

# 铁皮石斛共性黄酮类成分新西兰牡荆苷 II 的体外抗氧化与诱导 HepG2 细胞凋亡的作用

罗颖懿<sup>1</sup>, 李运容<sup>2</sup>, 雷胃熙<sup>1</sup>, 袁媛<sup>3\*</sup>, 黄月纯<sup>4</sup>, 魏刚<sup>1\*</sup>

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 广西国际壮医医院, 南宁 530021;  
3. 中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700;  
4. 广州中医药大学 第一临床医学院, 广州 510405)

**[摘要]** 目的:对不同道地种源铁皮石斛的共性黄酮类成分新西兰牡荆苷 II (芹菜素-6,8-二-C-葡萄糖苷, vicenin II) 进行体外抗氧化及诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡的活性研究。方法:采用 2,2-联苯基-1-苦基肼法 (DPPH), 2-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸法 (ABTS) 和铜离子还原法对 vicenin II (0.005 ~ 1 g·L<sup>-1</sup>) 进行体外的抗氧化活性研究;采用噻唑蓝 (MTT) 比色法检测 vicenin II (12.5 ~ 100 μmol·L<sup>-1</sup>) 对人 6 种不同的肿瘤细胞体外的增殖抑制作用;后续凋亡实验 vicenin II 浓度为 75 μmol·L<sup>-1</sup>, 采用 Hoechst33258 染色, 荧光显微镜进行 HepG2 细胞形态学观察;应用流式细胞术, 磷脂结合蛋白 V/碘化丙啶 (AnnexinV-FITC/PI) 检测 HepG2 细胞凋亡率;采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (Real-time PCR) 检测丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路及相关凋亡基因的 mRNA 表达。结果: Vicenin II 质量浓度为 1 g·L<sup>-1</sup> 时, 对 DPPH 的清除率和 Cu<sup>2+</sup> 还原率为 48.82% 和 22.01% (P < 0.01); 当 vicenin II 质量浓度为 0.5 g·L<sup>-1</sup> 时, 对 ABTS 清除率为 86.88% (P < 0.01); vicenin II 显著抑制 HepG2 细胞增殖并诱导凋亡, 75 μmol·L<sup>-1</sup> 的 vicenin II 作用 48 h 后, 细胞存活率为 45.69% (P < 0.01), 细胞凋亡率为 14.57% (P < 0.01), 升高 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bax)/Bcl-2, 半胱氨酸蛋白酶 (Caspase)-8, p38, 细胞外信号调节激 (ERK), c-Jun 氨基末端酶 (JNK), 核转录因子-κB (NF-κB) mRNA 表达 (P < 0.01)。结论:铁皮石斛不同道地种源的共性黄酮类成分新西兰牡荆苷 II 在体外具有一定的抗氧化作用, 能有效抑制 HepG2 细胞增殖, 并可能通过调控 MAPK 通路及 Bax/Bcl-2 途径诱导 HepG2 细胞凋亡。

**[关键词]** 铁皮石斛; 黄酮苷; 新西兰牡荆苷 II; 抗氧化; HepG2 细胞; 凋亡

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5; R273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)01-0043-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20182210

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20180827.1802.020.html>

**[网络出版时间]** 2018-08-28 16:12

## Antioxidation Activities *in Vitro* of Vicenin II Isolated from *Dendrobii Officinalis Caulis* and Effect on HepG2 Cells

LUO Ying-yi<sup>1</sup>, LI Yun-rong<sup>2</sup>, LEI Zhou-xi<sup>1</sup>, YUAN Yuan<sup>3\*</sup>, HUANG Yue-chun<sup>4</sup>, WEI Gang<sup>1\*</sup>

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Guangxi International Zhuang Medical Hospital, Nanning 530021, China;

3. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

4. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**[收稿日期]** 20180509(009)

**[基金项目]** 中央本级重大增减支项目(2060302)

**[第一作者]** 罗颖懿, 在读硕士, 从事中药创新药物研究与指纹图谱分析, E-mail: 297036535@qq.com

**[通信作者]** \*袁媛, 研究员, 从事中药鉴定与分子药理学研究, Tel: 010-64087649, E-mail: y\_yuan0732@163.com;

\*魏刚, 研究员, 博士生导师, 从事中药创新药物研究与指纹图谱分析, 石斛类药材规范化研究, Tel: 020-39358519, E-mail: weigang021@163.com

**[Abstract]** **Objective:** To study the antioxidation activities *in vitro* of a common flavonoid component named vicenin II (Apigenin 6, 8-di-C-glucoside) in *Dendrobii Officinalis Caulis* from different origin places and investigate its effects on apoptosis of HepG2 cells. **Method:** The antioxidation activities *in vitro* of vicenin II ( $0.005-1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) were evaluated by 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), salicylic acid and 2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and copper ion reduction assays. Methylthiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to test the inhibitory effect of vicenin II ( $12.5 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) on proliferation of 6 tumour cells *in vitro*. In subsequent apoptosis experiment, the concentration of vicenin II was  $75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . The morphological changes of HepG2 cells were evaluated by Hoechst 33258 under fluorescence microscope; and the cell apoptosis rate was detected by flow cytometry with AnnexinV/PI apoptosis assay kit. The mRNA expressions of mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway related apoptotic genes were detected by Real-time PCR assay. **Result:** The  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  vicenin II showed 48.82% and 22.01% for DPPH scavenging rate and  $\text{Cu}^{2+}$  reduction rate respectively ( $P < 0.01$ ).  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  vicenin II showed 86.88% for ABTS scavenging rate ( $P < 0.01$ ). vicenin II could significantly inhibit the proliferation and increase the apoptosis rate on HepG2 cells; after treatment for 48 h with  $75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Vicenin II, the cells survival rate was 45.69% ( $P < 0.01$ ) and apoptotic rate was 14.57% ( $P < 0.01$ ). Meanwhile, the mRNA expression levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) related X protein (Bax) /Bcl-2, Caspase-8, p38, extracellular signal-regulated kinases (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), and nuclear transcription factor (NF)  $-\kappa\text{B}$  were increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The general flavone glycosides component vicenin II of *Dendrobii Officinalis Caulis* from different origins has a certain antioxidation effect and significant inhibitory effect on proliferation, and could induce apoptosis on HepG2 cells probably by regulating the expression of related genes in MAPK pathway and Bax/Bcl-2.

