

## 硫酸高乌甲素对人肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡与细胞周期的影响

马君义<sup>1,2</sup>, 韩小芬<sup>1</sup>, 陈香玲<sup>1</sup>, 后春静<sup>1</sup>, 朱建朝<sup>1</sup>, 杨翠霞<sup>1</sup>, 郭红云<sup>3</sup>

(1. 西北师范大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 西北师范大学, 甘肃特色植物有效成分制品工程技术研究中心, 甘肃 兰州 730070; 3. 甘肃省医学科学研究所, 甘肃 兰州 730050)

**摘要:** 目的 探讨硫酸高乌甲素对人肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响。方法 用不同质量浓度的硫酸高乌甲素作用于体外培养的 HepG2 细胞, 采用细胞计数试剂盒 (Cell Counting Kit-8, CCK-8) 法检测硫酸高乌甲素对 HepG2 细胞的增殖抑制能力, Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测硫酸高乌甲素对 HepG2 细胞凋亡的影响, PI 单染流式细胞术检测硫酸高乌甲素对 HepG2 细胞周期的影响。结果 硫酸高乌甲素可抑制 HepG2 细胞的增殖, 且存在明显的浓度依赖关系 ( $r=0.9865$ ,  $P<0.01$ ), 其对 HepG2 细胞的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $0.423\text{ mg/mL}$ ; 流式细胞术检测显示, 硫酸高乌甲素作用 48 h 后, HepG2 细胞出现明显的凋亡细胞群, 且细胞凋亡率随硫酸高乌甲素质量浓度的增大而逐渐升高; 实验组处于 S 期的细胞数较对照组减少,  $G_0/G_1$  期的细胞较对照组增多。结论 硫酸高乌甲素对人肝癌 HepG2 细胞的体外增殖具有抑制作用, 可改变细胞周期分布, 并诱导其凋亡。

**关键词:** 硫酸高乌甲素; HepG2 细胞; 增殖; 凋亡; 细胞周期

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2017)09-1940-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2017.09.039

高乌甲素是从毛茛科乌头属植物高乌头根中提取分离的一种单酯型降二萜二萜类生物碱, 临床常用其氢溴酸盐, 具有显著的抗炎消肿、降温解热与局部麻醉作用, 镇痛效果与哌替啶相当, 是氨基比林的 7 倍, 且药效维持时间长, 无致畸、致突变作用, 也不会发生蓄积中毒<sup>[1-4]</sup>, 是优良的非成瘾性镇痛药, 广泛用于癌痛和术后镇痛。研究表明, 高乌甲素与氢溴酸高乌甲素还具有抗肿瘤、抗心律失常等药理作用<sup>[5-8]</sup>, 但后者溶解度低、起效慢, 镇痛总有效率及显效率不高, 引入  $SO_4^{2-}$  等阴离子可改变高乌甲素的溶解性和脂溶系数, 提高其镇痛效果与生物利用度<sup>[9]</sup>。

本研究用不同质量浓度的硫酸高乌甲素作用于体外培养的人肝癌 HepG2 细胞, 采用 CCK-8 法检测硫酸高乌甲素对 HepG2 细胞的增殖抑制能力, 运用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术测定硫酸高乌甲素对 HepG2 细胞凋亡的影响, 通过 PI 单染流式细胞术检测硫酸高乌甲素对 HepG2 细胞周期分布的影响, 并探讨其可能的作用机制, 以期对硫酸高乌甲素的临床应用提供药理依据。

### 1 仪器与试剂

1.1 仪器 MB-530 酶标仪 (深圳松汇科技发展有限公司); IX51 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); BD 流式细胞仪 (赛维斯科科技有限公司); 2406-2  $CO_2$  培养箱 (美国 Shel-Lab 公司); Allegra X-42R 台式低温高速离心机 (美国 Beckman Coulter 公司); FA 2004 万分之一电子天平 (天津市天马仪器厂)。

