青藏高原黑果枸杞花青素对人肝癌细胞增殖和自噬的影响

王梦杰[1],李玉林[2],刘嘉华[1],
张龙飞[1],阿孝蓉[1],周佳俊[1],吴　华[1*],柴沙驼[3*]

[1]青海大学农牧学院;[2] 中国科学院西北高原生物研究所;[3] 青海大学畜牧兽医科学院,西宁 810000

摘　要:探究黑果枸杞花青素在体外对人肝癌 HepG2 细胞增殖和自噬的影响。利用 CCK-8 法测定细胞活力,EdU 和细胞划痕试验检测细胞增殖和迁移效果,RT-PCR 和 Western blot 检测增殖和自噬相关基因的 mRNA 和蛋白表达。结果显示,黑果枸杞花青素可有效抑制人肝癌 HepG2 细胞的增殖和迁移;上调增殖因子(LATS1、LATS2 和 MOB1)和自噬因子(Beclin-1、LC3-Ⅱ和 AMPK),并下调增殖因子 YAP 的 mRNA 水平;下调自噬因子 p-mTOR 和细胞周期因子 CDK4,并上调自噬因子 p-AMPK 和 LC3-Ⅱ的蛋白表达。由此推测黑果枸杞花青素可在体外抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖和迁移,并促进人肝癌 HepG2 细胞发生自噬。

关键词:黑果枸杞花青素;人肝癌 HepG2 细胞;增殖;自噬

中图分类号:R932　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1001-6880(2021)1-0079-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.1.011

Effect of anthocyanidin of *Lycium ruthenicum* Murry from Qinghai Tibet Plateaun on the proliferation and autophagy of HepG2 cells

WANG Meng-jie[1], LI Yu-lin[2], LIU Jia-hua[1],
ZHANG Long-fei[1], A Xiao-rong[1], ZHOU Jia-jun[1], WU Hua[1*], CHAI Sha-tuo[3*]

[1] *College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University*;
[2] *Institute of Northwest Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences*;
[3] *Qinghai Academy of Science and Veterinary Medicine of Qinghai University, Xining 810000, China*

Abstract: To explore the effect of *Lycium ruthenicum* Murray anthocyanidin on proliferation and autophagy of HepG2 cells *in vitro*, the viability of HepG2 cells were detected by CCK-8. Besides, HepG2 cells proliferation and migration were explored by EdU and cell scratch test. Then RT-PCR and Western blot were performed to explore the expression of proliferation-related genes and autophagy-related genes at mRNA and protein level, respectively. We found that *L. ruthenicum* anthocyanidin could significantly inhibit the proliferation and migration of HepG2 cells. The mRNA expression of proliferation factors (LATS1, LATS2 and MOB1) and autophagy factors (Beclin-1, LC3-Ⅱ and AMPK) induced by *L. ruthenicum* anthocyanidin were up-regulated, while the mRNA expression of proliferation factor YAP induced by *L. ruthenicum* anthocyanidin were down-regulated. Furthermore, *L. ruthenicum* anthocyanidin decreased autophagy factor p-mTOR and cyclin factor CDK4 protein expression, while enhanced autophagy factors (p-AMPK and LC3-Ⅱ) protein expression. In conclusion, *L. ruthenicum* anthocyanidin can inhibit the proliferation and migration, and promote the autophagy of HepG2 cells *in vitro*.

Key words: *Lycium ruthenicum* Murray anthocyanidin; HepG2 cells; proliferation; autophagy

肝脏是人体内最主要的代谢器官之一,具有合成分泌型蛋白质、去氧化和储存肝糖等功能。肝癌是全球第六大常见癌症。与其他实体癌相比,过去十多年来,世界范围内肝癌的发病率和死亡率都呈现增长趋势[1]。在各类癌症的发病率和死亡率中,肝癌的发病率和死亡率均位于前十位(发展中国家中发病率 85%,居不同癌种第一),中国作为最大的发展中国家,肝癌发病总数占全球肝癌病人总数的 50%[2],肝癌已经成为国民健康的主要威胁者之一。在多种导致肝癌的因素中,人类饮食习惯和生

收稿日期:2020-07-10　　接受日期:2020-12-10
基金项目:青海省科技厅应用基础研究计划项目(2018-ZJ-759)
*通信作者 Tel:86-013997381315;E-mail:qhwuhua@163.com,chaishatuo@163.com

天然产物研究与开发

活习惯的失调是重要原因之一。在人们崇尚绿色天然生活观念的影响下,利用天然食品中的抑癌因子来有效预防和干预癌症的发生发展已获得人们的重点关注。

黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murray)是茄科枸杞属植物,浆果呈现为球形,果实成熟后颜色呈紫黑色,果实无毒且具有甜味,是一种尚待开发的野生植物资源[3]。黑果枸杞主要分布于我国西北地区,因其富含花青素而被誉为"沙漠黑珍珠"和"花青素之王"[4]。花青素(anthocyanidin,又称花色素),属类黄酮化合物,具有抗肿瘤、抗炎、降血糖血脂、护肝以及很强的抗氧化能力等多种生理功能[4-6]。在食品开发和医学研究方面具有较高的研究价值。基于花青素的生理活性和保健作用,黑果枸杞俨然已经成为青海省的特色经济植物,并在医疗保健领域获得了广泛关注。然而,目前对黑果枸杞花青素的研究还停留在黄酮、多糖等成分的抗氧化活性上,尚未见黑果枸杞花青素对人肝癌 HepG2 细胞自噬作用影响机制的相关报道。基于此,本试验主要针对黑果枸杞花青素对人肝癌 HepG2 细胞免疫活性的影响展开相关研究,为青藏高原黑果枸杞的深度开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验材料

