

东方肉穗草异鼠李素诱导 HepG2 细胞凋亡研究

左爱仁¹, 汪满红², 万春鹏¹, 周寿然¹, 王晓崑³, 邱彦⁴

(1. 江西中医学院基础医学院, 江西南昌 330006 2 江西省残疾人联合会, 江西南昌 330010

3 江西中医学院药学院 2007级中药科研实践班, 江西南昌 330006 4 厦门大学医学院, 福建厦门 361005)

摘要:目的 研究东方肉穗草中的主要抗癌活性成分之异鼠李素诱导 HepG2 细胞凋亡的机理。方法 采用 MTT 法检测异鼠李素对肝癌 HepG2 细胞的抑制作用, DAPI 染色法对细胞凋亡进行形态学检测。结果 实验结果显示异鼠李素对肝癌 HepG2 细胞的增殖有明显抑制作用, 呈浓度依赖性效应。异鼠李素处理 48h 的 IC_{50} 为 $60\mu\text{mol/L}$ 。荧光显微形态学检测显示异鼠李素处理 HepG2 细胞后出现细胞凋亡的特征性变化。结论 研究表明东方肉穗草异鼠李素可以诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡。

关键词: 东方肉穗草; 异鼠李素; HepG2 细胞; 细胞凋亡

DOI 标识: doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2011.02.075

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1008-0805(2011)02-0427-02

东方肉穗草 *Sarcopyramis bodinieri* var *delicata* 属野牡丹科 (Melastomataceae) 肉穗草属植物, 主要分布在江西、福建、台湾等地。东方肉穗草全草可药用, 归肝、脾、胃经, 具有清热解毒、清肝泻火之效, 是治疗急性肝炎、肺热咳嗽、蛇头疔、无名肿毒、胃肠炎等疾病的珍稀名贵中药^[1], 在闽南地区民间应用极广。由于近几年来肉穗草组织培养^[2]与扩繁技术及东方肉穗草林下栽培技术^[3]的研究成功, 使得东方肉穗草的大面积栽培成为可能, 从而解决了野生东方肉穗草资源稀少的问题。

东方肉穗草主要活性成分包括异鼠李素①、槲皮素②、异鼠李素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷③、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖苷④、异鼠李素-3-O-(6''-乙酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷⑤、异鼠李素-3-O-(2''-乙酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷⑥、槲皮素-3-O-(6''-乙酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷⑦、槲皮素-3-O-(6''-反式-对香豆酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷⑧等^[4,5]。

异鼠李素化学名为 3,4,5,7-四羟基-3-甲氧基黄酮, 又名槲皮素-3-甲醚, 分子式为 $C_{16}H_{12}O_7$; 槲皮素化学名为 3,3',4',5',7-五羟基黄酮, 又名槲皮素, 分子式为 $C_{15}H_{10}O_7$ 。至今许多实验已证实, 异鼠李素和槲皮素具有非常广泛的生理和药理活性, 如扩张冠状血管、降低血脂、抗血小板聚集、保护心、肝肾等脏器损伤、清除氧自由基、抗氧化等。近些年来, 异鼠李素和槲皮素对肿瘤的化学预防作用和治疗作用日益受到人们的重视, 它们都能显著地抑制人乳腺癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、白血病、宫颈癌等多种癌细胞的生长^[6-12]。作为两种有应用潜力的抗癌物质, 有关异鼠李素和槲皮素抗癌作用的分子机理也已进行较广泛的研究, 既有理论意义又有临床实用价值。因此, 我们从抑制肿瘤细胞增殖, 诱导凋亡方面对异鼠李素抗 HepG2 肝癌细胞作用进行了研究。

1 材料与仪器

小牛血清、PRM I1640 液 (含氨苄青霉素、链霉素各 $100\mu\text{g/ml}$)、MTT、DAPI 伊文斯蓝均购于 kayon 公司; 胰酶, 上海蓝季公司。二甲基亚砜, 汕头西陇化工厂。人肝癌细胞株 HepG2, 厦门大学医学院邱彦博士惠赠。东方肉穗草由福建永春林业局提供, 经该局高级工程师邹秀红鉴定, 原植物为 *Sarcopyramis bodinieri* var *delicata*。

