

网络出版时间: 2017-5-22 17:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170522.1745.013.html>

◇ 药学研究 ◇

## 橙皮素衍生物对肝癌细胞 SMMC-7721 的促凋亡作用

赵雨欣, 孙莹茵, 黄成, 马陶陶, 李俊

**摘要** 目的 以橙皮素为原型,合成了新型化合物 HY-12,研究其体外对 SMMC-7721 细胞的促凋亡作用及机制。方法

在 3 个时间点(24、48、72 h)采用 MTT 比色法观察不同浓度 HY-12 对肝癌细胞、肝细胞增殖的影响,计算半数抑制率( $IC_{50}$ )。根据结果选取了 24 h, $12.5 \times 10^{-6}$ , $25 \times 10^{-6}$ , $50 \times 10^{-6}$  mol/L 3 个浓度进行下述实验。通过 Annexin V/PI 双染,流式细胞仪检测细胞凋亡率;制备细胞爬片,Hoechst 33342 染色,在荧光倒置显微镜下观察细胞凋亡的形态学改变;采用 Western blot 法检测细胞凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 蛋白水平的表达情况。结果 ① MTT 法显示在对肝细胞活性无显著影响的前提下, HY-12 在体外可抑制 SMMC-7721 细胞的增殖,且具有剂量-时间依赖性;② 流式细胞仪检测显示 HY-12 作用后, SMMC-7721 细胞凋亡率增加,且呈浓度依赖性趋势;③ 经 Hoechst 33342 染色,药物处理后细胞核皱缩断裂呈现亮蓝色新月状;④ Western blot 结果显示药物处理可以使 Bax 蛋白表达上调,相反地 Bcl-2 蛋白表达下调。结论 橙皮素衍生物 HY-12 有明显抑制肝癌细胞 SMMC-7721 增殖作用。其机制可能是通过调节 Bcl-2、Bax 表达以诱导细胞凋亡。HY-12 可能成为治疗肝癌的有效化疗药物。

**关键词** 肝癌;人肝癌细胞 SMMC-7721;橙皮素;Bcl-2;Bax  
中图分类号 R 961

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)07-1003-05  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.013

原发性肝癌是世界上第六大肿瘤,其死亡率居恶性肿瘤的第三位,同时也是肝硬化患者死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。根据 2012 年的国际癌症研究机构 GLOBOCAN 系列调查研究<sup>[2]</sup>显示,全球约有 782 万肝癌患者和 745 万肝癌死亡病例,其中约 82.9%的

患者和 83.6%的死亡病例来自发展中国家。

尽管二十一世纪以来,肝癌的诊断及治疗手段已经取得了很大的进步和发展,但是其五年存活率并没有得到根本的改变,预后仍然很差。由于化疗药物缺乏选择性而对身体一些生长迅速的细胞产生损伤,但是化学药物的应用,明显延长了患者的生命,提高了患者的生活质量,所以仍然是目前肝癌患者的主要治疗手段之一<sup>[3]</sup>。近年来,植物提取物在人类疾病尤其是癌症中的应用得到了越来越多的重视。橙皮素是柑橘类水果中存在的最丰富的黄酮类化合物之一<sup>[4]</sup>。已有大量文献<sup>[5]</sup>报道,橙皮素具有抗炎、抗癌、抗氧化、抗动脉粥样硬化及降压作用。并且越来越多的研究<sup>[6]</sup>证实了在结肠癌、肺癌、前列腺癌、宫颈癌中,橙皮素可以抑制肿瘤细胞增殖或者促进肿瘤细胞凋亡。但是溶解性差、半衰期短等缺陷限制了其临床应用。该实验室通过对其结构修饰,解决上述橙皮素的应用缺陷,选取人肝癌细胞 SMMC-7721,观察 HY-12 的体外抗癌作用,初步探讨了其促凋亡机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株** 人肝癌细胞株 SMMC-7721 和人肝细胞 L02 细胞株购自中科院上海细胞库。

**1.1.2 主要试剂** HY-12 安徽医科大学药学院石静波博士合成并测定含量>99%;DMEM 高糖培养基、二甲基亚砜(美国 Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青生物材料有限公司);胰酶(上海生工生物工程股份有限公司);噻唑蓝(北京奇华盛生物技术有限公司);兔抗 Bcl-2、Bax、 $\beta$ -actin 蛋白单克隆抗体(美国 Abcam 公司);抗兔二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(美国贝博公司);Hoechst 33342 染色剂(上海碧云天试剂公司)。

