文章编号:1000-5404(2011)12-1233-04

论著

柴胡皂甙d对肝癌细胞VEGF和Ang-2表达的影响

和水祥[1],朱占芳[1,2],卢新兰[1],赵 刚[3],陈静宏[4],王治伦[4],罗金燕[3] (710061 西安,西安交通大学:第一附属医院消化内科[1],校医院[2],医学院地方性骨病研究所[4];710049 西安,西安交通大学第二附属医院消化内科[3])

【摘要】 **目的** 观察柴胡皂甙d(saikosaponins-d,SSd)对人肝癌SMMC-7721细胞血管内皮生成因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和血管生成素-2(angiopoietin-2,Ang-2)表达的影响,探讨其抗癌作用机制。**方法** 肝癌SMMC-7721细胞株经LPS诱导,加入不同终浓度的SSd(2.5、5、10、20 mg/L)作用48 h,并以300 μmol/L终浓度的Nimesulide(COX-2选择性抑制剂)作为阳性对照,采用MTT法检测细胞增殖,免疫细胞化学法测定肝癌细胞内VEGF和Ang-2蛋白表达,RT-PCR法检测VEGF mRNA表达,ELISA法检测培养上清中VEGF含量。**结果** SSd可显著抑制肝癌SMMC-7721细胞的生长、增殖。与LPS诱导组比较,10 mg/L SSd作用组肝癌细胞VEGF蛋白表达率、mRNA表达水平和培养上清中VEGF含量均显著降低[VEGF蛋白:80.0% *vs* 60.0%;mRNA表达:(0.83±0.07) *vs* (0.09±0.03);培养上清中VEGF含量:(655.00±5.56) *vs* (446.15±5.05) pg/ml,$P<0.05$,$P<0.01$],同时Ang-2蛋白表达亦显著降低(86.67% *vs* 53.33%,$P<0.05$)。在2.5~10 mg/L作用终浓度范围内,SSd对培养上清中VEGF含量降低的影响呈现一定的剂量依耐性。**结论** SSd可能通过VEGF和Ang-2信号通路,发挥其抗癌作用。

【关键词】 肝肿瘤;肿瘤细胞,培养的;柴胡皂甙;血管内皮生长因子类;血管生成素2
【中图法分类号】 R285.5;R730.23;R735.7 **【文献标志码】** A

Effect of saikosaponin-d on expression of VEGF and angioprotein-2 in human hepatocellular carcinoma cells

He Shuixiang[1], Zhu Zhanfang[1,2], Lu Xinlan[1], Zhao Gang[3], Chen Jinghong[4], Wang Zhilun[4], Luo Jinyan[3] ([1]Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, [2] Hospital of Xi'an Jiaotong University, [4]Institute of Endemic Bone Disease, College of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi Province, 710061; [3]Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi Province, 710049, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the effect of saikosaponin-d (SSd) on expression of VEGF and angioptrotein-2 (Ang-2) in hepatocellular carcinoma (HCC) SMMC-7721 cells. **Methods** Human HCC SMMC-7721 cells were induced by LPS and treated with SSd at different concentrations (2.5, 5, 10, or 20 mg/L) for 48 h. Nimesulide (a COX-2 selective inhibitor) at the concentration of 300 μmol/L served as a positive control. Proliferation of HCC SMMC-7721 cells was measured by MTT assay. Expressions of VEGF and Ang-2 protein as well as VEGF mRNA in HCC SMMC-7721 cells were detected by immunocytochemistry and RT-PCR, respectively. VEGF level in cultured supernatant was measured by ELISA. **Results** SSd significantly inhibited the growth and proliferation of HCC SMMC-7721 cells. The expression rates of VEGF and Ang-2 were significantly higher in 10 mg/L SSd group than in LPS induction group (80.0% *vs* 60.0%, 86.67% *vs* 53.33%, $P<0.05$), while the expression level of VEGF mRNA in HCC SMMC-7721 cells and the VEGF level in cultured supernatant were also significantly higher in 10 mg/L SSd group than in LPS induction group (0.83±0.07 *vs* 0.09±0.03, 655.00±5.56 *vs* 446.15±5.05 pg/ml, $P<0.01$), indicating that SSd inhibits the VEGF level in cultured supernatant in a dose-dependent manner. **Conclusion** SSd exerts its anti-tumor effect through the VEGF and Ang-2 signaling pathways.

