

# 大蓟炭中香叶木素诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡及其机制研究

姚亮亮<sup>1</sup>, 王晓珊<sup>2</sup>, 何军伟<sup>3</sup>, 岳丹洁<sup>2</sup>, 蒋福全<sup>2</sup>, 郑里翔<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>江西中医药大学附属医院, 南昌 330006; <sup>2</sup>厦门大学, 厦门 361102; <sup>3</sup>江西中医药大学, 南昌 330004

**摘要:** 研究大蓟炭中香叶木素诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡及其作用机制。采用硅胶和 Sephadex LH-20 柱层析从大蓟炭中分离鉴定了三个黄酮类化合物, 经 NMR 和 MS 鉴定他们的结构分别为香叶木素(1)、刺槐素(2)和柳川鱼黄素(3)。采用 MTS 方法检测不同浓度的香叶木素对 MCF-7 的细胞活力的影响; 流式细胞术检测不同浓度的香叶木素处理对 MCF-7 细胞凋亡的作用; Western blot 法检测香叶木素处理对细胞 PARP、P-JNK 等细胞凋亡相关蛋白表达的影响。MTS 及流式细胞术结果显示香叶木素能显著抑制 MCF-7 的增殖并且诱导细胞凋亡; 香叶木素可上调 P-JNK 促进细胞凋亡。结果表明香叶木素在体外实验能通过激活 JNK 细胞凋亡通路抑制 MCF-7 的增殖及促进细胞凋亡。

**关键词:** 大蓟炭; 香叶木素; 人乳腺癌 MCF-7 细胞; 细胞凋亡; 作用机制

中图分类号: R273

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.008

## Effects of Diosmetin from Carbonized *Cirsium japonicum* on Apoptosis in Human MCF-7 Breast Cancer Cells and its Mechanisms

YAO Liang-liang<sup>1</sup>, WANG Xiao-shan<sup>2</sup>, HE Jun-wei<sup>3</sup>, YUE Dan-jie<sup>2</sup>, JIANG Fu-quan<sup>2</sup>, ZHENG Li-xiang<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; <sup>2</sup>Xiamen University, Xiamen 361102, China; <sup>3</sup>Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

**Abstract:** To study the effects of diosmetin from carbonized *Cirsium japonicum* on apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells and its mechanisms. Three flavonoids were isolated and purified from carbonized *C. japonicum* by silica gel and Sephadex LH-20 chromatography methods. Their structures were elucidated by NMR and MS spectroscopic data and identified as diosmetin(1), acacetin(2) and pectolarigenin(3). MTS assay was performed to detect the viability of MCF-7 cells treated by different concentrations of diosmetin. The cell apoptosis rate was further analyzed by flow cytometry (FCM). Western blot assay was applied to measure the apoptosis related protein expression levels of PARP, P-JNK. Diosmetin treatment on MCF-7 cells significantly inhibited cell proliferation and induced cell apoptosis. Diosmetin significantly downregulated P-JNK and upregulated cleaved-PARP protein expression. Diosmetin inhibited MCF-7 cell proliferation and induced cell apoptosis by activation of JNK pathway *in vitro*.

**Key words:** diosmetin; human breast cancer cell line MCF-7; cell apoptosis; mechanism

中药大蓟炭由菊科植物蓟(*Cirsium japonicum* Fisch. ex DC.)的干燥地上部分炒炭加工炮制而成, 收载于每版的《中国药典》中。据《中药大词典》记载, 大蓟炭具有凉血止血、散瘀解毒消痈的功效, 用于治疗多种出血症, 如吐血、衄血、崩漏、尿血等, 有“止血良药”之美称, 还可用于治疗痈肿疮毒等疾

病。现代研究表明大蓟炭中主要含有黄酮类化合物, 另外还有三萜类、甾体类、挥发油类、长链烯炔醇类、有机酸类等结构类型<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明, 大蓟提取物及单体化合物具有广泛的生物活性, 包括抗肿瘤、抗菌、抗出血、抗氧化、抗病毒、降血压和降血糖等作用<sup>[2,3]</sup>。在抗肿瘤方面, 大蓟对多种癌细胞的生长有抑制作用, 能抑制人白血病细胞 K562、肝癌细胞 HepG2、宫颈癌细胞 Hela、胃癌细胞 BGC823 和结肠癌细胞 HT-29 的生长, 大蓟黄酮为其主要的活性成分<sup>[4]</sup>。此外, 大蓟总黄酮能诱导人

收稿日期: 2016-09-12 接受日期: 2017-02-24

基金项目: 江西中医药大学校级科研项目(2013ZR004); 国家自然科学基金(81160531); 江西省自然科学基金(2016BAB205223)

