

消失。基于此,本实验以Per1、Per2这一正向昼夜节律调节基因为研究对象,以阐明酸枣仁汤调节睡眠的分子机制。本实验发现,空白组大鼠SCN中Per1、Per2表达水平较高,造模后,模型组大鼠SCN中Per1、Per2表达水平下降($P < 0.01$),给药后,褪黑素组和酸枣仁汤组大鼠SCN中Per1、Per2表达都有不同程度上升($P < 0.01$, $P < 0.05$)。这说明睡眠剥夺可以引起大鼠下丘脑SCN中节律基因Per1、Per2的异常,而酸枣仁汤可以通过调节SCN中Per1、Per2的表达而达到防治失眠的疗效。

综合分析,课题组认为酸枣仁汤可能通过调节大鼠SCN中Per1、Per2的表达进而改善慢睡眠剥夺大鼠的睡眠状态。本研究机制初步阐明了酸枣仁汤干预失眠的作用机制,但其调节节律基因的分子机制有待于进一步研究。此外,本研究也为其他中医经典方的现代化研究提供了一定的借鉴意义。

参考文献

- [1] 钱见见,蔡圣朝.针刺百会五针结合中药治疗心肾不交型失眠验案1则[J].中医外治杂志,2018,27(1):59-60.
- [2] 张红菊,赵忠新.睡眠障碍临床研究的主要进展[J].神经疾病与精神卫生,2015,15(1):6-8.
- [3] 魏歆然,魏高文,郑雪娜,等.不同经穴组合针刺对失眠大鼠下丘脑生物钟基因Clock和Bmal1表达的影响[J].针刺研究,2017,42(5):429-433.

- [4] 马艳苗,贾跃进,柴智,等.浅谈中西医对失眠症昼夜节律的认识[J].世界中西医结合杂志,2017,12(9):1189-1191.
- [5] YOKOTA S I, HORIKAWA K, AKIYAMA M, et al. Inhibitory action of brotizolam on circadian and light-induced Per1, and Per2, expression in the hamster suprachiasmatic nucleus [J]. British Journal of Pharmacology, 2000, 131(8): 1739-1747.
- [6] ZHANG B, GAO Y, LI Y, et al. Sleep Deprivation Influences Circadian Gene Expression in the Lateral Habenula [J]. Behavioural Neurology, 2016, 2016: 7919534. DOI:10.1155/2016/7919534.
- [7] 谢鸣.方剂学[M].北京:人民卫生出版社,2010:258.
- [8] 王思宇,杨学,何园.酸枣仁汤方证探微[J].上海中医药杂志,2016,50(7):30-34.
- [9] 王培坎,吴高义,李吉国,等.睡眠剥夺对大鼠行为学及咀嚼肌肌电图的影响[J].现代生物医学进展,2014,14(9):1645-1647.
- [10] YU J, CHEN J, HU T, et al. Effect of Electro-Acupuncture on Expression of Circadian Clock Gene Per2 and Bmal1 in Sleep-Deprivation Model Rat [J]. Chinese Medicine, 2016, 7(1): 16-24.
- [11] TAMAYO A G, DUONG H A, ROBLES M S, et al. Histone monoubiquitination by Clock - Bmal1 complex marks Per1 and Per2 genes for circadian feedback [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2015, 22(10): 759-766.
- [12] 魏文静,全立国,仲启明,等.蛇床子催眠活性组分对对氯苯丙氨酸致失眠大鼠海马钟基因与氨基酸类神经递质表达的影响[J].中草药,2018,49(11):2614-2619.
- [13] ONO D, HONMA K I, YANAGAWA Y, et al. Role of GABA in the regulation of the central circadian clock of the suprachiasmatic nucleus. [J]. Journal of Physiological Sciences, 2018, 68(4): 333-343.

(收稿日期:2018-07-14,修回日期:2018-09-15)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.11.005

◇ 药学研究 ◇

槲皮素抑制人肝癌细胞 HepG2 的体内外活性研究

周孟^{ab}, 廖祥明^{ab}, 王珊^{ab}, 巩仔鹏^c, 张荣红^d

作者单位:贵州医科大学^a民族药与中药开发应用教育部工程研究中心、药用植物功效与利用国家重点实验室,
^b药学院,^c贵州省药物制剂重点实验室,^d组织工程与干细胞实验中心,贵州 贵阳 550004

通信作者:张荣红,女,讲师,研究方向为肿瘤学,E-mail:476281051@qq.com

基金项目:贵州省民族药药效物质基础研究科技创新人才团队贵州省高层次创新型人才培养(百层次)(黔科合平台人才[2016]5613\5677)

