

# 芹菜素对人肝癌细胞 Hepg2 增殖与葡萄糖摄取的影响

陈婷<sup>1</sup>, 王桂香<sup>2</sup>, 潘雪刁<sup>2</sup>, 王晶<sup>1</sup>, 黎同明<sup>1\*</sup>

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006; 2. 广东药学院 药科学院, 广州 510006)

**[摘要]** **目的:**探讨芹菜素对人肝癌 Hepg2 细胞增殖与葡萄糖摄取的影响。**方法:**以 Hepg2 细胞为研究对象,实验均用  $0.625 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  不同浓度芹菜素作用于细胞,细胞密度以  $6 \times 10^3$  个/mL 接种于 96 孔培养板,5 复孔/组,分别培养 24, 48, 72 h 后,MTT 法检测细胞增殖抑制情况;同时,取 96 孔板培养 24, 48, 72 h 的细胞上清液,用葡萄糖测定试剂盒检测 Hepg2 细胞葡萄糖摄取情况;细胞密度以  $10^6$  个/mL 接种于 6 孔培养板中,培养 48 h 后,Western blot 检测葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1) 表达的变化。**结果:**与对照组比较,芹菜素各浓度组均能抑制 Hepg2 细胞的增殖,且抑制作用呈时间和浓度依赖性,差异有统计学意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );芹菜素各浓度组作用后 Hepg2 细胞对葡萄糖的摄取明显减少 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );与对照组比较, GLUT1 蛋白随着芹菜素浓度的升高表达减少 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论:**芹菜素具有抑制人肝癌 Hepg2 细胞增殖与葡萄糖摄取的作用,为肝癌的预防和治疗提供新的思路。

**[关键词]** 芹菜素; Hepg2 细胞; 细胞增殖; 葡萄糖摄取

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0106-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230106

## Effects of Apigenin on Proliferation of Human Hepatocellular Carcinoma Hepg2 Cells and Glucose Uptake

CHEN Ting<sup>1</sup>, WANG Gui-xiang<sup>2</sup>, PAN Xue-diao<sup>2</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, LI Tong-ming<sup>1\*</sup> (1. College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China; 2. The School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of apigenin on proliferation of human hepatocellular carcinoma Hepg2 cells and glucose uptake. **Method:** Human hepatocellular carcinoma Hepg2 cells were used as study objects and apigenin of different concentrations ( $0.625 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) acted on the cells. The cells were inoculated at  $6 \times 10^3$  /mL in 96-well plate, 5 duplicate wells/group. After culture for 24, 48, 72 h, cell proliferation was detected by MTT. Glucose uptake was detected by glucose test kit. The cells were inoculated at  $10^6$  /mL in 6-well plate, and after culture for 48 h, the changes in glucose transporter protein 1 (GLUT1) was detected by Western blot. **Result:** The proliferation of human hepatocellular carcinoma Hepg2 cells could be inhibited by apigenin compared with the control group, and the inhibitory effect was in a time and concentration dependent manner, with statistically significant difference ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). Apigenin of different concentrations could significantly reduce the intake of glucose by Hepg2 cells ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). Compared with the control group, GLUT1 expression was decreased with the increase of apigenin concentration ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). **Conclusion:** Apigenin of different concentrations could inhibit the proliferation of human hepatocellular carcinoma Hepg2 cells and glucose uptake.

**[Key words]** apigenin; Hepg-2 cell; cell proliferation; glucose uptake

芹菜素 (apigenin) 又称芹黄素, 是一种天然的黄酮类化合物, 广泛分布于茶叶、蔬菜、水果和香料

中, 如芹菜、大蒜等, 以芹菜中含量最高<sup>[1]</sup>, 具有抗炎, 阻滞癌细胞增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡等作用<sup>[2]</sup>;

**[收稿日期]** 20150323(020)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81302895)

**[第一作者]** 陈婷, 硕士, 从事药理学研究, Tel: 18826403206, E-mail: 478167066@qq.com

**[通讯作者]** \*黎同明, 博士, 教授, 从事中医方剂学研究, Tel: 020-39358096, E-mail: ltmwgx@yahoo.com.cn

实验表明,芹菜素在体外能够显著抑制多种肿瘤细胞的生长<sup>[3-5]</sup>,但关于人肝癌 Hepg2 的研究相对较少,本实验以 Hepg2 细胞为模型,研究芹菜素抑制 Hepg2 细胞增殖以及摄取葡萄糖能力的作用,为肝癌的预防和治疗提供新的思路。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人肝癌细胞 Hepg2,由广东药学院药科学院新药筛选与药效评价中心馈赠。

