

杨黄总黄酮对人肝癌HepG2细胞凋亡的影响[△]

孙锦秀^{1*}, 姜慧妍², 杜盼², 韩晓雯², 夏国华², 戈延茹^{2#} (1. 如皋市人民医院药剂科, 江苏如皋 226500; 2. 江苏大学药学院, 江苏镇江 212013)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)10-1342-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.10.15

摘要 目的: 研究杨黄总黄酮对人肝癌HepG2细胞凋亡的影响。方法: 制备杨黄总黄酮并进行定性、定量分析。以5-氟尿嘧啶(50 μg/ml)与不同质量浓度杨黄总黄酮(10、20、40、80、100 μg/ml)作用于HepG2细胞24 h后, 采用MTT法测定细胞活力以计算抑制率与半数抑制浓度(IC₅₀)。以不同质量浓度杨黄总黄酮(40、80、100 μg/ml)作用于HepG2细胞72 h后, 采用流式细胞仪测定细胞凋亡情况与细胞周期分布情况。结果: 杨黄总黄酮含量为464.5 mg/g。10、20、40、80、100 μg/ml杨黄总黄酮对细胞的抑制率分别为(6.46 ± 1.74)%、(8.19 ± 1.08)%、(23.19 ± 2.77)%、(42.09 ± 1.46)%和(58.18 ± 1.89)%, 抑制率与其质量浓度呈正相关, IC₅₀为93.9 μg/ml。40、80、100 μg/ml杨黄总黄酮作用于细胞72 h后细胞凋亡率增加, 并与质量浓度呈正相关。随着杨黄总黄酮质量浓度增加, S+G₂期细胞比例增加。结论: 杨黄总黄酮可诱导HepG2细胞凋亡, 其机制可能与将细胞阻滞于S+G₂期有关。
关键词 杨黄; 总黄酮; 抗癌活性; 人肝癌HepG2细胞; 凋亡

Effect of Total Flavonoids from *Phellinus vaninii* on the Apoptosis of Human Hepatoma HepG2 Cells

SUN Jin-xiu¹, JIANG Hui-yan², DU Pan², HAN Xiao-wen², XIA Guo-hua², GE Yan-ru² (1. Dept. of Pharmacy, the People's Hospital of Rugao, Jiangsu Rugao 226500, China; 2. School of Pharmacy, Jiangsu University, Jiangsu Zhenjiang 212013, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effect of total flavonoids from *Phellinus vaninii* on the apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. METHODS: The total flavonoids from *P. vaninii* was prepared, and then qualitative and quantitative analysis were made. MTT method was used to determine cell viability after 5-fluorouracil (50 μg/ml) and the total flavonoids from *P. vaninii* varying in mass concentration of 10, 20, 40, 80 and 100 μg/ml had acted on HepG2 cells for 24 h to calculate the inhibition rates and the half inhibition concentration (IC₅₀). The flow cytometry was employed to determine the apoptosis and cell cycle distribution after the total flavonoids from *P. vaninii* varying in mass concentration of 40, 80 and 100 μg/ml had acted on HepG2 cells for 72 h. RESULTS: The content of the total flavonoids from *P. vaninii* was 464.5 mg/g. The total flavonoids from *P. vaninii* with the mass concentrations of 10, 20, 40, 80 and 100 μg/ml had cell growth inhibition rates of (6.46 ± 1.74)%, (8.19 ± 1.08)%, (23.19 ± 2.77)%, (42.09 ± 1.46)% and (58.18 ± 1.89)% respectively, demonstrating a positive correlation between the inhibition rate and the mass concentration. The IC₅₀ was 93.9 μg/ml. The apoptosis rate was increased after 72 hour action of the total flavonoids from *P. vaninii* with the mass concentrations of 40, 80 and 100 μg/ml, demonstrating a positive correlation with the mass concentration. The proportion of the cells at S+G₂ phases was increased by the increasing of the mass concentration of the total flavonoids from *P. vaninii*. CONCLUSIONS: The total flavonoids from *P. vaninii* can induce the apoptosis of HepG2 cells by a mechanism related to cell cycle arrest at S+G₂ phases.

