

香叶木素和香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷的生物活性比较

王月华¹, 杨红英¹, 付崇罗¹, 李爱峰², 玄红专^{1*}

¹聊城大学生命科学学院; ²聊城大学化学与化工学院, 聊城 252059

摘要: 研究香叶木素和香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷对不同肿瘤细胞 (MCF-7、MDA-MB-231 和 A549) 和血管内皮细胞 (HUVECs) 的细胞毒性及作用机制。正常培养的肺腺癌细胞 (A549)、乳腺癌细胞 (MCF-7、MDA-MB-231) 及血管内皮细胞 (HUVECs) 经不同浓度的香叶木素和香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 (20、40、80、160 μ M) 分别处理 24 和 48 h, 倒置显微镜观察细胞形态, SRB 法检测细胞存活率; 吖啶橙染色观察细胞核凝集和片段化; Hoechst 33258 检测细胞凋亡; 荧光探针 DCHF 检测细胞内活性氧 (ROS); Western blot 检测膜联蛋白 A7 (ANXA7)、P62、procaspase3 和 LC3 的表达。结果表明, 香叶木素以剂量依赖的方式抑制肿瘤细胞 MDA-MB-231、MCF-7、A549 的增殖和去血清条件下血管内皮细胞的增殖, 通过上调 LC3-II 的水平, 促进肿瘤细胞自噬。香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷对去血清条件下血管内皮细胞有保护作用, 显著降低去血清条件下血管内皮细胞的细胞凋亡和细胞核片段凝集, 显著降低细胞内 ROS 水平, 下调 caspase3 和 LC3-II 的水平。香叶木素和香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷具有不同的生物活性。香叶木素是一种潜在的抗肿瘤化合物, 而香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷可能成为一种保护 HUVECs 的有效药物。

关键词: 香叶木素; 香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷; 细胞凋亡; 自噬; 活性氧

中图分类号: R285.6

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.7.020

Comparison of Biological Activities of Diosmetin and Diosmetin-7-*O*- β -D-Glucopyranoside

WANG Yue-hua¹, YANG Hong-ying¹, FU Chong-luo¹, LI Ai-feng², XUAN Hong-zhuan^{1*}

¹School of Life Science, Liaocheng University; ²School of Chemical & Chemical engineering, Liaocheng 252059, China

Abstract: To compare the biological activities of diosmetin and diosmetin-7-*O*- β -D-glucopyranoside extracted from the peel of *Trichosanthes kirilowii* Maxim, we investigated their cytotoxicity on different cancer cells (MCF-7, MDA-MB-231 and A549) and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), and the probable mechanisms were also preliminary studied. Cell viability, morphological changes of nuclei and the expression of procaspase 3, LC3B, p62 and annexin A7 (ANXA7) were measured by sulforhodamine B (SRB) assay, acridine orange and Hoechst33258 staining and western blot respectively. Intracellular reactive oxygen species (ROS) level was determined by utilizing a fluorescent probe, 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein (DCHF). SRB assay showed that diosmetin had significant inhibition effects on the proliferation of MCF-7, MDA-MB-231 and A549 human cancer cell lines in a dose- and time- dependent manner, and induced HUVECs deprived of serum apoptosis. Western blot results showed that diosmetin induced tumor cell autophagy by increasing LC3-II level. However, diosmetin-7-*O*- β -D-glucopyranoside had a protective effect on HUVECs deprived of serum. Hoechst 33258 staining and acridine orange staining results showed apoptosis and nuclei fragments in HUVECs deprived of serum significantly decreased after treated with diosmetin-7-*O*- β -D-glucopyranoside respectively. Moreover, diosmetin-7-*O*- β -D-glucopyranoside significantly decreased ROS levels and inhibited caspase 3 and LC3-II level in HUVECs deprived of serum. Diosmetin and diosmetin-7-*O*- β -D-glucopyranoside had different biological activities. Diosmetin was a good antitumor agent whereas diosmetin-7-*O*- β -D-glucopyranoside might be a promising substituent to protect HUVECs.

VECs.

