

芍药苷通过调节Caspase3活性及核因子κB信号通路诱导HepG2肝癌细胞凋亡

白春阳, 王红雷

■背景资料

肝癌是世界上常见恶性肿瘤之一, 目前其主要治疗手段为手术, 但术后复发、转移率高。而芍药苷(paeoniflorin, PF)是从毛茛科植物芍药(*Paeonia Lactiflora Pall*)中提取的有效单体成分, 具有抗各种肿瘤活性, 因此本文通过一定剂量芍药苷作用于肝癌细胞HepG2, 并探讨其机制。

白春阳, 南阳市第二人民医院医务部 河南省南阳市 473012
 王红雷, 南阳市第二人民医院肝胆外科 河南省南阳市 473012

白春阳, 主治医师, 主要从事消化内科的研究。

作者贡献分布: 本文主要由白春阳与王红雷共同写作完成。

通讯作者: 白春阳, 主治医师, 473012, 河南省南阳市建设路66号, 南阳市第二人民医院医务部。

baichunyangwei@yeah.net

电话: 0377-61609970

收稿日期: 2015-04-16 修回日期: 2015-05-10

接受日期: 2015-06-25 在线出版日期: 2015-08-08

Paeoniflorin induces HepG2 cell apoptosis by regulating Caspase3 activation and nuclear factor kappa B signaling pathway

Chun-Yang Bai, Hong-Lei Wang

Chun-Yang Bai, Medical Service Division, Nanyang Second People's Hospital, Nanyang 473012, He'nan Province, China

Hong-Lei Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, Nanyang Second People's Hospital, Nanyang 473012, He'nan Province, China

Correspondence to: Chun-Yang Bai, Attending Physician, Medical Service Division, Nanyang Second People's Hospital, 66 Jianshe East Road, Nanyang 473012, He'nan Province, China. baichunyangwei@yeah.net

Received: 2015-04-16 Revised: 2015-05-10

Accepted: 2015-06-25 Published online: 2015-08-08

Abstract

AIM: To explore the effect of paeoniflorin on apoptosis of HepG2 cells and the underlying mechanisms.

METHODS: HepG2 cells were treated with

different concentrations of paeoniflorin (0.5, 1.0, and 2.0 mg/mL). The viability of cells was detected by MTT assay. Apoptotic cells were detected by Annexin V-FITC flow cytometry. Caspase3 activity was measured with a colorimetric assay kit. The expression of nuclear factor kappa-B (NF-κB) related proteins was detected by Western blot.

RESULTS: Compared with the control group, paeoniflorin at concentrations of 0.5, 1.0, and 2.0 mg/mL could reduce cell viability, and the inhibitory rate peaked at 48 h ($P < 0.05$). Compared with the control group, paeoniflorin at concentrations of 0.5, 1.0, and 2.0 mg/mL could promote cell apoptosis, increase Caspase3 activity, and suppress NF-κB p65 phosphorylation ($P < 0.05$). Paeoniflorin at concentrations of 1.0 and 2.0 mg/mL could suppress IκBα phosphorylation ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Paeoniflorin induces apoptosis of HepG2 cells possibly *via* the NF-κB signal pathway.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Paeoniflorin; HepG2 cells; Apoptosis; Nuclear factor kappa B signaling pathway; Phosphorylation

Bai CY, Wang HL. Paeoniflorin induces HepG2 cell apoptosis by regulating Caspase3 activation and nuclear factor kappa B signaling pathway. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(22): 3582-3586 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/3582.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i22.3582>

■同行评议者

李孟森, 教授, 海南医学院, 海南省肿瘤发生和干预重点实验室

摘要

目的: 探讨芍药苷(paeoniflorin)对HepG2肝癌细胞凋亡诱导作用, 并考察其作用机制。

方法: 用不同浓度芍药苷(0.5、1.0、2.0 mg/mL)对HepG2肝癌细胞进行给药, MTT法检测细胞活力, Annexin V-FITC流式细胞法检测细胞凋亡情况, 酶标法检测Caspase3活性, Western blot检测核因子κB(nuclear factor kappa-B, NF-κB)信号通路相关蛋白表达。

