

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.12.017

实验研究

不同浓度槲皮素对人肝癌细胞株 Hep3B、Huh7 细胞凋亡的影响

陈兆勋^{1,2}, 高彦宇², 李 冀^{2*}

(1. 台湾大学, 台湾省台北市罗斯福路四段一号, 10617; 2. 黑龙江中医药大学)

摘要 目的 观察不同浓度槲皮素对人肝癌细胞株 Hep3B、Huh7 凋亡的影响。方法 将人肝癌细胞株 Hep3B、Huh7 分别种植于 96 孔板中, 每孔 2×10^5 个细胞, 设 6 个复孔, 放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养至贴壁生长。加入不同浓度槲皮素 (0、10、50、100 μM) 干预, 48 h 后用胰蛋白酶收集细胞, 利用流式细胞仪分析不同浓度槲皮素干预下 Hep3B、Huh7 细胞周期分布情况。结果 槲皮素浓度为 10、50、100 μM 时, Hep3B 和 Huh7 在 Pre-G0 期随浓度增加所占百分比升高, 并且以 100 μM 时所占百分比最高 ($P < 0.01$), 而在不同浓度槲皮素干预下的 G1 期、S 期和 G2/M 期时 Hep3B 和 Huh7 所占百分比显著降低 ($P < 0.01$)。结论 槲皮素可诱导人肝癌细胞株 Hep3B、Huh7 的凋亡, 并且以浓度为 100 μM 时效果最好。

关键词 槲皮素; 肝癌; Hep3B; Huh7; 细胞凋亡; 细胞周期

槲皮素是一种典型的黄酮类化合物, 通常当作苷元, 可以被消化道吸收并进行后续代谢转换^[1], 在肠道吸收后会转变为代谢产物, 这些代谢产物可在血管循环系统中发现。而有研究表明, 槲皮素的代谢产物可通过上调促凋亡蛋白以及下调抗凋亡蛋白来促进人体肺癌细胞株 NCI-H209 凋亡, 从而抑制肺癌细胞的增殖^[2]。槲皮素及其他相关黄酮类化合物可通过不同的机制来达到预防癌症的效果, 包括抗氧化作用、抑制活化致癌物的酵素、讯息传递途径的修正及一些蛋白质的交互作用^[3-5]。本实验通过观察不同浓度的槲皮素对人体肝癌细胞株 Hep3B、Huh7 凋亡的影响, 从而探讨槲皮素的抗肝癌作用及量效关系。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人肝癌细胞株 Hep3B、Huh7 由台湾国立中山大学提供。

1.2 主要试剂及仪器

PBS 溶液 (Summus 公司, 货号: S75853); 二

甲基亚砷 (DMSO, Summus 公司, 货号: S40010); 胰蛋白酶 (HyClone 公司, 货号: SH30042.01); Triton X-100 (Sigma 公司, 货号: 9002-93-1); RNase A (Sigma 公司, 货号: R6148); 碘化丙啶 (PI, Sigma 公司, 货号: 25535-16-4); 流式细胞仪 (ELITEESP 型, 美国 Coulter 公司); 低速离心机 (KDL-40 型, 科大创新股份有限公司中佳分公司); 电子分析天平 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司。

1.3 药物

槲皮素 (Sigma 公司, 货号 CAS6151-25-3), 加入 0.3 g 的槲皮素至离心管, 加入 DMSO 至 10 cc, 振动至溶解, 浓度为 0.1 M (贮备原液), 分装各 1 ml 至 ependorf 避光小管中, 共 10 瓶, 于 -20℃ 冰箱保存。

1.4 细胞分期

细胞周期是指细胞从一次分裂完成开始到下一次分裂结束所经历的全过程, 分为间期与分裂期两个阶段。间期又分为 DNA 合成前期 (G1 期)、DNA 合成期 (S 期) 及 DNA 合成后期 (G2 期)。M 期指细胞分裂期, G0 期指细胞休眠期, Pre-G0 期代表细胞脱离细胞分裂期进入休眠期阶段^[6]。

