

油枣中黄酮类化合物抗肿瘤活性研究

王争争^{1,2}, 赵 邑², 潘微微², 赵亚蕊², 张慧霞³, 王如福^{3*}

(¹山西农业大学园艺学院 山西晋中 030800

²山西省生物研究院有限公司 太原 030006

³山西农业大学食品科学与工程学院 山西晋中 030800)

摘要 通过细胞增殖试验、细胞迁移试验和细胞凋亡试验,研究油枣中不同黄酮类化合物的抗肿瘤活性。细胞增殖试验结果表明:油枣中 5 种黄酮类化合物对胰腺癌细胞 BXPC-3、肠癌细胞 HT-29、肺癌细胞 A549 均有不同程度的抑制作用。其中,槲皮素对胰腺癌细胞 BXPC-3、肠癌细胞 HT-29 的抑制作用最为明显,抑制率分别达到 79.08%和 89.09%;金丝桃苷对肺癌细胞 A549 的抑制作用最为明显,抑制率为 74.32%。细胞迁移试验结果表明:槲皮素对胰腺癌细胞 BXPC-3 有较强的抑制迁移能力,而对肠癌细胞 HT-29、肺癌细胞 A549 效果不明显。通过 TUNEL 染色观察肿瘤细胞的凋亡,试验结果表明:油枣黄酮类化合物对肿瘤细胞的抑制作用是由细胞凋亡引起的。

关键词 油枣; 黄酮; 抗肿瘤

文章编号 1009-7848(2023)03-0090-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.03.010

2021 年全球癌症统计数据显示,49.3%的新发癌症病例和 58.3%的癌症死亡病例都发生在亚洲^[1]。其中,中国作为人口大国更是占据了亚洲癌症发病与死亡的一大部分,癌症已经成为严重威胁人类健康的多发病、常见病^[2]。由于目前抗肿瘤药物毒性较高,对人体正常细胞的损伤较大,因此寻找天然、低毒的抗肿瘤药物对治疗癌症具有重要意义。黄酮类化合物是一类以蛋白激酶为靶点的植物化学物质,具有潜在的抗肿瘤活性^[3]。植物中黄酮类物质的抗肿瘤活性已被许多研究证实^[4-7]。日常饮食中摄入富含黄酮类物质的水果和蔬菜,能有效降低罹患癌症的风险^[8-9]。黄酮类化合物的抗肿瘤活性及其作用机制已成为当前医学界的研究热点^[10-11]。枣是一种药用价值很高的植物^[12],研究表明枣多糖具有抗肿瘤活性^[13],然而,有关枣中黄酮类物质的抗肿瘤活性研究较少,多数以枣黄酮粗提物为研究对象,研究其对乳腺癌、肺癌的抑制作用^[14]。本文通过细胞增殖试验、细胞迁移试验和细胞凋亡试验,研究油枣黄酮单体化合物的抗肿瘤活性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

油枣,由山西省农业科学院果树研究所提供。胰腺癌细胞 BXPC-3、肠癌细胞 HT-29、肺癌细胞 A549、人胚肾细胞 HEK-293,上海细胞库。

DMEM 培养基、胎牛血清(FBS),美国 GIBCO 公司;二甲基亚砜(DMSO),sigma 公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8)细胞增殖-毒性检测试剂盒,同仁化工;TUNEL 试剂盒、多聚甲醛固定缓冲液、Triton,上海生工;胰蛋白酶,Amresco 公司。

1.2 仪器与设备

IX51 显微镜,奥林巴斯公司;3111 型 CO₂ 细胞培养箱,Thermo 公司;GI80DS 高压灭菌锅,AUTOLAVE 公司;L-550 台式低速大容量离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;MILLI-Q 超纯水仪,Millipore 公司;IMS-20 全自动雪花制冰机,常熟市雪科电器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备方法 将油枣洗净、晾干、去核后置于真空冷冻干燥箱中干燥至恒重,冷却后用粉碎机粉碎,过 60 目筛,经超声辅助提取及一系列梯度洗脱,最后经半制备液相分离纯化得到 5 种黄酮类化合物,分别为表儿茶素、槲皮素、异槲皮素、金丝桃苷、芦丁。分别用 DMSO 溶解,配成 40 mg/mL 的溶液,用 0.22 μm 的无菌微孔过滤器过