结果: 与对照组比较, 0.5、1.0、2.0 mg/mL芍药苷能逐渐降低HepG2肝癌细胞活力, 且在48 h, 抑制率最高($P<0.05$); 与对照组比较, 0.5、1.0、2.0 mg/mL芍药苷能逐渐促进HepG2肝癌细胞凋亡并提高Caspase3活性($P<0.05$), 还能显著抑制IκBα磷酸化, 从而促进细胞凋亡; 并且1.0、2.0 mg/mL芍药苷能抑制细胞核内NF-κB p65磷酸化($P<0.05$)。

结论: PF可能通过激活Caspase3活性以及抑制NF-κB p65和pIκBα表达促进HepG2细胞凋亡。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 芍药苷; HepG2肝癌细胞; 凋亡; 核因子κB信号通路; 磷酸化

核心提示: 芍药苷可通过抑制核因子κB(nuclear factor kappa-B, NF-κB)信号通路, 来抑制胃癌细胞增殖, 且芍药苷具有抗肝癌作用; Caspase3及NF-κB活性促进细胞凋亡是治疗肿瘤的有效手段之一, 因此本文拟通过调节Caspase3活性及NF-κB信号通路来探讨芍药苷对肝癌细胞凋亡的抑制作用。

白春阳, 王红雷. 芍药苷通过调节Caspase3活性及核因子κB信号通路诱导HepG2肝癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2015; 23(22): 3582–3586 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/3582.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i22.3582>

0 引言

肝癌是世界上常见恶性肿瘤之一, 目前其主要治疗手段为手术, 但术后复发、转移率高。因此, 寻求有效治疗肝癌, 降低复发率的药物成为研究热点。芍药苷(paeoniflorin, PF)是从毛茛科植物芍药(*Paeonia Lactiflora Pall*)中提取的有

效单体成分, 具有抗各种肿瘤活性^[1-4]。已有报道^[1]芍药苷可上调Bax、p53表达, 下调Bcl-2表达, 从而促进HepG2肝癌细胞凋亡, 但其具体机制还尚未可知。并且芍药苷可通过抑制核因子κB(nuclear factor kappa B, NF-κB)信号通路, 来抑制胃癌细胞增殖^[4,5], 因此本课题在此基础上探讨芍药苷是否也是通过抑制NF-κB信号通路, 来诱导HepG2肝癌细胞凋亡。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2肝癌细胞, 购自美国标准生物品收藏中心(American Type Culture Collection, ATCC), 细胞培养在含10%胎牛血清的DMEM培养基中。芍药苷购自中国药品生物制品检定所。其余的材料包括: 四唑盐试剂(MTT)(Sigma公司); BCA法蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术有限公司); ECL超敏发光液(碧云天生物技术有限公司); 小鼠p65抗体(碧云天生物技术有限公司); β-actin(碧云天生物技术有限公司); 兔核因子κB抑制因子α(nuclear factor of kappa B inhibitor alpha, IκBα)抗体(Epitmics公司); 兔抗pp65抗体(Epitmics公司); Caspase3分光光度法检测试剂盒(南京凯基生物技术有限公司); 胎牛血清(Gbico公司); DMEM培养基(Gbico公司); CO₂培养箱(Thermo Scientific公司); 超净工作台(Thermo Scientific公司); Tecan Infinite F200/M200型多功能酶标仪(瑞士TECAN集团公司); ChemiDoc™ XRS凝胶成像系统(Bio-Rad公司)。

1.2 方法

1.2.1 MTT实验: 将80%左右融合的HepG2肝癌细胞消化, 细胞浓度调整为 4×10^3 个细胞/mL, 接种, 37℃、50 mL/L CO₂培养箱中培养24 h。加入含PF[终浓度(0.5、1.0、2.0 mg/mL)]DMEM培养基, 继续培养24、48、72 h, 加MTT(5 mg/mL) 20 μL, 培养4 h后, 弃上清, 加DMSO 150 μL, 10 min左右后, 570 nm处测定吸光度(A)值。计算药物对细胞生长的抑制率。

