

# 黄芪多糖抑制 HepG2 细胞增殖及可能机制研究

刘礼<sup>1</sup>, 袁昌劲<sup>1</sup>, 郭敬杰<sup>1</sup>, 余涛<sup>1</sup>, 吕秀玮<sup>1</sup>, 刘娇萍<sup>1</sup>, 赖晓晶<sup>2</sup>

1. 华中科技大学同济医学院附属武汉市中心医院, 湖北 武汉 430012; 2. 武汉生物工程学院药学院

**摘要:** **目的** 研究黄芪多糖对 HepG2 细胞增殖的作用及可能机制。 **方法** 用不同浓度 (100、200 和 400  $\mu\text{g/ml}$ ) 的黄芪多糖 (astragalus polysaccharide, APS) 处理 HepG2 细胞, 采用 MTT 法检测细胞增殖, 采用 Western blot 检测细胞内糖原合成酶激酶 3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ ) 的表达。 **结果** APS100 组、APS200 组及 APS400 组 HepG2 细胞第 1~7 d 吸光度和 GSK3 $\beta$  蛋白质表达均显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ); APS100 组和 APS400 组 HepG2 细胞 D1~D7 吸光度和 GSK3 $\beta$  蛋白质表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但均显著高于 APS200 组 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 黄芪多糖可显著抑制 HepG2 细胞增殖, 其机制可能与抑制糖原合成酶激酶 3 $\beta$  表达有关, 其中 200  $\mu\text{g/ml}$  抑制作用最强。

**关键词:** 黄芪多糖; HepG2 细胞; 细胞增殖; 糖原合成酶激酶 3 $\beta$

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2018)04-0385-03 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.04.001

## Inhibitory effect of astragalus polysaccharide on the proliferation of HepG2 cells and its potential mechanism

LIU Li\*, YUAN Chang-jin, GUO Jing-jie, YU Tao, LYU Xiu-wei, LIU Jiao-ping, LAI Xiao-jing

\* The Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430012, China

**Abstract:** **Objective** To study the inhibitory effect of astragalus polysaccharide (APS) on the proliferation of HepG2 cells and its potential mechanism. **Methods** HepG2 cells were cultured and treated with 100  $\mu\text{g/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$  or 400  $\mu\text{g/ml}$  APS. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect the cell proliferation. Western blot was employed to examine the expression of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). **Results** The absorbance at the 1<sup>st</sup>–7<sup>th</sup> day (D1–D7) in MTT assay and GSK3 $\beta$  expression in HepG2 cells at the 5<sup>th</sup> hour after treatment were significantly lower in the groups of APS100, APS200 and APS400 than in the control group ( $P < 0.05$ ). No statistically significant differences were found in the D1–D7 absorbance and GSK3 $\beta$  expression between the groups of APS100 and APS400 ( $P > 0.05$ ), but both of them were higher than those of the APS200 group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Astragalus polysaccharide can significantly inhibit the proliferation of HepG2 cells, and its mechanism may be related to inhibiting GSK3 $\beta$  expression. The results suggest that 200  $\mu\text{g/ml}$  APS has the best inhibitory effect.

**Key words:** astragalus polysaccharide; HepG2 cell; cell proliferation; glycogen synthesis kinase 3 $\beta$

黄芪多糖具有免疫增强及调控炎症反应功能, 可改善机体免疫而协同增强多种化疗药物对肿瘤的治疗疗效<sup>[1-2]</sup>, 但目前在黄芪多糖对肝癌的抑制作用及具体作用机制方面研究较少<sup>[3-4]</sup>。糖原合成酶激酶-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ ) 为保守丝氨酸/苏氨酸激酶, 除调控糖原合成酶的活性外, 还可作用于众多信号蛋白结构蛋白和转录因子, 调节细胞的分化、增殖、存活和凋亡, 证实与肝癌的发生、发展及转归密切相关。本研究采用不同浓度黄芪多糖作用于 HepG2 细胞, 比较不同浓度下 GSK3 $\beta$  表达差异, 研究黄芪多糖对 HepG2 细胞细胞增殖的影响及可能机制。

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31500840); 武汉市卫计委项目 (WZ17Z03)

**作者简介:** 刘礼 (1983-), 女, 湖北武汉人, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤疾病诊断与治疗工作。

## 1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 黄芪多糖粉针购自武汉胜天宇科技有限公司 (产品批号: 20110506)。HepG2 细胞购自中国科学院典型培养物细胞库, DMSO、高糖 DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS) 购自碧云天生物科技公司, 兔抗人 GSK3 $\beta$  一抗购自 Santa Cruze 公司。

