

构树叶总黄酮对人肝癌 HepG-2 细胞增殖及其细胞周期的影响

朱开梅¹, 李美波¹, 骆彩珍², 刘建楠¹, 顾生玖^{1*}

(1. 桂林医学院药学院, 广西 桂林 541004; 2. 桂林医学院护理学院, 广西 桂林 541004)

[摘要] **目的:**研究构树叶总黄酮(total flavonoids of *Broussonetia papyrifera*, TFBP)对人肝癌细胞 HepG-2 的生长抑制和诱导凋亡的作用及其机制。**方法:**取对数生长期人肝癌 HepG-2 细胞,随机分为药物组和对照组,药物组用 3, 6, 9, 12 g·L⁻¹不同质量浓度 TFBP 作用人肝癌 HepG-2 细胞 24, 48, 72 h 后,采用 MTT 法检测细胞生长抑制率;Hoechst 33342 荧光染色法荧光显微镜观察细胞的形态变化并用流式细胞仪检测细胞的周期及细胞凋亡率。**结果:**MTT 结果显示,各质量浓度 3, 6, 9, 12 g·L⁻¹的 TFBP 对 HepG-2 有增殖抑制作用,并存在浓度和时间依赖关系,3, 6, 9, 12 g·L⁻¹不同质量浓度 TFBP 作用人肝癌 HepG-2 细胞 48 h 后,细胞增殖抑制率分别为 20.2%, 29.44%, 39.21%, 43.96%; 9 g·L⁻¹的 TFBP 作用 HepG-2 细胞 72 h 后,细胞增殖抑制率可达 52.46%,与对照组具有显著性差异($P < 0.05$);Hoechst 33342 荧光染色可观察到核浓缩及核碎裂等典型细胞凋亡特征及凋亡小体;流式细胞仪结果显示,随着 TFBP 作用浓度的增加,加药组细胞凋亡率加药组凋亡率与对照组相,有显著差异($P < 0.01$),G₀/G₁ 期细胞逐渐减少,G₂/M 期细胞数逐渐增多,与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$),细胞周期被阻滞在 G₂/M 期。**结论:**TFBP 在体外对肝癌细胞 HepG-2 有明显的增殖抑制和诱导细胞凋亡的作用,其抑制机制可能和诱导细胞凋亡与阻滞细胞周期有关。

[关键词] HepG-2 细胞株; 构树叶总黄酮; 细胞凋亡;

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0153-04

[doi] 10.11653/syfyj2014030153

Effect of Total Flavonoids of *Broussonetia papyrifera* on Proliferation and Cell Cycle of Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG-2

ZHU Kai-mei¹, LI Mei-bo¹, LUO Cai-zhen², LIU Jian-nan¹, GU Sheng-jiu^{1*}

(1. College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541004, China;

2. School of Nursing, Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** The total flavonoids of *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent (TFBP) was investigated for its antitumor activity and induction of apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2 *in vitro*. **Method:** The HepG-2 cells in logarithmic phase of growth were randomly divided into drug group and control group, with the concentration of 3, 6, 9, 12 g·L⁻¹ TFBP in hepatocellular carcinoma HepG-2 cells. The intervention durations was 24, 48, 72 h accordingly, the viability of HepG-2 cells was measured by MTT. Morphology of cell apoptosis was observed by Hoechst 33342 fluorescence staining. The cell cycle and cell apoptosis rate were detected by flow cytometry. **Result:** TFBP could inhibit the growth of cells and cause apoptosis significantly. The suppression was in a time-and dose-dependent manner, HepG-2 cells were treated with TFBP of 3, 6, 9, 12 g·L⁻¹ concentrations, the inhibition rates were 20.2%, 29.44%, 39.21%, 43.96% at 48 h.

