

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.09.003

◇ 药学研究 ◇

迷迭香酸联合槲皮素对人肝癌 HepG₂ 细胞增殖和迁移的影响

刘庆东^{1a}, 白跳艳^{2a}, 王晔飞^{1b}, 姚杨^{2b}作者单位:¹榆林市第一医院,^a消化内科,^b肝胆外科,陕西 榆林 719000;²西安医学院第一附属医院,^a检验科,^b中心实验室,陕西 西安 710077

通信作者:姚杨,女,高级实验师,研究方向为肝损伤的机制及防治,E-mail:yaoyang1220@sina.com

基金项目:陕西省科技厅基金(2020SF-062)

摘要:目的 探讨迷迭香酸联合槲皮素对人肝癌 HepG₂ 细胞增殖、侵袭力的影响,并探讨其可能的机制。方法 以不同浓度迷迭香酸(12.5、25.0、50.0 和 100.0 μmol/L)和槲皮素(12.5、25.0、50.0 和 100.0 μmol/L)单药及二者联合用药处理 HepG₂ 细胞 36 h,用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)检测细胞增殖,划痕实验检测细胞迁移能力,蛋白质印迹法检测凋亡相关蛋白 E-钙黏蛋白(E-cad)及 N-钙黏蛋白(N-cad)的表达情况。**结果** 槲皮素和迷迭香酸单药均能使细胞活力降低,二者联合用药对细胞活力抑制率更加显著,且呈剂量依赖性($P < 0.05$)。25 μmol/L 迷迭香酸组及 25 μmol/L 槲皮素组划痕愈合距离分别为(11.35±2.37)mm、(11.46±3.86)mm,均能抑制细胞的迁移;两者联合用药组划痕愈合距离为(4.36±0.56)mm,抑制细胞迁移效果更加明显($F = 6.73, P = 0.003$)。槲皮素组及迷迭香酸组中 E-cad 蛋白相对表达量为(1.02±0.10)及(1.25±0.14),N-cad 蛋白相对表达量为(0.98±0.05)及(0.73±0.02),与之相比二者联合用药可显著上调 E-cad[(1.42±0.06), $F = 5.28, P = 0.02$]及下调 N-cad[(0.61±0.07), $F = 3.28, P = 0.03$]的表达。**结论** 槲皮素联合迷迭香酸能抑制 HepG₂ 细胞增殖及凋亡,其作用主要是通过上调 E-cad 及下调 N-cad 的表达来实现的。**关键词:**迷迭香属; 槲皮素; 肝肿瘤; HepG₂ 细胞; 细胞凋亡

Effect of combined use of quercetin and rosmarinic acid on proliferation and apoptosis of HepG₂ cells in vitro

LIU Qingdong^{1a}, BAI Tiaoyan^{2a}, WANG Yefei^{1b}, YAO Yang^{2b}

Author Affiliations: ^{1a}Department of Gastroenterology, ^{1b}Department of Hepatobiliary Surgery, The First Hospital of Yulin City, Xi'an, Shaanxi 719000, China; ^{2a}Department of Clinical Laboratory, ^{2b}Department of Centralab, The First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi 710077, China

Abstract: Objective To investigate the effect of combined use of quercetin and rosmarinic acid on proliferation and apoptosis of HepG₂ cells, and to explore the possible mechanism. **Methods** HepG₂ cells were treated with different concentrations of quercetin (12.5, 25.0, 50.0, 100.0 μmol/L) and rosmarinic acid (12.5, 25.0, 50.0, 100.0 μmol/L) alone or in combination for 36 hours. Cell proliferation was assayed by MTT method. The ability of cell migration was studied by wound healing test and expressions of E-cad protein and N-cad were measured by Western blot. **Results** Both quercetin and rosmarinic acid reduced cell viability, and the combination of the two drugs had a more significant inhibition on cell viability in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). The wound healing distances of the 25 μmol/L rosmarinic acid group and 25 μmol/L quercetin group were (11.35±2.37) mm and (11.46±3.86) mm, respectively, both of which inhibited cell migration; the wound healing distance in the combined medication group was (4.36±0.56) mm, with more significant inhibition on cell migration ($F = 6.73, P = 0.003$). The relative expression of E-cad protein in the quercetin group and rosmarinic acid group were (1.02±0.10) and (1.25±0.14), and the relative expression of N-cad protein was (0.98±0.05) and (0.73±0.02). In contrast, the combination of the two drugs significantly increased E-cad [(1.42±0.06), $F = 5.28, P = 0.02$] and downregulated N-cad [(0.61±0.07), $F = 3.28, P = 0.03$] expression. **Conclusion** Quercetin combined with rosmarinic acid can synergistically inhibit cell proliferation and migration probably by up-regulating the expression of E-cad and down-regulating N-cad gene expression.