细胞系:人肝癌细 HepG2 细胞由中国科学院细胞库提供。

黑果枸杞花青素:购自青海金麦杞生物科技有限公司(花青素:64.4%;灰分:0.6%;蛋白质:6%;糖类:1.32%;氨基酸:3.56%)。

1.1.2 主要试剂配制

PBS:将 PBS 干粉倒入容量瓶,向容量瓶中加入 1 L 超纯水,并用超纯水反复冲洗粘在袋壁上的粉末并移至容量瓶,充分搅拌至 PBS 干粉完全溶解后将其定容至 2 L,调节 PBS 溶液的酸碱度为 7.2 ~ 7.4。而后将 PBS 溶液转移至玻璃容器中进行高压蒸汽灭菌,待溶液冷却至室温后,用封口膜密封并放至 4 ℃冰箱低温保存待用。

DMEM 培养基:将 DMEM 粉末溶于超纯水和 FBS,用超纯水定容至 1 L,控制 FBS 的终浓度为 10%。加入适量的碳酸氢钠,调节 pH 值为 7.2 ~ 7.4,滤菌后用封口膜密封并放至 4 ℃冰箱低温保存。

花青素溶液:称取 2 mg 花青素溶于 10 mL DMEM 培养基中,配制得到花青素浓度为 200 μg/mL 的溶液,滤菌后用封口膜密封并避光低温条件下保存。

3-MA(3-methyladenine)自噬抑制剂配制:精确称量 20 mg 3-MA,加入 3.36 mL PBS 缓冲液配制成浓度为 20 mM 的溶液,滤菌后用封口膜密封置于-20 ℃冰箱保存。

1.1.3 试剂与设备

DEPC(西安赫特);DMEM、胰酶、双抗(Gibco 公司);DMSO(山东德彦化工有限公司);EDTA(Solarbio 公司);FBS、PBS、Promega 反转录试剂盒、SYBR Green I 荧光染料、SDS、无水乙醇、氯仿、异丙醇(西宁宝信生物科技有限公司);EdU 试剂盒(广州瑞博生物科技有限公司);超纯水、Aglient1260 高效液相色谱仪(Aglient 公司);X500R ESI-Q-TOF 质谱仪(SCIEX 公司);乙腈、色谱纯、净化工作台(江苏通净净化设备有限公司);CO_2 恒温培养箱(美国 NUAIRE 公司);水平离心机(英国 Dynamica 公司);酶标仪(无锡华卫德朗仪器有限公司);荧光显微镜(日本 O-lympus 公司);荧光定量 PCR 仪器、蛋白印记检测系统(美国 Bio-Rad 公司);Western blot 转膜仪、电泳仪、电源(购自北京六一生物科技公司);摇床(美国 Scilogex 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 黑果枸杞花青素提取物液质分析条件

色谱条件:Phenomenex Luna-C_{18} 柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm);流动相 A(1 000 mL 超纯水,0.1% 甲酸),流动相 B(乙腈)。梯度梯度洗脱程序(0 ~ 10 min,流动相 B:15%;10 ~ 30 min,流动相 B:15% →40%,流速 1.0 mL/min;柱温 25 ℃,检测波长 254 nm)。

质谱条件:采用 TurbolonSpray 离子源,气帘气 30 psi,离子源载气 150 psi,离子源载气 260 psi,离子源温度 550 ℃;IDA 正离子模式,喷雾电压 5 500 V;CAD 载气 7 psi,一级 TOF-MS 质量扫描范围 50 ~ 1 500 Da,诱导碰撞电压 10 V;二级 TOF-MS 质量扫描范围 50 ~ 1 500 Da,诱导碰撞电压 45 V。

1.2.2 细胞培养

1.2.2.1 细胞的常规培养

人肝癌 HepG2 细胞培养 24 h,弃去旧的培养基,加入 5 mL 新的 DMEM 培养液十字混匀后放入 5% CO_2,37 ℃的培养箱中继续培养。

1.2.2.2 细胞计数

向血球计数板中滴加 10 μL 预先混好的人肝癌 HepG2 细胞悬液,在培养箱内静置培养 3 min 后在显微镜下观察计数,根据观察得到的细胞数统计计数板中四大格细胞的总数为 A,计算细胞数:实际细胞数 = A/4 × 10 × 1 000 × 稀释倍数。

1.2.3 CCK-8 法检测黑枸杞花青素对人肝癌 HepG2 细胞活率的影响

将人肝癌 HepG2 细胞以 1×10^6 个/mL 的密度接种于 96 孔板中(每孔 100 μL),细胞培养贴壁 24 h 后用黑果枸杞花青素诱导细胞,控制黑果枸杞花青素的终浓分别为 0、12.5、25、50、100 μg/mL,并分别作用于人肝癌 HepG2 细胞 12、24、36、48 h。在各时间点前的 3 h,每孔加 10 μL CCK-8 溶液,继续孵育 3 h,用酶标仪测定其 450 nm 处的 OD 值,每组设 3 个重复。计算公式:细胞活力 = (OD 实验组-OD 对照组)/(OD 对照组-OD 空白组) × 100%。

1.2.4 EdU 荧光标记法检测黑枸杞花青素对人肝癌 HepG2 细胞增殖的影响

将人肝癌 HepG2 细胞以 1×10^6 个/mL 的密度接种于 96 孔板中(每孔 100 μL),细胞培养 24 h。设花青素刺激组浓度分别为 0 μg/mL 和 25 μg/mL。0 μg/mL 组中加入 DMEM 培养基正常培养人肝癌 HepG2 细胞;黑果枸杞花青素刺激组中加 DMEM 培养基并用控制终浓度为 25 μg/mL 的花青素诱导人肝癌 HepG2 细胞。每组设 3 个复孔,每孔终体积为 300 μL,培养 24 h。

首先制备出适量的浓度为 50 μM 的 EdU 培养基;每孔中均加入 100 μL EdU 培养基,在培养箱内静置培养 2 h 后弃去培养基。用 PBS 清洗未贴壁的细胞;每孔加 50 μL 细胞固定液,恒温培养 30 min 后弃去固定液;加 50 μL 2 mg/mL 甘氨酸,脱色摇床温育 5 min 后弃去甘氨酸溶液;加入 100 μL PBS,脱色摇床温育 5 min 后 PBS 清洗 5 min;最后加入 100 μL 的渗透剂,温育 10 min 后用 PBS 清洗 5 min。加 100 μL Apollo 染液,避光室温孵育 30 min 后弃去染液;加 100 μL 渗透剂,脱色摇床清洗 2 次,每次 10 min,而后倒掉渗透剂;加 100 μL 甲醇,清洗 2 次,每次 5 min,再用 PBS 清洗 5 min。加 100 μL 的 DAPI 反应液,在避光、室温条件下孵育 30 min 后倒掉染色液;加 100 μL PBS 清洗细胞;观察人肝癌 HepG2 细胞的染色情况。