1.2 试剂 硫酸高乌甲素 (参考文献 [9] 的方法制备, 含量  $>98.2\%$ ); 氢溴酸高乌甲素 (甘肃新兰药业集团有限责任公司提供, 批号 20141115, 含量  $>97.7\%$ ); RPMI 1640 培养基 (北京博艾尔科技有限公司, 批号 20130622); 胰蛋白酶 (北京博艾尔科技有限公司, 批号 20130307); 胎牛血清 (浙江天杭生物科技有限公司, 批号 20131207); CCK-8 试剂盒 (日本同仁化学研究所, 批号 JV872); 青、链霉素双抗溶液 (上海麦约尔生物技术有限公司, 批号 20130418); Annexin V-FITC/PI 检测试剂盒 (北京宝赛生物技术有限公司, 批号 20140621); PI 试剂盒 (北京宝赛生物技术有限公司, 批号 20140518); 磷酸盐缓冲液 (PBS) (上海乔羽生物科技有限公司, 批号 20110304)。其余试剂均为分析纯; 水为超纯水。

1.3 细胞 人肝癌 HepG2 细胞株 (甘肃省医学科学研究所)。

### 2 方法

2.1 人肝癌 HepG2 细胞培养 人肝癌 HepG2 细胞培养于含 10% 胎牛血清、青霉素和链霉素各  $100\text{ U/mL}$  的 RPMI-1640 培养基中, 于  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $CO_2$  以及饱和湿度的  $CO_2$  培养箱中传代培养, 每 2 d 传代 1 次, 取对数生长期的细胞。

2.2 实验分组 以氢溴酸高乌甲素 ( $0.56$ 、 $0.64$ 、 $0.72$ 、 $0.80$ 、 $0.88\text{ mg/mL}$ ) 处理的 HepG2 细胞为阳性对照组; 硫酸高乌甲素 ( $0.30$ 、 $0.34$ 、 $0.38$ 、 $0.42$ 、 $0.46$ 、 $0.56\text{ mg/mL}$ ) 处理的 HepG2 细胞为试药组; 未经任何药物处理的 HepG2

收稿日期: 2017-03-27

基金项目: 甘肃省基础研究创新群体计划项目 (1506RJIA116)

作者简介: 马君义 (1967—), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事药物新剂型与新技术、资源植物化学、生物高分子研究。

Tel: (0931) 7975153, E-mail: skymjy@nwnu.edu.cn

细胞为阴性对照组，每个质量浓度设3个复孔。

2.3 CCK-8 法测定细胞增殖抑制率 参照试剂盒说明书，将对数生长期的 HepG2 细胞用胰蛋白酶消化，离心，用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基配成细胞悬液，接种至 96 孔板使细胞密度为  $5 \times 10^4$  /mL，在饱和湿度、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养 24 h 使细胞贴壁。按“2.2”项分组所需终质量浓度加药，阴性对照组仅加 pH 7.4 的 PBS，空白对照组为完全培养基，每个质量浓度设置 3 个复孔，CCK-8 于处理后 48 h 加入，每孔 10 μL，相同条件下继续培养 2 h，用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔的 D 值（吸光度），按下式计算抑制率。抑制率 = (1 - 试药组 D 值 / 阴性对照组 D 值) × 100%。绘制细胞增殖抑制曲线，计算 IC<sub>50</sub>。

2.4 Annexin V-FITC/PI 双标记法检测细胞凋亡率 参照试剂盒说明书，将 HepG2 细胞以密度  $1 \times 10^5$  /mL 接种于 6 孔培养板中，培养 24 h 贴壁后，更换新鲜培养基。按 0.34、0.38、0.42 mg/mL 终质量浓度加药，对照组用 pH 7.4 的 PBS，处理 48 h 后，胰蛋白酶消化，制单细胞悬液，离心，PBS 洗涤 2 次，吸尽上清，加入 100 μL 结合缓冲液重悬细胞。分别加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI，混匀，室温避光反应 10 min，再加入 400 μL 结合缓冲液，用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.5 PI 单标记法检测细胞周期分布 参照试剂盒说明书，将 HepG2 细胞以密度  $1 \times 10^5$  /mL 接种于 6 孔培养板中，培养 24 h 贴壁后，更换新鲜培养基。按 0.34、0.38、0.42 mg/mL 终质量浓度加药，对照组用 pH 7.4 的 PBS，处理 48 h 后，胰蛋白酶消化，制单细胞悬液，离心，PBS 洗涤 2 次，加入 -20 °C 预冷的 70% 的乙醇 3 mL，于 -20 °C 固定 24 h 以上，离心，PBS 洗涤 2 次，吸尽上清，加入 200 μL 0.1 mmol/L 的乙二胺四乙酸重悬细胞，37 °C 下避光孵育 30 min。加入 35 μL 2% Triton-100 和 114 μL 150 μg/mL