摘要:目的 系统评价槲皮素(Qu)体内外干预HepG2人肝癌细胞增殖效果。方法 使用MTT法检测不同浓度Qu在不同作用时间对HepG2细胞的体外抑制活性;采用裸鼠移植瘤实验,评价腹腔注射Qu对HepG2人肝癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用;使用TUNEL法检测凋亡指数。结果 Qu作用HepG2细胞24、48和72 h的IC₅₀分别为110.50, 63.73和46.38 μmol/L; 12.5, 25和50 mg/kg的Qu都能显著抑制裸鼠皮下移植瘤的生长,且呈浓度依赖性;其中50 mg/kg的Qu对人肝癌HepG2细胞裸鼠皮下肿瘤模型的抑瘤率为46.65%,差异有统计学意义($P < 0.05$),相对肿瘤增殖率为46.68%。同时Qu还会导致约20.17%的体内肿瘤细胞发生凋亡,且几乎无毒性,表现出良好的抑瘤效果。结论 Qu能较为显著的抑制体内外HepG2肝癌细胞的增殖并会导致其发生凋亡,且由于极低的毒性及在自然界的广泛分布,使Qu成为新型抗肝癌药物开发的重要资源。

关键词:槲皮素; 肝癌; HepG2细胞; 抗肿瘤活性; 细胞凋亡

In vivo and in vitro anticancer activity of quercetin against human liver cancer HepG2 Cells

ZHOU Meng^{a,b}, LIAO Xiangming^{a,b}, WANG Shan^{a,b}, GONG Zipeng^c, ZHANG Ronghong^d

Author Affiliation: ^aEngineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, ^bState Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, ^bSchool of Pharmacy, ^cGuizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, ^dTissue Engineering and Stem Cell Research Center, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China

Abstract: Objective To evaluate the anticancer effect of quercetin (Qu) against HepG2 cells in vitro and in vivo. **Methods** MTT assay was used to evaluate the anticancer activity of Qu against HepG2 cells in vitro, and nude mice xenograft model was employed to study the in vivo antitumor activity with intraperitoneal injection of Qu. TUNEL assay was used to test the apoptosis index of the tumor tissue. **Results** The IC₅₀ values of Qu against HepG2 in vitro with experimental time of 24, 48 and 72 h were 110.50, 63.73 and 46.38 μmol/L, respectively. All three concentrations of Qu (12.5, 25 and 50 mg/kg) could inhibit the growth of subcutaneous xenografts in Balb/C mice in a concentration-dependent manner. Among them, the tumor inhibition rate of Qu with concentration of 50 mg/kg was 46.65%, which had statistically significant effect ($P < 0.05$), and the relative proliferation rate was 46.68%. Meanwhile, nearly 20% of tumor cell apoptosis and no toxicity were observed, suggesting a good inhibitory effect of Qu against liver cancer. **Conclusion** Qu can significantly inhibit the proliferation of HepG2 cells in vitro and in vivo and cause tumor cells apoptosis. Due to the low toxicity and widespread distribution in nature, Qu is an important resources for developing novel anti-hepatocarcinoma drugs.

Key words: Quercetin; Liver cancer; HepG2 cell; Anticancer activity; Cell apoptosis

恶性肿瘤是我国乃至全球最为主要的公共健康问题之一。调查发现,我国肿瘤总体5年生存率较低,仅为30.9%,与发达国家相比尚有明显差距^[1]。槲皮素(Quercetin, Qu)属于黄酮类,广泛分布于多种蔬菜(洋葱、姜、芹菜等)、水果(苹果、草莓等)和中草药(银杏、三七、槐米等)中^[2]。人体对Qu具有良好的耐受性,国际癌症研究机构已于1999将Qu归入对人无致癌性物质之列,可将Qu作为有益健康的食品补充剂使用^[3]。Qu具有多种生物活性,如抗肿瘤、抗氧化、抗感染、免疫抑制、心血管保护和血糖调节等^[4]。抗肿瘤活性方面,Qu可抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、干扰肿瘤细胞周期和信号转导通路、逆转肿瘤细胞多药耐药等作用^[5-6],对多种恶性肿瘤如肝癌、胃癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、卵巢癌及胆囊癌等均有较好抑制作用^[7]。其中,以抗肝癌活性尤为显著,而原发性肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,在我国近20年来其死亡率增加了41.17%,已成为我国第二位肿瘤病因。Qu可阻滞肝癌细胞周期,抑制肝癌细胞生长,具有显著的抗癌活性^[8],然而具体的抗肿瘤机制目前尚未完全明确^[4]。并且,同时评价Qu体内外抗HepG2细胞活性及对凋亡的影响也未见报道。因此,本研究自2017年1月至2018年1月分别通过体外直接抑制HepG2细胞及体内抑制皮下移植肿瘤模型来考察Qu对肝癌细胞的抑制活性,并进一步分析了Qu