**[Key words]** *Dendrobii Officinalis Caulis*; flavonoid glycoside; vicenin II; antioxidant; HepG2 cell; apoptosis

铁皮石斛为兰科植物铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 的干燥茎,味甘,微寒,归胃、肾经,具有益胃生津、滋阴清热的功效<sup>[1]</sup>。铁皮石斛在我国分布较广,南方大部分地区都有人工种植<sup>[2]</sup>。近年的研究发现铁皮石斛具有含量较为丰富的以芹菜素作为苷元的多种黄酮碳苷类成分<sup>[3]</sup>,课题组前期通过比较几个主要道地种源的铁皮石斛叶黄酮类成分 HPLC 特征图谱,发现这几个主要种源的铁皮石斛含有一种含量较高且分离度较好的黄酮类成分<sup>[4]</sup>,并鉴定为新西兰牡荆苷 II。目前国内对铁皮石斛有效成分的药理研究主要是针对多糖,而黄酮类成分的报道尚少,现代药理研究表明黄酮碳苷类化合物具有抗氧化、抗肿瘤、保肝、保护心血管系统、调节免疫等多种药理活性<sup>[5-7]</sup>。

新西兰牡荆苷 II 是存在于多种植物中的以芹菜素为母核的黄酮碳苷,首次报道为不同道地种源铁皮石斛的共性特征成分,结构式为芹菜素-6,8-二-C-葡萄糖苷。国内对其药理活性的研究报道非常少,国外则比较关注,已报道其具有多种药理活性。包括对多种炎症细胞和动物模型发挥有效的抗炎作用,特别是对血管性炎症有很好的治疗效果<sup>[8-11]</sup>;

抗血栓和抗血小板活性<sup>[12]</sup>;治疗糖尿病<sup>[13]</sup>;解痉作用<sup>[14]</sup>以及联合多烯紫杉醇发挥抗前列腺癌的作用<sup>[15]</sup>。而新西兰牡荆苷 II 抗氧化及诱导肿瘤细胞凋亡的报道相对缺乏,因此本研究从抗氧化及诱导肿瘤细胞凋亡活性角度进行新西兰牡荆苷 II 的药理活性研究。

目前抗癌重要的途径之一是诱导癌细胞凋亡,利用药物使癌细胞自身或其生存环境得以改变,以致于诱导癌细胞在一定的生理或病理条件下发生程序性死亡,进而控制癌细胞的扩散速度,达到逐渐消除肿瘤的目的<sup>[16]</sup>。本研究前期筛选发现新西兰牡荆苷 II 对于人肝癌细胞 HepG2 具有较强增殖抑制作用,故选取 HepG2 细胞为研究对象,运用细胞凋亡形态学、分子生物学等相关方法,通过丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路及 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bax) /Bcl-2 途径探讨新西兰牡荆苷 II 诱导 HepG2 细胞凋亡作用的机制。再加上体外抗氧化活性的探讨,本研究对铁皮石斛的质量评价及新西兰牡荆苷 II 的药理活性提供重要的补充依据。

## 1 材料

**1.1 细胞** 人肝癌 HepG2 细胞购自广州凯基生物

科技有限公司,编号 20140625;人胃癌 SGC7901 细胞购自 BNCC 公司,编号 100674;人黑色素瘤 B16 细胞、人非小细胞肺癌 H1299 细胞、人肺癌 A549 细胞、人结肠癌 HT-29 细胞受赠于广州中医药大学药理实验室。

**1.2 药物** 新西兰牡荆苷 II 为广州中医药大学中药学院魏刚课题组分离得到,纯度 >98%。经 70% 乙醇提取铁皮石斛叶总黄酮,采取有机溶剂萃取法将铁皮石斛叶粗提物分成极性不同的萃取部位(石油醚、乙酸乙酯、水饱和正丁醇),运用大孔吸附树脂 AB-8 及葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20,ODS 柱层析对正丁醇部位进行分离纯化,通过化合物的理化性质结合现代波谱学方法(ESI-MS,<sup>1</sup>H-NMR,<sup>13</sup>C-NMR)进行鉴定。新西兰牡荆苷 II 用已过滤除菌的二甲基亚砜(DMSO)溶解,-20℃保存备用,临用前用 H-DMEM 基础培养基稀释使用,使 DMSO 终体积分数低于 0.5%。

**1.3 仪器** FORMA371 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱, Multiskan Go 自动型酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司);MIT-2 型倒置相差显微镜,BX53 型荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);FACSCanto II 型流式细胞仪(美国 BD 公司);CFX96 型荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

