

白术精油对肝癌细胞增殖和凋亡的影响

李红霞¹，叶泽婷^{2#}，聂裕桐³，苏祖清^{1,2,3*}，郑广娟^{1,2,3*}

(1. 广州中医药大学第二附属医院, 省部共建中医湿证国家重点实验室, 广东广州 510006; 2. 粤港澳中医药与免疫疾病研究联合实验室, 广东广州 510120; 3. 广州中医药大学第二附属医院中药药理研究实验室, 广东广州 510006)

摘要: 目的 探讨白术精油对肝癌细胞增殖和凋亡的影响。方法 体外培养 HepG2、MHCC97-L、MHCC97-H 肝癌细胞, 给予不同质量浓度白术精油干预, 通过 MTT 法检测细胞存活率, 平板克隆实验检测细胞增殖活性, Hoechst 33342 染色观察凋亡细胞形态及数目, 流式细胞术检测细胞凋亡率, Western blot 法检测细胞 Bax、Bcl-2、cleaved caspase-3 和 cleaved PARP 蛋白表达。结果 MTT 和平板克隆实验结果显示, 白术精油可剂量依赖性地降低 HepG2、MHCC97-L 和 MHCC97-H 肝癌细胞存活率和增殖能力 ($P<0.05$, $P<0.01$)。Hoechst 33342 染色和流式细胞术结果显示, 白术精油可剂量依赖性地促进 HepG2 和 MHCC97-H 肝癌细胞凋亡 ($P<0.05$, $P<0.01$)。Western blot 实验结果显示, 白术精油可升高 HepG2 和 MHCC97-H 肝癌细胞中 cleaved caspase-3、cleaved PARP 和 Bax 蛋白表达 ($P<0.05$, $P<0.01$), 降低 Bcl-2 蛋白表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 白术精油可能通过诱导肝癌细胞凋亡, 从而发挥抑制其增殖活性的作用。

关键词: 白术精油; 肝癌细胞; 增殖; 凋亡; Bax/Bcl-2; cleaved caspase-3

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)07-2365-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2024.07.041

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是目前我国常见的恶性肿瘤, 具有病死率高、生存周期短、复发率高等特征, 其 5 年生存率仅为 5.1%^[1], 死亡率高居我国癌症死亡率的第 2 位^[2]。目前, 手术切除、放疗、介入、肝移植、靶向药物及免疫疗法是治疗肝细胞癌的主要手段^[3], 但均具有一定的局限性, 如手术常要求肿瘤处于早期, 无转移发生; 以 PD-1/PD-L1 抑制剂和血管生长抑制为代表的抗肿瘤药物也存在靶点单一等问题^[4-5]。因此, 寻找其他有效的 HCC 治疗药物具有重要的意义。

白术是菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎, 具有益气健脾、燥湿利水等功效^[6]。课题组前期通过超临界 CO_2 萃取法, 从白术的干燥根茎中提取得到一种具有特殊香气的黄棕色液体, 即为白术精油 (the essential oil of *Rhizoma atractylodis macrocephalae*, EO-RAM), 通过 HPLC 指纹图谱研究, 发现其主要成分有苍术酮、白术内酯 I、白术内酯 III 等, 并且在 MHCC97-L 细胞和 MHCC97-L 移植瘤裸鼠模型上证实具有治疗肝癌的活性^[7-8]。其他研究也表明, 白术精油可以通过抑制 MMP-9

表达发挥抑制 H22 肝癌肺转移的作用^[9]。在临幊上, 白术也被众多医家用于治疗肝癌, 具有较好的疗效^[10-13]。因此, 本研究拟探索白术精油对 HepG2、MHCC97-L 和 MHCC97-H 肝癌细胞凋亡的影响及其作用机制, 以期为白术的开发、应用提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 HepG2 细胞购自广州赛库生物技术有限公司; MHCC97-L、MHCC97-H 细胞均购自复旦大学附属中山医院肝癌研究所。

1.2 试剂与药物 白术精油由广东省中医院中药药理实验室提供。DMEM 培养基 (批号 8117127, 美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (FBS)、0.25% 胰蛋白酶 (批号 1739464、1176503, 美国 Gibco 公司); 噻唑蓝粉末 (MTT) (批号 7101K, 美国 Sigma 公司); Hoechst 33342 试剂盒、RIPA 裂解液 (批号 C1025、P0013B, 上海碧云天生物技术股份有限公司); Annexin V-FITC/PI 试剂盒 (批号 A80010633, 杭州联科生物技术有限公司); 二甲亚砜 (DMSO) (批号 180990, 广州威佳科技有限公司); 4% 多聚甲醛 (批号