对HepG2细胞凋亡的影响,为明确Qu的抗肝癌作用机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与动物 人肝癌细胞株HepG2购置于美国ATCC,并由四川大学生物治疗国家重点实验室馈赠;雌性裸鼠(Balb/C nu/nu),4~6周龄,体质量18~20 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2015-0004;动物处置符合伦理学原则。

1.1.2 试剂 Qu(100 mg,批号051K1225)购自Sigma公司;DMEM培养基、胎牛血清(FBS)均购自美国GIBCO公司;胰蛋白酶(trypsin)、注射用顺铂(Cisplatin)均购自云南个旧生物药业有限公司产品(批号150301),临用前用0.9%氯化钠溶液稀释;5%葡萄糖注射液购自太极集团西南药业股份有限公司产品(批号15081073);氯化钠注射液(0.9%)购自四川科伦药业股份有限公司产品(批号M15062317)。体外用Qu用二甲基亚砜(DMSO)稀释成储存液冻存。使用时用DMEM培养基稀释成所需浓度,DMSO体积百分数<0.1%;体内用Qu溶解在PEG400里,临用时用0.9%氯化钠溶液稀释成所需浓度。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2细胞常规培养于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 mg/L链霉素的

DMEM培养液中,置饱和湿度、37℃的5% CO₂孵箱中培养。此细胞贴壁生长。

1.2.2 细胞计数 体外培养的细胞经0.25%胰蛋白酶消化、吹打脱落并混匀后,用0.9%氯化钠溶液稀释到合适的密度。混匀后吸取少量悬液滴加到血球计数板上,在倒置显微镜下计数。记下4个大格的细胞总数,取平均数后乘以10⁴,再乘以稀释倍数得到细胞密度,乘以总体积即得到细胞总数。

1.2.3 MTT 试验 取对数生长期细胞,消化液消化或直接吹打混匀后计数;调整细胞悬液浓度每毫升3×10⁴,于96孔板中每孔加入100 μL细胞悬液;24 h后吸掉原有培养基,分别加入200 μL含有Qu的完全培养液(阴性对照组加等量DMSO),每组5孔,继续培养于CO₂孵箱;分别于加药后24、48和72 h后取出96孔板,每孔加入5 mg/L MTT试剂20 μL,继续培养4 h;吸出孔中的液体,每孔加入150 μL DMSO,室温震荡15 min充分溶解沉淀,用酶标仪在570 nm波长检测每孔细胞OD值。

根据相对抑制率判断Qu对肿瘤细胞的抑制作用:

相对抑制率=(对照孔平均OD值-加药孔平均OD值)÷对照孔平均OD值×100%。

1.2.4 HepG2 细胞裸鼠皮下移植模型的建立 HepG2细胞长到80%~90%汇合度时,用0.25%的胰酶消化后离心,加无血清培养基悬浮,用血球计数板对细胞进行计数。离心后用无血清漂洗一次,然后再次离心。去掉培养基后,加入合适体积的无血清DMEM培养基,将细胞浓度调节到每毫升10⁸个细胞悬液,在注射之前置于冰上。混匀细胞悬液,用1 mL注射器往裸鼠右侧 flank 位置皮下注射100 μL细胞悬液(10⁷个细胞)。接种后一周左右,待肿瘤长到3 mm×3 mm时,进行随机分组。

1.2.5 移植瘤种植及药物治疗 接种后待肿瘤直径长至6 mm以上时,淘汰肿瘤体积过大、过小的荷瘤裸鼠,将合格动物采用随机数字表法分组,实验设0.9%氯化钠溶液阴性对照组,腹腔注射给药Qu低(12.5 mg/kg)、中(25 mg/kg)、高剂量组(50 mg/kg),阳性药顺铂组(5 mg/kg),共5组,每组6只荷瘤裸鼠。分组后次日第一次给药,Qu组给药频率为每2 d腹腔注射给药一次;阳性药顺铂组(5 mg/kg)为每5 d腹腔注射给药。

