

桑根酮 D 对肿瘤细胞及移植瘤生长作用研究

王 艺,魏 华,杨 光,张 梅*

石河子大学药学院 新疆植物药资源利用教育部重点实验室,新疆石河子 832000

摘要:研究桑根酮 D 的体内外抗肿瘤作用。采用的体外实验,桑根酮 D 溶液体外共培养三种癌细胞(人肝癌 HepG2 细胞、小鼠黑色素瘤 B16F0 细胞、小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞),采用 SRB 法(Sulforhodamine B)检测桑根酮 D 对肿瘤细胞增殖的影响,计算 IC₅₀。对黑色素瘤细胞(B16F0 和 B16F10 细胞)给予不同浓度的桑根酮 D,考察其对黑色素含量的影响。采用的体内实验,建立小鼠 H22 肿瘤模型并分组,三个剂量的桑根酮 D 分别为 12.5、25、50 mg/kg,考察其对肿瘤生长的抑制作用。结果显示,桑根酮 D 抑制 B16F0、B16F10、HepG2 细胞增殖,HepG2 细胞对桑根酮 D 最敏感,得 IC₅₀ 为 $22.61 \pm 0.26 \mu\text{mol/L}$ 。随着桑根酮 D 浓度的增加,抑制细胞的作用增强且均有显著性差异($P < 0.01$)。桑根酮 D 促进 B16F0 细胞内黑色素生成,促进细胞分化。12.5、25、50 mg/kg 剂量的桑根酮 D 对小鼠肝癌细胞 H22 移植瘤抑制率为 32.51% ~ 45.72%。给药组小鼠的体重及各脏器指数变化与空白对照组和模型组比较均无显著性差异。得出结论,桑根酮 D 具有体内外抗肝癌作用和促进肿瘤细胞分化的作用。

关键词:桑根酮 D;肿瘤细胞;H22 移植瘤;体内体外抗癌活性

中图分类号:R961

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)6-1057-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.6.021

Effect of sanggenon D on the growth of tumor cells and transplantation tumors

WANG Yi, WEI Hua, YANG Guang, ZHANG Mei*

Key Laboratory of Plant Medicine Resources Utilization of Ministry of Education in Xinjiang, School of Pharmacy Shihezi University, Shihezi 832000, China

Abstract: To study the anti-tumor effect of sanggenon D *in vivo* and *in vitro*. The *in vitro* method was first to co-culture three types of cancer cells (human liver cancer HEPC2 cells, mouse melanoma B16F0 cells, and mouse melanoma B16F10 cells) with sanggenon D solution. Then, SRB method (sulforhodamine B) was used to investigate the effect of sanggenon D on the proliferation of tumor cells, and IC₅₀ was calculated. The effects of different concentrations of sanggenon D on melanoma cells were investigated. The *in vivo* experimental method was to establish a mouse H22 tumor model, and to investigate the inhibitory effect of the drug on tumor growth by intraperitoneal injection of 12.5, 25 and 50 mg/kg of sanggenon D. The results showed that sanggenon D inhibited the proliferation of B16F0, B16F10 and HepG2 cells, among which HepG2 cells were the most sensitive to sanggenon D, and IC₅₀ was calculated to be $22.61 \pm 0.26 \mu\text{mol/L}$. The inhibitory effect on the cells was enhanced with the increase of the concentration of sanggenon D, and the difference was significant ($P < 0.01$). sanggenon D promotes melanin production in B16F0 cells and promotes cell differentiation. The inhibitory rate of H22 transplanted tumor in mice at 12.5, 25 and 50 mg/kg was 32.51% to 45.72%. There was no significant difference in the changes of body weight and organ index in the mice treated with sanggenon D compared with the blank group and the model group. This indicated that sanggenon D could inhibit the growth of transplanted tumor and the proliferation of tumor cells in mice, and it also indicated that sanggenon D had anti-tumor effects *in vivo* and *in vitro*.

Key words: sanggenon D; tumor cell; H22 transplantation tumor; *in vivo* and *in vitro* anti-cancer activity

癌症,又称恶性肿瘤,是严重危害人类健康、导

致现代人类死亡的第一大恶疾和顽症。近 20 年,我国的恶性肿瘤发病率和死亡率呈逐年上升趋势,目前国内多数肿瘤患者,以中晚期居多,治愈率较低。世界卫生组织调查结果显示,在世界范围内恶性肿瘤死亡率呈现持续上升的趋势。虽然对细胞癌变机

制的认识在不断深入,然而人们在控制癌症的征途中步履维艰,进展缓慢,人类将面临着防治恶性肿瘤的新挑战^[1]。恶性肿瘤的治疗方法早期多以手术为主,但大多数患者发现时已为晚期,失去了手术切除的机会。放疗等其他方法疗效均不理想,且副作用大。所以,临幊上药物治疗仍为多数病人不可缺少的治疗手段。因此,寻找新的抗癌药物并探讨其分子机制是目前癌症防治措施的研究重点。

