

• 药理与临床 •

蓬子菜黄酮类化合物对人肝癌 HepG2 细胞增殖及凋亡的机制研究

李海霞¹, 马英丽², 史灵恩¹, 董晶¹, 马玲^{1*}

1. 哈尔滨医科大学公共卫生学院, 黑龙江 哈尔滨 150081

2. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 探讨蓬子菜黄酮类化合物香叶木素-7-*O*- β -*D*-木糖-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-葡萄糖苷 (DXG) 对人肝癌细胞株 HepG2 增殖的抑制作用及其诱导 HepG2 细胞凋亡的机制。方法 台盼蓝染色法检测 DXG 对 HepG2 细胞生长的影响; MTT 法检测 DXG 对细胞增殖的抑制作用; 吖啶橙/溴乙 (AO-EB) 荧光染色法观察 DXG 对 HepG2 细胞凋亡的形态学影响; 琼脂糖凝胶电泳观察凋亡细胞的 DNA 图谱变化; 反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测凋亡相关基因 bcl-2 及 bax 的表达。结果 台盼蓝染色和 MTT 检测显示, DXG 50、100、200 μ g/mL 能明显抑制 HepG2 细胞增殖, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。AO-EB 染色可见 DXG 诱导 HepG2 细胞凋亡并发生形态学改变, 且随 DXG 的质量浓度升高, 凋亡细胞的比例显著增加。琼脂糖凝胶电泳显示, HepG2 细胞经 DXG 100、200 μ g/mL 处理 48 h 后, 可见 DNA “梯形” 碎片条带。RT-PCR 实验表明, DXG 下调细胞凋亡的抑制基因 bcl-2 mRNA 表达, 促使凋亡基因 bax mRNA 表达增强。结论 DXG 具有显著抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖、诱导其凋亡的作用, 其作用机制与调控 bax/bcl-2 的表达有关。

关键词: 蓬子菜; 香叶木素-7-*O*- β -*D*-木糖-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-葡萄糖苷; 人肝癌 HepG2 细胞; 细胞凋亡; 细胞增殖; bcl-2; bax

中图分类号: R282.710.5; R979.19

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)10-1290-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.10.016

Mechanism of flavonoids from *Galium verum* on cell proliferation and apoptosis of HepG2

LI Hai-xia¹, MA Ying-li², SHI Ling-en¹, DONG Jing¹, MA Ling¹

1. College of Public Health, Harbin Medical University, Harbin 150081, China

2. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To investigate the inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis of flavonoids [diosmetin-7-*O*- β -*D*-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-glucopyranoside, DXG] from *Galium verum* on liver cancer cell HepG2 and to study its mechanisms.

Methods Cell growth was detected with Trypan blue staining. The proliferation inhibition rates of DXG on HepG2 were measured by MTT assay. The morphology changes of apoptotic cell were observed by AO-EB double staining. Agarose gel electrophoresis was used to detect the DNA fragmentation. The expression of apoptosis-related genes bax and bcl-2 was examined by RT-PCR. **Results** DXG (50, 100, and 200 μ g/mL) could significantly inhibit the proliferation of HepG2 cells by Trypan blue staining and MTT assay compared with the control group ($P < 0.05$). AO-EB double staining showed that DXG could induce the apoptosis and morphological change of HepG2 cells and the ratios of apoptosis were obviously high when the concentration of DXG increased. The laddering pattern was clearly presented in the cells treated with 100 and 200 μ g/mL DXG for 48 h. RT-PCR showed that DXG could up-regulate the mRNA level of bax and down-regulate the mRNA levels of bcl-2 in HepG2 cells. **Conclusion** DXG could obviously inhibit the proliferation and induce the apoptosis in HepG2 cells. The mechanism is related to the modulation of the expression level of bax/bcl-2 mRNA.

