

# 白凤菜总黄酮对肝癌 HepG2 细胞生长、增殖和凋亡的影响

林燕燕<sup>1</sup>, 许新恒<sup>2</sup>, 黄仲庆<sup>1</sup>, 林泽燕<sup>1</sup>, 罗秀针<sup>1</sup>, 石艳<sup>2\*</sup>

(1. 漳州卫生职业学院基础医学部, 福建 漳州 363000; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361102)

**摘要:** 研究了白凤菜总黄酮 (TFG) 对人的肝癌 HepG2 细胞的生长、增殖和凋亡的影响。噻唑兰 (MTT) 实验结果表明: TFG 对肝癌细胞 HepG2 的体外增殖抑制有浓度和时间依赖效应, 130 和 260  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFG 处理组 HepG2 细胞凋亡率均显著升高, 分别达到 47% 和 76.39% ( $p < 0.05$ ); 24 h 的半抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为 190.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。实验组 HepG2 细胞周期阻滞在 S 期 ( $p < 0.05$ ), 细胞迁移率随 TFG 浓度的升高下降, 细胞内活性氧 (ROS) 水平最终显著下降 14.5 倍 ( $p < 0.05$ ), 细胞中 Bax 表达量上调而 Bcl-2 表达量下调。综上, TFG 抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖和诱导 HepG2 细胞凋亡的机制, 可能与下调细胞 ROS 水平、重新构建细胞内还原体系、上调促凋亡蛋白 Bax、下调凋亡抑制蛋白 Bcl-2 相关。

**关键词:** 白凤菜; 总黄酮; 细胞增殖; 细胞周期; 细胞凋亡

**中图分类号:** R915      **文献标志码:** A

肝癌在世界常见癌症中排第五, 分别是男女性死于癌症的第二及第六大原因<sup>[1]</sup>。中国是肝癌的高发大国, 肝癌在所有恶性肿瘤发病率中排第四位, 死亡率排第二位<sup>[2]</sup>。早期肝癌患者手术治疗是首选; 可是对于大多数晚期发现的肝癌患者及复发患者, 系统化疗是患者的重要治疗手段之一。化疗药物能有效抑制肿瘤, 但是副作用较强, 很多患者难以耐受药物引发的副作用。植物总黄酮具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、防治糖尿病、保护心血管和消化道等多种活性<sup>[3-6]</sup>, 毒副作用相对较小, 具有抗肿瘤药物开发的潜在价值。

白凤菜 (*Gynura formosana* Kitam) 又名肝炎菜, 菊科千里光族菊三七属, 原产自台湾岛, 药食同源, 全草可入药。传统中白凤菜是采集后切断鲜用或晒干备用, 较少使用炮制品。全草有清热利尿、活血化瘀、舒经活络和解毒消肿的功效。煎服可治疗咽喉炎、气管炎、中耳炎、高血压、肝炎、肺炎、风湿关节炎、咳血、便血等<sup>[7]</sup>。外用主治外伤出血、跌打外伤、

**收稿日期:** 2018-07-03      **录用日期:** 2018-10-04

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31571896); 福建省教育厅科技 B 类项目 (JB14209); 漳州卫生职业学院自然科学课题 (ZWYZ201807)

**\*通信作者:** yshi@xmu.edu.cn

乳腺炎、阴道炎等<sup>[7]</sup>。

近年来,黄酮等天然产物逐渐成为抗癌药物开发的热点。有报道马鞭草总黄酮可有效抑制人肝癌 HepG-2 细胞增殖,降低 HepG2 细胞侵袭力,并呈现明显的浓度依耐性<sup>[5,8]</sup>;高良姜总黄酮能明显抑制宫颈癌 SiHa 细胞的增殖、同时诱导细胞凋亡<sup>[9]</sup>。黄芩黄酮类化合物作用 HeLa 细胞后,细胞的增殖和迁移能力受到明显抑制,同时处于 S 期的细胞比例增大,且作用呈现时间与剂量依赖性<sup>[10]</sup>。三七属植物多含生物碱、黄酮、挥发性萜类活性成分,然而关于白凤菜总黄酮的抗肿瘤活性研究目前还未见报道。

本研究通过不同浓度白凤菜总黄酮 (total flavonoids of *Gynura formosana* Kitam., TFG) 作用于肝癌 HepG2 细胞后,观察细胞的生长形态、细胞的存活率、细胞的迁移能力、细胞周期及细胞的凋亡情况,并通过检测细胞内活性氧水平及细胞内 Bax 和 Bcl-2 蛋白含量的变化,探讨了白凤菜总黄酮抑制肝癌细胞的可能作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

试剂: DMEM 高糖培养基(上海 Sangon 公司),胎牛血清(澳大利亚 AusGeneX 公司), RNase A (北京全式金生物技术公司),青链霉素混合液(美国 Hyclone 公司), 0.25% Trypsin-EDTA 消化液(美国 Hyclone 公司),活性氧试剂盒(上海碧云天生物技术研究所),碘化丙啶(上海 sangon 公司), Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒(上海 sangon 公司),噻唑兰(MTT)干粉(美国 Sigma-Aldrich 公司),吉姆萨染色液(上海 sangon 公司),AO/EB 染色试剂盒(上海碧云天生物技术研究所); $\beta$ -actin (HRP-Conjugate)抗体(上海 sangon 公司,NO.D190826);一抗: Bax 抗体(上海 sangon 公司,NO.D190756)和 Bcl-2 抗体(上海 sangon 公司,NO.D195310);HRP 标记的小鼠抗兔二抗(上海 sangon 公司,NO.D190756)。其他试剂均为国产分析纯。