KEYWORDS *Phellinus vaninii*; Total flavonoids; Antitumor activity; Human hepatoma HepG2 cells; Apoptosis

- [9] 翁艳英, 韦藤幼, 童张法. 内部沸腾法提取三七多糖的研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(6): 1 435.
[10] 廖共山, 班建东. 一种检测凝血酶、类凝血酶的新方法: 纤维蛋白原平板法[J]. 广西医科大学学报, 2008, 25(6): 967.
[11] 尹玉华, 钟山, 杨得坡. 蚂蟥药材总脂肪酸的GC-MS分析

△ 基金项目: 江苏省高等学校大学生创新创业计划立项项目(No. 201310299032Z); 江苏大学大学生科研立项资助项目(No. 13A074)

* 中药师。研究方向: 中药学。电话: 0513-87512315。E-mail: 343044630@qq.com

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 中药物质基础。电话: 0511-85010518。E-mail: geyanru@tom.com

- 及其抗凝活性研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(3): 520.
[12] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 201.
[13] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理学实验方法学[J]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1 281.
[14] 朴春花. 三七的药理作用研究进展概述[J]. 中国医药指南, 2011, 9(13): 209.
[15] 李裕波, 林进令, 刘志明. 白芨作为血管栓塞剂的应用[J]. 介入放射学杂志, 2010, 19(10): 835.
[16] 蒙衍强, 唐献兰, 黄健军, 等. 闪提法对仙鹤草止血镇痛作用的影响[J]. 中成药, 2013, 35(7): 1 560.

(收稿日期: 2014-05-18 修回日期: 2014-07-17)

(编辑: 张静)

杨黄(*Phellinus vaninii* L.),又名桑黄,属担子菌门、层菌纲、非褶菌目、锈革孔菌科、木(针)层孔菌属^[1],其资源稀少,价格昂贵,传统常用于治疗盗汗、痢疾、血崩等^[2]。现代研究发现杨黄是生物治癌领域有效率最高的真菌之一,该真菌中含有三萜、多糖和黄酮等活性成分^[3-7]。目前国内外研究多集中于其多糖类成分^[8-12],而对于占药材约7%的黄酮类成分^[13]研究较少。因此,笔者研究了杨黄总黄酮抗人肝癌HepG2细胞的作用及其可能的作用机制,以期为杨黄资源的高效综合利用和杨黄总黄酮的进一步开发提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

KQ-250B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);LABORATA 4000型旋转蒸发仪(德国Heidolph公司);CO₂孵箱(美国Shellab公司);KT-30L型全自动高压灭菌锅(日本Tokyo公司);1-13型高速台式离心机(德国Sigma公司);TS100型倒置相差显微镜(日本Nikon公司);Spectra Max 190型酶标仪(美国Molecular Device公司);流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司)。

1.2 药材

杨黄(寄主为杨树)子实体购自延吉市长白山特产经营部,由江苏大学药学院张朝晖教授鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

芦丁对照品(南京泽朗医药科技有限公司,批号:ZL20130908,纯度:>98%);5-氟尿嘧啶(5-FU,天津金耀药业有限公司,批号:201302181,规格:0.25 g:100 ml);小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);培养基(MEM1640,美国Gibco公司);胰蛋白酶、MTT(美国Amresco公司);Annexin V-FITC试剂盒(深圳晶美生物工程有限公司);细胞周期检测试剂盒(美国Becton Dickinson公司)。

1.4 细胞

HepG2细胞由南京大学徐力致工程师提供。

2 方法

2.1 杨黄总黄酮的制备、定性、定量^[13]

2.1.1 制备 杨黄子实体粉末过60目筛,取30 g置于烧瓶中,加70%乙醇900 ml,室温浸泡12 h,超声提取30 min,抽滤,残渣用同体积70%乙醇再超声提取1次,合并2次滤液,浓缩至约100 ml;上聚酰胺柱,以500 ml水洗后再用70%乙醇洗脱,收集洗脱液,浓缩干燥,贮藏,备用。

2.1.2 黄酮的定性反应 (1)盐酸-镁粉反应:取少量“2.1.1”项下产物用70%乙醇溶解,加少许镁粉、浓盐酸3~4滴,观察现象。(2)浓氨水反应:取少量“2.1.1”项下产物用70%乙醇溶解,点在滤纸上,将滤纸置于浓氨水上方30 s,紫外灯下观察。(3)薄层层析:取少量“2.1.1”项下产物用70%乙醇溶解,点于硅胶板上,以展开剂正丁醇-醋酸-水(4:1:5, V/V/V)展开,紫外灯下254 nm波长处观察。