**1.1.3 主要仪器** 酶标仪(荷兰雷勃公司);NAP-CO-6100 型细胞培养箱(美国 SHELLAB 公司);Sig-am3-16K 高速离心机(美国 Sigma 公司);Western

2017-03-22 接收

基金项目:安徽省高等学校省级自然科学研究重点项目(编号:KJ2016A364、KJ2016A365);安徽省自然科学基金面上项目(编号:1408085MKL31);国家自然科学基金(编号:81273526、81473268)

作者单位:安徽医科大学药学院,安徽医科大学肝病研究所,安徽省创新药物产业共性研究院,合肥 230032

作者简介:赵雨欣,女,硕士研究生;

李俊,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: lijun@ahmu.edu.cn

blot 设备(美国 Biorad 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 肝癌细胞 SMMC-7721、肝细胞 L02 培养** 取出冻存的细胞,于 37 °C 水中快速解冻,将细胞加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6 h,给细胞换液。根据细胞生长速度对细胞进行传代处理。

**1.2.2 细胞增殖实验** 取对数生长期的细胞,制备单细胞悬液,将 100 μl 细胞悬液接种于 96 孔板(3 000/孔),在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养条件下培养,待细胞贴壁且生长到孔底面积的 2/3。小心将细胞悬液吸出,换成 1% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基,饥饿处理 12 h。每孔加入含一定浓度药物的空白 DMEM 100 μl,培养 24、48、72 h,每孔依次加入 20 μl MTT 溶液(5 mg/ml),避光条件下在 37 °C 环境中放置 4 h。吸弃细胞上清液,每孔加 150 μl DMSO,摇床上放置 10 min 后在 490 nm 波长下检测吸光度值,以对照孔调零。抑制率(%) = (1 - 实验组吸光度值/对照组吸光度值) × 100%。L02 细胞和 SMMC-7721 同法操作。实验重复 3 次,计算平均值和 IC<sub>50</sub> 值。

**1.2.3 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡** 人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞生长至对数生长期,换 1% DMEM 培养基饥饿处理 12 h,然后加入浓度为 12.5 × 10<sup>-6</sup>、25 × 10<sup>-6</sup>、50 × 10<sup>-6</sup> mol/L 的 HY-12 作用 24 h。制备单细胞悬液,离心弃去上清液,用 400 μl Annexin V Buffer 工作液悬浮细胞,在悬液中加入 5 μl Annexin V-FITC 染色液,4 °C 避光孵育 15 min,加入 10 μl PI 染色液同条件下孵育 5 min 使用流式细胞检测仪检测。根据说明,细胞分为活细胞(FITC-/PI-),死细胞(FITC+/PI),凋亡早期细胞(FITC+/PI-),凋亡晚期细胞(FITC+/PI+)。

**1.2.4 Hoechst 33342 染色法观察细胞凋亡的形态学变化** 将盖玻片放入 75% 酒精中浸泡 30 min,放入 6 孔板前酒精灯过火。将制备好的 SMMC-7721 单细胞悬液调整为 0.5 × 10<sup>6</sup>/ml 接种于 6 孔板,2 ml/孔。给予不同浓度(12.5 × 10<sup>-6</sup>、25 × 10<sup>-6</sup>、50 × 10<sup>-6</sup> mol/L) 药物处理,小心吸弃培养基,用 PBS 洗 2 遍,小心取出盖玻片放入玻璃皿,浸泡于丙酮中固定 10 min。PBS 洗 2 遍后,加入 0.5 ml/孔、1 μg/ml 的 Hoechst 33342 染色液,于 37 °C 培养箱中避光放置 20 min,再用 PBS 洗 2 遍后放在载玻片上。立刻在倒置荧光显微镜下观察细胞形态。