Key words: Rosmarinus; Quercetin; Liver neoplasms; Hep G2 cells; Cell apoptosis

原发性肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一,发病率和病死率较高^[1-3]。尽管肝癌的治疗方法不

断进步,但仍然存在预后效果差、术后转移或复发率高、对放化疗不敏感等局限性^[4-6]。因此迫切需

要寻找安全有效的治疗策略。槲皮素(querletin)是一种天然的黄酮类化合物,能够抑制多种肿瘤细胞的增殖、转移的作用^[7-8]。迷迭香酸(rosmarinic acid)是一种广泛分布的水溶性酚酸类化合物^[9-10]。且具有抗炎、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用^[11-13]。其抗肿瘤作用受到广泛关注。但目前尚无文献报道槲皮素联合迷迭香酸对HepG₂细胞的影响。本研究2018年1月至2019年1月选用人肝癌HepG₂细胞为模型,观察槲皮素与迷迭香酸联合应用对HepG₂细胞增殖及凋亡的影响,并探讨其可能的作用机制,为其应用于肝癌的临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 试剂:10%小牛血清(四季青生物工程公司),3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT,美国sigma公司);槲皮素及迷迭香酸购自美国Signal Chemical公司,RPMI-1640培养基(Gibco公司)槲皮素及迷迭香酸用二甲基亚砷(DMSO)超声溶解,配成不同质量浓度的溶液,然后用0.22 μm微孔滤器过滤,灭菌,4℃保存备用。

仪器:二氧化碳培养箱(美国Thermo公司),96孔板、6孔板(美国Thermo Fisher Scientific公司),流式细胞仪(FranklinLakes),全自动酶标仪(美国Molecular Devices公司),实时定量PCR仪(美国Bio-Rad),离心机(美国Bio-Rad)。

1.2 HepG₂细胞培养及分组 将HepG₂细胞复苏后,37℃、5%二氧化碳孵箱内培养培养。其中RPMI-1640培养基内含3%小牛血清,青霉素100 U/mL、链霉素100 μg/mL。每2~3天传代换液1次,取对数生长期的细胞进行实验。将处于对数生长期的HepG₂细胞以5×10⁴/mL接种至96孔板中培养24 h。分为空白对照组(只加DEME培养液),槲皮素单独处理组(DMEM培养液+DMSO+12.5、25.0、50.0和100.0 μmol/L槲皮素溶液),迷迭香酸单独处理组(DMEM培养液+DMSO+12.5、25.0、50.0和100.0 μmol/L迷迭香酸溶液)单药及联合用药组(DMEM培养液+DMSO+IC50槲皮素+IC50迷迭香酸),各组培养24 h后进行后续实验。

1.3 四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)检测细胞活力 将处于对数生长期的HepG₂细胞以5×10⁴/mL接种至96孔板中培养24 h,每孔200 μL倒掉培养液,按照上述分组操作,再培养24 h后弃液,每孔加入MTT 20 μL,继续培养4 h后,吸去上清液,每孔加入DMSO溶液150 mL,放至摇床低速振荡10 min,使各孔结晶物充分溶解,采用全自动酶标仪在570 nm处测各孔吸光度。

1.4 划痕实验 将处于对数生长期的HepG₂细胞接种到6孔板,调整细胞密度为5×10⁵/mL,摇匀后与

37℃、5%二氧化碳培养箱中常规培养过夜,用记号笔在6孔板底部画3条水平直线,常规培养至90%融合状态。用移液器在细胞板上划痕,磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗以去除悬浮细胞,同时在各药物组中分别加入用1.5%血清培养基配置的不同浓度迷迭香酸及槲皮素,镜下记录划痕宽度并拍照。37℃、5%二氧化碳体积分数为5%的培养箱中继续培养36 h,倒置显微镜下观察划痕愈合程度并拍照。计算各组划痕距离。

1.5 蛋白质印迹法检测蛋白表达 收集上述各组细胞,BCA法测定蛋白浓度,取50 μg等量蛋白上样,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜,封闭液室温封1 h,加入一抗N-钙黏蛋白(N-cad)(1:300),E-钙黏蛋白(E-cad)(1:500),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(1:500)。4℃孵育过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000),室温孵育2 h,凝胶成像分析系统扫描分析。以GAPDH为内参计算各组目的蛋白的表达水平。

