

沙漠绢蒿黄酮抑制肺癌 A-549 细胞增殖

张成军¹, 邓雁如^{2*}, 王颖², 牟佳佳²

(1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150;

2. 天津中医药大学, 天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 300193)

[摘要] **目的:** 研究从沙漠绢蒿中得到的黄酮类化合物体外对肺癌 A-549 细胞增殖的影响。**方法:** 利用硅胶柱色谱等方法分离纯化 6 种黄酮类化合物, 分别为 5,7,4'-三羟基-6-甲氧基黄酮、5,7-二羟基-6,3',4',5'-四甲氧基黄酮、5,7,4'-三羟基-6,3',5'-三甲氧基黄酮、5,7-二羟基-6,3',4'-三甲氧基黄酮、槲皮万寿菊素-3,6-二甲醚-7-O- β -D-葡萄糖苷、木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷-(3'-O-7")-槲皮素-3"-甲醚; 采用 MTT 法测定 6 种黄酮类化合物对肺癌 A-549 细胞增殖的抑制作用; 采用流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡。**结果:** 受试的 6 种黄酮类化合物中的 5 种化合物对肺癌 A-549 细胞增殖具有明显抑制作用, 其抑制率与化合物浓度呈一定的相关性; 流式细胞仪检测发现其中 2 种化合物(5,7,4'-三羟基-6-甲氧基黄酮和 5,7,4'-三羟基-6,3',5'-三甲氧基黄酮)使细胞周期分别阻滞于 G₁ 和 G₂ 期, 另 1 种化合物(5,7-二羟基-6,3',4'-三甲氧基黄酮)可通过诱导细胞凋亡及细胞周期阻滞抑制 A-549 细胞增殖。**结论:** 沙漠绢蒿黄酮对人肺癌细胞株 A-549 增殖具有明显抑制作用, 使细胞发生周期阻滞或凋亡。

[关键词] 沙漠绢蒿; 黄酮类; 人肺癌 A-549 细胞; 增殖; 细胞周期; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0243-05

Inhibiting Effects of Flavonoids from *Seriphidium santolium* on Human Lung Carcinoma Cell Line A-549

ZHANG Cheng-jun¹, DENG Yan-ru^{2*}, WANG Ying², MOU Jia-jia²

(1. Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM),

Tianjin 300150, China; 2. Tianjin Key Lab of Chemistry and Analysis of Chinese

Materia Medica, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effect of flavonoids from *Seriphidium santolium* on the proliferation of the lung carcinoma A549 cell line. **Method:** Six flavonoids were isolated by column chromatography on silica gel. They were identified as hispidulin, arteanoflavone, 5, 7, 4'-trihydroxy-6, 3', 5'-trimethoxyflavone, eupatilin, quercetagenin-3, 6-dimethyl ether-7-O- β -D-glucoside, luteolin-7-O- β -D-glucoside-(3'-O-7")-quercetin-3"-methyl ether. MTT was performed to examine the proliferation of A-549 cells, and flow cytometry was used to determine the cell cycle distribution and cell apoptosis. **Result:** There was a dose-dependent inhibition of cell proliferation of A-549 by five compounds. The antiproliferative effect of compound I (hispidulin) was attributed to its inducing cell cycle (G₁) arrest, and compound III (5, 7, 4'-trihydroxy-6, 3', 5'-trimethoxyflavone) attributed to its inducing cell cycle (G₂) arrest. Compound IV (eupatilin) induced the apoptosis and inhibited the cell circle of A-549 cell. **Conclusion:** Flavonoids from *S. santolium* could exert an anti-lung cancer effect via induction of cell cycle arrest or cell apoptosis.