Key words: *Galium verum* L.; diosmetin-7-*O*- β -*D*-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-glucopyranoside; liver cancer HepG2 cell; apoptosis; cell proliferation; bcl-2; bax

收稿日期: 2012-07-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (201281274034); 教育部博士点基金资助项目 (20112327110006)

作者简介: 李海霞 (1986—), 女, 山东泰安人, 硕士, 主要从事中药抗肿瘤作用机制研究。Tel: 13946097470 E-mail: xinyuanfangfei@126.com

*通信作者 马玲 Tel: 13654657092 E-mail: malinghai@126.com

许多天然黄酮类化合物具有抗肿瘤和诱导细胞凋亡的作用^[1-2]。蓬子菜 *Galium verum* L. 含有大量黄酮类化合物,其中香叶木苷可抑制黑色素瘤转移,阻止口腔癌细胞增殖^[3-4]。前期研究从蓬子菜总黄酮中分离到单体化合物香叶木素-7-O-β-D-木糖-(1→6)-β-D-葡萄糖苷(DXG)^[5],本实验研究DXG体外对人肝癌HepG2细胞增殖与凋亡的作用,并探讨其作用机制,为蓬子菜黄酮类成分的研发及寻找新的抗肿瘤药物提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂

DXG,相对分子质量594,质量分数95%,由黑龙江中医药大学提供。新生牛血清,杭州四季青公司;DMEM培养基,Gibco公司;台盼蓝染液、MTT试剂、Trizol细胞裂解液、吖啶橙-溴乙啶(AO-EB),Sigma公司;琼脂糖,Biowest公司;EDTA、Tris-HCl,KH公司;反转录及PCR试剂盒,TakaRa公司,引物由上海英俊公司合成。

1.2 细胞

人肝癌HepG2细胞株,购于中国科学院上海研究所。

1.3 仪器

CO₂恒温培养箱,Heal Force 生物医疗科技有限公司;倒置显微镜、荧光显微镜,日本Olympus公司;多功能酶标仪,美国BioTek公司;PCR仪,美国ABI公司。

2 方法

2.1 细胞培养

HepG2细胞用含有10%新生牛血清的DMEM培养基、于37℃、5%CO₂培养箱中培养。当细胞密度达80%~90%时,弃掉培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗2遍,加入消化液(0.02%EDTA和0.25%胰蛋白酶),37℃消化2min。倒置显微镜观察细胞变圆、收缩、细胞间隙增大时,弃掉消化液,加培养基制成单细胞悬液,分装到新的培养瓶中,继续培养。

2.2 台盼蓝染色法检测HepG2细胞生长

取对数生长期HepG2细胞,调整细胞悬液密度为 1.75×10^4 /mL,接种于96孔板,每孔200μL。待细胞贴壁后换液,给药组分别加入DXG 50、100、200μg/mL,对照组加入DMEM培养液,每组均设3个平行孔,培养24、48h后收集细胞,细胞悬液与0.4%台盼蓝以9:1混合,倒置显微镜下观察(死

细胞被染成蓝色,活细胞呈无色透明),计算活细胞和死细胞数目。

2.3 MTT法检测HepG2细胞增殖

HepG2细胞处理与给药同“2.2”项。细胞培养24、48、72h后,各给药组及对照组每孔均分别加入20μL MTT(5mg/mL),37℃孵育4h,弃上清,每孔加入200μL DMSO,37℃下摇床振荡10min,酶标仪测定490nm处吸光度(A)值,计算细胞增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = 1 - A_{\text{给药组}} / A_{\text{对照组}}$$

2.4 AO-EB染色法检测HepG2细胞凋亡的形态学改变

收集对数生长期HepG2细胞,调整细胞悬液密度为 1.8×10^5 /mL,接种到有盖玻片的培养皿中,待细胞贴壁后换液,给药组加入DXG 50、100、200μg/mL,对照组加入培养液。培养48h后,取出盖玻片,PBS洗3min,取10μL AO-EB(250μg/mL AO,250μg/mL EB)染色,荧光显微镜下(×200)观察,计数一个视野下的细胞凋亡率。

$$\text{细胞凋亡率} = (\text{早期凋亡细胞数} + \text{晚期凋亡细胞数}) / (\text{早期凋亡细胞数} + \text{晚期凋亡细胞数} + \text{坏死细胞数} + \text{活细胞数})$$

2.5 琼脂糖凝胶电泳检测凋亡细胞DNA变化

将HepG2细胞分成DXG 50、100、200μg/mL组和对照组(给予培养液),加药后各组细胞培养48h,收集细胞,调整细胞数约 3×10^6 个,PBS洗2遍,加入600μL细胞裂解液(0.5mol/L EDTA,1mol/L Tris-HCl,10% SDS)、20μL蛋白酶K(200μg/mL),55℃孵育3h,用等体积的Tris-饱和酚-氯仿-异丙醇(25:24:1)提取3次,1.2倍体积无水乙醇沉淀DNA,等体积70%乙醇洗沉淀后,三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸缓冲液(TE缓冲液,0.5mol/L EDTA,1mol/L Tris-HCl)溶解DNA。进行2%琼脂糖凝胶电泳分析。