仪器设备:流式细胞仪 Beckman Coulter FC500(美国),倒置相差显微镜 Nikon TE2000(日本),pH 计 METTLER TOLEDO FE20(上海),全波长酶标仪 Thermo Fisher MULTISKAN GO(美国),凝胶成像仪 GE Image Quant LAS 4000 mini(美国)。

### 1.2 白凤菜总黄酮的制备

白凤菜乙醇提取液转入大孔树脂柱,用 70%乙醇溶液洗脱,将洗脱液旋转蒸发浓缩,获得白凤菜总黄酮浸膏。所得浸膏用双蒸水溶解,将溶解液经 0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜依

次过滤，最终获得白凤菜总黄酮样液。根据亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法使样液显色，测定吸光度，计算样液白凤菜总黄酮含量<sup>[6]</sup>。

### 1.3 细胞培养

HepG2 (human hepatocellular carcinoma cells) 细胞来自厦门大学细胞应激国家重点实验室，将 HepG2 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中，添加双抗（青霉素 100 U/mL，链霉素 100 U/mL），培养箱控制温度 37 °C，CO<sub>2</sub> 浓度 5%。

细胞汇合度达到 70%~90%时传代，0.25% Trypsin-EDTA 消化细胞 1~2 min，1800 r/min 离心 3 min，弃去 Trypsin-EDTA，重悬细胞于培养基，传代比例为 1:3。

### 1.4 指标与方法

#### 1.4.1 细胞存活率的检测

收集指数生长期的细胞，以 10000 个/孔接种于 96 孔板，设 5 个重复孔。贴壁过夜后，实验组加白凤菜总黄酮，每组终浓度分别达到 25、50、100、150、200、300、400 μg/mL，于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 h 和 48 h，随后更换 DMEM 完全培养基，加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 10 μL，继续孵育 4 h，液体全部吸出，每孔加入二甲基亚砜 150 μL，摇床震荡 10 min，于酶标仪发射波长 490 nm 检测吸光度，计算细胞活力和抑制率。96 孔板上的无细胞只有 MTT 反应试剂的孔为空白对照，板上有 HepG2 细胞无添加白凤菜总黄酮的孔为对照组。细胞活力计算公式：

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{实验组OD} - \text{空白对照OD}}{\text{对照组OD} - \text{空白对照OD}} \times 100\%$$

抑制率计算公式：

$$\text{抑制率} = (1 - \text{细胞存活率}) \times 100\%$$

应用 Origin 8.0 进行 MTT 实验数据的分析，获得拟合曲线和半抑制浓度 ( $IC_{50}$ )。

#### 1.4.2 细胞形态学观察

消化收集细胞，以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板，隔夜后，设置各组药物浓度为 0、65、130、260 μg/mL，培养箱中孵育 24 h，随后在相差倒置显微镜下进行细胞形态学观察。

#### 1.4.3 细胞荧光凋亡检测

按照 BBI 试剂盒说明操作，消化收集指数生长期的细胞，以 20000 个/mL 接种于 12 孔板，每孔培养基 2 mL，置于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 恒温培养箱贴壁 12 h。弃去旧培养基，加入含药物的培养基 2 mL，浓度分别为 65、130、260 μg/mL，培养箱孵育 24 h。弃去药物，PBS

洗涤 3 遍，加入 1×buffer 至覆盖细胞。每孔加入 5 μL AO 和 5 μL EB，避光室温孵育 30 min，用荧光倒置显微镜观察荧光。

#### 1.4.4 细胞迁移能力检测

将 HepG2 细胞以  $5 \times 10^6$  个/mL 密度接种 2 mL 于 6 孔板。贴壁后用 10 μL 枪头在孔底笔直划取痕迹，保持划痕宽度相同。PBS 洗 2 遍，加入无血清培养基，立即在显微镜下拍摄划痕。用终浓度为 0、65、130 和 260 μg/mL 的白凤菜总黄酮处理细胞，期间细胞用无血清培养基培养。48 h 后在相同倍数拍摄划痕。对比处理前后划痕的宽度，以此得出细胞迁移情况。

#### 1.4.5 细胞周期检测

取处于指数生长期的 HepG2 细胞，以  $1 \times 10^6$  个/mL 接种 2 mL 于 6 孔板，培养箱中孵育过夜。各组分别用 0、65、130、260 μg/mL 浓度的药物作用于细胞 24 h，之后各自收集培养体系内全部细胞，PBS 洗涤 2 次，离心弃去 PBS。用 -20 °C 预冷的 70% 乙醇重悬，放置于 4 °C 1 h。1200 r/min 离心 5 min，收集沉淀，PBS 洗涤 2 次，并用 500 μL PBS 重悬。加入 5 μL 10 mg/mL PI 染液和 2.5 μL 20 mg/mL RNase A，避光室温孵育 30 min。300 目尼龙筛过滤细胞，进入流式细胞仪检测细胞周期。

#### 1.4.6 细胞流式凋亡检测

按照 BBI 公司的凋亡检测试剂盒说明操作。各组分别用 0、65、130、260 μg/mL 浓度的药物作用于细胞 24 h，之后消化，1800 r/min 离心 5 min 收集全部细胞，用 PBS 洗涤细胞 1 次，用 195 μL 的 1×结合液重悬细胞，使细胞浓度在  $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$  个/mL，加入 5 μL Annexin V-FITC，避光室温孵育 15 min，用 200 μL 1×结合液洗涤一遍，1000 r/min 离心 5 min，弃上清，用 190 μL 1×结合液重悬细胞，加入 10 μL PI，避光室温孵育 15 min 后用流式细胞仪检测。