收稿日期:2022-03-06

第一作者:王争争,女,博士生,副研究员

通信作者:王如福 E-mail:wrf558@126.com

滤,灭菌,备用。试验前用培养液制成质量浓度分别为 25,50,100,150,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,确保稀释后样品中 DMSO 含量为 0.5% 以下。

1.3.2 油枣黄酮类化合物对肿瘤细胞的增殖试验

采用 CCK-8 法检测油枣黄酮类化合物对肿瘤细胞增殖的影响^[15]。将胰腺癌细胞 BXPC-3、肠癌细胞 HT-29、肺癌细胞 A549、人胚肾细胞 HEK-293 细胞进行细胞复苏、细胞传代后,分别选取对数生长期的 BXPC-3、HT-29、A549 3 种肿瘤细胞,经胰酶消化后,通过细胞计数仪计数,调整细胞浓度至 5×10^4 cells/mL。96 孔培养板中按照每孔 100 μL 的量接种细胞悬液,置于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中过夜培养^[16]。待细胞贴壁后取出培养板,加上上述制备好的不同浓度的 5 种黄酮类化合物,每个浓度设 5 个平行孔。同时设置对照组(加入 0.5% DMSO 的培养基 100 μL),将培养板放回培养箱中继续培养 48 h,取出培养板,电子显微镜观察拍照后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,继续培养 3 h,用酶标仪于 450 nm 处测定各孔光吸收值(OD 值),细胞生长抑制率计算公式:

$$\text{细胞增殖抑制率}(\%) = \frac{(\text{OD}_{450\text{nm}}\text{对照组} - \text{OD}_{450\text{nm}}\text{试验组})}{\text{OD}_{450\text{nm}}\text{对照组}} \times 100 \quad (1)$$

用上述方法观察油枣黄酮类化合物对人胚肾细胞 HEK-293 的影响,对黄酮类化合物进行安全性评价。

1.3.3 红枣黄酮类化合物对肿瘤细胞的迁移试验

选取生长状态良好的 BXPC-3、HT-29、A549 细胞,以每孔 1.5×10^4 细胞的密度接种到 96 孔培养板上,在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养 1 d。待细胞铺满底部约 90% 后,用 20 μL 枪头垂直于细胞表面,由孔一端划向另一端。尽量垂直于背面的横线划痕,枪头垂直,不能倾斜,此时可清晰看到细胞表面的划痕。吸掉培养液,用无菌 PBS 洗 3 次,洗去不贴壁的细胞(即划线划下的细胞),在试验组中加入终质量浓度 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的油枣黄酮类化合物,在对照组中加入同浓度的 DMSO,放入 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱,分别于 0,12,24,48 h 在电子显微镜下拍照,观察划痕闭合的情况,每组重复 2 个。