1.2.6 观察指标和有效判定标准 从分组当天开始,对小鼠体质量和肿瘤大小进行测量,并对可能存在的药物毒性进行观察。

(1)体质量测量:置于电子天平上测量,结果精

确到0.1 g。同时观察毒性反应,治疗期间观察小鼠对药物的反应,如皮毛色泽、立毛反应、食欲及活跃程度等。

(2)肿瘤体积(TV)、相对肿瘤体积(RTV)和相对肿瘤增殖率:每2天用1/50 mm精度游标卡尺测肿瘤的长径和短径,动态观察受试药抗肿瘤的效应。TV的计算公式为:TV(mm³)=a×b²×π/6

其中a、b分别表示长径和短径。根据测量的结果计算出RTV,计算公式为:RTV=V_t/V₀,其中V₀为每一组在分笼给药时(即d₀)测量所得TV,V_t为该组每一次测量时的TV。抗肿瘤活性的评价指标为相对肿瘤增值率T/C(%),计算公式如下:

$$T/C(\%) = \frac{T_{RTV}}{C_{RTV}} \times 100\%$$

T_{RTV}:治疗组相对肿瘤体积;C_{RTV}:阴性对照组相对肿瘤体积。

疗效评价标准:T/C(>60为无效;T/C(%)≤60,并经统计学处理P<0.05为有效。

(3)肿瘤重量测定及抑瘤率(%)的计算:于治疗终点时处死动物,解剖剥离瘤块,称瘤重,并照像。按下式计算肿瘤生长抑制率:

抑瘤率(%) =

$$\frac{\text{阴性对照组平均瘤重(g)} - \text{给药组平均瘤重(g)}}{\text{阴性对照组平均瘤重(g)}} \times 100\%$$

有效判定标准:抑瘤率(即肿瘤生长抑制率)<40%为无效;抑瘤率≥40%并经统计学处理P<0.05为有效。

(4)综合判定标准:上述2项有效判定标准(相对肿瘤增殖率和抑瘤率)中,有一项符合有效标准判为有效。

1.3 统计学方法 采用SPSS 17.0和GraphPad Prism 5软件对实验结果进行统计分析。各实验均独立重复3次。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-t检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外Qu对HepG2细胞增殖的影响 为了测试Qu对肿瘤细胞HepG2的直接作用,实验中使用MTT法对比分析了不同浓度的Qu(0, 10, 20, 40, 80和160 μmol/L)在不同时间(24, 48, 和72 h)对体外肿瘤细胞HepG2增殖的影响(图1)。结果发现,随着检测时间的延长,Qu对HepG2的抑制活性也逐渐增强(图1A),24, 48和72 h的IC₅₀分别为110.50, 63.73和46.38 μmol/L(图1B),可见Qu对肝癌细胞的生长和增殖具有时间和浓度依乘抑制效果。

2.2 Qu对HepG2肝癌裸鼠皮下移植瘤的影响

2.2.1 Qu对肿瘤体积与动物体质量的影响 通过测试不同浓度(12.5, 25和50 mg/kg)的Qu对HepG2人肝癌裸鼠皮下移植瘤肿瘤体积的影响(图2A),发现Qu能够显著抑制HepG2在体内的增殖,且呈浓度依赖性。尤其是当Qu给药浓度为50 mg/kg时,在前12 d内其抑制活性较阳性药物顺铂更好;在第12~18天之间,活性与阳性药物顺铂相当。在动物体质量方面,各浓度Qu组的动物体质量与空白对照组几乎相同,而顺铂组体质量下降非常明显(图2B),在第20天体质量下降接近30%,并导致了其中一只实验动物的死亡。在第21天处死动物后,可以

观察到顺铂组肿瘤体积显著受到抑制。各浓度的Qu组的肿瘤体积明显小于空白对照组(图3),并且随着Qu浓度的提升,肿瘤体积也相应减小,但相对于阳性药物顺铂抑瘤效果略差。

2.2.2 Qu对RTV值的影响 经测量裸鼠瘤体积与第1天给药时瘤体积计算RTV值,结果见表1。可见,与0.9%氯化钠溶液组相比,Qu各剂量组和顺铂组均在第6至10天开始差异有统计学意义,HepG2肿瘤体积受到显著抑制,且Qu各剂量组比阳性药略好。第12至20天与0.9%氯化钠溶液阴性对照组相比,各实验组也显著抑制肿瘤增殖,并且50 mg/kg Qu活性与阳性组相当,而中、低剂量组活性稍差。