1.2.5 细胞划痕试验测定测黑果枸杞花青素对人肝癌 HepG2 细胞迁移的影响

每隔 0.5 cm 在 6 孔板背后划一道横线,每孔接种 1×10^6 个细胞并且至少穿过 5 条线。培养 24 h 后用枪头沿着横线在细胞层上进行划痕。用 PBS 清洗细胞 3 次,洗去未贴壁和划线是脱落的细胞。控制黑果枸杞花青素刺激组加入终浓度分别为 0、25 μg/mL,培养 24 h 后在显微镜下观察细胞。

1.2.6 Western blot 检测增殖和自噬相关基因的蛋白表达

细胞分组设为对照组(0 μg/mL)、花青素组(25 μg/mL)、3-MA(5mM)组和花青素(25 μg/mL) + 3-MA(5 mM)组。细胞 5% CO_2,37 ℃培养 24 h 后收集细胞。

用蛋白裂解液提取细胞总蛋白;BCA 法测定蛋白浓度,调整蛋白浓度,加入适量 2 × SDS 上样缓冲液,煮沸 5 min,-20 ℃保存备用。配制 12% SDS-PAGE 分离胶和 5% SDS-PAGE 浓缩胶,100 V,电泳 2 h。根据蛋白 Marker,4 ℃,200 mA 转移 2 ~ 2.5 h,将目的条带转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 或 4 ℃过夜。TBST 溶液漂洗膜 3 次,8 min/次,一抗孵育 2 h。TBST 溶液漂洗膜 3 次,8 min/次,二抗孵育 1 h。最后用 Bio-Rad Chemi Doc XRS + 曝光系统检测目的蛋白。

1.2.7 RT-PCR 检测 Hippo 通路和自噬相关基因表达

细胞分组设为对照组(0 μg/mL)和花青素(25 μg/mL)组,细胞培养 24 h 后分别用 TRIZOL 法和紫外线分光光度计提取总 RNA 和测定 RNA 浓度。每组各取 1 500 ng 总 RNA,按照 Promega 试剂盒的说明书 mRNA 进行反转录为 cDNA。反转录反应体系为 20 μL,5 × Prime Script Buffer 2(for Real Time)4 μL,Total RNA 2 μL,RNase Free ddH_2O 14 μL,将体系置于 PCR 仪中 42 ℃ 15 min;95 ℃ 3 min 后获得 cDNA 转至-20 ℃长期保存。采用 SYBRGreenl 法以 cDNA 为模板对 PCR 进行实时荧光定量检测,反应体系为 20 μL,SYBR Premix Ex Taqll 10 μL,PCR Forward Primer 0.8 μL,PCR Reverse Primer 0.8 μL,cDNA 2 μL,ddH_2O 6.4 μL,95 ℃预变性 15 min,95 ℃变性 10 s,60 ℃退火 20 s,72 ℃延伸 20 s(40 次循环)。试验每组均重复 3 次,根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算所测基因的相对表达量。

使用上海生物工程有限公司设计合成引物如下:

表 1 RT-PCR 引物

Table 1 Print for RT-PCR

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence(5′→3′)
AMPK	F:CTCTGCACCCAATGATTCCG R:GTTAATTCCGGTGCCTCGTC
Beclin-1	F:CTGGCACTAGAGGAGGAGAG R:CTGGGCATAACGCATCTGG
LC3-Ⅱ	F:CTGCGGGCTAAGGAGACAC R:AAGGTTCGGCGCTGTTTGA
LATS1	F:TCTTTGGTTGGGACTCCTAAT R:TTCTTGCCTAAGCGATCTTCT
LATS2	F:AGCCTTTCCCGCCCTTCACGC R:CGAGCAAGTGGGTCGCCTTG
YAP	F:TAGCCCTGCGTAGCCAGTTA R:TCATGCTTAGTCCACTGTCTGT
MOB1	F:TCTCCACCTCCCTTTACCC R:TGCCATCTCACCTGGACTG
β-Actin	F:CATCGGCAATGAGCGGTTC R:ACAGCACCGTGTTGGCGTAG

1.3 数据分析

每组试验均重复 3 次,用 SPSS19.0 采用单因素方差分析和多重比较对试验数据进行处理。

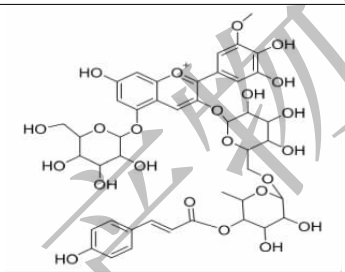
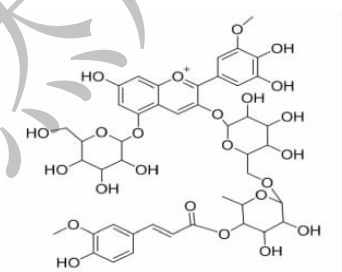
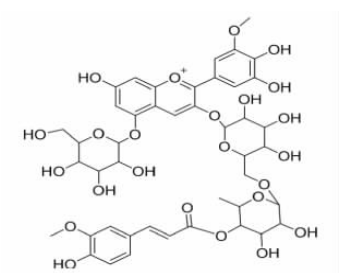
2 结果与分析