收稿日期: 2023-05-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81703770); 广东省中医药防治难治性慢病重点实验室项目 (2018B030322012); 广东省中医院朝阳人才科研专项 (ZY2022KY12); 广东省中医院中医药科学技术研究专项 (YN2018QJ04, YN2019QJ10)

作者简介: 李红霞 (1996—), 女, 硕士生, 研究方向为中医药防治代谢性疾病。Tel: (020) 39318470, E-mail: lihx2106@163.com

#共同第一作者: 叶泽婷 (1998—), 女, 硕士生, 研究方向为中医药防治代谢性疾病。Tel: (020) 39318470, E-mail: yezeting1216@163.com

*通信作者: 苏祖清 (1989—), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为中医药防治代谢性疾病。E-mail: suzq@gzucm.edu.cn

郑广娟 (1964—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药理。E-mail: zhengguangjuan@gzucm.edu.cn

AR1069, 武汉博士德生物工程有限公司); GIMSA 应用染色液 (上海锐赛生物技术有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂 (批号 XE340612, 美国 Thermo Fisher 公司); Bax、Bcl-2 抗体 (批号 50599、68103, 美国 Proteintech 公司); cleaved PARP、cleaved caspase-3 (批号 5625、9661, 美国 Cell Signaling Technology 公司)。

2 方法

2.1 白术精油微乳制备 将 1.3 g 油相 LabrafilM1944CS 和 1.0 g 白术精油混合, 于 30 ℃ 水浴中搅拌均匀, 再加入 2.5 g RH40 和 1.0 g Transcutol HP, 充分搅拌混合均匀后加入 5.2 g 纯水, 30 ℃ 水浴中充分混匀, 过滤, 即得。

2.2 MTT 法检测细胞增殖活性 将 HepG2、MHCC97-L 和 MHCC97-H 细胞分别接种于 96 孔细胞培养板中, 接种密度为 4.0×10^3 /孔, 加入 100 μL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养, 放置在 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中过夜, 细胞贴壁后分别加入不同质量浓度 (20、40、60、80、100、120 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 白术精油微乳, 同时设置溶剂组 (溶剂制备方法同“2.1”项, 并以纯水代替白术精油), 培养 24、48、72 h, 每孔加入 10 μL MTT 溶液, 继续孵育 4 h, 使用酶标仪检测 490 nm 波长处吸光度。

2.3 平板克隆实验检测细胞增殖能力 将 HepG2 和 MHCC97-H 细胞分别接种于 6 孔细胞培养板中, 接种密度为 500/孔, 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 放置在 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养过夜, 细胞贴壁后加入 2 mL 含不同质量浓度 (40、60、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 白术精油的培养基, 并设溶剂组和对照组 (含 10% FBS 的 DMEM 培养基), 培养 48 h 后弃去培养基, 加入新的培养基继续培养, 直至出现明显的克隆后终止, PBS 清洗后加入 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 清洗后加入适量结晶紫染色液染色 15 min, PBS 洗去浮色后自然风干, 拍照。

2.4 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡情况 细胞按“2.3”项下方法培养及给药, 接种密度为 2.0×10^4 /孔, 培养 48 h 后弃去原培养基, PBS 清洗后加入 4% 多聚甲醛固定 15 min, 再清洗后加入 Hoechst 33342 染色液染色 5 min, PBS 洗去浮色, 于荧光显微镜下观察并拍照。

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡率 细胞按“2.3”项下方

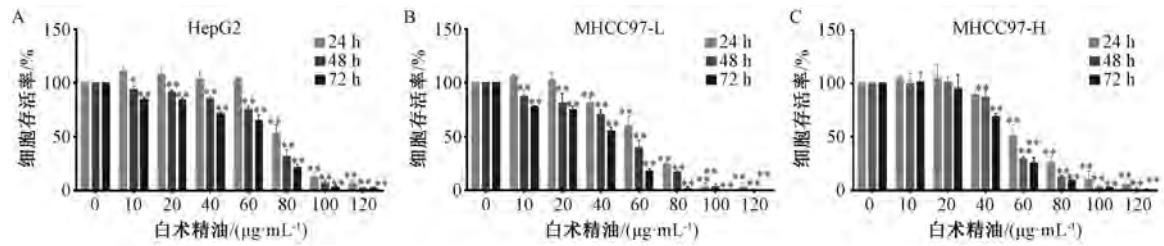
法培养及给药, 接种密度为 3.0×10^5 /孔, 培养 48 h 后弃去原培养基, 加入不含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化, 收集细胞至流式细胞管中, 2 000 r/min 离心 5 min, 按试剂盒说明书操作, 上机检测细胞凋亡率。