Key words: diosmetin; diosmetin-7-*O*- β -D-glucopyranoside; apoptosis; autophagy; reactive oxygen species

收稿日期: 2016-12-16 接受日期: 2017-04-01

基金项目: 国家自然科学基金 (31672499); 山东省高等学校

科技计划 (J16LE21); 山东省自然科学基金

(ZR2014BQ023); 聊城大学创新基金 (26312160904)

* 通信作者 Tel: 86-635-8230739; E-mail: xuanhongzhan@lcu.edu.cn

香叶木素(3',5,7-三羟基-4'-甲氧基黄酮)和香叶木素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷是广泛分布于各种植物中的两个天然黄酮类化合物,如栝楼、菊花、异叶青兰和柑橘^[14]。黄酮具有多种药理活性,例如抗氧化,抗菌,抗病毒,抗炎,抗肿瘤,抗血栓和保肝^[5-9]。香叶木素和香叶木素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷是广泛应用于食品和饮料中的两种类黄酮化合物,可以改善健康和预防疾病,如炎症、心脏疾病、糖尿病和癌症^[10-14]。但目前关于香叶木素和香叶木素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷的研究比较少,本研究检测了香叶木素和香叶木素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷对不同的肿瘤细胞和人脐静脉血管内皮细胞(HU-VECs)的影响,并对其机理进行了初步研究,为今后的研究提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

DMEM 培养基(美国 Gibco 公司)、胎牛血清(美国 Hyclone 公司);胰酶、磺酰罗丹明 B(SRB)、Hoechst 33258、吖啶橙(AO)、DCHF 探针(美国 Sigma 公司);细胞培养皿、96 孔板(美国 Falcon 公司);Tris(上海生工),一抗 ANXA7, P62, procaspase3, β -actin 和辣根过氧化物酶标记的二抗(Santa Cruz Biotechnology);LC3B(Cell Signaling Technology)。其它试剂均为分析纯。

香叶木素和香叶木素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷由

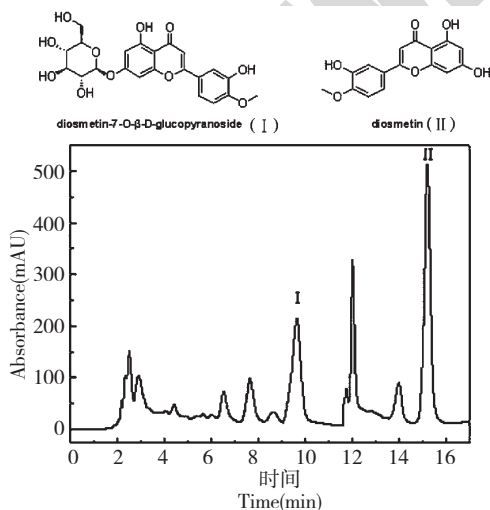


图1 香叶木素和香叶木素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷结构式

Fig. 1 Chemical structures of diosmetin and diosmetin-7-O- β -D-glucopyranoside

聊城大学化学与化工学院分析化学实验室李爱峰老师提供,主要是从栝楼皮(*Trichosanthes kirilowii* Maxim)中分离、提纯,并经 UV 和 NMR 鉴定,纯度为 98% 以上^[1]。A549、MCF-7、MDA-MB-231 和 HU-VECs 细胞由本实验室保存。

香叶木素和香叶木素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷结构式如图 1 所示。

1.2 主要仪器

Heal Force 生物安全柜、Heal Force CO₂ 培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司);TE2000S 倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);激光扫描共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司);MK3 酶标仪(芬兰雷勃公司);AR2140 电子分析天平(美国奥豪斯公司);Milli-Q Synthesis 超纯水(美国密理博公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞的培养

A549、MCF-7、MDA-MB-231 和 HUVECs 细胞培养在添加 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,孵育条件为:5% CO₂、37 °C、饱和湿度 CO₂ 培养箱中。倒置相差显微镜下观察细胞形态。

1.3.2 细胞存活率的测定

将处于对数生长期的细胞按 4000 个/孔种植到 96 孔板,37 °C、5% CO₂ 孵育,待肿瘤细胞长到 60% 以上,血管内皮细胞长到 80% 以上,除正常组外所有处理组分别经不同浓度的香叶木素(20、40、80、160 μ M)和香叶木素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(20、40、80、160 μ M)分别处理细胞 24 和 48 h 后,弃细胞培养液,用 10% 三氯乙酸 4 °C 固定 1 h,然后用 SRB 染色 10 min,晾干,100 mM Tris 碱溶解,在 492nm 处测吸光值。

