

绞股蓝皂苷抑制 HepG2 细胞无氧糖酵解的检测分析

文利¹, 郑新¹, 刘飞², 钱青^{1△}

(第三军医大学新桥医院: 1. 药剂科; 2. 检验科, 重庆 400037)

摘要:目的 探讨绞股蓝皂苷对肝癌细胞 HepG2 生长和无氧糖酵解的影响。方法 在肝癌细胞 HepG2 培养基中加入不同浓度的绞股蓝皂苷, 于 0、4、8、16、24 h 分别收集培养基 200 μ L。培养基葡萄糖和乳酸含量均采用生化流水线检测。结果 MTT 数据表明绞股蓝皂苷明显抑制了肝癌细胞株 HepG2 的生长; 浓度为 5 mg/mL 时, 抑制明显, 且有利于后续无氧糖酵解分析。生化检测表明, 绞股蓝皂苷显著降低了葡萄糖的消耗, 两者差距最明显的时间点为 6 h ($P < 0.05$); 同时绞股蓝皂苷也明显降低了乳酸的生成 ($P < 0.05$)。结论 绞股蓝皂苷显著抑制 HepG2 无氧糖酵解, 为绞股蓝在肝癌治疗的临床用药提供了一定的线索和依据。

关键词:绞股蓝皂苷; HepG2; 无氧糖酵解; 葡萄糖; 乳酸

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.04.011 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)04-0484-03

Detection analysis of inhibition of anaerobic glycolysis by gypenosides in HepG2 cells

WEN Li¹, ZHENG Xin¹, LIU Fei², QIAN Qin^{1△}

(1. Department of Pharmacy; 2. Department of Laboratory, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** The research aims to explore gypenoside influence on the growth and anaerobic glycolysis in HepG2 cell. **Methods** Gypenosides with different concentrations were added into culture medium of HepG2 cell, and 200 μ L of cell culture medium were collected at 0, 4, 8, 16, 24 h time. The concentration of medium glucose and lactic acid were detected by biochemical detection pipeline. **Results** The test data show that gypenoside significantly inhibited the growth of HepG2 cells; where the concentration of 5 mg/mL is the proper choice of the inhibition and favor of anaerobic glycolysis analysis. Follow-up testing found gypenosides significantly inhibited glucose consumption, with the difference is most obvious at a time point 6 h ($P < 0.05$). Meanwhile, gypenoside significantly reduced lactate production ($P < 0.05$). **Conclusion** Experimental results show that gypenoside significantly inhibited anaerobic glycolysis of HepG2 cell, which provides some clues for gynostemmaclinical use in cancer treatment.

Key words: gypenoside; HepG2; anaerobic glycolysis; glucose; lactate

肝癌是一种严重威胁生命安全的疾病^[1]。无限制生长和快速增殖是包括肝癌在内的恶性肿瘤细胞的典型特征, 因此对营养供应速度的需求很高。正常物质代谢速度远不能满足肿瘤细胞的增殖特性, 所有肿瘤细胞启动无氧糖酵解以实现肿瘤细胞快速生长的能量供应, 无氧糖酵解的主要指标包括葡萄糖的消耗和乳酸的生成^[2-3]。因此, 对恶性肿瘤细胞无氧糖酵解的研究多从这 2 个指标进行分析。绞股蓝又名七叶胆, 具有清热解毒、止咳祛痰、益气养阴、延年益寿的功效^[4]。近年来, 有关研究报道绞股蓝在肺癌、结肠癌和肝癌中具有明显的抗癌作用, 包括抑制肿瘤细胞增殖分裂、促进细胞凋亡、抑制迁移和侵袭等^[5-8]。绞股蓝有效成分众多, 包括多糖、皂苷等。目前, 尚无绞股蓝皂苷在肝癌细胞无氧糖酵解的研究报道。现针对肝癌细胞 HepG2, 研究绞股蓝皂苷对其细胞的生长抑制和无氧糖酵解的影响情况, 为绞股蓝在肝癌治疗的应用提供一定的依据。

1 材料与方 法

1.1 一般材料 培养皿购自美国康宁公司; 人肝癌细胞系 HepG2 由第三军医大学新桥医院中心实验室惠赠; MEM 培养基购自美国 Hyclone 公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司; 绞股蓝皂苷购自上海基免实业有限公司, MTT 购自美国 Sigma 公司。

1.2 细胞培养 HepG2 细胞培养于含 10% 小牛血清的

MEM 培养基中。培养基在使用前添加 100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素。细胞置于 5% CO₂ 的 37 °C 孵育箱内培养, 每 3~5 d 传代 1 次。