[Key words] *Seriphidium santolium*; flavonoids; lung cancer; proliferation; cell cycle; apoptosis

[收稿日期] 20120506(002)

[第一作者] 张成军, 副主任医师, 从事呼吸内科的临床及教学工作, Tel:022-60335393, E-mail: zblzj@sina.com

[通讯作者] * 邓雁如, 教授, 博士, Tel:022-59596221, E-mail: dyanru@sina.com

黄酮类成分为一类多酚类天然化合物,广泛存在于自然界,如水果、蔬菜、绿茶及红酒中,是构成人们饮食的一类重要组成成分,欧洲许多国家作为日常饮食,每天都要食用几毫克的黄酮类成分。大量的流行病学研究与实验表明黄酮类成分具有多种生理及药理活性,主要表现在抗菌、抗病毒、抗突变、抗肿瘤及防癌方面。近年来分子生物学研究表明,大量的黄酮类成分对多种癌细胞系有较强的细胞毒作用,其作用方式主要通过诱导肿瘤细胞凋亡,或阻滞细胞周期在 G_1 -S 或 G_2 -M 期等方式抑制癌细胞增殖。如泽兰林素 (eupatilin) 通过诱导、分化和细胞凋亡的形式抑制胃癌 AGS 细胞的增殖^[1],木犀草素 (luteolin) 通过诱导细胞凋亡及阻滞细胞在 G_2 期抑

制非小细胞肺癌的增殖^[2],大豆素 (daidzein) 可使细胞周期阻滞在 G_1 期和 G_2 /M 期抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-453 增殖^[3]、染料木素 (genistein) 阻滞细胞周期在 G_2 -M 期而抑制人卵巢癌细胞的增殖^[4]、杨梅素 (myricetin)、落叶松黄酮 (laricitrin) 等阻滞细胞周期在 G_2 -M 期而抑制人结肠癌细胞的增殖^[5]。由于具有极大的抗肿瘤潜力,黄酮类化合物已成为药物化学研究的热点与重点^[6-10],基于此,为发现更多的具有抗肿瘤活性的黄酮类化合物,我们对来自于新疆沙漠地区的植物沙漠绢蒿中的 6 种黄酮类化合物体外抑制肺癌 A-549 细胞的增殖作用进行了初步研究(化合物结构见图 1),现报道如下。