#### 1.4.7 细胞活性氧检测

使用碧云天活性氧检测试剂盒。指数生长期的细胞孵育于培养箱 12 h 使其完全贴壁，施加 0、65、130、260 μg/mL 浓度的药物 24 h 后，PBS 洗涤 2 遍，收集细胞。按照 1:1000 添加 DCFH-DA 至无血清培养基。重悬细胞于 DCFH-DA 稀释液中，37 °C 孵育 20 min，期间适时振荡混匀。用无血清培养基洗涤细胞 3 次，PBS 重悬，300 目尼龙网过滤后，流式细胞仪检测荧光，激发波长 488 nm，发射波长 525 nm。

#### 1.4.8 细胞内 Bax 和 Bcl-2 蛋白含量检测

用 0、65 和 130 μg/mL 浓度的药物分别处理各组细胞 24 h，裂解细胞提取总蛋白，用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度。

Western blot: SDS-PAGE 分离蛋白, PVDF 膜转膜 2 h。封闭液浸泡 15 min 进行封闭; 加入  $\beta$ -actin、Bax、Bcl-2 一抗 4 °C 孵育过夜; 然后加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h。按 HRP-ECL 试剂盒说明操作显影。

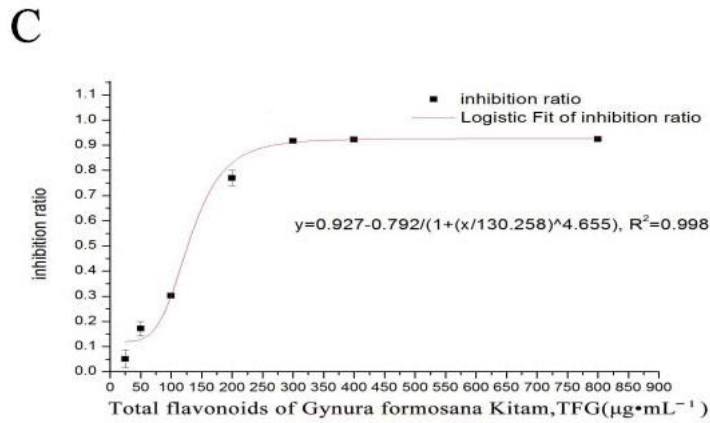
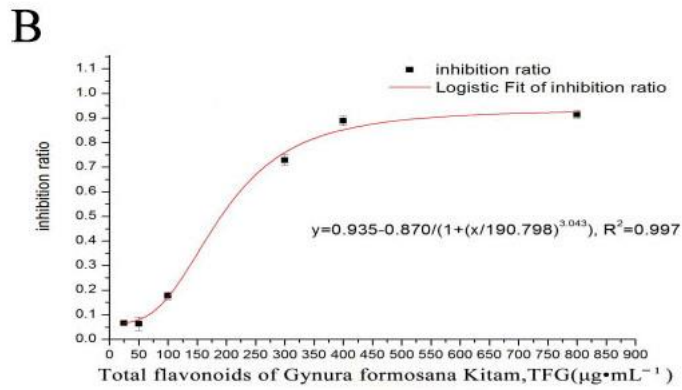
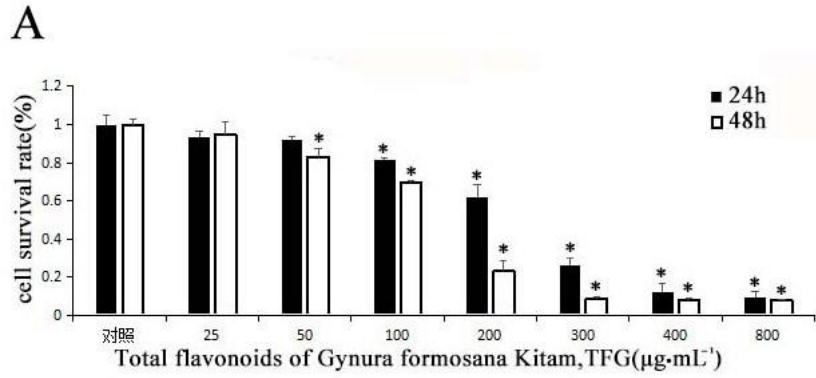
## 1.5 统计学处理

使用统计软件 SPSS 21.0 进行数据统计、分析, 结果采用平均值 $\pm$ 标准差表示, 独立样本采用 *t*-检验, 组间比较用单因素方差分析 (ANOVA),  $p < 0.05$  为差异有统计学意义。

# 2 结果与分析

## 2.1 TFG 对肝癌 HepG2 细胞存活率的影响

结果表明 (图 1A), 白凤菜总黄酮对肝细胞癌细胞 HepG2 的体外增殖有明显的抑制作用, 实验组与对照组比较差异有统计学意义 ( $p < 0.05$ ), 抑制作用有浓度和时间依赖效应。TFG 对人肝癌细胞 HepG2 作用 24 h 的  $IC_{50}$  为 190.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (图 1B); 48 h 的  $IC_{50}$  为 165.87  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (图 1C)。