2.6 RT-PCR检测bcl-2及bax基因表达

HepG2细胞处理与给药同“2.5”项。细胞培养48h,收集细胞,调整细胞数约 2×10^6 个,用Trizol裂解法提取细胞中RNA并检测其量和纯度,按照反转录试剂盒说明书,合成cDNA。反应条件:42℃,30min;95℃,5min;5℃,5min。bcl-2(340bp)引物序列:上游引物5'-TTCCATCGCTGTCCTT CG-3',下游引物3'-CGCTTAGATACAAATGTCC GTGTC-5';PCR反应条件:94℃,5min,94℃,30s,59℃,30s,72℃,45s,35个循环,最后72

℃延伸 7 min。bax (386 bp) 引物序列：上游引物 5'-GGATGCGTCCACCAAGAA-3'，下游引物 3'-AAACACCGCCTCACG-5'；PCR 反应条件：94 ℃、5 min，94 ℃、30 s，56 ℃、30 s，72 ℃、45 s，30 个循环，最后 72 ℃延伸 7 min。β-actin (256 bp) 引物序列：上游引物 5'-CTCGCTGTCCACCTTCCA-3'，下游引物 3'-CTTGCCACTTCCACTGTCG-5'，PCR 反应条件：94 ℃、2 min，94 ℃、45 s，55 ℃、1 min，72 ℃、1 min，35 个循环，最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析。

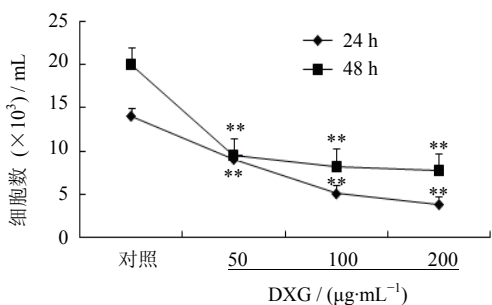
2.7 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件处理数据，连续型变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用方差分析，组间两两比较采用 LSD 检验。

3 结果

3.1 对 HepG2 细胞生长的影响

与对照组相比，DXG 50、100、200 μg/mL 均抑制 HepG2 细胞生长，并随着培养时间延长、质量浓度升高，细胞数量逐渐减少，表明 DXG 对 HepG2 细胞生长抑制作用明显 ($P < 0.01$)。结果见图 1。



与同期对照组比较：** $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs control group at same phase

图 1 DXG 对 HepG2 细胞生长的影响

Fig. 1 Effect of DXG on growth of HepG2 cells

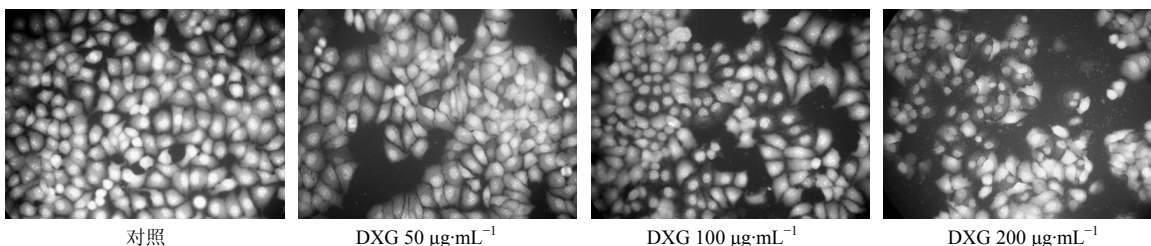
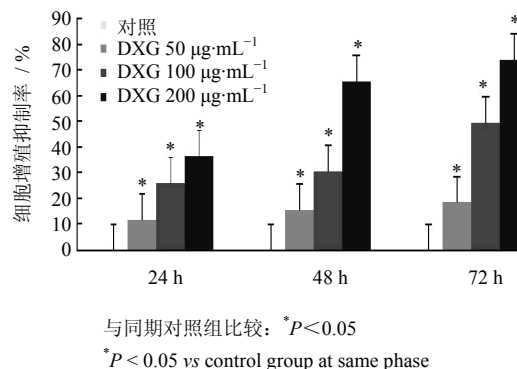