细胞存活率(%) = (处理组 OD 值/对照组 OD 值) \times 100%

1.3.3 细胞核凝集和片段化测定

将处于对数生长期的细胞按 8×10^4 个/孔种植到共聚焦小皿中,37 °C、5% CO₂ 孵育,待血管内皮细胞长到 80% 以上,加药处理 48 h,弃培养液,用 1 \times PBS 冲洗细胞,加入吖啶橙染液 1 min,弃吖啶橙染液,用 1 \times PBS 冲洗两次,激光扫描共聚焦显微镜观察、分析结果。

1.3.4 细胞凋亡检测

将处于对数生长期的细胞按 8×10^4 个/孔种植到 24 孔板中,37 °C、5% CO₂ 孵育,待血管内皮细胞长到 80% 以上,加药处理 48 h,弃培养液,用 1 \times PBS

冲洗细胞,将 Hoechst 33258 应用液代替细胞培养液,37 °C 孵育 15 min;弃 Hoechst 33258 染液,加入 PBS 倒置相差显微镜观察、分析结果。

1.3.5 细胞内活性氧的测定

将处于对数生长期的细胞按 8×10^4 个/孔种植到共聚焦小皿中,37 °C,5% CO₂ 孵育,待血管内皮细胞长到 80% 以上,加药处理 48 h,弃培养液,用 1 × PBS 冲洗细胞,将 DCHF 应用液代替细胞培养液,37 °C 孵育 30 min;弃 DCHF 染液,用 1 × PBS 冲洗细胞两次,加入 DMEM 原液用激光扫描共聚焦显微镜观察、分析结果。

1.3.6 免疫荧光显微镜法

将处于对数生长期的细胞按 8×10^4 个/孔种植到共聚焦小皿中,37 °C,5% CO₂ 孵育,待血管内皮细胞长到 80% 以上,加药处理 48 h,弃培养液,4% 多聚甲醛固定 15 min,5% 驴血清封闭,一抗 4 °C 过夜,用 0.1M PBS 冲洗细胞,二抗孵育 1 h,用 0.1M PBS

冲洗细胞,激光扫描共聚焦显微镜观察、分析结果。

1.3.7 蛋白水平的检测

细胞经加药(80 μM)处理 48 h 后,用蛋白裂解液收集不同处理组细胞,BCA 法测定蛋白浓度。每组细胞分别经 12% SDS-PAGE 电泳、转印、杂交、ECL 显色,得到 P62、procaspase3、ANXA7、LC3、β-actin 蛋白杂交带。蛋白相对量通过 Quantity One 软件分析。

1.4 数据统计

采用 SPSS v11.5 软件包统计分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 *t* 检验进行统计学分析。*P* < 0.05 为差异显著。