**1.4 试剂** 2,2-联苯基-1-苦基肼自由基(DPPH),2,2-联氮-双 3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸二胺盐(ABTS)(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号分别为 27M4209V,13M5426V);2,6-二叔丁基对甲酚(BHT,阿拉丁试剂有限公司,批号 20140816);胎牛血清(FBS,德国 PAN biotech 公司,批号 P160704);噻唑蓝(MTT),五氟尿嘧啶(5-FU)(美国 Sigma 公司,批号分别为 M-0215,20170308);DMEM 培养基,胰酶,青链霉素混合液(美国 Gibco 公司,批号分别为 20160712,20170303,20160712);DMEM 高糖培养基(江苏南京凯基生物科技有限公司,批号 20170603);DMSO(广州浩玛生物科技有限公司,批号 20170907);AnnexinV-FITC/碘化丙啶(PI)凋亡检测试剂盒,Hoechst33258 染色试剂盒(江苏南京凯基生物科技有限公司,批号分别为 20170624,20170712);逆转录试剂盒 5 × All-In-One RT MasterMix,qPCR 试剂盒(加拿大 ABM 公司,批号分别为 65170002,65170003)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 人肝癌 HepG2 细胞、人胃癌 SGC7901 细胞、人黑色素瘤 B16 细胞、人非小细胞

肺癌 H1299 细胞、人肺腺癌 A549 细胞、人结肠癌 HT-29 细胞用含 10% 胎牛血清,1% 青-链霉素的 DMEM 高糖培养基置于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 2.2 抗氧化活性检测

**2.2.1 对 DPPH 自由基的清除作用** 配置浓度为 0.5 mmol·L<sup>-1</sup>的 DPPH 工作液。精密称取样品新西兰牡荆苷 II 适量,加 95% 乙醇溶解并等比稀释成 1,0.8,0.5,0.2,0.1,0.05,0.01,0.005 g·L<sup>-1</sup>供试品溶液,阳性药 BHT 重复此操作。精密量取供试品溶液和 DPPH 合格液各 100 μL 于 96 孔板中,每个浓度各取 3 个复孔,BHT 同法操作,空白对照加 95% 乙醇。在暗处反应 30 min 后于酶标仪中选取 517 nm 波长测定吸光度 A。按以下公式对 DPPH 自由基的清除率,清除率 = (A<sub>0</sub> - A<sub>样</sub>)/A<sub>0</sub> × 100%。A<sub>0</sub> 为空白溶液 A,A<sub>样</sub> 为样品溶液 A。

**2.2.2 对 ABTS 自由基的清除作用** 配置浓度为 7.4 mmol·L<sup>-1</sup>的 ABTS 和 2.6 mmol·L<sup>-1</sup>的 K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>。精密吸取 ABTS 200 μL,K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 200 μL,混匀,置于暗处室温条件下静置 12 h 得 ABTS 工作液。精密称取样品新西兰牡荆苷 II 适量,供试品溶液制备同 2.2.1 项,BHT 重复此操作。精密吸取 ABTS 工作液 800 μL,供试品溶液 200 μL,充分混匀,静止放置 6 min,于紫外可见分光光度计中在 734 nm 波长下检测 A,BHT 组同法操作,空白加 95% 乙醇。按 2.2.1 项下公式计算清除率。

**2.2.3 对铜离子还原能力** 配置 0.01 mol·L<sup>-1</sup>的 CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 溶液,7.5 mmol·L<sup>-1</sup>新铜试剂,pH 7.5 的 0.1 mol·L<sup>-1</sup>乙酸铵缓冲液。精密称取样品新西兰牡荆苷 II 适量,供试品溶液制备同 2.2.1 项,BHT 重复此操作。精密吸取 CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 溶液 25 μL,新铜试剂 25 μL,样品液 25 μL,乙酸铵缓冲液 125 μL 于 96 孔板中,每个浓度 3 个复孔,振摇使混匀,静止放置反应约 30 min。于酶标仪中选取 450 nm 波长测定 A。BHT 同法操作,空白组加 95% 乙醇。相对铜还原能力按公式计算。铜离子还原能力率 = (A<sub>样</sub> - A<sub>0</sub>)/(A<sub>max</sub> - A<sub>0</sub>) × 100%,A<sub>max</sub> 为 1 次测定内每个待测液所取的相对应平均值的最大值。

### 2.3 体外抗肿瘤活性检测

**2.3.1 MTT 比色法检测新西兰牡荆苷 II 对不同肿瘤细胞生长的影响** MTT 比色法筛选新西兰牡荆苷 II 对不同肿瘤细胞的增殖影响,包括人肝癌 HepG2 细胞、人非小细胞肺癌 H1299 细胞、人肺癌 A549 细胞、人胃癌 SGC7901 细胞、人结肠癌 HT-29 细胞、人黑色素瘤 B16 细胞。

收集对数生长期的细胞,用 H-DMEM 培养基将细胞悬浮液稀释成  $5 \times 10^4$  个/mL,将细胞接种于 96 孔培养板中,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  细胞悬浮液,然后置细胞培养箱中继续培养。24 h 后小心吸去每孔的培养基,分别加高糖 DMEM 培养基(不含血清)稀释的不同浓度的新西兰牡荆苷 II (6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),每孔精密加入 100  $\mu\text{L}$ ,每个浓度设置 5 个复孔,另设置空白组每孔加高糖 DMEM 培养基(不含血清),肝癌 HepG2 细胞设 5-FU 组,浓度为 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将 96 孔板置 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱分别培养 24, 48 h 后,每孔加入 5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 溶液 20  $\mu\text{L}$ ,将 96 孔板放置培养箱中继续培养 4 h,然后小心的吸去孔内悬浮液,每孔加入 DMSO 100  $\mu\text{L}$ ,将 96 孔板轻微震荡 10 min,待结晶紫完全溶解后,于酶标仪在 490 nm 波长下检测各孔 A。根据以下公式计算细胞的存活率。细胞存活率 =  $A_{\text{样}}/A_0 \times 100\%$ ,  $A_0$  为空白溶液 A,  $A_{\text{样}}$  为样品溶液 A。

