伤寒和排毒等功效; 《现代中药大辞典》、《本草推陈》等也记载了

红豆杉的叶、枝作为药材具有通经、利尿治疗心脏病和抑制糖尿病等疗效^[1]。1964 年, 美国国家癌症协会 (National Cancer Institute, 简称 NCI) 对外宣称, 红豆杉树皮提取物对人体口腔表皮样癌细胞 (KB 细胞) 具有细胞毒性, 并进一步明确其中起作用的有效成分是紫杉醇; 1993 年, 美国 FDA 批准紫杉醇可以用于治疗卵巢癌晚期, 后来又相继批准其可以用于治疗乳腺癌等疾病^[2]。

研究表明, 紫杉醇主要存在两种独特的抗癌机制。一种机制是紫杉醇能够破坏癌细胞微管与微管蛋白之间的动态平衡, 通过影响微管束的再生, 使细

收稿日期: 2017-01-17 接受日期: 2017-02-14

基金项目: 湖北省高等学校优秀中青年创新团队项目 (T201317)

* 通信作者 E-mail: kweismile0312@126.com

胞有丝分裂时不能正常形成纺锤体和纺锤丝,从而抑制细胞的分裂与增值来达到抗肿瘤的目的^[3];另一种机制是紫杉醇通过诱导与促进微管蛋白有关的不可逆聚集、合成微管装备,阻止肿瘤细胞的生长^[4,5]。目前,世界上许多国家已经批准紫杉醇用于癌症的临床治疗或运用在其它非癌症性的疾病如类风湿性关节炎等的治疗研究上^[6]。迄今,鲜见用于肝癌的研究报道。本研究以离体培养的肝癌细胞 HEPG2 为材料,探讨红豆杉叶片提取物中的紫杉醇对肝癌细胞 HEPG2 的抑制作用,为相关药物的研发提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用红豆杉 (*Taxus Linn*) 叶片取自湖北省黄石市青龙山苗圃人工种植的三年生树苗。常规管理。实验所需肝癌细胞 HEPG2 由湖北理工学院医学院提供。

1.2 紫杉醇的提取

参照李春斌等(2005)^[7]方法从红豆杉叶片中提取紫杉醇(略有改进)。具体方法是:

1.2.1 材料预处理:取新鲜红豆杉叶片,洗净,置于 50 °C 温箱中干燥 24 h,用粉碎机粉碎后放于塑料袋中密封保存备用。

1.2.2 浸提:以乙酸乙酯:丙酮(1:1)为提取剂。称量 5g 红豆杉叶片粉末,置于圆底烧瓶中,45 °C 浸提回流 16 h(料液比 1:16),抽滤收集上清液。

1.2.3 浓缩:用旋转蒸发器(0.095 MPa,45 °C)真空减压浓缩,直至得到绿色浸膏。

1.2.4 纯化:将浓缩浸膏置于缓冲瓶内,加适量石油醚,震荡混匀,转入离心管中,离心,弃上清,保留沉淀,重复操作三次(去除浸膏中各种极性或非极性杂质)。沉淀用甲醇溶解后,置于冰箱 4 °C 保存。多次提取后合并溶解液,并减压浓缩直至蒸干。

1.2.5 紫杉醇纯度检测

分别用高效液相色谱法(HPLC, Agilent 1260)和傅里叶红外光谱法(FTIR, Tensor 27)检测红豆杉叶片提取紫杉醇的纯度。

1.3 紫杉醇处理肝癌细胞 HEPG2

用小牛血清培养培养基将肝癌细胞 HEPG2 复苏、传代培养后(贴壁细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化液消化,并用移液枪反复轻轻敲打),制成细胞悬液。对细胞悬液进行计数,以 6×10^4 个/mL 的密度

接种到 96 孔板,每孔 150 μ L。培养 24 h 后,弃去培养液,A1 和 A2 孔加培养液,作为空白调零。每孔加入含不同浓度红豆杉紫杉醇提取物的培养液,每孔 200 μ L,使样品紫杉醇终浓度分别为 2、1.0、0.5、0.25、0.125 (μ g/mL),每一个浓度设置 5 个平行孔。对照加 DMSO。96 孔板加药后置于 37 °C,饱和湿度,5% CO₂ 培养箱中继续培养 48 h。

1.4 肝癌细胞 HEPG2 活力测定

采用 MTT 法测定细胞活力。用含有红豆杉紫杉醇提取物的培养基处理肝癌细胞 HEPG2,倒置显微镜(NIB-100,宁波永新)下观察细胞形态及数量变化,并在每孔加入 20 μ L MTT 溶液(浓度:5 mg/mL),轻轻振荡培养板,放回培养箱继续培养 4 h,取出培养板,弃去培养上清液,每孔加入反应停止液 DMSO 150 μ L,在振荡器上震荡 10 min,使甲臞结晶充分溶解。使用酶联免疫法(iMark, BIO-RAD)测吸光度 OD($\lambda = 570$ nm),三次重复。计算细胞存活率、死亡率,公式如下:

细胞相对存活率(%) = (样品 OD 值/对照 OD 值) \times 100;