2.1.3 黄酮含量测定 精确吸取0.464 mg/ml芦丁醇溶液0.5、1.5、2.0、2.5、3.0 ml,加70%乙醇定容至25 ml,制得芦丁系列溶液。分别精密吸取上述系列溶液5 ml与1% AlCl₃醇溶液5 ml混匀,于408 nm波长处测定吸光度(A)。以A为纵坐标、芦丁质量浓度(c, μg/ml)为横坐标,绘制标准曲线。精密称取“2.1.1”项下产物25 mg,加70%乙醇制备成0.5 mg/ml的供试品溶液,按标准曲线计算杨黄总黄酮含量。

2.2 体外抗肿瘤试验

2.2.1 样品溶液的制备 用二甲基亚砜(DMSO)溶解杨黄总黄酮以制备样品溶液(100 mg/ml)。样品溶液以含10%小牛血清的培养基稀释,漩涡混匀,DMSO终体积分数不超过0.4%。

2.2.2 对数生长期细胞的制备^[14] HepG2细胞培养于含10%灭活小牛血清和青霉素、链霉素(各100万 u/L)的MEM1640培养基中,置37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。取对数生长期细胞用于试验。

2.2.3 MTT法检测细胞活力 取“2.2.2”项下对数生长期细胞接种于96孔培养板(2×10⁴ ml⁻¹),培养细胞24 h后分别以10、20、40、80、100 μg/ml样品溶液与50 μg/ml 5-FU处理细胞48 h后,加100 μl MTT(1 mg/ml)继续培养细胞4 h,加100 μl DMSO,在酶标仪570 nm波长处测定A,并以50 μg/ml 5-FU溶液为阳性对照,以含0.4% DMSO的培养液作空白对照。A水平代表细胞活力。计算抑制率:抑制率(%)=(1-给药组A/空白对照组A)×100%。采用IC₅₀计算软件(中国药科大学)求半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡情况 取“2.2.2”项下对数生长期细胞,用0.25%胰蛋白酶和0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)消化液制成单细胞悬液,细胞密度调整为5×10⁴ ml⁻¹,接种于培养皿,分别加6 ml细胞悬液;24 h后更换培养液,将细胞随机均分为对照(等容常规培养液)组与杨黄总黄酮①、②、③(40、80、100 μg/ml)组,培养细胞72 h后,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞3次,以不含EDTA的0.25%胰蛋白酶消化,以离心半径为6 cm、1 000 r/min离心5 min, PBS洗涤细胞2次;用500 μl缓冲液(Buffer)悬浮细胞;加入5 μl Annexin V-FITC混匀,加5 μl碘化丙啶(PI)混匀,室温下避光反应5 min;采用流式细胞仪检测。采用Annexin V-FITC/PI双染色法进行细胞凋亡的检测,其中Annexin V-FITC阳性代表细胞发生凋亡,而PI阳性代表细胞死亡。FITC阳性、PI阴性时,代表细胞早期凋亡;FITC阴性、PI阳性时,则代表细胞死亡;双阳性则代表细胞凋亡晚期;双阴性则代表正常细胞。

2.2.5 流式细胞仪检测细胞生长周期情况 取“2.2.4”项下单细胞悬液,同“2.2.4”项下方法分组与给药,培养细胞72 h, PBS洗涤细胞3次,0.25%胰蛋白酶和0.02% EDTA消化,以离心半径为6 cm、1 000 r/min离心5 min,弃上层液体;加入1 ml Buffer,轻轻摇动试管使细胞分散悬浮,室温下以离心半径为6 cm、1 000 r/min离心5 min,弃上层液体;按说明加入细胞周期检测试剂,采用流式细胞仪检测细胞生长周期情况。

2.3 统计方法

采用GraphPad Prism 5软件处理试验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后用LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄酮定性反应结果

3.1.1 盐酸-镁粉反应 加入镁粉后溶液呈暗黄色,滴加浓盐酸后有泡沫产生,且升腾的泡沫呈橙红色。

3.1.2 浓氨水反应 显黄色荧光斑点。

3.1.3 薄层层析 显黄色荧光斑点。

以上结果表明,“2.1.1”项下产物主要为黄酮类成分,即杨黄总黄酮。

3.1.4 杨黄总黄酮含量测定结果 回归方程为 $A = 0.2625c + 0.0097$ ($r = 0.9998$),式中,A为吸光度,c为杨黄总黄酮含量。