2 实验结果

2.1 不同浓度的香叶木素和香叶木素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷抗肿瘤活性

经不同浓度的香叶木素和香叶木素-7-O-β-D-吡喃

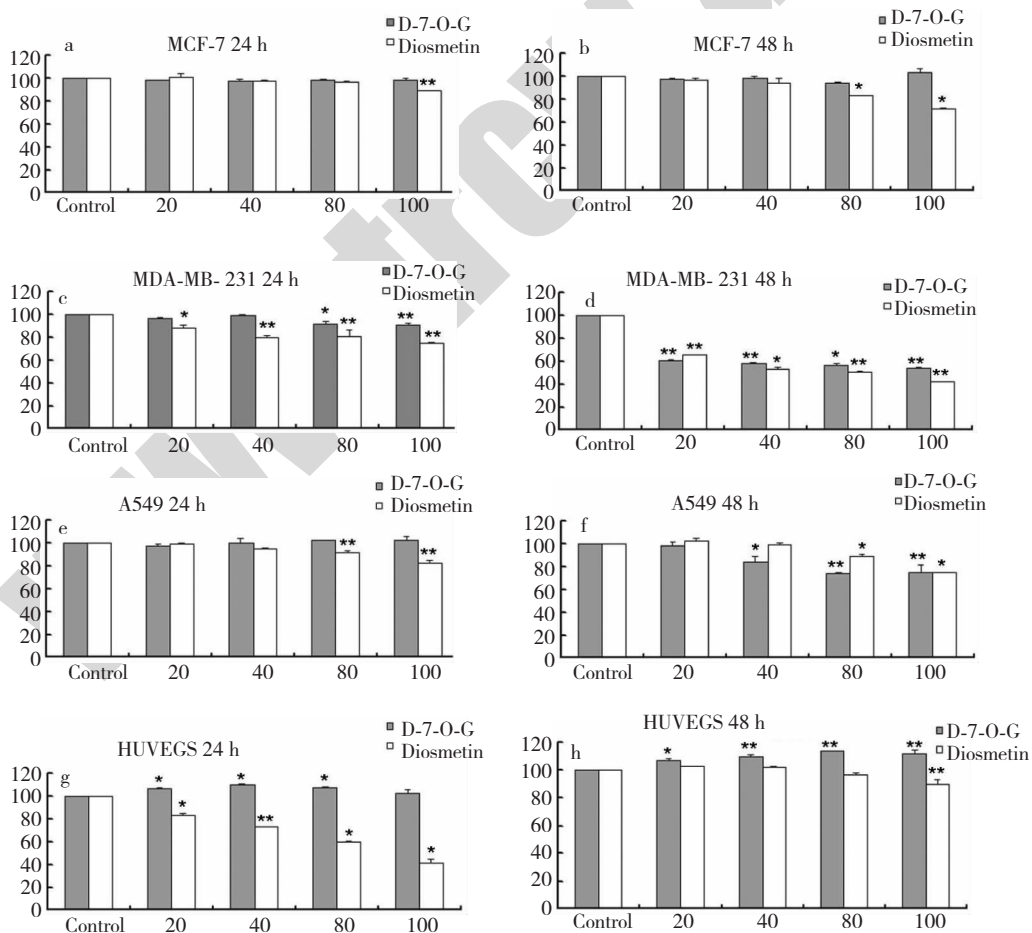


图2 不同浓度的香叶木素和香叶木素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对不同细胞存活率的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of diosmetin and diosmetin-7-O-β-D-glucopyranoside on cell viabilities of different cells for 24 and 48 h

葡萄糖苷(20、40、80、160 μM)分别处理细胞 24 和 48 h 后,通过 SRB 测定细胞存活率,结果如图 2 所示。

由图 2 可以看出,在 24h,香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷抑制三种肿瘤细胞增殖不显著;香叶木素在浓度为 80 μM 以上显著抑制 A549、MCF-7、MDA-MB-231 细胞的增殖,并呈现时间和剂量依赖性;在去除血清条件下,不同浓度的香叶木素促进内皮细胞的凋亡,而香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷促进内皮细胞增殖;对正常培养的 HUVECs,香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷显著促进细胞增殖(* P <

0.05, ** P < 0.05)。

2.2 香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷对去血清条件下血管内皮细胞(HUVECs)的影响

为了进一步探究香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷对内皮细胞的保护功效,我们分别通过吖啶橙和 Hoechst33258 染色、ROS 的检测以及 western blotting 分别检测了香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(80 μM)对去血清条件下 HUVECs 48 h 细胞的影响,结果如图 3 所示。