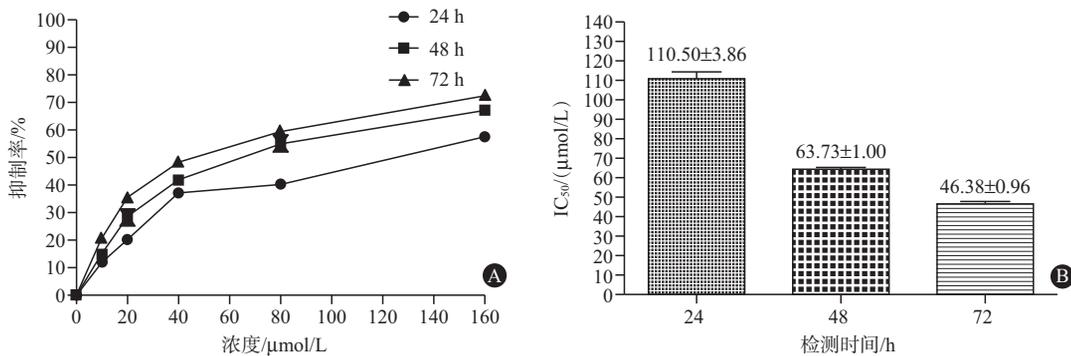


图1 不同检测时间(24,48,及72 h)下槲皮素对HepG 2细胞的抑制曲线(A)与IC₅₀值(B)

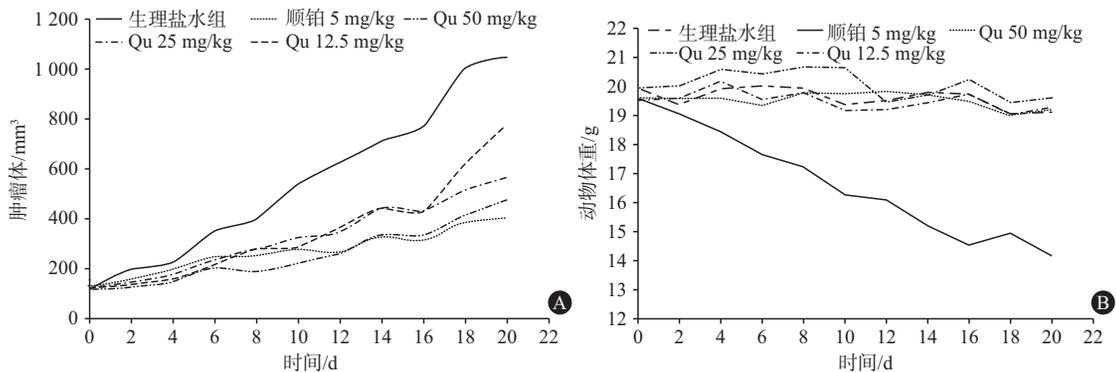


图2 槲皮素对HepG2人肝癌皮下移植瘤肿瘤体积(A)与模型老鼠体质量(B)的影响

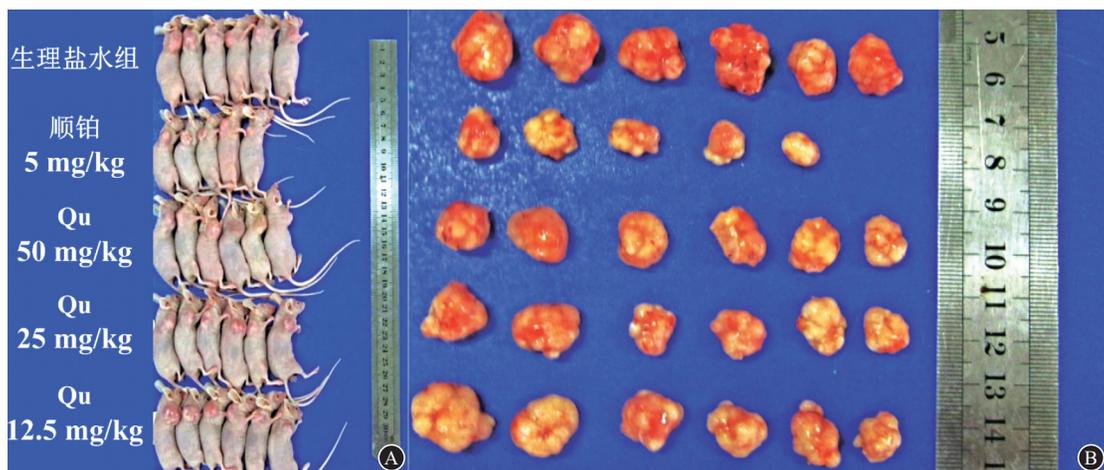


图3 腹腔注射不同药物后,第21天HepG2人肝癌裸鼠皮下肿瘤模型动物(A)与肿瘤(B)