2.1 黑果枸杞花青素成分分析

经 HPLC-Q-TOF-MS 分析,从黑果枸杞花青素中确认出五种花青素化合物,总含量为 64.4%。其中,$C_{49}H_{50}O_{28}$,矮牵牛素-3-*O*-芸香糖(反式对香豆酸-7-*O*-葡萄糖苷)-5-*O*-葡萄糖苷,其分子量为 1 095.983,出峰时间为 5.225,含量为 4.2%;$C_{43}H_{49}O_{23}$,矮牵牛素-3-*O*-芸香糖(反式对香豆酸)-5-*O*-葡萄糖苷,其分子量为 933.842,出峰时间为 16.952,含量为 2.6%;$C_{44}H_{51}O_{24}$,矮牵牛素-3-*O*-芸香糖(阿魏酰)-5-*O*-葡萄糖苷,其分子量为 963.868,出峰时间为 17.872,含量为 47.6%;$C_{43}H_{49}O_{24}$,矮牵牛素-3-*O*-芸香糖(咖啡酰)-5-*O*-葡萄糖苷,其分子量为 949.841,出峰时间为 18.390,含量为 6.4%;$C_{44}H_{51}O_{23}$,锦葵素-3-*O*-芸香糖(反式对香豆酸)-5-*O*-葡萄糖苷,其分子量为 847.864,出峰时间为 18.945,含量为 3.6%(见表 2)。

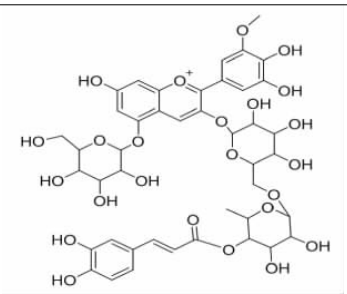
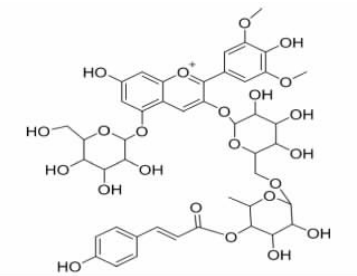
表 2 黑果枸杞花青素中主要成分 HPLC-Q-TOF-MS 分析

Table 2 Main components in anthocyanidin of *L. ruthenicum* by HPLC-Q-TOF-MS analysis

序号 No.	结构式 Structural formula	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight	时间 Time(min)	百分比 Percentage(%)
1		$C_{49}H_{50}O_{28}$	1 095.983	5.225	4.20
2		$C_{43}H_{49}O_{23}$	933.842	16.952	2.60
3		$C_{44}H_{51}O_{24}$	963.868	17.872	47.60

天然产物研究与开发

续表 2(Continued Tab. 2)

序号 No.	结构式 Structural formula	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight	时间 Time(min)	百分比 Percentage(%)
4		$C_{43}H_{49}O_{24}$	949.841	18.390	6.40
5		$C_{44}H_{51}O_{23}$	847.864	18.945	3.60

2.2　黑果枸杞花青素对人肝癌 HepG2 细胞的增殖和迁移作用的影响

2.2.1　黑果枸杞花青素对人肝癌 HepG2 细胞增殖作用的影响

与 0 μg/mL 浓度组相比,浓度为 12.5、25 和 50 μg/mL 的黑果枸杞花青素作用于人肝癌 HepG2 细胞 12 h 后,人肝癌 HepG2 细胞的活力均显著降低($P<0.05$),浓度为 25 μg/mL 的黑枸杞花青素在作用于人肝癌 HepG2 细胞 24 h 后,人肝癌 HepG2 细胞的活力极显著降低($P<0.01$);此外,浓度为 50 μg/mL 的黑枸杞花青素刺激人肝癌 HepG2 细胞 24 h 后,人肝癌 HepG2 细胞的活力也呈显著降低趋势($P<0.01$)。

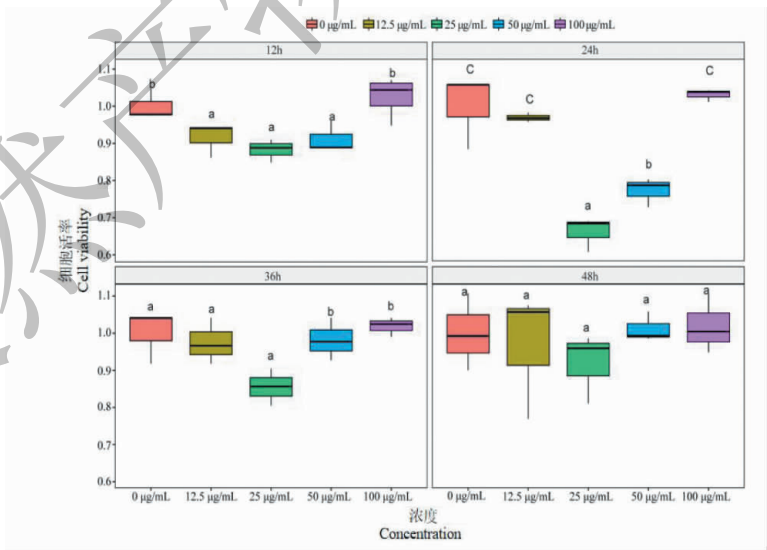


图 1　黑果枸杞花青素对人肝癌 HepG2 细胞活率的影响

Fig. 1　The effect of *L. ruthenicum* anthocyanidin on HepG2 cells viability

注:相同字母表示差异不显著 $P>0.05$,不同字母表示差异显著,其中小写字母表示 $P<0.05$,大写字母表示 $P<0.01$。Note:The same letter indicates no significant difference $P>0.05$, but different letters mean significant difference, in which the lower case letter means $P<0.05$, and the capital letters means $P<0.01$.