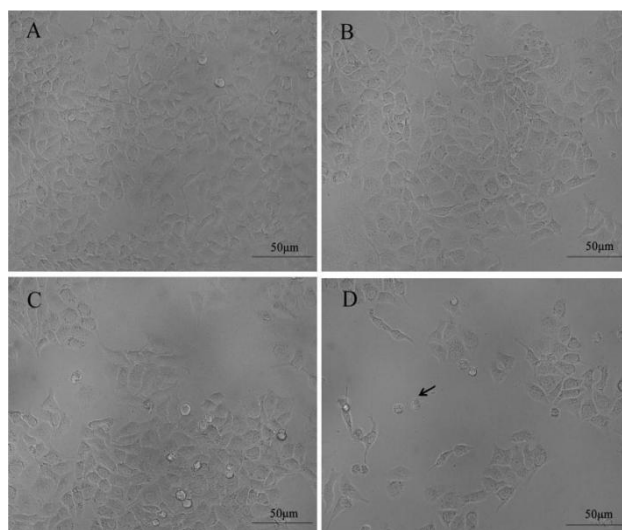
注：\*表示实验组与对照组有显著差异 ( $p<0.05$ )。

图 1 TFG 对肝癌 HepG2 细胞的体外增殖抑制作用

Fig. 1 Effects of TFG on HepG2 cell proliferation inhibition *in vitro*

## 2.2 TFG 对肝癌 HepG2 细胞形态的影响

如图 2 所示：随着 TFG 浓度的增大，HepG2 细胞形态皱缩，边缘粗糙，呈不规则状，胞体折光度减小，内含物减少；260  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFG 处理的 HepG2 细胞出现凋亡小体。



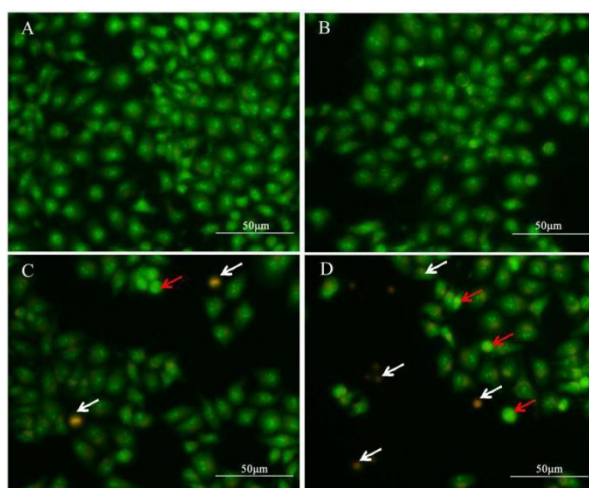
A.对照组; B.65  $\mu\text{g/mL}$  TFG; C.130  $\mu\text{g/mL}$  TFG; D.260  $\mu\text{g/mL}$  TFG, 黑色箭头所指为凋亡小体。

图2 相差显微镜观察 HepG2 细胞经 TFG 处理 24 h 后细胞形态的变化

Fig. 2 Observation on morphology of HepG2 treated with TFG for 24 h by phase contrast microscope

### 2.3 TFG 对肝癌 HepG2 细胞核形态的影响

如图 3 所示: 对照组中细胞核排列比实验组紧密, 核染色质分布均匀, 发出绿色荧光。65 $\mu\text{g/mL}$  TFG 实验组中细胞排列疏松, 发出淡绿色荧光, 个别细胞核发出橙红色荧光。130  $\mu\text{g/mL}$  TFG 实验组中细胞数量减少, 出现发明亮绿光和红光的细胞核。260  $\mu\text{g/mL}$  TFG 实验组中细胞数量明显减少, 大量细胞发生了染色质的凝集和细胞膜破损, 许多细胞核发明亮绿光和红光。



A.对照组; B.65  $\mu\text{g/mL}$  TFG; C.130  $\mu\text{g/mL}$  TFG; D.260  $\mu\text{g/mL}$  TFG。

红色箭头代表细胞核发明亮绿光, 白色箭头代表细胞核发红光。

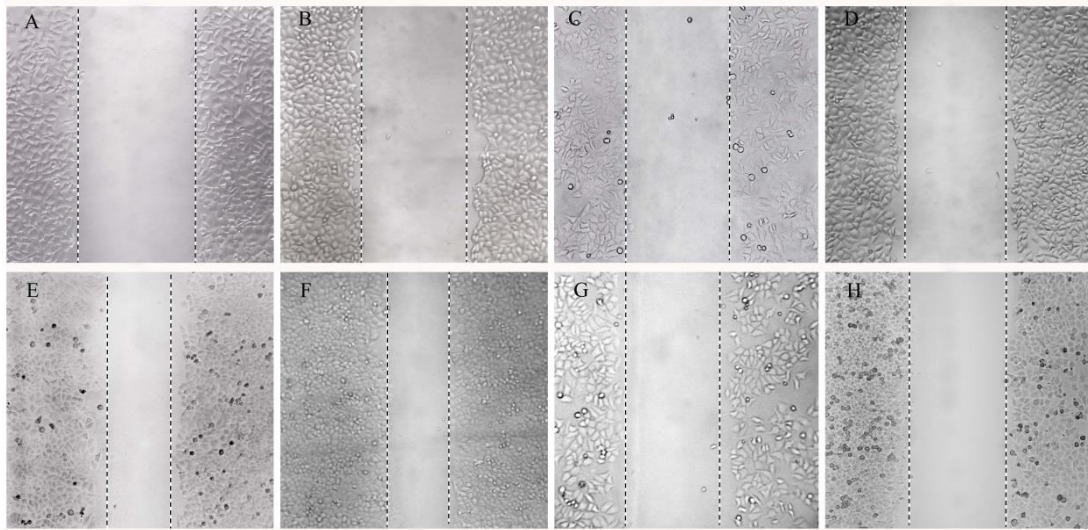
图3 吡啶橙/溴化乙锭染色观察 HepG2 细胞经 TFG 处理 24 h 后细胞核形态的变化

