

# 无患子皂苷对人肝癌细胞 HepG2 增殖与凋亡的影响

卢文显\*

福建医科大学基础医学院 福建省癌症和神经退行性疾病转化研究重点实验室,福州 350122

**摘要:**为了探究无患子皂苷对人肝癌细胞 HepG2 增殖和凋亡的影响。本研究采用不同浓度的无患子皂苷对 HepG2 细胞进行处理,分别利用 MTT 法、流式细胞术、qPCR 的方法检测细胞增殖、周期和凋亡情况以及 NF- $\kappa$ B 和 Caspase3 的表达情况。结果发现 25  $\mu$ g/mL ~ 100  $\mu$ g/mL 的无患子皂苷分别作用 12、24 和 36 h 后,显微镜下发现细胞形态发生明显变化,MTT 法检测发现细胞的增殖受到明显的抑制。无患子皂苷作用 24 h 后流式细胞术检测出现明显的凋亡峰,细胞周期阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。qPCR 检测发现随着皂苷浓度的提高,Caspase3 的表达上调,而 NF- $\kappa$ B 的表达下调。以上结果说明无患子皂苷能够抑制人肝癌细胞 HepG2 的增殖并诱导其凋亡。

**关键词:**无患子皂苷;HepG2;增殖与凋亡

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.7.023

## Proliferation and Apoptosis Effects of Sapindus-saponin on Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells

LU Wen-xian\*

Fujian Key Laboratory for Translational Research in Cancer and Neurodegenerative Diseases,  
School of Basic Medical Sciences, Fujian Medical University, Fuzhou, 350122, China

**Abstract:** To investigate the effect of sapindus-saponin on the proliferation of HepG2 cell lines. HepG2 cell lines were treated by different doses of sapindus-saponin. HepG2 cell viability were evaluated by MTT assay, cell change in morphology was observed by microscope; Fluorescence flow cytometry (FCM) was applied to detect cell cycle and cell apoptosis; qPCR was used to detect the levels of NF- $\kappa$ B and Caspase3. The growth of human hepatocellular carcinoma HepG2 Cells were inhibited after Sapindus-saponin (25-100  $\mu$ g/mL) treated for 12 h, 24 h and 36 h. Meanwhile, morphological changes of cells were obvious. FCM assay indicated that apoptosis peak appeared evidently and HepG2 Cells were arrested in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase; the Caspase3 expression were up regulated, and the NF- $\kappa$ B expression were down regulate with the sapindus-saponin concentration increased. In summary, Sapindus-saponin could inhibit the proliferation of HepG2 Cells and induce their apoptosis.

**Key words:** sapindus-saponin; HepG2 cells; proliferation and apoptosis

无患子 (*Sapindus mukorossi* Gaertn.) 又名肥皂树,在我国有广泛分布,是传统的中草药。由于无患子果皮中含有丰富皂苷,因此其具有抗衰老、抗病毒、保护心血管及中枢神经系统。已有研究表明,无患子皂苷也具有抑制肿瘤细胞生长增殖作用<sup>[1]</sup>。实验证明无患子皂苷对小鼠黑色素瘤、人宫劲癌、人胃癌细胞的增殖有抑制作用<sup>[2]</sup>。Chen 等用发现不同溶剂提取无患子皂苷能够对人的黑色素瘤和肺癌细胞的生长有一定的抑制作用<sup>[3]</sup>。台湾的研究者发

现新的五种达玛烷型无患子皂苷,其中 4 种能够抑制 Hepa59T/VGH、NCI、HeLa 等多种癌细胞生长<sup>[4]</sup>。Zhang 等从无患子果实中提取分离得到新的无患子皂苷对人肺癌细胞系 A549 的抑制率能达到 69.2% ~ 83.3%<sup>[5]</sup>。无患子的甲醇提取物能够对小鼠黑色素瘤、hela、人胃癌细胞增殖具有抑制作用<sup>[6]</sup>。综上所述,无患子皂苷能够对多种癌细胞的增殖有抑制作用,但尚无研究报道验证无患子皂苷是否能够作用于肝癌细胞。由于我国的饮食习惯和乙型肝炎等因素,导致我国肝癌发病率逐年升高,成为我国四大癌症之一。鉴于此,本文对无患子皂苷对肝癌细胞 HepG2 生长、增殖的作用进行初步的研究。