【基金项目】 国家自然科学基金(30771895)
【通信作者】 和水祥,电话:(029)85323920, E-mail:hesx123@126.com

【Key words】 liver neoplasm; tumor cells, cultured; saikosaponins-d; vascular endothelial growth factors; angiopoietin-2

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30771895). Corresponding author: He Shuixiang, Tel: 86-29-85323920, E-mail: hesx123@126.com

1971年Folkman[1]首次提出肿瘤血管生成(angiogenesis)的观点,认为肿瘤的持续生长依赖于血管生成,进而提出通过干预肿瘤血管生成来"饿死肿瘤"的假想,引起肿瘤学界的广泛关注。目前,抗血管生成治疗的基础与应用研究已经取得突飞猛进的发展,开发出了一些针对肿瘤血管生成的有效靶点药物,开创了肿瘤治疗的新领域。柴胡皂甙d(saikosaponins-d,SSd)是从我国传统中药柴胡中分离、提取出来的生理活性成分,具有解热、镇痛和抗炎等非甾体类药物类似的药理作用。近年研究[2]表明,SSd还具有抗肿瘤活性,可调节免疫系统功能和细胞生长,抑制肿瘤的发生、发展。我们前期的研究[3-5]显示柴胡皂甙d可明显下调肝癌细胞环氧化酶-2(cyclooxygenase-2,COX-2)的表达,抑制PGE2的生成,进而抑制肝癌细胞的增殖。本研究进一步观察SSd对肝癌SMMC-7721细胞血管内皮生成因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)和血管生成素-2(angiopoietin-2,Ang-2)表达的影响,探讨其可能的抗癌作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

RPMI1640购自GIBCO公司;小牛血清为北京元亨生物工程有限公司产品;SSd购自江西本草天工科技有限公司(HPLC >98%);胰蛋白酶、尼美舒利(Nimesulide)、二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)均购自Sigma公司;VEGF鼠抗人单克隆抗体和辣根过氧化酶标记的羊抗小鼠IgG抗体及SABC免疫组化试剂盒均为北京中山生物技术公司产品,兔抗Ang-2多克隆抗体购于武汉博士德生物工程有限公司。RNAfast200细胞总RNA提取试剂盒购自上海飞捷生物,反转录试剂盒为Fermentas产品,2×*Taq* PCR Mix为西安润德生物技术有限公司产品,PCR引物由北京三博远志生物技术有限技术公司合成,序列如下:VEGF上游:5′-TTGCTGCTCTACCTCCAC-3′,下游:5′-AATGCTTTCTCCCCTCTG-3′;β-actin上游:5′-ATCGTGCGTGACATTAAGGAGAAG-3′,下游:5′-AGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3′,扩增片段长度分别为291、179 bp。人肝癌SMMC-7721细胞株由西安交通大学医学院第一附属医院临床分子试验中心陈威主任惠赠。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞分组培养与增殖测定 按照本组前期实验报道的方法[4],人肝癌SMMC-7721细胞随机分为空白对照组;DMSO对照组;LPS诱导组(LPS 100 μg/ml);SSd作用组(LPS 100 mg/L + SSd 10 mg/L);Nimesulide(COX-2选择性抑制剂)对照组(LPS 100 mg/ml + Nimesulide 300 μmol/L),进行培养、处理及VEGF和Ang-2表达测定。另随机分为6组,分别加入终浓度为0、2.5、5.0、10、20 mg/L SSd和300 μmol/L Nimesulide的培养液,培养48 h,MTT法测定细胞增殖,培养上清用于测定VEGF分泌水平。