1.2.2 Annexin V-FITC流式细胞法检测软骨细胞凋亡: 细胞培养同1.2.1, 培养48 h。加入含PF[终浓度(0.5、1.0、2.0 mg/mL)]DMEM培养基, 按照Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒说明书的方法, 用0.25%的胰蛋白酶(不含EDTA)消化, PBS洗涤, 2000 r/min离心5 min, 收集细胞; 加入Binding Buffer 500 μL悬浮细

■ 相关报道

朱开梅等报道八角中莽草酸可通过抑制NF-κB p65活性, 从而抑制人肝癌HepG2细胞增殖。本实验结果也表明芍药苷能抑制HepG2肝癌细胞NF-κBp65, IκBα蛋白磷酸化, 最终提高Caspase3活性, 诱导肿瘤细胞凋亡。

创新点

芍药苷可通过激活Caspase3活性以及抑制pp65和pI κ B α 表达促进HepG2细胞凋亡。

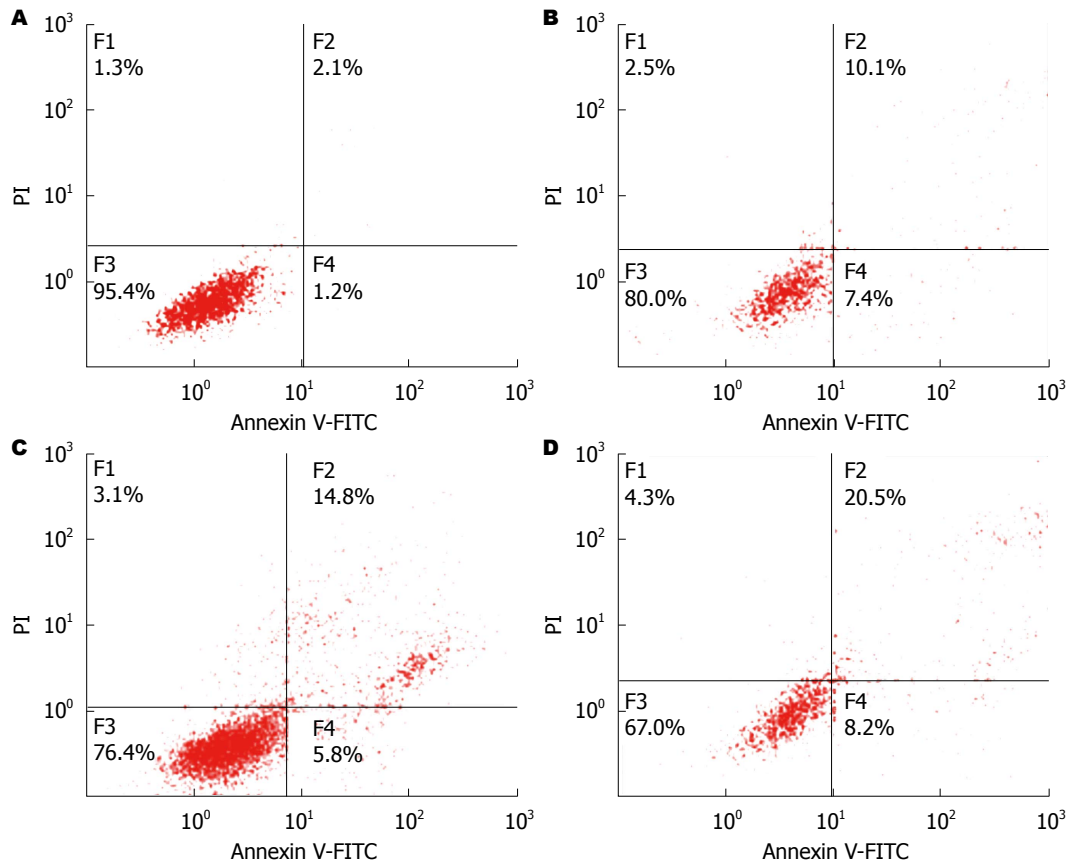


图1 不同浓度芍药苷对HepG2肝癌细胞凋亡诱导作用. A: 对照组; B: 0.5 mg/mL; C: 1.0 mg/mL; D: 2.0 mg/mL.