**1.2 试剂** 芹菜素(纯度为 $\geq 98\%$ ,阿拉丁公司,lot 11311031),DMEM 高糖培养基(lot 8114314),胎牛血清(FBS,lot 41F9144K),非必需氨基酸(lot 1444324),青链霉素双抗(lot 1491907),均为美国 Gibco 公司,葡萄糖检测试剂盒(上海荣盛生物药业有限公司,lot 20141105147),MTT(Genview 公司,lot 3911020250),Anti-GLUT1(lot 13H161),ACTIN 一抗(lot 12320),均购自 Boster 公司,羊抗兔二抗(杭州华安生物技术有限公司,lot G140606),其余试剂均为国产分析纯。

**1.3 仪器** 680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),3111 型恒温 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 Thermo 公司),Multiskan FC 型酶标仪(美国 Thermo 公司),TD5K-II 型台式低速离心机(长沙东旺实验仪器有限公司),LED-3 型超净工作台(苏州净化设备有限公司),KQ-100M 型超声波清洗器(东莞市科桥超声波设备有限公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 按常规方法培养 Hepg2 细胞株,用完全培养基(含 DMEM 高糖培养基,10% FBS,1% 青链霉素,1% 非必需氨基酸)置于 5% CO<sub>2</sub>,37 °C 细胞培养箱内传代培养。

**2.2 检测细胞增殖抑制率** 取对数生长期 Hepg2 细胞,接种于 96 孔培养板(细胞密度为  $6 \times 10^3$  个/mL),分为空白组(不含细胞),对照组,芹菜素(0.625,1.25,2.5,5,10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组,每组 5 个复孔,24 h 后,给药组加入含不同浓度的芹菜素,空白组及对照组均加入等量无血清培养基。分别培养 24,48,72 h 后,每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液,继续培养 4 h,弃上清,加入 DMSO 溶液 150  $\mu\text{L}$ ,置于摇床上振荡 10 min,充分溶解结晶物,酶标仪 570 nm 处测定各孔吸光度 A。实验重复 3 次。

$$\text{细胞增殖抑制率} = \frac{(\text{对照组 } A - \text{给药组 } A)}{(\text{对照组 } A - \text{空白组 } A)} \times 100\%$$

**2.3 对 Hepg2 细胞摄取葡萄糖的影响** 取对数生长期 Hepg2 细胞,接种于 96 孔培养板,分组同 2.2,

24,48,72 h 后,取各组细胞的培养上清液,用葡萄糖测定试剂盒检测培养液中的葡萄糖含量,以空白组为标准,计算各组细胞的葡萄糖消耗量,后将芹菜素各浓度组葡萄糖消耗量与对照组比较,观察其对 Hepg2 细胞摄取葡萄糖的影响。

**2.4 检测葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1) 蛋白表达** 取对数生长期 Hepg2 细胞以  $10^6$  个/mL 密度接种于 6 孔培养板中,分为对照组,芹菜素(0.625,1.25,2.5,5,10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组,24 h 后,弃去培养液,给药组加入不同浓度的芹菜素(对照组加入无血清培养基),继续培养 48 h 后,收集细胞,提取细胞总蛋白,BCA 法进行总蛋白定量,每泳道上样量为总蛋白 50  $\mu\text{g}$ ,10% SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 室温下封闭 90 min,加入 GLUT1 一抗(1:400), $\beta$ -actin(1:500),4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜后经 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:5000)孵育 1 h,加入 ECL 化学发光液,用 X 射线光片暗室曝光,显影及定影。用 WO-9413B 型凝胶成像系统自带软件 Gelpro 32 分析胶片中的蛋白条带,以各组灰度面积的乘积/内参( $\beta$ -actin)灰度面积的乘积反映相对蛋白表达丰度。实验重复 3 次<sup>[6]</sup>。

**2.5 统计学方法** 应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间显著性比较采用 *t* 检验和单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对 Hepg2 细胞增殖抑制的作用** 与对照组比较,不同浓度的芹菜素作用于 Hepg2 后,细胞生长受到不同程度的抑制,随着芹菜素时间的延长,抑制作用明显增强,其抑制作用呈时间和浓度依赖性( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

**3.2 芹菜素对 Hepg2 细胞葡萄糖消耗的影响** 与对照组比较,芹菜素作用于 Hepg2 24,48,72 h 后,Hepg2 细胞的葡萄糖消耗量明显减少( $P < 0.05, P < 0.01$ ),当同一芹菜素浓度作用时间逐渐延长或同一作用时间芹菜素浓度逐渐升高时,其抑制 Hepg2 细胞摄取葡萄糖的作用逐渐增强,呈浓度和时间依赖性。见表 2。