2.6 Western blot 法检测细胞 Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3、cleaved PARP 蛋白表达 将 HepG2 和 MHCC97-H 细胞分别接种于 100 mm 直径的细胞培养皿中, 接种密度为 2.0×10^5 /孔, 分组及给药方法同“2.3”项, 药物处理后弃去原培养基, 使用含有 PMSF 的 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白浓度, SDS-PAGE 电泳、转膜, Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3、cleaved PARP、GAPDH 一抗孵育过夜, 次日孵育二抗, ECL 化学发光试剂显色、曝光, 获取条带图片, Image Lab 软件分析条带灰度值, 计算目的蛋白相对表达量。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 25.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 白术精油对肝癌细胞增殖活性的影响 如图 1A 所示, 10、20、40、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白术精油作用 24 h 时, 对 HepG2 细胞无明显抑制作用 ($P > 0.05$); 延长到 48、72 h 时, 10~120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白术精油均能抑制 HepG2 细胞活性 ($P < 0.05$), 其中作用 48 h 半抑制浓度 (IC_{50}) 约为 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。如图 1B 所示, 10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白术精油作用 24 h 时, 对 MHCC97-L 细胞无明显抑制作用 ($P > 0.05$); 延长到 48、72 h 时, 10~120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白术精油均能抑制 MHCC97-L 细胞活性 ($P < 0.05$), 其中作用 48 h IC_{50} 约为 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。如图 1C 所示, 10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白术精油作用 24 h 时, 对 MHCC97-H 细胞无明显抑制作用 ($P > 0.05$); 延长到 48、72 h 时, 40~120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白术精油能抑制 MHCC97-H 细胞活性 ($P < 0.05$), 其中作用 48 h IC_{50} 约为 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以上结果表明, 白术精油能抑制 HepG2、MHCC97-L 和 MHCC97-H 肝癌细胞的增殖并呈现时间和剂量依赖性。综上所述, 本研究选择白术精油的给药质量浓度为 40、60、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 作用时间为 48 h。