胞, 随后加入Annexin V-FITC 5 μ L混匀后, 加入PI 5 μ L, 混匀, 于室温避光反应5-15 min, 在1 h内进行流式细胞仪检测。

1.2.3 Caspase3酶活性检测: 按照Caspase3酶活性检测试剂盒说明书进行操作, 收集细胞, 裂解, 加底物, 显色, 于405 nm处测定A值。

1.2.4 Western blot收集细胞: 加入RIPA裂解液, 收获蛋白. 根据BCA试剂盒对蛋白浓度进行测定. 跑SDS凝胶电泳, 后湿法转膜. 孵一抗过夜, 二抗1 h, 后在膜上滴加ECL曝光液, 在凝胶成像系统中曝光. 用“Quantity one”软件对各抗体条带灰度值进行统计。

统计学处理 采用SPSS17.0统计分析, 所有数据至少重复3次, 并用mean \pm SD表示, 两组之间差异显著性经t检验, 以 $P<0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 芍药苷抑制HepG2肝癌细胞的增殖 如表1所示, 随着给药浓度的增加(0.5、1.0、2.0 mg/mL), 芍药苷对HepG2肝癌细胞抑制作用逐渐增强, 在2.0 mg/mL时抑制率最大($P<0.05$); 随着24、

48 h给药时间增加, 芍药苷对HepG2肝癌细胞抑制作用也逐渐增强, 其中48、72 h作用强度一致, 所以在后续实验中我们选取48 h作为给药浓度。

2.2 芍药苷对HepG2肝癌细胞凋亡诱导作用 与对照组比较, 0.5、1.0、2.0 mg/mL都能显著促进HepG2肝癌细胞凋亡(图1)。

2.3 芍药苷对HepG2肝癌细胞Caspase3活性的影响 如图2所示, 与对照组比较, 0.5、1.0、2.0 mg/mL芍药苷能提高HepG2肝癌细胞Caspase3活性, 并呈剂量依赖性, 具有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 芍药苷对HepG2肝癌细胞NF- κ B通路的影响 如图3所示, 芍药苷能抑制HepG2肝癌细胞细胞核NF- κ B p65蛋白磷酸化, 并呈剂量依赖性, 具有统计学意义($P<0.05$), 而对细胞核内p65表达无任何影响, 无统计学意义. 因此继续探讨NF- κ B p65上游蛋白的影响, 结果发现芍药苷对芍药苷能抑制HepG2肝癌细胞I κ B α 蛋白磷酸化, 并呈剂量依赖性, 具有统计学意义($P<0.05$), 对I κ B α 自身表达无任何影响(图4)。

表 1 芍药苷对HepG2肝癌细胞增殖抑制作用 (mean ± SD, %)

分组	剂量(mg/mL)	抑制率		
		24 h	48 h	72 h
对照组	0.0	0.1 ± 0.02	3.0 ± 0.3	3.1 ± 0.5
芍药苷	0.5	3.5 ± 0.08 ^a	14.5 ± 2.12 ^a	14.3 ± 2.47 ^a
	1.0	6.5 ± 0.15 ^a	23.7 ± 3.63 ^b	23.8 ± 3.82 ^b
	2.0	10.7 ± 1.19 ^b	35.3 ± 5.14 ^b	35.2 ± 4.31 ^b

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 对照组.

同行评价

本文研究内容新颖, 有一定的参考价值.