\*通信作者 Tel: 86-791-87118931; E-mail: zlx000168@sina.com

肝癌 SMMC-7721 和 HeLa 细胞的凋亡<sup>[5]</sup>。大蓟总黄酮的抗肿瘤活性可能与其能够极为显著地提高肿瘤小鼠细胞产生 IL-1 和 IL-2 的转录水平,促进肿瘤小鼠 IL-1 和 IL-2 mRNA 的表达有关<sup>[6]</sup>。

香叶木素(3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavone, C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)主要分布于豆科植物金合欢以及木犀科植物油橄榄中,是一种重要的黄酮类化合物<sup>[7]</sup>。研究证实香叶木素对多种肿瘤细胞具有增殖抑制的作用<sup>[8-10]</sup>,但其对人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞的作用鲜有文献报道。乳腺癌起源于乳腺导管内上皮或乳腺小叶,已成为全球范围内女性最常见的恶性肿瘤之一。《全球癌症报告 2014》中数据显示,2012 年全球女性乳腺癌新发病例数超过 167.7 万,占女性新发癌症病例数的 25.2%,其中中国新发病例数 18.7 万,占女性乳腺癌新发病例数的 11.2%。从 90 年代以来,我国乳腺癌发病率呈快速上升趋势,乳腺癌已是中国女性发病率最高的癌症,居癌症死亡原因第六位。

本研究以人乳腺癌 MCF-7 细胞为研究对象,通过相关分子生物学技术,对比分析来源于中药大蓟炭中香叶木素成分对人乳腺癌 MCF-7 增殖抑制的作用及其对相关蛋白表达的影响,证实香叶木素能在体外抑制人乳腺癌 MCF-7 增殖并揭示其分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

大蓟炭购自江西中医药大学附属医院中药房,硅胶及硅胶板购自青岛海洋化工公司,Sephadex LH-20 为 GE 公司产品;DMEM 培养基和胎牛血清购自 Hyclone 公司;青霉素-链霉素购自 Gibico 公司青霉素-链霉素购自 Gibico,胰蛋白酶消化液由碧云天生物技术研究提供,MTS 购自 Promega 公司,Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自 BD 公司,SP600125 购自 Sigma 公司,BCA 蛋白定量试剂盒、山羊抗兔二抗和山羊抗鼠二抗均购自 Thermo 公司,ECL 试剂盒购自 Advansta 公司,PARP 一抗、JNK 一抗、P-JNK 一抗和  $\beta$ -actin 一抗均购自 Cell Singnal 公司。有机溶剂为分析纯购自西陇化工股份有限公司。

### 1.2 细胞株

人乳腺癌细胞 MCF-7,来源于美国 ATCC(American Type Culture Collection)。

### 1.3 仪器

二氧化碳培养箱、超净工作台和 MK3 酶标仪均

为 Thermo 公司;AXIO OBSERVER A1 荧光倒置显微镜为 Carl Zeiss AG 公司;电泳仪为 Bio-RAD 公司,流式细胞仪 Beckman 公司。布鲁克 AVANCE III 400 M 核磁共振谱仪;AB SCIEX Triple Quad 3500 质谱仪。

### 1.4 提取与分离

大蓟炭干燥粉末 1.0 kg 于 95% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h,合并 3 次滤液,减压浓缩得总浸膏 130 g。取浸膏 120 g 溶解于 2 L 超纯水中,依次用等体积的石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取 3 次。其中氯仿萃取部分 15.8 g,经硅胶柱层析分离,氯仿:甲醇梯度洗脱(100:0 $\rightarrow$ 4:1),根据 TLC 环己烷-丙酮展开(5:1 $\rightarrow$ 2:1),合并为八个部分(Fr. A-Fr. H),取 0.78 g Fr. B 经反复 Sephadex-LH20 柱层析分离纯化得到化合物 3(110.5 mg);取 0.58 g Fr. D 经反复 Sephadex-LH20 柱层析分离纯化得到化合物 2(58.9 mg);取 0.32 g Fr. G 经反复 Sephadex-LH20 柱层析分离纯化得到化合物 1(35.2 mg)。

### 1.5 乳腺癌细胞 MCF-7 的复苏与培养

取出冻存于液氮罐中的冻存管迅速置于 37 °C 水浴中,使冻存管中的细胞快速解冻,然后在无菌条件下将冻存管中的细胞悬液混匀移入离心管中,离心 1000 rpm,5 min;弃上清,将细胞重悬于新的培养液中再洗两遍,以去除残留的 DMSO。然后将细胞悬液移入细胞培养皿中,于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。乳腺癌细胞 MCF-7 所用培养液为含 10% 胎牛血清,青霉素-链霉素双抗的 DMEM 培养基。细胞在 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中呈贴壁状态生长。待细胞长至布满培养瓶底部 80%~90% 时,用含 0.25% EDTA 的胰酶消化液消化 1 min 左右,收集消化后的细胞,1000 rpm 离心 3 min,离心结束后取出离心管,小心吸去上清。吸取完全培养基至离心管中,反复轻轻吹打重悬细胞,将细胞悬液分装入新培养皿中。置 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。传代周期为 3~4 d/次。