1.2 HepG2 细胞培养 取 HepG2 细胞接种于 24 孔板内, 完全培养基为 90% 高糖 DMEM + 10% FBS, 每孔 1 ml, 培养条件为 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱。

1.3 HepG2 细胞增殖检测 黄芪多糖采用完全培养基配置。根据不同浓度的黄芪多糖处理将 HepG2 细胞分组如下: (1) 对照组 (CON 组): 完全培养基作用 5 h; (2) 黄芪多糖 100  $\mu\text{g/ml}$  剂量组 (APS100 组): 完全培养基联合 100  $\mu\text{g/ml}$  黄芪多糖作用 5 h; (3) 黄芪多糖 100  $\mu\text{g/ml}$  剂量组 (APS200 组): 完全培养基联合

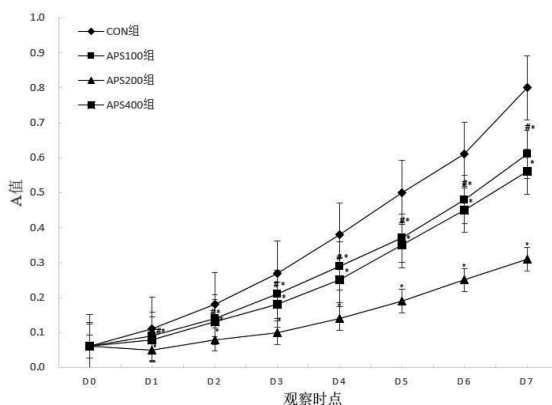
200  $\mu\text{g/ml}$  黄芪多糖作用 5 h; (4) 黄芪多糖 100  $\mu\text{g/ml}$  剂量组 (APS400 组): 完全培养基联合 400  $\mu\text{g/ml}$  黄芪多糖作用 5 h。将细胞按约 5 000 个/孔接种到 96 孔板中, 每组设置 6 个复孔, 根据分组加入不同的黄芪多糖处理 5 h 后洗去上清液, 然后加入完全培养基。MTT 法检测四组细胞增殖: 加入 5 mg/ml MTT (20  $\mu\text{l}$ /孔), 置 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下 4 h, 弃去上清液, 加入 DMSO 200  $\mu\text{l}$ /孔, 混匀 30 min 后, 在酶联检测仪上 570 nm 波长处测吸光度值, 分别检测处理前 (D0) 及处理后第 1~7 d (D1~D7) 吸光度。

**1.4 GSK3 $\beta$  表达检测** 采用 Western Blot 检测 CON 组、APS100 组、APS200 组及 APS400 组 HepG2 细胞药物处理后 5 h 后 GSK3 $\beta$  蛋白质表达, 选择  $\beta$ -actin 为内对照, 具体检测方法如下: 采用 Trizol 提取 CON 组、APS100 组、APS200 组及 APS400 组 HepG2 细胞细胞蛋白质, 加入兔抗人 GSK3 $\beta$  多克隆一抗抗体, 显色后, 计算 GSK3 $\beta$  基因蛋白质与内参  $\beta$ -actin 表达百分比。

**1.5 统计学分析** 采用 SPSS 12.5 进行统计学分析。CON 组、APS100 组、APS200 组及 APS400 组 HepG2 细胞吸光度及 GSK3 $\beta$  蛋白质表达比较采用单因素方差分析 (两两比较采用 SNK 法)。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HepG2 细胞增殖对比** 采用 MTT 法检测不同浓度黄芪多糖组及对照组 HepG2 细胞增殖 D0~D7 吸光度 (A 值), 结果表明 APS100 组、APS200 组及 APS400 组 HepG2 细胞 D1~D7 吸光度显著低于 CON 组 ( $P < 0.05$ ); APS100 组和 APS200 组 HepG2 细胞 D1~D7 吸光度差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但均显著高于 APS200 组 ( $P < 0.05$ ), 见图 1。