的 PI，轻轻混匀，室温避光反应 10 min。经尼龙网过滤后，流式细胞仪检测并分析细胞周期分布。

2.6 统计学处理 所有数据结果均为计量单位，应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。采用单因素方差分析，结果以  $\bar{x} \pm s$  表示， $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

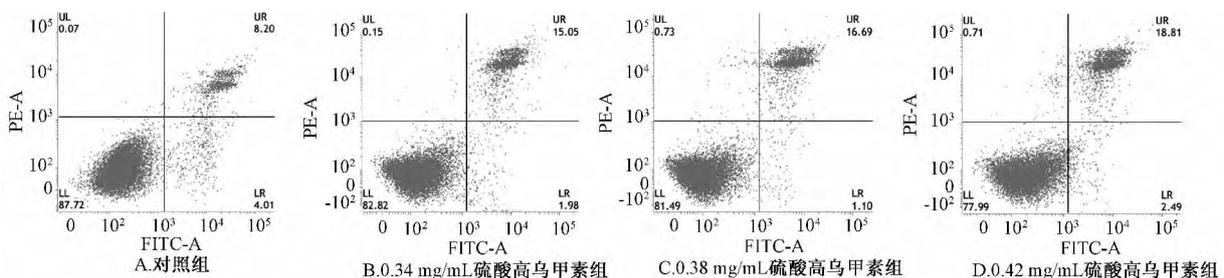
3.1 硫酸高乌甲素对 HepG2 细胞增殖的抑制作用 采用 CCK-8 试剂盒检测了硫酸高乌甲素、氢溴酸高乌甲素给药 48 h 后对人肝癌 HepG2 细胞增殖能力的影响，发现氢溴酸高乌甲素在较大的质量浓度范围内对 HepG2 细胞的增殖产生一定的抑制作用，但在 0.88 mg/mL 的质量浓度下仅为 (26.99 ± 0.60)%；硫酸高乌甲素对 HepG2 细胞的增殖有明显的抑制作用，在相对较低的质量浓度 (0.30 ~ 0.56 mg/mL) 范围内，其抑制率为 31.93% ~ 78.44%，呈现一定的剂量依赖性 ( $R = 0.9865$ ,  $P < 0.01$ )，抑制作用强于相同剂量的氢溴酸高乌甲素，其作用 48 h 对 HepG2 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 0.423 mg/mL。

3.2 硫酸高乌甲素对 HepG2 细胞凋亡的影响 Annexin V-FITC/PI 双标记法检测结果显示，给予 HepG2 细胞 0.34、0.38、0.42 mg/mL 硫酸高乌甲素培养 48 h，细胞凋亡率分别为 (16.18 ± 1.43)%、(17.51 ± 0.25)%、(20.29 ± 1.40)%，呈现出一定的浓度依赖性，表明硫酸高乌甲素能诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡。见表 1、图 1。

表 1 硫酸高乌甲素作用 48 h 对 HepG2 细胞周期分布和细胞凋亡的影响 ( $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	细胞周期分布/%			凋亡率/%
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	
对照组	-	61.92	38.08	0.00	12.33 ± 0.15
硫酸高乌甲素组	0.34	63.29	36.63	0.08	16.18 ± 1.43
硫酸高乌甲素组	0.38	65.62	34.36	0.02	17.51 ± 0.25*
硫酸高乌甲素组	0.42	68.24	31.76	0.00	20.29 ± 1.40**