收稿日期: 2010-04-04 修订日期: 2010-06-20

基金项目: “产学研结合培养高素质复合型中药人才模式创新研究与实践”课题资助 (No. [2007]29)

作者简介: 左爱仁 (1976-), 男 (汉族), 江西南昌人, 现任江西中医学院基础医学院讲师, 硕士学位, 主要从事中药药理研究工作。

CO_2 培养箱, 美国 Thermo 公司; 血球计数板, 上海医用光学仪器厂; 离心管, 比利时 Orange Scientific 公司; 细胞培养瓶及 96 孔培养板, 比利时 Orange Scientific 公司; 微量移液器, 美国 Eppendorf 公司; 一次性注射器, 上海金塔医用器材有限公司; 高速离心机, 美国 Eppendorf 公司; 酶标仪, 美国 Thermo 公司; 电子天平, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 倒置显微镜, 日本 Olympus Leica 显微镜。

2 方法

2.1 异鼠李素提取与分离方法 称取干燥的东方肉穗草全草 (SB) 10 kg 粉碎后以 70% 乙醇室温浸提 3 次 (每次 7 d), 合并滤液减压浓缩, 得总浸膏 1.81 kg。取浸膏 1.8 kg 悬浮于 15 L 蒸馏水中, 依次用石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇分别萃取 3 次, 回收溶剂后得石油醚部分 (SBA) 55 g 氯仿部分 (SBB) 60 g 醋酸乙酯部分 (SBC) 160 g 及正丁醇部分 (SBD) 280 g。将 155 g SBC 用 2 L 蒸馏水溶解, 过滤, 滤渣蒸干后称重为 57 g 滤液 (98 g) 经 D101 大孔树脂柱, 以不同含量的乙醇进行梯度洗脱, 得到 5 个部分, 分别为水洗脱部分 (SBC-A) 18.65 g 30% 乙醇洗脱部分 (SBC-B) 44.4 g 50% 乙醇洗脱部分 (SBC-C) 13.76 g 70% 乙醇洗脱部分 (SBC-D) 2.9 g 乙醇洗脱部分 (SBC-E) 2.4 g。

70% 乙醇洗脱部分 (2.9 g) 经反复 Sephadex LH-20 柱色谱进一步分离纯化, 甲醇洗脱, 得到 3 种化合物, 经结构鉴定^[4], 分别为异鼠李素 (isorhamnetin)、槲皮素 (quercetin) 和山萘酚 (kaempferol)。

2.2 肝癌细胞 HepG2 的复苏、传代培养和冻存 细胞复苏: 将液氮冻存细胞迅速投入 37℃ 水浴, 不断晃动, 使其快速融化。然后, 将细胞悬液移入已含有 5 ml 细胞培养液的离心管中, 离心 $1000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}\times 10\text{min}$ 洗涤细胞。加 5 ml 新鲜的 RPMI 1640 完全培养基重悬细胞并移入细胞培养皿, 于 5% CO_2 的 37℃ 的孵箱中静置培养, 每天更换一次培养液。

细胞传代培养: 待细胞基本长满培养皿底部时, 弃去培养液, 加 PBS 洗两遍。然后加过滤除菌的 0.25% 胰蛋白酶 1 ml 消化细胞 (1~3 min), 待大部分细胞贴壁变松, 但还未脱落时, 终止消化, 弃去胰酶。加新鲜含血清 10% 的 RPMI 1640 完全培养基 20 ml 用弯头吸管反复吹打细胞至细胞完全悬浮, 分装成 4 个培养瓶, 实现细胞传代和扩大培养。