[收稿日期] 20130830(011)

[基金项目] 广西科技厅资助项目(桂科能 129825-21);广西教育厅项目资助项目(201202ZD065);桂林市科技攻关资助(20130103-8, 20120105-5, 20120105-16, 20130103-9, 20130113-1)

[第一作者] 朱开梅, 硕士, 教授, 从事化学致病分子机制和药物防治研究, Tel: 13977375180, E-mail: glzkcm@163.com

[通讯作者] * 顾生玖, 博士, 教授, 从事药物化学研究, Tel: 13607733816, E-mail: gushengjiu@163.com

When HepG-2 cells were treated with the concentration of $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ TFBP, the inhibition rate could be achieved 52.46% at 72 h, there was a significant difference compared with control group ($P < 0.05$) The typical apoptosis characteristics such as nuclear fragmentation and apoptotic body could be observed under the fluorescence microscope. In the same time, with the increase of drug concentration, cell apoptosis rate increased significantly ($P < 0.01$). TFBP could reduce the cell population in G_1/G_0 phase and increase the cell population in G_2/M phase significantly ($P < 0.05$). TFBP could induce a G_2/M cell cycle arrest. **Conclusion:** TFBP has apparent inhibition and apoptosis-inducing effect on HepG-2 cells. TFBP may induce apoptosis and induce a G_2/M cell cycle arrest.

[Key words] HepG-2 cell line; TFBP; apoptosis

构树系中药楮实子的原属植物,资源十分丰富。现代化学成分研究表明,从构树不同部位中分离出新的化合物,具有多种生物学活性,构树属提取物被发现具有抗真菌^[1]、抗氧化^[2-3]、抗血小板凝集^[4]、抗炎症镇痛^[5]等活性,由于构树具有广泛的药理活性,其药用开发前景广阔^[6]。然而,最近研究发现,从楮实子中分离得到 5 种生物碱对人宫颈鳞癌细胞、人肝癌细胞株、人生骨肉瘤细胞系、人胰腺癌细胞株、人黑色素瘤细胞株的细胞毒作用^[7],根皮中分离得到的 papyriflavonol A 对 HepG2 细胞有较高的细胞毒作用^[8]。但是关于总黄酮对肝癌作用的研究和报道很少。总黄酮具有抗凝血、镇痛和抗炎、抗氧化和延缓衰老、抗肿瘤及防治骨质疏松等作用^[9]。本实验旨在通过将构树叶总黄酮(TFBP)作用于人肝癌 HepG-2 细胞,观察 TFBP 对该细胞的生长抑制和凋亡作用的影响,并探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌细胞株 HepG-2(由桂林医学院科学实验中心惠赠)。

1.2 试剂 构树叶于 2009 年 9 月采集于桂林医学院药用植物园,由药学院天然药化教研室 傅鹏博士鉴定其来源于桑科构属植物构树的叶子 *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent。构树叶总黄酮,由本实验室提取,含量为 $1.39 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[10]。3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT, Sigma 公司,批号 M2128);二甲基亚砜(DMSO, Sigma 公司,批号 02650);胎牛血清(FBS,上海玉博生物科技有限公司,批号 8112018);碘化丙啶(PI)和 RNAase (Sigma 公司);其余试剂均为分析纯。

1.3 仪器 CO_2 培养箱(Thermo,美国),Model-550 酶标仪(BD),流式细胞仪(FACSCanto II, BD),倒置荧光显微镜(Olympus,日本)。

2 方法

2.1 细胞培养及分组 将人肝癌 HepG-2 细胞接

种于含 10% 热灭活小牛血清的 RPMI1640 培养液中,在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 饱和湿度及 5% CO_2 的细胞培养箱中传代培养,每 1~2 d 传代 1 次。取对数生长期细胞进行试验。将 TFBP 用 pH 7.8 的 PBS 溶解后,过滤除菌,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用,实验前稀释至所需浓度 3,6,9,12 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 测细胞增殖抑制率 取对数生长期的 HepG-2 细胞,调整细胞密度为 $4 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 96 孔板中,每孔 100 μL ,再加入培养基 80 μL ,24 h 后观察细胞贴壁情况,加入不同浓度的药物 20 μL ,使其终质量浓度 3,6,9,12 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。再置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度的培养箱中分别培养 48 h。每种药物浓度为 1 组,每个质量浓度设 3 个平行复孔,同时设不加药组为对照组。终止培养后每孔加入 20 μL MTT,继续培养 4 h 后,弃上清液,加入 DMSO 150 μL ,振荡,充分溶解结晶,选择 490 nm 波长酶联免疫检测仪测定各孔的吸光度(A),计算细胞增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = (\text{对照组 } A_{490} - \text{实验组 } A_{490}) / \text{对照组 } A_{490} \times 100\%$$

