

2 种苯并呋喃衍生物对肝癌细胞的毒性及活性氧机制

赵晶¹, 蒲丽平¹, 杨精涛¹, 刘权², 高清祥¹, 王勤¹, 王春明^{1*}

(1. 兰州大学生命科学学院生物物理研究所, 兰州 730000;

2. 兰州大学功能有机分子化学国家重点实验室, 兰州 730000)

[摘要] 目的: 比较离舌囊吾 *Ligularia veitchiana* (Hemsl.) Greenm 的 2 种苯并呋喃衍生物 5, 6-二甲氧基-2-异丙基-苯并呋喃 (5, 6-dimethoxy-2-isopropenyl-benzofuran, 化合物 1), 5-乙酰基-6-甲氧基-2-异丙基-苯并呋喃 (5-acetyl-6-methoxy-2-isopropenyl-benzofuran, 化合物 2) 对人肝癌细胞 HepG2 和正常肝细胞 L02 的毒性, 并分析其可能机制。方法: 用台盼蓝排染法检测化合物细胞毒性、用 DCFH-DA 荧光分光光度计法检测细胞活性氧含量、用钼酸铵比色法检测过氧化氢酶活性。结果: 化合物 1 和 2 对 L02 的 IC₅₀ 分别为 (171.2 ± 3.3) mg·L⁻¹ 和 (79.0 ± 4.1) mg·L⁻¹, 高于对 HepG2 的 IC₅₀ (84.2 ± 6.5) mg·L⁻¹ 和 (65.2 ± 1.9) mg·L⁻¹, 表明肿瘤细胞比正常细胞对化合物更加敏感。用化合物 1 和 2 IC₅₀ 处理细胞 48 h, 测得 HepG2 细胞活性氧分别是对照组的 1.6 倍和 3.2 倍; L02 细胞活性氧分别是对照组的 1.2 倍和 1.8 倍。化合物 1 和 2 处理后, HepG2 细胞过氧化氢酶活力分别从对照组的 (17.2 ± 1.7) U·mg⁻¹ 下降到 (12.8 ± 0.4) 和 (6.4 ± 0.1) U·mg⁻¹; L02 细胞过氧化氢酶活力分别从对照组的 (17.7 ± 1.2) U·mg⁻¹ 下降到 (14.3 ± 1.5) 和 (8.6 ± 0.5) U·mg⁻¹; HepG2 过氧化氢酶活力降低幅度大于 L02。结论: 2 个化合物对 HepG2 的毒性和活性氧的增幅均大于 L02, 同时 HepG2 过氧化氢酶活力降幅也大于 L02。据此推测 2 个化合物细胞毒性与活性氧有关。

[关键词] 离舌囊吾; 苯并呋喃; 细胞毒; 活性氧

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0105-04

Cytotoxicity and Reactive Oxygen Species Related Mechanism on HepG2 Cells of Two Benzofuran Derivatives

ZHAO Jing¹, PU Li-ping¹, YANG Jing-tao¹, LIU Quan², GAO Qing-xiang¹, WANG Qin¹, WANG Chun-ming^{1*}

(1. School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

2. State Key Laboratory of Applied Organic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** This study was to evaluate the effect of two benzofuran derivatives on human liver hepatocellular carcinoma cells HepG2 and human hepatic L02 cells *in vitro*. **Method:** 5, 6-dimethoxy-2-isopropenyl-benzofuran (compound 1) and 5-acetyl-6-methoxy-2-isopropenyl-benzofuran (compound 2) were isolated from *Ligularia veitchiana* (Hemsl.) Greenm. Trypan blue exclusion staining, 2, 7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescence spectrophotometry, and ammonium molybdate colorimetric assay were used to evaluate cytotoxicity, reactive oxygen species (ROS) generation, and catalase activity respectively. **Result:** The results showed that IC₅₀ of compound 1 and 2 on L02 cells are (171.2 ± 3.3) mg·L⁻¹ and (79.0 ± 4.1) mg·L⁻¹, higher than that on HepG2, (84.2 ± 6.5) mg·L⁻¹ and (65.2 ± 1.9) mg·L⁻¹, exhibited more potent cytotoxic effect on tumor cells. After treated with the half inhibitory concentration (IC₅₀) of compound 1 and 2 for 48 hours, ROS generated in HepG2 cells were 1.6 and 3.2 folds to the control group, and 1.2 and 1.8 folds in L02 cells respectively. Higher