桑树中有抗癌作用的黄酮类化合物,其特有的Diels-Alder型加合物,以桑根酮D(sanggenon D)含量较高。药理学研究证实该单体具有明显的降压、抗炎作用,但其抗癌作用研究鲜有报道。目前,国外仅证明这种化合物对PKC、ODC和COX-1等癌症相关因子有抑制作用,国内主要研究该单体的提取工艺^[2-5]。本课题前期的实验结果显示,桑根酮C(是桑根酮D的同分异构体)能抑制多种人肿瘤细胞,尤其对肝癌细胞最为敏感^[6]。本研究开展了桑根酮D体内外抗癌活性的研究,旨在探究桑树中抗癌活性成分,发现更好的抗癌药物,为药用植物黑桑的开发和利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器

二氧化碳细胞培养箱(Thermo 3131),超净工作台(ZHJH-1112B),蔡司荧光倒置显微镜(MIC00266),酶标仪(Thermo 3001),普通生物倒置显微镜(BDS200-PH),电子天平(AR-2140型),MH-2微量振荡器,HH.S精密恒温水浴锅,离心机(TGL 16 M),超声波清洗器,电热恒温鼓风干燥箱,超低温冰箱,4℃冰箱等。

1.2 样品与试剂

桑根酮D(英文名称:sanggenon D;纯度:HPLC>98%;CAS号:81422-93-7;分子量:708.70;分子式:C40H36O12;产品货号:HS052274,购于宝鸡市辰光生物科技有限公司),5-氟尿嘧啶(美仑生物),1640(HyClone),PBS,0.4%SRB溶液,胰蛋白酶(BOSTRE),小鼠黑色素瘤B16F0细胞、小鼠黑色素瘤B16F10细胞、人肝癌HepG2细胞(中科院上海细胞库),小鼠肝癌细胞H22细胞株(北京协和细胞资源库),昆明种(KM)小鼠(石河子大学实验动物中心)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养

用含10%血清和1%双抗的RPMI1640培养液,在37℃、5%CO₂及饱和湿度的培养箱中培养人

肝癌HepG2细胞、小鼠黑色素瘤B16F0细胞、B16F10细胞。

1.3.2 细胞增殖测定

将对数生长期的B16F0细胞、B16F10细胞、HepG2细胞分别按照 2×10^4 、 3×10^4 、 8×10^4 个/mL浓度接种于96孔板(180 μL/孔),24 h后,加入不同浓度的桑根酮D和5-FU处理细胞,48 h后采用SRB法检测细胞增殖情况。

1.3.3 黑色素含量的测定

按照Vandana法,将对数生长期的B16F0、B16F10细胞以 1.0×10^5 个/孔铺于6孔板中,加入三个浓度的桑根酮D(20、40、80 μmol/L),24 h后,PBS洗2次,用0.25%的胰酶消化收集于离心管,再次用PBS洗一次并倒入离心管,3 500 rpm离心5 min,收集上清液,取1 mL上清液加入1 mL 0.4 M HEPES buffer(pH 6.8)和1 mL乙醚:乙醇=1:1(V:V),取下层水相,于405 nm测定细胞外吸光度(A);取细胞沉淀,细胞计数后加入含10% DMSO-NaOH 1.5 mL于80℃煮1 h,3 500 rpm离心10 min,取上清液,于405 nm测定细胞内吸光度(A)。

1.3.4 细胞克隆形成实验

取对数生长期的B16F0、HEPG2、B16F10单层培养细胞,用0.25%胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞,将B16F0、HEPG2细胞悬浮在含10%胎牛血清的1640培养液中备用,B16F10悬浮在10%胎牛血清的DMEM培养液中备用。将细胞以每孔100个/mL的浓度接种于6孔板中,24 h后加入不同浓度的桑根酮D(5、10、20、40、80 μmol/L),置37℃、5%CO₂及饱和湿度的环境下,静置培养7天。在蔡司荧光倒置显微镜下观察集落形成情况并拍照。终止培养弃去上清,用PBS润洗2次,用甲醇固定10 min后,弃固定液用Giemsa应用染色液染10 min后,用PBS冲洗多余染液,空气干燥。拍照并计算肉眼可见的集落数,最后计算克隆形成率。

1.3.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

细胞按 5×10^8 /L的密度接种于6孔板内,加入不同浓度的桑根酮D,培养24 h。离心收集细胞 1×10^5 ~ 5×10^5 。加入300 μL Binding buffer,再加入5 μL FITC标记的Annexin V,室温混匀并避光30 min,然后加入PI,避光反应5 min。上流式细胞仪进行检测。

1.3.6 对小鼠肝癌细胞移植动物肿瘤生长的影响

取KM鼠,制备H22小鼠肝癌单细胞悬液,每

只小鼠腋窝皮下接种 2×10^6 个/mL 的细胞悬液 (0.2 mL/只)。在接种后第一天开始给药,将动物随机分 5 组,为模型组、5-FU 组 (20 mg/kg)、桑根酮 D 低 (12.5 mg/kg)、中 (25 mg/kg)、高 (50 mg/kg) 剂量组,连续腹腔注射桑根酮 D 10 天。末次给药后 24 h,处死动物,剥离瘤组织并称重,通过计算得抑瘤率。考察桑根酮 D 对肝癌移植瘤的抑制作用。

