

# 紫甘薯花青素对肝癌的影响及其机制的研究

李佳睿<sup>1</sup>, 李泓焯<sup>1</sup>, 喻凯<sup>1\*</sup>, 李甫<sup>2</sup>, 马珂<sup>1</sup>, 何雨轩<sup>1</sup>

<sup>1</sup>西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031; <sup>2</sup>中国科学院成都生物研究所, 成都 610041

**摘要:**为研究紫甘薯花青素对体外培养的人肝癌细胞 SNU-387 的影响及其可能的机制。在不同终浓度紫甘薯花青素处理下, 利用 MTT 法和 Hoechst 33258 染色法, 测定人肝癌细胞 SNU-387 增殖活力, 通过测定细胞 TNF- $\alpha$  含量来考察死亡受体 TNFR1 介导的外源性凋亡通路的作用, 通过测定细胞内 Caspase-8 表达量变化来考察 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路的作用。结果表明在细胞凋亡实验中, 不同浓度紫甘薯花青素作用下, 人肝癌细胞 SNU-387 增殖活力降低, 出现核固缩等凋亡特征, 细胞内 TNF- $\alpha$  含量和 Caspase-8 表达量提高; 在阻断剂 PDTC 作用下, Caspase-8 表达量无差异; 在阻断剂 SB203580 作用下, Caspase-8 表达量下降。综上, 紫甘薯花青素可以通过死亡受体 TNFR1 介导的外源性凋亡通路和 MAPK 信号通路参与介导肝癌细胞 SNU-387 的凋亡过程。

**关键词:**紫甘薯花青素; SNU-387 细胞; 凋亡

中图分类号: R966

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.1.007

## Effect and Mechanism of Purple Sweet Potato Anthocyanins on Liver Cancer

LI Jia-rui<sup>1</sup>, LI Hong-ye<sup>1</sup>, YU Kai<sup>1\*</sup>, LI Fu<sup>2</sup>, MA Ke<sup>1</sup>, HE Yu-xuan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Life Science and Engineering in Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China;

<sup>2</sup>Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy Sciences, Chengdu 610041, China

**Abstract:** To study the effect of purple sweet potato anthocyanins on human hepatocellular carcinoma cell SNU-387 cultured *in vitro* and its possible mechanism. The proliferation of human hepatoma carcinoma cell SNU-387 treated by different concentrations of purple sweet potato anthocyanins was measured with MTT and Hoechst 33258 staining. The effect of exogenous apoptotic pathway mediated by death receptor TNFR1 was investigated through measuring the cellular TNF- $\alpha$  content and to examine the function of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathway by measuring the change of expression of Caspase-8 in cells. The results suggested that in the experiment of apoptosis, under different final concentrations of purple sweet potato anthocyanins, the activity of SNU-387 in human HCC cells decreased and nuclear pyknosis and other apoptotic characteristics occurred, and the contents of TNF- $\alpha$  and Caspase-8 in the cells increased; Under the influence of blocking agent PDTC, there was no difference in the expression of Caspase-8, and the expression of Caspase-8 decreased under the action of blocking agent SB203580. In summary, anthocyanins from purple sweet potato can participate in the process of apoptosis mediated by SNU-387 through an exogenous apoptotic pathway mediated by death receptor TNFR1 and MAPK signaling pathway.

**Key words:** purple sweet potato anthocyanin; SNU-387 cells; apoptosis

紫甘薯属于多年生双子叶植物, 花青素含量约为 20 ~ 180 mg/100 g<sup>[1,2]</sup>。紫甘薯来源的花青素, 是一种天然的类黄酮类物质<sup>[3,4]</sup>, 具有抗氧化活性<sup>[5-7]</sup>、保护肝脏等作用。关于紫甘薯花青素对肝癌细胞的影响研究还未见有报道。本实验将在体外培养肝癌细胞 SNU-387, 研究紫甘薯花青素对它的增殖活力、凋亡情况的影响, 并进一步研究紫甘薯花青