**2.3.2** Hoechst33258 染色观察 HepG2 细胞凋亡形态学改变 取对数生长期的 HepG2 细胞,以  $5 \times 10^4$  个/mL 接种于 6 孔培养板中,培养 24 h,加入 75  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  新西兰牡荆苷 II 孵育 48 h,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,加入 4% 多聚甲醛 4  $^{\circ}\text{C}$  固定细胞 30 min, PBS 洗 3 次,每孔加入 Hoechst 33258 染色液 300  $\mu\text{L}$ ,室温避光染色 15 min,荧光显微镜拍照记录。同时设空白组(不含血清的培养基)和 5-FU 组(50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

**2.3.3** Annexin V/PI 双染检测 HepG2 细胞的凋亡率 取对数生长期的 HepG2 细胞,以  $5 \times 10^4$  个/mL 接种于 6 孔培养板中,培养 24 h,加入 75  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  新西兰牡荆苷 II 孵育 48 h,收集细胞培养液, PBS 清洗 1 次,用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化,收集细胞,重悬,各管再分别加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 5  $\mu\text{L}$ ,混匀,室温避光反应 20 min,另设空白组与 5-FU 组(50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),于流式细胞仪进行细胞凋亡率检测。

**2.3.4** 实时荧光定量 PCR 测定相关 mRNA 表达 取对数生长期 HepG2 细胞,以  $7.5 \times 10^4$  个/mL 接种于 6 孔培养板中,培养 24 h 后,加入 75  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  新西兰牡荆苷 II 孵育 48 h,设 3 个正常孔,提取 mRNA。测定其浓度及纯度,按反转录试剂盒操作说明进行 cDNA 合成。按 PCR 试剂盒说明配置反应体系,进行 PCR 反应,反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸

30 s,返回变性 30 s,进行 40 个循环,最终 72  $^{\circ}\text{C}$  溶解曲线分析 5 min。以  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)为内参,按照相对表达量公式计算不同 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1,引物由日本宝生物(大连)公司设计及合成。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度 /bp
核转录因子(NF)- $\kappa\text{B}$	上游 TTCAACCACAGATGGCACT	20
	下游 AACCTTTGCTGGTCCCACAT	20
$\beta$ -actin	上游 ATTAAGGAGAAGCTGTGCTACGTC	24
	下游 ATGATGGAGTTGAAGGTAGTTCCG	24
Bcl-2	上游 AACATCGCCCTGTGGATGAC	20
	下游 AGAGTCTTCAGAGACAGCCAGGAG	24
Bax	上游 TTGCTTCAGGGTTTCATCCA	20
	下游 CTTGAGACACTCGCTCAGCTTC	22
p38	上游 CTACCGGCAGGAGCTGAACAA	21
	下游 AATGATGGACTGAAATGGTCTGGAG	25
细胞外信号调控的蛋白激酶(ERK)	上游 CGTTGTTACAGGGCTCCAGAA	21
	下游 CTGCCAGAATGCAGCCTACAGA	22
c-Jun N 端激酶(JNK)	上游 TGAGAACTCTTCCTGATGTCCTT	25
	下游 GATAACAAATCCCTTGCCCTGACTG	24
半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-8	上游 GCTGACTTCTGCTGGGGAT	20
	下游 AGGCTGAGGCATCTGTTTCC	20
肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$	上游 TGAAGCATGATCCGGGACG	20
	下游 GTCACCTCGGGTTCGAGAAG	20

**2.4** 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计处理,实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,并采用单因素方差检验分析组间差异,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1** 新西兰牡荆苷 II 对抗氧化活性的影响 与空白组比较,当新西兰牡荆苷 II 质量浓度达到 1  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,对 DPPH 的清除率和对  $\text{Cu}^{2+}$  还原率达到 48.82% 和 22.01% ( $P < 0.01$ );当质量浓度达到 0.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,对 ABTS 清除率达到 86.88% ( $P < 0.01$ ),具有与 BHT (86.62%) 相似的清除效果。实验结果表明新西兰牡荆苷 II 对 ABTS 自由基的清除作用最好,对 DPPH 的清除作用较好,而对  $\text{Cu}^{2+}$  的还原能力作用则较弱。3 种不同的体外抗氧化体系证明新西兰牡荆苷 II 具有一定的抗氧化作用。见表 2。

**3.2** 新西兰牡荆苷 II 对不同肿瘤细胞生长的影响 新西兰牡荆苷 II 对不同的肿瘤细胞均有一定的抑制增殖作用,对肝癌 HepG2 作用较强,对其他肿瘤

表 2 新西兰牡荆苷 II 对抗氧化活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Antioxidant activities of vicenin II *in vitro* ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) %