1.3.4 油枣黄酮类化合物对肿瘤细胞的凋亡试验

采用 TUNEL 染色法观察黄酮类化合物对肿瘤

细胞的凋亡试验。分别选取对数生长期的 BXPC-3、HT-29、A549 3 种肿瘤细胞,经胰酶消化后,通过细胞计数仪计数,将细胞浓度调整至 1×10^5 cells/mL,96 孔培养板每孔 100 μL 铺板,置于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁后移去细胞培养基,在试验组中加入用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基稀释的对肿瘤细胞增殖有抑制作用的油枣黄酮类化合物 100 μL ,在对照组中加入正常培养基,置于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 24 h,显微镜观察。当油枣黄酮类化合物对肿瘤细胞有明显作用效果后,移去细胞培养基,每孔加入 100 μL 4% 多聚甲醛固定缓冲液,室温孵育 30 min,除去 4% 多聚甲醛固定缓冲液,用 PBS 缓冲液洗板 2 次,每次 5 min,加入 0.01% Triton 试剂的 PBS 溶液,冰浴孵育 2 min。用 PBS 洗涤细胞 2 次,每次 5 min。按照 100 \times TF3-dUTP 与反应缓冲液(Reaction Buffer)1:100 的比例配成反应混合液,每孔加入反应混合液 50 μL ,样品用湿棉花浸润,保持孵育环境湿润,37 $^\circ\text{C}$ 避光孵育 60 min。吸去反应混合物,用 PBS 洗板 3~5 次,每孔加 PBS 缓冲液 200 μL ,用抗荧光淬灭封片剂封片后荧光显微镜观察。

1.4 统计学分析

经 SPSS 20.0 统计分析,试验数据均为均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$),误差棒(Error Bar)表示标准差,结果采用 t 检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 油枣黄酮类化合物对肿瘤细胞增殖的影响

2.1.1 油枣黄酮类化合物对人胚肾细胞 HEK-293 的作用效果 通过 CCK-8 法比较不同浓度的 5 种黄酮类化合物对人胚肾细胞 HEK-293 的影响,测定的 OD 值如图 1 所示。200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 槲皮素作用于人胚肾细胞 HEK-293,48 h 后在电子显微镜下观察细胞,作用效果如图 1 所示。

由图 1 可看出,不同浓度的 5 种黄酮类化合物对人胚肾细胞 HEK-293 作用 48 h 后,细胞增殖基本不受影响,与对照组相比,OD 值几乎无明显差别,抑制率随浓度的增加也无明显提高。由图 2 可看出,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 槲皮素作用于人胚肾细胞

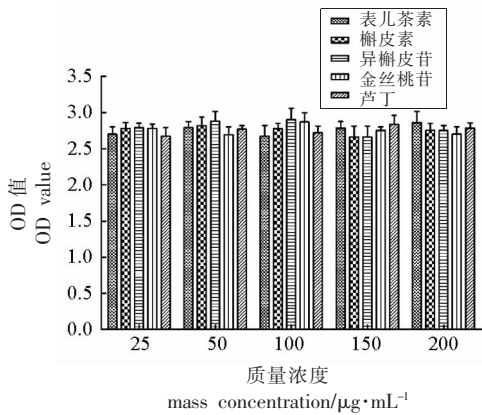


图1 黄酮类化合物对人胚肾细胞 HEK-293 的抑制作用
Fig.1 Inhibition of flavonoids on HEK-293 cells

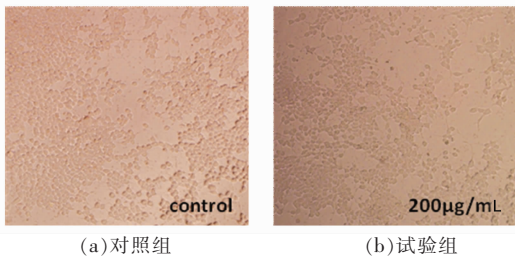


图2 槲皮素对人胚肾细胞 HEK-293 细胞的影响
Fig.2 Effect of quercetin on HEK-293 cells

HEK-293, 48 h 后细胞仍保持正常形态, 且生长旺盛、贴壁良好。综合上述结果, 油枣黄酮类化合物对人胚肾细胞 HEK-293 无抑制作用, 无毒性, 可用其进行肿瘤细胞抑制作用研究。

2.1.2 油枣黄酮类化合物对胰腺癌细胞 BXPC-3 的作用效果 通过 CCK-8 法比较不同浓度的 5 种黄酮类化合物对胰腺癌细胞 BXPC-3 的影响, 测定的抑制率如图 3 所示。