天然产物研究与开发

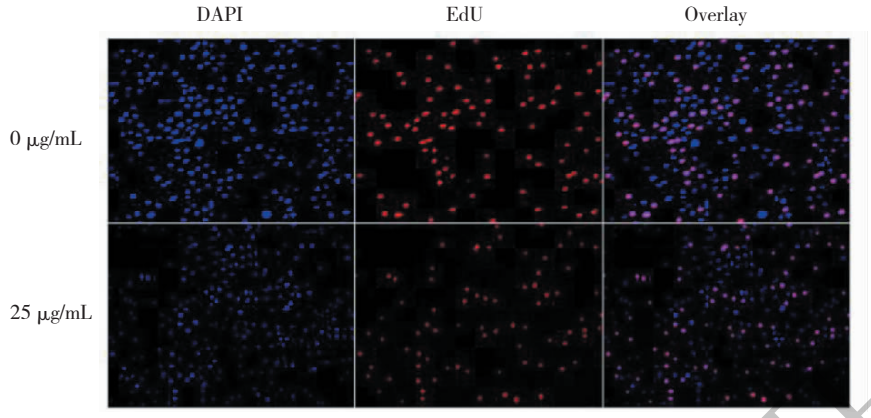


图 2 黑果枸杞花青素对人肝癌 HepG2 细胞增殖的影响

Fig. 2 The effect of *L. ruthenicum* anthocyanidin on HepG2 cells proliferation

与 25 μg/mL 浓度组相比,浓度为 12.5 μg/mL 的黑枸杞花青素作用 24 h 时对人肝癌 HepG2 细胞活力的抑制作用极显著降低($P<0.01$);浓度为 50 μg/mL 的黑枸杞花青素作用 24 h 和 36 h 时对人肝癌 HepG2 细胞活力的抑制作用均显著降低($P<0.05$);此外,浓度为 100 μg/mL 的黑枸杞花青素作用 24 h 和 36 h 时对人肝癌 HepG2 细胞活力的抑制作用极显著降低($P<0.01$),浓度为 100 μg/mL 的黑枸杞花青素作用 12 h 时对人肝癌 HepG2 细胞活力的抑制作用也显著降低($P<0.05$)(图 1)。其中,以浓度为 25 μg/mL 的黑枸杞花青素作用 24 h 时对人肝癌 HepG2 细胞活力的抑制作用最为显著,因此筛选出黑枸杞花青素的最佳作用浓度和最佳作用时间分别为 25 μg/mL,24 h。25 μg/mL 黑枸杞花青素刺激人肝癌 HepG2 细胞 24 h 后,EdU 荧光染色结果发现,与对照组相比,活细胞数减少(图 2 中蓝色荧光),新增殖的细胞数也明显减少(图 2 中红色荧光),人肝癌 HepG2 细胞的总数也减少(图 2 结合蓝色和红色荧光)。

2.2.2 黑果枸杞花青素对人肝癌 HepG2 细胞迁移作用的影响

细胞划痕的结果表示,黑果枸杞花青素处理 24 h 后,0 μg/mL 浓度组细胞连接紧密,成团生长,又重新铺满划痕区;25 μg/mL 浓度组的细胞在划痕区新增细胞相对较少,细胞的增殖、贴壁和迁移能力被显著抑制(见图 3)。

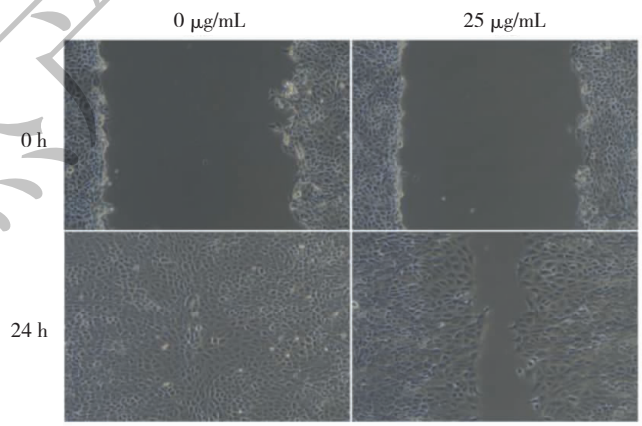


图 3 黑果枸杞花青素对人肝癌 HepG2 细胞迁移的影响

Fig. 3 The effect of *L. ruthenicum* anthocyanidin on migration in HepG2 cells

2.2.3 黑果枸杞花青素对人肝癌 HepG2 细胞关键增殖因子在 mRNA 和蛋白水平表达的影响

与对照组相比,增殖关键因子 LATS1 和 MOB1 在黑果枸杞花青素组细胞中的 mRNA 水平的表达极显著升高($P<0.01$),LATS2 在 mRNA 水平的表达显著升高($P<0.05$),YAP 在 mRNA 水平的表达

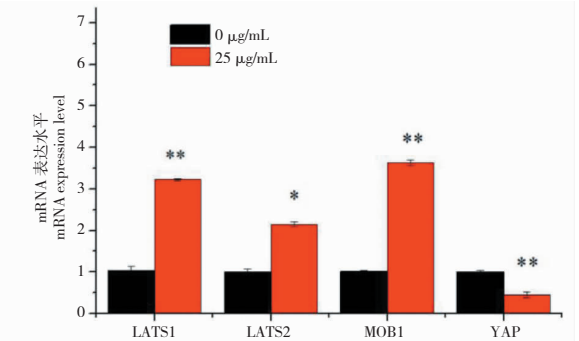


图 4　黑果枸杞花青素调控人肝癌 HepG2 细胞增殖因子 LATS1、LATS2、MOB1 和 YAP 在 mRNA 水平的表达

Fig. 1　*L. ruthenicum* anthocyanidin regulates the expression of the proliferation factors LATS1, LATS2, MOB1 and YAP at mRNA level in HepG2 cells

注:与对照组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$。Note:Compared with control, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

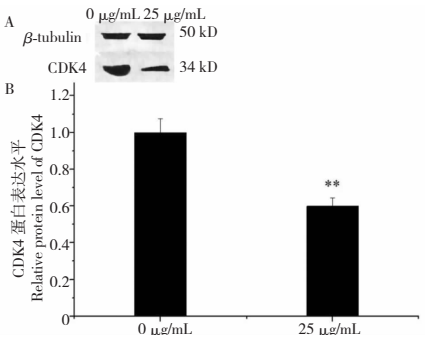


图 5　黑果枸杞花青素调控人肝癌 HepG2 细胞 CDK4 在蛋白水平的表达

Fig. 5　*L. ruthenicum* anthocyanidin regulates the expression of CDK4 at protein level in HepG2 cells

注:与对照组比较,$^{**}P<0.01$。Note:Compared with control, $^{**}P<0.01$.