素对 TNFR1 死亡受体介导的外源性凋亡通路、MAPK 信号通路和 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响, 探讨其对肝癌细胞 SNU-387 凋亡影响的分子机制, 为紫甘薯花青素的深入开发来源提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验药物

紫甘薯花青素, 纯度 83.34%, 由中科院成都生物研究所提供。

### 1.2 细胞系

人肝癌细胞 SNU-387, 由中国科学院成都生物

研究所提供。

### 1.3 试剂

DMEM 培养基、胰蛋白酶(HyClone 公司);胎牛血清(上海复蒙基因生物科技有限公司);四甲基偶氮唑盐(MTT,美国 Amresco 公司);顺铂(美国 Sigma 公司,p4394);曲拉通溶液;四氢吡咯二硫代氨基甲酯(PDTC);SB203580、Hoechst 33258(Sigma);Caspase-8 活性检测试剂盒(Beyotime);TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(R&D)。

### 1.4 主要仪器

生化多功能酶标仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);二氧化碳恒温孵箱(ESCO)。

### 1.5 实验方法

#### 1.5.1 肝癌细胞 SNU-387 的增殖活力检测

取对数生长期 SNU-387 细胞,以  $1 \times 10^4$  个/孔的密度接种到 96 孔板,100  $\mu\text{L}$ /孔并放入恒温培养箱(37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ )培养过夜。24 h 后吸弃培养液,加入含不同浓度紫甘薯花青素(0、20、40、80  $\mu\text{M}$ /L)、DMSO 溶解的顺铂(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )培养液 100  $\mu\text{L}$ ,处理 24 h;利用 MTT 法测定各孔的  $\text{OD}_{490}$ 。以未加花青素的  $\text{OD}_{490}$  为 100%,计算不同浓度花青素对 SNU-387 细胞增殖的影响。

#### 1.5.2 Hoechst 33258 染色

将肝癌细胞 SNU-387 稀释成  $1 \times 10^5$  个/mL,按 2 mL/孔加入到 6 孔板中并培养过夜;加入紫甘薯花青素,使终浓度为 0、20、40、80  $\mu\text{M}/\text{L}$ ,继续培养 48 h;每孔加入 4% 多聚甲醛固定液 0.5 mL,4  $^{\circ}\text{C}$  下反应 30 min。弃去多聚甲醛固定液,每孔加入 0.5 mL 0.1% 曲拉通溶液,室温通透性处理 15 min;吸弃曲拉通溶液,每孔加入 Hoechst 33258(5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )0.5 mL,室温避光反应 30 min;加入 1 mL PBS,观察肝癌细胞 SNU-387 的凋亡状态。

#### 1.5.3 细胞中 TNF- $\alpha$ 含量、Caspase-8 活性水平的检测

将肝癌细胞 SNU-387 按  $1 \times 10^4$  个/孔的密度接种到 96 孔板,100  $\mu\text{L}$ /孔,按单个孔板分为不作处理、加入终浓度为 50  $\mu\text{M}/\text{L}$  阻断剂 PDTC、加入终浓度为 20  $\mu\text{M}/\text{L}$  阻断剂 SB203580 三组。分别加入 0、20、40、80  $\mu\text{M}$  的紫甘薯花青素,继续孵育 24 h 后,收集细胞,反复冻融。用 ELISA 试剂盒检测冻融细胞液中 TNF- $\alpha$  含量和 Caspase-8 的活性。以未加花青素组为 1,计算各组 TNF- $\alpha$  含量和 Caspase-8 的活

性的相对变化。

## 2 实验结果

### 2.1 紫甘薯花青素对肝癌细胞 SNU-387 活力的影响

用终浓度分别为 20、40、80  $\mu\text{M}$  的紫甘薯花青素处理肝癌细胞 SNU-387 24 h 后,肝癌细胞 SNU-387 的活力分别降低为 82.76%、78.47%、63.35%,用 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的顺铂同样处理后,活力降低为 54.18%,如图 1 所示。

