

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2022.06.004

• 实验研究 •

# 半枝莲多糖 SBP-2A 对小鼠肝癌 H22 细胞增殖的抑制作用\*

付 杨 许晓义 宋高臣<sup>△</sup>

牡丹江医学院基础医学院,黑龙江牡丹江 157011

**摘要** **目的** 探讨半枝莲多糖 SBP-2A 对小鼠肝癌 H22 细胞增殖及凋亡的影响。**方法** 体外培养小鼠肝癌 H22 细胞分为阴性对照组(不加任何药物)、阳性对照组(黄芪多糖 200  $\mu\text{g/mL}$ )、低剂量治疗组(半枝莲多糖 SBP-2A 50  $\mu\text{g/mL}$ )、中剂量治疗组(半枝莲多糖 SBP-2A 100  $\mu\text{g/mL}$ )、高剂量治疗组(半枝莲多糖 SBP-2A 200  $\mu\text{g/mL}$ )。MTT 比色法检测各组细胞增殖的抑制活性。HE 染色观察各组细胞形态学变化。流式细胞术 Annexin V/PI 双染法检测各组细胞凋亡水平。蛋白质印迹法(Western blot, WB)检测各组细胞 B 细胞淋巴瘤 2 基因(B cell lymphoma 2 gene, Bcl-2)、BCL2 关联 X 蛋白(BCL2-associated X protein, Bax)的蛋白表达水平。**结果** 低、中、高剂量治疗组细胞增殖抑制率明显增加。低、中、高剂量治疗组均较阴性对照组出现一定程度的凋亡形态特征,且高剂量治疗组最为明显。高剂量治疗组细胞凋亡率显著高于阴性对照组及低、中剂量治疗组( $P < 0.05$ )。低、中、高剂量治疗组 Bax 蛋白表达水平均显著高于阴性对照组( $P < 0.05$ );中、高剂量治疗组 Bcl-2 蛋白表达水平均显著低于阴性对照组( $P < 0.05$ )。**结论** 半枝莲多糖 SBP-2A 可显著抑制小鼠肝癌 H22 细胞增殖,其作用机制可能与调控 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平从而促进细胞凋亡有关。

**关键词** 半枝莲多糖 SBP-2A;小鼠肝癌 H22 细胞;细胞凋亡;细胞增殖

**中图分类号** R285.5 **文献标志码** A

## Inhibitory Effect of Scutellaria Barbata Polysaccharide SBP-2A on Proliferation of Mouse Hepatoma H22 Cells\*

FU Yang, XU Xiaoyi, SONG Gaochen<sup>△</sup>

Basic Medical College, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, China

**Abstract** **Objective** To investigate the effect of Scutellaria barbata polysaccharide SBP-2A on the proliferation and apoptosis of mouse hepatoma H22 cells. **Methods** In vitro cultured mouse H22 cells were divided into negative control group(without any drug), positive control group(Astragalus polysaccharide 200  $\mu\text{g/mL}$ ), low dose treatment group(Scutellaria barbata polysaccharide SBP-2A 50  $\mu\text{g/mL}$ ), medium dose treatment group(Scutellaria barbata polysaccharide SBP-2A 100  $\mu\text{g/mL}$ ), and high dose treatment group(Scutellaria barbata polysaccharide SBP-2A 200  $\mu\text{g/mL}$ ). The proliferation inhibitory activity of cells in each groups was measured by MTT colorimetric method. Cell morphological changes in each group were observed by HE staining. The level of apoptosis in each group was determined by flow cytometry Annexin V/PI double staining. The protein expression levels of B cell lymphomas 2 gene(Bcl-2)and BCL2-associated X protein(Bax)were determined by Western blot(WB). **Results** Cell proliferation inhibition rate was significantly increased in the low, medium and high doses treatment groups. The low, medium and high doses treatment groups showed some degree of apoptotic morphology compared

\* 黑龙江省中医药科研项目(No. ZHY18-168);黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(No. 2018-KYYWFMY-0010);牡丹江市科学技术计划项目(No. Z2015s0028);黑龙江省博士后科研启动金资助项目(No. LBH-Q15141)