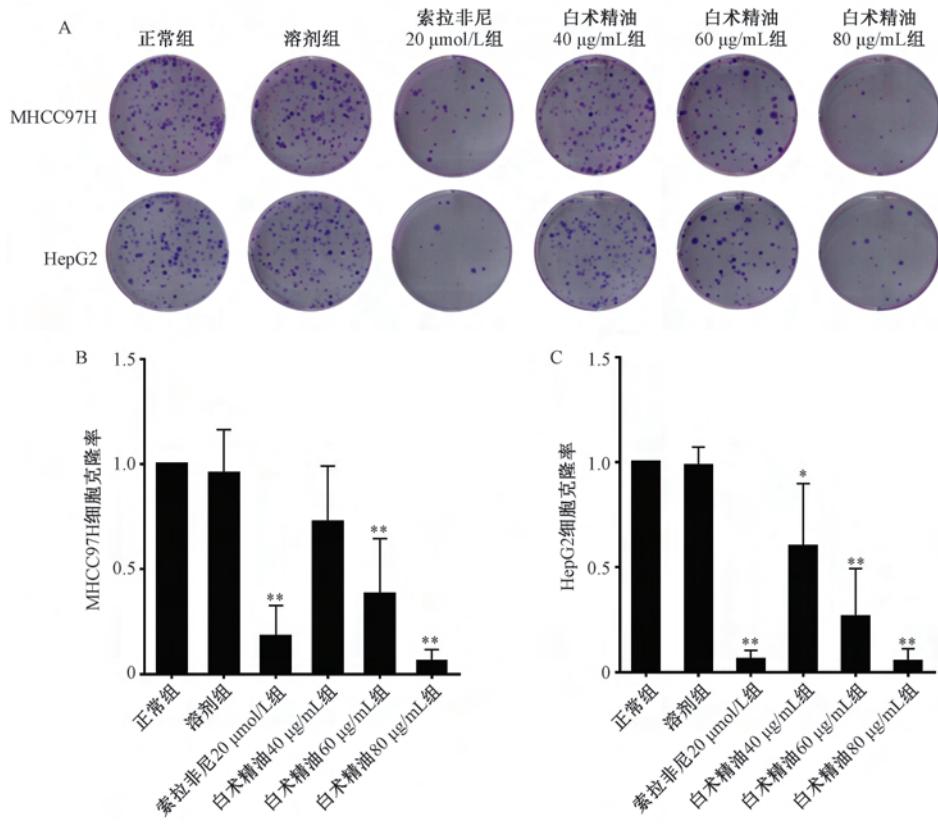


注: 与溶剂组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 不同质量浓度白术精油及作用时间对 HepG2 (A)、MHCC97-L (B)、MHCC97-H (C) 肝癌细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.2 白术精油对 HepG2、MHCC97-H 肝癌细胞增殖能力的影响 如图 2 所示, 与溶剂组比较, 60、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白术精

油可抑制 MHCC97-H 细胞增殖能力 ($P < 0.01$), 40、60、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白术精油可抑制 HepG2 细胞增殖能力 ($P < 0.05$,



注：与溶剂组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图 2 白术精油对 HepG2、MHCC97-H 肝癌细胞集落形成能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

$P < 0.01$)。

3.3 白术精油对 HepG2、MHCC97-H 肝癌细胞凋亡的影响 Hoechst 33342 实验结果如图 3 所示，与溶剂组比较，60、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白术精油干预 48 h 后，HepG2、MHCC97-H 细胞内出现亮蓝色的或碎块状的致密染色，即细胞呈现凋亡现象，细胞凋亡率升高 ($P < 0.01$)。