**1.2.5 Western blot 检测** SMMC-7721 单细胞悬液

接种于 6 孔板(0.5 × 10<sup>6</sup>/ml),2 ml/孔。给予上述 3 个浓度药物处理细胞 24 h,裂解液冰上裂解细胞 30 min,12 000 r/min 离心 30 min,上清液用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定各组样品中蛋白含量。每组蛋白上样量为 30 ~ 50 μg,12% SDS-PAGE 进行电泳,200 mA、50 min 条件将凝胶上的蛋白转移 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶在常温下封闭 3 h,敷一抗 4 °C 过夜(均按照 1 : 1 000 比例稀释),Tris-HCl-Tween TBST(含 0.075% 吐温 20)洗 3 遍,15 min/遍,常温敷二抗(1 : 10 000 稀释)1 h。按上述洗 3 遍后采用 ECL 化学发光法观察蛋白表达情况。

**1.3 统计学处理** 用 SPSS 17.0 软件进行分析,所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。多样本比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计意义。

## 2 结果

### 2.1 HY-12 对肝癌细胞 SMMC-7721 增殖的影响

MTT 实验结果表明,在 24 h 浓度低于或等于 50 × 10<sup>-6</sup> mol/L, HY-12 对 L02 细胞增殖的抑制差异无统计学意义(图 1A),但 12.5 × 10<sup>-6</sup>、25 × 10<sup>-6</sup>、50 × 10<sup>-6</sup> mol/L 3 个浓度对 SMMC-7721 细胞生长有抑制作用( $F = 5.173, P < 0.05$ ),抑制率分别为 14.4%、16.8%、18.6%(图 1B)。因此本实验选定 12.5 × 10<sup>-6</sup>、25 × 10<sup>-6</sup>、50 × 10<sup>-6</sup> mol/L 3 个浓度作为后续实验的给药浓度。

### 2.2 HY-12 对 SMMC-7721 细胞凋亡率的影响

12.5 × 10<sup>-6</sup>、25 × 10<sup>-6</sup>、50 × 10<sup>-6</sup> mol/L 3 个浓度 HY-12 作用于 SMMC-7721 细胞 24 h 后,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率的变化。HY-12 组细胞凋亡率明显高于对照组,呈剂量依赖性。3 个浓度的凋亡率分别为 9.1%、23.4%、47.7%。见图 2。

### 2.3 HY-12 对 SMMC-7721 细胞形态的影响

经过 Hoechst 33342 染色后的细胞,在倒置荧光显微镜下可见细胞核呈亮蓝色小点,细胞核缩小,变圆,皱缩到细胞一侧,呈半月形或者圆形。并且随着药物浓度增加,凋亡细胞数目增加。见图 3。

### 2.4 HY-12 对 SMMC-7721 细胞凋亡相关因子表达情况的影响

Western blot 检测结果显示, HY-12(12.5 × 10<sup>-6</sup>、25 × 10<sup>-6</sup>、50 × 10<sup>-6</sup> mol/L) 作用于细胞 24 h 后,与对照组比较, Bcl-2 属于抗凋亡蛋白,表达量随药物浓度增加而减少。Bax 与 Bcl-2 功能相反,属于促凋亡蛋白,表达随药物浓度增加而增加。见图 4。

### 2.5 HY-12 对其他肝癌细胞株增殖的抑制作用

MTT 结果显示,不用浓度 HY-12 作用于肝癌细胞系 HepG2、BEL-7402 24 h,浓度高于  $80 \times 10^{-6}$  mol/L ( $t = 5.932, P < 0.0001$ ),  $50 \times 10^{-6}$  mol/L ( $t = 5.032, P < 0.0001$ ) 对细胞增殖有明显抑制作用。见图 5。