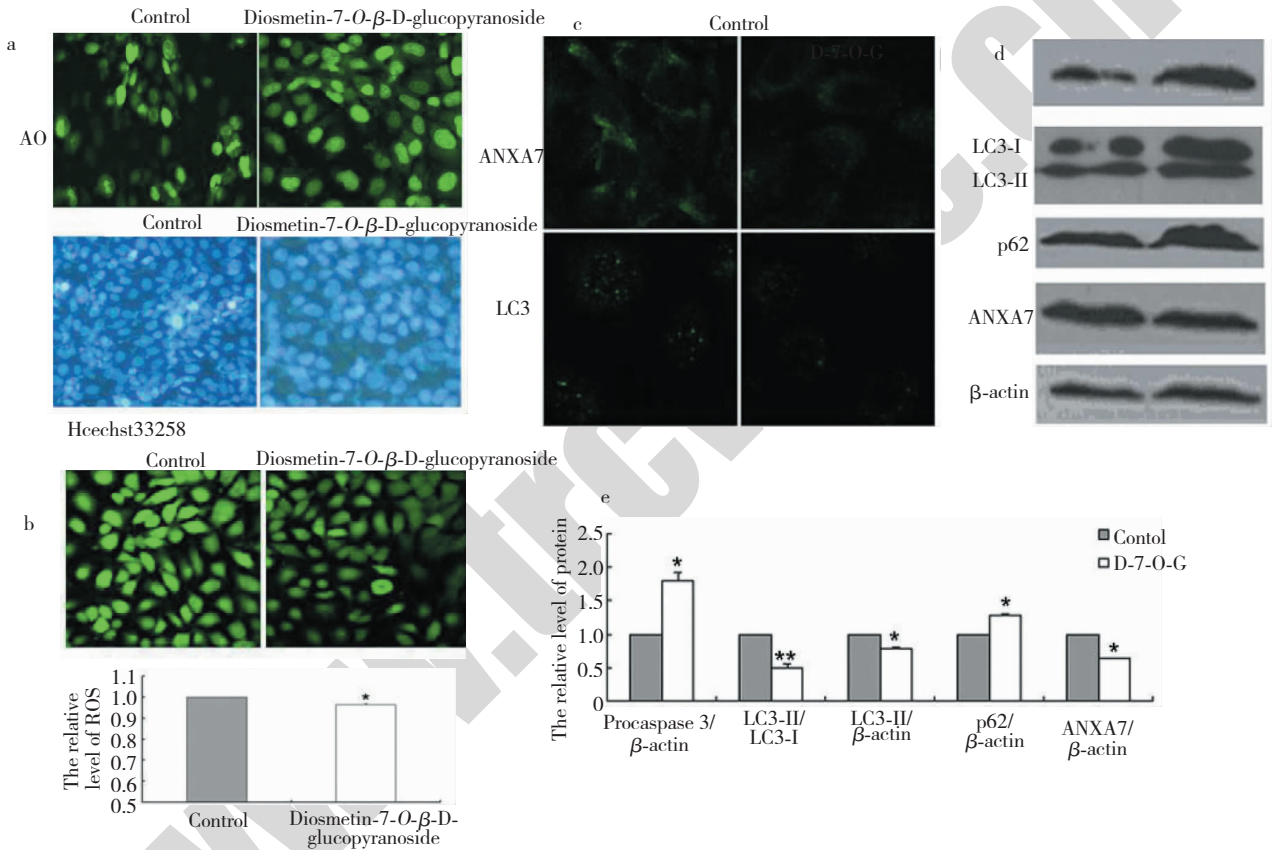


图3 香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷对去血清条件下 HUVECs 的影响

Fig. 3 Effect of diosmetin-7-*O*- β -D-glucopyranoside in HUVECs deprived of serum

由图 3 可以看出,80 μM 香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷处理去血清条件下 HUVECs 后,核断裂数目明显减少;显著降低了细胞内 ROS 的水平;显著上调 P62 表达水平,下调 LC3-II、ANXA7 和 caspase3 的表达(* P < 0.05, ** P < 0.01)。

2.3 香叶木素和香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷对 MDA-MB-231 细胞中 ANXA7、LC3B 和 procaspase3 蛋白水平的影响

为了确定香叶木素和香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡

萄糖苷对肿瘤细胞的不同影响,我们通过 western blotting 分别检测了香叶木素和香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(80 μM)处理 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,对细胞内 ANXA7、LC3 和 procaspase3 的影响,结果如图 4 所示。

由图 4 可以看出,80 μM 香叶木素和香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷对 MDA-MB-231 细胞影响有不同之处,香叶木素显著得上调 LC3-II 和 ANXA7 的表达水平,下调 procaspase3 的表达(* P < 0.05, ** P < 0.01)。