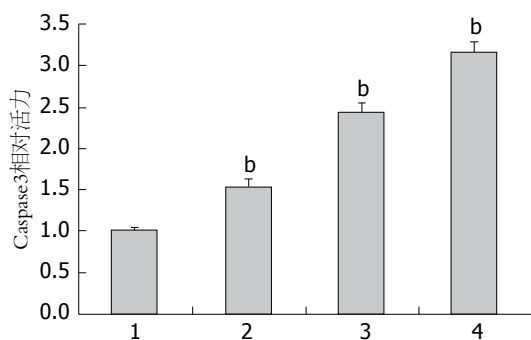


图 2 芍药苷对HepG2肝癌细胞Caspase3活性的影响. 1: 对照组; 2: 0.5 mg/mL; 3: 1.0 mg/mL; 4: 2.0 mg/mL. ^b*P*<0.01 vs 对照组.

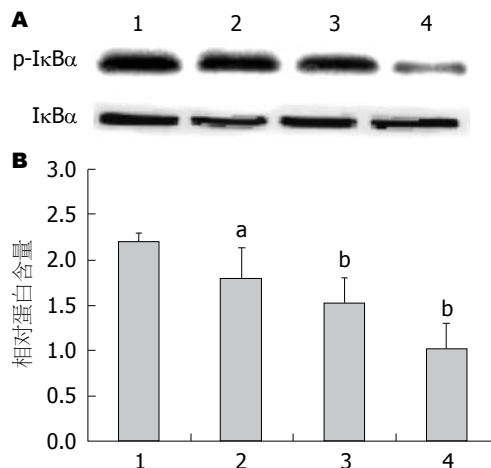


图 4 芍药苷对HepG2肝癌细胞IκBα磷酸化水平的影响. 1: 对照组; 2: 0.5 mg/mL; 3: 1.0 mg/mL; 4: 2.0 mg/mL. ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 对照组. IκBα: 核因子κB抑制因子α.

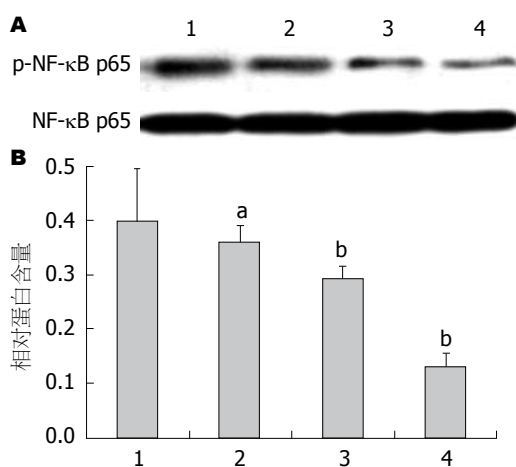


图 3 芍药苷对HepG2肝癌细胞NF-κB p65磷酸化水平的影响. A: Western blot结果; B: NF-κB p65蛋白相对表达量. 1: 对照组; 2: 0.5 mg/mL; 3: 1.0 mg/mL; 4: 2.0 mg/mL. ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 对照组. NF-κB: 核因子κB.

3 结论

肝癌是世界上常见恶性肿瘤之一, 其危害仅次于肺癌, 全球每年有约100万例死于肝癌, 其中50%在我国^[5-7]. 目前其主要治疗手段为手术, 但即使获得手术切除机会, 其复发、转移率依然相当高. 因此, 寻求有效治疗肝癌, 降低复发率的药物成为研究热点. 而很多的抗肿瘤药物, 包

括化疗药物、激素、生物制剂, 都能够引起肿瘤细胞发生凋亡. 凋亡对肿瘤的抑制起到重要作用, 并且抑制NF-κB活性促进细胞凋亡是治疗肿瘤的有效手段之一^[8]. 芍药苷可通过抑制NF-κB信号通路, 来抑制胃癌细胞增殖^[2,4], 所以本文拟尝试用不同浓度(0.5、1.0、2.0 mg/mL)芍药苷对HepG2肝癌细胞进行给药, 结果表明随着给药浓度的增加, 芍药苷可以逐渐地降低细胞活力, 抑制肿瘤细胞的增殖, 在48 h时其抑制率就可达到最高点. 与芍药苷对其他肿瘤细胞抑制作用浓度有稍许差别^[4,9], 这可能是各种肿瘤细胞抵抗外环境不同所造成的, 对各种药物敏感程度不一样所致的.