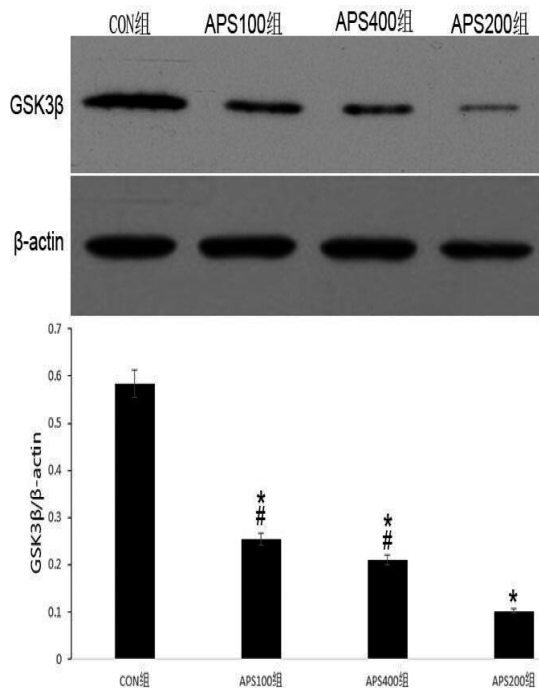


注: \* 与 CON 组比较,  $P < 0.05$ ; # 与 APS200 组比较,  $P < 0.05$ 。

图 1 HepG2 细胞增殖检测 D0~D7 吸光度比较

**2.2 GSK3 $\beta$  蛋白质表达对比** 采用 Western Blot 法

检测不同浓度黄芪多糖组及 CON 组处理 5 h 后 HepG2 细胞 GSK3 $\beta$  蛋白质表达, 结果表明 APS100 组、APS200 组及 APS400 组 HepG2 细胞 GSK3 $\beta$  蛋白质表达显著低于 CON 组 ( $P < 0.05$ ); APS100 组和 APS400 组 HepG2 细胞 GSK3 $\beta$  蛋白质表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); APS100 组及 APS400 组 HepG2 细胞 GSK3 $\beta$  蛋白质表达均显著高于 APS200 组 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。



注: \* 与 CON 组比较,  $P < 0.05$ ; # 与 APS200 组比较,  $P < 0.05$ 。

图 2 不同浓度黄芪多糖对 HepG2 细胞的 GSK3 $\beta$  蛋白质表达影响

## 3 讨论

黄芪多糖为目前临床上常见的调节免疫药物, 具有免疫增强及调控炎症反应功能, 可改善机体免疫而协同增强多种化疗药物对肿瘤的治疗疗效。目前研究发现黄芪多糖对机体的非特异性免疫及特异性免疫均具有显著改善作用, 可调节杀伤肿瘤细胞的因子增强对肿瘤细胞的抑制作用<sup>[5-6]</sup>。此外, 越来越多的研究发现黄芪多糖存在多种机制抑制肿瘤细胞增殖。陈瑾敬等<sup>[7]</sup>研究发现黄芪多糖可显著抑制 HepG2 细胞凋亡基因 Bcl-2 表达, 联合斑蝥酸钠其抑制效果更明显; 冯涛等<sup>[8]</sup>发现黄芪多糖和 5-Fu 联合使用可抑制 HepG2 细胞的增殖, 效应呈浓度和时间依赖性, 阻滞 HepG2 细胞周期于 G1 期, 并可诱导 HepG2 细胞凋亡, 明显增高肝癌 HepG2 细胞中 caspase-3、caspase-9 蛋白的表达, 抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著降低, 而单独 5-Fu 的实验组细胞中均未检测到上述变化, 认为黄芪

多糖和 5-Fu 联合使用能抑制肝癌 HepG2 细胞株的增殖,其机制之一是影响细胞周期使之阻滞于 G1 期,激活细胞凋亡系统,诱导细胞凋亡。此外,黄芪多糖可减少实验性肝癌大鼠 GST-P 和 TGF- $\beta$ 1 表达<sup>[9]</sup>。本研究表明,APS100 组、APS200 组及 APS400 组 HepG2 细胞 D1~D7 吸光度均显著低于 CON 组 ( $P<0.05$ ); APS100 组和 APS400 组 HepG2 细胞 D1~D7 吸光度差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),且均显著高于 APS200 组,这些证据表明黄芪多糖可抑制肝癌细胞增殖,200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  为最佳抑制浓度。