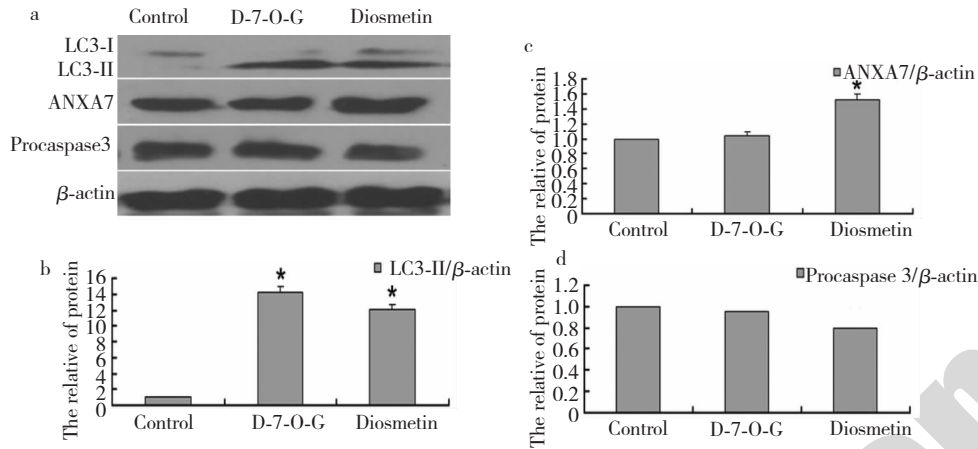


图4 香叶木素和香叶木素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对 ANXA7、LC3 和 procaspase3 的影响

Fig. 4 Effects of diosmetin and diosmetin-7-O-β-D-glucopyranoside on the expression of ANXA7, LC3 and procaspase3

3 讨论与结论

香叶木素和香叶木素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷是两种不同的类黄酮。最近一项研究表明,香叶木素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷在体内被肠道细菌转化为大量的香叶木素和少量的金合欢素^[15]。我们首先研究了香叶木素和香叶木素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对不同细胞的细胞毒性,结果表明,香叶木素和香叶木素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷具有不同的生物活性。一方面,香叶木素比香叶木素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷具有更高的抗肿瘤活性;另一方面,香叶木素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对去血清条件下的血管内皮细胞具有良好的保护作用。由此我们推断,香叶木素和香叶木素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的空间结构可能影响其不同的生物学活性。

我们对香叶木素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷保护血管内皮细胞的机理进行了初步研究。血管内皮细胞在维持血管的动态平衡中起重要作用^[16]。血管内皮细胞损伤或功能障碍会引发许多疾病,例如动脉粥样硬化^[17]。在本实验中,我们发现香叶木素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷能够通过抑制细胞凋亡和自噬以及下调 ROS 水平来保护血管内皮细胞。

同样,我们对香叶木素抗肿瘤的作用机理也进行了初步研究,发现在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中,香叶木素主要是通过促进细胞自噬和肿瘤抑制基因膜联蛋白 A7 的表达来促进肿瘤细胞凋亡。总之,基于目前的结果我们初步推断香叶木素和香叶木素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷具有不同的生物学活性。

参考文献

- Li A, Sun A, Liu R, *et al.* An efficient preparative procedure for main flavonoids from the peel of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. using polyamide resin followed by semi-preparative high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*, 2014, 965:150-157.
- Lee SJ, Jung TH, Kim H, *et al.* Inhibition of c-Kit signaling by diosmetin isolated from *Chrysanthemum morifolium*. *Arch Pharm Res*, 2014, 37:175-185.
- Numonov SR, Qureshi MN, Aisa HA. Development of HPLC protocol and simultaneous quantification of four free flavonoids from *Dracocephalum heterophyllum* Benth. *Int J Anal Chem*, 2015, 2015:503139.
- Zhu MZ, Wu W, Jiao LL, *et al.* Analysis of flavonoids in lotus (*Nelumbo nucifera*) leaves and their antioxidant activity using macroporous resin chromatography coupled with LC-MS/MS and antioxidant biochemical assays. *Molecules*, 2015, 20:10553-10565.
- Androutopoulos VP, Spandidos DA. The flavonoids diosmetin and luteolin exert synergistic cytostatic effects in human hepatoma HepG2 cells via CYP1A-catalyzed metabolism, activation of JNK and ERK and P53/P21 up-regulation. *J Nutr Biochem*, 2013, 24:496-504.
- Patel K, Gadewar M, Tahilyani V, *et al.* A review on pharmacological and analytical aspects of diosmetin; a concise report. *Chin J Integr Med*, 2013, 19:792-800.
- Brito A, Ramirez JE, Areche C, *et al.* HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. *Molecules*, 2014, 19:17400-17421.
- Sanchez-Bridge B, Lévêques A, Li H, *et al.* Modulation of