Fig. 3 Morphological changes of HepG2 cell nucleus treated with TFG by AO/EB staining

## 2.4 TFG 对肝癌 HepG2 细胞迁移能力的影响

如图 4 所示：划痕处理 48 h 后，对照组与 65  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFG 实验组两划痕线间的距离明显变窄；而 130 和 260  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFG 实验组划痕宽度并未发生显著变化。

为了较准确量化白凤菜总黄酮对肝癌 HepG2 细胞迁移能力的影响，测定 0 和 48h 的两划痕线间的距离，相减得出细胞迁移的距离，再求得细胞迁移率。结果显示（图 5）：当 TFG 处理肝癌 HepG2 细胞后，3 个实验组细胞的迁移率与对照组相比有显著差异( $p < 0.05$ )。

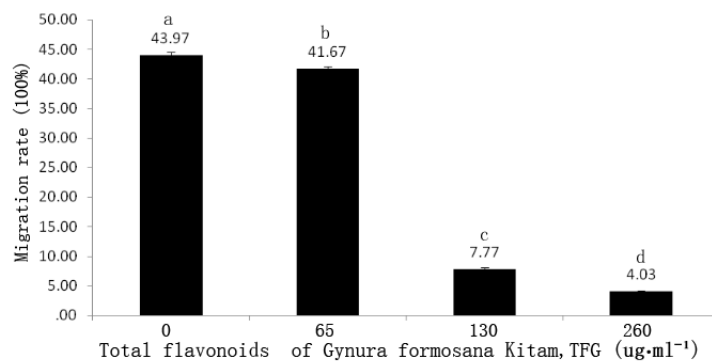


A. 对照组; B.65  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFG; C.130  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFG; D.260  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFG 为划痕处理 0 h;

E. 对照组; F.65  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFG; G.130  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFG; H.260  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFG 为划痕处理 48 h。

图 4 白凤菜总黄酮对肝癌 HepG2 细胞迁移能力的影响

Fig. 4 Impact of TFG on HepG2 cell migration ability



不同字母表示不同实验组存在显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

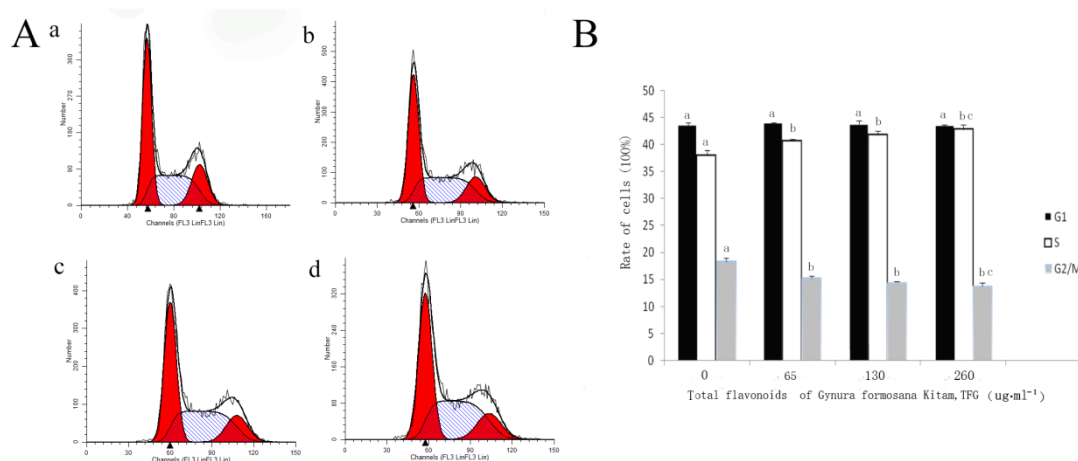
图 5 肝癌 HepG2 细胞在白凤菜总黄酮作用下的迁移率

Fig. 5 Migration rates of HepG2 treated with TFG



## 2.5 TFG 对肝癌 HepG2 细胞周期分布的影响

如图 6 所示：处理 24 h 后，实验组与对照组相比，HepG2 细胞在 S 期的数量显著增多 ( $p < 0.05$ )，由对照组的 ( $38.03 \pm 0.86$ ) % 增加到 260  $\mu\text{g/mL}$  TFG 实验组的 ( $42.79 \pm 0.83$ ) %；同时，G2/M 的细胞显著减少 ( $p < 0.05$ )，由对照组的 ( $18.38 \pm 0.67$ ) % 减少到 260  $\mu\text{g/mL}$  TFG 实验组的 ( $13.79 \pm 0.58$ ) %。该结果表明 TGF 可影响肝癌 HepG2 细胞周期分布，细胞阻滞于 S 期。



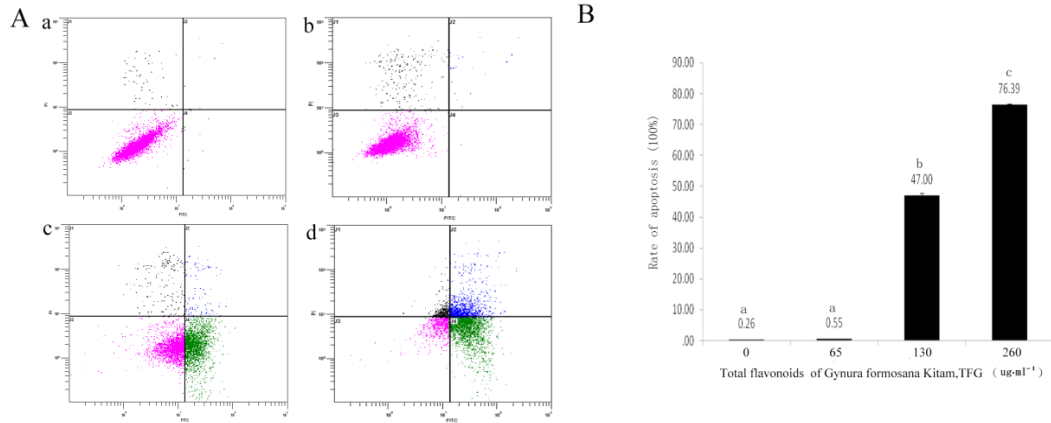
A. 流式图：a 为对照组，b 为 65  $\mu\text{g/mL}$  TFG，c 为 130  $\mu\text{g/mL}$  TFG，d 为 260  $\mu\text{g/mL}$  TFG；B. 不同字母表示不同处理组存在显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