1.5 细胞培养

吸掉媒介; 用 10 ml PBS 溶液洗掉含有血清的

基金项目: 国家自然科学基金 (81373536); 黑龙江中医药大学优秀领军人才支持计划

* 通讯作者: wangyanli.300@163.com, 13206563169

媒介 (因为血清会降低胰蛋白酶作用), 用吸管吸干; 加入 0.25% 胰蛋白酶 1 ml, 振摇后放入保温箱 2~3 min, 取出并拍打; 加入 5 ml 媒介, 再移入离心管 (共有 6 ml); 1500 r/min, 离心 5 min; 离心后, 吸干上清液; 加入 500 μ l 媒介至离心管, 并拍散; 新培养瓶用 5 ml PBS 清洗, 吸干, 加入 10 ml 媒介; 从离心管中吸取 100 μ l 加至新培养瓶中, 放入培养箱中继续培养细胞, 剩余细胞实验用。

1.6 分组及给药

将人肝癌细胞株 Hep3B、Huh7 分别种植于 96 孔板中, 每孔 2×10^5 个细胞, 设 6 个复孔, 放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养至贴壁生长。加入不同浓度槲皮素 (0、10、50、100 μ M) 干预。48 h 后用胰蛋白酶收集细胞, 用离心机 1500 r/min 离心 5 min, 去除上清液, 加入 PBS 清洗细胞, 再 2000 r/min 离心 5 min, 去除 PBS, 加入冰冷的 70% 酒精, 于 -20℃ 冰箱保存。24 h 后 2000 r/min 离心 5 min 去除酒精, 加入 PBS 清洗细胞, 再 2000 r/min 离心 5 min, 去除 PBS。避光加入染色剂 1 ml, 染色剂: 1% Triton X-100, 0.1 mg/ml RNase A, 4 g/ml PI。以 0 μ M 槲皮素组为对照组, 利用流式细胞仪分析不同 DNA 含量的细胞分布情况。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用配对 t 检验。

2 结果

2.1 不同浓度槲皮素对人肝癌细胞株 Hep3B 凋亡的影响

表 1 示, 槲皮素浓度 10、50、100 μ M 时, Hep3B 在 Pre-G0 期所占百分比随槲皮素浓度增加

而增加, 浓度 50、100 μ M 时 Pre-G0 期所占百分比显著高于浓度为 0 和 10 μ M 时 ($P < 0.01$), 且浓度 100 μ M 时显著高于浓度为 50 μ M 时 ($P < 0.01$)。Hep3B 在 G1 期时浓度为 10、50、100 μ M 时所占百分比显著低于浓度为 0 μ M 时 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Hep3B 在 S 期浓度为 100 μ M 时所占百分比显著低于浓度为 50 μ M 时 ($P < 0.01$)。Hep3B 在 G2/M 期时浓度为 10、50、100 μ M 时所占百分比显著高于浓度为 0 μ M 时 ($P < 0.01$)。

2.2 不同浓度槲皮素对人肝癌细胞株 Huh7 凋亡的影响

表 2 示, 槲皮素浓度为 0、10、50、100 μ M 时, Huh7 在 Pre-G0 期所占百分比随槲皮素浓度增加而增加, 不同浓度之间两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。Huh7 在 G1 和 S 期时, 浓度为 10、50、100 μ M 与浓度为 0 μ M 比较, 所占百分比均显著降低 ($P < 0.01$), 且浓度为 50、100 μ M 时所占百分比亦低于浓度为 10 μ M 时 ($P < 0.01$)。Huh7 在 G2/M 期时, 浓度为 50、100 μ M 所占百分比显著低于浓度为 0、10 μ M, 并且浓度为 100 μ M 所占百分比显著低于浓度为 50 μ M 时 ($P < 0.01$)。

