

• 实验研究 •

# 桑白皮提取物对 HepG2 细胞增殖和迁移的抑制作用

余丽芳, 饶智国, 章必成, 王伟星, 刘健

**【摘要】** 目的 观察桑白皮提取物在体外实验条件下对人肝癌细胞 HepG2 细胞增殖、迁移及基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 表达的影响, 探讨桑白皮提取物对人肝癌细胞 HepG2 细胞的抑制作用与分子机制。**方法** 培养 HepG2 细胞, 将高、中、低三种浓度的桑白皮提取物血清分别加入体外培养的肝癌细胞株 HepG2 细胞, 应用流式细胞检测法检测桑白皮提取物对人肝癌细胞 HepG2 细胞周期的影响; 应用细胞划痕实验观察桑白皮提取物对 HepG2 细胞迁移能力的影响; 应用 Western blotting 检测桑白皮提取物对 HepG2 细胞 MMP-9 蛋白表达的影响; 应用逆转录聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 方法检测桑白皮提取物对 HepG2 细胞 MMP-9 mRNA 表达的影响。**结果** 桑白皮提取物血清中等浓度组 HepG2 细胞与对照组比较, 明显阻滞于 G1 期 ( $P < 0.05$ ); 中等浓度组 HepG2 细胞, 迁移实验中细胞迁移面积明显少于对照组 ( $P < 0.001$ ); 中等浓度组桑白皮提取物还可明显下调 HepG2 细胞 MMP-9 蛋白表达 ( $P < 0.001$ ) 及 MMP-9 mRNA 表达 ( $P < 0.001$ )。**结论** 桑白皮提取物能有效抑制人肝癌细胞 HepG2 细胞增殖与迁移, 其作用机制可能与降低 MMP-9 蛋白的表达有关。

**【关键词】** 桑白皮提取物; 肝癌细胞; 细胞增殖; 细胞迁移; 金属基质蛋白酶-9

**【中图分类号】** R 282.7 **【文献标识码】** A doi: 10.3969/j.issn.1009-2595.2014.11.001

## Inhibition of Cortex Mori on Cells Proliferation and Migration in HepG2

YU Li-fang, RAO Zhi-guo, ZHANG Bi-cheng, WANG Wei-xing, LIU Jian. Department of Oncology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Command, Wuhan Hubei 430070, China

Corresponding author: RAO Zhi-guo, E-mail: zhiguorao@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the inhibitory effect of Cortex Mori on proliferation migration and the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in HepG2 cells in vitro and explore the molecular mechanism. **Method** Different concentrations of Cortex Mori serum were added into HepG2 medium respectively. Cell cycle assay was used to detect the effect of Cortex Mori serum on proliferation of HepG2 cells. Migratory ability was examined by using a model of wounding injury of confluent cultured cells. MMP-9 expression was detected by Western blotting. MMP-9 mRNA expression was detected by creverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The treatment of medium dose of Cortex Mori serum suppressed the proliferation of HepG2 cells, and blocked them at G1 stage. Compared with the control group, the migratory area was remarkably decreased ( $P < 0.001$ ). In addition showed that the expressions of MMP-9 at protein and mRNA level were significantly down-regulated ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** The proliferative and migratory abilities of HepG2 cells could be inhibited by Cortex Mori serum, which may be related to down-regulating MMP-9 expressions.

**【Key words】** Cortex Mori; Liver cancer cells; Cell proliferation; Cell migration; Matrix metalloproteinase-9

近年来对肝癌的临床治疗虽有较大进展, 疗效也明显提高, 但是肝癌患者的长期生存率仍不尽如人意。因此, 探索肝癌细胞侵袭转移的机制, 寻找新的药物和

治疗靶点是提高治疗效果的关键。研究表明, 基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的浸润、转移机制中具有重要作用<sup>[1]</sup>。肝癌组织内 MMP-9 表达与肝癌的侵袭、转移呈正相关<sup>[2]</sup>; 肝癌组织过度表达 MMP-9 与肿瘤生长、术后复发、甲胎蛋白 (alpha fetal protein, AFP) 升高密切相关<sup>[3]</sup>, 以上研究结果提示调