图 6 HepG2 细胞经 TFG 处理 24 h 后细胞周期分布变化

Fig. 6 Variation of cell cycle on HepG2 treated with different concentrations of TFG for 24 h

## 2.6 TFG 对肝癌 HepG2 细胞凋亡的诱导

如图 7 所示：处理 24 h 后，随着 TFG 浓度的增加，细胞的 FITC 荧光呈现阳性偏移，表明凋亡细胞比例增加；对照组 HepG2 细胞的凋亡率为 ( $0.26 \pm 0.03$ ) %，65、130 和 260  $\mu\text{g/mL}$  TFG 实验组 HepG2 细胞的凋亡率分别为 ( $0.55 \pm 0.05$ ) %、( $47 \pm 1.31$ ) % 和 ( $76.39 \pm 1.39$ ) %。当 TFG 浓度达到 130 和 260  $\mu\text{g/mL}$  时，HepG2 细胞明显凋亡，与对照组相比具有显著性差异 ( $p < 0.05$ )。



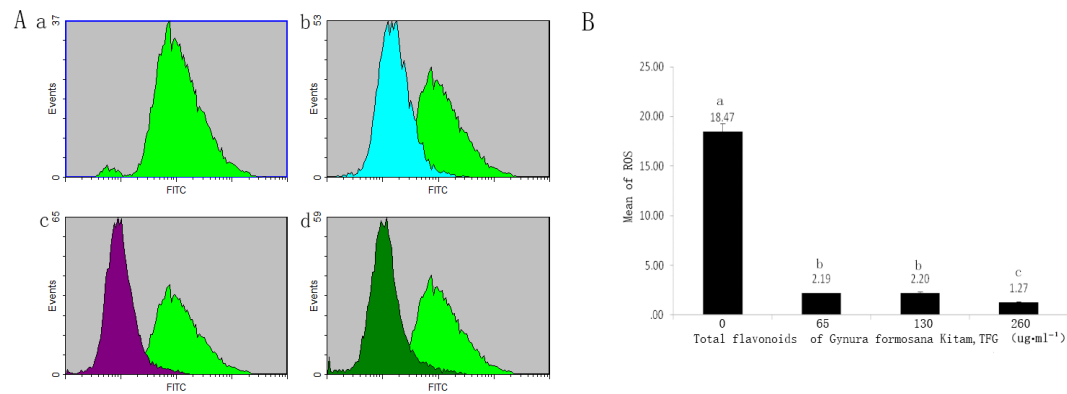
A.流式图: a 为对照组, b 为 65 µg/mL TFG, c 为 130 µg/mL TFG, d 为 260 µg/mL TFG; B.不同字母表示不同处理组存在显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

图 7 HepG2 细胞经不同浓度 TFG 处理 24 h 后凋亡率的变化

Fig. 7 Variation of apoptosis rates on HepG2 treated with different concentrations of TFG for 24 h

## 2.7 TFG 处理肝癌 HepG2 细胞后细胞活性氧含量的影响

如图 8 所示, 处理 24 h 后, 对照组与实验组的细胞内 ROS 水平存在显著性差异 ( $p < 0.05$ )。ROS 水平在 TFG 达到 65 µg/mL 时就明显下降; 当 TGF 达到 260 µg/mL 时, HepG2 细胞内 ROS 水平下降 14.5 倍 ( $p < 0.05$ )。



A. 流式图: a 为对照组, b 为 65 µg/mL TFG, c 为 130 µg/mL TFG, d 为 260 µg/mL TFG B.不同字母表示不同处理组存在显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

图 8 HepG2 细胞经白凤菜总黄酮 (TFG) 处理 24 h 后细胞内活性氧的变化

Fig. 8 Variation of ROS on HepG2 treated with different concentrations of TFG for 24 h

## 2.8 TFG 处理肝癌 HepG2 细胞后凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的变化

在细胞凋亡过程中的 Bcl-2 蛋白家族起着重要的调节作用, Bax 是促凋亡蛋白, Bcl-2

是凋亡抑制蛋白。提取对照组与 65  $\mu\text{g/mL}$ 、130  $\mu\text{g/mL}$  TFG 实验组的细胞总蛋白进行 Western blot 检测，发现 Bax 的表达略微增加，Bcl-2 的表达量明显降低（图 9）。

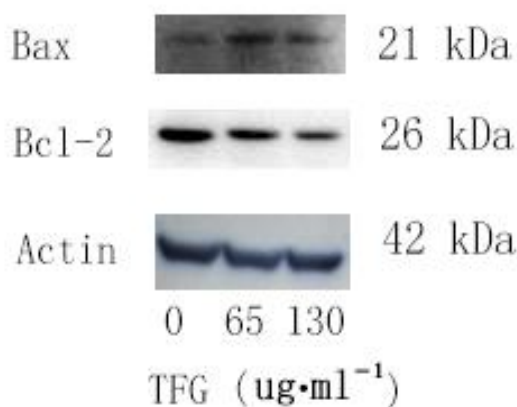


图 9 TFG 对 HepG2 细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig. 9 TFG's impact on Bax and Bcl-2 expression of HepG2