如图 3 所示, 5 种黄酮类化合物中槲皮素、异槲皮苷、金丝桃苷对胰腺癌细胞 BXPC-3 的增殖有明显的抑制作用, 表儿茶素对其的抑制作用较弱, 芦丁对其几乎没有抑制作用。当用 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 槲皮素作用于 BXPC-3 时, 抑制率为 19.59%, 抑制效果不明显, 而槲皮素质量浓度增到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 抑制率为 66.34%, 表现出较强的抑制作用。当槲皮素质量浓度达 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 抑制率 79.08%, 极大地抑制胰腺癌细胞 BXPC-3 的生长, 并随着其浓度的增加, 对 BXPC-3 表现出明显的梯度抑制效应。而用 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦丁作用于 BXPC-3, 48 h 后抑制率仅为 6.11%, 几乎无抑制作用。不同黄酮类化合物作用于 BXPC-3 的抑制率从高到低依次为槲皮素>金丝桃苷>异槲皮苷>表儿茶素>芦丁。由此可见, 槲皮素对胰腺癌细胞 BXPC-3 的抑制效果最佳。不同浓度的槲皮素作用于胰腺癌细胞 BXPC-3, 48 h 后在电子显微镜下观察细胞, 作用效果如图 4 所示。

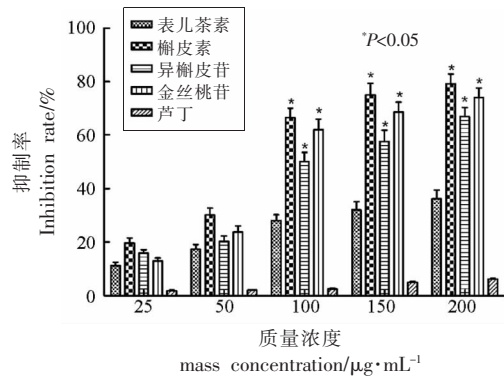


图3 不同化合物对胰腺癌细胞 BXPC-3 的抑制作用
Fig.3 Inhibitory of different ompounds on BXPC-3 cells

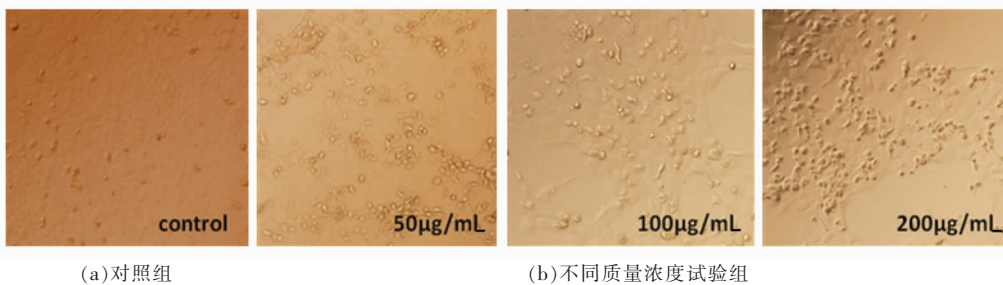


图4 槲皮素对胰腺癌细胞 BXPC-3 的影响
Fig.4 Effect of Quercetin on BXPC-3 cells

由图 4 可看出,与对照组相比,随着槲皮素浓度的增加,细胞数目明显减少,细胞间隙增大,细胞缩小,部分细胞脱落、死亡,不再贴壁,而对照组的肿瘤细胞生长旺盛,几乎铺满培养板底部,贴壁良好。

2.1.3 油枣黄酮类化合物对肠癌细胞 HT-29 作用效果 通过 CCK-8 法比较不同浓度的 5 种黄酮类化合物对肠癌细胞 HT-29 的影响,测定的抑制率如图 5 所示。