组别	质量浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	DPPH 清除率	ABTS 清除率	$\text{Cu}^{2+}$ 还原率
空白	-	0.00 ± 0.03	0.00 ± 0.05	0.00 ± 0.06
新西兰 牡荆苷 II	1	48.82 ± 0.50 <sup>2)</sup>	-	22.01 ± 0.72 <sup>2)</sup>
	0.8	37.25 ± 2.65 <sup>2)</sup>	-	17.61 ± 1.12 <sup>2)</sup>
	0.5	25.89 ± 1.44 <sup>2)</sup>	86.88 ± 0.23 <sup>2)</sup>	14.17 ± 1.43 <sup>1)</sup>
	0.2	7.86 ± 0.55 <sup>2)</sup>	41.07 ± 0.99 <sup>2)</sup>	5.84 ± 0.64 <sup>1)</sup>
	0.1	3.68 ± 0.62 <sup>1)</sup>	19.91 ± 0.77 <sup>2)</sup>	3.04 ± 0.32 <sup>1)</sup>
	0.05	0.42 ± 1.78	8.00 ± 1.50	1.46 ± 0.25
	0.01	-	0.23 ± 1.24	-
	0.005	-	0.16 ± 1.83	-
BHT	1	79.23 ± 0.04 <sup>2)</sup>	-	100.0 ± 2.44 <sup>2)</sup>
	0.8	78.88 ± 0.28 <sup>2)</sup>	-	94.56 ± 7.81 <sup>1)</sup>
	0.5	76.68 ± 0.55 <sup>2)</sup>	86.62 ± 0.17 <sup>2)</sup>	82.61 ± 2.70 <sup>2)</sup>
	0.2	70.72 ± 0.49 <sup>2)</sup>	84.80 ± 0.18 <sup>2)</sup>	59.50 ± 3.32 <sup>2)</sup>
	0.1	57.35 ± 0.92 <sup>2)</sup>	77.01 ± 0.81 <sup>2)</sup>	34.90 ± 2.15 <sup>2)</sup>
	0.05	39.03 ± 0.51 <sup>2)</sup>	56.47 ± 1.34 <sup>2)</sup>	18.98 ± 0.97 <sup>2)</sup>
	0.01	-	17.03 ± 1.09 <sup>2)</sup>	-
	0.005	-	8.43 ± 0.74 <sup>1)</sup>	-

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 3 ~ 5 同)。

表 3 新西兰牡荆苷 II 对 HepG2, H1299, A549, SGC7901, HT-29, B16 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Effect of vicenin II on cell viability of HepG2, H1299, A549, SGC7901, HT-29, and B16 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ ) %

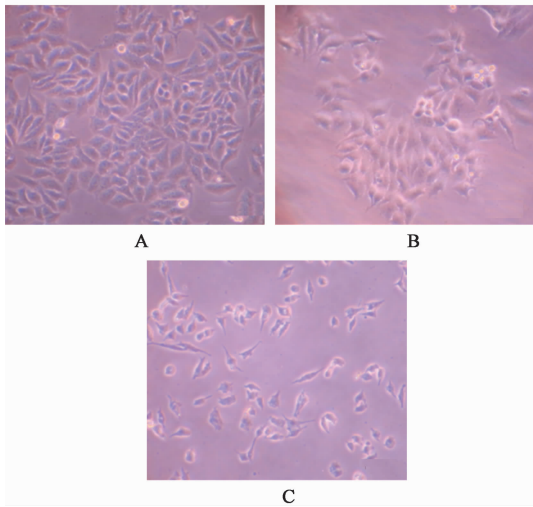
组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	HepG2		H1299		A549	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
空白	-	100.00 ± 2.50	100.00 ± 4.49	99.83 ± 6.08	100.07 ± 6.03	100.00 ± 7.14	100.00 ± 1.90
新西兰牡荆苷 II	12.5	76.94 ± 4.03 <sup>2)</sup>	69.05 ± 0.52 <sup>2)</sup>	80.63 ± 4.18 <sup>2)</sup>	78.77 ± 7.72 <sup>2)</sup>	91.36 ± 1.43 <sup>1)</sup>	90.78 ± 3.65 <sup>2)</sup>
	25	78.76 ± 4.37 <sup>2)</sup>	60.91 ± 3.93 <sup>2)</sup>	81.30 ± 4.95 <sup>2)</sup>	69.03 ± 3.70 <sup>2)</sup>	90.09 ± 7.79 <sup>1)</sup>	85.57 ± 4.29 <sup>2)</sup>
	50	73.04 ± 1.54 <sup>2)</sup>	50.89 ± 1.15 <sup>2)</sup>	77.11 ± 6.87 <sup>2)</sup>	65.60 ± 2.39 <sup>2)</sup>	84.49 ± 3.48 <sup>2)</sup>	82.88 ± 2.99 <sup>2)</sup>
	75	69.91 ± 4.24 <sup>2)</sup>	45.69 ± 2.41 <sup>2)</sup>	76.66 ± 3.42 <sup>2)</sup>	62.60 ± 2.35 <sup>2)</sup>	83.99 ± 5.29 <sup>2)</sup>	76.98 ± 1.53 <sup>2)</sup>
	100	70.40 ± 2.28 <sup>2)</sup>	44.17 ± 3.83 <sup>2)</sup>	79.09 ± 5.11 <sup>2)</sup>	60.37 ± 2.51 <sup>2)</sup>	79.97 ± 2.15 <sup>2)</sup>	75.57 ± 3.15 <sup>2)</sup>
5-FU	50	67.45 ± 2.76 <sup>2)</sup>	44.84 ± 0.76 <sup>2)</sup>	-	-	-	-