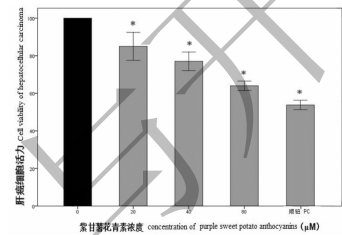


图1 紫甘薯花青素对肝癌细胞 SNU-387 活力的影响

Fig. 1 Effect of purple sweet potato anthocyanins on activity of SNU-387 cells

注:与空白对照组比较,\*  $P < 0.05$

Note: Compared with control, \*  $P < 0.05$

### 2.2 紫甘薯花青素诱导人肝癌细胞 SNU-387 凋亡

如图 2 所示,对比荧光区域:空白组内肝癌细胞 SNU-387 形态比较完整,染色比较均匀;紫甘薯花青素剂量组中,肝癌细胞 SNU-387 形态出现收缩、核染色质发生固缩,局部区域出现了强烈的蓝色荧光,说明肝癌细胞 SNU-387 发生凋亡;随着花青素剂量的增加,荧光强度增加,说明肝癌细胞 SNU-387 凋亡的程度加剧。阳性组内肝癌细胞 SNU-387 形态出现收缩、核染色质发生固缩,局部区域出现了强烈的蓝色荧光,肝癌细胞 SNU-387 发生凋亡程度大。

### 2.3 TNFR1 介导外源性凋亡通路介导紫甘薯花青素诱导的细胞凋亡

如图 3 所示,不同剂量的紫甘薯花青素组与空白组相比,\*  $P < 0.05$ ,有显著性差异,TNF- $\alpha$  的含量水平增高;不同剂量的紫甘薯花青素 + PDTC 组与空白组相比,\*  $P < 0.05$ ,有显著性差异,TNF- $\alpha$  的含量水平增高,且增幅与未添加阻断剂 PDTC 时相比,\*  $P > 0.05$ ,无显著性差异;不同剂量的紫甘薯花青素 + SB 组与空白组相比,\*  $P < 0.05$ ,有显著性差异,TNF- $\alpha$  的含量水平有所升高,但增幅与未添加 SB203580 时相比,\*  $P > 0.05$ ,无显著性差异。