收稿日期:2017-05-25 接受日期:2018-01-16

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81502115);福建省自然科学基金青年创新项目(2016J05190);福建省卫计委青年科研项目(2016-1-34)

\* 通信作者 Tel:86-015980186739; E-mail:luwenxian0617@163.com

# 1 对象与方法

## 1.1 实验仪器

全波长酶标仪 (Multiskan go 1510, Thermo Scientific); 流式细胞仪 (BD FACSCalibur); 全自动细胞计数仪 (IC 1000, Countstar); 荧光定量 PCR 仪 (QuantStudio6, Thermo Scientific)。

## 1.2 细胞与试剂

HepG2 细胞、(中科院上海细胞库)、无患子皂苷 (福建师范大学泉港石化研究院提供, 从无患子果皮中提取)、DMEM 培养基、PBS 缓冲溶液、胰酶、双抗 (Hyclone)、血清 (Gibco)、DMSO (国药)、MTT (生工)、PI (sigma)、顺铂 (阿拉丁) RNAiso Plus、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara) 引物序列 (上海生工合成)。

## 1.3 MTT 检测

在 96 孔板中接种对数期细胞, 每孔接种 5000 个细胞左右, 培养箱中过夜, 之后, 换液加含不同浓度无患子皂苷 (25、50、75、100 μg/mL) 的培养基, 继续培养 12、24、36 h, 吸走培养基, 加入含 0.5% MTT 培养基 100 μL, 继续培养 4 h, 1000 g 离心 3 min, 在黑暗条件下加入 150 μL DMSO, 酶标仪上低速震荡 10 min, 测量 OD490 nm 吸光值。按照抑制率 = (对照组 OD - 实验组 OD) / 对照组 OD × 100% 公式, 计算药物对细胞的增殖抑制率。

## 1.4 流式细胞术检测

将 HepG2 细胞培养于培养皿中过夜, 之后分别加入无患子皂苷浓度为 25、50、75、100 μg/mL 的培养基及阴性对照组 (只加培养基)、阳性对照组 (顺铂 20 μg/mL), 继续培养 24 h, 收集每组细胞各 1 × 10<sup>6</sup> 个, 加入 70% 的冰乙酸固定过夜, PI 染色, 流式细胞仪检测细胞周期各阶段细胞的百分率和凋亡细胞百分率。

## 1.5 荧光定量 PCR 检测

利用 RNAiso Plus 提取总 RNA, 按照逆转录试剂盒使用方法将提取的总 RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 以表 1 中的序列为引物按照使用说明进行 QPCR, 对结果进行分析。

## 1.6 统计分析

实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件处理。计量资料以平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两样本均数的比较采用 *t* 检验或 Mann-Whitney U 检验, *P* < 0.05 具有统计学意义。

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 Sequence of qPCR primers

基因 gene	引物序列 Sequence of primers
Caspase 3	5'-AGAGCTGGACTGCGGTATTGAG-3'
	5'-GAACCATGACCCGTCCTTG-3'
NF-κB	5'-GAGCCACCAATCCACACAGAGT-3'
	5'-ATGAGCTTCTGGCGTTTCTCT-3'
GAPDH	5'-GTGCCAGCCTCGTCTCATAG-3'
	5'-TTTGTCACAAGAGAAGGCAG-3'

# 2 结果

## 2.1 无患子皂苷对 HepG2 细胞形态的影响

在对数生长期的 HepG2 细胞中分别加入含 0、50 μg/mL 和 100 μg/mL 浓度的无患子皂苷的培养基, 继续培养 24 h 后显微镜下观察。观察发现在不含无患子皂苷的培养基中, HepG2 细胞状态良好, 生长增殖正常, 轮廓清楚 (图 1, A)。当无患子皂苷为 50 μg/mL 时, HepG2 增殖变慢, 细胞部分死亡, 漂浮于培养基中 (图 1, B)。当无患子皂苷为 100 μg/mL 时, 细胞缩小变圆, 细胞碎片大量出现, 细胞数目减少 (图 1, C)。这说明在相同的处理时间, 随着药物浓度的增加, 抑制作用逐渐增强。因此, 无患子皂苷对 HepG2 细胞生长具有强烈的抑制作用。

