



紫甘薯花色苷对人肝癌细胞 HepG2 的作用

曹东旭^{1,2}, 董海叶¹, 李妍¹, 吕晓玲¹

(1. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457; 2. 天津市食品加工工程中心, 天津 300457)

摘要: 以人肝癌细胞 HepG2 为模型研究紫甘薯花色苷的抗肿瘤活性. 通过 MTT 实验检测紫甘薯花色苷对 HepG2 细胞的生长抑制作用, HE 染色观察细胞形态, 流式细胞仪测定细胞周期变化. MTT 结果表明, 不同浓度的紫甘薯花色苷处理 HepG2 细胞 24、48、72 h 后, 低浓度的紫甘薯花色苷促进肿瘤细胞的生长, 高浓度的紫甘薯花色苷抑制肿瘤细胞的生长, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 花色苷处理 72 h 抑制率高达 80%. HE 染色结果表明, 正常 HepG2 细胞的细胞核和细胞质清晰可见, 而加入花色苷后, 出现细胞核固缩、染色质浓集于核膜表面、形成新月形致密小斑块、细胞膜形态变得不规则等凋亡的特征. 流式细胞仪分析结果表明, 花色苷能够促进肿瘤细胞的凋亡, 且细胞的凋亡率随花色苷浓度的增加而增大.

关键词: 紫甘薯花色苷; HepG2 细胞; 抗肿瘤

中图分类号: TS202.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2011)02-0009-04

Effect of Purple Sweet Potato Anthocyanin on Human Liver Cancer HepG2 Cells

CAO Dong-xu^{1,2}, DONG Hai-ye¹, LI Yan¹, LÜ Xiao-ling¹

(1. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Tianjin Food Engineering Center, Tianjin 300457, China)

Abstract: The anti-tumor activity of purple sweet potato anthocyanin to human liver cancer HepG2 cells was studied. Cell viability, morphology characteristic and cell cycle distribution were analyzed by MTT experiment, HE dyeing and flow cytometry, respectively. The MTT results indicated that after being treated with purple sweet potato anthocyanin for 24, 48, 72 h, the growth of HepG2 cell was slightly promoted by low concentration of purple sweet potato anthocyanin and obviously inhibited by high concentration of purple sweet potato anthocyanin. The cell growth inhibitory rate could reach up to 80% when HepG2 cells were treated with 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of anthocyanin for 72 h. The HE dyeing results indicated that the normal HepG2 cell nucleus and cytoplasm are clearly discernible, while after being treated with anthocyanin, HepG2 cells showed typical morphological changes associated with the characters of apoptosis, such as karyopyknosis, the chromatin enrich in the karyotheca surface, forming the meniscus compact small mottling, the cell membrane shape becomes anomalous. Flow cytometry analysis results indicated that the anthocyanin could induce cell apoptosis, and the apoptotic percentage increased along with the anthocyanin concentration.

Keywords: purple sweet potato anthocyanin; HepG2 cells; anti-tumor

花色苷是一类广泛地存在于植物中的水溶性天然色素, 是一大类多酚化合物的总称, 也是植物的主要呈色物质^[1]. 何会等^[2]研究了荔枝皮色素提取液中花色苷的抗氧化能力, 分别测定花色苷的总抗氧化能力 (TAC), 清除羟自由基、DPPH 自由基、超氧阴离子自由基的能力, 结果表明花色苷具有极佳的抗氧化能

力. 吴信子等^[3]测定了花色苷的氧自由基吸收能力, 发现在 14 种花色苷中, 花青素具有最高活性, 其活性比传统抗氧化剂维生素 E 强得多. 近年来花色苷抗肿瘤的作用越来越受到人们的关注, 有研究表明花色苷对人肿瘤细胞有杀伤作用, 对多种癌细胞如乳腺癌细胞、前列腺癌细胞等都具有不同程度的抑制作用^[1].