进一步采用 Annexin V-FITC/PI 双染法和流式细胞仪检测白术精油对肝癌细胞凋亡的影响，结果如图 4 所示，可知与溶剂组比较，60、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白术精油组 HepG2、MHCC97-H 细胞出现凋亡现象，凋亡率升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，其中 HepG2 细胞凋亡特征以晚期凋亡为主，而 MHCC97-H 细胞以早期凋亡为主。以上结果表明，白术精油能通过诱导 HepG2、MHCC97-H 细胞凋亡，从而抑制肝癌细胞的增殖。

3.4 白术精油对肝癌细胞 Bax、Bcl-2、cleaved caspase-3、cleaved PARP 蛋白表达的影响 如图 5~6 所示，与溶剂组比较，60、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白术精油组 HepG2、MHCC97-H 细胞 Bax、cleaved caspase-3、cleaved PARP 蛋白表达及 Bax/Bcl-2 比值升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。Western blot、Hoechst 33342 和流式细胞术结果共同证实，白术精油能通过促进肝癌细胞凋亡来发挥抑制其增殖的作用。

4 讨论

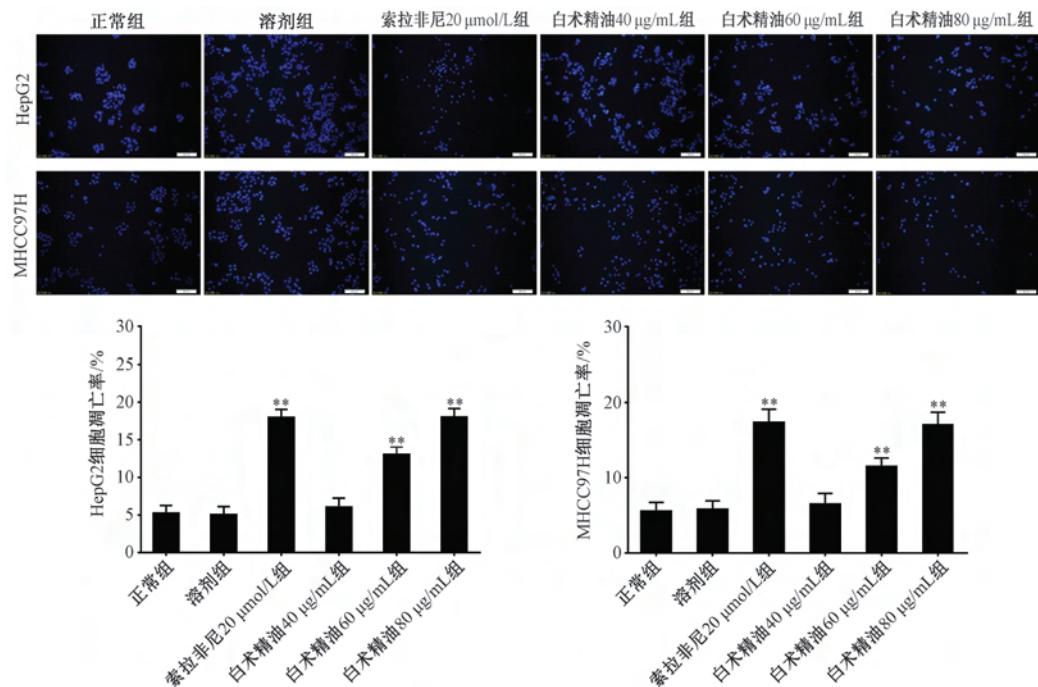
肝细胞癌是最为常见的恶性肿瘤之一，其死亡率高居世界癌症死亡率的第二位，且具有复发率高、生存率低的特点。目前，针对肝癌早期患者临床中首选手术治疗，但