**【基金项目】** 武汉市青年科技晨光计划 (201150431137)

**【作者单位】** 430070 湖北武汉, 广州军区武汉总医院肿瘤科 (余丽芳、饶智国、章必成、王伟星、刘健)

**【通讯作者】** 饶智国, E-mail: zhiguorao@hotmail.com

控 MMP-9 在肝癌细胞中的表达,对肝癌的治疗有望提供新的思路。

桑白皮(*Morus alba* L.)即桑科植物桑的根皮,自古以来就在民间用于消炎、利尿、解热、镇咳、祛痰等,在方剂中亦广泛使用<sup>[4]</sup>。近年来,国内外学者对桑白皮的多种药理活性和药效进行了深入研究和科学评价,桑白皮提取物具有一定的抗肿瘤活性,已应用于治疗肝细胞癌、胃癌、白血病、宫颈癌等多种癌症<sup>[5-6]</sup>,但其具体作用机制尚未明确。其是否通过调控 MMP-9 表达来抑制 HepG2 细胞增殖、迁移而发挥抗肿瘤作用,目前尚未见报道。本文旨在探讨桑白皮提取物对人肝癌细胞 HepG2 细胞生物学行为及 MMP-9 表达的影响,探索中西医结合治疗肝癌的作用与分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

250~350 g 雄性 Wistar 大鼠,购于华中科技大学实验动物中心 SCXK(鄂)2004-007。实验所用细胞及生物试剂均购于武汉科瑞生物技术有限公司,包括:人肝癌细胞 HepG2 细胞株(编号:zx1006);MMP-9 抗体(Santa Cruz, sc-100558);高糖 DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium)培养基(Hyclone 公司);胰蛋白酶(Sigma 公司,批号:HY27250);胎牛血清(Gibco 公司)。桑白皮提取物由江阴天江药业有限公司生产(生产批号:1202025)。

### 1.2 方法

1.2.1 制备含药血清 取大鼠 40 只(清洁级),均分为 4 组[正常对照组(C组)、高浓度组(H组)、中等浓度组(M组)、低浓度组(L组)]。给药组正常饲养,连续 7 d,每日 7:00 am 定时灌胃一次(颗粒药物浓度为 5.25 g/ml,依据:根据公式换算给予大鼠与人的等效剂量为 0.525 g/100 g,中等浓度为 5.25 g/100 g,而大鼠灌胃剂量通常在 1~2 ml/100 g),剂量分别相当于 65 kg 成人每日每公斤用药量的低、中及高剂量,对照组按 1 ml/100 g 灌以生理盐水。末次给药后 2 h,每只大鼠断头取血 5~10 ml 于无菌试管(不加抗凝剂),室温静置 2 h 后,1500 r/min 离心 10 min,取上清液即为各浓度药物血清和对照血清,微孔滤膜除菌后分装于 1 ml 冻存管,标记后置于一 80 ℃冰箱备用。

1.2.2 细胞培养 HepG2 细胞于 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中,37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,隔天换培养液,当细胞融合度达 80%时,用 0.25%胰蛋白酶消化,以 1:4 比例传代,24 h 后更换新鲜培养基,72 h 再次传代,所有实验用细胞均处于对数增长期。

1.2.3 细胞分组及处理 将处于生长对数期的 HepG2 细胞以  $2 \times 10^5$  /mL 密度接种于 6 孔板中,将

细胞进行相应的分组及处理。C组:正常培养基培养;H、M、L 成 3 组;用 0.5%胎牛血清稀释药物血清处理 HepG2 24 h 后进行相应实验。

1.2.4 Western blotting 检测 MMP-9 蛋白表达 收集各组细胞,加适量预冷 150 mmol/L Lysis buffer (Cocktail)裂解液,提取总蛋白。按照 30 μl 体系、2×le-amnli buffer 制样,按实验设计顺序加样,电泳(95 V),转膜 75 min。取出聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,做标记后,用 5%脱脂牛奶封闭液封闭 30 min。倒掉封闭液后,加入一抗兔抗小鼠多克隆抗体(anti-MMP-9, 1:1000),摇床上 4 ℃过夜,用 1×TBST 洗膜,加入用 1×TBST 稀释的二抗室温孵育 1 h,电化学发光(elctrochemiluminescence, ECL)显影并用蛋白灰度值用 ImageJ 软件进行分析。

1.2.5 逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 MMP-9 mRNA 的表达 细胞培养达到 80%~90%融合后,弃去陈旧培养液,用适量灭菌的预热磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗两次去除残余培养液,按 Trizol 试剂盒步骤说明进行操作提取总 RNA 并用核酸测定仪测定总 RNA 含量和纯度。取 cDNA 5 μg,利用逆转录试剂盒合成 cDNA。根据 Genbank 查找基因序列并设计引物:MMP-9 引物序列:F 5'-ACCACGTGTGCTGGACTCTG-3', R 5'-CCAT-CAGGCAGTTCGTAG-3',长度 156 bp;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glycer-aldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物序列:F 5'-TATCGGACGCCTG-GTTAC-3', R 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGG-3',长度 201 bp。反应条件:95 ℃预变性,5 min;95 ℃变性,30 s;58 ℃退火,30 s;68 ℃延伸,10 min;4 ℃,终止。PCR 产物经浓度为 2%的琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像分析系统进行扫描拍照,灰度值用 ImageJ 软件进行分析。