图 3 DXG 对 HepG2 细胞形态学的影响

Fig. 3 Morphological changes of HepG2 cells induced by DXG

3.2 对 HepG2 细胞增殖的影响

MTT 法检测显示，DXG 在 50、100、200 μg/mL 时，对细胞增殖的抑制作用逐渐增强，也呈现明显的时间和质量浓度相关性，与同期对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。结果见图 2。



与同期对照组比较：* $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group at same phase

图 2 DXG 对 HepG2 细胞增殖抑制的影响

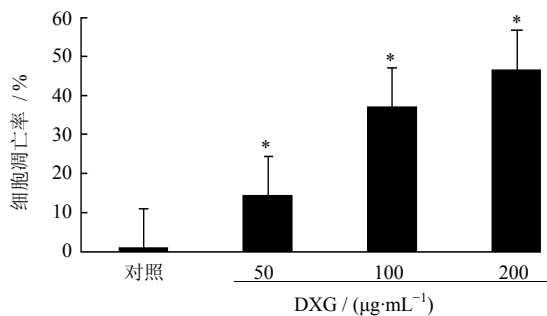
Fig. 2 Inhibition of DXG on proliferation of HepG2 cells

3.3 对 HepG2 细胞形态学及凋亡率的影响

荧光显微镜下可见，对照组 HepG2 细胞核为绿色，细胞排列紧密呈多边形。DXG 50 μg/mL 组，HepG2 细胞出现早期凋亡的特点，细胞体积缩小，核呈绿色、固缩，可见圆柱状的小体；DXG 100、200 μg/mL 组 HepG2 细胞呈现晚期凋亡的特点，由于细胞膜通透性的改变，使溴乙锭 (EB) 进入细胞内，细胞核为橘红色并呈固缩状或破碎状。随着 DXG 质量浓度的增加，细胞凋亡率明显增大。结果见图 3、4。

3.4 对 bcl-2 和 bax 基因表达及 bax/bcl-2 的影响

以质量浓度分别为 100、200 μg/mL 的 DXG 处理 HepG2 细胞 48 h 后，细胞出现凋亡特征性“梯形”条带 (图 5)；HepG2 细胞 bax 基因表达明显增强，且呈质量浓度相关性；而随着 DXG 质量浓度的增高，bcl-2 基因表达则显著减弱 (图 6)，bax/bcl-2 值增大 (表 1)。



与对照组比较: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group

图4 DXG对HepG2细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effect of DXG on apoptosis of HepG2 cells

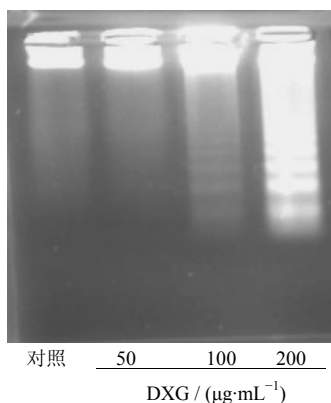


图5 DXG诱导HepG2细胞凋亡的DNA片段

Fig. 5 DNA fragmentation in HepG2 cells induced by DXG

表1 DXG对HepG2细胞bcl-2和bax表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of DXG on expression of bcl-2 and bax gene in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho / (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	bcl-2 相对表达量	bax 相对表达量	bax/bcl-2
对照	—	0.96 ± 0.02	0.87 ± 0.01	0.79 ± 0.11
DXG	50	0.90 ± 0.01	0.96 ± 0.03	0.91 ± 0.10
	100	$0.88 \pm 0.22^*$	$1.02 \pm 0.04^*$	$1.01 \pm 0.14^*$
	200	$0.60 \pm 0.03^*$	$1.06 \pm 0.08^*$	$1.50 \pm 0.13^*$

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

进一步证实 DXG 诱导 HepG2 细胞凋亡; DXG 还可调节 bax 和 bcl-2 基因表达。此外,随着 DXG 质量浓度的增加,细胞凋亡抑制基因 bax 的表达明显上调,细胞凋亡抑制基因 bax 的表达明显增强,而促凋亡基因 bcl-2 的表达逐渐减少,导致了 bax/bcl-2 的增加。