1.3.7 对荷瘤小鼠脏器指数的影响

1.3.6 项中,剥离瘤组织后,取小鼠心、肝、肾、脾等脏器并称重,通过计算得脏器指数。考察桑根酮 D 对荷瘤小鼠各脏器的毒性。

1.3.8 数据分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SAS 软件处理数据,

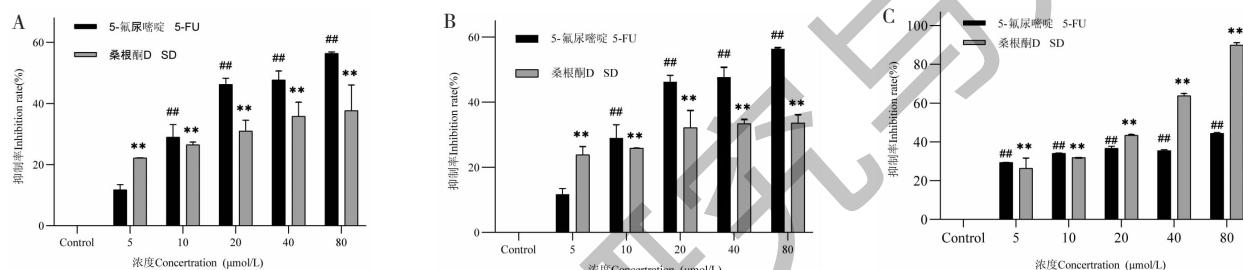


图 1 桑根酮 D 抑制细胞增殖 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Sanggenon D inhibits cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注: A. B16F0 细胞; B. B16F10 细胞; C. HepG2 细胞; SD 组与空白组比较, ** $P < 0.01$; 5-FU 组与空白组比较, ## $P < 0.01$ 。Note: A. B16F0;
B. B16F10; C. HepG2; SD group compared with control, ** $P < 0.01$; 5-FU group compared with control, ## $P < 0.01$.

2.2 桑根酮 D 促进细胞黑色素生成

处理细胞 24 h 后,不同浓度的桑根酮 D 均可使 B16F0、B16F10 细胞外(图 2A、2C)与细胞内(图 2B、2D)黑色素生成增加($P < 0.01$)。生成的黑色素越多,表明细胞的分化程度越高。胞内和胞外的黑色素含量与对照组相比均升高,且成剂量依赖性,可见 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的桑根酮 D 可以使 B16F0、B16F10 细胞分化,恶化程度降低。

2.3 桑根酮 D 抑制细胞克隆

桑根酮 D 处理 B16F0、B16F10 细胞后,细胞集落数减少,抑制其生长。从图 3A 可以看出并计数,B16F0 细胞对照组的集落数为 71 个,5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 SD 组形成的集落数为 43、33、17、15 个。从图 3B 可以看出,B16F10 细胞对照组的集落数为 88 个,5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ SD 组形成的集落数为 70、62、45、7 个。同样,桑根酮 D 处理的 HepG2 细胞实验结果见图 3C,对照组集落数 64 个,而 5、10、

Student's t-test 考察统计学意义。

2 结果

2.1 桑根酮 D 对 B16F0 细胞、B16F10 细胞、HepG2 细胞增殖抑制作用

SRB 检测结果显示(图 1A、B、C),5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的桑根酮 D 和 5-FU 分别作用于 B16F0 细胞、B16F10 细胞、HepG2 细胞 48 h 后,细胞增殖均被抑制,且随着桑根酮 D 和 5-FU 浓度升高,增殖抑制作用增强。与空白组比较,均有显著性差异($P < 0.01$)。计算得桑根酮 D 对 B16F0 细胞、B16F10 细胞、HepG2 细胞的 IC_{50} 分别为 $26.71 \pm 0.2 \mu\text{mol/L}$ 、 $40.46 \pm 0.03 \mu\text{mol/L}$ 、 $22.61 \pm 0.26 \mu\text{mol/L}$ 。此结果表明桑根酮 D 对 HepG2 细胞增殖抑制作用最强。

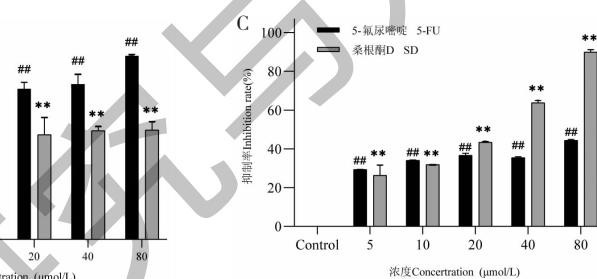


图 1 桑根酮 D 抑制细胞增殖 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

20、40 $\mu\text{mol/L}$ LSD 组形成集落数为 53、51、29、13 个,其形成的集落的个数均少于对照组的克隆数,增殖能力下降,集落形成能力也减弱,说明较高浓度的桑根酮 D 抑制 HepG2 生长。