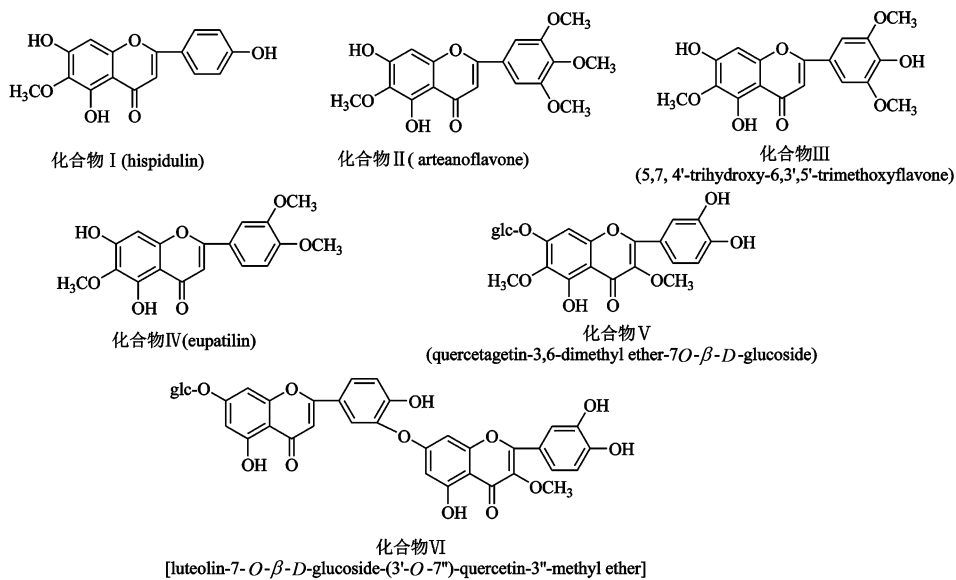


图 1 6 种黄酮类化合物结构

1 材料

1.1 药品和试剂 菊科植物沙漠绢蒿 *Seriphidium santolinum* (Schrenk) Poljak 的全草采自新疆阜康县,由中国科学院新疆生态与地理研究所张立运研究员鉴定。6 种黄酮类化合物从该植物中分离得到,分别为 5,7,4'-三羟基-6-甲氧基黄酮 (hispidulin, 化合物 I), 5,7-二羟基-6,3',4',5'-四甲氧基黄酮 (arteanoflavone, 化合物 II), 5,7,4'-三羟基-6,3',5'-三甲氧基黄酮 (5,7,4'-trihydroxy-6,3',5'-trimethoxyflavone, 化合物 III), 5,7-二羟基-6,3',4'-三甲氧基黄酮 (eupatilin, 化合物 IV), 槲皮万寿菊素-3,6-二甲醚-7-O-β-D-葡萄糖苷 (quercetagenin-3,6-dimethyl ether-7-O-β-D-glucoside, 化合物 V), 木犀

草素-7-O-β-D-葡萄糖苷-(3'-O-7'')-槲皮素-3''-甲醚 [luteolin-7-O-β-D-glucoside-(3'-O-7'')-quercetin-3''-methyl ether, 化合物 VI], 6 种化合物均为自制,质量分数均达到 98%。胎牛血清、胰蛋白酶、MTT、二甲亚砜 (DMSO) (美国 Sigma 公司), DEME, F₁₂ 培养基干粉 (美国 Invitrogen 公司), 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器 流式细胞仪 EPICS XL (Coulter, USA), 微量移液器 (法国 Gilson 公司), 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司), 倒置显微镜 (日本 Nikon 公司), 超净工作台 (苏净集团安泰空气技术公司)。

1.3 细胞株 正常人胚肾 293S 细胞和肺癌 A-549 细胞由北京阜外心血管病医院中德分子生物学实验室提供。

2 方法

2.1 受试样品的制备 选用的受试样品均从菊科沙漠绢蒿 *Seriphidium santolinum* (Schrenk) Poljak 植物的全草中分离得到,其分离纯化及结构鉴定已另文发表^[11]。样品分别以相应的培养基溶解待用,浓度为 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2 细胞培养及药物处理 正常人胚肾 293S 细胞和肺癌 A-549 细胞按常规方法复苏后,人胚肾 293S 细胞置于含 10% 的胎牛血清的 DEME 培养液中、肺癌 A-549 细胞置于含 10% 胎牛血清的 F_{12} 培养液中,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养,每 2~3 d 用 0.25% 胰酶消化传代。取对数生长期的细胞用于试验。

2.3 细胞增殖活性测定 调整人胚肾 293S 细胞和肺癌 A-549 细胞悬液密度为 1×10^6 个/mL,接种于 96 孔板中,实验组分别加入用相应培养基稀释的不同浓度的 6 种化合物,使终浓度分别为 15, 30, 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 正常对照组加入相应的培养液,使给药组和对照组的每孔终体积为 100 μL 。每组设 5 个复孔,加药后继续培养 72 h 后,每孔加入 100 μL MTT($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS),继续培养 4 h,吸出上清,加入 100 μL DMSO,振荡 3 min。于酶标仪内,选取波长 570 nm 处测定其吸光度(A)。计算药物对细胞生长的抑制率。

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

2.4 细胞周期检测 肺癌 A-549 细胞接种于细胞培养瓶中,加入不同浓度的药物,使终浓度分别为 15, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 正常对照组加入相应的培养液,24 h 后弃培养液,生理盐水洗一次,0.125% 胰酶消化,离心收集细胞,PBS 液离心洗涤 2 次,以 70% 乙醇固定过夜,PBS 离心洗去乙醇,加入 RNase A (终质量浓度为 $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min,加入 PI (终质量浓度为 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 暗染 30 min,上流式细胞仪分析。

2.5 细胞凋亡观察 肺癌 A-549 细胞接种于细胞培养瓶中,加入化合物(终浓度为 15, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),对照瓶加入培养液,24 h 后,弃培养液,生理盐水洗 1 次,0.125% 胰酶消化细胞,PBS 洗 2 次,采用无血清培养基重悬细胞,加入 Hoechst 33258 染色 10 min,将细胞悬液涂于载玻片上,加盖玻片,荧光显微镜下观察并拍照。