Caspase3是Caspase家族中最重要的凋亡执行者之一, 他被合成后通常以非活化的酶原形式存在于细胞质中, 在多种凋亡信号刺激下经蛋白水解作用被激活成活化形式, 可对多种蛋白底物进行降解, 从而在细胞凋亡过程中起关键作用, 被认为是整个凋亡级联反应的一个关键调节点^[10]. Caspase3在HepG2肝癌细胞中活性

高于给药组^[11-13], 在本研究中, 与对照组中对比, 芍药苷(0.5、1.0、2.0 mg/mL)剂量依赖性抑制Caspase3活性。

NF- κ B是一类广泛存在于肿瘤细胞内的重要转录因子, 是多信号转导途径的汇聚点, 参与组织细胞的免疫调节、炎症反应、生长分化和凋亡等^[14]。未受刺激时与I κ B结合, 当受到刺激时, I κ B磷酸化, 释放NF- κ B, 使之恢复转录活性并从细胞质转移到细胞核内, 调节相关基因的表达。NF- κ B在肝癌^[15]、胃癌^[16]、乳腺癌^[17]等肿瘤中都被激活, 过表达。在原发性肝癌中NF- κ B持续被激活, 与原发性肝癌肿瘤的发生发展及预后不良密切相关^[18], NF- κ B抑制剂PDTC可抑制NF- κ B活性, 抑制肿瘤细胞增殖^[19]。朱开梅等^[20]报道八角中莽草酸可通过抑制NF- κ B p65活性, 从而抑制人肝癌HepG2细胞增殖。本实验结果也表明芍药苷能抑制HepG2肝癌细胞NF- κ B p65、I κ B α 蛋白磷酸化, 最终提高Caspase3活性, 诱导肿瘤细胞凋亡。