2.3 观察细胞凋亡 取肝癌对数生长期细胞,以每孔 2×10^5 个细胞/孔的密度接种于 6 孔培养板,培养 24 h 后,倒置显微镜观察细胞,细胞爬片且生长状态良好时,加入 3,6,9,12 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同浓度的 TFBP,再置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$,5% CO_2 饱和湿度的培养箱中分别培养 48 h 后终止培养,吸尽培养液,PBS 溶液冲洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 冲洗 3 次后加入 Hoechst 33342 染液,避光,均匀, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min 后,去染色液,PBS 冲洗 3 次后将细胞爬片贴于载玻片上,荧光显微镜下观察细胞核形态。

2.4 检测细胞周期 取对数生长期的 HepG2 细胞,调整密度为 $4 \times 10^4/\text{mL}$,接种于培养瓶中,再放入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度下的培养箱中进行培养。培养 24 h 后,于显微镜下观察细胞呈贴壁生长状态,弃去上清液加药,分别加入 3,6,9,12 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同浓度

的 TFBP。不加药组为阴性对照组。在细胞培养箱中培养 48 h 后,收集细胞。离心后,加入 75% 乙醇(4 ℃ 预冷)固定,于 -20 ℃ 过夜。检测时,加 RNA 酶后孵育 30 ~ 60 min 后,在细胞悬液中加入一定量的 PI 和 Annexin V-FITC,震荡混匀,避光染色,用流式细胞仪检测细胞周期分布和细胞凋亡率。

2.5 统计学处理 所有实验数据均采用 SPSS 17.0 统计软件进行 One-way ANOVA 检验分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 HepG-2 细胞增殖的影响 MTT 实验结果显示:经 3, 6, 9, 12 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同浓度的 TFBP 作用后 HepG-2 细胞 48 h 后,绘制细胞生长抑制曲线,如图 1)。随着药物浓度的增加,细胞增殖抑制率也逐渐增大,TFBP 对人肝癌 HepG-2 细胞生长抑制影响呈剂量依赖性。用 9 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TFBP 作用 HepG-2 细胞(24, 48, 72 h)后对其细胞增殖抑制率进行比较,随着作用时间的延长,细胞增殖的抑制率也逐渐增长,9 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TFBP 作用 HepG-2 细胞 24, 48, 72 h 后,细胞增殖抑制率分别为 19.02%, 39.21%, 52.46%, 相同浓度下,TFBP 对人肝癌 HepG-2 细胞生长抑制影响呈时间依赖性。

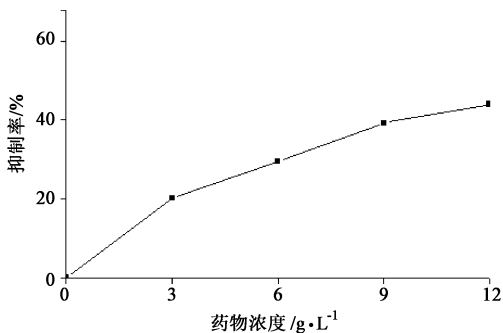


图 1 不同浓度 TFBP 对 HepG-2 细胞作用 48 h 后细胞生长的抑制曲线

3.2 对 HepG-2 细胞核形态的影响 经不同浓度的 TFBP 处理 48 h 后,用 Hoechst 33342 荧光染色后在荧光显微镜下观察,可见正常对照组细胞贴壁生长,细胞核均匀着色,核仁大且完整,细胞发光均匀,而 TFBP 组随药物浓度增加,细胞产生典型的凋亡细胞形态改变,贴壁细胞明显减少,皱缩、变圆和脱落细胞逐渐增加,逐渐出现各期凋亡细胞形态:细胞核皱缩变形,部分细胞呈现致密浓染,呈现高度凝聚、边缘化,甚至裂解为碎块,产生凋亡小体,并且凋亡细胞的数目随着药物浓度的增加而增加(图 2)。