显著降低($P<0.05$)(图 4)。花青素组 CDK4 的蛋白表达极显著低于对照组(图 5,$P<0.01$)。

2.3　黑果枸杞花青素对人肝癌 HepG2 细胞自噬作用的影响

与对照组相比,黑果枸杞花青素组极显著升高 Beclin-1、LC3-Ⅱ和 AMPK 的 mRNA 水平表达($P<0.01$,图 6)。与对照组相比,25 μg/mL 花青素可极显著显著下调 p-mTOR($P<0.01$),并极显著上调 LC3-Ⅱ和 p-AMPK 的蛋白表达($P<0.01$);3-MA 组极显著上调 p-mTOR ($P<0.01$),并极显著下调 p-AMPK 和 LC3-Ⅱ的蛋白表达($P<0.01$);花青素 + 3-MA 组可极显著上调 p-mTOR($P<0.01$),并极显著上调 p-AMPK 和 LC3-Ⅱ的蛋白表达($P<0.01$)。与花青素组相比,3-MA 组可极显著上调 p-mTOR($P<0.01$),并极显著下调 LC3-Ⅱ和 p-AMPK 的蛋白表达($P<0.01$);花青素 +3-MA 组可极显著下调 p-mTOR($P<0.01$),并显著上调 LC3-Ⅱ 和 p-AMPK ($P<0.05$)的蛋白表达(见图 7)。

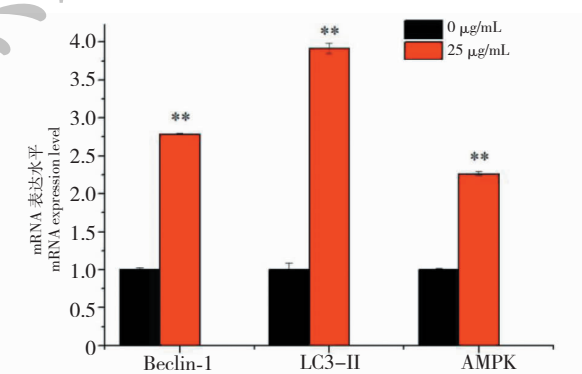


图 6　黑果枸杞花青素对人肝癌 HepG2 细胞自噬因子 Beclin-1、LC3-II 和 AMPK 在 mRNA 水平表达的影响

Fig. 6　The effect of *L. ruthenicum* anthocyanidin on autophagy factors Beclin-1, LC3-II and AMPK expression at mRNA level in HepG2 cells

注:与对照组比较,$^{**}P<0.01$。Note:Compared with control, $^{**}P<0.01$.

天然产物研究与开发

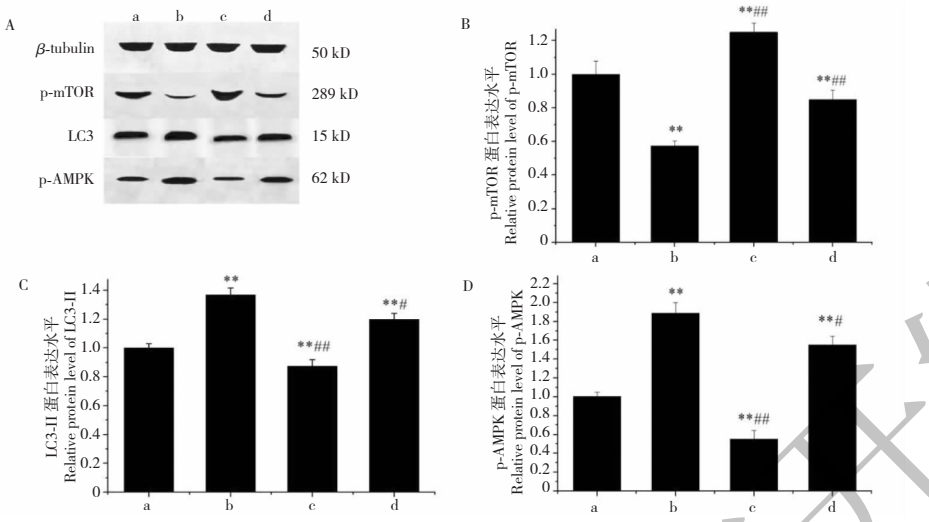


图 7 黑果枸杞花青素和 3-MA 对人肝癌 HepG2 细胞自噬相关因子 p-mTOR、LC3-II 和 p-AMPK 在蛋白水平表达的影响

Fig. 7 The effect of *L. ruthenicum* anthocyanidin and 3-MA on protein expression level of autophagy factors p-mTOR, LC3-II and p-AMPK in HepG2 cells

注：a 为对照组（0 μg/mL）；b 为花青素组（25 μg/mL）；c 为 3-MA 组（5 mM）；d 为花青素（25 μg/mL）+3-MA 组（5 mM）。A. p-mTOR、LC3-II 和 p-AMPK Western blot 电泳图；B. p-mTOR 蛋白相对表达量；C. LC3-II 蛋白相对表达量；D. p-AMPK 蛋白相对表达量。与对照组（0 μg/mL）相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与花青素组（25 μg/mL）相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。Note：a indicates the control group（0 μg/mL）；b indicates the group induced with *L. ruthenicum* anthocyanidin（25 μg/mL）；c indicates the group induced with 3-MA（5 mM）；d indicates the group induced with *L. ruthenicum* anthocyanidin（25 μg/mL）+3-MA（5 mM）. A. p-mTOR, LC3-II and p-AMPK Western blot figure；B. Relative expression of p-mTOR；C. Relative expression of LC3-II；D. Relative expression of p-AMPK. Compared with control，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；Compared with *L. ruthenicum* anthocyanidin group（25 μg/mL），$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$.