1.2.2 免疫细胞化学检测VEGF和Ang-2蛋白表达 取处理、贴壁后的细胞玻片,用PBS清洗,4%多聚甲醛固定10 min,自然干燥,-20 ℃冰箱保存。采用SABC法免疫细胞化学染色,显微镜观察。结果判断:VEGF和Ang-2定位于细胞质和细胞膜,阳性细胞染色呈棕褐色或棕黄色,半定量积分法计算阳性细胞百分比:随机选择15个具有代表意义的高倍视野,每个视野计数100个细胞中的阳性细胞数,其中无阳性细胞计为0分,阳性细胞数≤30%计为1分,阳性细胞数31%~70%计为2分,阳性细胞数≥71%计为3分;染色强度以多数呈现的染色特征为标准:无染色计0分,淡黄色计1分,棕黄色计2分,棕褐色计3分,将两种得分相加,0分为阴性(-),1~2分为弱阳性(+),3~4分为中度阳性(++),5~6分为强阳性(+++);(-)及(+)视为低表达,(++)、(+++)视为高表达。

1.2.3 RT-PCR法检测VEGF mRNA表达 按照RNAfast200说明书抽提细胞总RNA,紫外分光光度仪定量,按Fermentas逆转录试剂盒说明书逆转录反应,PCR总体系为25 μl,基本反应参数设置为:94 ℃预变性2 min后,94 ℃变性30 s,56 ℃退火1 min,72 ℃延伸60 s,共35个循环,最后72 ℃延伸7 min。PCR产物经2%琼脂糖凝胶(含0.5%溴化乙锭)电泳分离,β-actin为内参照,图像分析系统下观察、保存图像,进行图像分析。实验重复3次。VEGF mRNA指数(RI) = VEGF mRNA RT-PCR产物扫描值/β-actin mRNA RT-PCR产物扫描值。

1.2.4 ELISA法测定VEGF分泌水平 按照ELISA试剂盒说明要求进行操作,将标准品值输入统计包,以吸光值作为纵坐标,以浓度为横坐标,绘制标准曲线,计算样品VEGF浓度。

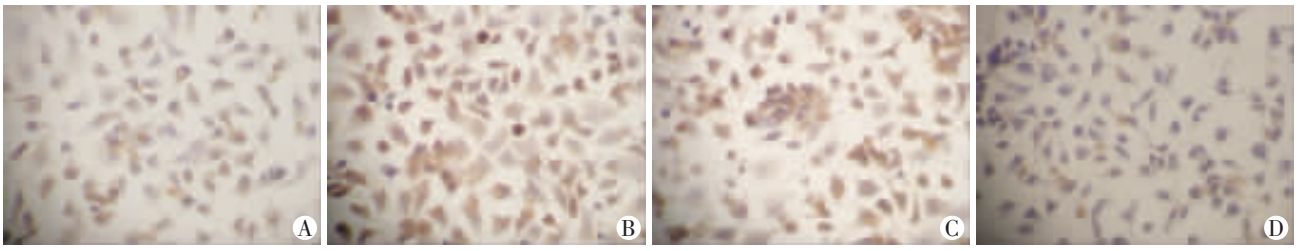
1.3 统计学分析

采用SPSS 11.0统计软件,实验数据计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组间比较采用 t 检验,计数资料统计分析应用Fisher确切概率法。

2 结果

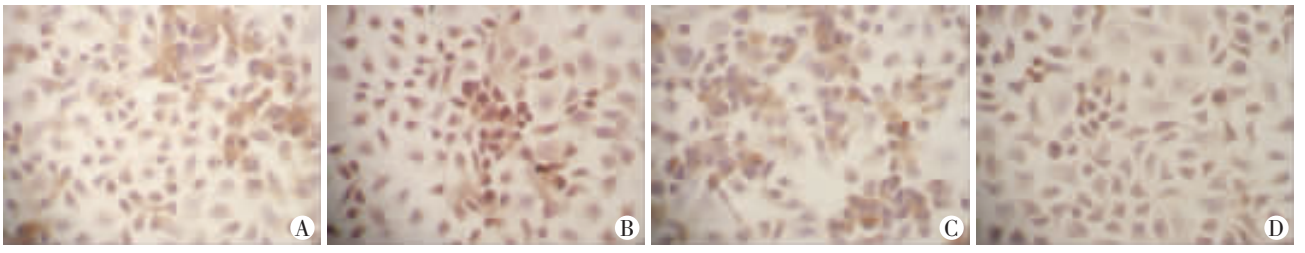
2.1 肝癌SMMC-7721细胞中VEGF和Ang-2蛋白表达

VEGF蛋白主要定位于肝癌细胞的细胞质,Ang-2蛋白主要定位于肝癌细胞的细胞质和细胞膜,两者阳性表达细胞染色显示均为棕黄色颗粒。其中,空白对照组VEGF蛋白呈不均匀分布,部分胞浆可见淡黄色或棕黄色颗粒(图1A、2A)。经LPS诱导后,肝癌细胞VEGF和Ang-2蛋白表达均明显增加,细胞呈现较多的棕黄色颗粒,部分细胞呈现棕褐色颗粒(图1B、2B),