## 2.2 无患子皂苷对 HepG2 细胞的生长抑制

用含有四种不同浓度的无患子皂苷培养基分别培养 HepG2 细胞, 并在培养后 12、24 和 36 h 后对其进行 MTT 检测。MTT 结果发现, 当 25 μg/mL 无患子皂苷作用细胞 12 h 后, 细胞的生长影响较小, 抑制率仅为 10.2%, 而随着浓度的提高 (50、75、100 μg/mL) 抑制率逐渐增加, 分别达到了 23.3%、37.6% 和 49.9%。处理 24 h, 四个浓度的抑制率分别为 13.9%、28.6%、41.9% 和 56.3%。当处理 36 h, 抑制率分别达到 10.6%、25.1%、37.2% 和 52.6% (图 2)。以上结果表明, 无患子皂苷对 HepG2 细胞作用不同时间和不同浓度, 对细胞的增殖也有不同的影响, 随着浓度的提高, 抑制作用有明显增强, 作用时间的延长对细胞的抑制作用影响不明显。

## 2.3 流式细胞术检测无患子皂苷对 HepG2 细胞周期和凋亡情况

通过流式细胞仪对 HepG2 细胞周期检测发现,

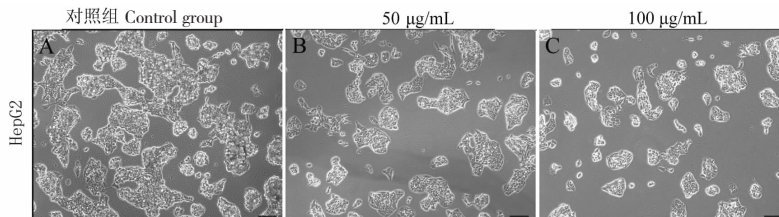


图1 无患子皂苷作用后的 HepG2 细胞形态学变化

Fig. 1 Effect of sapindus-saponin on morphological change of HepG2 cells

注:A:HepG2 细胞培养 24 h,作为对照组;B:50 µg/mL 无患子皂苷作用于 HepG2 细胞后 24 h;C:100 µg/mL 无患子皂苷作用于 HepG2 细胞后 24 h。标尺:100 µm。

Note:A:HepG2 cell cultivated 24 h, as the control group;B:HepG2 cell cultivated 24 h with 50 µg/mL Sapindus-saponin;C:HepG2 cell cultivated 24 h with 100 µg/mL Sapindus-saponin. Scale:100 µm.

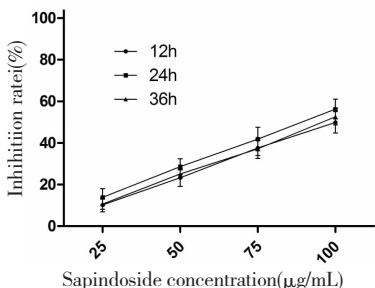


图2 利用 MTT 检测无患子皂苷对 HepG2 细胞生长的抑制作用

Fig. 2 The growth-inhibition rate of sapindus-saponin against HepG2 cells by MTT

当无患子皂苷浓度提高到 75 µg/mL 时,与阴性对照组对比,HepG2 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞的比例显著提高,S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例显著降低。在检测细胞凋亡时发现,当浓度为 25 µg/mL 时,与阴性对照组比较,凋亡率显著升高。总之,随着浓度的提高,细胞阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,并出现明显的凋亡峰(见表 2)。

### 2.4 不同无患子皂苷浓度对 HepG2 细胞的 Caspase-3 表达影响

不同药物浓度处理 24 h 后,提取 HepG2 细胞 mRNA,利用 qPCR 技术检测 HepG2 细胞中 Caspase-3 mRNA 表达量。结果发现,随着药物浓度增加,