1.3 细胞计数 采用乙醇冲洗计数板后晾干, 将盖片覆在计算板上, 微微移向一侧, 以便滴加细胞悬液。取一吸管伸入培养瓶, 轻轻吸打细胞悬液混匀。从盖片边缘滴加 10 μ L 细胞悬液, 使其充满计数板和盖片间隙。显微镜 100 倍视野下观察计数细胞, 分别计数计数板的四角大格内的细胞数, 压线者只计算左侧和上方。细胞数 = (4 大格细胞总数/4) $\times 10^4$ 稀释倍数。

1.4 绞股蓝皂苷的处理 绞股蓝皂苷配置成 100 mg/mL 的母液; 吸取不同体积的 MEM 培养基和绞股蓝皂苷母液分别配置成总体积 2 mL 含绞股蓝皂苷浓度分别为 1、2、5、10、20 mg/mL 的 MEM 培养基。取直径为 100 mm 细胞培养皿培养细胞, 细胞融合率达到 70%~80% 时, 消化细胞, 细胞计数后取 1×10^6 传代至 35 mm 培养皿中。5% CO₂ 的 37 °C 孵育箱内培养 4 h, 用无菌 $1 \times$ PBS (pH 7.4) 缓冲液洗涤 3 次, 加入 2 mL 含绞股蓝皂苷的 MEM 培养基, 5% CO₂ 的 37 °C 孵育箱内培养。

1.5 MTT 法 于设定时间在 96 孔培养皿选定孔中加入 20 μ L MTT 溶液 (5 mg/mL, 即 0.5% MTT) (15 μ L 即可), 继续培养 2~4 h (同批次实验时间固定)。终止培养, 小心吸去孔

内培养液。每孔加入 150 μL (200 μL)二甲基亚砷(细胞裂解液 10% SDS, 25% DMF),置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 OD 570 nm 处测量各孔的吸光值。

1.6 细胞培养基的收集和保存 葡萄糖和乳酸收集的时间设置点为 0、4、8、16、24 h。每隔设定的时间于超净台内吸取 200 μL 培养基,移至 1.5 mL EP 管,立即转移至 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.7 葡萄糖和乳酸的检测 取体积为 1 μL 培养基上清液,加入 49 μL 的缓冲液,总体积为 50 μL 。分别设立 2 个复孔。培养基葡萄糖和乳酸含量采用生化检测流水线检测。

1.8 统计学处理 选用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 绞股蓝皂苷对 HepG2 细胞的抑制效应 为确定绞股蓝皂苷最佳作用浓度,在 HepG2 细胞培养基中加入不同浓度的绞股蓝皂苷;24 h 后采用 MTT 终点法检测 OD570,对比细胞生长情况。加入绞股蓝皂苷后 MTT 法 OD570 值逐步降低,对 HepG2 生长抑制显著。绞股蓝皂苷浓度为 1 mg/mL 时,OD 值为(0.41 \pm 0.03);加入的含量增加至 10 mg/mL 时,下降最明显,由 5 mg/mL 的(0.26 \pm 0.01)下降至(0.11 \pm 0.02)。见图 1。本研究主要以检测无氧糖酵解情况,HepG2 过多或过少均对后续检测有影响,因此把 5 mg/mL 作为后续实验绞股蓝皂苷使用含量;既可以体现绞股蓝对肿瘤细胞的抑制作用,也可方便检出葡萄糖消耗和乳酸生成。

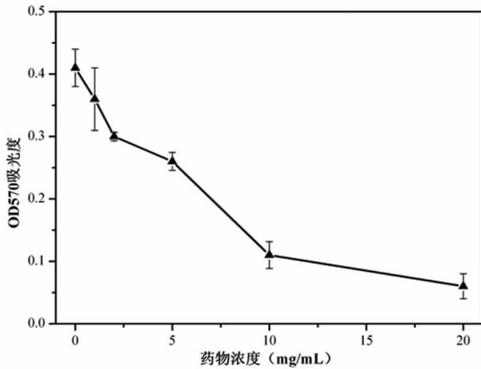


图 1 绞股蓝皂苷对 HepG2 细胞生长抑制结果(24 h)

2.2 葡萄糖消耗情况对比研究 葡萄糖消耗是反映无氧糖酵解的指标之一,葡萄糖变化与初筛时趋势一致。随着时间的推移,MEM 培养基中葡萄糖含量依次减少。初始 MEM 培养基中葡萄糖含量均为 10.46 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,细胞经过 24 h 培养后,绞股蓝组 HepG2 葡萄糖含量为(2.31 \pm 0.02) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,而对照组则为(1.02 \pm 0.10) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。见表 1。葡萄糖含量越低,说明相同含量的细胞葡萄糖消耗越快。两者差距最明显的是在时间点 6 h,绞股蓝组 HepG2 葡萄糖含量为(8.83 \pm 0.05) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,而对照组为(7.44 \pm 0.01) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。对照组下降的趋势比绞股蓝组明显($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 乳酸生成情况的变化分析 乳酸的多少直接反映无氧糖酵解的情况,随着时间的增加,HepG2 细胞乳酸生成逐渐增加,且对照组速度明显超过绞股蓝组 HepG2。0~8 h,两者乳酸生成含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3。差异出现在 16 h,两者含量差为 1.506 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($P < 0.05$)。24 h 时间点 2 组差距最大,对照组乳酸含量为(7.738 \pm 0.019) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,绞股蓝组则为(5.761 \pm 0.008) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,两者差异有统计学意义($P <$

