文章编号:1000-5404(2006)18-1885-03

论著

# 芦丁对 HepG2 细胞生长的影响

沈钦海,马　臻,陈国民　　(重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

**提　要: 目的**　观察芦丁(Rutin)对人肝癌 HepG2 的生长和增殖的影响。**方法**　体外培养 HepG2 细胞,用甲基塞唑基四唑(MTT)法、$^{3}$H-TdR 掺入法测定芦丁对人肝癌 HepG2 的生长和增殖抑制情况,并且用荧光染色法在 Olympus 荧光显微镜下观察芦丁对 HepG2 细胞凋亡的影响,流式细胞仪检测细胞周期变化。**结果**　芦丁能抑制 HepG2 细胞的生长、增殖、诱发细胞凋亡;在 50 ~ 250 μmol/L 浓度范围内处理的 HepG2,$G_0/G_1$ 期细胞增加,$G_2$/M 期细胞减少,细胞周期阻滞于 $G_0/G_1$ 期。**结论**　芦丁能抑制 HepG2 细胞的生长,并诱发细胞凋亡,呈浓度依赖性。

**关键词**: 芦丁;人肝癌细胞株;凋亡
**中图法分类号**: R282.71;R73-351;R735.7　　**文献标识码**: A

# Effect of rutin on proliferation of HepG2 cells

SHEN Qin-hai, MA Zhen, CHEN Guo-min (Institute of Viral Hepatitis, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China)

**Abstract**: **Objective**　To observe the effect of rutin on growth and proliferation of human hepatic cancer line (HepG2). **Methods**　HepG2 cells were cultured *in vitro*, then cocultured with 50 to 250 μmol/L rutin for 24 h. The inhibition rate of rutin on growth and proliferation of HepG2 was determined by MTT, $^{3}$H-TdR, and apoptotic cells were observed in fluorescent staining by Olympus fluorescent microscopy, and cell cycle was analysed by flow cytometry. **Results**　Rutin inhibited HepG2 cells from growth and proliferation, and evoked apoptosis. Flow cytometry showed that 50 to 250 μmol/L rutin caused an increase at $G_0/G_1$ phase and a decrease at $G_2$/M phase and arrest at $G_0/G_1$ phase in the cell cycle. **Conclusion**　Rutin markedly inhibits the proliferation of HepG2 cells and induces apoptosis in a concentration-dependent manner.

**Key words**: rutin; human hepatoma carcinoma cell line; apoptosis

芦丁又名芸香甙,是一种从植物中提取的黄酮类化合物,它分布广泛,在植物的根、茎、叶、花、果实、种子中都有存在,一些中药如大枣、山楂、银杏柴胡、绞股蓝等都含芦丁。具有多方面的生物活性,如具有维生素 P 样作用,有助于保护和恢复毛细血管的弹性,调节毛细血管的通透性,具有抗炎、抗病毒、抗氧化及保护胃黏膜、镇痛作用、对低密度脂蛋白的氧化修饰的抑制等作用。其抗肿瘤方面的作用报道的文献并不多,为探讨芦丁在体外对 HepG2 细胞的影响作用,我们观察了芦丁对肿瘤细胞的生长和抑制情况。

**作者简介**:沈钦海(1968 - ),男,山东省菏泽市人,博士,主治医师,主要从事肝病的研究与治疗方面的研究,发表论文 5 篇。电话:13048342135,E-mail: dttt444@yahoo.com
**通讯作者**:陈国民,电话:(023)63825854
**收稿日期**:2005-11-10;**修回日期**:2006-03-12

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

1.1.1　人肝癌细胞株 HepG2(重庆医科大学附属第二医院肝炎研究所提供);RPMI1640(购于 Gibco 产品公司);芦丁(安徽省甙尔天然有机化物信息中心);MTT、丫啶橙和二甲基亚砜(购自上海生工)。

1.1.2　主要仪器　$CO_2$ 孵箱(series Ⅱ water Jacketed $CO_2$ incubator);Olympus 荧光显微镜;超净工作台(class Ⅱ A2 Biological safety cabinet);液闪仪(beckman coulter);流式细胞仪;酶联免疫检测仪(Elx 800 universal microplate reader)。

### 1.2　方法

1.2.1　用 0.25% 的胰蛋白酶消化单层培养细胞 HepG2(人肝癌细胞株),用含 10% 小牛血清 RPMI1640 培养液 配成单个细胞悬液,将细胞接种在 96 孔板上,其细胞数为每孔为 $2 \times 10^4$ 个,在 37 ℃,5% $CO_2$ 孵箱培养 24 h;然后换含不同浓度(50 ~ 250 μmol/L)的 10% 的小牛血清 RPMI1640 培养基,对照组则换等体积含二甲基亚砜培养液(终浓度 0.05%,实验证明对细