2.4 桑根酮 D 对 HepG2 细胞形态的影响

正常组 HepG2 肿瘤细胞形态规则,大小均匀,细胞核清楚可见,且均呈贴壁生长状态,少有悬浮细胞存在。其他 SD 各组细胞形态不规则,体积变小,细胞间隙增加,贴壁细胞减少,部分细胞脱落悬浮在培养液中,结果见图 4。

2.5 桑根酮 D 诱导 HepG2 细胞凋亡

桑根酮 D 对细胞凋亡的影响(图 5a、b、c、d)。5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的桑根酮 D 处理 HepG2 细胞 24 h 后,流式细胞仪检测细胞凋亡率分别为:7.12% \pm 0.98%、8.09% \pm 1.4%、11.07% \pm 1.17% (图 5e)。与阴性对照组比较,三个浓度的桑根酮 D 诱导细胞凋亡作用具有显著性差异($P < 0.05$)。

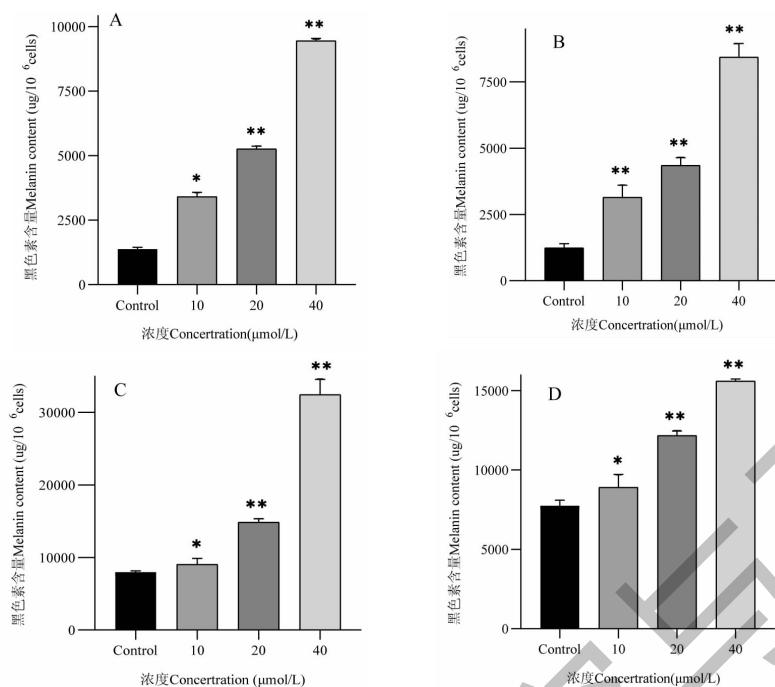


图 2 桑根酮 D 对黑色素瘤细胞中黑色素生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of sanggenon D on melanin production ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注: A. B16F0 细胞外黑色素; B. B16F0 细胞内黑色素; C. B16F10 细胞外黑色素; D. B16F10 细胞内黑色素; 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note: A. Extracellular melanin in B16F0; B. Intracellular melanin in B16F0; C. Extracellular melanin in B16F10; D. Intracellular melanin in B16F10; Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

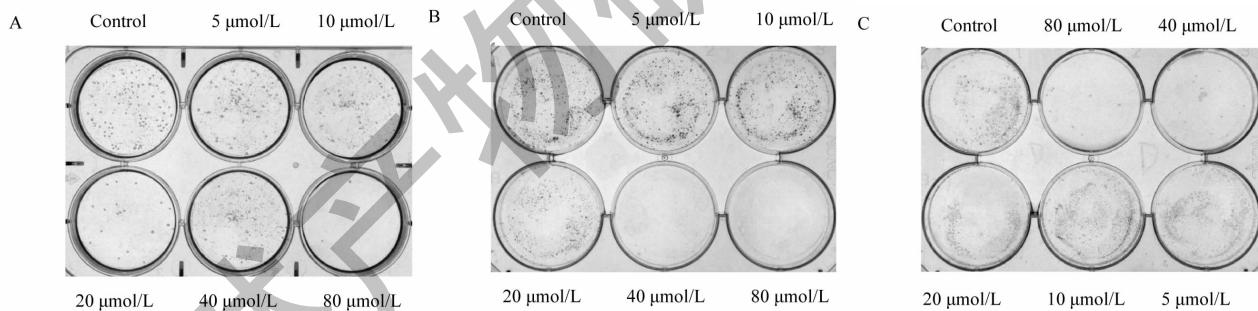


图 3 桑根酮 D 对细胞克隆的影响

Fig. 3 Effects of sanggenon D on cells clone.