是确诊时往往已是中晚期，因此，选择高效低毒的药物对于肝癌的治疗具有重要作用。中药具有多靶点、副作用小等治疗优势，正得到越来越多的关注。

在临床中，由白术组成的主要方药对胃癌^[14]、肺癌^[15]和肝癌^[16]等均有一定治疗作用。实验发现，白术精油可以通过抑制 MMP-9 的分泌，发挥抑制 H22 肝癌血道转移模型肺转移的作用^[9]。课题组前期在体内外实验中均证实，白术精油具有治疗肝癌的药效基础^[7~8]。因此，本研究在此基础上进一步探索白术精油对肝癌的抑制作用及其机制。

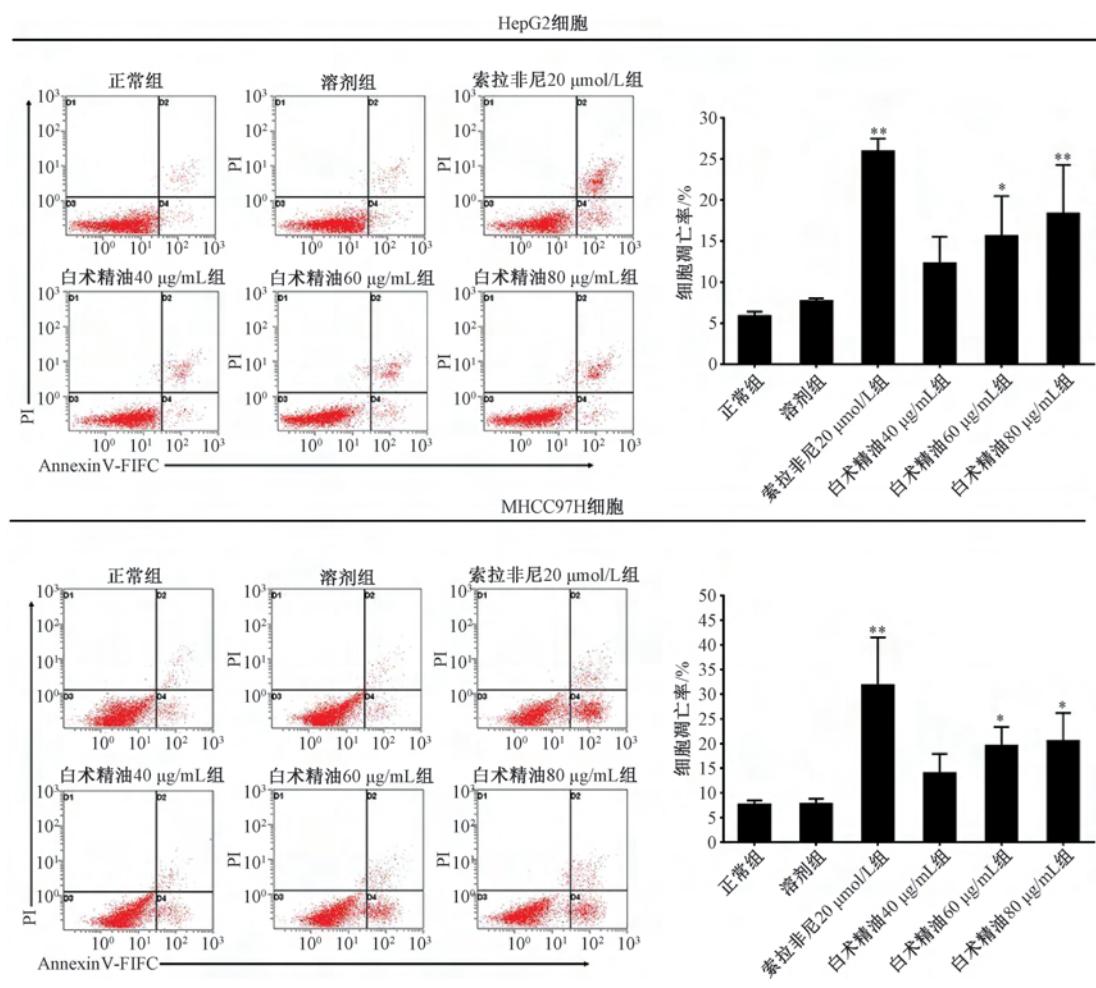
肝癌细胞的异常增殖是其最典型的恶性生物学特征，本研究选择 HepG2、MHCC97-L、MHCC97-H 肝癌细胞作为实验对象，通过 MTT 实验证实白术精油对这 3 种肝癌细胞的增殖均有抑制作用，且具有剂量和时间依赖性。通过 Hoechst33342 实验发现，白术精油能诱导 HepG2、MHCC97-H 肝癌细胞凋亡，80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 效果与阳性药索拉非尼相当；流式细胞术的结果也证实了白术精油对肝癌细胞凋亡的促进作用。