[收稿日期] 20100330(005)

[基金项目] 省部共建新疆特种植物药资源教育部重点实验室开放课题 (ZWY200806)

[第一作者] 赵晶, 生物物理专业硕士研究生, 研究方向为自由基生物学, Tel: 13893329154, E-mail: jingzhao07@lzu.cn

[通讯作者] * 王春明, 理学博士, 副教授, 研究方向为自由基生物学, Tel: 0931-8912563, E-mail: cmwang@lzu.edu.cn

ROS generations in HepG2 cells than L02 were found. The catalase activity decreased from the control group (17.2 ± 1.7) $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ to (12.8 ± 0.4) and (6.4 ± 0.1) $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ after treated with compound 1 and 2 in HepG2 cell respectively, and decreased from the control group (17.7 ± 1.2) $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ to (14.3 ± 1.5) and (8.6 ± 0.5) $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ in L02 cells. Higher catalase activity reduced in HepG2 cells than L02. **Conclusion:** According to the more potent cytotoxicity, the ROS generation increasing in HepG2 than L02, and the decreasing of catalase activity in HepG2 cells, we suppose that the mechanism of the cytotoxicity for these two benzofuran derivatives may relate to ROS theory.

[Key words] *Ligularia veitchiana* (Hemsl.) Greenm; benzofuran; cytotoxicity; reactive oxygen species

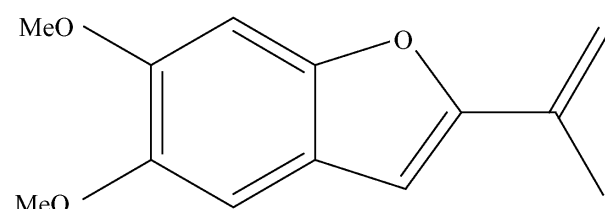
离舌橐吾 *Ligularia veitchiana* (Hemsl.) Greenm 为菊科橐吾属植物, 分布于甘肃、湖北、贵州、云南、陕西等地, 生长在海拔 1 400 ~3 300 m 的地区, 常生于山坡、河边以及林下。根及根茎作为山紫菀入药^[1], 具散寒祛风、润肺下气, 化痰止咳、理气顺中、抗菌消炎、清热解毒、活血止痛等功效。民间常用于治疗痈肿、疔疮、风湿感冒、肺结核咯血、小便不利、咽喉炎及跌打损伤等症^[2]。从中分离纯化到 5, 6-二甲氧基-2-异丙基-苯并呋喃 和 5-乙酰基-6-甲氧基-2-异丙基-苯并呋喃 2 种化合物。该文用台盼蓝排染法、DCFH-DA (2, 7-dichlorofluorescein diacetate) 染色法、钼酸铵比色法研究了 2 种化合物的细胞毒性, 并初步分析了相关作用机制。

1 材料与方

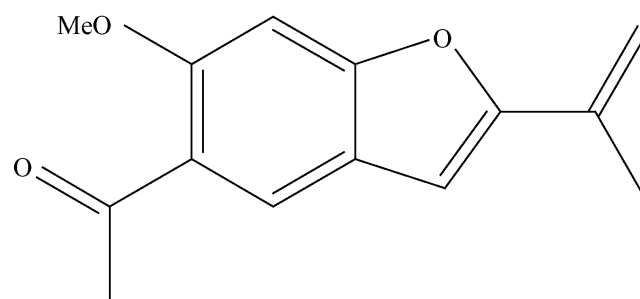
1.1 材料 5, 6-二甲氧基-2-异丙基-苯并呋喃 (5, 6-dimethoxy-2-isopropenyl-benzofuran, 化合物 1), 5-乙酰基-6-甲氧基-2-异丙基-苯并呋喃 (5-acetyl-6-methoxy-2-isopropenyl-benzofuran, 化合物 2) 分离自菊科橐吾属植物离舌橐吾 *L. veitchiana* 全草, 由兰州大学功能有机分子化学国家重点实验室刘权分离鉴定。结构式见图 1。人肝癌细胞株 HepG2 和正常肝细胞株 L02 为兰州大学生命科学学院生物物理研究所保存。RPMI 1640 培养基为 GIBCO 公司产品, 批号 728712; 超级新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, 批号 080524; DCFH-DA 购自 Sigma 公司, 批号 119K4022; 胰蛋白酶, 二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 均购自 Sigma 公司。