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	SGC7901		HT-29		B16	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
空白	-	100.00 ± 0.90	100.00 ± 3.64	101.42 ± 2.37	99.08 ± 3.67	100.00 ± 1.50	100.18 ± 1.53
新西兰牡荆苷 II	12.5	91.05 ± 5.32 <sup>2)</sup>	87.12 ± 4.66 <sup>2)</sup>	93.30 ± 1.99 <sup>2)</sup>	85.56 ± 6.04 <sup>2)</sup>	97.46 ± 4.35	95.59 ± 1.78
	25	85.77 ± 3.74 <sup>2)</sup>	85.36 ± 3.56 <sup>2)</sup>	90.27 ± 3.19 <sup>2)</sup>	72.66 ± 2.45	97.32 ± 1.70	84.89 ± 1.42 <sup>2)</sup>
	50	86.10 ± 2.39 <sup>2)</sup>	82.13 ± 2.10 <sup>2)</sup>	88.43 ± 2.34 <sup>2)</sup>	80.93 ± 2.08 <sup>2)</sup>	93.68 ± 5.14 <sup>1)</sup>	87.62 ± 3.42 <sup>2)</sup>
	75	84.63 ± 0.81 <sup>2)</sup>	78.85 ± 4.41 <sup>2)</sup>	76.72 ± 3.62 <sup>2)</sup>	76.56 ± 3.58 <sup>2)</sup>	93.30 ± 4.55 <sup>1)</sup>	77.71 ± 4.79 <sup>2)</sup>
	100	86.31 ± 5.75 <sup>2)</sup>	77.64 ± 5.13 <sup>2)</sup>	77.31 ± 2.40 <sup>2)</sup>	70.23 ± 5.25 <sup>2)</sup>	92.27 ± 5.02 <sup>1)</sup>	73.69 ± 2.27 <sup>2)</sup>
5-FU	50	-	-	-	-	-	-

细胞抑制增殖的作用均较弱,给药 48 h 后细胞活性在 60% ~ 77%,对肝癌 HepG2 细胞的抑制增殖作用最明显,存活率 < 50%,因此选择 HepG2 细胞开展后续实验。另外结果呈现出时间依赖关系,48 h 作用效果明显好于 24 h,同时也成浓度依赖关系,与空白组比较,在新西兰牡荆苷 II 10 ~ 75  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,细胞活性逐渐下降到 45.69% ( $P < 0.01$ ),当新西兰牡荆苷 II 为 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,存活率为 44.17% ( $P < 0.01$ ),与新西兰牡荆苷 II 75  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  比较下降则不明显,不具有统计学差异。因此选用新西兰牡荆苷 II 75  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,给药时间 48 h 开展后续实验。计算 48 h 的半数抑制率 ( $\text{IC}_{50}$ ) 为 50.35  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见表 3。

**3.3 新西兰牡荆苷 II 对 HepG2 细胞凋亡形态的影响** 与空白组比较,药物组细胞表现出数量减少,体积缩小,细胞质收缩,膜起泡等凋亡特征。用 Hoechst 33258 染色后在荧光显微镜下观察,同样可以观察到新西兰牡荆苷 II 组细胞出现凋亡的一些典型形态改变,包括细胞核固缩,染色质收缩,核内出现凋亡小体,可见浓染致密的颗粒块状荧光且荧光较强;而正常细胞细胞核较大,无颗粒块状荧光。见图 1, 2。



A. 空白组; B. 新西兰牡荆苷 II (75  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); C. 5-FU 组 (50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (图 2 同)

图 1 新西兰牡荆苷 II 作用于 HepG2 细胞的凋亡形态学变化 (倒置显微镜,  $\times 200$ )

Fig. 1 Morphology changes of HepG2 cells treated with vicenin II (inverted microscope,  $\times 200$ )

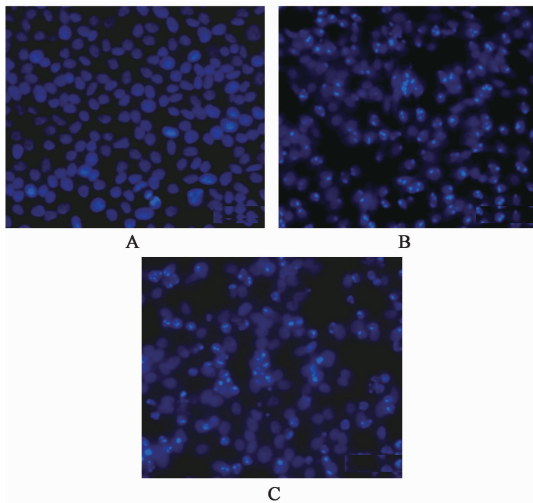


图 2 新西兰牡荆苷 II 作用于 HepG2 细胞 48 h 的荧光凋亡形态学变化 (Hoechst 33258,  $\times 200$ )

Fig. 2 Morphology changes of HepG2 cells treated with vicenin II for 48 h (Hoechst 33258,  $\times 200$ )

### 3.4 新西兰牡荆苷 II 对 HepG2 细胞凋亡率的影响

与空白组比较,新西兰牡荆苷 II 组凋亡率显著增加 ( $P < 0.01$ ),表明新西兰牡荆苷 II 能显著促进 HepG2 细胞凋亡。见表 4。

### 3.5 新西兰牡荆苷 II 对 HepG2 细胞凋亡相关 mRNA 表达的影响

与空白组比较,75  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  新西兰牡荆苷 II 给药组能显著提高促凋亡基因 Bax 的表达 ( $P < 0.01$ ),降低抗凋亡基因 Bcl-2 的表达 ( $P < 0.05$ ),提高 Bax/Bcl-2 ( $P < 0.01$ ),提高直接