然而,花色苷抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖、诱导凋亡作用的机制尚不清楚,本文以 HepG2 细胞为模型,初步探讨紫甘薯花色苷对肝癌细胞的抗肿瘤效应,为肝病的预防、治疗及保肝功能食品的开发提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

紫甘薯花色苷为本学院实验室提取^[4-5],样品 I 色价为 40.7,样品 II 色价为 85。

细胞株为人肝癌细胞 HepG2,南开大学生命科学学院。

主要试剂:胎牛血清,杭州四季青生物工程有限公司;青霉素、链霉素,哈药集团制药总厂;MTT(噻唑蓝),Sigma 公司;二甲基亚砷(DMSO),天津市化学试剂一厂。

1.2 细胞培养

将 HepG2 细胞接种于含 10%灭活胎牛血清的 DMEM 培养基(Gibico 公司)中,置 37℃、饱和湿度 CO₂ 5%的 2123TC 型水套式 CO₂ 培养箱(美国 Shellab 公司)中恒温培养,2~3 d 传代 1 次,取对数生长期的 HepG2 细胞进行实验。

1.3 HepG2 细胞生长抑制率的测定

采用 MTT 法进行测定。取对数生长期的 HepG2 细胞调整浓度为 10⁵ mL⁻¹,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL。培养 24 h 后倒掉培养基,用 PBS 洗 2 次,实验组加入终质量浓度分别为 25、50、100、200、400、800 μg/mL 的紫甘薯花色苷 200 μL,对照组加入等体积的培养基,每组设 6 个平行孔。培养 24、48、72 h 后倒掉紫甘薯花色苷溶液,用 PBS 洗 2 次,每孔加入质量浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT 200 μL。继续培养 4 h 后倒掉上清液,用 PBS 洗 2 次,每孔加入 DMSO 150 μL,振荡使紫色结晶物充分溶解。在酶标仪上测定波长 570 nm 处各孔的吸光度,进行不同色价紫甘薯花色苷的实验及其吸光度的测定。

$$\text{抑制率} = (1 - A_{\text{加药孔}}/A_{\text{对照孔}}) \times 100\%$$

1.4 细胞形态学观察^[6-10]

用 HE 染色方法观察细胞形态。取对数生长期的 HepG2 细胞,调整其浓度为 10⁵ mL⁻¹,接种于底部铺有盖玻片的 6 孔培养板中,每孔 2 mL。培养 12 h 待细胞贴壁后吸走培养基,用 PBS 洗 2 次,加入紫甘薯花色苷样品 I 使终质量浓度分别为 100、200、400、800 μg/mL,同时设置对照组。培养 24 h 后取出盖玻

片,固定前先用 PBS 清洗细胞 2 次(1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液),去除妨碍染色的血清。用 10%甲醛固定细胞 40 min。蒸馏水洗 1 次后,滴入苏木精染液作用 3 min。加入 0.5%盐酸-70%乙醇溶液作用 1 min,脱去胞质的着色,此时核呈紫红色。加入碱性溶液碱化,使细胞核变成蓝色。用自来水(呈弱碱性)浸泡 5 min。蒸馏水洗作用 1 min,去除残留的碱性溶液,否则影响伊红着色。加入伊红染液作用 1 min。用梯度乙醇溶液脱水:70%、90%、95%的乙醇各脱水 45 s,100%乙醇脱水 2 次,每次 2 min。用二甲苯透明细胞 2 次,每次 5 min。树脂封固,即将盖玻片用树脂粘于载玻片上,以利保存和观察。

1.5 细胞周期测定^[10-11]

分别取终质量浓度为 100、200、400、800 μg/mL 紫甘薯花色苷样品 I 处理的 HepG2 细胞各 10⁵ mL⁻¹,用 PBS 洗 2 次后将细胞重悬于 1 mL PBS 中,缓慢滴入预冷的 2.3 mL 100%乙醇中,于 4℃冰箱固定 18 h。离心去除乙醇,将细胞用 PBS 洗 2 次,重悬于 1 mL PBS 中。加入 20 μL PI 染液、5 μL 的 RNaseA 室温避光作用 1 h。加 2.5 mL PBS 稀释 300 目滤膜过滤。流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)测定细胞周期,用荧光共聚焦显微镜(日本尼康公司)观察细胞的凋亡情况。