- (-)-epicatechin metabolism by coadministration with other polyphenols in Caco-2 cell model. *Drug Metab Dispos*, 2015, 43(1):9-16.
- 9 Barrajón-Catalán E, Taamalli A, Quirantes-Piné R, et al. Differential metabolomic analysis of the potential antiproliferative mechanism of olive leaf extract on the JIMT-1 breast cancer cell line. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 105:156-162.
- 10 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 Rep*, 2009, 21:1525-1528.
- 11 Androutsopoulos V, Wilsher N, Arroo RR, et al. Bioactivation of the phytoestrogen diosmetin by CYP1 cytochromes P450. *Cancer Lett*, 2009, 274(1):54-60.
- 12 Xie YY, Yuan D, Yang JY, et al. Cytotoxic activity of flavonoids from the flowers of *Chrysanthemum morifolium* on human colon cancer Colon205 cells. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11:771-778.
- 13 Salib JY, Eskander EF, Michael HN. Bioactivity of diosmetin glycosides isolated from the epicarp of date fruits, *Phoenix dactylifera*, on the biochemical profile of alloxan diabetic male rats. *Phytother Res*, 2013, 27:699-704.
- 14 Wang SF, Leng J, Xu YM, et al. Identification and determination of major constituents in a traditional Chinese medicine compound recipe Xiongdankaiming tablet using HPLC-PDA/ESI-MS(n) and HPLC-UV/ELSD. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2013, 14:604-614.
- 15 Zhao M, Du L, Tao J, et al. Determination of metabolites of diosmetin-7-O-glucoside by a newly isolated *Escherichia coli* from human gut using UPLC-Q-TOF/MS. *J Agric Food Chem*, 2014, 62:11441-11448.
- 16 Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002, 420:868-874.
- 17 Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*, 1995, 57:791-804.

(上接第 1247 页)

- 63 Qi DL (奇达拉), et al. Extraction and purification of palmitoleic acid from seabuckthorn oil by supercritical CO₂ extraction. *Inner Mongolia Petrochem Ind* (内蒙古石油化工), 2012, 1:121-122.
- 64 Zhang ZS (张泽生), et al. Processing and comprehensive utilization of palmitoleic acid. *China Food Addit* (中国食品添加剂), 2016, 9:198-202.
- 65 Awad AC, et al. Methods to reduce free fatty acids and cholesterol in anhydrous animal fat. US 6129945 A, 2000-10-10.
- 66 Ratnayake W. Overview of methods for the determination of trans fatty acids by gas chromatography, silver-ion thin-layer chromatography, silver-ion liquid chromatography, and gas chromatography/mass spectrometry. *J AOAC Int*, 2003, 87:523-539.
- 67 Aliev AM, et al. The study of microalgae *Nannochloropsis salina* fatty acid composition of the extracts using different techniques. SCF vs conventional extraction. *J Mol Liq*, 2016, In press.
- 68 Yu CX (于晨旭), et al. Purification of PUFA in fish oil and enzymatic transesterification catalyzing by lipozyme. *J Dalian Polytech Univ* (大连轻工业学院学报), 1997, 16:62-66.
- 69 Shahidi F, et al. Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies. *Trends Food Sci Tech*, 1998, 9:230-240.
- 70 An TQ (安腾奇), et al. Improvement of oleic acid purity by-solvent crystallization and urea adduction. *China Oils Fats* (中国油脂), 2016, 41:64-68.
- 71 Hou WW (侯雯雯), et al. Separation of linoleic acid from mixed fatty acids by frozen solvent crystallization. *China Oils Fats* (中国油脂), 2011, 35:54-16.
- 72 Hayes DG, et al. Urea complexation for the rapid, ecologically responsible fractionation of fatty acids from seed oil. *J Am Oil Chem Soc*, 1998, 75:1403-1409.
- 73 Inuwa H, et al. Isolation and determination of omega-9 fatty acids from *Telfairia Occidentalis*. *Int J Food Nutri Safety*, 2012, 1:9-14.
- 74 Teramoto M, et al. Separation of ethyl esters of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by circulating liquid membranes using silver nitrate as a carrier. Uphill transport by use of temperature and solvent dependencies of distribution ratio. *Sep Sci Technol*, 1996, 31:1953-1969.
- 75 Suzuki T, et al. Extraction of polyunsaturated fatty-acid ethyl-esters from aqueous silver-nitrate solution using supercritical ethane and ethylene and modeling of the extraction process. *Kagaku Kogaku Ronbun*, 1994, 20:97-104.
- 76 Wille J, et al. Palmitoleic acid isomer (C16:1Δ6) in human skin sebum is effective against gram-positive bacteria. *Skin Pharmacol Phys*, 2003, 16:176-187.