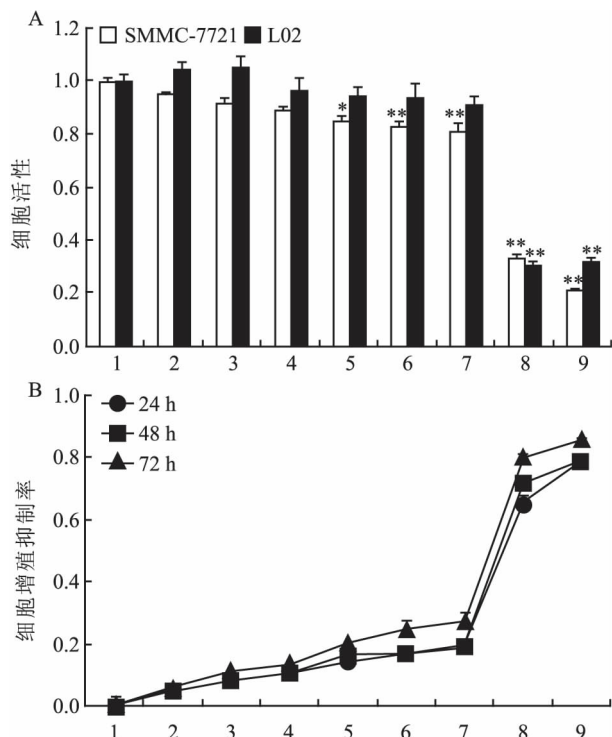


图 1 HY-12 对肝癌细胞 SMMC-7721 细胞增殖的影响

A: 细胞活性; B: 细胞增殖抑制率; 1: 对照组; 2: HY-12 组 ( $1.56 \times 10^{-6}$  mol/L); 3: HY-12 组 ( $3.125 \times 10^{-6}$  mol/L); 4: HY-12 组 ( $6.25 \times 10^{-6}$  mol/L); 5: HY-12 组 ( $12.5 \times 10^{-6}$  mol/L); 6: HY-12 组 ( $25 \times 10^{-6}$  mol/L); 7: HY-12 组 ( $50 \times 10^{-6}$  mol/L); 8: HY-12 组 ( $80 \times 10^{-6}$  mol/L); 9: HY-12 组 ( $100 \times 10^{-6}$  mol/L); 与对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

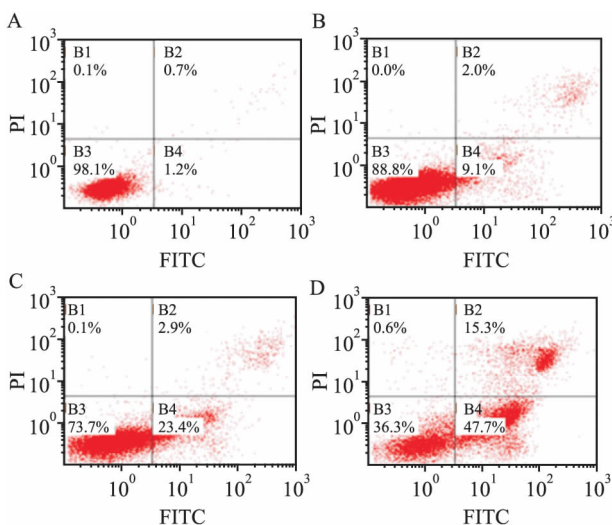


图 2 HY-12 对 SMMC-7721 细胞凋亡率的影响

A: 对照组; B: HY-12 组 ( $12.5 \times 10^{-6}$  mol/L); C: HY-12 组 ( $25 \times 10^{-6}$  mol/L); D: HY-12 组 ( $50 \times 10^{-6}$  mol/L)

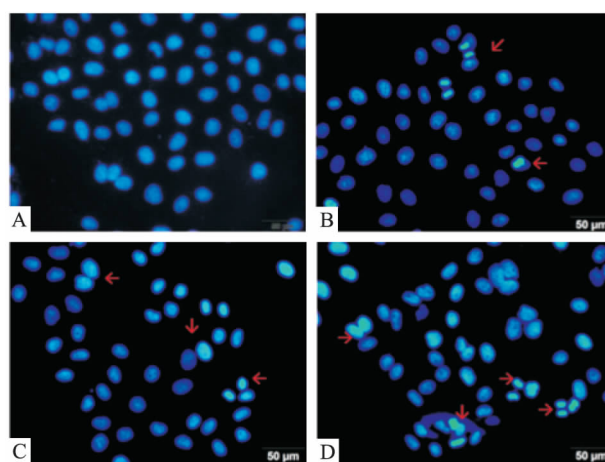


图 3 HY-12 对 SMMC-7721 细胞形态的影响  $\times 200$

A: 对照组; B: HY-12 组 ( $12.5 \times 10^{-6}$  mol/L); C: HY-12 组 ( $25 \times 10^{-6}$  mol/L); D: HY-12 组 ( $50 \times 10^{-6}$  mol/L)