### 1.6 细胞毒性实验(MTS 法)

MTS 法是由 MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐,商品名为噻唑蓝)法改良而来,是一种检测细胞存活和生长的方法。其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓩(Formazan)并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。二甲基亚砜(DMSO)能溶解细胞中的甲瓩,用酶联免疫检测仪在 490

nm 波长处测定其光吸收值,可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内,MTT 结晶形成的量与细胞数成正比。MTS 为新一代四氮唑盐化合物,其原理与 MTT 相同,但其被还原形成的甲瓖产物稳定性更高,显色更快,故灵敏度更高,且操作方便。

将对数生长期的细胞消化后接种于 96 孔板中,接种中间 60 孔每孔 100  $\mu\text{L}$ ,边缘孔用 PBS 填充,放入 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中 37  $^\circ\text{C}$  过夜贴壁。孵育 24 h,待细胞贴壁后吸去原培养基,用预热的无血清 DMEM 培养基稀释香叶木素(终药物浓度分别为 0、5、10、20、40、100 和 200  $\mu\text{Mol/L}$ ),每孔 100  $\mu\text{L}$  加入,每组设 6 个复孔培养 72 h 后加入 MTS 15  $\mu\text{L}$ ,倒置显微镜观察细胞形态,37  $^\circ\text{C}$  反应 2 h 后在酶联免疫检测仪 492 nm 测量各孔的吸光值(OD),通过比较 OD 值判断细胞增殖或存活情况。存活率% = (试验组/对照组平均值)  $\times$  100

### 1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡

Annexin V 是检测细胞凋亡的灵敏指标之一,以标记了的 Annexin V 作为荧光探针,利用流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)是一种核酸染料,它不可以透过完整的细胞膜,但对凋亡中晚期的细胞和坏死细胞,PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红;用荧光标记的 Annexin V 与 PI 双染色,可同时区分正常细胞、凋亡早期、凋亡晚期和坏死细胞,并可以根据所检测的荧光强度对凋亡细胞进行定量分析。

将对数生长期细胞消化后接种于 6 孔板另加一 3 cm 盘中,5%  $\text{CO}_2$  培养箱中 37  $^\circ\text{C}$  过夜贴壁。孵育 24 h,用预热的无血清 DMEM 培养基稀释香叶木素(终药物浓度分别为 0、1、5、10 和 20  $\mu\text{Mol/L}$ )及 5-Fu(终浓度 100  $\mu\text{Mol/L}$ ),每孔 2 mL 加入,处理 12 h。胰蛋白酶(不含 EDTA)消化后分别收集不同浓度香叶木素处理 24 h 的乳腺癌 MCF-7 细胞;PBS 洗涤细胞 2 次(2000 rpm 离心 5 min),收集细胞。加入 500  $\mu\text{L}$  的 1  $\times$  Binding Buffer 悬浮细胞;加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 混匀后,加入 5  $\mu\text{L}$  PI 混匀;室温、避光、反应 10 min;在 1h 内进行流式细胞仪的检测。

### 1.8 蛋白质 Western blot 分析

蛋白免疫印迹杂交(Western Blot, WB)是将蛋白样本通过聚丙烯酰胺电泳按分子量大小分离,再转移到杂交膜上,然后通过一抗/二抗复合物对靶蛋白进行特异性检测的方法。Western Blot 是进行蛋白质分析最流行和成熟的技术之一。