尽管研究充分证实黄芪多糖可显著抑制肝癌细胞增殖,但目前在具体作用机制方面尚无相关研究,推测可能与抑制调控细胞增殖基因有关。GSK3 $\beta$  生物学功能较为复杂,参与肿瘤形成的 Wnt/ $\beta$ -catenin 和 NF- $\kappa$ B 等多个信号传导通路,在癌细胞基因转录、加速细胞周期、参与肿瘤细胞侵袭与转移及凋亡过程中起到调控作用<sup>[10-11]</sup>。GSK3 $\beta$  具有抑制癌症及促进癌症双重作用,抑制 GSK3 $\beta$  活性后 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号传导通路激活,促进细胞增殖产生肿瘤,而增强 GSK3 $\beta$  则可表现出抑制癌症作用,但在不同肿瘤中 GSK3 $\beta$  展现出不同的功能,抑制癌症和促进癌症与肿瘤类型及内环境密切相关。目前研究发现 GSK3 $\beta$  在卵巢癌中具有促进肿瘤功能,而在胃癌中表现出抑制癌症作用<sup>[12-13]</sup>,而在肝癌中 GSK3 $\beta$  则表现出促进癌症功能<sup>[14]</sup>。基于目前研究,推测黄芪多糖抑制肝癌作用可能与其可调控 GSK3 $\beta$  有关。本研究中,采用 Western blot 法检测不同浓度黄芪多糖组及 CON 组 HepG2 细胞 GSK3 $\beta$  蛋白质表达,结果表明 APS100 组、APS200 组及 APS400 组 HepG2 细胞 GSK3 $\beta$  蛋白质表达显著低于 CON 组 ( $P<0.05$ ); APS100 组和 APS400 组 HepG2 细胞 GSK3 $\beta$  蛋白质表达差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); APS100 组及 APS400 组 HepG2 细胞 GSK3 $\beta$  蛋白质表达均显著高于 APS200 组 ( $P<0.05$ ),这些证据表明黄芪多糖可显著降低 HepG2 细胞 GSK3 $\beta$  蛋白质表达,推测黄芪多糖抑制 HepG2 细胞可能与其降低 GSK3 $\beta$  有关,但该结论有待于进一步研究

证实。

## 参考文献

- [1] Zhao HM, Wang Y, Huang XY, et al. Astragalus polysaccharide attenuates rat experimental colitis by inducing regulatory T cells in intestinal Peyer's patches [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22 (11): 3175-3185.
- [2] Guo L, Bai SP, Zhao L, et al. Astragalus polysaccharide injection integrated with vinorelbine and cisplatin for patients with advanced non-small cell lung cancer: effects on quality of life and survival [J]. Med Oncol, 2012, 29 (3): 1656-1662.
- [3] Liu Y, Chen X, Gu Y, et al. FOXM1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and mediates sensitivity to cisplatin in A549 cells via the JNK/mitochondrial pathway [J]. Neoplasia, 2015, 62 (1): 61-71.
- [4] Liu X, Wang C, Gu Y, et al. TCRP1 contributes to cisplatin resistance by preventing Pol beta degradation in lung cancer cells [J]. Mol Cell Biochem, 2015, 398 (1-2): 175-183.
- [5] 邱波,荆雪宁,武继彪,等. 黄芪多糖诱导的树突状细胞疫苗对 S180 荷瘤小鼠抗肿瘤作用研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2015, 31 (1): 44-47.
- [6] 田庆锬,李焕德. 黄芪多糖抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中医药导报, 2011, 17 (1): 86-88.
- [7] 陈瑾歆,何军,张娟娟,等. 黄芪多糖对人肝癌细胞 HepG2 凋亡相关基因表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 34 (1): 124-126.
- [8] 冯涛,张保国. 黄芪多糖对肝癌 HepG2 细胞的抑制作用及其机制 [J]. 实用老年医学, 2010, 24 (6): 486-488, 495.
- [9] 党双锁,张正国,袁利超,等. 大黄素和黄芪多糖对大鼠实验性肝癌的抑制作用 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2006, 27 (3): 250-253.
- [10] 郭玉霞,马利国,陈递林,等. Wnt 信号通路中  $\beta$ -catenin, GSK3 $\beta$  及 Lef-1 在卵巢癌中的表达及其意义 [J]. 山西医科大学学报, 2015, 46 (8): 773-776.
- [11] 刘斐,谭布珍. PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  信号通路在上皮性卵巢癌细胞增殖与耐药中的作用 [J]. 天津医药, 2013, 41 (6): 614-616.
- [12] 郭扬,曲国蕃. GSK3 $\beta$  在恶性肿瘤中的作用及研究现状 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12 (22): 4390-4392.
- [13] 肖阳,刘洁婷,柏合,等. 黄芪多糖针对人胃癌细胞 SGC-7901 体外实验抑制作用 [J]. 牡丹江医学院学报, 2014, 35 (1): 7-9.
- [14] 陈泽昆. GSK3 $\beta$  及 HBx-JNK 信号通路共同磷酸化 RXR $\alpha$  促进 HCC 进程的分子机制 [D]. 厦门: 厦门大学, 2015.

收稿日期: 2017-04-09