表 2 流式细胞术检测无患子皂苷对 HepG2 细胞周期和凋亡情况

Table 2 Effects of sapindus-saponin on cell cycle apoptotic rate of HepG2 cells by FCM

组别 Group	浓度 Concentration (µg/mL)	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期 G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> phase	S 期 S phase	G <sub>2</sub> /M 期 G <sub>2</sub> /M phase	凋亡率 Apoptosis rate
阴性对照 negative control	0	40.3 ± 6.3	24.6 ± 4.6	40.1 ± 3.2	2.0 ± 1.5
无患子皂苷 Sapindus-saponin	25	45.2 ± 3.7 <sup>#</sup>	20.6 ± 5.3	37.2 ± 4.0 <sup>#</sup>	7.6 ± 2.4 <sup>**</sup>
	50	49.6 ± 4.8	15.4 ± 4.5	33.6 ± 3.7 <sup>#</sup>	14.6 ± 1.7 <sup>**</sup>
	75	57.4 ± 2.1 <sup>*</sup>	11.6 ± 2.5 <sup>*</sup>	29.2 ± 2.6 <sup>*</sup>	21.6 ± 2.6 <sup>**</sup>
	100	63.3 ± 5.6 <sup>*</sup>	8.8 ± 2.0 <sup>*</sup>	24.5 ± 2.3 <sup>*</sup>	24.7 ± 6.0 <sup>**</sup>
阳性对照 positive control	20	56.9 ± 4.6	12.0 ± 3.9	24.0 ± 3.3	39.1 ± 4.3

注:与阴性对照组相比,<sup>\*</sup>P < 0.05;与阳性对照组相比,<sup>#</sup>P < 0.05。

Note:Compare with negative control,<sup>\*</sup>P < 0.05;Compare with positive control,<sup>#</sup>P < 0.05.

Caspase-3 mRNA 表达逐渐增加。当药物浓度为 50 µL/mL 时,Caspase-3 mRNA 表达量为对照组的 3.1 倍,具有显著差异。药物浓度提高到 100 µL/mL,Caspase-3 mRNA 表达量为对照组的 8.6 倍,具有极显著差异(见图 3)。

### 2.5 不同无患子皂苷浓度对 HepG2 细胞的 NF-κB 表达影响

同样的,检测药物处理后的 HepG2 细胞中 NF-κB mRNA 表达。结果发现,随着药物浓度增加,NF-

κB mRNA 表达逐渐减少。当药物浓度为 50 µL/mL 时,NF-κB mRNA 表达量只有对照组的 43%。药物浓度提高到 100 µL/mL,NF-κB 表达量只有对照组的 26%(见图 4)。

## 3 讨论

通过显微镜观察药物作用后 HepG2 细胞发现,

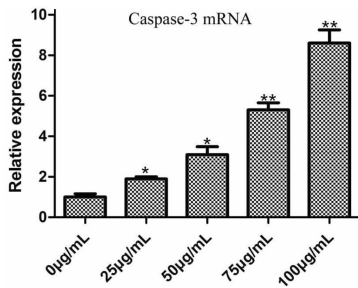


图3 不同无患子皂苷浓度对 HepG2 细胞的 Caspase-3 表达影响

Fig. 3 The effect of sapindus-saponin in different concentrations on the expression of Caspase-3 in HepG2 cells

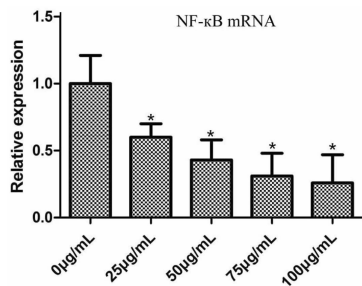


图4 不同无患子皂苷浓度对 HepG2 细胞的 NF-κB 表达影响

Fig. 4 The effect of sapindus-saponin in different concentrations on the expression of NF-κB in HepG2 cells