实验步骤如下:1、细胞处理:无血清加药,分别做两组,其中一组用 P-JNK 抑制剂 sp600125 提前处理细胞 1h,再合加香叶木素(终浓度 0、1、5、10 和 20  $\mu\text{Mol/L}$ )处理细胞 12 h,2、蛋白样品的制备:取出细胞样品吸去培养基置于冰上,用 PBS 缓冲液清洗一次,加入 RIPA 细胞裂解液(加入蛋白酶抑制剂和磷酸化酶抑制剂)冰上裂解细胞 30 min,12000 rpm 4  $^\circ\text{C}$  离心 10 min。3、BCA 法测定蛋白浓度:将 Reagent A 与 Reagent B 按 50:1 的比例混和均匀;将配好的 Reagent 混和液加入到各孔,每孔 200  $\mu\text{L}$ ,将标准品(0.1、0.25、0.5、1.0 和 2.0 mg/mL)和待测样品分别吸取 2  $\mu\text{L}$  加入到 96 孔板中;37  $^\circ\text{C}$  培养箱孵育 30 min 后用酶标仪测量 OD560 的吸收值,并根据标准曲线换算样品蛋白浓度。4、蛋白样品的准备:将蛋白样品与 4  $\times$  SDS Loading Buffer 按 1:3 比例混合,100  $^\circ\text{C}$  煮 10 min。3000 rpm 离心 3 min。5、SDS-PAGE 电泳:使用 10% 分离胶,按照次序每条泳道各加处理好的样品 30  $\mu\text{L}$ ,样品两边预留出两个孔道加入蛋白质 Marker,多余孔道加入 30  $\mu\text{L}$  1  $\times$  SDS Loading Buffer 用于平衡。80V 电压进行电泳,至蛋白质 Marker 分离后将电压调至 120V,Loading Buffer 电泳至胶底部时停止电泳。6、转膜:先将 PVDF 膜在甲醇中浸泡 5 min,滤纸,PVDF 膜,海绵垫放入转移缓冲液(4  $^\circ\text{C}$  预冷)中充分浸泡。电泳完成后拆开双层玻璃板,按照以下顺序安装转膜装置:黑色板(阴极),海绵,滤纸,凝胶,PVDF 膜,滤纸,海绵,红色板(阳极)。在放置每一层时都需要排尽气泡并且边缘严格对齐。安装好转膜装置后将其放入电转移槽中,加入转移缓冲液,每张膜 150 mA 恒流进行电转。转膜结束后,取出 PVDF 膜。7、封闭:取出 PVDF 膜 5% 脱脂奶粉室温置于摇床封闭 1~2 h。8、一抗孵育:根据所需蛋白质大小,对照 Marker 位置,裁剪 PVDF 膜,加入相应的一抗,4  $^\circ\text{C}$  摇床孵育过夜。9、二抗孵育:一抗孵育结束后,用镊子取出 PVDF 膜,在 TBST 缓冲液中反复震荡漂洗 3 次,每次 10 min。加入相应的二抗(5% 脱脂奶粉稀释 5000~10000 倍),室温孵育 1~2 h。10、显影:二抗孵育 PVDF 膜结束后,用 TBST 缓冲液反复震荡漂洗三次,每次 10 min。将 ECL(Pierce)试剂盒 A 液、B 液 1:1(V/V)混合再用 ddH<sub>2</sub>O 1:1 稀释,滴加于 PVDF 膜表面,涂抹均匀,于暗室中用医用 X 光胶片压数秒或更长。显影液显影,定影液定影。Western blot 条带量化分析采用 ImageJ 图像处理软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 结构鉴定

**化合物 1** 黄色粉末, UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$ : 339, 269 nm, ESI-MS  $m/z$ : 299. 1 [M-H]<sup>-</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm, *J*/Hz): 12.96 (1H, s, OH-5), 10.86 (1H, s, OH-7), 9.47 (1H, s, OH-3'), 7.56 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.4, H-6'), 7.44 (1H, d, *J* = 2.0, H-2'), 7.10 (1H, d, *J* = 8.4, H-5'), 6.78 (1H, s, H-3), 6.49 (1H, d, *J* = 2.0, H-8), 6.22 (1H, d, *J* = 2.0, H-6), 3.89 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm): 181.34 (C-4), 164.15 (C-7), 163.27 (C-2), 161.36 (C-9), 157.21 (C-5), 151.10 (C-4'), 146.57 (C-3'), 123.08 (C-6'), 118.45 (C-1'), 112.67 (C-2'), 112.07 (C-5'), 103.56 (C-3), 103.39 (C-10), 98.79 (C-6), 93.36 (C-8), 55.61 (4'-OCH<sub>3</sub>). 以上波谱数据与香叶木素文献报道<sup>[11]</sup>一致, 故鉴定化合物 **3** 为香叶木素。

**化合物 2** 黄色粉末, UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$ : 335, 267 nm, ESI-MS  $m/z$ : 283. 2 [M-H]<sup>-</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm, *J*/Hz): 12.87 (1H, s, OH-5), 10.79 (1H, s, OH-7), 7.97 (2H, d, *J* = 8.8, H-2', 6'), 7.05 (2H, d, *J* = 8.8, H-3', 5'), 6.81 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, d, *J* = 2.0, H-8), 6.15 (1H, d, *J* = 2.0 Hz,

H-6), 3.81 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm): 181.78 (C-4), 164.12 (C-7), 163.23 (C-2), 162.23 (C-4'), 161.15 (C-9), 157.13 (C-5), 128.14 (C-2', 6'), 122.78 (C-1'), 114.56 (C-3', 5'), 103.78 (C-10), 103.45 (C-3), 98.85 (C-6), 94.02 (C-8), 55.60 (4'-OCH<sub>3</sub>). 以上波谱数据与刺槐素文献报道<sup>[11]</sup>一致, 故鉴定化合物 **2** 为刺槐素。