胞活力无影响),每个浓度3个复孔,于孵箱再培养24 h。

1.2.2 MTT法测细胞活力 将第一步骤培养的细胞每孔加入MTT溶液5 mg/ml 20 μl,继续培养4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液。最后每孔加入150 μl DMSO(二甲基亚砜),震荡10 min,使结晶物充分溶解。比色:选择490 nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值[$D$(490)]。结果判定:细胞存活率(%)=实验组孔$D$(490)值平均值/对照组孔$D$(490)值平均值×100%,细胞生长抑制率($IR$)=[1-实验组孔$D$(490)值平均值/对照组孔$D$(490)值平均值]×100%。

1.2.3 $^3$H-TdR掺入法测细胞活力 将一步骤培养的细胞在收获前12 h加入$^3$H-TdR即(甲基-$^3$H)胸腺嘧啶核苷([$^3$H-methyl] thymidine),它是DNA合成的前提,1 μCi/孔。抽滤96孔板上底部的细胞,收集细胞至滤纸上,将滤纸在90 ℃下烘干后放入液闪瓶内,然后测定脉冲数,用液闪仪检测cpm值。结果分析:SI=(实验组值-机器本底每分闪烁计数)/阴性对照组每分闪烁计数-机器本底每分闪烁计数)。SI为标记指数,cpm为增殖水平。

1.2.4 荧光染色检测细胞凋亡 于24孔板内加入无菌的载玻片,加入细胞悬液(细胞浓度为$5\times10^4$)1 ml/孔,在孵箱培养24 h后,分别加入芦丁浓度(50~250 μmol/L)100 μl,另设无药培养组作对照,置孵箱培养24 h,取出盖玻片置于载玻片上加丫啶橙(AO)/溴乙啶(EB)混合液于盖玻片上(避光),在Olympus荧光显微镜下作细胞凋亡的形态观察和拍照。不同浓度下细胞HepG2细胞凋亡的判断:①核染色质着绿色,细胞呈正常结构;②早期凋亡细胞表现核染色质着绿色,呈圆缩或圆球状;③晚期凋亡细胞核染色质着橘红色,呈圆缩或圆球状;④非凋亡的死细胞核染色质着橘红色,呈正常结构。在Olympus荧光显微镜下观察、拍照,数至少200个细胞,计算细胞凋亡率。凋亡率(%)=细胞凋亡/凋亡细胞+正常细胞×100%。

1.2.5 流式细胞仪观测细胞周期 将HepG2细胞接种于100 ml培养瓶上,细胞浓度为$4\times10^6$个/孔,分为实验组和对照组。实验组以(50~250 μmol/L)芦丁浓度处理HepG2细胞24 h后,对照组则加入含0.05%收二甲基亚砜,每个浓度3个重复培养瓶。收集细胞用PBS洗涤2次,制备单细胞悬液,用70%冰乙醇固定,4 ℃过夜保存。染色前用PBS离心沉淀,去除乙醇,加1% RNA酶的Tri-HCl缓冲液(pH=7.4)100~200 μl 37 ℃水浴30 min,至4 ℃避光保存30 min,再加入50 μl碘化丙锭染色液混匀进行DNA染色,4 ℃避光30 min,通过流式细胞仪测定细胞周期分布情况。

### 1.3 统计学处理方法

不同浓度芦丁处理HepG2细胞组与对照组作两两比较,采用SAS(Stastical Analysis System)软件行方差分析。细胞凋亡百分率采用4格表$\chi^2$检验。

## 2 结果

### 2.1 芦丁对HepG2细胞DNA合成的影响

2.1.1 MTT法观察结果 应用MTT法观察不同浓度的芦丁对HepG2细胞的生长的影响,结果显示芦丁在(50~250 μmol/L)浓度内对HepG2细胞生长的抑制作用效果明显,与对照组比较差异有显著意义($P<0.01$),组间比较($P<0.05$),并且呈剂量效应关系(表1)。

**表1 芦丁对HepG2抑制作用**

| 组别(μmol/L) | 抑制率(%, $\bar{x}\pm s$) |
|---|---|
| 对照组 | |
| 0 | 0.00±0.00 |
| 实验组 | |
| 50 | 0.09±0.01 |
| 100 | 0.23±0.04[a] |
| 150 | 0.39±0.02[a] |
| 200 | 0.58±0.03[a] |
| 250 | 0.72±0.04[a] |

a: $P<0.01$,与对照组比较

2.1.2 $^3$H-TdR掺入法观察结果 采用$^3$H-TdR掺入法观察芦丁在50~250 μmol/L对HepG2细胞作用24 h后,对细胞DNA的影响。结果表明芦丁对HepG2细胞DNA合成有抑制作用,与对照组相比较具有显著差异($P<0.01$)(图1)。