如图 5 所示,5 种黄酮类化合物对肠癌细胞 HT-29 均有抑制作用,且呈明显的量效关系。其中,槲皮素、异槲皮苷、金丝桃苷对肠癌细胞 HT-29 的增殖有明显的抑制作用,表儿茶素和芦丁对其的抑制作用较弱。当用 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的不同化合物作用于 HT-29 时,表儿茶素的抑制率最低为 7.61%,槲皮素的抑制率最高为 20.50%,差别不是很大,而当质量浓度增加到 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,抑制效果差别较明显,芦丁的抑制率为 46.05%,而槲皮

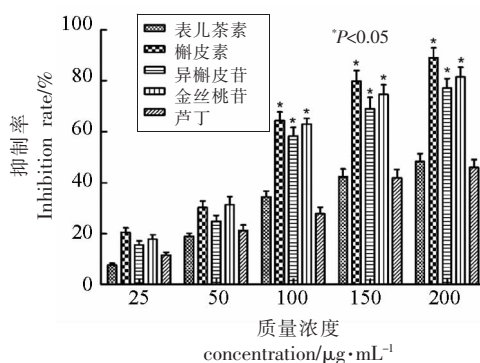
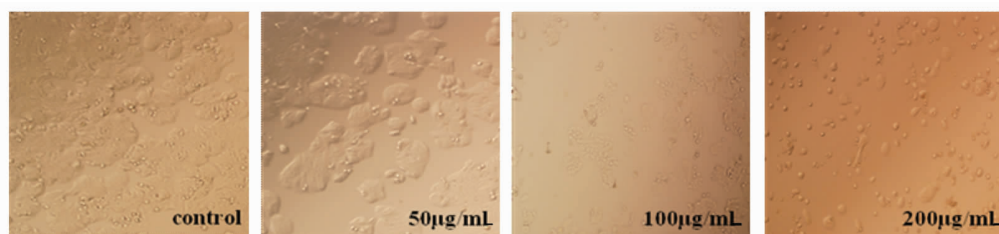


图 5 不同化合物对肠癌细胞 HT-29 的抑制作用

Fig.5 Inhibitory of different ompounds on HT-29 cells

素的抑制率高达 89.09%。油枣中不同黄酮提取物作用于 HT-29 的抑制率,从高到低依次为槲皮素>金丝桃苷>异槲皮苷>表儿茶素>芦丁。由此可见,槲皮素对肠癌细胞 HT-29 抑制效果最佳。不同浓度的槲皮素作用于肠癌细胞 HT-29,48 h 后在电子显微镜下观察细胞,作用效果如图 6 所示。



(a)对照组

(b)不同质量浓度试验组

图 6 槲皮素对肠癌细胞 HT-29 的影响

Fig.6 Effect of Quercetin on HT-29 cells

由图 6 可看出,与对照组相比,随着槲皮素浓度的增加,细胞数目明显减少,细胞间隙增加,细胞缩小、变圆,部分细胞脱落、死亡,不再贴壁,而对照组的肿瘤细胞生长旺盛,几乎铺满培养板底部,贴壁良好。

2.1.4 油枣黄酮类化合物对肺癌细胞 A549 的作用效果 通过 CCK-8 法比较不同浓度的 5 种黄酮类化合物对肺癌细胞 A549 的影响,测定的抑制率如图 7 所示。

如图 7 所示,5 种黄酮类化合物对肺癌细胞 A549 的增殖均有不同程度的抑制作用,且呈明显的量效关系。当用 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 金丝桃苷作用于 A549 时,有一定的抑制作用,抑制率为 17.80%;

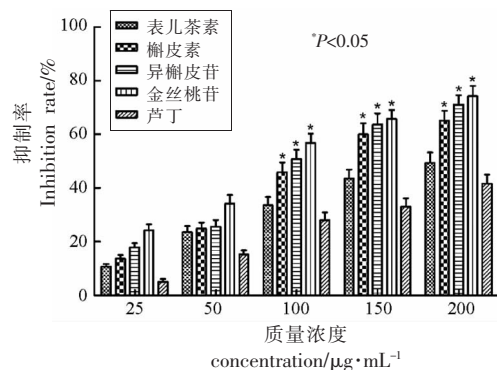


图 7 不同化合物对肺癌细胞 A549 的抑制作用

Fig.7 Inhibitory of different compounds on A549 cells

当金丝桃苷的质量浓度增到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,表现出较强的抑制作用,抑制率为 64.39%;当金丝桃