0.05)。见表 2。

表 1 HepG2 绞股蓝组和对照组葡萄糖消耗结果比较

细胞	时间(h)	均值($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	标准差
HepG2(绞股蓝组)	0	10.46	0.18
	4	9.75	0.02
	8	8.83	0.05
	16	5.96	0.06
	24	2.31	0.02
HepG2(对照组)	0	10.51	0.15
	4	9.02	0.09
	8	7.44	0.01
	16	4.65	0.02
	24	1.02	0.10

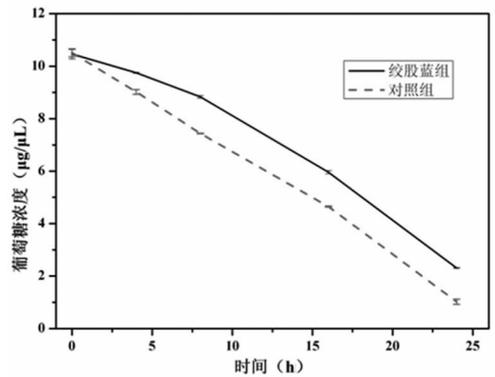


图 2 葡萄糖消耗趋势

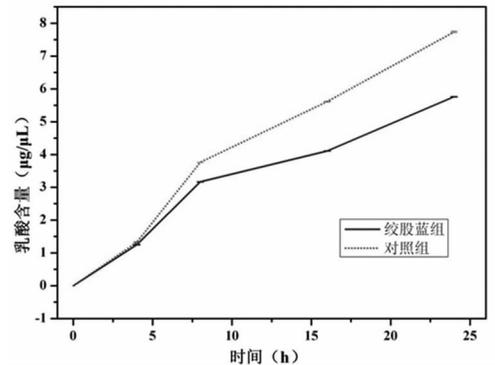


图 3 乳酸生成含量变化趋势

表 2 HepG2 绞股蓝组和对照组乳酸生成数据表

组别	时间(h)	乳酸浓度($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	标准差
HepG2(绞股蓝组)	0	0.000	0.000
	4	1.251	0.011
	8	3.168	0.008
	16	4.109	0.007
	24	5.761	0.008
HepG2(对照组)	0	0.000	0.000
	4	1.325	0.009
	8	3.763	0.002
	16	5.614	0.005
	24	7.738	0.019

3 讨 论

哺乳动物细胞主要通过 2 大主要的代谢过程获取能量:乳

酸生成和有氧呼吸。乳酸生成也就是葡萄糖有氧呼吸的第一大步,葡萄糖生成乳酸^[3,9]。在正常机体细胞,乳酸的生成仅发生在氧气缺乏时;但在肿瘤组织一直发生糖酵解,肿块即使氧供充足,这种现象也不发生改变,这种现象被学术界命名为 warburg 效应^[2]。

肿瘤组织超过 100 μm 时,氧供明显减弱,而 warburg 的切片是从 200~300 μm,因此这种效应可能是一定程度缺氧引起。肿瘤细胞葡萄糖摄取超过正常细胞 30 倍,乳酸释放超过正常细胞 43 倍。有氧糖酵解的增强对肿瘤细胞保持快速增殖和细胞活动非常重要。肿瘤细胞增殖快速,血管生成速度往往滞后,因此就会造成局部缺血缺氧的环境。有氧糖酵解赋予肿瘤细胞更好的生存力,细胞在氧浓度波动较大的微环境中能更好地存活。糖酵解的主要产物是乳酸和碳酸根等酸性产物,改变了微环境的 pH 值更偏酸性。酸性环境下,癌细胞侵袭力增强,抑制抗肿瘤免疫因子,这些都使恶性肿瘤具有更强的适应能力和肿瘤细胞从而更容易快速无限制生长。有氧糖酵解的表现为糖酵解的增强和有氧呼吸的减弱,具体主要是葡萄糖代谢和乳酸生成增多加快^[10]。