因此可以得出PF可能通过激活Caspase3活性以及抑制pp65和pI κ B α 表达促进HepG2细胞凋亡。

4 参考文献

- 1 晏雪生, 李瀚旻, 彭亚琴, 明安萍. 芍药苷对人肝癌细胞HepG-2凋亡及其调控基因的影响. 中华中医药学刊 2007; 25: 1346-1347
- 2 Fang S, Zhu W, Zhang Y, Shu Y, Liu P. Paeoniflorin modulates multidrug resistance of a human gastric cancer cell line via the inhibition of NF- κ B activation. *Mol Med Rep* 2012; 5: 351-356 [PMID: 22051979 DOI: 10.3892/mmr.2011.652]
- 3 Lu JT, He W, Song SS, Wei W. Paeoniflorin inhibited the tumor invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma cells. *Bratisl Lek Listy* 2014; 115: 427-433 [PMID: 25077366]
- 4 方申存, 戴伟, 吴昊, 束永前, 刘平. 芍药苷对人胃癌SGC7901/VCR细胞增殖抑制作用及其机制研究. 南京医科大学学报(自然科学版) 2010; 30: 636-640
- 5 Chang H, Xu J, Mu Q, Qin C, Zhang Z, Wu T. Occult hepatocellular carcinoma: a case report of a special icteric-type hepatoma and literature review. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2010; 19: 690-693 [PMID: 19659667 DOI: 10.1111/j.1365-2354.2008.01035.x]
- 6 Wang YX, De Baere T, Idée JM, Ballet S. Transcatheter embolization therapy in liver cancer: an update of clinical evidences. *Chin J Cancer Res* 2015; 27: 96-121 [PMID: 25937772 DOI: 10.3978/j.issn.1000-9604.2015.03.03]
- 7 Bruix J, Han KH, Gores G, Llovet JM, Mazzaferro V. Liver cancer: Approaching a personalized care. *J Hepatol* 2015; 62: S144-S156 [PMID: 25920083 DOI: 10.1016/j.jhep.2015.02.007]
- 8 Baud V, Karin M. Is NF- κ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 33-40 [PMID: 19116625 DOI: 10.1038/nrd2781]
- 9 晏雪生, 李瀚旻, 彭亚琴, 明安萍. 芍药苷对人肝癌细胞HepG-2凋亡及其调控基因的影响. 中华中医药学刊 2007; 25: 1346-1347
- 10 Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6: 99-104 [PMID: 10200555 DOI: 10.1038/sj.cdd.4400476]
- 11 Xiang Q, Ma Y, Dong J, Shen R. Carnosic acid induces apoptosis associated with mitochondrial dysfunction and Akt inactivation in HepG2 cells. *Int J Food Sci Nutr* 2015; 66: 76-84 [PMID: 25265205 DOI: 10.3109/09637486.2014.953452]
- 12 Zhang H, Guo Z, Han L, You X, Xu Y. The antitumor effect and mechanism of taipenine A, a new C19-diterpenoid alkaloid from Aconitum taipenicum, on the HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line. *J BUON* 2014; 19: 705-712 [PMID: 25261656]
- 13 Sudan S, Rupasinghe HP. Flavonoid-enriched apple fraction AF4 induces cell cycle arrest, DNA topoisomerase II inhibition, and apoptosis in human liver cancer HepG2 cells. *Nutr Cancer* 2014; 66: 1237-1246 [PMID: 25256427 DOI: 10.1080/0163581.2014.951733]
- 14 Zhang YH, Yan HQ, Wang F, Wang YY, Jiang YN, Wang YN, Gao FG. TIPE2 inhibits TNF- α -induced hepatocellular carcinoma cell metastasis via Erk1/2 downregulation and NF- κ B activation. *Int J Oncol* 2015; 46: 254-264 [PMID: 25339267 DOI: 10.3892/ijo.2014.2725]
- 15 Huang X, Qin J, Lu S. Kanglaite stimulates anticancer immune responses and inhibits HepG2 cell transplantation-induced tumor growth. *Mol Med Rep* 2014; 10: 2153-2159 [PMID: 25119060 DOI: 10.3892/mmr.2014.2479]
- 16 Cheng CY, Hu CC, Yang HJ, Lee MC, Kao ES. Inhibitory effects of scutellarein on proliferation of human lung cancer A549 cells through ERK and NF κ B mediated by the EGFR pathway. *Chin J Physiol* 2014; 57: 182-187 [PMID: 25246059 DOI: 10.4077/CJP.2014.BAC200]
- 17 Zeng L, Zhen Y, Chen Y, Zou L, Zhang Y, Hu F, Feng J, Shen J, Wei B. Naringin inhibits growth and induces apoptosis by a mechanism dependent on reduced activation of NF- κ B/COX-2-caspase-1 pathway in HeLa cervical cancer cells. *Int J Oncol* 2014; 45: 1929-1936 [PMID: 25174821 DOI: 10.3892/ijo.2014.2617]
- 18 Calvisi DF, Frau M, Tomasi ML, Feo F, Pascale RM. Deregulation of signalling pathways in prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma: novel insights from interspecies comparison. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1826: 215-237 [PMID: 23393659]
- 19 Madonna G, Ullman CD, Gentilecore G, Palmieri G, Ascierto PA. NF- κ B as potential target in the treatment of melanoma. *J Transl Med* 2012; 10: 53 [PMID: 22433222 DOI: 10.1186/1479-5876-10-53]
- 20 朱开梅, 顾生玖, 顾小文, 骆彩珍. 八角中莽草酸对人肝癌HepG-2细胞增殖及NF- κ B蛋白表达的影响. 中国实验方剂学杂志 2014; 20: 126-129

编辑: 郭鹏 电编: 闫晋利