苷的质量浓度达 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,抑制率达到 81.51%,极大地抑制了 A549 的生长。油枣中不同黄酮提取物作用于 A549 的抑制率从高到低依次为金丝桃苷>异槲皮苷>槲皮素>表儿茶素>芦丁。

由此可见,金丝桃苷对肺癌细胞 A549 抑制效果最佳。不同浓度的金丝桃苷作用于肺癌细胞 A549,48 h 后在电子显微镜下观察细胞,作用效果如图 8 所示。

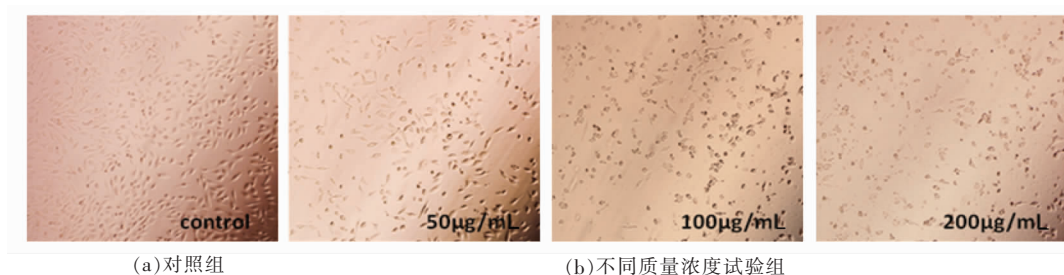


图 8 金丝桃苷对肺癌细胞 A549 的影响

Fig.8 Effect of Hyperoside on A549 cells

由图 8 可看出,与对照组相比,随着金丝桃苷浓度的增加,细胞数目明显减少,细胞间隙增加,细胞缩小,由原来的梭形逐渐变为圆形,部分细胞脱落,不再贴壁,而对照组的肿瘤细胞为梭形,生长旺盛,几乎铺满培养板底部,贴壁良好。

2.2 油枣黄酮类化合物对肿瘤细胞迁移的影响

通过细胞划痕方法来检测油枣黄酮类化合物

对肿瘤细胞迁移的影响。选用抑制效果较明显的槲皮素对 BXPc-3、HT-29、A549 肿瘤细胞进行处理。因 HT-29 细胞和 A549 细胞划痕效果不明显,故不适宜做细胞迁移试验。选用 BXPc-3 做试验,用 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 槲皮素分别作用 0, 12, 24, 48 h, 对其拍照观察,如图 9 所示。