结果表明,黄酮质量浓度在4.64~27.84 μg/ml范围内与A呈良好线性关系。杨黄总黄酮含量为464.5 μg/mg(以测得杨黄黄酮质量浓度/供试品溶液质量浓度计算)。

3.2 体外抗肿瘤试验结果

3.2.1 细胞抑制率 在质量浓度10、20、40、80、100 μg/ml下,杨黄总黄酮对细胞的抑制率分别为(6.46 ± 1.74)%、(8.19 ± 1.08)%、(23.19 ± 2.77)%、(42.09 ± 1.46)%、(58.18 ± 1.89)%,表明杨黄总黄酮对细胞生产的抑制作用与其质量浓度呈正相关性;50 μg/ml 5-FU对细胞的抑制率为(55.08 ± 2.42)%;在80、100 μg/ml质量浓度下杨黄总黄酮与50 μg/ml 5-FU对细胞抑制作用差异无统计学意义($P > 0.05$)。IC₅₀为93.9 μg/ml。细胞抑制率计算结果见表1;不同质量浓度杨黄总黄酮对细胞生长的影响见图1。

表1 细胞抑制率结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Results of cell growth inhibition rates($\bar{x} \pm s, n=6$)

药物	质量浓度, μg/ml	抑制率, %
杨黄总黄酮	10	6.46 ± 1.74*
	20	8.19 ± 1.08*
	40	23.19 ± 2.77**
	80	42.09 ± 1.46
	100	58.18 ± 1.89
5-FU	50	55.08 ± 2.42

注:与5-FU比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:vs. 5-FU,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

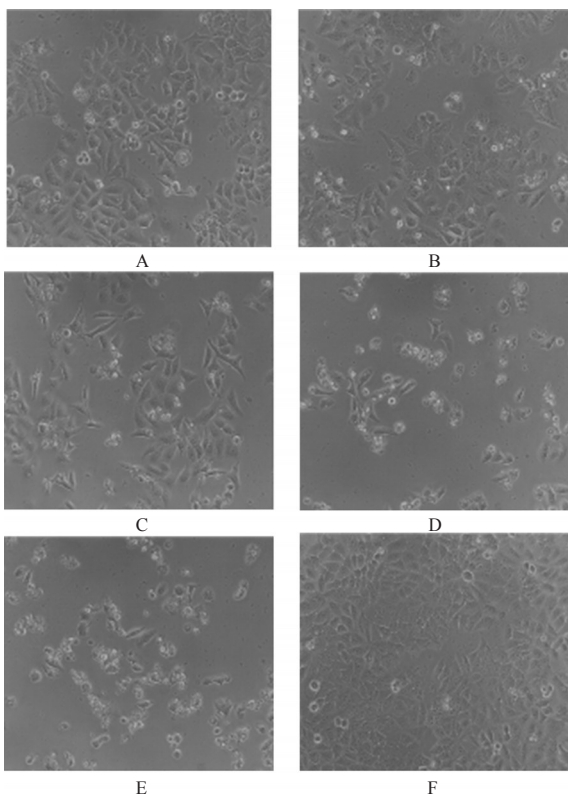


图1 不同质量浓度杨黄总黄酮对细胞生长的影响

A.10 μg/ml; B. 20 μg/ml; C. 40 μg/ml; D. 80 μg/ml; E.100 μg/ml; F.空白对照

Fig 1 Effects of total flavonoids from *P. vaninii* with different mass concentrations on cell growth

A.10 μg/ml; B. 20 μg/ml; C. 40 μg/ml; D. 80 μg/ml; E. 100 μg/ml; F. blank control

3.2.2 不同质量浓度杨黄总黄酮对细胞凋亡的影响 不同质量浓度杨黄总黄酮作用于HepG2细胞72 h后采用流式细胞仪分析,结果显示,随着杨黄黄酮质量浓度的增加,HepG2细胞凋亡率逐渐升高。不同质量浓度杨黄总黄酮对细胞凋亡的影响见图2。