2.2.3 Qu对移植瘤肿瘤抑瘤率与相对增殖率的影响 进一步分析各组肿瘤的抑瘤率与肿瘤相对增殖率可以发现,阳性药物顺铂对HepG2细胞裸鼠皮下肿瘤模型的抑瘤率为59.59%(表2),大于40%,与空白对照相比,差异有统计学意义;并且其相对肿瘤增殖率为38.07%(表3),小于60%,两组数据均表明顺铂对人肝癌HepG2细胞裸鼠皮下肿瘤具有明显的抑制作用。50 mg/kg Qu组对人肝癌HepG2细胞裸鼠皮下肿瘤模型的抑瘤率为46.65%,大于40%,差异有统计学意义;并且相对其肿瘤增殖率为46.68%,小于60%,两组数据均表明50 mg/kg的Qu

对人肝癌HepG2细胞表现出较理想的抑制效果。25 mg/kg Qu对人肝癌HepG2细胞裸鼠皮下肿瘤模型的抑瘤率为40.23%,大于40%,差异有统计学意义;并且其相对肿瘤增殖率为52.58%,小于60%,两组数据也表明25 mg/kg的Qu在人肝癌HepG2细胞裸鼠皮下肿瘤模型上表现出一定抑制效果。然而12.5 mg/kg Qu对人肝癌HepG2细胞裸鼠皮下肿瘤模型的抑瘤率为11.22%,小于40%,差异有统计学意义;且其相对肿瘤增殖率为75.30%,大于60%,则表明12.5 mg/kg的Qu在人肝癌HepG2细胞裸鼠皮下肿瘤模型中抑制作用较弱。综上可知Qu在体内

表1 各实验组裸鼠RTV值变化($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	16 d	18 d	20 d
0.9%氯化钠溶液组	6	1.58±0.59	1.85±0.62	2.85±0.74	3.29±1.02	4.38±0.62	5.08±0.36	5.81±0.52	6.30±0.58	8.13±2.16	8.58±0.73
顺铂(5 mg/kg)	6	1.27±0.40	1.59±0.62	1.98±0.87	2.05±0.79 ^a	2.25±0.76 ^a	2.17±0.57 ^a	2.67±1.02 ^a	2.54±0.96 ^a	3.10±0.46 ^a	3.26±0.93 ^a
Qu(50 mg/kg)	6	1.09±0.16	1.30±0.29	1.71±0.61 ^a	1.58±0.55 ^a	1.85±0.58 ^a	2.19±0.53 ^a	2.81±0.69 ^a	2.82±0.63 ^a	3.47±0.72 ^a	4.00±0.64 ^a
Qu(25 mg/kg)	6	1.12±0.34	1.41±0.41	1.85±0.48 ^a	2.20±0.80	2.58±0.55 ^a	2.79±0.63 ^a	3.50±0.65 ^a	3.47±0.48 ^a	4.11±0.55 ^a	4.51±0.77 ^a
Qu(12.5 mg/kg)	6	1.00±0.07	1.15±0.27	1.32±0.38 ^a	1.81±0.56	2.29±0.52 ^a	2.41±0.53 ^a	3.05±0.82 ^a	3.67±1.29 ^a	3.61±0.82 ^a	5.12±0.82 ^a
与0.9%氯化钠溶液组比较P值											
顺铂(5 mg/kg)		0.650	0.770	0.060	0.045	0.016	0.001	0.002	0.000	0.000	0.000
Qu(50 mg/kg)		0.810	0.650	0.045	0.028	0.013	0.002	0.007	0.000	0.000	0.000
Qu(25 mg/kg)		0.760	0.850	0.049	0.037	0.025	0.009	0.012	0.005	0.001	0.001
Qu(12.5 mg/kg)		0.920	0.560	0.039	0.032	0.022	0.008	0.009	0.005	0.000	0.003