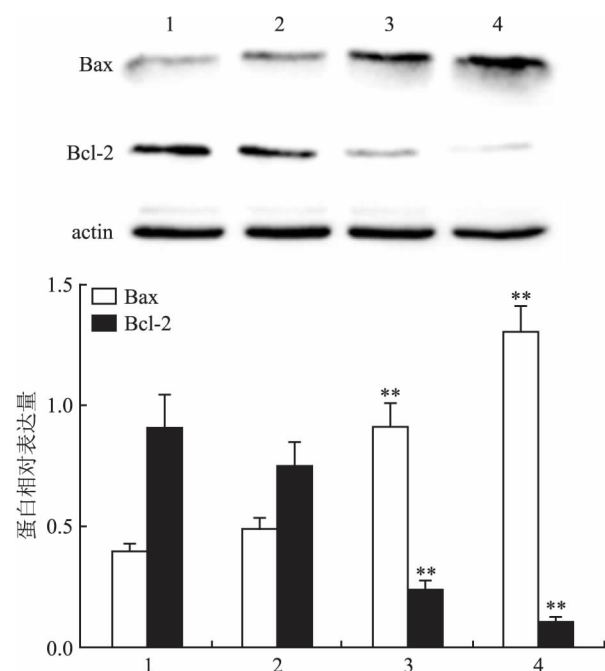


图 4 HY-12 对 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

1: 对照组; 2: HY-12 组 ( $12.5 \times 10^{-6}$  mol/L); 3: HY-12 组 ( $25 \times 10^{-6}$  mol/L); 4: HY-12 组 ( $50 \times 10^{-6}$  mol/L); 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

### 3 讨论

肝癌是一种全球性的健康难题,并且发病率逐年上升,在美国、德国等国家过去 20 年里病例数翻了一番<sup>[7]</sup>。尽管已了解绝大多数的危险因素,  $< 1$  cm 的肿瘤也有可能被诊断和治愈。但是本研究依然没有胜券打赢这场战斗。目前肝癌的治疗手段主要分为两大类,一类是可能治愈的,包括肝移植、外

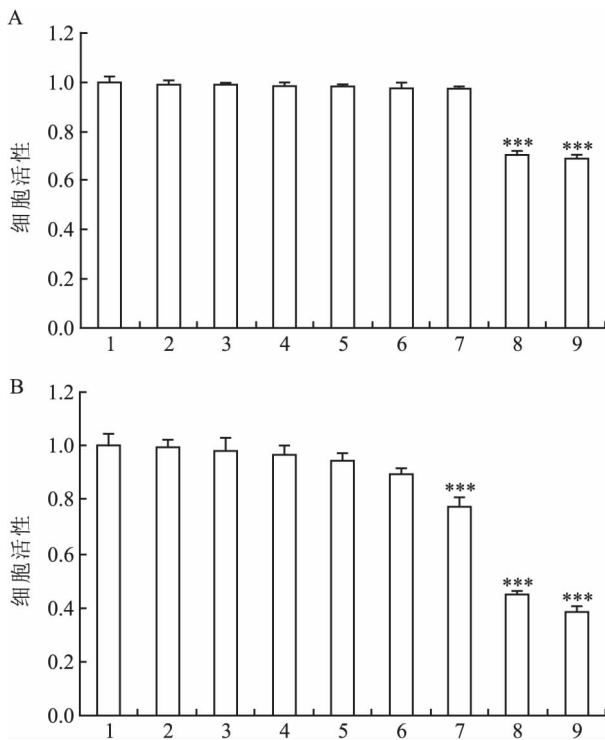


图5 HY-12 对其他肝癌细胞株增殖的抑制作用

A: HY-12 对 HepG2 细胞存活率的影响; B: HY-12 对 BEL-7402 细胞存活率的影响; 1: 对照组; 2: HY-12 组 (1.56 × 10<sup>-6</sup> mol/L); 3: HY-12 组 (3.125 × 10<sup>-6</sup> mol/L); 4: HY-12 组 (6.25 × 10<sup>-6</sup> mol/L); 5: HY-12 组 (12.5 × 10<sup>-6</sup> mol/L); 6: HY-12 组 (25 × 10<sup>-6</sup> mol/L); 7: HY-12 组 (50 × 10<sup>-6</sup> mol/L); 8: HY-12 组 (80 × 10<sup>-6</sup> mol/L); 9: HY-12 组 (100 × 10<sup>-6</sup> mol/L); 与对照组比较: \*\*\* P < 0.001