**3.3 芹菜素对 Hepg2 细胞葡萄糖消耗相关蛋白表达水平的影响** 与对照组比较,0.625 ~ 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  芹菜素与细胞共同培养 48 h 后,葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1)随着芹菜素浓度升高表达逐渐减少,见图 1。对条带的灰度值进行统计学分析,随着芹菜素浓度升高,与对照组比较差异具有统计学意义( $P <$

表 1 不同浓度芹菜素对 Hepg2 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of different concentrations of apigenin on Hepg2 cell growth ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h		48 h		72 h	
		$A_{570}$	抑制率/%	$A_{570}$	抑制率/%	$A_{570}$	抑制率/%
对照	-	1.989 ± 0.085	-	1.974 ± 0.016	-	2.189 ± 0.077	-
芹菜素	0.625	1.802 ± 0.037 <sup>1)</sup>	9.77	1.782 ± 0.021 <sup>2)</sup>	10.16	1.938 ± 0.059 <sup>1)</sup>	11.28
	1.25	1.789 ± 0.023 <sup>1)</sup>	10.41	1.738 ± 0.037 <sup>2)</sup>	12.47	1.877 ± 0.045 <sup>2)</sup>	12.81
	2.5	1.775 ± 0.044 <sup>1)</sup>	11.14	1.699 ± 0.106 <sup>1)</sup>	14.51	1.817 ± 0.089 <sup>2)</sup>	15.74
	5	1.767 ± 0.044 <sup>1)</sup>	11.58	1.674 ± 0.062 <sup>1)</sup>	15.85	1.764 ± 0.180 <sup>1)</sup>	18.33
	10	1.589 ± 0.120 <sup>1)</sup>	20.83	1.519 ± 0.089 <sup>1)</sup>	24.04	1.463 ± 0.061 <sup>2)</sup>	32.94

注:与对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

表 2 不同浓度芹菜素对 Hepg2 细胞葡萄糖消耗量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of different concentrations of apigenin on Hepg2 cell glucose uptake ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	葡萄糖消耗量/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$		
		24 h	48 h	72 h
对照	-	3.046 ± 0.010	3.005 ± 0.013	3.150 ± 0.012
芹菜素	0.625	2.301 ± 0.010 <sup>1)</sup>	2.171 ± 0.008 <sup>1)</sup>	1.675 ± 0.018 <sup>1)</sup>
	1.25	2.296 ± 0.006 <sup>1)</sup>	1.586 ± 0.008 <sup>1)</sup>	1.486 ± 0.010 <sup>1)</sup>
	2.5	1.778 ± 0.012 <sup>1)</sup>	1.252 ± 0.016 <sup>1)</sup>	1.025 ± 0.019 <sup>1)</sup>
	5	1.448 ± 0.018 <sup>1)</sup>	1.012 ± 0.009 <sup>2)</sup>	0.653 ± 0.014 <sup>2)</sup>
	10	0.866 ± 0.002 <sup>1)</sup>	0.501 ± 0.021 <sup>2)</sup>	0.164 ± 0.006 <sup>2)</sup>

0.05,  $P < 0.01$ ), 见表 3。

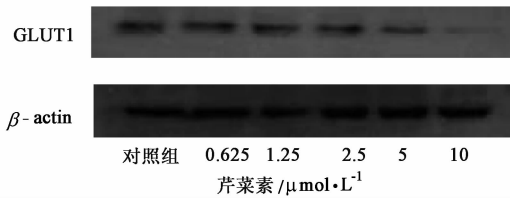


图 1 不同浓度芹菜素作用于 Hepg2 细胞后 GLUT1 蛋白的表达

Fig. 1 Effect of different concentrations of apigenin on GLUT1 expression on Hepg2 cell

表 3 不同浓度芹菜素作用于 Hepg2 后 GLUT1 蛋白相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of different concentrations of apigenin on relative density of GLUT1 expression on Hepg2 cell ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	GLUT1/ $\beta$ -actin
对照	-	1.221 ± 0.011
芹菜素	0.625	1.201 ± 0.010
	1.25	1.171 ± 0.019 <sup>2)</sup>
	2.5	1.050 ± 0.027 <sup>2)</sup>
	5	0.501 ± 0.100 <sup>2)</sup>
	10	0.186 ± 0.010 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

肝癌是肝脏中首要的恶性肿瘤,在全球恶性肿瘤死亡率排行榜中,肝癌排名第三。在很多国家,肝癌的发病率和死亡率仍在不断升高。在我国,肝癌是危害居民生命健康的前 3 位最主要恶性肿瘤之一。所以,针对肝癌的预防与治疗已成为全球的热点<sup>[7]</sup>。