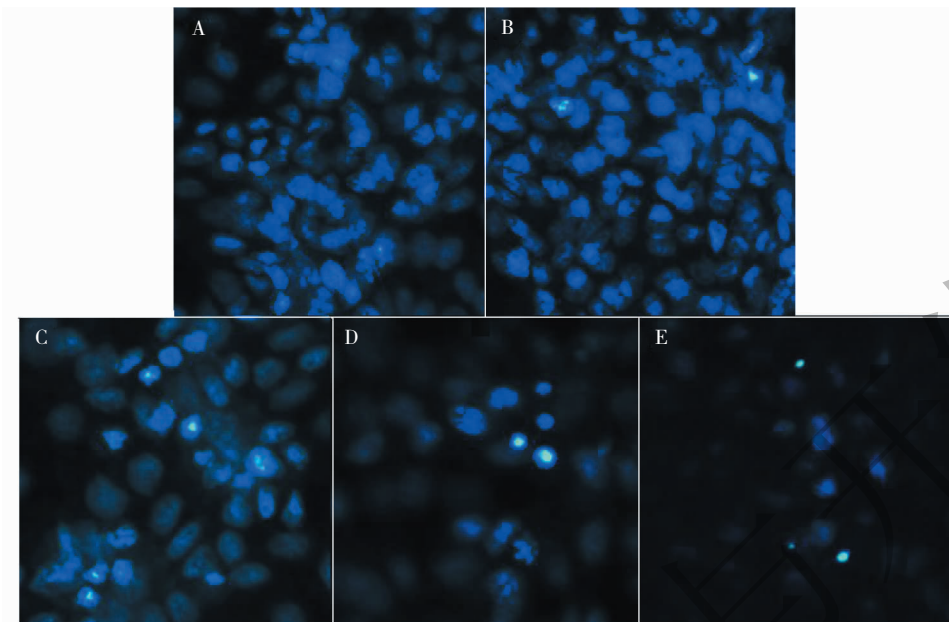


图2 紫甘薯花青素 0 μM (A)、20 μM (B)、40 μM (C)、80 μM (D) 及顺铂 (E) 作用下 SNU-387 细胞 Hoechst 33258 染色图  
 Fig. 2 Hoechst 33258 staining of SNU-387 cells under the effects of different concentrations of purple sweet potato anthocyanins [0 μM (A), 20 μM (B), 40 μM (C), 80 μM (D)] and cisplatin

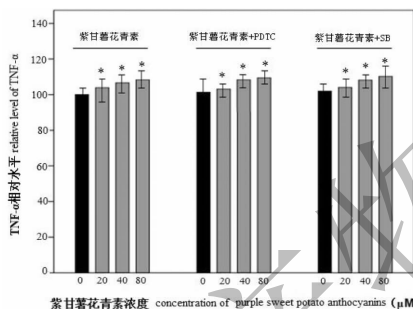


图3 不同浓度紫甘薯花青素作用下 TNF-α 的相对含量  
 Fig. 3 The relative content of TNF-α in different final concentrations of purple sweet potato anthocyanins

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$   
 Note: Compared with control, \*  $P < 0.05$

#### 2.4 NF-κB 信号通路介导紫甘薯花青素诱导的细胞凋亡

如图4所示,在未添加 NF-κB 阻断剂 PDTC 时,紫甘薯花青素组与空白组相比, \*  $P < 0.05$ ,肝癌细胞 SNU-387 中 Caspase-8 的活性明显升高;不同剂量的紫甘薯花青素 + PDTC 组与空白组相比, \*  $P < 0.05$ ,有显著性差异,加入阻断剂 PDTC 组, Caspase-8 的活性与未加 PDTC 组相比,变化趋势无明显差异。

#### 2.5 MAPK 信号通路介导紫甘薯花青素诱导的细胞凋亡

如图5,在 MAPK 阻断剂 SB203580 作用下,空

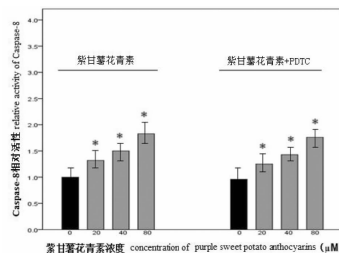


图4 NF-κB 阻断剂及紫甘薯花青素对 Caspase-8 活性的影响

Fig. 4 Effect of NF-κB blocker and purple sweet potato anthocyanins on Caspase-8 activity

白组肝癌细胞 SNU-387 中 Caspase-8 的活性显著下降;与空白组相比,紫甘薯花青素剂量组中肝癌细胞 SNU-387 中 Caspase-8 活性明显上升 (\*  $P < 0.05$ ),

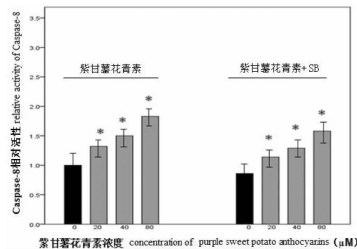


图5 MAPK 阻断剂及紫甘薯花青素对 Caspase-8 活性的影响

Fig. 5 Effect of MAPK inhibitor and purple sweet potato anthocyanins on Caspase-8 activity