1.2 细胞培养 将对数生长期的 HepG2 和 L02 分别接种于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 37°C , 5% CO_2 饱和湿度下培养^[3]。

1.3 供试药物配制方法 首先用 DMSO 溶解化合物 1 和 2, 配制成 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液, 加药处理前再用添加了 10% 小牛血清的 RPMI-1640 完全培养基稀



化合物1: 5, 6-二甲氧基-2-异丙基-苯并呋喃



化合物2: 5-乙酰基-6-甲氧基-2-异丙基-苯并呋喃

图 1 从离舌橐吾中分离纯化的 2 种天然产物结构式

释到相应浓度, pH 7.4。

1.4 台盼蓝排染法检测细胞增殖率^[4] 以不加药组细胞为阴性对照, 待细胞生长至对数生长期时, 取 2.5×10^5 个细胞均匀铺于 25 mL 细胞培养瓶内, 每瓶含 5 mL 培养基, 37°C , 5% CO_2 培养, 24 h 后, 弃去旧培养液, 用不同浓度梯度的化合物 1 和 2 继续处理细胞 48 h, 镜检记录细胞状态。胰酶消化, 取 45 μL 细胞液加入 5 μL 0.4% 的台盼蓝, 染色 3 min。显微镜下观察, 死细胞染成蓝色, 活细胞不着色, 计数染色细胞和总细胞的数目, 计算各个浓度梯度细胞的存活率, 求出半数抑制浓度 (IC_{50})。

1.5 DCFH-DA 染色法检测细胞活性氧生成^[5] 以不加药组细胞为对照组, 化合物 1 和 2 处理细胞为处理组。药物处理 48 h 后, 在 5 mL 细胞液中加入 25 μL 配制好的 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DCFH-DA 在细胞培养箱中处理 30 min。胰酶消化, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min 离心, 弃上清, 加入 3 mL PBS, 低温超声破碎 10 次, 每次 10 s; $10\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min 离心取上清, 荧光分光光度法检测上清液吸光度 (发射光 530 nm, 激发光 420 nm), 吸光度与细胞数目的比值即为

DCF 荧光强度。

1.6 过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 活力测定 以不加药组细胞为对照组, 化合物 1 和 2 处理细胞为处理组。药物处理 48 h 后, 用 pH 7.4 PBS 洗 3 次, 胰酶消化, 细胞重悬于 2 mL PBS 中, 超声破碎, $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 10 min, 上清即为样品。根据钼酸铵比色法, 配制 $67\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液, $65\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, H_2O_2 基质液, 4% 的钼酸铵溶液, 以蒸馏水调零, 用 721 分光光度计在 405 nm 处测定吸光度 (A)。CAT 活力单位定义为: 每 1 min 分解 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的过氧化氢即为 1 个酶活力单位 (U)。依公式计算出 CAT 的活力^[6]。

$$\text{过氧化氢酶活力}(\text{U}\cdot\text{L}^{-1}) = [(A_{\text{对}} - A_{\text{测}}) / A_{\text{标}}] \times 325$$

用 Bradford 法^[7] 测蛋白浓度, 根据所测蛋白浓度把过氧化氢酶单位 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ 换算成每 1 mg 蛋白中含有的酶单位 ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)。