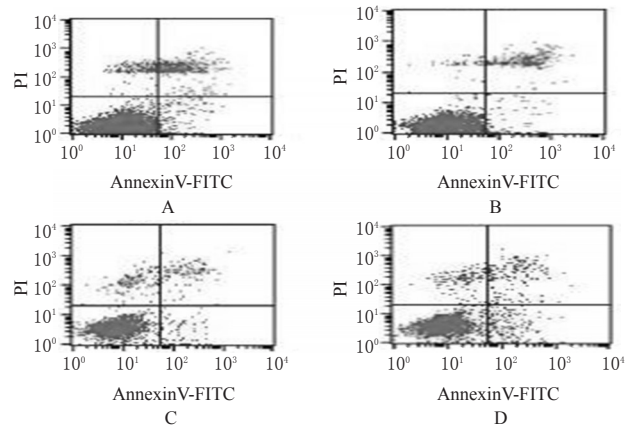


图2 不同质量浓度杨黄总黄酮对细胞凋亡的影响

A. 对照组; B. 杨黄总黄酮①组; C. 杨黄总黄酮②组; D. 杨黄总黄酮③组

Fig 2 Effects of total flavonoids from *P. vaninii* with different mass concentrations on apoptosis

A. control group; B. total flavonoids from *P. vaninii* ① group; C. total flavonoids from *P. vaninii* ② group; D. total flavonoids from *P. vaninii* ③ group

3.2.3 不同质量浓度杨黄总黄酮对细胞周期的影响 不同质量浓度杨黄总黄酮作用于HepG2细胞72 h后,采用流式细胞仪分析细胞周期。结果显示,随着杨黄总黄酮质量浓度增加,G₁期细胞比例逐渐减少,S+G₂期细胞比例呈浓度依赖性增加,表明杨黄总黄酮对HepG2细胞S+G₂期存在阻滞作用。不同质量浓度杨黄总黄酮对细胞周期的影响见图3。

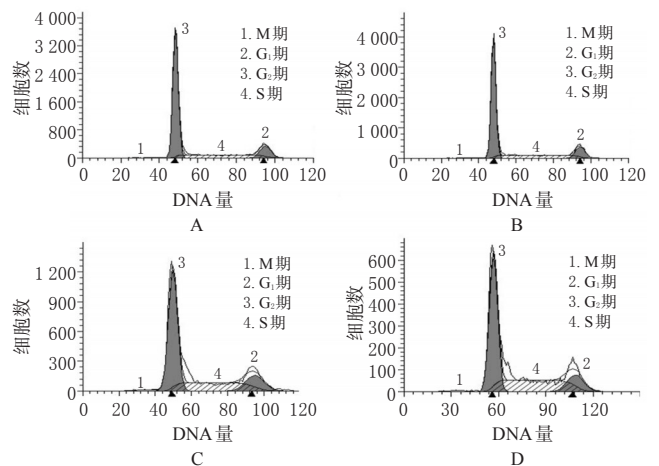


图3 不同质量浓度杨黄总黄酮对细胞周期的影响

A. 对照组; B. 杨黄总黄酮①组; C. 杨黄总黄酮②组; D. 杨黄总黄酮③组

Fig 3 Effects of total flavonoids from *P. vaninii* with different mass concentrations on cell cycle

A. control group; B. total flavonoids from *P. vaninii* ① group; C. total flavonoids from *P. vaninii* ② group; D. total flavonoids from *P. vaninii* ③ group

4 讨论

在癌症的临床治疗中,化疗药物在发挥效用的同时对机体的免疫力有较大破坏^[15]。黄酮可以通过增强机体的免疫功能而发挥其抗癌作用,因而作为代替或部分代替化疗药物的新药资源备受关注。本研究结果显示杨黄总黄酮对HepG2细胞IC₅₀为93.9 μg/ml,具有较好的体外抗癌作用,其抑制细胞增殖的机制可能与促进细胞凋亡和阻滞细胞于S+G₂期有关。

根据氧自由基学说,自由基引发过氧化损伤是引起肿瘤发生的重要原因之一。黄酮类成分中大都含有酚羟基,有较强的抗氧化作用,能与自由基反应形成稳定的半醌式结构,从而清除自由基,因此可推测杨黄总黄酮可能是通过清除自由基而抑制细胞增殖。其更为深入的作用机制有待进一步研究。

参考文献

[1] 戴玉成,图力古尔.中国东北野生食药真菌图志[M].北京:科学出版社,2007:164.

[2] 江西新医学院.中药大词典[M].上海:上海科学技术出版社,1995:1976.