但与未添加阻断剂 SB203580 相应各组相比,有明显降低(\* $P < 0.05$ )。

### 3 讨论与结论

MTT 实验结果显示,在终浓度 20、40、80  $\mu\text{M}$  紫甘薯花青素及阳性药顺铂的作用下,肝癌细胞 SNU-387 的活力分别降低为 82.76%、78.47%、63.35%、54.18%,表明紫甘薯花青素可以抑制肝癌细胞 SNU-387 的增殖,表现出一定的抗肿瘤活性;通过 Hoechst 33258 荧光染色实验,发现空白组内肝癌细胞 SNU-387 比较完整,染色比较均匀,而紫甘薯花青素剂量组内肝癌细胞发生收缩,核染色质出现固缩,局部区域内出现强烈蓝色荧光等现象,表明紫甘薯花青素可诱导肝癌细胞 SNU-387 的凋亡。

在凋亡因素的刺激下,肝癌细胞经历膜表面死亡受体 TNFR1 与其配体 TNF- $\alpha$  相结合等过程形成复合体,使具催化活性 Caspase-8 大量产生,从而诱导肝癌细胞的凋亡;NF- $\kappa\text{B}$  信号通路能够介导基因的表达调控,并影响凋亡等生物过程;同时,MAPK 信号通路也可以影响增殖、凋亡等生物过程<sup>[8]</sup>。

紫甘薯花青素可以提高肝癌细胞 SNU-387 内 TNF- $\alpha$  的含量水平,增加 Caspase-8 的活性水平,表明紫甘薯花青素可以通过 TNFR1 介导的外源性凋亡通路来诱导肝癌细胞 SNU-387 的凋亡;在 PDTC 作用下,肝癌细胞 SNU-387 内 TNF- $\alpha$  的含量和 Caspase-8 活性无变化,表明 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路不会参与介导紫甘薯花青素诱导肝癌细胞 SNU-387 的凋亡过程;在 SB203580 作用下,肝癌细胞 SNU-387 内 TNF- $\alpha$  的含量出现下降趋势,Caspase-8 的活性显著降低,表明 MAPK 信号通路可参与介导紫甘薯花青素诱导肝癌细胞 SNU-387 凋亡过程。

紫甘薯花青素可以诱导肝癌细胞 SNU-387 发生凋亡,其凋亡的相关分子机制包括:一方面,紫甘薯花青素可以通过死亡受体 TNFR1 与其配体 TNF- $\alpha$  相结合等过程形成复合体,使具催化活性

Caspase-8 大量产生,继而激活 Caspase 级联反应,诱发肝癌细胞 SNU-387 的凋亡;另一方面,紫甘薯花青素还可以通过 MAPK 信号通路参与介导肝癌细胞 SNU-387 的凋亡过程。

### 参考文献

- 1 Ren Y(任雁),Zhang WG(张惟广). Research advances of anthocyanin. *China Food Addit*(中国食品添加剂),2006,4:71-77.
- 2 Lu GQ(陆国权),Shi F(史峰). Extraction purification and component analysis of anthocyanins from purple sweet potato. *Southwest China J Agric Sci*(西南农业学报),1997,9(3):48-51.
- 3 Matsui T, Ebuchi S, Kobayashi M, et al. Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki can be achieved through the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory action. *J Agric Food Chem*,2002,50:7244-7248.
- 4 Fang ZX(方忠祥),Ni YY(倪元颖). Research progress on physiological function of anthocyanins. *Mod Food Sci Technol*(现代食品工业科技),2001,17(3):60-62.
- 5 Jiang PP(姜平平),Lv XL(吕晓玲),Yao XL(姚秀玲), et al. Study on *in vitro* antioxidant activities of anthocyanins from purple core sweet. *China Food Addit*(中国食品添加剂),2002,6:8-12.
- 6 Tamura H, Yamagami A. Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from Muscat Bailey A grape. *J Agric Food Chem*,1994,42:1612-1615.
- 7 Matsui T, Ebuchi S, Kobayashi M, et al. Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki can be achieved through the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory action. *J Agric Food Chem*,2002,50:7244-7248.
- 8 Wang CY(王春艳),Wu ZM(吴中明). Virus infection and apoptosis. *Chin J Cellul Molecul Immunol*(细胞与分子免疫学杂志),2007,4:387-389.