A：空白对照组；B：LPS 诱导组；C：SSd 作用组；D：Nimesulide 对照组

图 1　VEGF 在各组肝癌细胞中的表达（SABC ×200）



A：空白对照组；B：LPS 诱导组；C：SSd 作用组；D：Nimesulide 对照组

图 2　Ang-2 在各组肝癌细胞中的表达（SABC ×200）

与空白对照组相比，2 种蛋白表达差异均具有统计学意义（$P<0.05$，表 1）。SSd 作用组和 Nimesulide 对照组表现相似，VEGF 和 Ang-2 蛋白阳性表达细胞均减少，细胞着色程度明显较浅，浅黄色颗粒增多（图 1C、2C，1D、2D）。VEGF 和 Ang-2 蛋白各组阳性细胞高表达率比较，LPS 诱导组明显高于空白对照组，差异均具有显著性意义（$P<0.05$）。SSd 作用组和 Nimesulide 对照组明显低于 LPS 诱导组，差异均有显著性意义（$P<0.05$）。见表 1。

表 1　不同处理组 SMMC-7721 细胞 VEGF 和 Ang-2 的表达

组别	VEGF					Ang-2				
	−	+	++	+++	阳性细胞高表达率	−	+	++	+++	阳性细胞高表达率
空白对照组	1	9	4	1	33.33%[a]	1	8	3	3	40.00%[a]
LPS 诱导组	0	3	5	7	80.00%	0	2	8	5	86.67%
SSd 组	0	6	7	2	60.00%[a]	2	5	7	1	53.33%[a]
Nimesulide 对照组	3	8	2	2	26.67%[a]	2	7	2	3	33.33%[a]

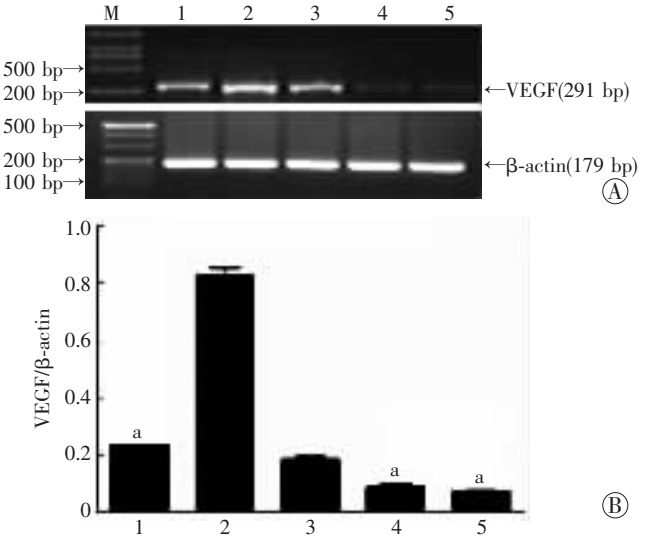
a：$P<0.05$，与 LPS 诱导组比较

2.2　肝癌 SMMC-7721 细胞中 VEGF mRNA 表达变化

VEGF 在空白对照组就有表达，经 LPS 作用后 VEGF 的表达较空白对照组明显增强（$P<0.05$），SSd（10 mg/L）组和 Nimesulide 对照组均抑制了 VEGF 的表达，与 LPS 诱导组相比，2 组 VEGF mRNA 水平差异有显著性（$P<0.05$），见图 3。