注: A. B16F0; B. B16F10; C. HepG2。

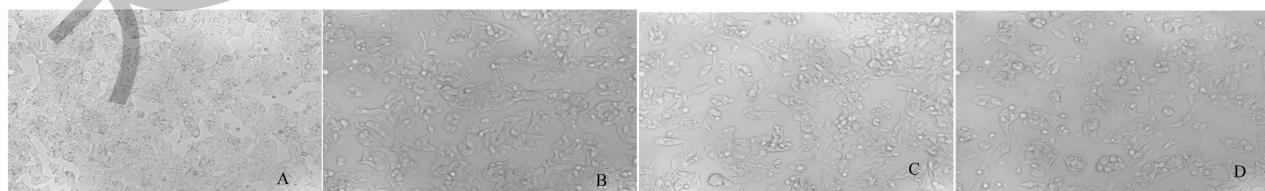


图 4 不同浓度的 SD 对 HepG2 细胞形态的影响

Fig. 4 The proliferation of HepG2 cells in each group

注: A、B、C、D 依次为 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的桑根酮 D。Note: A. Control group; B. 5 $\mu\text{mol/L}$ sanggenon D; C. 10 $\mu\text{mol/L}$ sanggenon D; D. 20 $\mu\text{mol/L}$ sanggenon D.

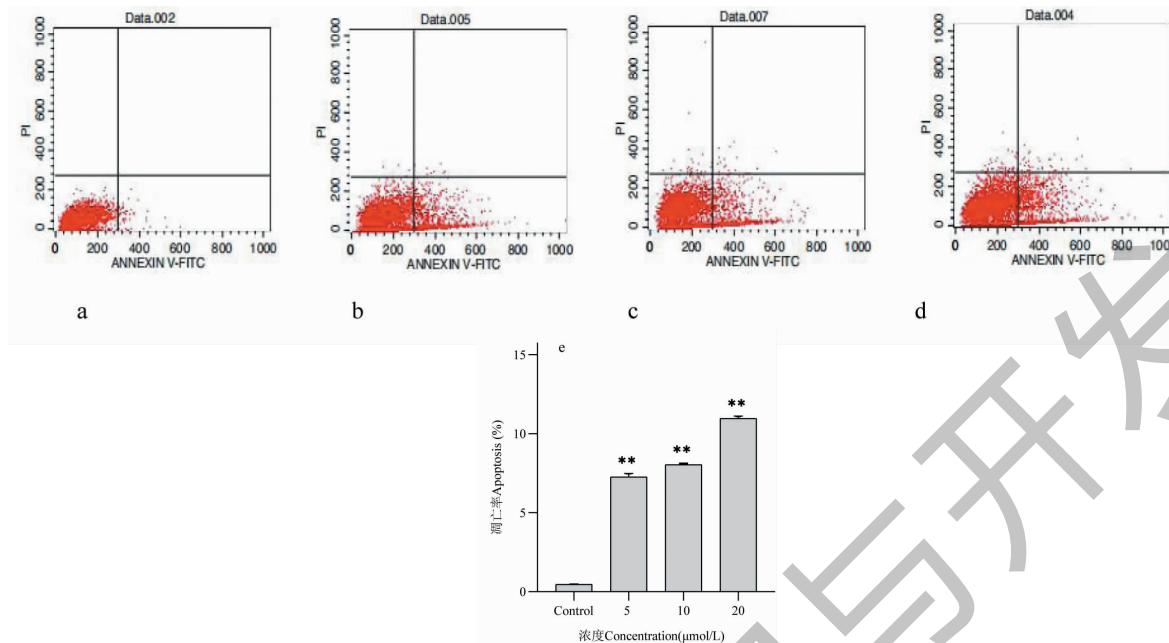


图 5 桑根酮 D 对 HepG2 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Apoptosis of HepG2 cells induced by sanggenon D ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:a、b、c、d 分别为 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的桑根酮 D 作用于细胞后的凋亡图;e 为桑根酮 D 诱导细胞凋亡的凋亡率;与空白对照组比较, ** $P < 0.01$ 。Note: a. Control group; b. 5 $\mu\text{mol/L}$ sanggenon D; c. 10 $\mu\text{mol/L}$ sanggenon D; d. 20 $\mu\text{mol/L}$ sanggenon D; e. Apoptosis rate of cells induced by sanggenon D; Compared with control, ** $P < 0.01$.

2.6 桑根酮 D 抑制移植瘤生长

建立小鼠 H22 肿瘤模型,分为模型组、桑根酮 D 低剂量组 (SD-L, 12.5 mg/kg)、桑根酮 D 中剂量组 (SD-M, 25 mg/kg)、桑根酮 D 高剂量组 (SD-H, 50 mg/kg) 和 5-氟尿嘧啶阳性组 (5-FU, 20 mg/kg),除模型组外其余组腹腔注射给药。桑根酮 D 对小鼠

的体重影响不大(图 6),与空白对照组相比无显著性差异,说明桑根酮 D 对小鼠的生长无明显影响。高中低三个剂量组的桑根酮 D 均具有抑制肿瘤生长作用(图 7 和图 8),且在该剂量范围内呈现一定的量效关系(表 1)。桑根酮 D 对小鼠 H22 肿瘤的抑制率为 32.51% ~ 45.72%。