细胞相对死亡率(%) = 1 - 细胞相对存活率。

1.5 肝癌细胞 HEPG2 的形态学观察

利用倒置显微镜对经不同浓度紫杉醇处理的肝癌细胞分别在 24、48 h 下进行观察,比较细胞形态变化。

1.6 数据处理

采用 office2007 处理实验数据。

2 结果与分析

2.1 红豆杉叶片提取物紫杉醇含量测定

采用高效液相色谱法(HPLC)检测。色谱条件:色谱柱:ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ Analytical(150 nm \times 4.6, 5-Micron);流动相:甲醇:水:乙腈 = 23:41:36;流速:1.0 mL/min;柱温:30 °C;进样量 40 μ L;紫外检测波长:227nm。外标法确定样品中紫杉醇含量,含量用峰面积计算。

紫杉醇标样浓度 X 与峰面积 Y 的回归方程为: $Y = 8.94977 + 47.90344X, R^2 = 0.9991$ 。线性关系如图 1 所示。由图 1 可以看出,该色谱条件下测定的紫杉醇在 4.0 ~ 52.0 μ g/mL 范围内呈现良好的线性关系。

通过计算紫杉醇峰面积和换算(如表 1 所示),红豆杉叶片提取物紫杉醇的浓度为 1.436 μ g/mg。

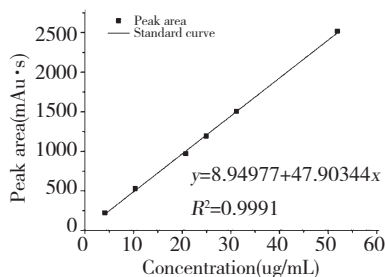


图1 紫杉醇标准曲线

Fig. 1 Standard curve of paclitaxel

2.2 红豆杉叶片提取物紫杉醇红外光谱分析

采用 KBr 压片法对红豆杉叶片提取物紫杉醇进行红外光谱分析。如图 2 所示,在波长 400 ~ 4000 cm^{-1} 范围内,3439.87 cm^{-1} 处有强吸收峰,推测可能是 N-H 伸缩振动或—OH 的伸缩振动;在 1734.35 cm^{-1} 处有强吸收峰,推测为酯类化合物中 C = O 的伸缩振动;在 1713.55 cm^{-1} 处有强吸收峰,推测为羰基化合物中 C = O 的伸缩振动;在 1646.56 cm^{-1} 处有强吸收峰,推测为 C = C 的伸缩振动;在 1600-1450 cm^{-1} 处出现了 3-4 条谱带,为单核芳烃中 C =

表 1 红豆杉叶片提取物紫杉醇含量

Table 1 Paclitaxel content in the extractive of *Taxus* Linn leaves

测定次数 No.	1	2	3
紫杉醇峰面积 Peak area	1450.20	1347.00	1539.70
平均值 Mean		1445.63	
紫杉醇提取样品浓度 Sample concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		29.991	
紫杉醇提取样品纯度 Purity ($\mu\text{g}/\text{mg}$)		1.436	

C 的伸缩振动;在 1245.81 cm^{-1} 处有吸收峰,推测为酯类 C—O 伸缩振动;在 709.73 cm^{-1} 处及周围有吸收峰,推测为 C—H 弯曲震动吸收峰。通过对比紫杉醇标准品和红豆杉叶片提取物紫杉醇样品特征峰分析可知,样品中存在紫杉醇类物质结构特征。

2.3 红豆杉叶片提取物紫杉醇对肝癌细胞 HEPG2 活力的影响

MTT(俗称噻唑蓝)能够与活细胞中的琥珀酸脱氢酶生成溶于水的沉淀,死细胞不能生成沉淀,并且沉淀颜色深浅与活细胞数目成正比^[8]。通过测定细胞悬浮培养液的 OD 值得,计算细胞的存活率,常被用于药物筛选。

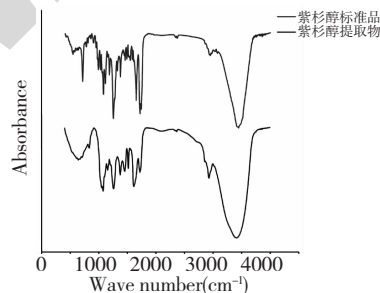


图 2 紫杉醇傅立叶红外光谱图

Fig. 2 FTIR spectra of Paclitaxel

本实验结果显示(见表 2),经红豆杉叶片提取物处理的肝癌细胞 HEPG2。其相对存活率和相对死亡率与紫杉醇浓度关系密切,且随着降低的升高

表 2 红豆杉提取物紫杉醇对肝癌细胞 HEPG2 活力的影响

Table 2 The influence of paclitaxel on liver cancer cell HEPG2 vitality

序号 No.	紫杉醇浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	样品 OD 值 Sample OD value	对照 OD 值 Control OD value	相对存活率 Relative survival rate (%)	相对死亡率 Relative mortality rate (%)
1	2	0.051	0.082	62.20	37.80
2	1	0.065	0.081	80.25	19.75
3	0.5	0.069	0.083	83.13	16.87
4	0.25	0.076	0.082	92.68	7.32
5	0.125	0.079	0.082	96.34	3.66