2.3　人肝癌 SMMC-7721 细胞培养液中 VEGF 含量变化

人肝癌 SMMC-7721 细胞经 SSd 作用后，增殖过程明显受抑。且这种增殖抑制作用在 2.5 ~ 10 mg/L SSd 作用终浓度范围内呈现出剂量依赖性。同时发现，经 LPS 诱导的肝癌细胞培养液中 VEGF 产生量明显增高，加入不同剂量的 SSd 作用后，VEGF 产生量则明显下降，并在 2.5 ~ 10 mg/L 作用终浓度范围内与 SSd 的作用剂量有关，以 10 mg/L SSd 作用最强，接近 Nimesulide 对照组水平，与 LPS 诱导组比较差异有统计学意义（$P<0.01$，表 2）。



M：标准；1：空白对照组；2：LPS 诱导组；3：DMSO 组；4：SSd 作用组；5：Nimesulide 对照组

A：RT-PCR 结果；B：半定量分析　a：$P<0.05$，与 LPS 诱导组比较

图 3　RT-PCR 检测各组肝癌细胞 VEGF mRNA 的表达

表 2　不同药物对肝癌 SMMC-7721 细胞增殖及其 VEGF 分泌水平的影响

组别	生长抑制率(%)	VEGF 值(pg/ml，$\bar{x}\pm s$)
空白对照组	0	435.00 ±4.28[a]
LPS 诱导组	−	655.00 ±5.56
SSd 作用组		
2.5 mg/L	22.0	624.35 ±3.86
5.0 mg/L	65.8	596.30 ±3.75[b]
10.0 mg/L	77.5	446.15 ±5.05[a]
20.0 mg/L	72.0	445.36 ±4.35[a]
Nimesulide 对照组	−	402.38 ±4.26[a]

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与 LPS 诱导组比较

3 讨论

肿瘤血管的生成与肿瘤的浸润、转移及复发有密切的相关性，肿瘤血管不仅为肿瘤生长提供养料，而且为肿瘤细胞的转移提供途径。而缺氧等因素刺激了肿瘤的血管发生，这个过程由肿瘤或宿主细胞释放的各种正反向调节因子介导调控，包括VEGF、血管生成素及其受体(Ang/Tie2)等。VEGF是目前研究最多，针对内皮细胞特异性最高和作用最强的促血管生成的有丝分裂源之一，故被公认是促血管生成作用最强的因子之一[6]。Ang/Tie2是新近发现的一条重要的信号转导通路，在机体生理、病理性血管生成中对新生血管的形成、重塑、成熟及维持稳定等过程发挥着重要的调节作用，与肿瘤血管生成关系密切，并独立于VEGF径路调节肿瘤血管生成[7-8]。肝癌是典型的富血管肿瘤，其生长和转移都依赖于血管生成因子的调控，VEGF和Ang-2在其中起着极其重要的调节作用[9-10]。因此，寻求能够以VEGF和Ang-2为作用靶点的抗肝脏肿瘤血管生成的药物意义重大。

本实验利用免疫细胞化学和RT-PCR等方法研究发现，SSd作用后人肝癌细胞VEGF和Ang-2高表达率均明显低于单纯经LPS诱导后人肝癌细胞。其中VEGF mRNA的表达指数和VEGF分泌水平亦低于单纯经LPS诱导后人肝癌细胞，显示SSd能明显下调人肝癌细胞的VEGF蛋白和VEGF mRNA表达，抑制细胞VEGF分泌，此结果与张丰华等[11]利用荷瘤小鼠研究结论相似。后者证实，小柴胡汤治疗可使肿瘤血管密度明显下降，瘤体内VEGF表达下降，抑瘤率提高，提示小柴胡汤可通过下调VEGF的表达抑制肿瘤血管生成而发挥抑瘤效果。本实验同时发现，SSd亦能明显下调人肝癌细胞的Ang-2蛋白表达，提示SSd抑制肝癌细胞血管生成的作用可能是通过影响VEGF和Ang-2表达2条途径来实现的。