<sup>△</sup>通信作者, Corresponding author, E-mail: songgaochen32@sina.com

with the negative control group, and the most obvious is in the high dose treatment group. Cell apoptosis rate in the high dose treatment group was significantly higher than that in the negative control group and the low, medium doses treatment groups ( $P < 0.05$ ). Bax protein expression in the low, medium and high doses treatment groups was significantly higher than that in the negative control group ( $P < 0.05$ ), and Bcl-2 protein expression in the medium, high doses treatment groups was significantly lower than that in negative control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Scutellaria barbata polysaccharide SBP-2A could significantly inhibit mouse hepatoma H22 cell proliferation, and the mechanism of action might be related to the regulation of Bax and Bcl-2 protein expression levels and thus promote apoptosis.

**Key words** Scutellaria barbata polysaccharide SBP-2A; mouse hepatoma H22 cells; cell apoptosis; cell proliferation

21 世纪,随着医疗事业的进步,人均预期寿命不断增加。同时,恶性肿瘤正逐渐成为常见恶性疾病,癌症这一世界性健康问题已成为每个国家人均预期寿命增加的最大障碍,严重威胁人类健康。2020 年全球新发癌症 19 292 789 例,死亡癌症 9 958 133 例<sup>[1]</sup>。其中全球肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 新发病例 90.5 万例,死亡病例 83 万例,占癌症发病和死亡总数的 4.7% 和 8.3%,我国占新发病例的 40% 以上,且有上升趋势<sup>[2]</sup>。半枝莲 (*Scutellaria barbata* D. Don) 为唇形科黄芩属多年生草本植物,广泛分布于我国境内,含多种维生素、微量元素及氨基酸等成分。半枝莲可全草入药,味苦、辛、酸,性寒,归肺、肝、肾经,具有清热解毒、活血祛瘀、利尿消肿止痛的功效。半枝莲是癌症治疗中常用的清热解毒中药,半枝莲多糖是从半枝莲全植物中提取的有效成分,很多药理实验已经证实半枝莲多糖具有抗肝癌<sup>[3]</sup>的作用。但以上研究多是基于半枝莲所提取的粗多糖水平来探索抗肝癌作用及机制的,这对于半枝莲多糖作为抗肝癌药物的开发尚欠缺一定的药学理论支持,缺乏说服力。本课题组采用水提醇沉法、除蛋白、脱色等实验方法对半枝莲进行分离纯化得到半枝莲多糖组分 SBP-2,再通过离子柱层析纯化、凝胶柱层析纯化等工艺,提取了更高纯度且组分均一的半枝莲多糖 SBP-2A,通过绘制葡萄糖标准曲线测定 SBP-2A 的多糖含量为 92.17%。本实验以小鼠肝癌 H22 细胞为实验对象,研究分离纯化后的半枝莲多糖 SBP-2A 对小鼠肝癌 H22 细胞增殖及凋亡的影响,以期开发半枝莲多糖为高效低毒抗肿瘤中药提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

小鼠肝癌 H22 细胞株购自无锡欣润生物公司;半枝莲多糖 SBP-2A 于牡丹江医学院药学院自提,经苯酚硫酸法测得多糖纯度为 92%;黄芪多糖购自北京美迪克斯生物技术有限公司,纯度为 99%。

### 1.2 实验试剂

Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (浙江联科生物有限公司); RPMI 1640、青霉素链霉素 (Gibco); 胎牛血清 (无锡欣润生物公司); BCA 试剂盒、Western 快速转膜液 (Beyotime); SDS-PAGE 配胶试剂盒、SDS-PAGE 电泳液 (Biosharp); Bcl-2、Bax 抗体 (Wanleibio); 高效 RIPA (Solarbio)。

### 1.3 实验仪器

酶标仪 (赛默飞世尔有限公司); 显微镜 (赛默飞世尔有限公司); BD Face caliber 流式细胞分析仪 (BD Biosciences, 美国); 5415D 型离心机 (Eppendorf, 德国)。

### 1.4 实验方法

小鼠肝癌 H22 细胞的培养: 将小鼠肝癌 H22 细胞培养于 RPMI 1640 完全培养基 (内含 10% 的胎牛血清、1% 的 100 pg/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素) 中, 放置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的细胞培养箱中, 取对数生长期细胞用于实验。