### 3 讨论

肝癌是我国常见的恶性肿瘤，发病率呈上升趋势，目前手术、化疗、放疗等已能广泛有效地控制病情，但是该病高复发率和高转移率影响治疗效果。来自自然的营养素能有效消除癌细胞<sup>[11]</sup>，探索天然、高效和低毒的天然药物进行长期的辅助抗癌具有重要的意义<sup>[12]</sup>。

白凤菜具有多种药理作用，含有丰富的、有治疗作用的黄酮，适合患者长期食用。有研究证实，高浓度白凤菜水提口服液具有阻止小鼠胃肠在机体糖负荷情况下对葡萄糖的吸收的作用<sup>[13]</sup>，白凤菜叶提取物能一定程度提高抗氧化酶活性和抑制促炎性因子表达，抑制大鼠的炎症<sup>[14]</sup>，白凤菜醇提取物对斑马鱼慢性酒精性脂肪肝具有防治作用，能够有效减轻肝脏的炎症病理<sup>[15]</sup>，白凤菜醇提取物可治疗大鼠非酒精性脂肪肝，明显降低非酒精性脂肪肝模型大鼠血脂（TG、TC）、ALT 及 AST 的水平<sup>[16]</sup>，白凤菜的乙酸乙酯提取物通过自噬作用抑制 HeLa 细胞的增殖，并非通过细胞凋亡途径抑制癌细胞增殖<sup>[17]</sup>。本研究通过 MTT 实验、V-FITC/PI 双染流式细胞术、划痕实验和细胞形态显微镜观察发现白凤菜总黄酮（TFG）对肝癌 HepG2 细胞具有增殖抑制、迁移抑制及凋亡促进作用。

各类细胞在生命周期中不断的产生和清除细胞内新陈代谢产物活性氧，在不同细胞中 ROS 的表达水平也不同。肿瘤细胞中高水平的 ROS 有助激活原癌基因，利于维持其细胞生长、增殖，导致 DNA 损伤和遗传不稳定性；肿瘤细胞会提高抗氧化蛋白的表达来消除高 ROS 的影响，建立氧化还原平衡，维持原癌基因信号通路，防止细胞凋亡<sup>[18]</sup>。有研究证实

通过化学或生物学的抗氧化剂降低肿瘤细胞 ROS 水平, 重新构建细胞内还原系统, 实现降低肿瘤细胞的增殖的目的<sup>[11,18,19]</sup>。总黄酮具有抗氧化作用, 本研究结果显示, 当 HepG2 细胞被 TFG 作用后, 细胞内的 ROS 水平显著降低 ( $p < 0.05$ ), 改变细胞内氧化还原状态, 可能细胞在低 ROS 水平下的相关信号传导途径会改变, 从而抑制了 HepG2 细胞的生长, 并进一步引起细胞凋亡。

Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 家族的重要蛋白, 与凋亡关系最密切。促凋亡蛋白 Bax 位于细胞线粒体膜上, 寡聚化形成一个跨膜通道, 增加膜通透性, 导致膜电位降低<sup>[20]</sup>。位于内质网膜上的 Bcl-2 可能通过阻断  $Ca^{2+}$  从内质网向胞质中的流动, 可与 Bax 结合, 形成异源二聚体, 阻止细胞凋亡<sup>[21]</sup>。本研究中 65 和 130  $\mu\text{g/mL}$  TFG 实验组 Bax 的表达略微增加, Bcl-2 的表达量明显降低, Bax 较 Bcl-2 相对增高时, 则可能形成大量的 Bax-Bax 同源二聚体, 两种凋亡调控蛋白间的平衡被打破, 进而促使细胞凋亡<sup>[22-24]</sup>。

本研究显示, 不同浓度的白凤菜总黄酮作用于 HepG2 细胞 24 和 48 h 后, 当剂量小于 50  $\mu\text{g/mL}$  时, 延长给药时间, 细胞存活率无显著性差异; 而当剂量大于 100  $\mu\text{g/mL}$  时, 延长给药时间, 细胞存活率有显著性差异, 随 TFG 浓度的增加而下降, 细胞皱缩, 染色质凝集, 细胞迁移能力下降, 细胞周期被阻滞在 S 期, 荧光凋亡探针呈现阳性, 胞内活性氧含量显著降低, 凋亡相关蛋白 Bax 表达量上升, Bcl-2 表达量下降。综上所述, 一定浓度的 TFG 具有抑制细胞活性并诱导细胞凋亡的能力。本研究结果为进一步研究和开发白凤菜总黄酮做为抗肝癌的天然药物提供了理论基础。

## 参考文献:

- [1] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [2] 叶胜龙. 关注原发性肝癌多学科治疗[J]. 中国医学前沿杂志. 2014, 6(5):1-3.
- [3] 吴立军. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003:173-216.
- [4] 林瑶, 谭冰, 韦文荣, 等. 不同提取法对广金钱草总黄酮抗氧化活性的影响研究[J]. 右江民族医学院学报, 2016, 38(4):364-367.
- [5] 任丽平, 李先佳, 朱宝安. 马鞭草总黄酮对 HepG-2 细胞增殖及侵袭力影响[J]. 中国公共卫生, 2016, 32(7):935-937.
- [6] 林燕燕, 罗秀针, 曹林枝, 等. 超声下白凤菜总黄酮的优化提取及其体外抑菌活性研究[J]. 右江民族医学院学报, 2017, 39(2):90-93.