大量研究证明，COX-2可能在肿瘤的发生、发展中参与刺激肿瘤新生血管的形成。一方面，COX-2可以通过影响VEGF表达途径，进而上调Ang-2表达水平。另一方面，COX-2亦可直接作用于内皮细胞，诱导Ang-2表达，而选择性COX-2抑制剂则可通过下调VEGF和Ang-2表达，抑制肿瘤新生血管的生成[12]。如Cheng等[9]发现选择性COX-2抑制剂能抑制人肝癌细胞株Hep3B分泌VEGF，加入外源性PGE2能逆转这种作用。邢丽华等[13]研究则证实COX-2抑制剂Nimesulide可下调肺癌裸鼠移植瘤Ang-2基因表达，抑制肿瘤新生血管形成。而陶凯雄等[14]的研究则发现，COX-2抑制剂美洛昔康对结肠癌细胞VEGF和Ang-2蛋白和mRNA的表达均有影响。本实验结果发现，SSd对人肝癌细胞VEGF和Ang-2蛋白表达及对VEGF mRNA表达及其VEGF分泌的抑制效果与COX-2选择性抑制剂尼美舒利相似。结合我们前期实验发现，SSd可通过影响人肝癌细胞SMMC-7721的COX-2表达和活性水平，发挥抗肝癌作用的结果[4,15]。因此，我们认为SSd可以抑制人肝癌细胞VEGF和Ang-2的表达，发挥抗肝癌血管生成作用。而阻断VEGF和Ang-2信号通路可能是其作用机制之一。

参考文献：

[1] Folkman J. Tumor angiogenesis：therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 285(21)：1182-1186.

[2] 王艳丽，和水祥，罗金燕. 柴胡皂苷抗肿瘤机制研究进展[J]. 中西医结合学报，2006，4(1)：98-100.

[3] 王艳丽，和水祥，罗金燕，等. 柴胡皂甙d对肝癌SMMC-7721细胞增殖的抑制作用[J]. 西安交通大学学报：医学版，2006，27(6)：572-574.

[4] 和水祥，罗金燕，赵刚，等. 柴胡皂甙d对肝癌SMMC-7721细胞环氧合酶-2表达的影响[J]. 中华肝脏病杂志，2006，14(9)：712-714.

[5] 党双锁，崔翔，和水祥，等. 柴胡皂苷d对实验性大鼠肝癌C-myc和PCNA蛋白表达的影响[J]. 中国药物与临床，2009，9(7)：557-559.

[6] 郑璐，梁平，李靖，等. HDGF、VEGF在人肝细胞癌中的表达及其与肿瘤血管生成的关系[J]. 第三军医大学学报，2010，32(7)：680-683.

[7] 杨利霞，骈林萍，李超. 肝细胞癌多普勒超声影像与微血管密度、血管内皮生长因子表达的相关性分析[J]. 郑州大学学报：医学版，2009，44(5)：1006-1009.

[8] 姜晓燕，彭贵勇，阎晓初，等. 血管生成素-2及其受体Tie2在食管鳞癌中的表达及与血管生成关系的研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(23)：2358-2361.

[9] Cheng A S, Chan H L, To K F, *et al*. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. Int J Oncol, 2004, 24(4)：853-860.

[10] Yao D F, Wu X H, Zhu Y, *et al*. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic features in human hepatocellular carcinoma[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2005, 4(2)：220-226.

[11] 张丰华，黄秀深，牛朝阳，等. 小柴胡汤对S180荷瘤小鼠肿瘤血管生成的影响[J]. 中医药学刊，2004，22(2)：269-270.

[12] Rodriguez-Moranta F, Castells A. Mechanisms of colon cancer prevention with and beyond COX-2 inhibition[J]. Curr Top Med Chem, 2005, 5(5)：505-516.

[13] 邢丽华，张珍祥，徐永健，等. COX-2抑制剂对肺癌裸鼠移植瘤血管生成素基因表达的影响[J]. 中国病理生理杂志，2005，21(9)：1775-1778.

[14] 陶凯雄，张宁，王国斌，等. 美洛昔康对结肠癌细胞VEGF和Angiopoietin-2表达的影响[J]. 世界华人消化杂志，2006，14(13)：1277-1282.

[15] 朱占芳，和水祥，侯和磊，等. 柴胡皂甙d对人肝癌细胞STAT3/COX-2信号通路的调节作用[J]. 第三军医大学学报，2010，32(18)：1932-1935.

(收稿 2010-11-18 修回 2010-12-13)

(编辑 王 红)