1.6 统计学方法 计量资料 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组定量数据的比较采用单因素方差分析的方法,多组之间两两比较采用LSD-*t*检验,所有数据采用SPSS 17.0统计软件分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

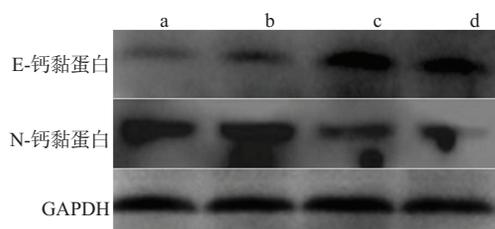
2 结果

2.1 细胞增殖结果 12.5、25.0、50.0和100.0 μmol/L槲皮素对HepG₂细胞抑制率分别为(16.9±3.2)%、(28.9±3.4)%、(39.6±4.2)%、(53.5±2.3)%、12.5、25、50、100 μmol/L迷迭香酸对HepG₂细胞抑制率分别为(5.2±1.2)%、(12.3±1.6)%、(39.8±2.1)%、(62.5±3.4)%;以上结果表明不同浓度槲皮素及迷迭香酸单独作用于HepG₂细胞均表现出浓度依赖性的细胞活力抑制效果,但是抑制率仍然不高。二者联合处理人HepG₂细胞24 h后,12.5、25.0、50.0和100.0 μmol/L对HepG₂细胞抑制率分别为(25.1±3.5)%、(52.3±4.2)%、(62.5±5.1)%、(78.2±3.6)%、可显著抑制细胞活力($F = 4.25, P = 0.02$)。

2.2 划痕实验结果 25 μmol/L迷迭香酸组及25 μmol/L槲皮素组均能抑制细胞的迁移,划痕愈合距离分别为(11.35±2.37)mm、(11.46±3.86)mm。迷迭香酸及槲皮素联合组划痕愈合距离为(4.36±0.56)mm,细胞间划痕距离缩小趋势较迷迭香酸及槲皮素单独使用有所减缓($F = 6.73, P = 0.003$)。该结果提示槲皮素及迷迭香酸联合组能显著抑制细胞迁移。

2.3 相关分子含量检测 蛋白质印迹法检测结果表明:与对照组相比,槲皮素组及迷迭香酸组中N-cad蛋白表达水平下降,其蛋白相对表达量为(0.98±0.05)及(0.73±0.02)。E-cad蛋白表达增加,其蛋白

相对表达量为 (1.02 ± 0.10) 及 (1.25 ± 0.14) , 而槲皮素+迷迭香酸组 N-cad (0.61 ± 0.07) 及 E-cad (1.42 ± 0.06) 蛋白表达变化更加明显(N-cad: $F = 3.28, P = 0.03$; E-cad: $F = 5.28, P = 0.02$)。见图1。



注: a为对照组, b为迷迭香酸组, c为槲皮素组, d为槲皮素+迷迭香酸组

图1 蛋白质印迹法检测各组E-钙黏蛋白(E-cad)和N-钙黏蛋白(N-cad)基因表达

3 讨论

肝癌病死率高, 预后效果不理想, 治疗难度大, 因此迫切需要寻找一种有效治疗肝癌的临床药物^[14]。槲皮素是一种天然黄酮类化合物, 具有抗氧化、抗菌消炎、抗病毒、防癌、抗癌等作用^[15-16]。迷迭香酸是一种天然的苯酚羧酸, 以唇形科和紫草科含量最高。迷迭香酸具有抗癌、抗过敏、抗氧化、抗炎等作用^[17]。

上皮-间质转化(EMT)是恶性肿瘤浸润与转移的重要因素, 其过程涉及许多EMT相关蛋白的参与。其中E-cad和N-cad被认为是最显著的标志蛋白。E-cad表达于细胞膜表面, 是一个与钙离子有高度结合亲和力的一种细胞黏附糖蛋白, 对维持细胞间的通讯与黏附有重要作用, 在多种恶性肿瘤的迁移侵袭阶段占重要地位。张杰东等^[18]研究发现E-cad在甲状腺乳头状癌中低表达, 与甲状腺乳头癌的发生、发展及转移中起重要作用, 可作为临床诊断和预后的指标。罗婷婷等^[19]研究发现E-cad能有效抑制鼻咽癌CNE-2细胞的体外迁移和侵袭。N-cad可以克服E-cad介导的细胞间牢固的黏附而影响上皮细胞的形态和行为, 促进肿瘤细胞浸润。但关于两种蛋白在肝癌防治机制中的研究却较少。