**化合物 3** 黄色粉末, UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$ : 336, 273 nm, ESI-MS  $m/z$ : 313. 1 [M-H]<sup>-</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm, *J*/Hz): 13.05 (1H, s, OH-5), 10.72 (1H, s, OH-7), 8.03 (2H, d, *J* = 8.8, H-2', 6'), 7.11 (2H, d, *J* = 8.8, H-3', 5'), 6.87 (1H, s, H-3), 6.63 (1H, s, H-8), 3.87 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 3.78 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm): 182.59 (C-4), 163.78 (C-2), 162.73 (C-4'), 157.76 (C-7), 153.22 (C-5), 152.86 (C-9), 131.83 (C-6), 128.71 (C-2', 6'), 123.30 (C-1'), 114.99 (C-3', 5'), 104.60 (C-10), 103.49 (C-3), 94.7 (C-8), 60.39 (6-OCH<sub>3</sub>), 55.98 (4'-OCH<sub>3</sub>). 以上波谱数据与柳川鱼黄素文献报道<sup>[12]</sup>一致, 故鉴定化合物 **3** 为柳川鱼黄素。

### 2.2 香叶木素抑制 MCF-7 细胞增殖

#### 2.2.1 倒置显微镜观察细胞形态

倒置显微镜下观察到: 对照组细胞密度较大, 生

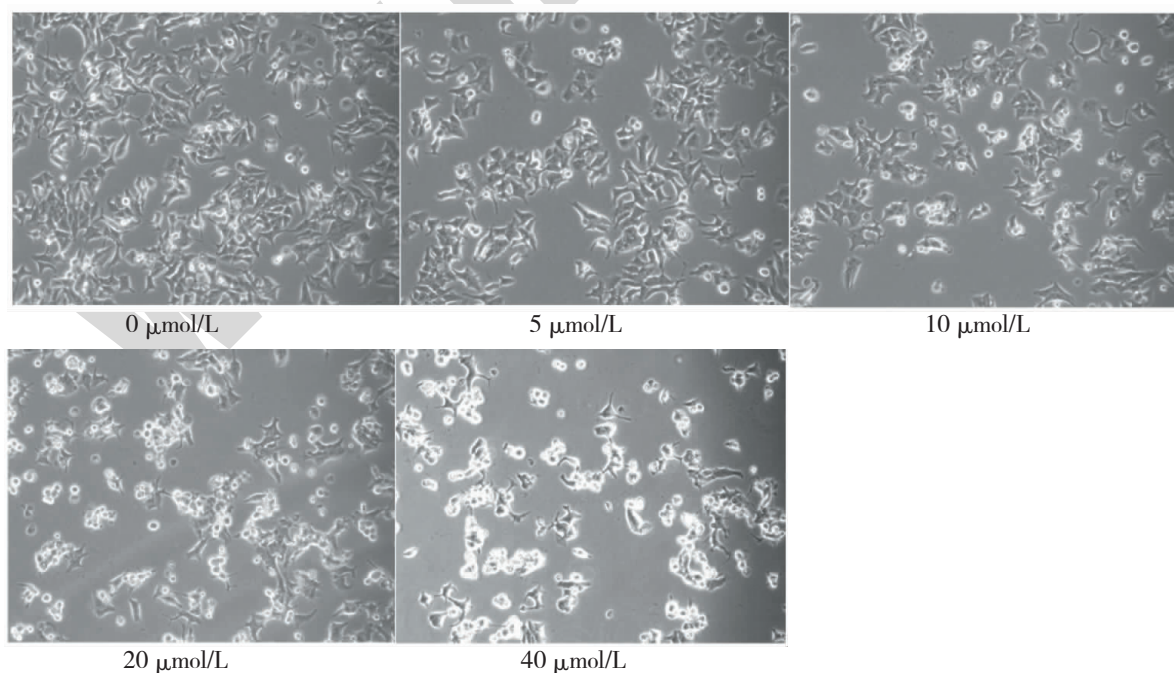


图 1 不同浓度香叶木素(0、5、10、20 和 40  $\mu\text{Mol/L}$ ) 处理 12 h 后 MCF-7 细胞形态

Fig. 1 Cellular morphology of MCF-7 after 12 h treated by different concentrations of diosmetin(0,5,10,20 and 40  $\mu\text{Mol/L}$ )

长状况良好,形态规则,大小均一,贴壁状况良好。经香叶木素处理后的实验组可见 MCF-7 细胞密度变小且形态不规则,细胞形态变圆,细胞间隙增大,且随药物浓度增加,细胞数明显减少(见图 1)。