细胞凋亡受到细胞内外多种因子和信号通路的调控，其中包括线粒体相关的 Bcl-2、Bax 蛋白^[17]。Bcl-2 作为抗凋亡蛋白，可通过阻止细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质，从而抑制细胞凋亡；Bax 作为一种促凋亡蛋白，可从细胞质转移至线粒体表面，与 Bcl-2 结合成异源二聚体，从而抑制 Bcl-2 活性，发挥促进细胞凋亡的作用，因此，常用 Bax/Bcl-2 比值的变化来反映细胞凋亡情况^[18]。此外，Caspase



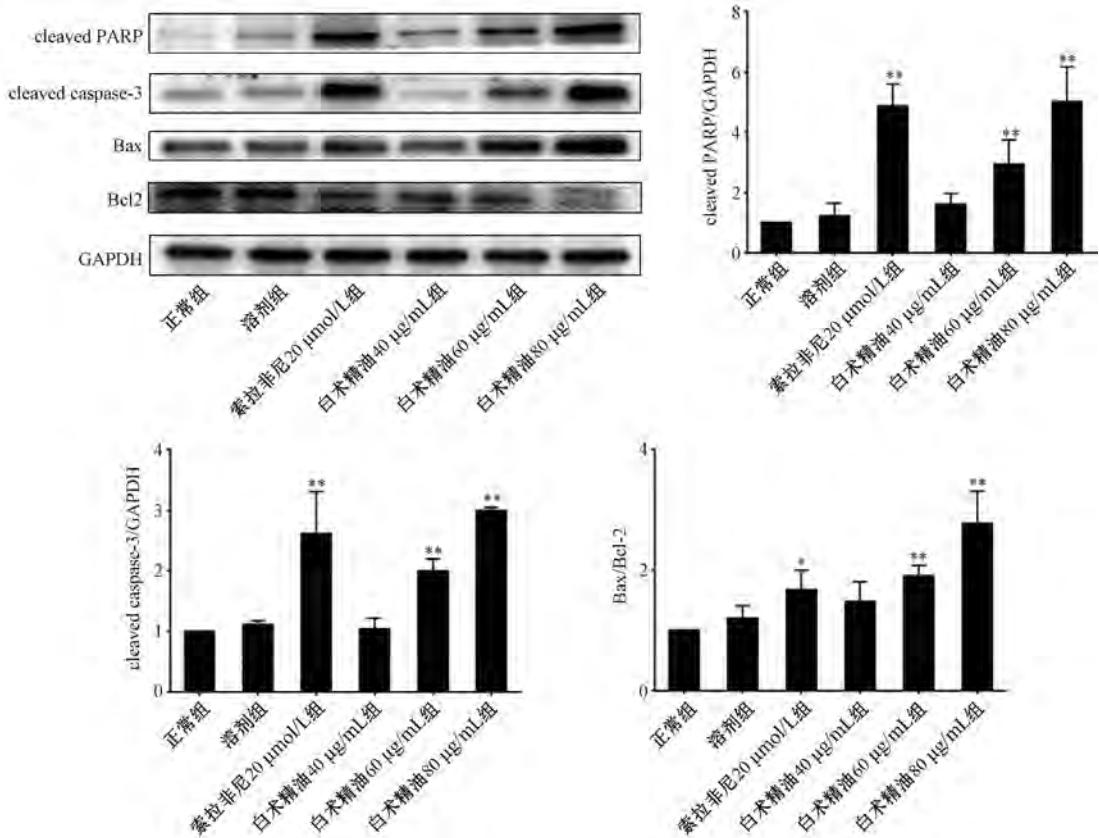
注：与溶剂组比较，** $P < 0.01$ 。

图3 白芷精油对HepG2、MHCC97-H肝癌细胞凋亡的影响 (Hoechst 33342染色, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)



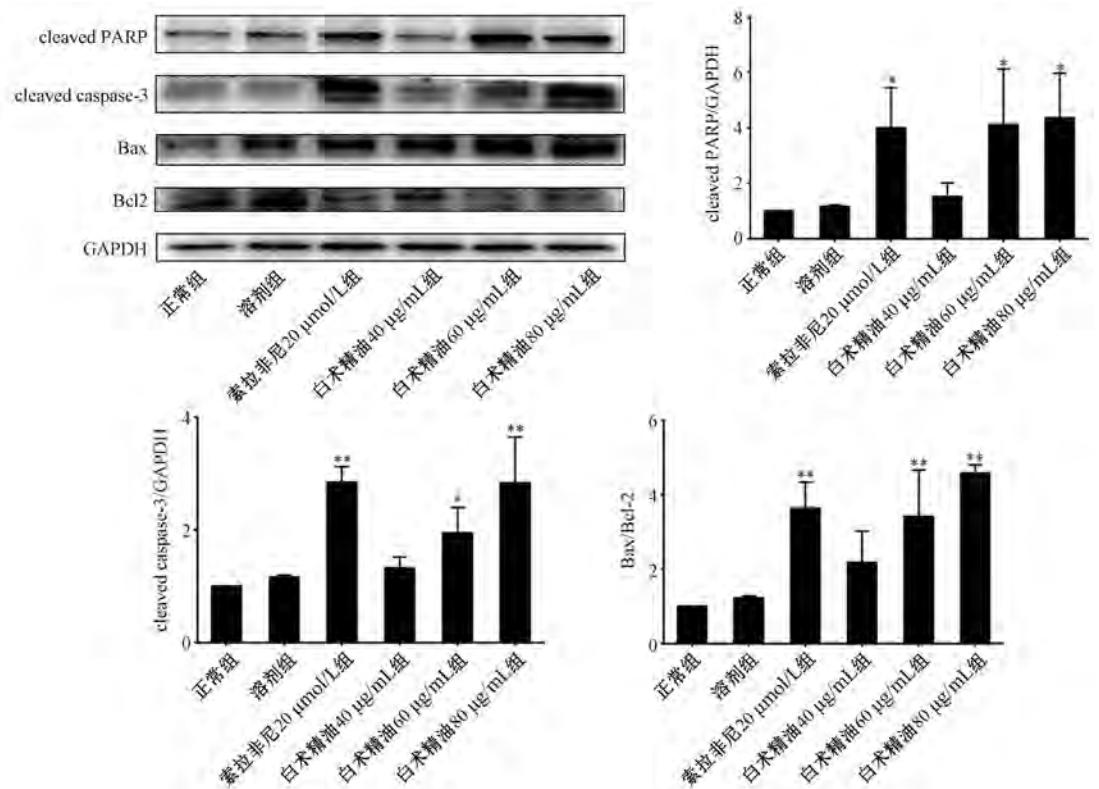
注：与溶剂组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图4 白芷精油对HepG2和MHCC97-H肝癌细胞凋亡的影响 (流式细胞术, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注: 与溶剂组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 5 白木精油对 HepG2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注: 与溶剂组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 6 白木精油对 MHCC97-H 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