3.3 对 HepG-2 细胞周期的影响 与空白对照组比较,给药组随着药物浓度的增加, G_0/G_1 细胞逐渐

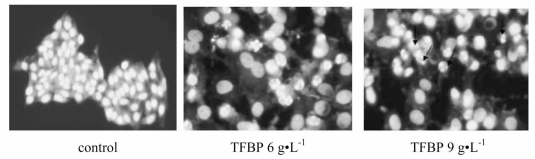


图 2 TFBP 对 HepG-2 细胞凋亡的影响 (Hoechst 33342 荧光染色, $\times 100$)

减少, G_2/M 期细胞逐渐增多,与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$),且 G_2/M 期细胞所占比率呈剂量依赖性增加,提示 TFBP 可使 HepG-2 阻滞于 G_2/M 期,且具有浓度依赖性,如表 1。

表 1 TFBP 对 HepG-2 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$) %

组别	TFBP 浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	G_0/G_1	S	G_2/M
空白	-	68.81	22.98	9.21
TFBP	3	58.23 ¹⁾	25.12	16.65 ¹⁾
	6	52.79 ¹⁾	27.64	19.57 ¹⁾
	9	49.25 ¹⁾	24.99	25.76 ¹⁾
	12	45.43 ¹⁾	27.28	28.19 ¹⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.4 对 HepG-2 细胞凋亡率的影响 经 3, 6, 9, 12 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TFBP 作用 HepG-2 细胞 48 h 后,随着 TFBP 浓度的增加,活细胞比例逐渐减少,凋亡和坏死细胞比例逐渐增加,细胞凋亡率逐渐增加。当质量浓度达到 6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,与对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.01$),如表 2。

表 2 TFBP 对 HepG-2 细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	TFBP 浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	凋亡率 / %
空白	-	2.06 \pm 0.19
TFBP	3	7.03 \pm 0.04
	6	11.56 \pm 0.12 ¹⁾
	9	26.21 \pm 0.17 ¹⁾
	12	33.21 \pm 0.13 ¹⁾

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

原发性肝癌(primary liver cancer)是我国常见恶性肿瘤之一,死亡率在消化系统恶性肿瘤中列第 3 位。我国每年死于肝癌约 11 万人,占全世界肝癌死亡人数的 45%^[11]。恶性肿瘤的典型特征是肿瘤细胞逃避正常的细胞增殖调控体系而自主地无限生长。正常的细胞周期内发生一系列的生化事件,从而实现生长、分裂和增殖的过程。细胞凋亡是机体维持稳定的重要保护机制之一,当细胞凋亡机能降低时,肿瘤发生率就会增加,肿瘤的发生发展

与肿瘤细胞的凋亡密切相关^[12-15]。黄酮类化合物是一类天然有机化合物,广泛存在于自然界中许多药用植物的根、叶、皮、果以及水果和蔬菜中,多以苷类形式存在,一部分以游离形式存在,具有多种潜在的药用价值,能够抑制多种肿瘤细胞的增殖和凋亡^[16-18]。

本实验通过 MTT 法研究发现,构树叶提取物总黄酮 TFBP 对 HepG-2 细胞生长有剂量-时间效应,随着 TFBP 浓度的提升及时间的延长,HepG-2 细胞增殖可受到明显抑制,可能是因为 TFBP 抑制了细胞生长或诱导细胞凋亡的结果。Hoechst 33342 荧光染色实验结果表明经 TFBP 作用的 HepG-2 细胞核致密浓染,或者细胞核裂解为碎块,呈碎片状等多种形态的变化,且随药物浓度增加,发生细胞核形态改变的细胞明显增多,流式细胞结果表明经 TFBP 处理后的 HepG-2 细胞多被阻滞于 G₂/M 期,且细胞凋亡率在一段时间范围内随着药物作用浓度的增加而上升,实验组与对照组的相,凋亡率明显增加 ($P < 0.01$),FCM 的实验结果结合形态学的凋亡改变进一步表明:TFBP 在体外有诱导 HepG-2 细胞株凋亡的作用。初步推断其诱导凋亡的机制可能与细胞周期阻滞有关。