### 2.2.2 MTS 法检测香叶木素对 MCF-7 细胞增殖的抑制

MTS 结果表明香叶木素对 MCF-7 细胞增殖有抑制作用,随着药物浓度增加,抑制作用越强(见图 2)。20  $\mu\text{Mol/L}$  香叶木素处理细胞后,细胞存活率为 82% 左右,与对照组比较显著降低( $P < 0.05$ ),

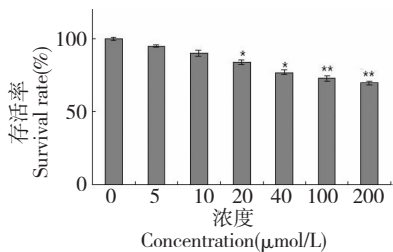


图 2 不同浓度的香叶木素处理 MCF-7 细胞 72 h 对细胞存活率的影响

Fig. 2 Cell viability of MCF-7 after 72 h treated by different concentrations of diosmetin

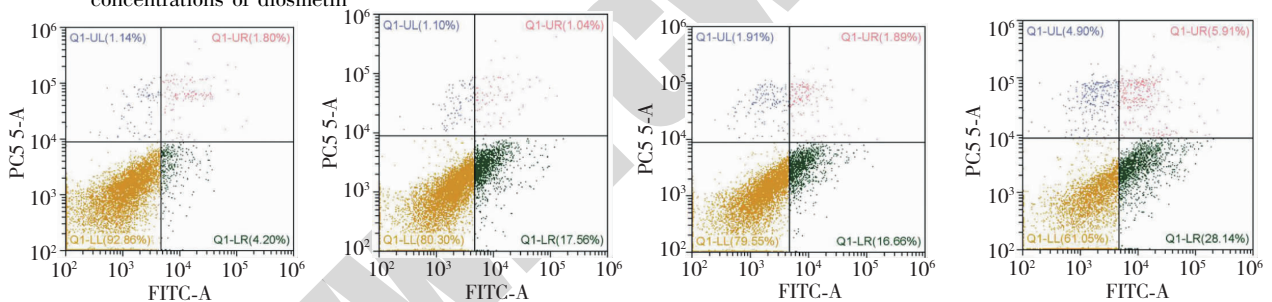


图 3 不同浓度香叶木素(0、5、10 和 20  $\mu\text{Mol/L}$ )作用 MCF-7 细胞 24 h 后诱导细胞凋亡

Fig. 3 Cell apoptosis of MCF-7 after 24 h treated by different concentrations of diosmetin(0,5,10 and 20  $\mu\text{Mol/L}$ )

### 2.4 香叶木素诱导 MCF-7 细胞凋亡的机制研究

PARP 是细胞凋亡核心成员半胱天冬酶(caspase)的切割底物,出现在凋亡早期。PARP 帮助修复正常或轻度 DNA 受损细胞的 DNA,维持基因组的稳定。当损伤过度时,细胞凋亡的启动使 PARP 水解形成相对分子质量为 89 kDa 和 24 kDa 两个片段,因此,可以用针对 PARP 大片段降解产物的抗体检测细胞是否发生凋亡<sup>[13]</sup>。

JNK(c-Jun 氨基末端蛋白激酶,c-Jun N-terminal kinase)也被称为应激活化蛋白激酶,属于促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)超家族的成员之一,具有促凋亡作用。目前

200  $\mu\text{Mol/L}$  香叶木素处理,细胞存活率为 70% 左右,与对照差异显著。MTS 结果看,香叶木素对 MCF-7 细胞增殖的效果不是十分明显,可能与其结构中酚羟基数目较多,具有很强的抗氧化,香叶木素可以直接还原 MTS 形成甲瓩,从而造成假阴性的现象。

### 2.3 流式细胞术检测细胞凋亡变化

在流式细胞术双参数散点图上(见图 3):左下象限显示正常活细胞,为 AnnexinV<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>;右下象限为早期凋亡细胞,为 AnnexinV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>;右上象限为晚期凋亡细胞,为 AnnexinV<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>;而左上象限为细胞膜破损细胞,PI 渗入细胞内,呈现 AnnexinV<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>。Annexin V-FITC/PI 双染后经流式细胞仪检测,结果显示,香叶木素对 MCF-7 细胞凋亡或坏死具有一定影响,且随着香叶木素浓度的增高,细胞凋亡具有一定的浓度依赖性。低浓度香叶木素处理(5 和 10  $\mu\text{Mol/L}$ )细胞,细胞早期凋亡明显,达到 17% 左右,显著高于对照组水平( $P < 0.05$ ),20  $\mu\text{Mol/L}$  香叶木素处理细胞,其早期凋亡率达到 28% 与对照组差异显著( $P < 0.05$ )。