家族成员参与细胞生长、分化、凋亡等生理过程，其中 caspase-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶，具有促进细胞凋亡的作用^[19]。PARP 也是死亡家族的调控因子之一，其中被切割的 PARP，即 cleaved PARP 被认为可以激活 caspase-3，从而诱导细胞凋亡^[20]。本研究发现，白术精油作用 48 h 后，HepG2、MHCC97-H 肝癌细胞 Bax/Bcl-2、cleaved caspase-3、cleaved PARP 蛋白表达均升高，且呈现剂量依赖性。

综上所述，白术精油对肝癌细胞增殖的抑制作用可能是通过诱导肝癌细胞凋亡来实现的，这对于今后它作为治疗肝癌联合用药或单独开发用药提供一定的理论依据。

参考文献：

- [1] Cao W, Chen H D, Yu Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. *Chin Med J*, 2021, 134(7): 783-791.
- [2] 曹梦迪, 王红, 石菊芳, 等. 中国人群肝癌疾病负担: 多数据源证据更新整合分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(11): 1848-1858.
- [3] 刘珍, 邓天好, 程华初, 等. 原发性肝癌临床治疗新进展 [J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(7): 207-210.
- [4] 陈健忠, 贾长库. 原发性肝癌手术治疗进展 [J]. 浙江医学, 2023, 45(4): 439-443.
- [5] 滕颖, 丁晓燕, 李文东, 等. 程序性细胞死亡受体 1 抑制剂联合仑伐替尼治疗晚期原发性肝癌的效果及不良反应 [J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(3): 606-610.
- [6] 靳玉秋, 陈光顺, 孙墨晗, 等. 经方中白术应用规律探析 [J]. 实用中医内科杂志, 2022, 36(11): 114-116.
- [7] 孙林芳, 朱莹, 贺嵩敏, 等. 白术挥发油的质量标准研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2015, 39(4): 372-376.
- [8] 孙林芳. 白术精油的质量控制及其微乳制剂的药学研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [9] 王郁金, 苏衍进. 白术挥发油对小鼠 H22 肝癌血道转移的抑制作用及机理研究 [J]. 陕西中医, 2009, 30(6): 735-736.
- [10] 黄锦鹏, 张腊, 林基伟, 等. 刘伟胜治疗肝癌用药规律研究 [J]. 新中医, 2021, 53(18): 118-122.
- [11] 宋金洁, 李中玉, 郭中宁, 等. 吴煜治疗中晚期肝癌用药规律的数据挖掘 [J]. 中国医药导报, 2021, 18(24): 124-127.
- [12] 许飞, 李学军. 白术的抗肿瘤作用及临床应用研究进展 [J]. 新乡医学院学报, 2021, 38(8): 798-801.
- [13] 刘丹, 王琼, 李牧婵, 等. 徐春军教授治疗原发性肝癌经验浅析 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2021, 31(9): 850-852.
- [14] 张斌. 参苓白术散加减联合化疗治疗中晚期胃癌的临床效果 [J]. 临床医学研究与实践, 2020, 5(16): 123-125.
- [15] 胡敬晖, 董慧君, 黎永明. 加味参苓白术散对中老年原发性支气管肺癌患者顽固性咳嗽的疗效研究 [J]. 中国处方药, 2022, 20(5): 130-132.
- [16] 李杏英, 杨德全, 骆常义, 等. 黄芪四君子汤对老年原发性肝癌放疗患者放射增敏及免疫功能的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(16): 3937-3940.
- [17] 白玲, 张昶, 陈昊. Bcl-2、Bax、Bcl-2 α 导致凋亡双向调节作用在肝癌中的意义 [J]. 临床荟萃, 2001, 16(9): 410-411.
- [18] Nasehi M, Torabinejad S, Hashemi M, et al. Effect of cholestasis and NeuroAid treatment on the expression of Bax, Bcl-2, Pgc-1 α and Tfam genes involved in apoptosis and mitochondrial biogenesis in the striatum of male rats [J]. *Metab Brain Dis*, 2020, 35(1): 183-192.
- [19] Gu Y Y, Chen M H, May B H, et al. Matrine induces apoptosis in multiple colorectal cancer cell lines in vitro and inhibits tumour growth with minimum side effects *in vivo* via Bcl-2 and caspase-3 [J]. *Phytomedicine*, 2018, 51: 214-225.
- [20] Kwon Y H, Bishayee K, Rahman A, et al. *Morus alba* accumulates reactive oxygen species to initiate apoptosis via FOXO-Caspase 3-dependent pathway in neuroblastoma cells [J]. *Mol Cells*, 2015, 38(7): 630-637.