细胞冻存: 扩培悬浮细胞经过离心, 吸取上清液后, 再加新鲜培养基 3.6 ml 再加无菌的 DMSO 液 0.4 ml 分装成两个 2 ml 的冻存管。依次在 4℃, -20℃ 冻存 1 h 然后 -80℃ 长期保存。

2.3 MTT 法测定异鼠李素对肝癌细胞 HepG2 生长的影响 实验原理: MTT 法是抗肿瘤药物体外筛选中常用的一种方法, MTT 法

(四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法)是 Mosmann 1983 年报道的,以后此方法得到迅速发展并在临床上得以应用。其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓨 (Formazan)并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。二甲基亚砜 (DMSO)能溶解细胞中的甲瓨,用酶联免疫检测仪在 490nm 波长处测定其光吸收值,可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内,MTT 结晶形成的量与细胞数成正比。

实验操作步骤:

- (1)细胞传代,用血球计数板计数。
- (2)将细胞悬液稀释成 $1 \times 10^5 / \text{ml}$ 每孔加 $100 \mu\text{l}$ 于 96 孔培养板中,继续培养。
- (3)24 h 后吸去培养基加药,每孔 $200 \mu\text{l}$ 。异鼠李素终浓度为 20 40 60 80 $\mu\text{mol/L}$ 和 $100 \mu\text{mol/L}$ 每组设 5 个复孔。
- (4)分别培养 48 h 后加入 $20 \mu\text{l}$ MTT (5mg/ml),混匀并放培养箱培养。
- (5)4h 后吸去上清,加入 $150 \mu\text{l}$ DMSO 溶解蓝紫色沉淀。
- (6)在振动仪上振动 30 min,490 nm 下酶标仪读数。统计数据并计算抑制率。

肿瘤细胞生长抑制率 (%) = (1 - 实验组平均 OD 值 / 对照组平均 OD 值) $\times 100\%$

2.4 DAPI 染色检测异鼠李素诱导 HepG2 细胞的凋亡形态
实验原理:DAPI 即 4',6'-二脒基-2-苯基吲 (4',6'-diamidino-2-phenylindole),是一种能够与 DNA 中大部分 A, T 碱基相互结合的荧光染料,常用与荧光显微镜观测。因为 DAPI 可以透过完整的细胞膜,它可以用于活细胞和固定细胞的染色。

实验操作步骤:

- (1)细胞传代计数同上。将细胞悬液浓度调至 $1 \times 10^5 / \text{ml}$ 。
- (2)于 15 mm 一次性培养皿中放 2~3 片无菌盖玻片,然后加入 5ml 细胞悬液。
- (3)24 h 后弃去培养液加入药物。
- (4)培养 48 h 后,细胞用 PBS 或 D-Hanks 缓冲液漂洗 3 遍,然后用预冷的 95% 乙醇固定 15~30 min,取出后晾干。
- (5)1% 醋酸作用 30 s, PBS 冲洗 1 min, 滴加 100ng/ml 的 DAPI 染液染色 10 min。
- (6)流水冲去染液,滤纸吸除多余水分,加一滴荧光封片液,置于荧光显微镜下观察,激发波长 360~400 nm。

3 结果

3.1 MTT 法测定异鼠李素对 HepG2 细胞生长的影响
异鼠李素对人肝癌 HepG2 细胞的增殖有明显的抑制作用,随用药浓度增加而增强,呈浓度依赖性效应(表 1 及图 1)。60 $\mu\text{mol/L}$ 的异鼠李素处理 48 h 对 HepG2 的抑制率可达 50% 左右;而 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时的抑制率达到了 80%。异鼠李素对 HepG2 的抑制率随浓度的增加而增加。

表 1 异鼠李素对 HepG2 细胞生长抑制作用结果

异鼠李素浓度 $C / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率 (%)
20	16.6
40	35.1
60	49.5
80	61.3
100	81.8