3 讨论

肝癌是发生于肝脏的恶性肿瘤, 初期无明显症状, 晚期主要表现为肝痛、黄疸、消瘦、乏力、腹水等症状, 为临床上最常见的恶性肿瘤之一。中医学根据其临床表现应归属于“积聚”“黄疸”“鼓胀”等范畴。其病因主要为酒食不节、情志所伤、劳役过度及外感毒邪所致, 病位责之于肝、脾、肾。病机特点为本虚标实, 在治疗上以扶正祛邪为原则, 根据不同证型可分为扶正培本、调和阴阳、

表 1 不同浓度槲皮素对人肝癌细胞株 Hep3B 凋亡的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

浓度 (μ M)	样本数	Pre-G0	G1	S	G2/M
0	6	1.56 $\pm$ 0.14	61.96 $\pm$ 3.57	15.29 $\pm$ 3.27	21.20 $\pm$ 0.91
10	6	1.63 $\pm$ 0.15	57.62 $\pm$ 2.79*	14.70 $\pm$ 1.62	26.05 $\pm$ 1.50**
50	6	2.11 $\pm$ 0.20** Δ	56.12 $\pm$ 3.06*	16.16 $\pm$ 1.34	25.62 $\pm$ 2.56**
100	6	5.15 $\pm$ 0.24** Δ $\blacktriangle$	55.27 $\pm$ 2.86**	13.55 $\pm$ 1.02 $\blacktriangle$	26.03 $\pm$ 2.28**

注: 与 0 μ M 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 10 μ M 比较, $\Delta P < 0.01$; 与 50 μ M 比较, $\blacktriangle P < 0.01$

表 2 不同浓度槲皮素对人肝癌细胞株 Huh7 凋亡的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

浓度 (μ M)	样本数	Pre-G0	G1	S	G2/M
0	6	12.47 $\pm$ 0.52	41.99 $\pm$ 1.53	16.41 $\pm$ 1.31	29.14 $\pm$ 0.86
10	6	27.69 $\pm$ 1.94*	30.87 $\pm$ 1.14*	11.43 $\pm$ 0.89*	30.02 $\pm$ 1.41
50	6	60.27 $\pm$ 1.59* Δ	11.86 $\pm$ 1.15* Δ	6.44 $\pm$ 0.84* Δ	21.42 $\pm$ 0.83* Δ
100	6	65.88 $\pm$ 1.10* Δ $\blacktriangle$	12.11 $\pm$ 0.85* Δ	5.65 $\pm$ 0.75* Δ	16.35 $\pm$ 0.74* Δ $\blacktriangle$

注: 与 0 μ M 比较, * $P < 0.01$; 与 10 μ M 比较, $\Delta P < 0.01$; 与 50 μ M 比较, $\blacktriangle P < 0.01$

活血化瘀、清热解毒、软坚散结。

槲皮素是典型的黄酮化合物,研究发现槲皮素可呈剂量依赖性地抑制 HL-60 细胞的增殖^[7]。另外,槲皮素及其衍生物可有效地诱导微粒体芳烃羟化酶和还原氧化物水解酶使多环芳烃和苯并芘通过羟化或水解而失去致癌活性,也可通过抑制细胞色素 P450^[8] 和磺基转移酶而减少杂环胺类等前致癌物质的生成^[9]。肿瘤细胞对细胞凋亡的敏感性是决定疗效的关键因素。细胞凋亡的形态特征与细胞坏死的形态特点不同,主要是受细胞本身之 DNA 调控的作用,主要目的在于消除老化、受伤及 DNA 受到破坏的细胞^[10-11]。在流式细胞仪检测实验中,因为细胞凋亡时细胞核的改变,会造成染色体荧光染料对凋亡细胞 DNA 可染性降低,因此通过此特性,可判别细胞是否处于凋亡状态。

本实验经 PI 染色流式细胞仪分析发现,槲皮素可诱导人肝癌细胞株 Hep3B、Huh7 的凋亡, Hep3B 和 Huh7 细胞株经不同浓度槲皮素干预后,细胞周期在 Pre-G0 期所占百分比显著升高,并且与浓度呈正相关,浓度为 100 μ M 时显著高于其他浓度。在 G1 期、S 期和 G2/M 时不同浓度槲皮素干预下的 Hep3B 和 Huh7 细胞所占百分比明显降低,说明槲皮素将肝癌细胞分裂有效地阻止在 Pre-G0 期,诱导细胞凋亡,具有较好的抗肝癌作用。

参考文献

[1] Murota K, Shimizu S, Chujo H, et al. Efficiency of absorption and metabolic conversion of quercetin and its glucosides in human intestinal cell line Caco-2 [J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 384(2): 391-397.