表 4 新西兰牡荆苷 II 对 HepG2 细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Apoptosis of HepG2 cells after treated with vicenin II ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	凋亡率/%
空白	-	7.67 $\pm$ 1.11
新西兰牡荆苷 II	75	14.57 $\pm$ 0.91 <sup>2)</sup>
5-FU	50	18.70 $\pm$ 0.85 <sup>2)</sup>

参与细胞凋亡 Caspase-8 mRNA 表达 ( $P < 0.01$ ),提高 MAPK 凋亡信号通路中关键基因 ERK, JNK, p38 和 NF- $\kappa$ B mRNA 表达 ( $P < 0.01$ )。见表 5。

## 4 讨论

黄酮类化合物在大自然中普遍存在,具有多酚羟基结构,这是其具有抗氧化能力的主要原因。黄酮苷类因其具有黄酮母核结构,因此也可能具有良好的抗氧化能力。DPPH 自由基清除法,ABTS 自由基清除法和铜还原法是筛选天然产物抗氧化剂较好的方法,在反应过程中抗氧化剂与自由基反应后使其溶液褪色,特征 A 降低,A 越低,表明所检测物质的总抗氧化能力越强<sup>[17]</sup>。本实验研究以常用的合成抗氧化剂 BHT 通过 3 种不同的抗氧化体系,分别测定了新西兰牡荆苷 II 对 DPPH 自由基,ABTS 自由基的清除能力,结果表明新西兰牡荆苷 II 清除 ABTS 自由基的能力最强,清除率达到与 BHT 组效果相似的 87%,清除 DPPH 自由基的能力较强,而使  $\text{Cu}^{2+}$  还原能力相对较弱。表明新西兰牡荆苷 II 在体表现出良好的抗氧化效果,是良好的抗氧化剂,为铁皮石斛及其黄酮类成分的抗氧化活性提供实验依据的补充。

肝癌是全球癌症死亡的第三大原因,每年估计有 74.9 万例新病例,肝癌的大多数典型症状是发展到中后期有明显的表现,但此时患者经常已经失去手术的机会<sup>[18]</sup>。肝癌又分为原发性肝癌和继发性肝癌,原发性肝癌在中国具有很高的发病率,严重威胁人民的健康和生命,目前在中国的肝癌患者人数占世界一半<sup>[19]</sup>。细胞的凋亡障碍与肿瘤的发生关系密切,通过药物诱导肿瘤细胞凋亡可控制肿瘤细胞增殖与扩散的速度,进而达到控制肿瘤生长的目的<sup>[20]</sup>,通过细胞凋亡途径研究药物抗肿瘤作用的机制是目前的热点之一。本实验首先通过 MTT 比色法检测新西兰牡荆苷 II 对不同肿瘤细胞增殖的影响以及对药物的给药浓度进行初步筛选,发现其有显著的抑制 HepG2 细胞增殖的作用,而且表现出显著的浓度依赖和时间依赖效应。最终确定了细胞模型

表 5 新西兰牡荆苷 II 对 HepG2 细胞凋亡相关 mRNA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of vicenin II on mRNA expression of apoptosis related genes in HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Bax	Bcl-2	Caspase-8	TNF- $\alpha$	ERK
空白	-	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.19	1.00 $\pm$ 0.03
新西兰牡荆苷 II	75	1.40 $\pm$ 0.10 <sup>2)</sup>	0.91 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>	2.36 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>	1.48 $\pm$ 0.43	1.54 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	JNK	p38	NF- $\kappa$ B	Bax/Bcl-2
空白	-	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.06	1.03 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.10
新西兰牡荆苷 II	75	1.71 $\pm$ 0.11 <sup>2)</sup>	2.30 $\pm$ 0.26 <sup>2)</sup>	1.56 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>	1.55 $\pm$ 0.16 <sup>2)</sup>

为 HepG2 及药物处理细胞时间与浓度是 48 h 和 75  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 并初步判断药物可诱导细胞凋亡。在凋亡细胞中, 细胞膜对 Hoechst 33258 的摄取增高, 并与高度浓缩的染色体高度结合, 呈强蓝色荧光, 而正常细胞只呈微弱荧光; Annexin V 可通过细胞外侧暴露的与凋亡早期细胞的胞膜结合, PI 不能透过正常细胞的完整细胞膜但能透过凋亡中晚期的细胞膜从而使细胞核染红, 因此 Annexin V 与 PI 合用可检测细胞凋亡率。本实验经 Hoechst 33258 染色后观察到 HepG2 细胞核固缩呈亮蓝荧光等典型的凋亡特征, 细胞凋亡率经流式细胞仪检测显著升高, 表明新西兰牡荆苷 II 能显著性诱导 HepG2 细胞发生凋亡。