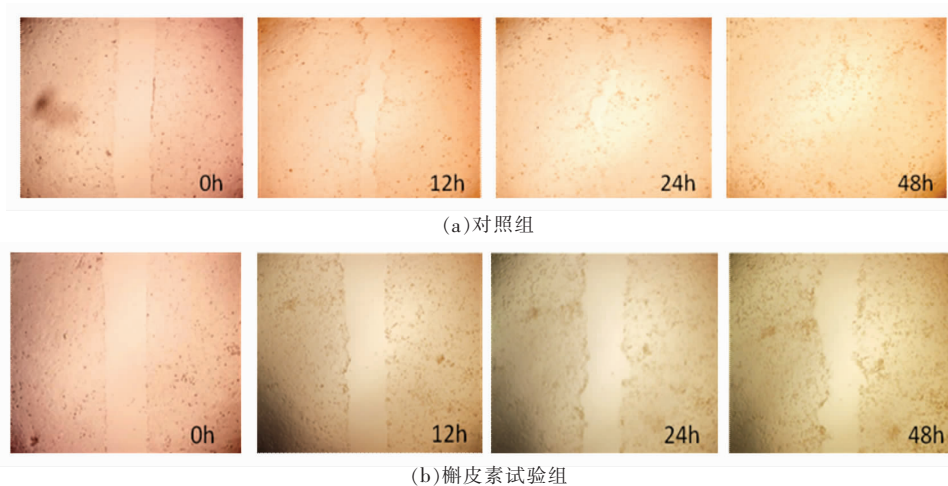


图 9 对照组和槲皮素对胰腺癌细胞 BXPc-3 迁移的影响

Fig.9 Effect of control and quercetin groups on BXPc-3 cells

如图 9a 所示,划痕细胞在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基的刺激下迁移,对照组细胞在加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基后明显地向中央划痕部位迁移,中间部位细胞数目增多,12 h 划痕已缩至 0 h 的三分之一左右,24 h 后基本融合,48 h 时几乎 100%融合。图 9b 所示,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 槲

皮素处理 48 h 后划痕都未明显融合,表明槲皮素明显抑制胰腺癌细胞 BXPc-3 的迁移作用。

2.3 油枣黄酮类化合物对肿瘤细胞凋亡的影响

前期研究表明油枣中提取的槲皮素对肿瘤细胞的抑制作用较为明显,尤其是对胰腺癌细胞 BXPc-3 和肠癌细胞 HT-29。采用 TUNEL 法来研

究槲皮素对肿瘤细胞的凋亡影响。结果表明槲皮素作用于肿瘤细胞 24 h 后,经 TUNEL 染色,均出

现阳性染色细胞。同时随着槲皮素浓度的增加,阳性染色细胞增加,如图 10 所示。

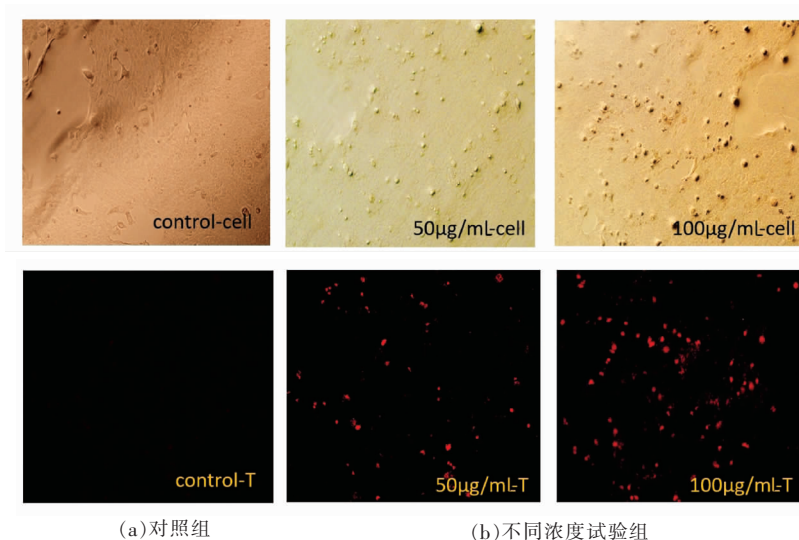


图 10 槲皮素对胰腺癌细胞 BXPC-3 凋亡效果

Fig.10 Effect of Quercetin on BXPC-3 cells

由图 10 可看出,随着槲皮素浓度的增加,细胞增殖活力下降,肿瘤细胞形态改变,细胞核变小,细胞膜皱缩,着色变深,细胞凋亡增加。对照组经 TUNEL 染色后未出现凋亡细胞,而 50 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素作用于 BXPC-3 细胞 24 h 后,经 TUNEL 染色,可以明显看到凋亡细胞。100 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素作用于 BXPC-3 细胞 24 h 后,经 TUNEL 染色,凋亡细胞增加 2 倍,表现有明显的量效关系,说明槲皮素对 BXPC-3 细胞的抑制作用是由细胞凋亡引起的。