认为 JNK 通路机制主要有两个:一是通过转录依赖的方式调节下游凋亡相关靶基因的转录和凋亡蛋白的表达而介导死亡受体途径及线粒体途径的细胞凋亡。JNK 被刺激因素激活后,可从细胞质转移到细胞核中,通过磷酸化激活 c-jun、c-Fos 等转录因子,而调节下游凋亡相关靶基因的表达。如 JNK 入核激活转录因子后有诱导 FasL、TNF 等配体蛋白的表达,而启动死亡受体途径的细胞凋亡。二是通过非转录依赖的方式直接调节胞质内靶蛋白的活性而介导线粒体途径的细胞凋亡,譬如可上调 BH3-only 蛋白如 Bim、Bid、DP5 的表达,活化 Bax 等促凋亡蛋白介导线粒体途径的细胞凋亡,此过程不依赖新基因

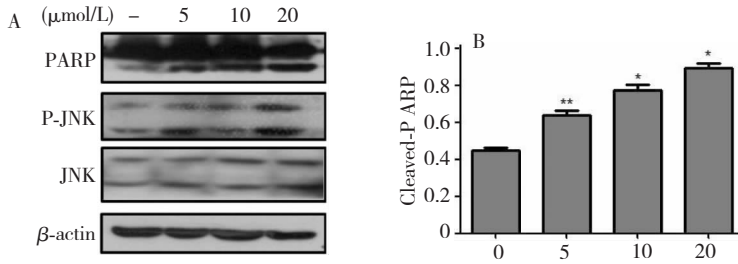


图4 不同浓度的香叶木素作用 MCF-7 细胞 12 h 后相关蛋白的表达及 Cleaved-PARP 的表达量化分析

Fig. 4 Protein expression and quantitative analysis of Cleaved-PARP of MCF-7 after 12 h treated by different concentrations of diosmetin

的表达<sup>[13]</sup>。

实验通过蛋白质的 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 分析的方法,比较 PARP、P-JNK 蛋白的变化(见图 4)。实验先通过不同浓度香叶木素处理细胞,证实香叶木素能诱导 MCF-7 细胞发生 PARP 切割,低浓度香叶木素处理(5 μMol/L)就可以显著提高 Cleaved-PARP 的表达量(图 4B),且能上调 P-JNK(见图 4A)。再进一步合加 P-JNK 抑制剂 Sp600125

对比发现:单加香叶木素 PARP 切割、P-JNK 均上调(见图 5A),显著提高 Cleaved-PARP 的表达量(见图 5B);合加 Sp600125 后,P-JNK 受到明显抑制,PARP 切割同时被抑制,10 μMol/L 香叶木素处理不能显著提高 Cleaved-PARP 的表达量,但是加大香叶木素处理浓度可以显著提高 Cleaved-PARP 的表达量(见图 5B)。

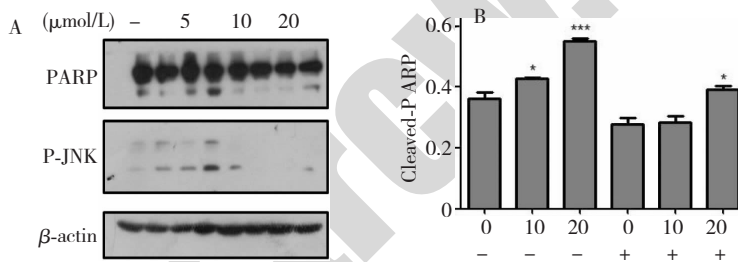


图5 Sp600125 及不同浓度的香叶木素作用 MCF-7 细胞 12 h 后相关蛋白的表达及 Cleaved-PARP 的表达量化分析

Fig. 5 Protein expression and quantitative analysis of Cleaved-PARP of MCF-7 after 12 h treated by different concentrations of diosmetin and Sp600125

### 3 讨论与结论

倒置显微镜结果显示,经香叶木素处理后 MCF-7 细胞密度变小且形态不规则,细胞形态变圆,细胞间隙增大,且随药物浓度增加,细胞数明显减少;由 MTS 结果表明香叶木素对 MCF-7 细胞增殖有抑制作用,随着药物浓度增加,抑制作用越强;流式细胞术结果同样表明香叶木素对 MCF-7 细胞凋亡或坏死具有一定影响,且随着香叶木素浓度的增高,细胞凋亡具有一定的浓度依赖性。综合以上研究结果,证实香叶木素能抑制乳腺癌细胞的增殖,对细胞的生长抑制具有浓度依赖性。通过 Western Blot 的方法观察不同浓度香叶木素对人乳腺癌 MCF-7 细胞 PARP、P-JNK 蛋白表达的影响,证实香叶木素能诱