1.2.6 流式细胞术检测细胞周期 设立阴性对照组,并收集细胞  $10^6$  个;用 1 ml PBS 重新悬浮细胞,2000 r/min,离心 5 min,小心移去上清液;加入 0.5 ml Solution Buffer,轻轻悬浮细胞(自此步骤起,操作中均不能剧烈振荡),2000 r/min,离心 5 min,小心移去上清液;再加入 0.5 ml Solution Buffer,轻轻悬浮细胞,2000 r/min,离心 5 min,小心移去上清液;加入 250 μl Solution A,轻轻悬浮细胞,25 ℃孵育 10 min;溶液中加入 200 μl Solution B,轻轻悬浮细胞,25 ℃孵育 10 min;最后加入 200 μl Solution C,轻轻悬浮细胞,4 ℃避光 10 min;应用流式细胞仪检测并分析。

1.2.7 细胞划痕实验 先用记号笔在 6 孔板背后,均匀的划横线,大约间隔 0.5 cm,横穿过孔,每孔至少穿

过5条线。在孔中加入约  $5 \times 10^5$  个细胞。第二天用  $10 \mu\text{l}$  枪头垂直于背后的横线划痕,不能倾斜。用预热的 PBS 洗细胞3次,去除划下的细胞,加入无血清培养基,放入培养箱培养,24 h后取样,拍照并分析结果。

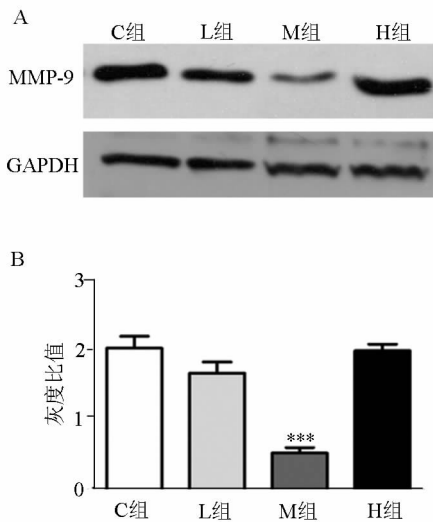
### 1.3 统计学处理

实验数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件分析,组间比较采用单因素方差分析,若方差不齐,则用非参数秩和检验,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度含桑白皮提取物血清处理的 HepG2 MMP-9 的表达

Western blotting 在 76 kDa 的位置上出现的阳性杂交带为 MMP-9 蛋白表达,如图 1A 所示。与正常对照组相比,桑白皮提取物血清处理各组对 MMP-9 蛋白表达均具有抑制效应;其中 M 组具有明显差异 ( $P < 0.001$ ),图 1B。



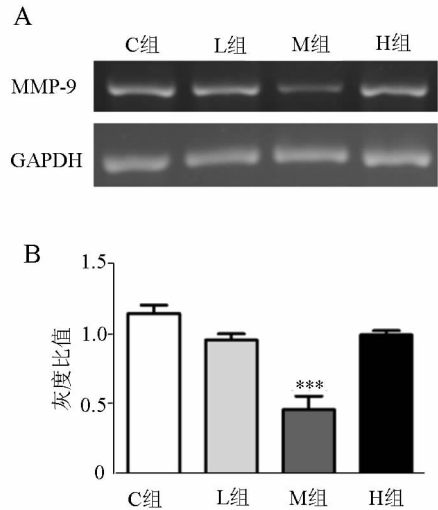
注:A: Western blotting 所示不同组别 HepG2 MMP-9 表达水平;  
B: 电泳条带光密度扫描分析比较,与正常对照组比较,\*\*\* $P < 0.001$

图1 不同浓度含桑白皮提取物对 HepG2 MMP-9蛋白表达的影响  
Figure 1 Protein expression of MMP-9 in HepG2 cells with different concentrations of Cortex Mori