3 讨论

3.1 黑果枸杞花青素成分分析

常见的花青素主要有 6 种，分别为天竺葵色素、矢车菊色素、飞燕草色素、芍药色素、矮牵牛色素和锦葵色素[7]。而花青素在自然界中主要以糖苷化和酰基化的形式存在，以不同的结合方式形成了不同种类的花色苷，因此，通过分析花色苷来确定花青素成分是一种有效的分析方法[8]。目前，采用花青素含量的测定较为普遍的方法为高效液相色谱法以及紫外分光光度计法[7,8]。本试验利用 HPLC-ESIQ-TOF 法，流动相采用水相（0.5% 甲酸）和乙腈相梯度洗脱可获得较好的分离效果和质谱响应峰值。根据高分辨质谱对分子量和同位素峰型匹配的精确性，可以确定物质的分子式，再结合二级质谱碎片信息和黑果枸杞化学成分的相关文献报道，从黑果枸杞花青素的提取物中确认出 5 种衍生自矮牵牛色素和锦葵色素的花色苷，分别为矮牵牛素-3-*O*-芸香糖（反式对香豆酸-7-*O*-葡萄糖苷）-5-*O*-葡萄糖苷、矮牵牛素-3-*O*-芸香糖（反式对香豆酸）-5-*O*-葡萄糖苷、矮牵牛素-3-*O*-芸香糖（阿魏酰）-5-*O*-葡萄糖苷、矮牵牛素-3-*O*-芸香糖（咖啡酰）-5-*O*-葡萄糖苷和锦葵素-3-*O*-芸香糖（反式对香豆酸）-5-*O*-葡萄糖苷，且其总含量为 64.4%，说明 HPLC-ESIQ-TOF 分析实现了复杂中药成分快速分离分析，为黑果枸杞微量成分分析提供了一种有效分析方法，其他化合物的化学结构则还需进一步研究。

3.2 黑果枸杞花青素对人肝癌 HepG2 细胞增殖作用的影响

花青素具有抗肿瘤的生物特性，可抑制癌细胞的体外增殖、迁移和侵袭[9,10]。研究发现，从多种植物中提取的花青素在一定的时间和剂量范围内均可抑制人肝癌 HepG2 细胞的增殖[11,12]。本试验 CCK-8 结果显示，浓度为 25 μg/mL 的黑果枸杞花青素作用于人肝癌 HepG2 细胞 12、24 和 36 h 时均可有效抑制人肝癌 HepG2 细胞的活力；浓度为 50 μg/mL 的黑枸杞花青素刺激人肝癌 HepG2 细胞 24 h 后，人肝癌 HepG2 细胞的活力也显著降低；黑枸杞花青素作用 24 h 和 36 h 时，25 μg/mL 黑果枸杞花青素较其他浓度组对人肝癌细胞的抑制作用更佳，其中，黑枸杞花青素作用 24 h 时，25 μg/mL 黑果枸杞花青

素对人肝癌 HepG2 细胞的抑制作用最为显著,因此筛选出黑枸杞花青素最佳作用浓度和最佳作用时间分别为 25 μg/mL 和 24 h。此外,EdU 和细胞划痕结果显示,25 μg/mL 黑果枸杞花青素诱导 24 h 后,可有效抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖和迁移。

MOB1 蛋白大型抑癌基因 1/2(LATS1/2)激酶的关键调控因子,哺乳动物 MST1-MOB 1 复合物已被证明能抑制 Yes 相关蛋白(Yes-associated protein,YAP)的致癌活性,并参与多种肿瘤的发生[13]。YAP 表达失调在人类癌症中较为常见,YAP 活性的降低可有效抑制癌细胞增殖和肝的过度生长[14]。LATS 是公认的抑癌基因,在抑制癌细胞增殖的过程中可参与多条信号通路[15]。有研究表明,LATS 缺失会引起恶性外周神经鞘膜瘤细胞的过度增殖[16]。LATS 基因表达上调除可以抑制细胞的增殖外,还可有效抑制细胞的迁移[17]。研究发现哺乳动物 LATS1 和 LATS2 通过负调控不同的细胞周期检查点来控制细胞的增殖,LATS2 异位表达可使细胞停滞在 G1/S 期[18],而细胞在 G1-S 期的转换主要由周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4)进行调控[19]。本研究结果显示,用 25 μg/mL 的黑果枸杞花青素诱导人肝癌 HepG2 细胞 24 h,增殖关键因子 LATS1、LATS2 和 MOB1 的 mRNA 表达被显著上调,YAP 的 mRNA 表达和 CDK4 的蛋白表达均被显著下调。说明黑果枸杞花青素可通过抑制 CDK4 的表达使人肝癌 HepG2 细胞周期停滞在 G1/S 期并通过上调 LATS1、LATS2、MOB1 和下调 YAP 的 mRNA 表达来抑制人肝癌 HepG2 细胞的增殖。

3.3 黑果枸杞花青素对人肝癌 HepG2 细胞自噬作用的影响

近年来,细胞自噬在治疗人类疾病方面的作用逐渐引起重视。当自噬发生时,Beclin-1 被激活,进而活化 LC3 基因(包括 LC3-I 和 LC3-II 两种亚型)中的 LC3-I,而后 LC3-I 被修饰成 LC3-II 并通过融合蛋白转位至自噬体膜,从而促进自噬体的成熟[20]。已有研究证实 LC3-II 的含量与自噬泡数量成正比,因此自噬程度与 LC3-II 的表达水平呈正相关[21]。本研究发现,浓度为 25 μg/mL 的黑果枸杞花青素人肝癌 HepG2 细胞 24 h 后可有效上调 Beclin-1 在 mRNA 水平的表达,并有效上调 LC3-II 在 mRNA 和蛋白水平的表达,说明黑果枸杞花青素可通过上调 Beclin-1 和 LC3-II 的表达进而诱导人肝癌 HepG2 细胞自噬。