2 结果与讨论

2.1 MTT 法的检测结果

终质量浓度为 25、50 μg/mL 紫甘薯花色苷作用 HepG2 细胞后,花色苷促进了细胞的生长,25、50 μg/mL 样品 I 作用 HepG2 细胞 24、48、72 h 的促进率分别为 15%、10%、6%和 9%、5%、3%。25、50 μg/mL 样品 II 作用 HepG2 细胞 24、48、72 h 的促进率分别为 12%、8%、3%和 6%、4%、1%。

由图 1(a)可知:在 100、200、400、800 μg/mL 紫甘薯花色苷样品 I 作用 HepG2 细胞 24 h 后,抑制了细胞生长,抑制率分别为 8%、19%、27%和 36%;在加药培养 48 h 后,抑制率达到 23%、31%、48%和 61%;800 μg/mL 紫甘薯花色苷与 HepG2 细胞共培养 72 h,抑制率达到 75%。其中 24、48、72 h 的 IC₅₀ 值分别为 2 253 ± 11.9, 459 ± 13.75 和 199 ± 13.5。

MTT 法测定细胞的生长抑制率显示,在 100~800 μg/mL 紫甘薯花色苷样品 I 对 HepG2 细胞有明显的抑制作用。紫甘薯花色苷样品 I 在 25~800 μg/mL 具有以下特点:紫甘薯花色苷低浓度促进

细胞的生长,高浓度抑制细胞生长,其抑制作用随药物浓度的增大而增大,随着作用时间的延长而增大。

由图 1(b)可知:在终质量浓度为 100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ 紫甘薯花色苷样品 II 作用 HepG2 细胞 24 h 后,抑制率分别为 12%、23%、30%和 38%;在加药培养 48 h 后,抑制率达到 25%、40%、52%和 63%,800 $\mu\text{g/mL}$ 紫甘薯花色苷与 HepG2 细胞共培养 72 h,抑制率达到 80%。其中 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为 $2\ 039 \pm 8.25$ 、 399 ± 12.50 和 151 ± 12.75 。

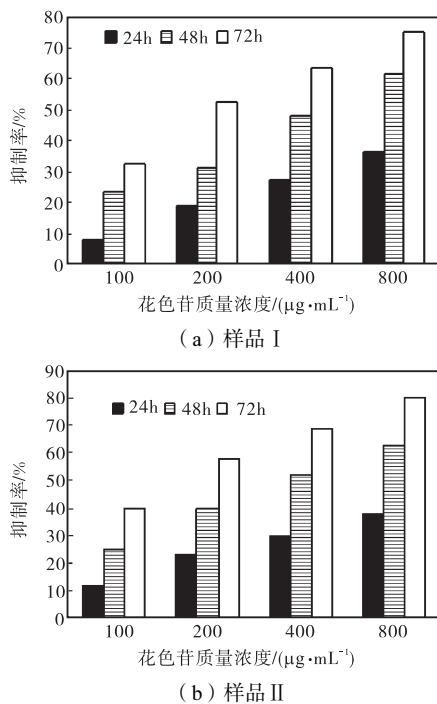


图 1 花色苷对 HepG2 细胞的影响

Fig.1 Effect of anthocyanin on HepG2 cells

实验中所用的紫甘薯花色苷样品 II 的色价要高于紫甘薯花色苷样品 I 的色价,结果显示紫甘薯花色苷样品 II 的抑制率明显高于样品 I 的抑制率,可见在本实验中所使用的紫甘薯花色苷浓度范围内,色价不同其抑制率也明显不同,色价越高,抑制率越强。

紫甘薯花色苷是类黄酮化合物,可能通过阻止肿瘤细胞增殖生长、降低金属蛋白酶的活力、激活 JNK 途径、阻止活性氧和致癌物以及 DNA 加合物的作用,导致肿瘤细胞凋亡。紫甘薯花色苷浓度越高,抑制效果越明显。而 MTT 法测定低浓度的紫甘薯花色苷组表现出促进细胞生长的结果,这可能是由紫甘薯花色苷本身颜色与 MTT 实验中生成的紫色结晶颜色相近造成的吸光度偏高。