### 2.2 不同浓度含桑白皮提取物血清处理的 HepG2 MMP-9 mRNA 的表达

各组在 156 bp 处出现了 MMP-9 基因的特异性条带,201 bp 处出现了内参照 GAPDH 的条带,见图 2A。通过对电泳条带光密度扫描分析,正常对照组有较强的 MMP-9 基因表达。与正常对照组比较,不同浓度桑白皮血清处理的 HepG2 细胞中, MMP-9 基因表达均有下调现象;低、中、高浓度血清组 MMP-9 基因表达分别为  $1.672 \pm 0.156$ ,  $0.532 \pm 0.079$ ,  $1.988 \pm 0.098$ , 其中 M 组表达水平降低最明显 ( $P < 0.001$ ),见图

2B。



注:A: RT-PCR 结果显示不同组别 HepG2 MMP-9 mRNA 表达;B: 电泳条带光密度扫描分析比较,与正常对照组比较,\*\*\* $P < 0.001$

图2 不同浓度含桑白皮提取物对 HepG2 MMP-9 mRNA 表达的影响  
Figure 2 MMP-9 mRNA levels of HepG2 cells with different concentrations of Cortex Mori

### 2.3 不同浓度桑白皮提取物血清处理的 HepG2 细胞周期的变化

应用流式细胞仪检测细胞周期的实验中,检测结果显示:正常对照组 HepG2  $G_1$  期细胞比例为  $(32.6 \pm 1.18)\%$ ,  $G_2$  期为  $(6.59 \pm 1.03)\%$ , S 期为  $(60.08 \pm 1.56)\%$ ; H、M、L 3 组 24 h 后,  $G_1$  期细胞数量增加,而  $G_2$  期细胞显著减少,细胞明显被阻滞于  $G_1$  期 ( $P < 0.05$ )。且以 M 组抑制效果最佳,  $G_1$  期细胞比例为  $(59.68 \pm 2.32)\%$ ,  $G_2$  期为  $(3.69 \pm 0.86)\%$ , S 期为  $(36.36 \pm 1.06)\%$  ( $P < 0.01$ ); 而 L 组无明显抑制作用,  $G_1$  期细胞比例为  $(40.52 \pm 1.89)\%$ ,  $G_2$  期为  $(5.84 \pm 0.93)\%$ , S 期为  $(53.64 \pm 2.47)\%$ ; 而 H 组抑制作用相对于 M 组抑制作用开始下降,  $G_1$  期细胞比例为  $(48.93 \pm 2.65)\%$ ,  $G_2$  期为  $(4.89 \pm 0.81)\%$ , S 期为  $(46.17 \pm 2.31)\%$ ,见图 3。

### 2.4 不同浓度含桑白皮提取物血清对 HepG2 迁移情况的影响

细胞划痕实验表明:桑白皮提取物血清处理的 HepG2 细胞与正常对照细胞相比,细胞的迁移面积均有减少,其中 M 组迁移面积减少最显著 ( $P < 0.001$ ),见图 4。

## 3 讨论

肝癌发生侵袭转移是一个复杂的多基因调控和多步骤发生过程,涉及肿瘤细胞增殖、黏附、基质降解、细胞迁移等许多环节<sup>[7]</sup>。因此,阻断肿瘤细胞增殖和侵袭过程的各环节均有可能抑制肿瘤的转移。

特异性的抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡是目前肿瘤治疗的新途径<sup>[8]</sup>。多数抗肿瘤的化学药物

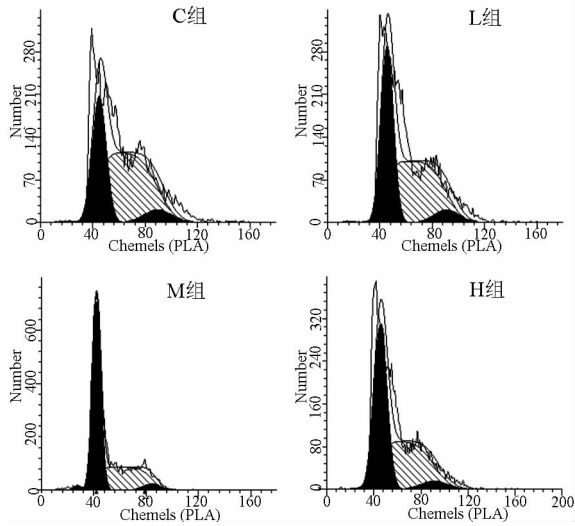
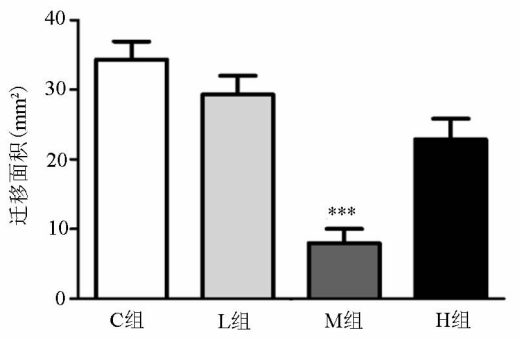