- [7]邱年永.原色台湾药用植物图鉴（第四册）[M].台湾:南天书局,1986:244.
- [8]李先佳,任丽平,金少举. 马鞭草总黄酮对肝癌 HepG-2 细胞凋亡的影响机制研究[J].现代预防医学, 2017, 44(15):2813-2816, 2822.
- [9]赛米热·艾尼瓦尔热,木塔力甫·艾买提,古扎力努尔·买提沙地克,等. 高良姜总黄酮对宫颈癌 SiHa 细胞增殖和凋亡的影响[J].新疆医学大学学报, 2015,38(8):958-962, 967.
- [10]张艳霞.黄芩黄酮类化合物体外抗宫颈癌作用的研究[D].秦皇岛:燕山大学, 2013:15.
- [11]SAHDEO P, SUBASH C, AMIT K. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: role of antioxidative nutraceuticals[J].Cancer Letters , 2017,387:95-105.
- [12]木合布力·阿布力孜,王永波,徐方野,等. 异甘草素和 3-甲氧基异甘草素对人肝癌 Bel-7402 细胞的抗癌活性[J].中国药理学通报,2014,30(06):887-888.
- [13]顾员印,丁淑梅,孙翠翠,等. 白凤菜对机体糖耐量影响的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2017,44(5):1547-1551.
- [14] MA J F, GUO C, PAN Y L, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of ethyl acetate extract of *Gynura formosana* (Kitam) leaves[J]. Experiment and Therapeutic Medicine, 2017, 14:2303-2309.
- [15]陈灿滨,陈志亮,薛钰,等. 白凤菜醇提物对斑马鱼酒精性脂肪肝损伤的修复[J].牡丹江师范学院学报, 2016,(94):53-56.
- [16]WAN Y, XU W, LIU L Y, et al. Therapeutical effect of *Gynura formosana* alcohol extract on Nonalcoholic fatty liver disease in rats[J]. New Century Science Press, 2014,2(2):1-6.
- [17]MA J F, WEI P F, GUO C, et al. The ethyl acetate extract of *Gynura formosana* Kitam. Leaves inhibited cervical cancer cell proliferation via induction of autophagy[J]. BioMed Research International, 2018,2018:1-10.
- [18]JENNIFER N, THOMAS G. ROS signalling in the biology of cancer [J]. Cell & Developmental Biology, 2018,80:50-64.
- [19]SUN Z L, DONG J L, WU J. Juglanin induces apoptosis and autophagy in human breast cancer progression via ROS/JNK promotion[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 85:303-312.
- [20]HADDAD J J. The role of Bax/Bcl-2 and pro-caspase peptides in hypoxia/reperfusion-dependent regulation of MAPK(ERK): discordant pro-teomic effect of MAPK(p38)[J]. Protein Pept Lett, 2007, 14(4):361-371.
- [21]LIANG M, LI A, LOU A, et al. Advanced oxidation protein products promote NADPH

oxidase-dependent beta-cell destruction and dysfunction through the Bcl-2/Baxapoptotic pathway[J]. Lab Invest,2017,97(7):792-805.

[22]李立祥, 熊奇如, 耿小平, 等. 肝细胞肝癌中 5-LOX 的表达及其与 Bcl-2 和 bax 表达的关系[J].肝胆外科杂志, 2008, 16(1):24-27.

[23]FRANK E. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns[J].Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 500:26-34.

[24]FAN J, LI R, ZHANG R. Effect of Bcl-2 and Bax on survival of side population cells from hepatocellular carcinoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(45):6053-6059.

## **Influence of Total Flavonoids of *Gynura formosana* Kitam. on the Growth, Proliferation, and Apoptosis of Hepatoma HepG2 Cell Line**

LIN Yanyan<sup>1</sup>, XU Xinheng<sup>2</sup>, HUANG Zhongqing<sup>1</sup>, LIN Zheyuan<sup>1</sup>,

LUO Xiuzhen<sup>1</sup>, SHI Yan<sup>2\*</sup>

(1.Faculty of Basic Medicine, Zhangzhou Health Vocational College, Zhangzhou 363000, China;

2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

**Abstract:** This paper investigated the effects of total flavonoids of *Gynura formosana* Kitam. (TFG) on the growth, proliferation and apoptosis of HepG2 cells. The MTT assay detected that TFG had dose- and time-dependent effects on the proliferation inhibition of HepG2 cells. The apoptosis rates of HepG2 cells treated with TFG of 130  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 260  $\mu\text{g}/\text{ml}$  increased significantly by 47% and 76.39%, respectively ( $p < 0.05$ ); the half-concentration of inhibition ( $\text{IC}_{50}$ ) in 24 h was 190.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The TFG-treated groups exhibited the HepG2 cell cycle was remarkably arrested in S phase ( $p < 0.05$ ); the cell mobility was decreasing with the increasing of TFG concentration; the ROS levels of HepG2 cells declined 14.5-fold ( $p < 0.05$ ); the Bax expression in cells was up-regulated and Bcl-2 expression was down-regulated. The mechanism of inhibiting the HepG2 cells proliferation and inducing the HepG2 cells apoptosis may be related to

the reduction of ROS levels, rebuilding of the intracellular redox system, up-regulation of apoptosis promoting protein Bax and down-regulation of apoptosis inhibiting protein Bcl-2.

**Key words:** *Gynura formosana* Kitam.; total flavonoids; cell proliferation; cell cycle; cell apoptosis