半枝莲多糖 SBP-2A 溶液的配制: 取出冻干的半枝莲多糖 SBP-2A 粉末, 加入 RPMI 1640 培养液, 配置的半枝莲多糖 SBP-2A 溶液的终浓度分别为 50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL。

细胞分组及给药: 分为 5 组, 阴性对照组不加入药物, 阳性对照组加入浓度为 200 μg/mL 的黄芪多糖, 低剂量治疗组加入浓度为 50 μg/mL 的半枝莲多糖 SBP-2A, 中剂量治疗组加入浓度为 100 μg/mL 的半枝莲多糖 SBP-2A, 高剂量治疗组加入浓度为 200 μg/mL 的半枝莲多糖 SBP-2A。

### 1.5 观察指标

#### 1.5.1 MTT 比色法测定细胞增殖的抑制率

取对数生长期的 小鼠肝癌 H22 细胞以 RPMI 1640 培养液制成细胞悬液, 调整细胞密度为 10<sup>4</sup> 个/mL, 每孔 100 μL, 接种于 96 孔板。分为 5 组, 每组设 5~6 个复孔, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的细胞培养箱中培养 24 h, 加入 5 μg/mL MTT, 在培养箱孵育 4 h, 2000 r/min 离心 10 min, 小心吸去孔内液体并加

入 150  $\mu$ L DMSO, 震荡 10 min, 利用酶标仪在波长 490 nm 处测定吸光度 OD 值。以上实验重复 3 次, 抑制率 = (1 - 试验孔 OD 值 / 对照孔 OD 值)  $\times$  100%。

1.5.2 HE 染色观察细胞形态学变化

取对数生长期的 小鼠肝癌 H22 细胞  $4 \times 10^5$  个/孔 接种在 24 孔板上, 培养 24 h 后取出并收集细胞涂片 于载玻片。细胞涂片用 4% 多聚甲醛固定 1 h, 按照苏 木素染色 2 min、盐酸乙醇分化 3 次、1% 伊红复染 10~15 s、再用梯度乙醇分别浸泡 0.5~1 min 后, 细胞涂 片置于二甲苯中浸泡 10 min。更换二甲苯后再浸泡 10 min, 滴加 1~2 滴中性树胶进行封片, 并在显微镜 下观察细胞形态。

1.5.3 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡

取对数生长期的 小鼠肝癌 H22 细胞, 经 0.25% 的胰蛋白酶消化后, 离心弃上清液, 加入 195  $\mu$ L Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞后, 加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 再加入 10  $\mu$ L 碘化丙啶(PI)染色液混匀。室 温避光孵育后置于冰浴中, 然后在流式细胞仪中进行 检测。

1.5.4 WB 实验检测细胞中 Bax、Bcl-2 蛋白的表达

将细胞接种于培养基中, 按照 1.5.1 方法分组处 理后培养 24 h, 用 PBS 冲洗, 加入蛋白酶和磷酸酶抑 制剂的 RIPA 裂解液, 将细胞转移至 EP 管内, 置于冰 上裂解 30 min。在预冷的 4  $^{\circ}$ C 离心机中 12 000 r/min 离心 15 min, 将上清液转移至新的 EP 管中, 用 BCA 蛋白定量试剂盒检测总蛋白浓度。用 SDS-PAGE 分 离总蛋白, 然后电泳转移到 PVDF 膜上。在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 用一级抗体在 4  $^{\circ}$ C 孵育一整 夜。用 TBST(Tris 缓冲盐水和 Tween 20 的混合物) 冲洗 3 次膜, 并在室温下与二级抗体孵育 2 h。进行 洗膜、显影液、定影、晾晒等一系列实际操作, 最后用 图像处理软件测量曝光图像的光密度, 然后用统计软 件分析目标蛋白和内参蛋白光密度的比值。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据处理, 计量资

料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用方差分 析, 两两比较采用 SNK-*q* 检验; 以  $P < 0.05$  为差异有 统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖抑制率比较