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$



注: UL 区为细胞坏死, UR 区为晚期凋亡, LL 区为细胞存活, LR 区为早期凋亡。凋亡总计 = LR 区 + UR 区

图 1 硫酸高乌甲素作用 48 h 对 HepG2 细胞凋亡的诱导作用 ( $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

3.3 硫酸高乌甲素对 HepG2 细胞周期分布的影响 PI 单标记法检测结果显示，给药 48 h，与对照组 HepG2 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期占比 (61.92%) 相比，随着硫酸高乌甲素质量浓度 (0.34、0.38、0.42 mg/mL) 的升高，HepG2 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期所占比例逐渐升高 (63.29%、65.62%、68.24%)，S 期所占比例逐渐降低 (36.63%、34.36%、31.70%)，

表现出明显的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞。见表 1、图 2。

### 4 讨论

氢溴酸高乌甲素作为一种非成瘾性镇痛药，具有良好的镇痛效果，并应用于临床<sup>[10]</sup>。文献报道，氢溴酸高乌甲素对小鼠肝癌、S180 均有抑制作用<sup>[11-12]</sup>，对人类急性白血病细胞株 HL-60 具有一定程度的诱导分化和凋亡的双重作

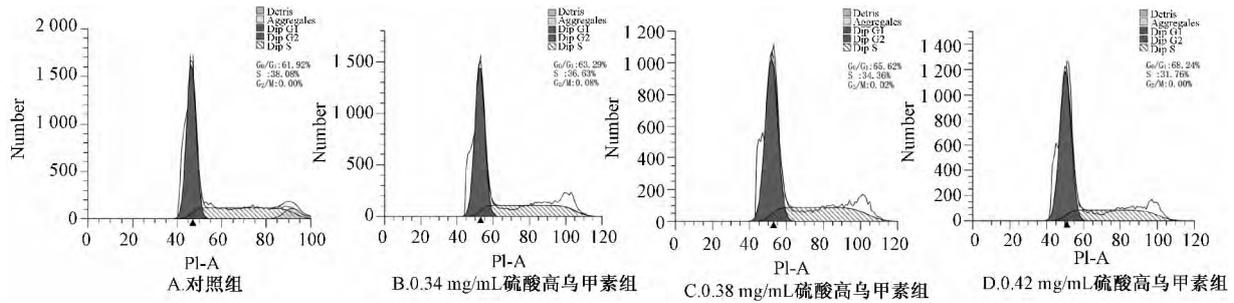


图2 硫酸高乌甲素作用48 h对HepG2细胞周期分布的影响

用<sup>[13]</sup>。高乌甲素与奥沙利铂结合使用时,对人肺癌 A549 细胞凋亡有着增敏的作用<sup>[14]</sup>。

硫酸高乌甲素可改变高乌甲素的溶解性和脂溶系数,提高其镇痛效果与生物利用度。盛良翻等<sup>[15]</sup>研究表明,0.48~7.68 mg/mL 高乌甲素对人非小细胞肺癌 A549 细胞的抑制作用差异具有统计学意义,而0.06~0.24 mg/mL 高乌甲素对 A549 细胞抑制率与对照组相比无明显差异。本研究采用 CCK-8 法考察了0.30~0.56 mg/mL 硫酸高乌甲素对体外培养的人肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用,结果显示,硫酸高乌甲素可呈剂量依赖性地抑制 HepG2 细胞的增殖 ( $r=0.9865$ ,  $P<0.01$ ),且其抑制作用强于相同剂量的氢溴酸高乌甲素,其作用48 h对 HepG2 细胞的  $IC_{50}$  为0.423 mg/mL。