3.2 DAPI 荧光染色检测异鼠李素诱导 HepG2 细胞的凋亡形态
用 DAPI 染色,活细胞核呈蓝绿色荧光,细胞质呈橙红色荧光。凋亡细胞核呈蓝绿色浓聚在核膜内侧,可见细胞膜呈泡状膨出及凋亡小体。对照组绝大多数细胞结构正常,无明显皱缩(图 2A)。而异鼠李素处理 HepG2 细胞 48 h 后,大多数细胞出现皱缩,细胞核固缩,体积变小,细胞内出现明显的凋亡小体形态(见

图 2B)。说明异鼠李素对 HepG2 细胞具有凋亡诱导作用。

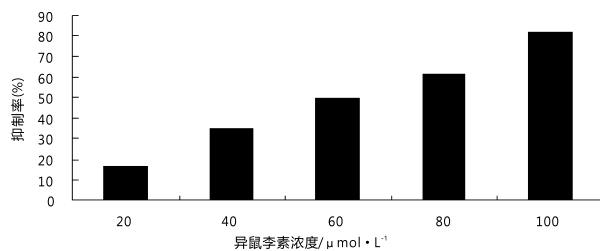


图 1 异鼠李素浓度与抑制率的关系



(A: DMSO 处理 B: 60 $\mu\text{mol/L}$ 异鼠李素处理,箭头示凋亡细胞 (400 \times)
图 2 异鼠李素浓度与抑制率的关系

4 讨论

本实验通过 MTT 法、细胞形态学观察等方法研究了异鼠李素对细胞增殖的影响。结果发现异鼠李素能抑制人 HepG2 细胞的增殖,随异鼠李素浓度增加,抑制率增加,即存在剂量依赖关系。从我们的实验结果可以看出,异鼠李素处理过的细胞在形态学上与阴性对照组 (DMSO 处理) 比较,出现凋亡的特征性变化,可见典型的凋亡小体;因此,我们进一步证实了异鼠李素的抗肿瘤活性是通过抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡来实现的。综上所述,东方肉穗草黄酮类物质对肿瘤有一定的调节作用,为其药理研究以及临床应用提供一定的参考。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志, 第 53 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1984: 246
- [2] 周以飞, 潘大仁. 肉穗草的组织培养与快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(3): 346
- [3] 陈得水. 东方肉穗草林下栽培技术 [J]. 林业科技开发, 2004, 18(6): 76
- [4] 万春鹏, 郑 啸, 陈海峰, 等. 东方肉穗草黄酮类化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(2): 172
- [5] 左爱仁, 万春鹏, 周寿然. HPLC 测定东方肉穗草中的槲皮素 [J]. 华西药学杂志, 2009, 24(3): 300
- [6] 罗 玲, 吴凯南, 吴晓健. 槲皮素对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖及凋亡的影响 [J]. 中草药, 2004, 35(1): 71
- [7] 向廷秀, 陶小红, 姜 政, 等. 槲皮素对 SGC-7901 胃癌细胞生长及 HSP70 和 EGFR 表达的影响 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2007, 28(4): 411
- [8] 李 焱, 王鹏祖, 张慧颖. 异鼠李素对人胃癌细胞生长的抑制作用 [J]. 中国初级卫生保健, 2008, 22(6): 58
- [9] 杨春蕾, 王正荣, 张 敏. 异鼠李素对人肺癌细胞抑制作用的观察 [J]. 航天医学与医学工程, 2004, 17(4): 261
- [10] 朱 玲, 王正荣, 周黎明. 异鼠李素及黄酮对人肺癌细胞 A549、人乳腺癌细胞 MCF-7 的影响 [J]. 四川生理科学杂志, 2003, 25(3): 231
- [11] 朱 玲, 王正荣, 杨春蕾. 异鼠李素对肺癌的影响及其抗肿瘤机制的初步探讨 [J]. 四川生理科学杂志, 2004, 26(4): 191
- [12] 朱 玲, 王正荣, 周黎明, 等. 异鼠李素对肺癌的作用及其抗肿瘤机制的初步探讨 [J]. 航天医学与医学工程, 2005, 18(5): 381