科切除和肝脏消融术; 另一类就是维持性治疗手段, 包括动脉栓塞、动脉化疗栓塞、射频消融法及药物治疗法。尤其对于中晚期肝癌患者药物维持治疗是最有效改善生活质量延长寿命的方法。但是目前索拉非尼是唯一可以使晚期肝癌患者生存受益的化学药物<sup>[8]</sup>。并且化学药物的应用多伴随着严重的毒副作用, 因此人们开始把目光移向植物中提取的天然化合物。已有大量文献<sup>[3]</sup>报道橙皮素具有体内外抗肿瘤活性和体外通过活性氧分子促进肝癌细胞凋亡。

细胞凋亡是一种不同于坏死的细胞自主的程序性死亡, 作为一种细胞的基本的生命活动, 其可以清除对机体有害的或者机体不再需要的细胞, 因此对维持内环境稳态有及其重要的作用。正常人体细胞的生长受到精确的调控, 增殖和凋亡保持平衡状态。但是肿瘤细胞由于凋亡受到抑制而获得了无限生长的特性。本实验通过 Hoechst 33342 染色和 Annexin V/PI 双染法从定性和定量两方面验证了 HY-12 对

肝癌细胞 SMMC-7721 具有促凋亡作用。

橙皮素的体外抗肿瘤作用使用浓度一般是 100 × 10<sup>-6</sup> mol/L 或者 200 × 10<sup>-6</sup> mol/L 以上, 过高的药物浓度可能会对正常肝细胞产生毒性作用<sup>[3]</sup>。本实验选取的 3 个浓度 12.5 × 10<sup>-6</sup>、25 × 10<sup>-6</sup>、50 × 10<sup>-6</sup> mol/L 在 MTT 结果中对正常肝细胞活性是没有显著影响的, 但是可以有效抑制肿瘤细胞的增殖。

Bcl-2 基因家族是细胞凋亡过程中重要的调控者<sup>[9]</sup>。根据结构和功能将其分为 3 大类: 一类是具有 BH1-4 结构的 Bcl-2、Bcl-x1、Bcl-w、Mcl-1 等具有抗凋亡作用; 另一类是含有结构 BH1-3 的 Bax、Bak、Bad、Bid、Bim 等具有促凋亡作用, 还有一类是只有 BH3 结构, 通过调节上述蛋白起促凋亡作用<sup>[10]</sup>。其中 Bcl-2 与 Bax 的比值就像是启动细胞凋亡的开关。Bax 可以形成同源二聚体, 具有促凋亡作用。但是在肿瘤细胞中, Bcl-2 过表达, 与 Bax 形成异二聚体, 发挥凋亡抑制作用。当同种细胞系所有细胞中异二聚体比值达到 50% 以上时, 细胞就会呈现出抗凋亡。而当同源二聚体达到 80% 以上时, 在适当死亡信号诱导下会出现凋亡。

凋亡主要有两条相互独立的途径, 一条是死亡受体转导途径, 即凋亡细胞表面分布有可以接收促凋亡信号的受体, 进而激活 caspase 蛋白, 诱导细胞凋亡; 另一条就是线粒体-细胞色素 C 途径。而 Bcl-2 和 Bax 的比值影响着死亡受体对死亡信号的敏感性, 也决定着线粒体膜上通道的开放情况。也就是说 Bcl-2 和 Bax 的比值是上述两条通路的核心。本实验通过 Western blot 法检测显示 HY-12 在 12.5 × 10<sup>-6</sup>、25 × 10<sup>-6</sup>、50 × 10<sup>-6</sup> mol/L 3 个浓度下的确可以增加 Bax、减少 Bcl-2 蛋白质水平的表达, 并且呈剂量依赖性。这些实验结果表明 HY-12 可能作为治疗肝癌的新型化疗药物。