1.7 结果统计 所有实验结果均来自至少 3 次独立的实验, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 显著性分析用 *t* 检验法。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞毒作用 通过台盼蓝排染法检测 2 种苯并呋 衍生物的细胞毒性, 求出对细胞增殖的 IC_{50} , 结果见表 1。

表 1 2 种化合物对 HepG2 细胞和 L02 细胞作用 48 h 的 IC_{50} ($\bar{x} \pm s, n=3$)

化合物	$\text{IC}_{50} / \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	
	L02	Hep G2
1	171.2 ± 3.3	84.2 ± 6.5
2	79.0 ± 4.1	65.2 ± 1.9

分别用 25, 50, 100, 150, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的供试药物处理 HepG2 和 L02 细胞 48 h, 得增殖曲线, 见图 2。其中 HepG2 细胞在化合物 2 的 150, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度处理下全部为死细胞, 该结果未在图中标出。

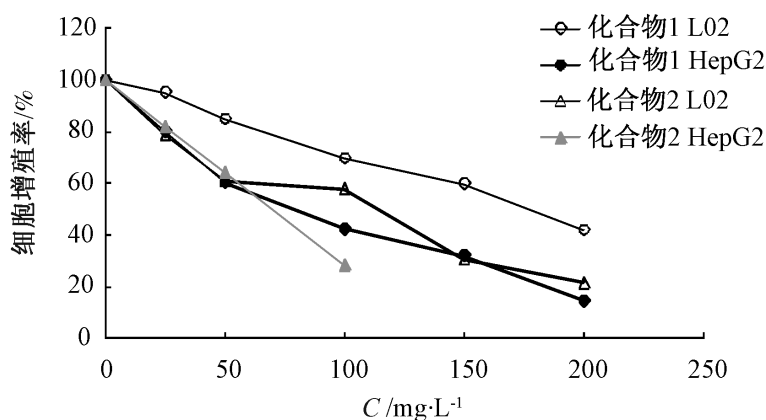


图 2 2 种化合物对 HepG2 和 L02 细胞增殖抑制曲线

2.2 化合物 1 和 2 促进细胞活性氧生成并使细胞过氧化氢酶活力下降 用化合物 1 和 2 IC_{50} 处理 48 h, 测得 HepG2 细胞活性氧分别是对照组的 1.6 倍和 3.2 倍; L02 细胞活性氧分别是对照组的 1.2 倍和 1.8 倍, HepG2 活性氧水平均较 L02 细胞为高, 且 2 种化合物对 HepG2 细胞过氧化氢酶活力的影响较 L02 更大, 结果见表 2。

表 2 2 种化合物对 HepG2 和 L02 细胞活性氧生成和过氧化氢酶活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	活性氧水平		过氧化氢酶 / $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	
	L02	Hep G2	L02	Hep G2
对照	14.2 ± 0.1	12.8 ± 0.1	17.7 ± 1.2	17.2 ± 1.7
化合物 1	$17.5 \pm 0.3^{1)}$	$20.9 \pm 0.2^{1)}$	$14.3 \pm 1.5^{1)}$	$12.8 \pm 0.4^{1)}$
化合物 2	$25.5 \pm 0.1^{1)}$	$41.5 \pm 0.4^{1)}$	$8.6 \pm 0.5^{1)}$	$6.4 \pm 0.1^{1)}$

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

3.1 对肝癌细胞的选择性毒性 2 种化合物对肝癌细胞 HepG2 的 IC_{50} 在 50 ~ 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 说明二者对肿瘤细胞具有一定的细胞毒性。而且对 HepG2 的 IC_{50} 均小于正常细胞 L02, 尤其是化合物 1 对 L02 细胞的 IC_{50} 达到 171.19 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 说明对肿瘤细胞毒性更强。

从图 2 可以看出化合物 1 和 2 对 HepG2 的作用强于 L02, 化合物浓度和细胞增殖率呈线性关系。化合物 2 对 HepG2 的作用最强, 在 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 细胞增殖率为 28.3%, 而化合物 1 对 L02 的作用最弱。