本研究以人肝癌HepG2细胞为模型, 考察迷迭香酸与槲皮素联用对N-cad及E-cad表达的影响, 结果显示, 两药联合能明显抑制肝癌HepG2细胞的活力, 抑制细胞迁移, 并呈现浓度依赖关系, 并通过蛋白质印迹法检测发现两药联合使用较单独应用迷迭香酸可显著上调E-cad和下调N-cad蛋白的表达。这说明槲皮素增强迷迭香酸对肝癌HepG2细胞增殖的抑制作用的机制可能是通过调控E-cad、N-cad蛋白的表达, 其机制可能与EMT有关。为肝癌的临床治疗提供了有力的实验证据。

参考文献

- [1] TIAN QH, ZHANG MF, LUO RG, et al. DHX33 expression is increased in hepatocellular carcinoma and indicates poor prognosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(4): 1163-1169.
- [2] COSTENTIN C. Hepatocellular carcinoma surveillance [J]. *Presse Med*, 2017, 46(4): 381-385.
- [3] LIU J, RAO J, LOU X, et al. Upregulated TRIM11 exerts its oncogenic effects in hepatocellular carcinoma through inhibition of P53 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(1): 255-266.
- [4] CHENG J, ZHONG Y, CHEN S, et al. Gab2 mediates hepatocellular carcinogenesis by integrating multiple signaling pathways [J]. *FASEB J*, 2017, 31(12): 5530-55542.
- [5] ZHANG Y, WEI C, GUO CC, et al. Prognostic value of microRNAs in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(63): 107237-107257. DOI: 10.18632/oncotarget.20883.
- [6] ZHANG W, TAN Y, SHEN S, et al. Prognostic nomogram for hepatocellular carcinoma in adolescent and young adult patients after hepatectomy [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(63): 106393-106404. DOI: 10.18632/oncotarget.18192.
- [7] CHIRUMBOLO S, BJØRKLUND G. Quercetin in the experimental liver fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl₄) [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 55: 254-256.
- [8] 施剑明, 殷嫦嫦, 孙维君, 等. 槲皮素联合顺铂对人骨肉瘤MG-63细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2014, 13(10): 1361-1366.
- [9] TSAI CF, WU JY, HSU YW. Protective effects of rosmarinic acid against selenite-induced cataract and oxidative damage in rats [J]. *Int J Med Sci*, 2019, 16(5): 729-740.
- [10] HASANEIN P, SHARIFI M. Effects of rosmarinic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in male Wistar rats [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 1809-1816.
- [11] 曹桂云, 王小洪, 李珂珂, 等. 迷迭香酸乙酯对MPTP诱导的帕金森小鼠的保护作用 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(10): 2346-2348.
- [12] 房祥杰, 张彬, 张德重, 等. 迷迭香酸通过MAPK/ERK信号通路对结肠癌细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *中国肿瘤*, 2018, 27(4): 306-310.
- [13] 冯传平, 丁海霞, 梁健, 等. 迷迭香酸抑制自噬诱导HepG₂细胞凋亡的作用研究 [J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(1): 57-63.
- [14] SAID A, GHUFRAN A. Epidemic of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma [J]. *World J Clin Oncol*, 2017, 8(6): 429-436.
- [15] ZHAO MH, YUAN L, MENG LY, et al. Quercetin-loaded mixed micelles exhibit enhanced cytotoxic efficacy in non-small cell lung cancer in vitro [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(6): 5503-5508.
- [16] WANG S, YAO J, ZHOU B, et al. Bacteriostatic effect of quercetin as an antibiotic alternative in vivo and its antibacterial mechanism in vitro [J]. *J Food Prot*, 2018, 81(1): 68-78.
- [17] 曹雯, 张文娟, 潘金凤, 等. 迷迭香酸药理作用的研究进展 [J]. *广西中医药*, 2019, 42(1): 54-58.
- [18] 张杰东, 方媛, 刘兰侠, 等. 小凹蛋白-1、E-cad和P53在甲状腺乳头状癌中的表达及临床意义 [J]. *现代医学*, 2018, 46(7): 741-744.
- [19] 罗婷婷, 严爱芬, 刘连, 等. 类转录激活因子效应物核酸酶介导的E-cad和Bmi-1基因联合干预鼻咽癌的体外研究 [J]. *中南大学学报*, 2018, 43(3): 229-239.

(收稿日期: 2019-06-18, 修回日期: 2019-06-29)