芹菜素是一种黄酮类物质,近几年,国内外对芹菜素的抗肿瘤作用进行了大量的研究,研究表明<sup>[8-10]</sup>,芹菜素在体外对宫颈癌 HeLa 细胞,胃癌 SGC-7901 细胞,卵巢癌 CoC1 细胞等肿瘤细胞的生长具有不同程度的抑制作用,但关于芹菜素抑制肝癌细胞生长作用的研究甚少。本实验 MTT 结果显示,芹菜素能较好的抑制人肝癌 Hepg2 细胞增殖的作用,且随着浓度的增加和时间的延长抑制作用逐渐增强,呈现出良好的时效和量效关系,其作用机制可能与直接抑制细胞生长有关。

癌细胞和正常细胞一样需要各种生物大分子如葡萄糖、蛋白质来提供能量<sup>[11]</sup>,其中通过摄取葡萄糖加强能量的摄取是一条重要的途径,肿瘤细胞的大量增殖导致其对葡萄糖的消耗量大大增加。葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1)是目前已知体内分布最为广

泛的葡萄糖转运体,其主要参与葡萄糖跨膜转运的正常生理过程,肿瘤细胞摄取葡萄糖增加主要通过增加 GLUT1 的跨膜转运,以 GLUT1 为靶点来减少其对葡萄糖摄取,从而从根本上阻断肿瘤细胞能量来源,可为肿瘤治疗提供新的方法<sup>[12]</sup>。本实验通过检测 Hepg2 细胞葡萄糖消耗量,表明芹菜素作用后的 Hepg2 细胞葡萄糖消耗量均明显减少,且随着芹菜素浓度增加,其抑制 Hepg2 细胞摄取葡萄糖的作用越明显,具有剂量依赖性。与此相应,芹菜素同时也下调 Hepg2 细胞的 GLUT1 蛋白表达水平。同时,有相关研究发现<sup>[13]</sup> 芹菜素对两种胰腺癌细胞系 CD18 和 S2-013 的葡萄糖摄取有显著抑制作用,因为它抑制了 GLUT1 mRNA 和蛋白质的表达。故我们推测,芹菜素对 Hepg2 细胞的葡萄糖摄取的影响,可能是与抑制细胞增殖,调节 GLUT1 蛋白表达有关,这也可能是芹菜素抗肿瘤的作用机制之一,同时提示食物中的芹菜素可能成为预防及治疗肿瘤的一种有效物质。

[参考文献]

[ 1 ] 林丽文,辛勤. 芹菜素药理作用的研究进展[J]. 中国热带医学,2012,12(8):1023-1026.  
[ 2 ] 历强,马建仓. 芹菜素的药理学研究进展[J]. 国外医学:中医中药分册,2003,25(3):147-149.  
[ 3 ] 刘斌,巴一. 芹菜素防治肿瘤及其机制研究进展[J]. 实用肿瘤杂志,2013,2(28):222-226.  
[ 4 ] 孟勇,李华,马清涌,等. 芹菜素对人结肠癌细胞株 SW480 体外侵袭能力的抑制作用[J]. 现代肿瘤医

学,2011,19(8):1522-1524.

[ 5 ] 杜俊瑶,辛彦. 芹菜素抑制人卵巢癌 CAOV3 细胞增殖的研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2007,23(5):374-375.  
[ 6 ] 潘雪刁,杨周萍,周四桂,等. 芹菜素对人肺癌 A549 细胞凋亡及相关蛋白 Bax、Bcl-2 表达的影响[J]. 中国医药生物技术,2013,8(4):259-263.  
[ 7 ] 陈建国. 中国肝癌发病趋势和一级预防[J]. 临床肝胆病杂志,2012,28(4):256-260.  
[ 8 ] Zheng P W, Chiangle, Linc C. Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells [J]. Life Sci,2005,76(12):1367-1379.  
[ 9 ] 王晓琳,黄晓莉,赵艳,等. 内质网应激在芹菜素诱导胃癌细胞凋亡中的作用[J]. 癌变·畸变·突变,2012,24(2):116-120.  
[10] 唐爱琼,刘杰,刘飞,等. 芹菜素增敏 TRAIL 诱导卵巢癌 CoC1 细胞凋亡[J]. 中南医学科学杂志,2011,39(1):37-40.  
[11] 陈况况,章宏慧,陈健初. 芹菜素对癌细胞作用机理的研究进展[J]. 食品工业科技,2013,34(3):392-395.  
[12] 俞晓燕,孙子林. GLUT1 的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志,2012,21(30):3411-3414.  
[13] Melstrom L G, Salabat M R, Ding Xian-Zhong, et al. Apigenin inhibits the GLUT-1 glucose transporter and the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway in human pancreatic cancer cells [J]. Pancreas, 2008, 37(4):426-431.

[责任编辑 聂淑琴]