2.2 HE 染色观察细胞形态变化

HE 染色观察到的细胞形态见图 2。

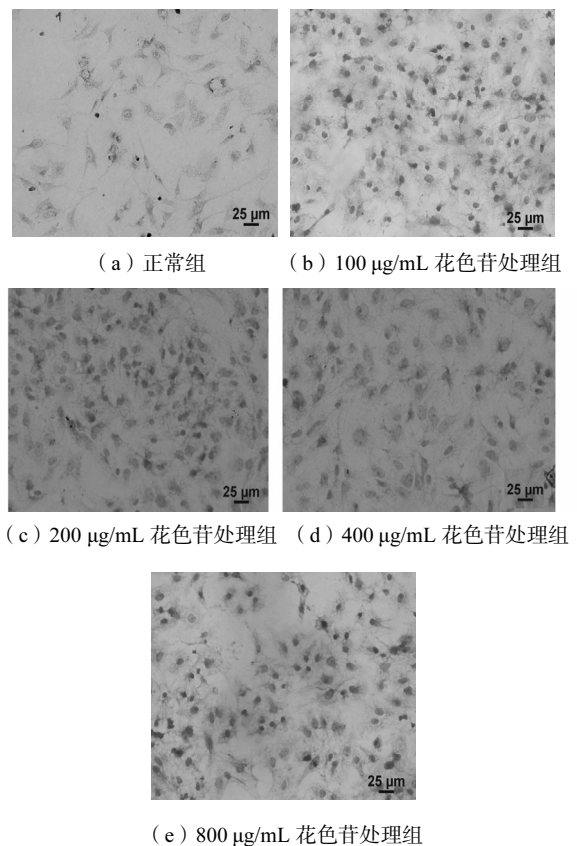


图 2 HepG2 细胞形态
Fig.2 HepG2 cells morphology

正常细胞形态呈贴壁状态比较好的菱形,细胞核呈蓝色清晰可见,细胞质呈微红色。加入药物处理后细胞呈现贴壁不太牢固的椭圆形,且形态大小不一。深蓝色的颗粒可能是钙盐颗粒,灰蓝色的为细胞核黏液,鲜红色的颗粒为胞浆内嗜酸性颗粒,而粉红的为蛋白质液体。加药处理后的细胞由于其细胞膜的损坏,由轻度嗜碱呈现嗜伊红浓染,伊红着色由浅变深。200 $\mu\text{g/mL}$ 紫甘薯花色苷处理细胞,部分细胞核已消失,染色质浓集于核膜表面,形成新月形致密小斑块,细胞膜形态变得不规则。800 $\mu\text{g/mL}$ 紫甘薯花色苷处理的细胞,大部分细胞已经不能维持原来的形态,很多碎裂出现凋亡晚期的特征。

2.3 细胞周期的变化

终质量浓度为 100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ 紫甘薯花色苷样品 I 作用于 HepG2 细胞 24 h,实验结果如图 3 所示。

在实验所取紫甘薯花色苷浓度范围内,随着紫甘薯花色苷浓度的增加,其抑制效果明显增强,呈浓度依赖关系,在紫甘薯花色苷质量浓度分别为 100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞凋亡率分别为 4.59%、20.87%、27.05%和 33.92%。