综上所述,蓬子菜中黄酮化合物 DXG 具有明显的抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖、诱导其凋亡的作用,其作用机制与调控 bax、bcl-2 的表达有关。

参考文献

[1] Wenzel U, Kuntz S, Brendel M D, et al. Dietary flavone

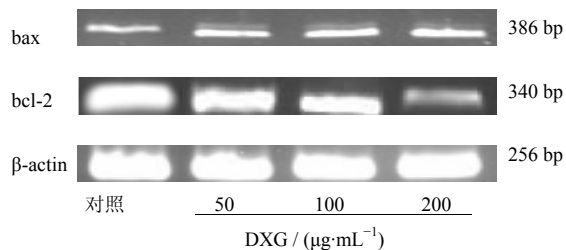


图6 DXG对HepG2细胞bcl-2、bax表达的影响

Fig. 6 Effect of DXG on expression of bcl-2 and bax in HepG2 cells

4 讨论

天然黄酮类化合物具有较好的抗癌作用,能够抑制肿瘤细胞增殖,并通过多种信号途径诱导细胞凋亡^[6-9]。蓬子菜具有多种药理作用,如降血压、抗血栓、抗氧化、消炎、抗癌和保肝作用等^[10],其主要生物活性成分是黄酮类化合物,其中香叶木苷可通过 Fas/FasL 受体途径抑制肿瘤细胞诱导的胸腺细胞凋亡,调节免疫系统的功能,发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用^[11]。为了进一步研究蓬子菜黄酮类成分的抗癌作用,本实验观察从蓬子菜总黄酮中分得的单体化合物 DXG 对肝癌 HepG2 细胞的体外抗肿瘤作用。结果表明,DXG 能够显著抑制 HepG2 细胞增殖,诱导其凋亡;观察到经 DXG 100、200 μg/mL 处理 48 h, HepG2 细胞出现明显的“梯状”条带,

is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(14): 3823-3831.

[2] Suh Y, Afaq F, Johnson J J, et al. A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cells by inhibition of COX₂ and Wnt/EGFR/NF- κ B-signaling pathways [J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(2): 300-307.
[3] Conesa M C, Ortega V V, Gascon M J Y, et al. Treatment of metastatic melanoma B16F10 by the flavonoids tangeretin rutin and disomin [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(17): 6791-6793.
[4] Browning A M, Walle U K, Walle T. Flavonoid

- glycodides inhibit oral cancer cell proliferation-role of cellular uptake and hydrolysis to the aglycones [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2005, 57(8): 1037-1042.
- [5] 崔明宇, 孙志伟, 王 艳, 等. 蓬子菜中活性成分 DXG 在大鼠体内的药动力学研究 [J]. *中医药学报*, 2012, 40(6): 47-50.
- [6] 肖义军, 陈元仲, 陈炳华, 等. 红花桑寄生总黄酮提取物选择性抑制人源肿瘤细胞增殖和诱导凋亡 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2009, 29(2): 148-152.
- [7] 唐丽华, 游本钢, 徐向义, 等. 珍珠菜总黄酮苷诱导 HL-60 细胞凋亡作用研究 [J]. *上海中医药大学学报*, 2007, 21(1): 54-57.
- [8] Chen Y C, Shen S C, Lee W R, *et al.* Wogonin and fisetin induction of apoptosis through activation of caspase 3 cascade and alter native expression of p21 protein in hepatocellular carcinoma cells SK-HEP-1 [J]. *Arch Toxicol*, 2002, 76(5/6): 351-359.
- [9] Lv W, Sheng X, Chen T, *et al.* Jaceosidin induces apoptosis in human ovary cancer cells through mitochondrial pathway [J]. *J Biomed Biotech*, 2008, 7: 1-6.
- [10] 崔明宇, 冀有良, 苏连杰, 等. 蓬子菜的化学成分与药理作用 [J]. *国外医药: 植物学分册*, 2008, 23(3): 112-114.
- [11] Zhao R, Chen Z B, Jia G Y, *et al.* Protective effects of diosmetin extracted from *Galium verum* L. on the thymus of U14-bearing mice [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2011, 89(9): 665-673.