2.6 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行数据处理,数据统计采用方差分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 6 种黄酮类化合物对 A-549 细胞增殖的影响 化合物 I, II, III, IV, VI 各浓度组均能不同程度的抑制 A-549 细胞的增殖,且呈一定的浓度依赖关系,但化合物 V 没有明显抑制作用(数据未显示),6 种黄酮类化合物($15, 30, 60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理正常人胚肾 293S 细胞 24 h 后,对细胞无细胞毒性(数据未显示)。统计分析结果显示,各处理组与正常对照组相比均呈现较显著差异(表 1)。

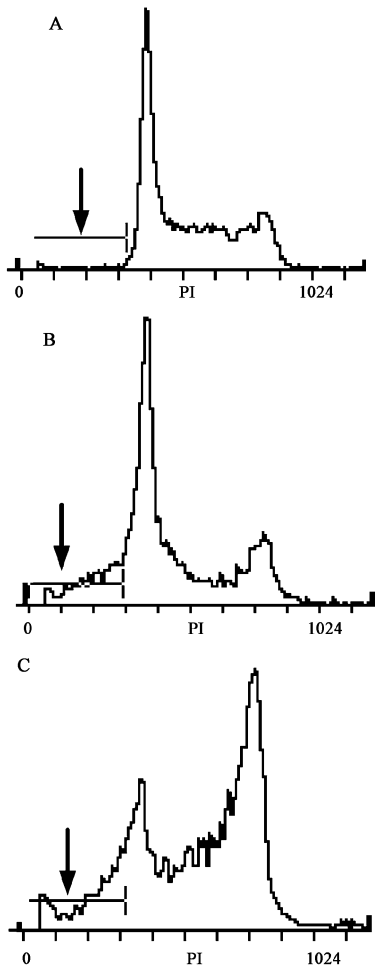
表 1 5 种黄酮类化合物对 A-549 细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	抑制率/%		
	15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
化合物 I	40.5 \pm 4.07	54.4 \pm 4.49 ¹⁾	81.5 \pm 2.84 ¹⁾
化合物 II	21.7 \pm 3.20	33.5 \pm 3.40 ¹⁾	52.0 \pm 3.06 ¹⁾
化合物 III	6.88 \pm 2.74	47.9 \pm 2.74 ¹⁾	54.1 \pm 1.82 ¹⁾
化合物 IV	20.4 \pm 2.78	39.0 \pm 2.82 ¹⁾	59.1 \pm 3.52 ¹⁾
化合物 VI	5.25 \pm 2.02	18.1 \pm 3.47 ¹⁾	37.7 \pm 3.39 ¹⁾

注:不同浓度组间比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 3 种化合物对细胞周期的影响 通过 MTT 实验后,选择了对 A-549 细胞增殖抑制效果较好的化合物 I, III 和 IV 进行进一步研究。取这 3 种黄酮化合物分别作用于 A-549 细胞 24 h 后,进行细胞周期的检测。化合物 I 作用于 A-549 细胞 24 h 后,处于 G_1 期的细胞由最初的 29.9% 分别增加至 38.8% ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 51.6% ($30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 而 S 期的细胞明显减少,由最初的 61.4% 减少至 44.5% ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 18.8% ($30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 差异有统计学意义($P < 0.01$), 这表明化合物 I 能阻滞 A-549 细胞在细胞周期中从 G_1 向 S 期的转变过程,使细胞周期停滞于 G_1 期,减少 DNA 合成和有丝分裂,抑制细胞增殖,见表 2。化合物 III 作用于 A-549 细胞 24 h 后,处于 G_2 期的细胞由初期的 8.70% 分别增加至 28.8% ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 41.5% ($30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 而 S 期细胞分别减少至 52.5% ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 27.4% ($30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 差异有统计学意义($P < 0.01$), 这表明化合物 III 作用于 A-549 细胞 24 h 后,使细胞停滞在 G_2 期,减少 DNA 合成和有丝分裂,抑制细胞增殖,见表 2。