表 1 桑根酮 D 对小鼠 H22 肿瘤的抑制作用及其对荷瘤小鼠生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 1 Inhibitory effect of sanggenon D on H22 tumor in mice and its effect on growth of tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别 Group	给药剂量 Dose (mg/kg)	体重 Weight(g)				瘤重 Tumor weight(g)	抑制率 Inhibition rate (%)
		0 天 0 days	1 天 1 days	4 天 4 days	7 天 7 days		
空白对照组 Control	-	22.81 ± 1.74	23.46 ± 1.45	23.41 ± 2.26	24.19 ± 2.82	1.6385 ± 0.4810	-
5-FU	20	20.64 ± 1.96	21.71 ± 2.19	22.88 ± 2.63	25.83 ± 2.33	0.8390 ± 0.4088 *	48.78
SD-L	12.5	19.80 ± 1.60	21.19 ± 1.13	22.13 ± 2.07	25.29 ± 2.62	1.1058 ± 0.5320 *	32.51
SD-M	25	18.86 ± 2.05	19.90 ± 1.70	21.49 ± 2.30	23.86 ± 2.50	0.90301 ± 0.7350 **	44.88
SD-H	50	21.69 ± 1.34	21.43 ± 1.74	23.73 ± 2.24	27.15 ± 2.39	0.8893 ± 0.7400 **	45.72

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

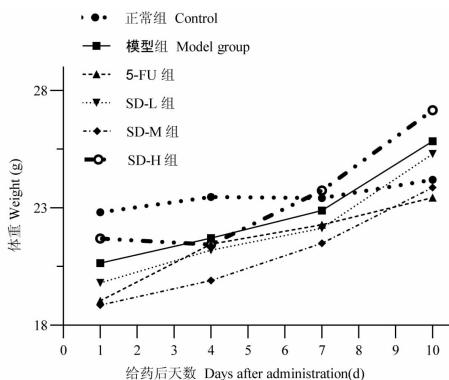


图 6 桑根酮 D 对荷瘤小鼠生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Fig. 6 Effect of sanggenon D on the growth of mice with tumor ($\bar{x} \pm s, n=9$)



图 7 H22 异种移植肿瘤组织

Fig. 7 Tumor tissue of mice after killed

注: a、b、c、d、e 依次为模型组、5-FU 组、桑根酮 D 低、中、高剂量组。Note: a. Control group; b. 5-FU group; c. SD-L group; d. SD-M group; e. SD-H group.

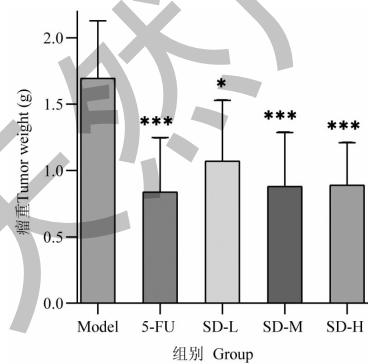


图 8 桑根酮 D 对小鼠 H22 肿瘤的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Fig. 8 Inhibitory effect of sanggenon D on H22 tumor in mice ($\bar{x} \pm s, n=9$)

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$. Note: Compared with model group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$.

2.7 桑根酮 D 对小鼠脏器的毒性研究

肝脏指数结果显示(图 9),桑根酮 D 组均小于阳性对照组和模型组,与空白组相近。对于肾脏指数,与模型组比较,中、高剂量桑根酮 D 具有显著性差异($P < 0.05$)。桑根酮 D 对心脏的影响(图 10),与模型组比较,中、高剂量桑根酮 D 组具有统计学意义($P < 0.05$);与正常组比较,心脏指数变化不大。脾脏指数变化结果(图 10),高、中、低三个剂量的脾脏指数比正常组大,但比模型组小($P < 0.05$)。毒理学中,脏器指数增大,表示脏器充血、水肿或增生肥大等,脏器指数减小,表示脏器萎缩及其他退行性改变^[5]。由此可见,桑根酮 D 对小鼠肝脏、脾脏、心脏、肾脏毒性小。

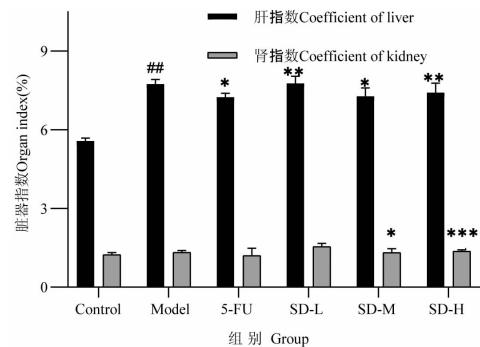


图 9 桑根酮 D 对小鼠肝脏、肾脏的脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Fig. 9 Effect of sanggenon D on viscera coefficient of liver and kidney in mice ($\bar{x} \pm s, n=9$)

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; 与空白组比较, ## $P < 0.01$. Note: Compared with model group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; Compared with control, ## $P < 0.01$.