综上所述,构树叶总黄酮 TFBP 能明显抑制 HepG-2 细胞的增殖,呈剂量与时间依赖性,其抑制细胞增殖的机制可能与 TFBP 能与诱导细胞其凋亡,使 HepG-2 细胞生长停滞于细胞周期的 G₂/M 期有关。但是 TFBP 作为一种天然提取物,其成分复杂,对于是否还存在其他途径和通道,有待进一步深入研究探讨。

[参考文献]

[1] 冯卫生,李红伟,郑晓珂,等. 构树叶的化学成分[J]. 药学学报,2008,43(2):173.
[2] Mei R Q, Wang Y H, Du G H, et al. Antioxidant Lignans from the Fruits of *Broussonetia papyrifera* [J]. *J Nat Prod*,2009,72(4):621.
[3] Tsai F H, Lien J C, Son K H, et al. Protective effect of *Broussonetia papyrifera* against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*,2009,73(9):1933.
[4] Lin C N, Lu C M, Hu T X, et al. Novel Antiplatelet constituents from Fornos Moraceous plants [J]. *J Nat Prod*,1996,59:834.
[5] Lin L W, Chen H Y, Wu C R, et al. Comparison with

various parts of *Broussonetia papyrifera* as to the antinociceptive and anti-inflammatory activities in rodents [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72 (9):2377.
[6] 朱开梅,刘建楠,顾生玖,等. 构树药用活性化学成分及药理临床应用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):198.
[7] 马养民,吉艳芬. 构树属植物活性成分的提取分离研究进展[J]. 中药材,2008,31(1):161.
[8] Ko H H, Chang W L, Lu T M. Antityrosinase and Antioxidant Effects of ent-Kaurane Diterpenes from Leaves of *Broussonetia papyrifera*[J]. *J Nat Prod*,2008, 71:1930.
[9] 谭秦莉,刘东,李玉宝,等. 总黄酮化合物药理作用研究进展[J],安徽中医学院学报,2009,28(3):62.
[10] 顾生玖,姚丽新,刘建楠,等. 微波辅助法提取构树叶中总黄酮的工艺研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(2):782.
[11] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics 2002 [J]. *CA Cancer J Clin*,2005, 55(2):74.
[12] 时昌文,李杰,赵霞,等. 丙戊酸钠对肝癌细胞系 HepG2 的生长抑制作用[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007,14(7):510.
[13] Van Geelen C M, Pennarun B, Ek W B, et al. Downregulation of active caspase 8 as a mechanism of acquired TRAIL resistance in mismatch repair-proficient colon carcinoma cell lines [J]. *Int J Oncol*, 2010, 37 (4):1031.
[14] 赵昌林,于哲,王珍. 番荔枝内 Bullatacin 对人肝癌细胞株 HepG2 凋亡影响的探讨[J]. 中华肿瘤防治研究, 2010,17(21):1738.
[15] 肖广显,丁素银,程英俊,等. 索拉非尼联合热疗对肝癌 HepG-2 细胞中 Bax, Bcl-2 表达的影响[J]. 解放军医药杂志,2011,23(5):1
[16] 陈海霞,刘明华,李茂,等. 皂角刺总黄酮粗提物与纯化物体外抗肿瘤活性研究[J]. 时珍国医国药,2013, 24(1):101.
[17] 甄汉深,周燕园,袁叶飞,等. 青天葵中黄酮类化合物的体外抗肿瘤实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008,14(3):36.
[18] Young Kyoan Kim, Young Sup Kim, Sang Un Choi, et al. Isolation of flavonol rhamnosides from *loranthUS tanakae* and cytotoxic effect of them on human tumor cell lines [J]. *Arch Pharm Res*,2004,27(1):44.

[责任编辑 聂淑琴]