化合物 IV 作用于 A-549 细胞 24 h 后, A-549 细胞在 G_1 峰前出现荧光强度下降的 sub- G_1 峰,说明化合物 IV 在对细胞周期产生阻滞的同时还可通过诱导细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖,当化合物浓度为 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,凋亡率为 15.6% (图 2)。



A. 对照; B. 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物 IV 处理 A-549 细胞 24 h;
C. 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物 IV 处理 A-549 细胞 24 h

图 2 化合物 IV 对细胞周期分布的影响

表 2 化合物 I, III 作用于 A-549 细胞 24 h 后
细胞周期的分布 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

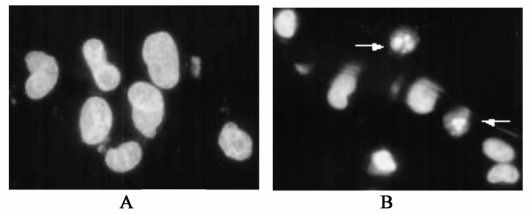
组别	浓度 $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	G ₁ 期	S 期	G ₂ 期
对照	-	29.9 ± 1.03	61.4 ± 3.35	8.7 ± 0.98
化合物 I	15	38.8 ± 1.76 ¹⁾	44.5 ± 3.14 ¹⁾	16.7 ± 1.11 ¹⁾
	30	51.6 ± 2.78 ¹⁾	18.8 ± 1.21 ¹⁾	29.6 ± 1.28 ¹⁾
化合物 III	15	19.8 ± 1.24 ¹⁾	52.5 ± 3.02 ¹⁾	28.8 ± 1.18 ¹⁾
	30	31.2 ± 1.88	27.4 ± 2.13 ¹⁾	41.4 ± 2.54 ¹⁾

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 诱导细胞凋亡 化合物 IV 作用于 A-549 细胞 24 h 后, 于荧光显微镜下观察, 可见其细胞的胞核或细胞质内出现浓缩致密的颗粒块状荧光 (图 3), 与流式细胞仪检测结果一致, 即化合物 IV 可通过诱导细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞 A-549 增殖。

4 讨论

本实验初步探讨了沙漠绢蒿黄酮对肺癌 A-549



A. 对照; B. 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物 IV 处理 A-549 细胞 24 h
图 3 化合物 IV 作用于 A-549 细胞 24 h 后荧光显微镜观察

细胞增殖的影响。MTT 法检测结果表明, 所测试的 6 种黄酮类化合物中的 5 种可抑制 A-549 细胞的增殖, 并呈一定的浓度依赖关系, 此结果与大多数植物来源的黄酮作用基本一致^[12-16]。

细胞周期 (cell cycle) 是细胞生命活动的基本过程, 通常被分为 4 个时期, 即 G₁ 期 (DNA 合成前期), S 期 (DNA 合成期), G₂ 期 (DNA 合成后期), M 期 (有丝分裂期)。增殖细胞的染色质在 S 期复制, 经过 G₂ 期后, 细胞开始有丝分裂的复杂过程, 有丝分裂后的细胞进入 G₁ 期, 再进入 S 期, 又重新启动 DNA 合成。细胞周期是一个高度有序的运转过程, 与之相关的调控分子主要有 3 类, 细胞周期蛋白 (cyclin), 细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 (cyclin dependent kinase inhibitors, CKI)。近年来研究发现细胞周期调控异常与肿瘤的发生发展密切相关, 许多化疗药物正是针对细胞周期调控中的关键分子来控制细胞的生长、分裂, 阻止癌细胞的增殖, 以达到治疗肿瘤的目的^[17]。