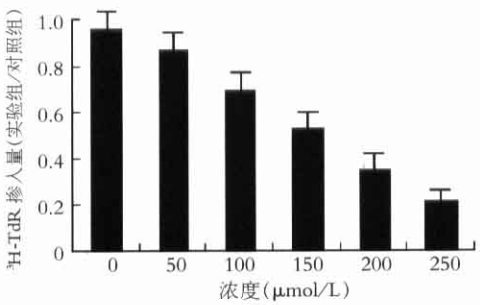



**图1 芦丁抑制HepG2细胞DNA的作用**

### 2.2 荧光染色检测芦丁诱导HepG2细胞株凋亡率

在荧光显微镜下观察不同浓度(50~250 μmol/L)芦丁诱导的HepG2细胞株凋亡效应,随着芦丁浓度增加凋亡百分率也增加,实验组与对照组比较表现显著差异($P<0.05$)。见表2。

**表2 芦丁诱导HepG2凋亡率**

| 组别(μmol/L) | 凋亡率(%) |
|---|---|
| 组照组 | |
| 0 | 0.10 |
| 实验组 | |
| 50 | 0.24[a] |
| 100 | 0.39[a] |
| 150 | 0.47[a] |
| 200 | 0.52[a] |
| 250 | 0.61[a] |

a: $P<0.05$,与对照组比较

### 2.3 流式细胞仪(FSM)观测芦丁对HepG2细胞周期的影响

结果由表3看出经过不同浓度芦丁处理HepG2细胞24 h后,细胞周期变化明显,随着芦丁浓度的增加,$G_0/G_1$期细胞所占的比例从(32.1±1.9)%上升到70.4%,$G_2$/M从(43.3±0.7)%下降到(8.4±1.0)%,说明芦丁主要作用于细胞增殖期的$G_1$~S期。

表 3　芦丁对 HepG2 作用 24 h 后 细胞周期的改变($\bar{x} \pm s$, %)

| 组别(μmol/L) | 细胞周期 | | |
|---|---|---|---|
| | $G_0/G_1$ | S | $G_2/M$ |
| 对照组 | | | |
| 0 | 32.1 ± 1.9 | 24.35 ± 1.4 | 43.3 ± 0.7 |
| 实验组 | | | |
| 50 | 36.5 ± 0.3 | 24.4 ± 1.7 | 38.1 ± 1.0 |
| 100 | 45.7 ± 1.5[a] | 29.5 ± 1.3 | 24.8 ± 1.1 |
| 150 | 50.2 ± 0.9[a] | 31.3 ± 1.4 | 17.5 ± 1.8 |
| 200 | 59.7 ± 2.7[a] | 23.4 ± 0.8 | 16.9 ± 1.6 |
| 250 | 70.4 ± 1.2[a] | 21.2 ± 1.4 | 8.4 ± 1.0 |

a：$P < 0.05$，与对照组比较

## 3　讨论

从 20 世纪 70 年代就有人发现黄酮类化合物有抗氧化和抗肿瘤作用。黄酮类化合物可分为黄酮、黄酮醇、异黄酮、黄烷、黄烷醇。黄酮类化合物抗肿瘤的作用主要是通过诱导细胞凋亡、抗肿瘤细胞增殖、干预细胞信号传导、促进抑癌基因表达等途径来实现。