3 讨论

恶性肿瘤严重威胁着人类健康和生命,已成为人类死亡的第一杀手。肝癌是我国高发肿瘤,且死亡率高、救治率低。虽然治疗手段多,但化疗药物是必不可少的。目前临床采用的化疗药物带来的不良反应重、多,而且容易耐药,导致预后效果差。这些现状迫使寻找新的高效低毒的抗癌药物成为防治癌症的重点。

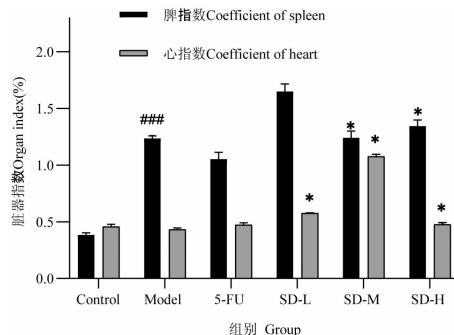


图 10 桑根酮 D 对小鼠心脏、脾的脏器指数的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

Fig. 10 Effect of sanggenon D on viscera coefficient of the heart and spleen of mice ($\bar{x} \pm s, n=9$)

注:与模型组比较, * $P < 0.05$;与空白组相比, ** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with model group, * $P < 0.05$; Compared with control, ** $P < 0.001$.

桑白皮 (Cortex Mori) 是桑科桑属植物 *Morus alba* L. 的干燥根皮。为中国药典收载的常用中药之一,具有泻肺平喘、利水消肿功效。现代药理研究表明,桑白皮降糖降脂主要药效成分为桑白皮黄酮、生物碱及多糖类成分^[9],而桑根酮 D 和桑根酮 C 是桑树中特有的黄酮结构,在桑黄酮中含量高^[6-8]。桑白皮具有抗癌、抗炎、降血压、降血糖、和抗动脉粥样硬化等药理作用,临床可用于治疗前列腺癌、“三高”等疾病^[10-13]。机制研究发现桑白皮的甲醇提取物可抑制 NF-κB 而诱导人宫颈癌细胞的凋亡,而且可以靶向杀灭肿瘤干细胞^[14,15]。

本研究发现桑根酮 D 抑制 B16F0 细胞、B16F10 细胞、HepG2 细胞增殖,桑根酮 D 对人肝癌 HepG2 细胞最为敏感。通过用肝癌细胞动物模型来考察 SD 体内抗癌作用,发现桑根酮 D 具有抑制移植瘤生长的作用。这些结果显示,桑根酮 D 具有体内外抗肝癌的作用。而桑根酮 D 对小鼠脏器指数的影响比模型组的要小,也比阳性对照组 5-FU 对各脏器指数小。表明桑根酮 D 对小鼠脾脏、心脏、肾脏毒

性小。本研究说明桑根酮 D 作为抗癌候选化合物,具有毒性小的优势。

此外,桑根酮 D 促进 B16F0 细胞黑色素生成,生成的黑色素越多,表明 B16F0 细胞的分化程度越高,说明桑根酮 D 能使细胞分化,恶性程度降低,细胞往好的方向发展。结合对黑色素瘤细胞的胞内胞外黑色素含量的测定,黑色素含量是黑色素瘤分化能力的重要标志^[16],药物诱导黑色素瘤细胞分化为较成熟的上皮样细胞的同时,黑色素的生成能力也增加,生成的黑色素越多,表明细胞的分化程度越高^[17],由于 B16F0 和 B16F10 细胞分化,其恶性程度降低,细胞会由低分化向成熟细胞分化。有效的诱导分化剂可使细胞的黑色素含量增加 2 倍以上^[18-20],提示桑根酮 D 有诱导 B16F0 和 B16F10 细胞向正常黑色素样细胞分化的能力。但本研究结果显示,桑根酮 D 具有诱导细胞分化成正常细胞的能力。本研究还发现桑根酮 D 具有诱导肝癌细胞凋亡的作用。

本实验只是初步探讨了桑根酮 D 可诱导细胞分化和诱导细胞凋亡,具体通过的信号转导通路还不清楚,需进一步研究,桑根酮 D 是否可作为一种有效的辅助手段用于肝癌患者的治疗,还有待更深入的研究。

参考文献

- 1 Lu GS, Chen L, Wang YH. Research progress and prospect of liver cancer in China [J]. Chin Bull Life Sci(生命科学), 2015, 27:237-248.
- 2 Gu GY. Research progress of mulberry chemical composition and biological activity [J]. Drugs Clin(现代药物与临床), 2007, 22(1):12-17.
- 3 Yang XL, Mao LX, Zhang XY. Study on nutritional components of black mulberry fruit and effects on anti-oxidation [J]. Food Sci(食品科学), 2006, 27:248-250.
- 4 Xiao LL, Gu YL, Gao L, et al. Sanggenon C protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy via the calcineurin /NFAT2 pathway [J]. Mol Med Rep, 2017, 16:5338-5346.
- 5 Lu XH, Su Y, Ren QL, et al. Extraction of the drug component sanggenon D from Cortex Mori [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2001, 13:48-53.
- 6 Wang Y, Li Y, Xie TP, et al. Anticancer of Sanggenon C in vitro and in vivo [J]. Shihezi: Shihezi University (石河子大学学报), 2019, 37:524-528.
- 7 Kwon DH, Chen JM, Choi EO, et al. The immunomodulatory