绞股蓝,又称天堂草、福音草、超人参、公罗锅底、遍地生根、七叶胆、五叶参、七叶参等,属葫芦科草质攀援植物。茎细弱,具分枝,具纵棱及槽,无毛或疏被短柔毛^[4]。绞股蓝喜阴湿温和的气候,多野生在林下、小溪边等荫蔽处,多年生攀援草本。绞股蓝的有效成分主要有绞股蓝皂苷、绞股蓝糖苷(多糖)、水溶性氨基酸、黄酮类、多种维生素、微量元素、矿物质等^[11]。绞股蓝具有降血脂,调血压防治血栓,防治心血管疾病,调节血糖,促睡眠,缓衰老,抗癌,提高免疫力,调节人体生理功能^[12]。中医理论则认为绞股蓝具有益气健脾,化痰止咳,清热解毒;主治体虚乏力;虚劳失精^[4]。

本研究结果表明,绞股蓝皂苷明显抑制了肝癌细胞株 HepG2 的生长,存在一定的剂效关系。同时,绞股蓝皂苷显著抑制了葡萄糖消耗,降低乳酸生成。从某种角度较为显著地抑制了 HepG2 的无氧糖酵解,抑制其细胞的能量供应,从而发挥抗癌作用,这也与生长实验结果吻合。

参考文献

[1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in

China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.

[2] Bhattacharya B, Omar MFM, Soong R. The Warburg effect and drug resistance[J]. Brit J Pharmacol, 2016, 173(6):970-979.

[3] Glucose RO. Fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(2):377-392.

[4] 刘鹏,李榆梅,张虹,等. 绞股蓝研究进展[J]. 科技资讯, 2009, 20(5):195-196.

[5] 杜小燕,侯颖,覃华,等. 绞股蓝多糖的抗肿瘤作用及其机制研究[J]. 科学技术与工程, 2009, 9(20):5968-5972.

[6] 肖忠革,金芝贵. 绞股蓝的抗肿瘤作用及其药理基础[J]. 浙江中西医结合杂志, 2001, 11(12):168-169.

[7] Xing SF, Jang M, Wang YR, et al. A new dammarane-type saponin from *Gynostemma pentaphyllum* induces apoptosis in A549 human lung carcinoma cells[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2016, 26(7):1754-1759.

[8] Yan H, Wang X, Wang Y, et al. Antiproliferation and antimigration induced by gypenosides in human colon cancer SW620 and esophageal cancer Eca-109 cells[J]. Hum Exp Toxicol, 2014, 33(5):522-533.

[9] Li CX, Zhang GF, Zhao L, et al. Metabolic reprogramming in cancer cells: glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer[J]. World J Surg Oncol, 2016, 14(1):15-16.

[10] Yuan LW, Yamashita H, Seto Y. Glucose metabolism in gastric cancer: the cutting-edge[J]. World J Gastroentero, 2016, 22(6):2046-2059.

[11] 闫爱军. 绞股蓝的化学成分及药理作用研究情况[J]. 中国医药指南, 2012, 10(12):469-470.

[12] 李露,范红艳,戴婷,等. 绞股蓝总皂苷的药理作用研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2015, 36(2):147-150.

(收稿日期:2016-09-02 修回日期:2016-11-08)

(上接第 483 页)

[6] 葛佳楠,陆利娟. 心理资本在护理人员抑郁倾向与职业紧张之间的中介作用[J]. 护理研究, 2016, 30(25):3128-3132.

[7] 王阳,隋国媛,王烈,等. 医生组织支持感及心理资本与抑郁症状关系[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(5):679-681.

[8] 潘惠英,王君俏,周标,等. 老年轻度认知障碍患者抑郁水平的调查与分析[J]. 中华护理杂志, 2012, 47(1):17-19.

[9] 李丽娜,王焱,李凤琼,等. 老年糖尿病患者抑郁与治疗依从性调查研究[J]. 护士进修杂志, 2012, 27(24):2233-2235.

[10] 刘丽婷,胡海霞,高玉霞,等. 国内外原发性老年抑郁相关因素的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(2):547-549.

[11] 李丽,吴海燕,王丽国,等. 心理干预对脑卒中继发抑郁发

眠患者的效果[J]. 医学临床研究, 2014, 31(1):178-179.

[12] 郝立艾,杨伟. 心理干预对老年糖尿病患者焦虑、抑郁状态的效果观察[J]. 医学临床研究, 2014, 31(9):1864-1865.

[13] 董雅娟,田波. 心理干预对老年冠心病伴发抑郁患者的效果观察[J]. 医学临床研究, 2014, 31(4):804-805.

[14] 胡利人,郑婵娇,张高华,等. 社区老年居民生存质量与抑郁发生的关系[J]. 中国老年学杂志, 2015, 34(19):5602-5604.

[15] 刘振静,王立涛,宋欣欣,等. 心理治疗在老年抑郁和焦虑共病患者治疗中的应用效果观察[J]. 山东医药, 2016, 56(2):86-88.

(收稿日期:2016-09-22 修回日期:2016-11-28)