注:Qu为槲皮素;与0.9%氯化钠溶液组比较,^aP<0.05

表2 槲皮素(Qu)对人肝癌HepG2细胞裸鼠皮下移植瘤肿瘤重量的影响及抑瘤率

组别	鼠数	肿瘤重量(g, $\bar{x} \pm s$)	与0.9%氯化钠溶液组比较P值	与顺铂组比较P值	与Qu低剂量组比较P值	抑瘤率/%
0.9%氯化钠溶液组	6	1.14±0.07	—	—	—	—
顺铂 5 mg/kg	6	0.46±0.11 ^a	0.000	—	—	59.59
Qu 50 mg/kg	6	0.61±0.05 ^{abc}	0.000	0.017	0.000	46.65
Qu 25 mg/kg	6	0.68±0.04 ^{abc}	0.000	0.001	0.000	40.23
Qu 12.5 mg/kg	6	1.02±0.09 ^{ab}	0.025	0.000	—	11.22

注:与0.9%氯化钠溶液组比较,^aP<0.05;与顺铂组比较,^bP<0.05;与Qu低剂量组比较,^cP<0.05

表3 各实验组裸鼠相对肿瘤增殖率[T/C(%)]

组别	鼠数	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	16 d	18 d	20 d
顺铂(5 mg/kg)	6	80.12	85.63	69.43	62.27 ^a	51.32 ^a	42.77 ^a	45.93 ^a	40.29 ^a	38.05 ^a	38.07 ^a
Qu(50 mg/kg)	6	68.81	69.96	60.06 ^a	47.94 ^{abc}	42.36 ^{abc}	43.13 ^{ac}	48.38 ^{ac}	44.74 ^{ac}	42.68 ^{ac}	46.68 ^{ac}
Qu(25 mg/kg)	6	71.12	76.04	65.08	66.87	58.92 ^a	54.94 ^{ab}	60.36 ^{ab}	54.98 ^{ab}	50.54 ^{ab}	52.58 ^{ab}
Qu(12.5 mg/kg)	6	72.54	71.31	63.41	69.54	55.02 ^a	59.97 ^{ab}	63.25 ^{ab}	57.23 ^{ab}	62.99 ^{ab}	75.30 ^b
与0.9%氯化钠溶液组比较P值											
顺铂(5 mg/kg)		0.089	0.071	0.067	0.025	0.015	0.005	0.004	0.006	0.003	0.000
Qu(50 mg/kg)		0.068	0.072	0.044	0.037	0.008	0.008	0.008	0.006	0.003	0.002
Qu(25 mg/kg)		0.067	0.079	0.056	0.053	0.043	0.048	0.049	0.049	0.067	0.001
Qu(12.5 mg/kg)		0.087	0.067	0.061	0.054	0.048	0.053	0.05	0.046	0.058	0.077
与顺铂组比较P值											
Qu(50 mg/kg)		0.079	0.068	0.053	0.025	0.012	0.120	0.230	0.280	0.220	0.062
Qu(25 mg/kg)		0.087	0.067	0.240	0.370	0.150	0.048	0.034	0.041	0.046	0.039
Qu(12.5 mg/kg)		0.098	0.078	0.140	0.180	0.350	0.011	0.009	0.001	0.000	0.000
与Qu低剂量组比较P值											
Qu(50 mg/kg)		0.450	0.550	0.430	0.042	0.031	0.015	0.021	0.033	0.008	0.000
Qu(25 mg/kg)		0.580	0.220	0.380	0.090	0.375	0.077	0.160	0.099	0.039	0.001

注:Qu为槲皮素;与0.9%氯化钠溶液组比较,^aP<0.05;与顺铂组比较,^bP<0.05;与Qu低剂量组比较,^cP<0.05

对 HepG2 肝癌的抑癌作用呈浓度依赖性,在中、高浓度表现较为显著的抑制作用,并且在高浓度(50 mg/kg)时与阳性药物顺铂活性相当。然而考虑到顺铂极为明显的毒副作用,几乎无毒性的 Qu 极具开发价值。

2.3 Qu 对 HepG2 肝癌裸鼠皮下移植瘤细胞凋亡的影响 采用原位末端标记(TUNEL)的方法检测 HepG2 移植瘤组织病理切片中细胞凋亡的情况,结果显示中剂量、高剂量和顺铂组的肿瘤细胞发生了明显的凋亡,空白对照组和低剂量组的肿瘤细胞只发生了极为少量的细胞凋亡。进一步分析 HepG2 细胞凋亡率发现,相对于阳性组 25.73%的凋亡率,50 mg/kg 的 Qu 也能使其凋亡率达到 20.17%(图 4),且与 0.9%氯化钠溶液组相比差异有统计学意义($P < 0.001$,表 4)。