阳性对照组及低、中、高剂量治疗组均显示出对 细胞增殖的抑制作用, 且随着半枝莲多糖 SBP-2A 剂 量增加, 小鼠肝癌 H22 细胞增殖抑制率逐渐升高 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组细胞增殖抑制率比较(% ,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | <i>n</i> | 抑制率                                        |
|--------|----------|--------------------------------------------|
| 阴性对照组  | 6        | -                                          |
| 阳性对照组  | 5        | 21.5 $\pm$ 0.11                            |
| 低剂量治疗组 | 6        | 28.1 $\pm$ 0.12 $\Delta$                   |
| 中剂量治疗组 | 6        | 30.8 $\pm$ 0.11 $\Delta\blacktriangle$     |
| 高剂量治疗组 | 6        | 49.9 $\pm$ 0.08 $\Delta\blacktriangle\Box$ |

与阳性对照组比较 $\Delta P < 0.05$ ; 与低剂量治疗组比较 $\blacktriangle P < 0.05$ ; 与中剂量治疗组比较 $\Box P < 0.05$

2.2 细胞形态比较

光学显微镜下, 阴性对照组细胞状态良好, 核质 染色较深。阳性对照组细胞变小, 严重破裂, 胞质流 出仅剩下细胞核, 存活的细胞明显减少。低剂量治疗 组细胞核内出现多个亮点泡状结构, 多数细胞核开始 出现固缩现象。中剂量治疗组细胞核大幅固缩, 细胞 变小, 少数细胞膜破裂, 胞质流出, 细胞核与细胞质开 始分开。高剂量治疗组细胞畸形, 大小不一, 破裂, 胞 质留出, 细胞黯淡无光。与阴性对照组比较, 低、中、 高剂量治疗组均出现一定程度的凋亡形态特征, 且高 剂量治疗组最为明显。见图 1。

2.3 细胞凋亡率比较

阳性对照组及低、中、高剂量治疗组细胞凋亡率 均显著高于阴性对照组( $P < 0.05$ ), 且高剂量治疗组 细胞凋亡率显著高于低、中剂量治疗组( $P < 0.05$ )。 见图 2 及表 2。

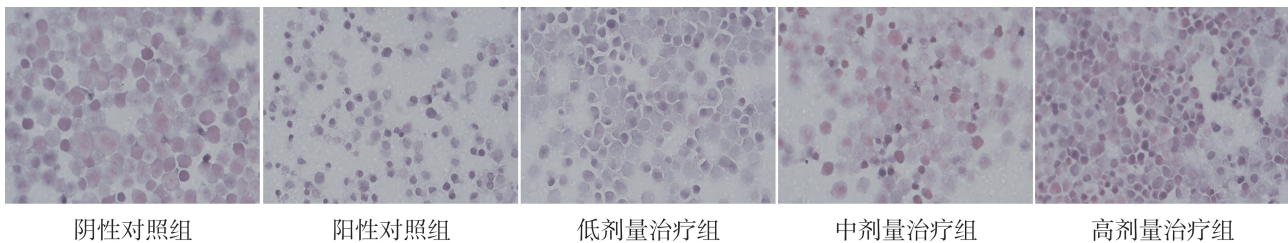


图 1 各组细胞形态变化( $\times 100$ )