导 MCF-7 细胞发生 PARP 切割,且能上调 P-JNK,且随着药物浓度的增加,现象越明显;在合加 P-JNK 抑制剂 Sp600125 的作用下 PARP 明显下调。由此,在人乳腺癌 MCF-7 细胞中,香叶木素可通过诱导细胞凋亡发挥抗癌活性,且根据 Western Blot 实验结果显示香叶木素可通过活化 JNK 通路从而诱导细胞凋亡。

#### 参考文献

- 1 Song ZG(宋泽规),Xue W(薛伟). Research advances of *Cirsium japonicum* DC. *Guangzhou Chem Ind*(广州化工), 2011,39(7):13-15.
- 2 Liu S,Zhang J,Li D,*et al.* Anticancer activity and quantitative analysis of flavone of *Cirsium japonicum* DC. *Nat Prod Res*,2007,21:915-922.

- 3 Zhi F(植飞), Kong LY(孔令义), Peng SX(彭司勋). Progress in chemical and pharmacological studies on *Cirsium japonicum*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(7): 90-93.
- 4 Wang ZF(王振飞), Li Y(李煜), Dai BZ(戴宝贞), et al. Study on inhibitory effects of *Cirsium japonicum* Fisch. DC on five kinds of human carcinoma cells. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2008, 27:761-762.
- 5 Liu SJ(刘素君), Guo H(郭红), Pan M(潘明), et al. Study on total flavonoids of *Cirsium japonicum* DC induce tumor cell apoptosis. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2010, 20:294-295.
- 6 Liu SJ(刘素君), Zhou ZB(周泽斌), Hu X(胡霞), et al. Effect of total flavonoids of *Cirsium japonicum* DC on tumor-bearing mice interleukin-1 and interleukin-2. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2008, 18:335-337.
- 7 Liu J, Wen X, Liu, B, et al. Diosmetin inhibits the metastasis of hepatocellular carcinoma cells by downregulating the expression levels of MMP2 and MMP9. *Mol Med Rep*, 2016, 13:2401-2408.
- 8 Zhao R, Chen Z, Jia G, et al. Protective effects of diosmetin extracted from *Galium verum* L. on the thymus of U14-bearing mice. *Canadian J Physiol Pharm*, 2011, 89:665-673.
- 9 Androutsopoulos VP, Mahale S, Arroo RR, et al. Anticancer effects of the flavonoid diosmetin on cell cycle progression and proliferation of MDA-MB 468 breast cancer cells due to CYP1 activation. *Oncol Reports*, 2009, 21:1525-1528.
- 10 Yang Y(杨阳), Lin MZ(林满洲), Huang YW(黄艺文), et al. Promoting effect of diosmetin on the cell cycle arrest and cell apoptosis in HepG2 cell and its mechanism. *Hainan Med J* (海南医学), 2016, 27:354-357.
- 11 Jiang XL(蒋秀蕾), Fan CL(范春林), Ye WC(叶文才). Chemical constituents of *Cirsium japonicum* DC. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37:510-512.
- 12 Ishida H, Umino T, Tsuji K, et al. Studies on antihemorrhagic substances in herbs classified as hemostatics in Chinese medicine. VII On the antihemorrhagic principle in *Cirsium japonicum* DC. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35:861-864.
- 13 Zhao YC(赵彦超), Gu Y(顾耘). Progress in apoptosis pathways. *Mod Med J* (现代医学), 2013, 41:285-288.

## 《天然产物研究与开发》青年编委会

### 青年编委(以姓氏笔划为序)

#### Members

丁克	王红兵	戈惠明	尹文兵	尹胜	吕兆林
DING Ke	WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LV Zhaolin
伍婉卿	刘相国	孙昊鹏	孙桂波	孙黔云	李芸霞
WU Wanqing	LIU Xiangguo	SUN Haopeng	SUN Guibo	SUN Qianyun	LI Yunxia
李良成	李国友	邱莉	汪海波	沐万孟	张炳火
LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo	MU Wanmeng	ZHANG Binghuo
陈益华	林茂祥	林昌俊	欧阳杰	易华西	罗应刚
CHEN Yihua	LIN Maoxiang	LIN Changjun	OU Yangjie	YI Huaxi	LUO Yinggang
周文	胡友财	袁涛	夏永刚	高慧敏	唐金山
ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang	GAO Huimin	TANG Jinshan
黄胜雄	韩淑燕	蓝蔚青	廖晨钟	潘卫东	薛永波
HUANG Shengxiong	HAN Shuyan	LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	PAN Weidong	XUE Yongbo