3.2 2 种化合物的细胞毒作用与活性氧有关

DCFH-DA 是一种非极性荧光染料, 可自由通过细胞膜, 在细胞内非特异性内酯酶作用下形成 DCFH。DCFH 本身不发荧光, 不能透过细胞膜, 从而被限制在细胞内, 继而被活性氧氧化成能发出强烈荧光的 DCF, 可用于检测细胞内活性氧的生成和氧化胁迫状态^[8]。氧化胁迫状态是肿瘤细胞的普遍特征, 通过诱导活性氧的生成还可以达到杀死肿瘤细胞的效果, 这一策略已被运用到肿瘤治疗的研究中^[9]。过氧化氢酶是细胞内重要的抗氧化酶, 能有效地清除 H_2O_2 , 减少 H_2O_2 与细胞有氧代谢产生的超氧阴离子自由基进一步生成毒性更强的羟自由基, 从而防止细胞损伤的加剧^[10]。

2 种化合物均促使细胞产生活性氧, 而且化合物 2 的作用强于化合物 1, 对肝癌细胞 HepG2 的作用强于正常肝细胞系 L02。二化合物使细胞中过氧

化氢酶活性降低,且化合物 2 的作用强于化合物 1,对肝癌细胞 HepG2 的作用强于正常肝细胞系 L02。这些结果与细胞毒结果相呼应。由于活性氧的产生,本身就具有细胞毒作用,因此我们推测受试化合物的细胞毒作用可能与其诱导活性氧升高并使过氧化氢酶活性降低有关。通过诱导氧胁迫来治疗肿瘤已有许多探索,许多临床上广泛应用抗肿瘤药物如长春新碱,顺铂,丝裂霉素 C,阿霉素,喜树碱都是通过依赖活性氧激活细胞凋亡,这表明活性氧策略已经作为一种抗肿瘤机制得到学术界的普遍认可^[11]。二化合物的生物活性在促进活性氧升高的同时还抑制了 CAT 的活性,使细胞处于氧化胁迫状态,这些都与自由基机制相关。

3.3 2 种化合物的构效关系 如图 1 所示,化合物 1 和 2 的结构相似,都为苯并呋 类化合物,其唯一区别就是 5 位碳上的取代基不同,化合物 1 的 5 位是甲氧基,而化合物 2 的 5 位是乙酰基。乙酰基为吸电子基团并且与苯环共轭从而使得苯环上的电子云密度降低,而甲氧基为供电子基团从而使苯环上的电子云密度升高。因次,从构效关系可初步推测,苯并呋 类化合物苯环上连有吸电子基团有利于提高其细胞毒性。

总之,离舌囊吾这 2 种苯并呋 对肿瘤细胞具有选择性毒性,本结果有助于新抗癌药的研发。

[参考文献]

[1] 王彩芳,潘成学,程茜.离舌囊吾叶化学成分分析

[J]. 郑州大学学报:自然科学版,2007,42(6):1173.

- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 北京:人民卫生出版社,1977:154,549,1152,2349.
- [3] 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997:2842.
- [4] 宁安红,黄敏,曹婧. 用台盼蓝染色法对 C9623 菌丝发酵液体外抗肿瘤作用的探索[J]. 中国微生物学杂志,2002,14(2):73.
- [5] Armstrong J S, Whiteman M. Measurement of reactive oxygen species in cells and mitochondria[J]. Methods Cell Biol,2007,80:355.
- [6] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,541.
- [7] Barbosa H, Slater N K, Marcos J C. Protein quantification in the presence of poly(ethylene glycol) and dextran using the Bradford method[J]. Anal Biochem,2009,395(1):108.
- [8] Soh N. Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species[J]. Anal Bioanal Chem,2006,386(3):532.
- [9] Fang J, Seki T, Maeda H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation[J]. Adv Drug Deliv Rev,2009,61(4):290.
- [10] Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress[J]. Curr Opin Cell Biol,2003,15(2):247.
- [11] Fang J, Nakamura H, Iyer A K. Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy[J]. J Drug Target,2007,15(7/8):475.

[责任编辑 聂淑琴]