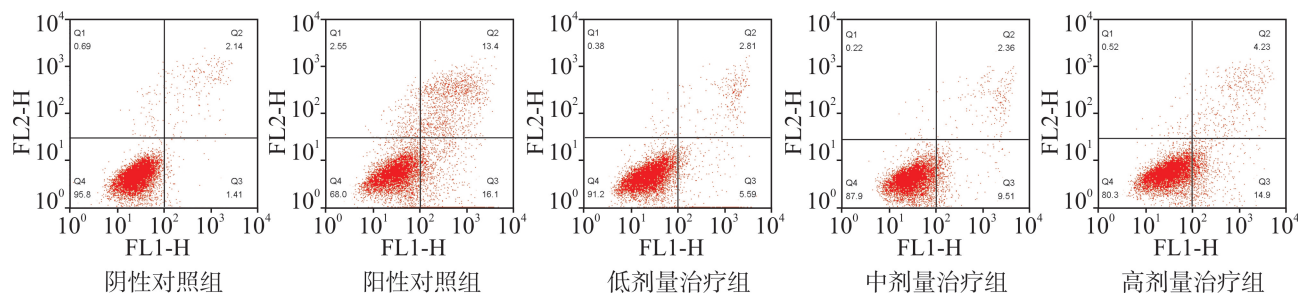


图2 各组细胞凋亡情况

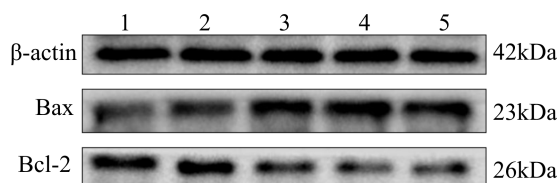
表2 各组细胞凋亡率比较( $n=3$ , %,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 凋亡率(%)           |
|--------|------------------|
| 阴性对照组  | 4.073±0.525      |
| 阳性对照组  | 28.867±0.651*    |
| 低剂量治疗组 | 8.600±0.304*△    |
| 中剂量治疗组 | 11.623±0.344*△▲  |
| 高剂量治疗组 | 17.380±1.525*△▲□ |

与阴性对照组比较\* $P<0.05$ ;与阳性对照组比较△ $P<0.05$ ;与低剂量治疗组比较▲ $P<0.05$ ;与中剂量治疗组比较□ $P<0.05$

## 2.4 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平比较

阳性对照组及低、中、高剂量治疗组 Bax 蛋白表达水平均显著高于阴性对照组( $P<0.05$ );阳性对照组及中、高剂量治疗组 Bcl-2 蛋白表达水平均显著低于阴性对照组( $P<0.05$ )。见图 3 及表 3。



1 为阴性对照组,2 为低剂量治疗组,3 为中剂量治疗组,4 为高剂量治疗组,5 为阳性对照组

图3 各组细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达

表3 各组细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平比较( $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | Bax          | Bcl-2          |
|--------|--------------|----------------|
| 阴性对照组  | 0.455±0.054  | 0.959±0.029    |
| 阳性对照组  | 0.707±0.017* | 0.585±0.159*   |
| 低剂量治疗组 | 0.622±0.057* | 0.859±0.042△   |
| 中剂量治疗组 | 0.690±0.073* | 0.745±0.077*   |
| 高剂量治疗组 | 0.717±0.055* | 0.514±0.074*△□ |

与阴性对照组比较\* $P<0.05$ ;与阳性对照组比较△ $P<0.05$ ;与低剂量治疗组比较▲ $P<0.05$ ;与中剂量治疗组比较□ $P<0.05$

## 3 讨论

中药在肿瘤治疗方面强调扶正与祛邪相结合,注

重全方位、多角度治疗疾病,可起到稳定肿瘤病灶、改善患者症状、提高生存质量的效果。中药多糖是一种天然大分子,广泛存在于多种中药材当中,多项研究表明,中药多糖具有抗肿瘤<sup>[4]</sup>、抗病毒<sup>[5]</sup>、抗氧化<sup>[6]</sup>、免疫调节<sup>[7]</sup>等多种生物活性,从而有效抑制肿瘤增殖<sup>[8]</sup>、分化和转移,已成为当前研究的热点。

半枝莲是近几年来研究较多的抗肿瘤药物,研究表明半枝莲粗多糖可抑制小鼠 H22 肝细胞瘤<sup>[9]</sup>;提高 S180 荷瘤小鼠红细胞膜的流动性,增强免疫功能<sup>[10]</sup>;也可通过影响 H22 小鼠肝癌组织中的部分蛋白质表达,实现对肝癌的治疗作用<sup>[11]</sup>;但以上研究都是基于半枝莲粗多糖水平进行的。本研究采用更精细的纯化工艺,提取了更高纯度且组分均一的半枝莲多糖 SBP-2A 进行抗肝癌作用机制的研究。基于此,本研究通过体外培养小鼠肝癌 H22 细胞,半枝莲多糖 SBP-2A 处理 24 h 后检测细胞活力,结果显示低、中、高剂量治疗组细胞增殖抑制率显著增加。HE 染色结果显示,低、中、高剂量治疗组较阴性对照组出现核固缩、体积缩小、细胞皱缩等细胞凋亡形态特征,且高剂量治疗组最为明显。通过 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡率,结果显示低、中、高剂量治疗组细胞凋亡率显著高于阴性对照组,高剂量治疗组细胞凋亡率高于低、中剂量治疗组。本研究结果表明半枝莲多糖 SBP-2A 能够抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡。