而下降。浓度为 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,相对死亡率最高,达到 37.80%;浓度为 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,相对死亡率下降为 16.87%。结果表明,紫杉醇对肝癌细胞 HEPG2 具有一定的抑制作用。

2.4 紫杉醇对肝癌细胞 HEPG2 形态结构的影响

正常生长的肝癌细胞 HEPG2 分布均匀,大小均一,贴壁后增值旺盛、密集,连接成片,呈梭状或多边形,状态较好(见图 3)。经红豆杉叶片提取物处理(紫杉醇含量 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$)的肝癌细胞 HEPG2,随着处理时间的延长,细胞形态变化明显,培养至 24 h,细胞开始变圆,膨大,分布松散,细胞褶皱,漂浮(见图 4),培养至 48 h 可明显观察到细胞坏死和碎片状(见图 5),并且观察到经红豆杉叶片提取物处理的肝癌细胞 HEPG2 与经紫杉醇标准品处理的肝癌细胞 HEPG2 发生相同的损坏现象(见图 6)。

3 结论

3.1 经高效液相色谱法(HPLC)检测表明,本实验条件下采用溶剂浸提法从红喜杉叶片中提取紫杉醇具有较高的收率,通过计算紫杉醇峰面积和换算,红豆杉叶片提取物紫杉醇的浓度为 $1.436 \mu\text{g}/\text{mg}$ 。

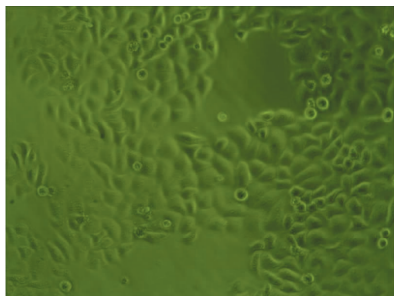


图 3 正常形态的肝癌细胞 HEPG2

Fig. 3 Normal cell of liver cancer cell HEPG2

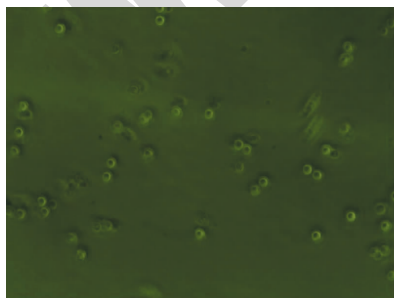


图 4 经红豆杉提取物(含 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 紫杉醇)处理 24 h 后的肝癌细胞 HEPG2

Fig. 4 The liver cancer cell HEPG2 were handled by taxus-chinensis extract(paclitaxel content is $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$) after 24 hours

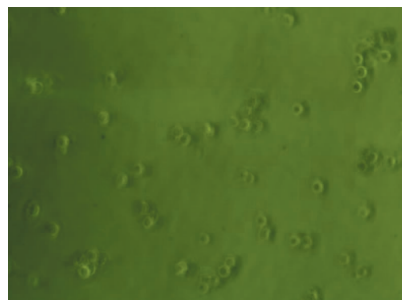


图 5 经红豆杉提取物(含 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 紫杉醇)处理 48 h 后的肝癌细胞 HEPG2

Fig. 5 The liver cancer cell HEPG2 were handled by *Taxus-chinensis* extract(paclitaxel content was $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$) after 48 hours

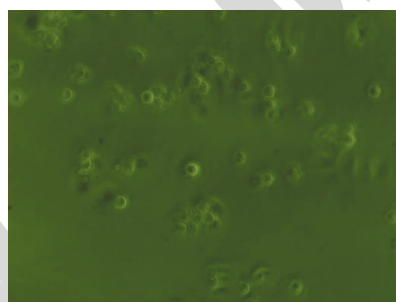


图 6 经紫杉醇标准品(紫杉醇含量 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$)处理 24 h 后的肝癌细胞 HEPG2

Fig. 6 The liver cancer cell HEPG2 were handled by paclitaxel standard (paclitaxel content is $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$) after 24 hours

3.2 通过红外光谱分析红豆杉叶片提取物与紫杉醇标准品都存在紫杉醇类物质结构特征峰,证实样品中存在紫杉醇类物质。

3.3 MTT 法测定结果表明,红豆杉叶片提取物对肝癌细胞 HEPG2 具有一定的抑制作用。紫杉醇含量为 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,相对死亡率最高,达到 37.80%。

3.4 经红豆杉叶片提取物(紫杉醇含量 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$)处理的肝癌细胞 HEPG2,随着处理时间的延长,细胞形态变化明显,培养至 24 h,细胞开始变圆,膨大,分布松散,细胞褶皱,漂浮(见图 4),培养至 48 h 可明显观察到细胞坏死和碎片状(见图 5),并且所发生的变化与经紫杉醇标准品处理的肝癌细胞 HEPG2 相同。

实验结果显示,红豆杉叶片提取物在治疗肝癌细胞 HEPG2 的药物开发方面具有研究的潜力。

参考文献

- 1 Horwitz SB. Personal recollections on the early development of taxol. *J Nat Prod*, 2004, 67: 136-138.