[3] Akito N, Itoh S, Rie T, *et al.* Identification of novel substituted fused aromatic compounds, meshimakobnol A and B, from natural *Phellinus linteus* fruit body[J]. *Tetrahedron Lett*, 2004, 54(45):5931.

[4] 冯子旺,俞力超,李峰,等.正交试验优选桑黄多酚超声提取工艺[J].中国药房,2012,23(3):221.

[5] 张万国,胡晋红,蔡溱,等.桑黄对四氯化碳致大鼠肝损伤的保护作用[J].中国药房,2003,14(5):267.

[6] 于小凤,秦庆玲,李峰,等.响应面法优选桑黄总三萜的超声提取工艺[J].中国药房,2012,23(47):4455.

[7] Mo SY, Wang J. Phelligrindins C-F: cytotoxic pyrano [4,3-c] [2] benzopyran-1,6-dione and four [3,2-c]pyran-4-one derivatives from the fungus *Phellinus igniarius* [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(5):823.

[8] Jang BS, Kim JC, Bae JS, *et al.* Extracts of *Phellinus gilvus* and *Phellinus baumii* inhibit pulmonary inflammation induced by lipopolysaccharide in rats[J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(1):31.

[9] Hwan MK, Sang BH, Coo TO, *et al.* Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*[J]. *Int J Immunopharmacol*, 1996, 18(5):295.

[10] Han SB, Leec W, Jeon YJ, *et al.* The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis[J]. *Immunopharmacology*, 1999, 41(2):157.

[11] Chen L, Pan JZ, Li X, *et al.* Endo-polysaccharide of *Phellinus igniarius* exhibited anti-tumor effect through enhancement of cell mediated immunity[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(2):255.

[12] Li X, Jiao LL, Zhang X, *et al.* Anti-tumor and immunomodulating activities of proteoglycans from mycelium of *Phellinus nigricans* and culture medium[J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(6):909.

[13] 夏国华,戈延茹,傅海珍,等.超声法提取桑黄总黄酮的工艺研究[J].江苏大学学报:医学版,2010,20(1):41.

[14] 徐晶晶,高静,戴小敏,等.新合成的7-氮杂异靛蓝抑制A549细胞增殖的作用及可能机制[J].中国细胞生物学学报,2010,32(2):205.

[15] 杨全,胡旭光,王琦,等.药用真菌桑黄菌丝体多糖抗肿瘤作用的研究[J].中国中药杂志,2006,31(20):1713.

(收稿日期:2014-04-26 修回日期:2014-05-27)

(编辑:张静)

国家卫生计生委副主任王国强赴广东省调研爱国卫生和重点传染病防控工作

本刊讯 2015年2月26-27日,国家卫生计生委副主任、国家中医药管理局局长王国强同志赴广东省调研爱国卫生和重点传染病防控工作。在粤期间,王国强参加了广东省春季爱国卫生运动统一行动日活动,与广东省驻军部队、环卫工人、社区居民群众、街道消毒人员共500余人一起参加了现场劳动。今年广东省春季爱国卫生运动以“清死角、除四害、保健康”为主题,以环境卫生整治、清除病媒孳生地为主要内容,广东省委省政府高度重视,胡春华书记、朱小丹省长分别作出重要批示。王国强还召开广东省春夏季传染病防控工作座谈会,听取了广东省疾病预防控制中心、卫生计生委、爱卫办和广州市等相关部门的情况汇报。

王国强肯定了广东省近年来在爱国卫生和疾病预防控制

工作方面取得的成效。要求广东省各级卫生计生部门充分认识当前面临的传染病防控形势,及早部署,科学研判,提出有针对性的防控策略,进一步强化流感、禽流感、麻疹、登革热、手足口病等重点传染病的防控措施,抓好工作落实。要继续做好埃博拉出血热、脊髓灰质炎等输入性传染病的防控工作准备,严防疫情输入。要进一步加强新时期爱国卫生工作,认真学习领会、深入贯彻落实好国务院66号文件精神,加快制订具体的工作方案。要以卫生城镇创建工作为抓手,不断提高城乡卫生管理水平。要在健康城市建设方面先行先试,探索出一条有地方特色的健康城市建设路径。要进一步加强爱国卫生组织机构建设,充分发挥爱国卫生工作在疾病防控中的不可替代的作用。