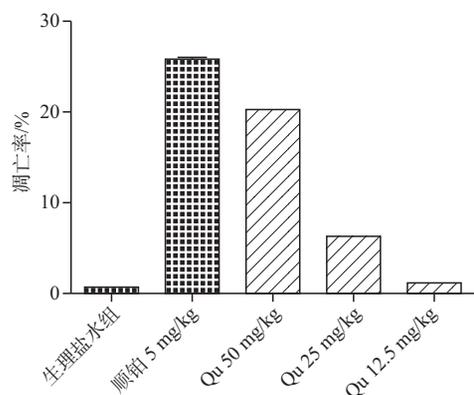


图 4 不同浓度的槲皮素与顺铂对 HepG2 细胞凋亡的影响

表 4 各实验组细胞凋亡统计值比较

组别	与 0.9% 氯化钠溶液组比较 P 值	与顺铂组比较 P 值	与 Qu 低剂量组比较 P 值
顺铂 5 mg/kg	0.000	—	—
Qu 50 mg/kg	0.000	0.028	0.002
Qu 25 mg/kg	0.000	0.003	0.035
Qu 12.5 mg/kg	0.024	0.000	—

3 讨论

Qu 是植物界中含量最丰富的黄酮类化合物之一,广泛存在于各种蔬菜、水果以及中草药中。Qu 可通过多种途径发挥抗肿瘤作用,且由于其较高的安全性,使 Qu 的抗肝癌活性已成为国内外研究的热点之一^[9-10]。本研究首先通过体外直接抑制实验,发现 Qu 对 HepG2 细胞具有明显的抑制活性,并且随着检测时间的延长,抑癌活性增加,其 IC₅₀ 值由 24 h 的 110.50 μmol/L 降低至 72 h 的 46.38 μmol/L,具有显著的时间与浓度依乘效果。通过对 Balb/C

裸鼠(nu/nu)皮下移植瘤的抑制实验发现,Qu 能够浓度依赖性的抑制移植瘤的生长,其中 50 mg/kg 的 Qu 在前 12 d 内其抑制活性较阳性药物顺铂更好。在 HepG2 移植瘤肿瘤重方面,25 和 50 mg/kg 的 Qu 都能显著减小瘤重,且 50 mg/kg 的 Qu 抑制作用与阳性药顺铂弱相当,但由于顺铂的毒性,导致给药后期实验动物的体质量降低近 30%,甚至导致实验动物死亡。同时,可能由于阳性组实验动物本身体质量下降严重,营养供应不足导致肿瘤细胞生长受到抑制,而表现出较为显著的抑制活性。相比之下,Qu 各剂量组动物体质量与对照组相比无明显变化,表明其几乎无毒性,且中、高剂量(25 和 50 mg/kg)的 Qu 还能显著提升 HepG2 的凋亡。综上所述,良好的抗肿瘤活性、极低的药物毒性以及庞大的自然储备,使得 Qu 极具研究开发的潜能。

参考文献

- [1] ZENG H, ZHENG R, GUO Y, et al. Cancer survival in China, 2003—2005: a population-based study [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(8): 1921-1930.
- [2] SUGANTHY N, DEVI KP, NABAVI SF, et al. Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: focusing on the mechanisms of actions [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 892-908.
- [3] ALUGOJU P, PERIYASAMY L, DYAVAI AH M. Quercetin enhances stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* tell mutant cells to different stressors [J]. *J Food Sci Technol*, 2018, 55(4): 1455-1466.
- [4] KHAN F, NIAZ K, MAQBOOL F, et al. Molecular targets underlying the anticancer effects of quercetin: an update [J]. *Nutrients*, 2016, 8(9): 529.
- [5] 翟闪闪, 杨成君, 王芳, 等. 槲皮素逆转肿瘤多药耐药作用研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(13): 2096-2098.
- [6] KASHYAP D, MITTAL S, SAK K, et al. Molecular mechanisms of action of quercetin in cancer: recent advances [J]. *Tumour Biology*, 2016, 37(10): 12927-12939.
- [7] 孙涓, 余世春. 槲皮素的研究进展 [J]. *现代中药研究与实践*, 2011, 25(3): 85-88.
- [8] BRITO AF, RIBEIRO M, ABRANTES AM, et al. New approach for treatment of primary liver tumors: the role of quercetin [J]. *Nutr Cancer*, 2016, 68(2): 250-266.
- [9] MENDOZA EE, BURD R. Quercetin as a systemic chemopreventive agent: structural and functional mechanisms [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2011, 11(14): 1216-1221.
- [10] SRIVASTAVA S, SOMASAGARA RR, HEGDE M, et al. Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24049. DOI: 10.1038/srep24049.

(收稿日期: 2018-05-24, 修回日期: 2018-07-17)