肿瘤细胞的增殖、分化及信号传递与 MAPK 信号通路的关系密切, 且其中很多 MAPK 成员参与其中<sup>[21]</sup>。MAPK 家族的信号通路包括了 ERK, JNK, p38 MAPK 3 条途径, ERK, JNK, p38 MAPK 可以由不同的刺激因素激活, 形成不同的转导通路, 激活各不相同的转录因子从而介导凋亡效应, NF- $\kappa$ B 也会受 MAPK 通路信号的间接影响, 而且这几条通路间会产生相互协同或抑制作用来调控细胞的凋亡<sup>[22]</sup>。p38 MAPK JNK, ERK 作为 MAPK 通路中的重要组成部分, 通过转化为磷酸化状态, 激活下游底物来传递信号, 进而调控细胞凋亡<sup>[20]</sup>。此外, 肿瘤细胞凋亡与 Bcl-2 家族及 Caspase 家族关系密切, Bax 为促凋亡基因, Bcl-2 为抗凋亡基因, 两者相互作用调控细胞凋亡<sup>[20]</sup>; Caspase-8 属于起始 Caspase 基因, 直接参与细胞中的凋亡程序, 传导凋亡信息<sup>[23-24]</sup>。本实验中, 新西兰牡荆苷 II 能显著升高 Bax/Bcl-2, Caspase-8, p38 MAPK, ERK, JNK, NF- $\kappa$ B mRNA 表达, 表明新西兰牡荆苷 II 可能通过 MAPK 通路和 Bax/Bcl-2, Caspase 途径诱导 HepG2 细胞发生凋亡效应。

综上所述, 本实验证实不同种源铁皮石斛共有

的黄酮化合物新西兰牡荆苷 II 具有良好的体外抗氧化效果, 能抑制 HepG2 细胞增殖, 并可能的机制是通过调控 MAPK 信号通路和 Bax/Bcl-2, Caspase 途径诱导肝癌 HepG2 细胞发生凋亡。作为共性成分, 新西兰牡荆苷 II 可以作为铁皮石斛质量评价的特征成分, 为铁皮石斛的药效物质基础、质量控制、资源的进一步开发利用提供重要依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015:282-283.

[2] 包雪声, 顺庆生, 陈立钻, 等. 中国药用石斛[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 2001:56.

[3] 周桂芬, 吕圭源. 铁皮石斛不同部位黄酮碳苷类成分及清除 DPPH 自由基能力比较研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11):1536-1540.

[4] 黄月纯, 谢镇山, 任晋, 等. 3 种种源铁皮石斛叶黄酮类成分 HPLC 特征图谱比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(24):37-40.

[5] 魏述永. 葛根素心血管保护作用及其机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(12):2278-2284.

[6] 朱开梅, 陈丹, 李美波, 等. 构树叶总黄酮调控 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达及 Caspase-3 活性诱导 HepG-2 细胞凋亡的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19):128-133.

[7] 张骏艳, 张磊, 李俊, 等. 野菊花总黄酮对佐剂性关节炎大鼠氧自由基代谢的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(3):344-347.

[8] KU S K. Vicenin-2 and scolymoside inhibit high-glucose-induced vascular inflammation *in vitro* and *in vivo*[J]. Can J Physiol Pharm, 2016, 94(3):287-295.

[9] Hassan N, Ali A, Withycombe C, et al. TET-2 up-regulation is associated with the anti-inflammatory action of vicenin-2[J]. Cytokine, 2018, 108:37-42.

[10] Lee I C. Anti-inflammatory effects of vicenin-2 and scolymoside on polyphosphate-mediated vascular inflammatory responses[J]. Inflamm Res, 2016, 65(3):

- 203-212.
- [11] Lee W, Ku S K, Bae J S. Ameliorative effect of vicenin-2 and scolymoside on TGFBI p-induced septic responses[J]. *Inflammation*, 2015, 38(6):2166-2177.
- [12] Lee W. Antithrombotic and antiplatelet activities of vicenin-2 [J]. *Blood Coagul Fibrin*, 2015, 26(6):628-634.
- [13] Islam M N, Ishita I J, Jung H A, et al. Vicenin 2 isolated from *Artemisia capillaris* exhibited potent anti-glycation properties[J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 69:55-62.
- [14] Verspohl E J, Fujii H, Homma K, et al. Testing of *Perilla frutescens* extract and Vicenin 2 for their antispasmodic effect[J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(5):427-431.
- [15] Nagaprashantha L D, Vatsyayan R, Singhal J, et al. Anti-cancer effects of novel flavonoid vicenin-2 as a single agent and in synergistic combination with docetaxel in prostate cancer[J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 82(9):1100-1109.
- [16] 刘延祥, 张学武. 中药诱导肿瘤细胞凋亡的研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(7):1563-1565.
- [17] 王华清. 茶叶籽中黄酮类化合物的分离鉴定及其抗氧化活性研究[D]. 南京:南京师范大学, 2012.
- [18] LIU Y, CHANG C C, Marsh G M, et al. Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: systematic review and Meta-analysis[J]. *Eur J Cancer*, 2012, 48(14):2125-2136.
- [19] 邓鹏裔. 芝麻素对人肝癌细胞系 HepG2 的抑制作用及机理研究 [D]. 武汉:华中科技大学, 2013.
- [20] 李娜, 高俊岩, 刘敏. 细胞凋亡和肿瘤的关系研究进展[J]. *当代医学*, 2009, 15(16):13-14.
- [21] Plataniias L C. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies [J]. *Blood*, 2003, 101(12):4667-4679.
- [22] 陈建勇, 王聪, 王娟, 等. MAPK 信号通路研究进展 [J]. *中国医药科学*, 2011, 1(8):32-34.
- [23] Bachegowda L, Gligich O, Mantzaris I, et al. Signal transduction inhibitors in treatment of myelodysplastic syndromes[J]. *J Hematol Oncol*, 2013, 6:50.
- [24] Eckhart L, Ballaun C, Hermann M, et al. Identification of novel mammalian Caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human Caspase repertoire[J]. *Mol Biol Evol*, 2008, 25(5):831-841.

[责任编辑 张丰丰]