由于硫酸高乌甲素对 HepG2 细胞具有明显的增殖抑制作用,考虑到其抑制作用可能与其能够诱导细胞的凋亡有关,本实验采用 AnnexinV-FITC/PI 双标记法和 PI 单标记法检测了 HepG2 细胞凋亡与细胞周期分布的情况。结果显示,随着硫酸高乌甲素质量浓度的增加, HepG2 细胞  $G_0/G_1$  期细胞所占比例逐渐上升,而 S 期所占比例逐渐下降,细胞凋亡率逐渐升高,这与郑富霞<sup>[16]</sup>研究高乌甲素对人非小细胞肺癌 A549 细胞株增殖、凋亡、细胞周期影响的结果相一致。抗肿瘤化合物可以通过影响细胞周期的正常分布,从而抑制肿瘤细胞的增殖,或直接杀伤肿瘤细胞。

硫酸高乌甲素具有抗肿瘤作用,其作用机制可能与诱导 HepG2 肿瘤细胞凋亡、细胞周期阻滞有关,本研究可为开发相关抗肿瘤制剂提供了实验依据。

参考文献:

[1] Wang J L, Shen X L, Chen Q H, et al. Structure-analgesic activity relationship studies on the C<sub>18</sub>- and C<sub>19</sub>-diterpenoid alkaloids[J]. *Chem Pharm Bull*, 2009, 57(8): 801-807.  
[2] Wang Y Z, Xiao Y Q, Zhang C, et al. Study of analgesic and anti-inflammatory effects of lappaconitine gelata[J]. *J Tradit Chin Med*, 2009, 29(2): 141-145.

[3] Ou S, Zhao Y D, Xiao Z, et al. Effect of lappaconitine on neuropathic pain mediated by P2X<sub>3</sub> receptor in rat dorsal root ganglion[J]. *Neurochem Int*, 2011, 58(5): 564-573.  
[4] 苏帆. 高乌甲素的临床应用及研究进展[J]. *实用疼痛学杂志*, 2009, 5(1): 50-54.  
[5] 魏华波, 张宝华, 谭兵, 等. 氢溴酸高乌甲素的药理作用及临床应用研究进展[J]. *重庆医学*, 2014, 43(20): 2660-2662.  
[6] Tolstikova T G, Bryzgalov A O, Sorokina I V, et al. Solification with hydrobromic acid as a factor defining the antiarrhythmic effect of lappaconitine derivatives[J]. *Lett Drug Des Discov*, 2009, 6(7): 475-477.  
[7] 孔古娅, 卿德华, 楚延. 氢溴酸高乌甲素的抗心律失常作用[J]. *四川生理科学杂志*, 2001, 24(4): 175-177.  
[8] 王培德, 马学民, 张慧灵, 等. 刺乌头碱对麻醉大鼠心电图的影响及其抗实验性心律失常作用[J]. *中国药理学通报*, 1997, 13(3): 263-265.  
[9] Sun W X, Zhang S, Wang H, et al. Synthesis, characterization and antinociceptive properties of the lappaconitine salts[J]. *Med Chem Res*, 2015, 24(9): 3474-3482.  
[10] 于基志, 张白晶, 蒋雪涛. 高乌甲素的临床应用[J]. *第二军医大学学报*, 2005, 26(7): 822-824.  
[11] 胡建媚, 陈凤仪. 高乌甲素对 S<sub>180</sub> 荷瘤小鼠的免疫调节作用研究[J]. *中国药房*, 2008, 19(30): 2343-2344.  
[12] 林妮, 肖柳英, 林培英, 等. 氢溴酸高乌甲素抗肿瘤的实验研究[J]. *中医研究*, 2005, 18(10): 16-17.  
[13] 伍耀衡, 宁异真, 许建邦, 等. 参附注射液、高乌甲素注射液诱导白血病细胞株 HL-60 分化、凋亡的研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2008, 25(2): 131-137.  
[14] Xu M, Sheng L H, Wang L, et al. Combination of lappaconitine and oxaliplatin against lung cancer *in vitro* [J]. *Lat Am J Pharm*, 2013, 32(10): 1433-1438.  
[15] 盛良翻, 徐萌, 徐立群, 等. 高乌甲素对非小细胞肺癌体外杀伤作用及其分子机制[J]. *中药材*, 2014, 37(5): 840-843.  
[16] 郑富霞. 高乌甲素对人非小细胞肺癌 A549 细胞株的作用及机制[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(12): 3231-3232.