Wenzel 等[1]研究发现，黄酮类化合物能抑制人结肠癌 HT-29 细胞增殖。Volate 等[2]研究发现草药成分(如槲皮素、芦丁等)在降低大肠的癌前病变、诱导凋亡作用方面发挥重要意义。Ogata 等[3]从柠檬中获得的黄酮类化合物和它的代谢产物圣草素、3,4-二羟氢化肉桂和藤黄酚能使 HL-60 细胞 DNA 片段化。Singh 等[4]研究发现在前列腺癌细胞增殖过程中，水飞蓟素(silymarin)的主要成分 silibinin 能降低 Rb/P107 和 Rb2/P130 磷酸化作用，促进胰岛素样生长因子结合蛋白-3(IGFBP-3)的生成，诱导细胞凋亡，进而抑制前列腺癌细胞生长，阻碍细胞增殖分化进程。曾文铤等[5]研究发现槲皮素能明显抑制 HepG2 细胞的增殖。槲皮素和芦丁同属黄酮醇类化合物，芦丁是槲皮素的重要衍生物，只是芦丁比槲皮素多一个芸香糖。Aherne 等[6]研究 HepG2 细胞，发现类黄酮能显著抑制 $H_2O_2$ 诱发的 DNA 损伤。芦丁是一种天然的抗氧化剂。它能减少黄曲霉毒素 B1 和 N-亚硝基二甲胺引起的 DNA 断列作用。夏维木等[7]应用电子自旋共振技术观察芦丁对 $O_2^-$ 的清除作用，发现其清除率达 96% 以上。阎道广等[8]研究芦丁抗低密度脂蛋白脂质过氧化方面发现，芦丁、槲皮素抗氧化能力相近，均优于人工合成的酚类物质 BHT(羟甲苯二丁脂)。Romero 等[9]研究发现芦丁在不同浓度下能够抑制 LNCaP(前列腺癌细胞株)的生长，并诱导细胞凋亡。韩书亮[10]研究发现，用体外细胞培养$^3$H-TDR 掺入法，芦丁对腹水型肝癌细胞平均抑制率为 23.8%。细胞分裂增殖的实质就是 DNA 的复制，通过细胞不断经历细胞的周期来实现。而细胞周期受细胞内的信号传导和多种因素的精细调节。本实验表明对肝癌细胞株抑制效果明显，不同浓度的芦丁对肝肿瘤细胞抑制增殖作用的效果不同，具有明显的浓度依赖性。

本研究显示不同浓度的芦丁处理肝癌细胞 24 h 后可出现明显的细胞凋亡效应，与对照组比较有显著差异($P < 0.05$)，显微镜看到对照组细胞变化不明显，细胞形态多数大小一致，染色均匀的细胞核，而经芦丁处理的细胞则出现较多的固缩、浓染、形态不规则的圆球形或小块状核。

本研究表明，芦丁浓度在 50 ~ 250 μmol/L 范围内对人肝癌细胞株 HepG2 处理后，细胞周期发生了变化，其中 $G_0/G_1$ 期细胞增多，$G_2/M$ 期细胞下降，说明芦丁的作用在 $G_1$ ~ S 期，并且能阻滞 $G_1$ 期细胞向 S 期移行；并且药物随着浓度的增加，HepG2 细胞凋亡也增加。从癌细胞体外实验中芦丁具有抗肿瘤作用，其作用机制是抑制肿瘤细胞生长和诱导细胞凋亡。

**参考文献：**


[1] WENZEL U, KUNTZ S, BRENDEL M D, *et al*. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells [J]. Cancer Res, 2000, 60(14): 3823 - 3831.

[2] VOLATE S R, DAVENPORT D M, MUGA S J, *et al*. Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin) [J]. Carcinogenesis, 2005, 26 (8): 1450 - 1456.

[3] OGATA S, MIYAKE Y, YAMAMOTO K, *et al*. Apoptosis induced by the flavonoid from lemon fruit (Citrus limon BURM. f.) and its metabolites in HL - 60 cells [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2000, 64 (5): 1075 - 1078.

[4] SINGH R P, DHANALAKSHMI S, TYAGI A K, *et al*. Dietary feeding of silibinin inhibits advance human prostate carcinoma growth in athymic nude mice and increases plasma insulin - like growth factor - binding protein - 3 levels[J]. Cancer Res , 2002, 62 (11): 3063 - 3069.

[5] 曾文铤，唐武兵，倪　宏，等. 槲皮素对人肝癌 HepG2 细胞的作用与机制[J]. 中西医结合肝病杂志，2003，13(1)：17 - 19.

[6] AHERNE S A, O'BRIEN N M. Protection by the flavonoids myricetin, quercetin, and rutin against hydrogen peroxide - induced DNA damage in Caco - 2 and HepG2 cells[J]. Nutr Cancer, 1999, 34 (2): 160 - 166.

[7] 夏维木，陈　杞，陈士明，等. 应用 ESR 技术观察芦丁对 $O_2^-$ 的清除作用[J]. 第二军医大学学报，1997，18(4)：388 - 389.

[8] 阎道广，周　玫，陈　瑗，等. 槲皮素、芦丁和 BHT 对低密度脂蛋白氧化修饰的抑制效应[J]. 第一军医大学学报，1995，15(1)：24 - 26.

[9] ROMERO I, PAEZ A, FERRUELO A, *et al*. Polyphenols in red wine inhibit the proliferation and induce apoptosis of LNCaP cells[J]. BJU Int, 2002, 89 (9): 950 - 954.

[10] 韩书亮. 大苞雪莲四种成分抗癌作用研究[J]. 癌变·畸形·突变，1995，7(2)：80 - 83.


(编辑　汪勤俭)