- [2] Yang JH, Hsia TC, Kuo HM, et al. Inhibition of lung cancer cell growth by quercetin glucuronides via G2/M arrest and induction of apoptosis [J]. Drug Metab Dispos, 2006, 34(2): 296-304.
- [3] Canivenc-Lavier MC, Vernevauf MF, Totis M, et al. Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver [J]. Toxicology, 1996, 114(1): 19-27.
- [4] Shih H, Pickwell GV, Quattrochi LC. Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of the human CYP1A2 enhancer [J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 373(1): 287-294.
- [5] Moon YJ, Wang X, Morris ME. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism [J]. Toxicol In Vitro, 2006, 20(2): 187-210.
- [6] 喻春钊,陶德定,冯永东,等. 联合放/化疗对细胞周期特异性凋亡的影响 [J]. 肿瘤, 2005, 25(1): 10-14.
- [7] 康铁邦,梁念慈. 槲皮素对 HL-60 细胞周期的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1998, 12(3): 169.
- [8] Tsyrllov IB, Mikhailenko VM, Gelboin HV. Isoenzyme and species-specific susceptibility of cDNA expressed CYP-1A P450s to different flavonoids [J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1205(2): 325-335.
- [9] Walle T, Eaton EA, Walle UK. Quercetin, a potent and specific inhibitor of the p-form phenolsulfotransferase [J]. Biochem Pharmacol, 1995, 50(5): 731-734.
- [10] 袁婷,梁吉祥,张斌,等. 地拉罗斯联合顺铂对非小细胞肺癌增值及凋亡的影响 [J]. 天津医药, 2015, 42(2): 125-129.
- [11] 刘磊玉,赵佳惠,秦玮,等. 转染 PDCD5 基因促进顺铂诱导前列腺细胞的凋亡作用 [J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(1): 32-35.

Effect of Quercetin in Different Concentration on Apoptosis of Human Hepatoma Cell Line Hep3B and Huh7 CHEN Zhaoxun^{1,2}, GAO Yanyu², LI Ji²

(1. Taiwan University, Taiwan Province, 10617; 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the effect of quercetin in different concentration on apoptosis of human hepatoma cell line Hep3B and Huh7. **Methods** Human hepatoma cell line Hep3B and Huh7 were planted in 96-well plate respectively, with 2×10^5 cells in each orifice. Six parallel holes were designed. The plate was put in 37°C and 5% CO₂ incubator until the cells grew adhering to the wall. Quercetin in different concentration (0, 10, 50, and 100 μ M) was added in. After 48h, cells were collected with trypsin. Hep3B and Huh7 cells cycle were analyzed using flow cytometry after adding quercetin in different concentration. **Results** When the concentration of quercetin was 10, 50, or 100 μ M, the percentage of Hep3B and Huh7 rose with the concentration increasing in Pre-G0 phase, and the top percentage reached when quercetin concentration was 100 μ M ($P < 0.01$). The percentage of Hep3B and Huh7 decreased significantly after adding quercetin in different concentration in G1, S and G2/M phase. **Conclusion** Quercetin could induce apoptosis of human hepatoma cell line Hep3B and Huh7, and with the concentration of 100 μ M, the effect is the best.

Keywords quercetin; hepatoma; Hep3B; Huh7; apoptosis; cell cycle

(收稿日期: 2014-07-17; 修回日期: 2015-01-04)

编辑: 邓 媛