线粒体在细胞凋亡中起着决定性的作用<sup>[12]</sup>,细胞凋亡的线粒体是通过 Bcl-2 家族 Bax/Bak 与 Bcl-2、Bcl-x L 水平之间的平衡来调控的<sup>[13]</sup>。Bcl-2、Bcl-x L 可以通过阻止线粒体 Cytochrome-c 的释放而发挥抗凋亡作用,而 Bax 和 Bak 通过破坏线粒体膜的完整性发挥促凋亡作用<sup>[14]</sup>。Bcl-2 基因是一种具有抑制细胞凋亡作用的原癌基因,主要位于线粒体外膜、核被膜和内质网;Bax 是一种诱导凋亡原癌基因,表达水平增加可拮抗 Bcl-2 的作用;两者间相互作用调控细胞凋亡。研究<sup>[15]</sup>显示,Bcl-2/Bax 比值上调,抑制细胞凋亡;Bcl-2/Bax 比值下调,促进细胞凋亡。因此,本研

究检测了半枝莲多糖 SBP-2A 对小鼠肝癌 H22 细胞中 Bax 和 Bcl-2 表达的影响,结果显示中、高剂量治疗组能明显上调 Bax 蛋白表达水平,下调 Bcl-2 蛋白表达水平;再次印证了半枝莲多糖 SBP-2A 对小鼠肝癌 H22 细胞凋亡的促进作用。

综上所述,半枝莲多糖 SBP-2A 可抑制小鼠肝癌 H22 细胞增殖,其作用机制可能是通过上调促凋亡基因 Bax 蛋白表达同时下调抗凋亡基因 Bcl-2 蛋白表达来促进细胞凋亡。半枝莲多糖作为一种天然提取物,仍需我们继续挖掘其组分的药用潜能。对于是否存在其他治疗途径或通路,也有待在后续研究中进行更深入的探讨。

# 参 考 文 献

- [1] 曹毛毛,陈万青. GLOBOCAN 2020 全球癌症统计数据解读[J]. 中国医学前沿杂志(电子版),2021,13(3):63-69.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209-249.
- [3] 宋高臣,于英君,王喜军. 半枝莲多糖的抗肿瘤作用及其调节免疫的实验研究[J]. 世界科学技术(中医药现代化),2011,13(4):641-643.
- [4] Sohretoglu D, Huang S. Ganoderma lucidum Polysaccharides as An Anti-cancer Agent[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2018, 18(5):667-674.
- [5] Wang T, Wang X, Zhuo Y, et al. Antiviral activity of a polysaccharide from Radix Isatidis (*Isatis indigotica* Fortune) against hepatitis B virus (HBV) in vitro via activation of JAK/STAT signal pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 257:112782.

- [6] 张艳,陈丽,李金娟,等. 当归多糖对哮喘幼龄小鼠抗氧化系统的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(17):2312-2315.
- [7] Xiao Z, Deng Q, Zhou W, et al. Immune activities of polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* L. What do we know so far? [J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 229:107921.
- [8] 周艾玲,王段珩,岳晓蕾,等. 中药多糖抗肿瘤作用研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(16):236-246.
- [9] Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(24):12736-12737.
- [10] 李晶,庄群川,蔡少丽. 田基黄水提物通过线粒体凋亡通路诱导肝癌细胞凋亡[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(8):1953-1955.
- [11] 李伟宏,田莉,刘俊保. 莪术油对子宫内腺癌 HEC-1-B 细胞增殖、凋亡及 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. *河南中医*, 2021, 41(3):384-387.
- [12] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis[J]. *Nature*, 2000, 407(6805):770-776.
- [13] Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family[J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(1):61-66.
- [14] Xu Y, Chiu JF, He QY, et al. Tubeimoside-1 exerts cytotoxicity in HeLa cells through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress pathways[J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(3):1585-1593.
- [15] 张慧,李雯雯,张建涛. 益肾养卵方对早发性卵巢功能不全患者卵巢储备功能、卵巢颗粒细胞 Bcl-2/Bax 的表达及 PI3 K/AKT 信号通路的影响[J]. *中医药导报*, 2021, 27(9):108-111, 116.

(收稿日期:2022-06-09)