图 3 不同浓度含桑白皮提取物对 HepG2 细胞周期影响流式分析  
Figure 3 Cell cycle of HepG2 cells with different concentrations of Cortex Mori



注：与正常对照组比较，\*\*\* $P < 0.001$

图 4 不同浓度含桑白皮提取物血清对 HepG2 迁移情况的影响  
Figure 4 Migration area of HepG2 cells with different concentrations of Cortex Mori serum

就是通过干扰肿瘤细胞增殖、分化，从而触发凋亡级联通路达到治疗效果<sup>[9]</sup>。由于化学药物的昂贵和高毒副作用的缺点，使得研发高效、低毒、价廉的抗肿瘤药物成为亟待解决的问题，这恰恰是中医药的优势所在。本研究选用目前广泛用于肝癌研究的模式细胞 HepG2<sup>[10]</sup>，通过桑白皮提取物血清干预 HepG2 后检测其对 HepG2 细胞增殖及侵袭转移能力的影响，结果表明桑白皮提取物血清能够显著抑制 HepG2 的增殖能力(图3)。图4显示，干预后的肝癌细胞迁移能力与对照组相比均明显下降( $P < 0.001$ )，说明桑白皮提取物血清能够抑制或减弱 HepG2 的迁移、转移的能力。图 1 和图 2 结果提示，桑白皮提取物血清可抑制

MMP-9 表达，有效地破坏肿瘤细胞运动侵袭的动力系统，抑制肿瘤细胞向外运动和侵袭。MMPs 作为肿瘤侵袭转移的促进因子，是  $\beta$ -catenin 的下游基因<sup>[11]</sup>，是一组锌离子依赖型内肽酶，其中 MMP-9 是降解 IV 型胶原最主要的酶<sup>[12]</sup>，在肝癌组织中高表达，并与肝癌的浸润转移及预后密切相关<sup>[13]</sup>。本研究结果表明，桑白皮提取物降低 MMP-9 蛋白及 mRNA 的表达水平( $P < 0.001$ )；提示桑白皮提取物可通过靶向抑制 MMP-9，从而有效地阻抑肿瘤细胞运动侵袭。本研究证实桑白皮提取物可明显抑制肝癌细胞的增殖和转移，下调 MMP-9 表达可能是其发挥作用的主要机制之一。今后本文研究者还将针对其抑制肝癌细胞增殖，诱导肝癌细胞凋亡的作用途径和作用靶点做进一步的研究。

### 参 考 文 献

- [1] Thieringer FR, Maass T, Anthon B, *et al.* Liver-specific overexpression of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in transgenic mice accelerates development of hepatocellular carcinoma[J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2012, 51(6): 439-448
- [2] Sakamoto Y, Mafune K, Mori M, *et al.* Overexpression of MMP-9 correlates with growth of small hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2000, 17(2): 237-280
- [3] Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(11): 1649-1659
- [4] 李 群. 桑白皮化学成分, 质量控制, 药理及炮制研究进展[J]. *齐鲁药事*, 2011, 30(10): 596-599
- [5] 吴志平, 谈建中, 顾振纶. 中药桑白皮化学成分及药理活性研究进展[J]. *中国野生植物资源*, 2004, 23(5): 10-12
- [6] 王 瑾, 张会敏, 石俊英. 桑白皮黄酮类化学成分研究进展[J]. *齐鲁药事*, 2012, 31(7): 420-422
- [7] Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: a global view [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7(8): 448-458
- [8] Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, *et al.* Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model[J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1005-1017
- [9] Yan SL, Huang CY, Wu ST, *et al.* Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines[J]. *Toxicol in Vitro*, 2010, 24(3): 842-848
- [10] Wilkening S, Stahl F, Bader A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties [J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31(8): 1035-1042
- [11] Dwivedi A, Slater SC, George SJ. MMP-9 and -12 cause N-cadherin shedding and thereby  $\beta$ -catenin signalling and vascular smooth muscle cell proliferation[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 81(1): 178-186
- [12] Sato H, Kida Y, Mai M, *et al.* Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various human tumor cells[J]. *Oncogene*, 1992, 7(1): 77-83
- [13] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(3): 161-174