### 参考文献

- [1] Forner A, Llovet J M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet 2012, 379(9822): 1245-55.
- [2] Zhang J, Song J, Wu D, et al. Hesperetin induces the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via mitochondrial pathway mediated by the increased intracellular reactive oxygen species, ATP and calcium [J]. Med Oncol, 2015, 32(4): 101.
- [3] Chaveli-López B. Oral toxicity produced by chemotherapy: a systematic review [J]. J Clin Exp Dent, 2014, 6(1): e81-90.
- [4] Lin X, Kong L N, Huang C, et al. Hesperetin derivative-7 inhibits PDGF-BB-induced hepatic stellate cell activation and proliferation by targeting Wnt/β-catenin pathway [J]. Int Immunopharmacol 2015, 25(2): 311-20.

- [5] Ma H ,Feng X ,Ding S. Hesperetin attenuates ventilator-induced acute lung injury through inhibition of NF- $\kappa$ B-mediated inflammation [J]. *Eur J Pharmacol* ,2015 ,769:333-41.
- [6] Ahmadi A ,Shadboorestan A ,Nabavi S F , et al. The role of hesperidin in cell signal transduction pathway for the prevention or treatment of cancer [J]. *Curr Med Chem* ,2015 ,22(30) :3462-71.
- [7] Trojan J ,Zangos S ,Schnitzbauer A A . Diagnostics and treatment of hepatocellular carcinoma in 2016: standards and developments [J]. *Visc Med* ,2016 ,32(2) :116-20.
- [8] Moriguchi M ,Umemura A ,Itoh Y. Current status and future prospects of chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Clin J Gastroenterol* ,2016 ,9(4) :184-90.
- [9] Vervliet T ,Parys J B ,Bultynck G. Bcl-2 proteins and calcium signaling: complexity beneath the surface [J]. *Oncogene* ,2016 ,35(39) :5079-92.
- [10] Delbridge A R ,Grabow S ,Strasser A , et al. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies [J]. *Nat Rev Cancer* ,2016 ,16(2) :99-109.

## Apoptosis-inducing effect of hesperitin derivatives on human hepatoma cell line SMMC-7721

Zhao Yuxin ,Sun Yingyin ,Huang Cheng , et al

(*School of Pharmacy Anhui Medical University; Institute for Liver Diseases of Anhui Medical University; Anhui Institute of Innovative Drugs , Hefei 230032*)

**Abstract Objective** This experiment take hesperitin as the prototype , synthesize a new compound HY-12. To explore the anti-cancer activity of HY-12 on SMMC-7721 cells and preliminary discussed its mechanism. **Methods** MTT assay was used to detect the effect of HY-12 on cell proliferation rate and then the  $IC_{50}$  was calculated. According to the results , 24 h and three concentrations of HY-12 ( $12.5 \times 10^{-6}$  ,  $25 \times 10^{-6}$  ,  $50 \times 10^{-6}$  mol/L) for the following experiments were chosen. Apoptotic ratio was measured by flow cytometer after Annexin V/PI staining. Prepared the cell-climbing slide , and then the apoptosis morphological changes were observed after Hoechst 33342 staining. The expression of Bcl-2 and Bax were measured by Western blot. **Results** ① HY-12 had inhibitory effect on proliferation of SMMC-7721 under the condition of no obvious significance on liver cell activity , which was time and dose dependent , and half inhibiting rate were  $41.7 \times 10^{-6}$  ,  $38.7 \times 10^{-6}$  ,  $31.36 \times 10^{-6}$  mol/L at three time points. ② The result of flow cytometer indicated that HY-12 could increase the apoptotic ratio of SMMC-7721 cell with time and dose dependent. ③ After treatment with indicated concentrations of HY-12 , light blue condensed nuclei present as bicornuous were observed by staining with Hoechst 33342. ④ According to Western blot , the expression of Bax were increased and conversely Bcl-2 were decreased in HY-12 treated groups. **Conclusion** The new compound derivative from hesperitin could inhibit the proliferation of SMMC-7721 cells *in vitro* , its mechanism is probably inducing cell apoptosis by regulating Bcl-2 , Bax expression , indicating that HY-12 might be a candidate for the treatment of hepatocellular carcinoma.

**Key words** hepatocellular carcinoma ; human hepatoma cell line SMMC-7721 ; hesperitin ; Bcl-2 ; Bax