HepG2 细胞形态变圆,生长增殖变慢,部分细胞死亡,这说明无患子皂苷对 HepG2 细胞生长具有抑制作用。进一步通过 MTT 法验证其对 HepG2 细胞生长增殖的影响,结果表明提高药物浓度,细胞生长增殖抑制作用明显增强;而延长作用时间对细胞的抑制影响不明显。通过流式细胞仪对药物处理后的细胞进行分析发现,随着无患子皂苷浓度的增加,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比率升高,说明更多的细胞周期被阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,细胞增殖被抑制。当浓度逐渐增加到 75 µg/mL 时,细胞的增殖受到明显的抑制作用,而在浓度为 25 µg/mL 时,凋亡率已明显提高。通过荧光定量 PCR 检测发现,药物浓度的提高,HepG2 细胞的 Caspase-3 mRNA 表达增加,NF-κB mRNA 表达减少。

肿瘤细胞具有快速、无限增殖的能力。肿瘤的发生不但与细胞增殖有关,而且与细胞的抗凋亡密切相关,故治疗肿瘤主要通过抑制细胞增殖、促进细胞凋亡<sup>[7]</sup>。无患子皂苷对 HepG2 细胞的增殖有明显的抑制作用,药物浓度提高,抑制作用越强;能将 HepG2 细胞阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。同时,无患子皂苷能促进 HepG2 细胞凋亡,Caspase 家族在细胞凋亡过

程中处于关键位置,Caspase 蛋白一旦被激活,细胞就将不可逆的进入细胞凋亡周期,而在 Caspase 家族中,Caspase 3 又是细胞凋亡最主要的执行者<sup>[8-10]</sup>。实验结果表明,无患子皂苷能够促进 Caspase 3 的表达,随着浓度的增加,Caspase 3 表达量逐渐增加。NF-κB 是普遍存在于真核细胞的关键性核转录因子,被认为是众多信号转导途径中肿瘤促进机制中重要的一环<sup>[11-13]</sup>。有研究发现,肝癌的发生发展与 NF-κB 有密切联系,抑制 NF-κB 表达能有助于肝癌的治疗<sup>[14]</sup>。实验结果表明,无患子皂苷能够抑制 NF-κB 的表达,随着浓度的增加,NF-κB 表达量逐渐减少。无患子皂苷对 HepG2 细胞中的 Caspase 3 和 NF-κB 的表达影响,能够促进肿瘤细胞凋亡。

综上所述,本研究表明,无患子皂苷通过阻滞细胞周期,上调 Caspase-3 和下调 NF-κB 的表达,从而抑制人肝癌细胞 HepG2 的增殖并诱导其凋亡。

#### 参考文献

- Huang HC, Wu MD, Tsai WJ, *et al.* Triterpenoid saponins from the fruits and galls of *Sapindus mukorossi* [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69: 1609-1616.
- Ibrahim M, Khaja MN, Aara A, *et al.* Hepatoprotective activity of *Sapindus mukorossi* and *Rheum emodi* extracts: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *World J Gastroentero*, 2008, 14: 2566-2571.
- Chen CY, Kuo PL, Chen YH, *et al.* Tyrosinase inhibition, free radical scavenging, antimicroorganism and anticancer proliferation activities of *Sapindus mukorossi*, extracts [J]. *J Taiwan Inst Chem E*, 2010, 41: 129-135.
- Kuo YH, Huang HC, Kuo LMY, *et al.* New Dammarane-Type Saponins from the Galls of *Sapindus mukorossi* [J]. *J Agr Food Chem*, 2005, 53: 4722-4727.
- Zhang XM, Yang DP, Xie ZY, *et al.* Two new glycosides isolated from *Sapindus mukorossi* fruits; effects on cell apoptosis and caspase-3 activation in human lung carcinoma cells [J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30: 1459.
- Reddy DRS, Mallika D, Reddy GD, *et al.* Phytochemical and antimicrobial activities of the soapnut saponin and its derivatives from the *Sapindus mukorossi* [J]. *Asian J Chem*, 2010.
- Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer [J]. *Nature*, 2001, 411: 342-348.
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, *et al.* Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis [J]. *Annu Rev Cell Dev Bi*, 1999, 15: 269-290.