研究发现,细胞自噬对肝癌的抑制作用可受到许多信号通路的调控,其中 AMPK 信号通路在激活细胞自噬的过程中起着重要作用[22]。Huang 等[23]发现,增强肝癌细胞中的酮分解水平可有效抑制 AMPK 信号通路来抑制肝癌细胞发生过度自噬,从而促进肝癌细胞的增殖。本研究发现,浓度为 25 μg/mL 的黑果枸杞花青素作用 24 h 可明显上调 AMPK 的 mRNA 表达和 p-AMPK 的蛋白表达,说明黑果枸杞花青素可能通过激活 AMPK 信号通路来诱导人肝癌 HepG2 细胞发生自噬进而抑制肝癌细胞的增殖,与 Huang 等研究结果一致。此外,mTOR 信号通路在细胞自噬的过程中也扮演着重要的角色。Wang[24]和 Jia 等[25]发现,硫化氢和组蛋白乙酰转移酶 P300/CBP 相关因子(P300/CBP-associa-ted factor,PCAF)均可通过抑制 mTOR 信号转导途径诱导肝癌细胞发生自噬,进而抑制人肝癌细胞 HepG2 细胞的增殖与迁移。本研究发现,浓度为 25 μg/mL 的黑果枸杞花青素作用 24 h 可有效下调 p-mTOR 的蛋白表达,说明黑果枸杞花青素可能通过抑制 mTOR 信号通路来促进人肝癌 HepG2 细胞发生自噬进而抑制人肝癌细胞 HepG2 细胞的增殖与迁移,与 Wang 和 Jia 等研究结果一致。

4 结论

综上所述,通过 HPLC-ESIQ-TOF 分析从黑果枸杞花青素提取物中确认出 5 种花色苷,实现了复杂中药成分快速分离分析,为黑果枸杞微量成分分析提供了一种有效分析方法。此外,结果发现 25 μg/mL 黑果枸杞花青素诱导 24 h 时可有效抑制人肝癌 HepG2 细胞的增殖和迁移,促进人肝癌 HepG2 细胞自噬,为黑果枸杞花青素的深度开发奠定了一定的理论基础。

参考文献

1 Kim DW, Talati C, Kim R. Hepatocellular carcinoma (HCC): beyond sorafenib-chemotherapy[J]. World J Gastrointest Oncol,2017,8(2):256-265.

2 Xu CM, Pang GY, Li T. Progress in the research on physiological activities of anthocyanin[J]. China Food Addit(中国食品添加剂),2013(3):205-210.

3 Zhang QL, Gao HQ, Ling LJ, et al. Crude polysaccharides extracted from three characteristic plants in Qinghai Province and their activities[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29: 34-39.

4 Mazzoni L, Giampieri F, Alvarez SJM, et al. Isolation of strawberry anthocyanin-rich fractions and their mechanisms of action against murine breast cancer cell lines[J]. Food Funct, 2019, 10: 7103-7120.

5 Kwak JH, Kim Y, Ryu SI, et al. Anti-inflammatory effect from extracts of Red Chinese cabbage and Aronia in LPS-stimulated RAW 264. 7 cells[J]. Food Sci Nutr, 2020, 8: 1898-1903.

6 Ferramosca A, Di GM, Zara V. Antioxidant dietary approach in treatment of fatty liver: new insights and updates[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23: 4146-4157.

7 Wang TQ, Ma ZC, Wu JM, et al. Analysis of anthocyanins in *Lycium ruthenicum* by high performance liquid chromatography[J]. J Anal Sci(分析科技学报), 2020, 36: 465-470.

8 Zhang Z, Kou XL, Fugal Ken, et al. Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and anthocyanidins in bilberry extracts[J]. J Agr Food Chem, 2004, 52: 688-691.

9 Er Y, Gulnara T, Xi C, et al. Anthocyanin is involved in the activation of pyroptosis in oral squamous cell carcinoma[J]. Phytomedicine, 2019, 56(15): 286-294.

10 Lin BW, Gong CC, Song HF, et al. Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer[J]. Br J Pharmacol, 2017, 174: 1226-1243.

11 Yang Y. Determination of main chemical components, anthocyanin extraction and antitumor activity of purple yam[D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University(西南交通大学), 2017.

12 Li HY. The study on effect on alcoholic liver injury and liver cancer with mechanism of anthocyanins from purple sweet potato[D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University(西南交通大学), 2015.

13 Chen M, Zhang H, Shi Z, et al. The MST4-MOB4 complex disrupts the MST1-MOB1 complex in the Hippo-YAP pathway and plays a pro-oncogenic role in pancreatic cancer[J]. Bio Chem, 2018, 293: 14455-14469.

14 Yuan WC, Pepe-mooney B, Galli GG, et, al. NUAK2 is a critical YAP target in liver cancer[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4834.

15 Noa F, Yael A. The LATS1 and LATS2 tumor suppressors: beyond the Hippo pathway[J]. Cell Death Differ, 2017, 24: 1488-1501.

16 Wierzbicki PM, Adrych K, Kartanowicz D, et al. Underexpression of LATS1 TSG in colorectal cancer is associated with promoter hypermethylation[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19: 4363-4373.

17 Schlegelmlch K, Mohseni M, Kirak O, et al. Yapl acts downstream of a-catenin to control epidermal proliferation[J]. Cell, 2011, 144: 782-795.

18 Li Y, Pei J, Xia H, et al. Lats2, a putative tumor suppressor, inhibits G1/S transition[J]. Oncogene, 2003, 22: 4398-4405.

19 O'leary BRS, Finn NC, Turner. Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2016, 13: 417-430.

20 Ouyang L, Shi Z, Zhao S, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis[J]. 2012, 45: 487-498.

21 Yu XN, Chen H, Liu TT, et al. Targeting the mTOR regulatory network in hepatocellular carcinoma: are we making headway? [J]. BBA-Rev Cancer, 2019, 1871: 379-391.

22 Cao J, Wei RJ, Deng RY, et al. Research status of autophagy in pathological mechanism and medicine therapy for hepatocellular carcinoma[J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2019, 35: 3129-3133.

23 Huang D, Li T, Wang L, et al. Hepatocellular carcinoma redirects to ketolysis for progression under nutrition deprivation stress[J]. Cell Res, 2016, 26: 1112- 1130.

24 Wang SS, Chen YH, Ning C, et al. Hydrogen sulfide promotes autophagy of hepatocellular carcinoma cells through the PI3K/Akt/m TOR signaling pathway[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(3): e2688.

25 Jia YL, Xu M, Dou CW, et al. P300/CBP-associated factor (PCAF) inhibits the growth of hepatocellular carcinoma by promoting cell autophagy[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(10): e2400.

天然产物研究与开发