- activity of Mori folium, the leaf of *Morus alba* L., in Raw 267.4 macrophages *in vitro* [J]. *Cancer Prev*, 2016, 21: 144-151.
- 8 Yan JJ, Ruan JY, Huang PJ, et al. The structure-activity relationship review of the main bioactive constituents of *Morus* genus plants [J]. *Nat Med*, 2020, 74: 331-340.
- 9 Kuk EB, Jo AR, Oh SI, et al. Anti-Alzheimer's disease activity of compounds from the root bark of *Morus alba* L. [J]. *Arch Pharm Res*, 2017, 40: 338-349.
- 10 Gao Y, Li Y, Li WM, et al. Effect of cortex mori flavone extracts on insulin resistance in rats with type 2 diabetes mellitus [J]. *Guangzhou Univ Tradit Chin Med(广州中医药大学学报)*, 2016, 33: 831-835.
- 11 Peng CH. Mulberry leaf extracts prevent obesity-induced NAFLD with regulating adipocytokines, inflammation and oxidative stress [J]. *Food Drug Anal*, 2018, 26: 778-787.
- 12 Guo H, Xu Y, Huang W, et al. Kuwanon G preserves LPS-induced disruption of gut epithelial barrier *in vitro* [J]. *Molecules*, 2016, 21: 1597-1611.
- 13 Qin J, Fan M, He J, et al. New cytotoxic and anti-inflammatory compounds isolated from *Morus alba* L. [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29: 1711-1718.
- 14 Dat NT, Binh PTX, Quynh LTP, et al. Cytotoxic prenylated flavonoids from *Morus alba* [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81: 1224-1227.
- 15 Eo HJ, Park GH, Jeong JB, et al. Involvement of cyclin D1 degradation through GSK3 β -mediated threonine-286 phosphorylation-dependent nuclear export in anti-cancer activity of mulberry root bark extracts [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23 (2): 105-113.
- 16 Kondylis V, Kumari S, Vlantis K, et al. The interplay of IKK, NF- κ B and RIPK1 signaling in the regulation of cell death, tissue homeostasis and inflammation [J]. *Immunol Rev*, 2017, 277: 113-127.
- 17 Liu YH, Ou YH, Xu Q, et al. Inhibition of extract from mulberry leaves on tyrosinase activity [J]. *Chin J Clin Rehabil(中国临床康复)*, 2005, 9: 164-165.
- 18 Yang J. Antitumor effect of berberine and its differentiating function on B16 cell [J]. *J Fujian Med Univ(福建医科大学学报)*, 2007, 24: 24-25.
- 19 Li LC, Shen F, Hou Q. Inhibitory effect and mechanism of action of sanggenon C on human polymorphonuclear leukocyte adhesion to human synovial cells [J]. *Acta Pharmacol Sin(中国药理学报:英文版)*, 2002, 23(2): 138-142.
- 20 Zhao WZ, Liu HY. Correlation between the biological behavior and invasion potential in three mouse melanoma cell lines [J]. *Chin J Oncol(中华肿瘤杂志)*, 2001, 23: 301-304.

(上接第 994 页)

- 12 Banerji A, Ray R, Bandyopadhyay D, et al. Structure and synthesis of aurantiamide benzoate a modified dipeptide [J]. *Indian J Chem*, 1993, 32B: 776-778.
- 13 Faramarzi MA, Aghelnejad M, Yazdi M T, et al. Metabolism of androst-4-en-3, 17-dione by the filamentous fungus *Neurospora crassa* [J]. *Steroids*, 2008, 73: 13-18.
- 14 Chu WX, Liu XH, Liu K, et al. Chemical constituents from active fraction in roots and rhizomes of *Cynanchum paniculatum* with reversal activity of multidrug resistance [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2015, 18: 2674-2679.
- 15 Wang HY, Xiao LH, Liu L, et al. Study on the chemical constituents from the root of *Scutellaria viscidula* [J]. *J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报)*, 2003, 5: 339-341.
- 16 Collado G, Maclas F, Massanet G, et al. Flavonoids from *Centaura clementel* [J]. *J Nat Prod*, 1985, 48: 819-822.
- 17 Yu JP, Chen RY, Yao ZX, et al. Studies on the chemical constituents of *Ganoderma capense* [J]. *Acta Pharm Sin(药学学报)*, 1990, 25: 612-616.
- 18 Konoshima T, Sawada T. Legume saponins of *Gleditsia japonica* Miquel. IV. ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectral studies for structure elucidation of *Gleditsia* saponins B and C [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30: 2747-2760.
- 19 Zhong JQ, Di B, Feng F. Chemical constituents from root of *Polygala fallax* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2009, 40: 844-846.
- 20 Ferri PH, Barata LES. Neolignans and a phenylpropanoid from *Virola pavonis* leaves [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31: 1375-1377.
- 21 Zhang AL, Yu M, Xu HH, et al. Constituents of *Dendrobium devonianum* and their antioxidant activity [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2013, 38: 844-847.