本实验结果表明化合物 I 可以使 G₁ 期细胞比例增加, 使细胞停滞于 G₁ 期, 化合物 III 可以使 G₂ 期细胞比例增加, 使细胞停滞于 G₂ 期, 同时两个化合物均能使 S 期细胞明显减少, 说明癌细胞的增殖活性受到抑制, 并且随着化合物浓度的增加, 效应增强; 而化合物 IV 通过细胞周期阻滞及诱导细胞凋亡抑制癌细胞的增殖活性。3 种黄酮类化合物结构不同, 其周期阻滞的分子机制可能有所不同, 因此有必要对这 3 种化合物与细胞周期调控因子 cyclins, CDKs, CKIs 的关系及其如何调控细胞周期的进程做进一步深入的研究, 以阐明药物在肿瘤细胞凋亡、增殖抑制中的作用, 探求它们用于肺癌治疗的可能性。

[参考文献]

[1] Choi Eun-Ju, Oh Hyun-Mee, Wee Hyun, et al. Eupatilin exhibits a novel anti-tumor activity through the

- induction of cell cycle arrest and differentiation of gastric carcinoma AGS cells [J]. *Differentiation*, 2009, 77(4): 412.
- [2] Cai Xueting, Ye Tingmei, Chao Liu, et al. Luteolin induced G₂ phase cell cycle arrest and apoptosis on non-small cell lung cancer cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(7): 1385.
- [3] Choi Eun Jeong, Kim Gun-Hee. Daidzein causes cell cycle arrest at the G₁ and G₂/M phases in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-453 cells [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15(9): 683.
- [4] Huang Yanhong, Yuan Peng, Zhang Qinghong, et al. Genistein sensitizes ovarian carcinoma cells to chemotherapy by switching the cell cycle progression *in vitro* [J]. *Journal of Medical Colleges of PLA*, 2009, 24(3): 125.
- [5] Sergio Gómez-Alonso, Vanessa J. Collins, David Vauzour, et al. Inhibition of colon adenocarcinoma cell proliferation by flavonols is linked to a G₂/M cell cycle block and reduction in cyclin D1 expression [J]. *Food Chemistry*, 2012, 130(3): 493.
- [6] Masahiko Imai, Hidetomo Kikuchi, Takanori Denda, et al. Cytotoxic effects of flavonoids against a human colon cancer derived cell line, COLO 201: A potential natural anti-cancer substance [J]. *Cancer Letters*, 2009, 276(1): 174.
- [7] Enos Tangke Arung, Keisuke Yoshikawa, Kuniyoshi Shimizu, et al. Isoprenoid-substituted flavonoids from wood of *Artocarpus heterophyllus* on B16 melanoma cells: Cytotoxicity and structural criteria [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(2): 120.
- [8] Samir Attoub, Ahmed H Hassan, Barbara Vanhoecke, et al. Inhibition of cell survival, invasion, tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin in human epithelioid cancer cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 651(1/3): 18.
- [9] Anne Pick, Henrik Müller, Ralf Mayer, et al. Structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP) [J]. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19(6): 2090.
- [10] Vasilis P Androutopoulos, Athanasios Papakyriakou, Dionisios Vourloumis, et al. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes [J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 126(1): 9.
- [11] Deng Yanru, Song Aixin, Wang Hanqing. Chemical components of *Speriphidium santolium* Pojak [J]. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2004, 51(3): 629.
- [12] 闫斐艳, 崔晓东, 李玉英, 等. 苦荞麦黄酮对人食管癌细胞 EC9706 增殖的影响 [J]. *中草药*, 2010, 41(7): 1142.
- [13] 张军, 李浩鹏, 杨平林, 等. 骨碎补总黄酮含药血清对成骨细胞增殖、分化、周期及凋亡的影响 [J]. *中药材*, 2009, 32(7): 1090.
- [14] 孙健, 张扬, 温庆辉, 等. 汉黄芩素对人肺腺癌 SPC-A-1 细胞增殖和周期的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(18): 169.
- [15] 林燕, 李萍, 王燕, 等. 鸡血藤黄酮类有效部位对人肺腺癌 A549 细胞氧化应激的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(4): 190.
- [16] 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.
- [17] 李志琴, 章静波. 细胞周期调控与肿瘤(2) [J]. *癌症进展杂志*, 2004, 2(2): 146.

[责任编辑 聂淑琴]