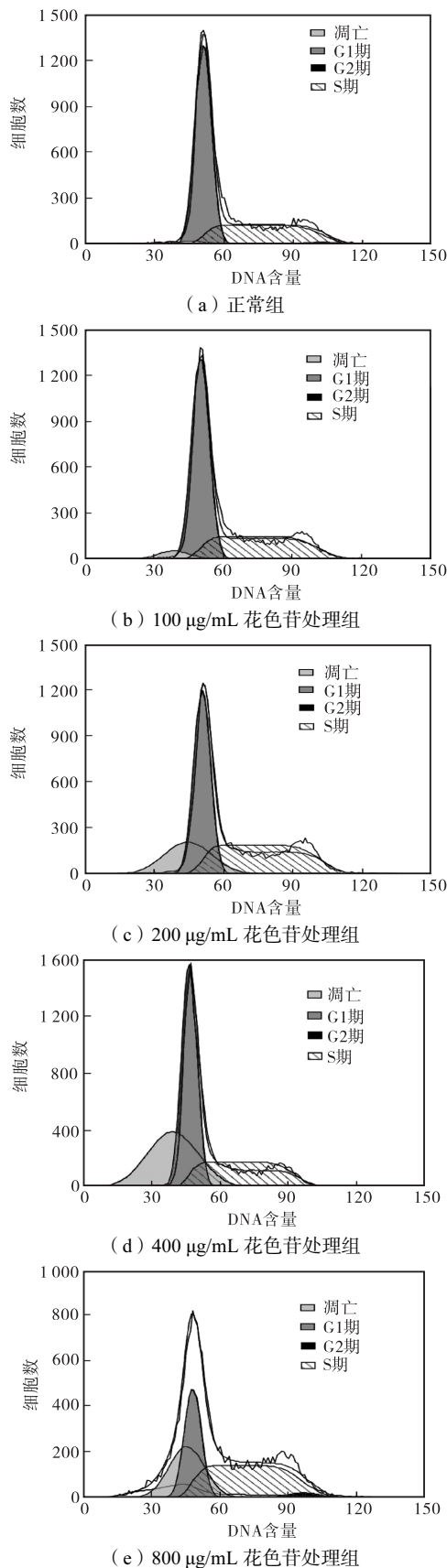


图3 花色苷样品 I 对 HepG2 细胞周期的影响

Fig.3 Effect of anthocyanin sample I on HepG2 cell cycle

3 结论

(1) 通过 MTT 实验结果证明,紫甘薯花色苷能够显著抑制人肝癌 HepG2 细胞的生长,抑制率与浓度、时间成剂量依赖性.

(2) HE 染色观察 HepG2 细胞的形态学变化,花色苷质量浓度为 100、200 µg/mL 时,细胞逐渐变圆,细胞核固缩,当花色苷质量浓度为 400、800 µg/mL 时,细胞膜基本破裂,几乎不能维持细胞形态.

(3) 流式细胞仪测定细胞周期,分析得出紫甘薯花色苷对 HepG2 细胞凋亡率的影响,即细胞凋亡比例随着花色苷浓度增大而增大.

参考文献:

[1] 高爱霞,罗巨东,吴庆婷,等. 花青素对肺癌细胞 NCI-H460 的体内外抗肿瘤效应[J]. 实验动物与比较医学, 2008,28(2):85-89.

[2] 何会,宋哲,谢碧秀,等. 荔枝皮花色苷体外抗氧化能力研究[J]. 食品科学,2009,30(11):22-25.

[3] 吴信子,朴京一,张小勇,等. 蓝靛果花青素的分离与鉴定[J]. 延边大学学报:自然科学版,2001,27(3):191-194.

[4] 范辉. 紫甘薯色素纯化及其对糖尿病鼠的抗氧化作用[D]. 天津:天津科技大学,2009.

[5] 韩永斌. 紫甘薯花色苷提取工艺与组分分析及其稳定性和抗氧化性研究[D]. 南京:南京农业大学,2007.

[6] 耿明,王琳,曹永成,等. 胃癌细胞药物敏感性 MTT 法检测结果分析[J]. 实用医药杂志,2009,26(12):26-28.

[7] 刘跃明,李石伟. 雷公藤内脂醇诱导 Hep-2 细胞凋亡及对细胞增殖周期的影响[J]. 中国老年学杂志,2010,30(2):220-221.

[8] 杜宏,张娜,高霞,等. 莲房原花青素对人肝癌细胞 HepG2 生长及凋亡的作用[J]. 实用医学杂志,2008,24(6):891-893.

[9] 吴翰桂. 细胞凋亡的研究进展[J]. 安徽大学学报:自然科学版,2001,25(4):102-106.

[10] Boivin D, Lamy S, Lord-Dufour S, et al. Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: A comparative study[J]. Food Chemistry, 2009,112(2):374-380.

[11] 谢朝阳,祝其锋,吴斌华,等. 原花青素影响 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞周期变化与细胞凋亡的可能机制[J]. 广东医学院学报,2009,27(2):119-123.