3 讨论

研究表明,目前超过一半以上的抗癌药物都是来自或由天然产物合成,自然界中各种植物资源带来了多种化合物的选择,不同的化合物作用机制也不同^[17]。从蔬菜、水果中寻找具有潜在抗癌功效的成分,是近年的研究热点。油枣中丰富的黄酮类物质,不仅可以拓宽枣在功能食品领域的应用范围,而且其黄酮成分具有潜在的协同防治癌症等疾病的可能性,在化疗药物或化疗辅助食品方面亦有可期的应用前景。崔雪琴^[18]研究了枣中含有的多酚单体化合物对 HepG2, A549, MCF-7 以及 HT-29 这 4 种肿瘤细胞的抑制和凋亡作用,

结果表明:蒙胧木酸衍生物、山楂酸衍生物、坡模醇酸、榄仁酸、白桦脂酸和芹菜素对上述肿瘤细胞有显著的抑制和促凋亡作用。而枣中黄酮类单体化合物对肿瘤细胞的抑制作用未见报道。

黄酮类化合物可通过抑制肿瘤细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡,干扰细胞信号传导,调节抑癌基因和癌基因关系等多种途径发挥其抗癌活性^[19-23]。肿瘤细胞迁移是指癌细胞从初始的病灶位点向临近的器官转移的现象,是引起癌症病人死亡的常见原因^[24]。细胞凋亡又称程序性细胞死亡^[25],目前检测细胞凋亡的手段较多,主要包括形态学观察、凝胶电泳及流式细胞仪检测等,其中形态学变化是细胞凋亡的最典型的特征^[26]。黄酮类化合物导致细胞凋亡的原因有:影响突变型 p53 蛋白;阻滞细胞周期;抑制酪氨酸激酶;抑制热休克蛋白;抑制雌激素受体结合能力;抑制 RAS 蛋白表达^[27]。赵欣等^[28]研究发现槲皮素是一个竞争性的基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinases 9, MMP-9),能诱导其降低活性,并导致 MMP-9mRNA, MMP-9 蛋白和 TGF- β 1 蛋白表达降低,进而抑制 A549 细胞。邓晓辉等^[29]发现槲皮素诱导 MCF-7 细胞凋亡并抑制 MCF-7 乳腺癌细胞的增殖,从而抑制了乳腺癌细胞。Teekaraman 等^[30]发现槲皮素诱导线

粒体介导的凋亡途径,从而抑制转移性卵巢癌细胞的生长。本试验中,TUNEL染色观察肿瘤细胞的凋亡试验结果表明,油枣黄酮类化合物对肿瘤细胞的抑制作用是由细胞凋亡引起,而其机理还有待研究。

4 结论

通过细胞增殖试验、细胞迁移试验和细胞凋亡试验,研究油枣中不同黄酮类化合物对肿瘤细胞的抑制作用。细胞增殖试验结果表明:油枣黄酮类化合物对人胚肾细胞 HEK-293 无抑制作用,无毒性,不影响正常细胞生长;对胰腺癌细胞 BXPC-3、肠癌细胞 HT-29、肺癌细胞 A549 均有不同程度的抑制作用;槲皮素对胰腺癌细胞 BXPC-3、肠癌细胞 HT-29 的抑制作用最明显,抑制率分别达到 79.08%和 89.09%;金丝桃苷对肺癌细胞 A549 的抑制作用最明显,抑制率为 74.32%;芦丁对各肿瘤细胞的抑制效果相对较弱,尤其是对胰腺癌细胞 BXPC-3 几乎无抑制效果。细胞迁移试验结果表明:槲皮素对胰腺癌细胞 BXPC-3 有较强的抑制迁移能力,对肠癌细胞 HT-29、肺癌细胞 A549 效果不明显。TUNEL 染色观察肿瘤细胞的凋亡试验结果表明:油枣黄酮类化合物对肿瘤细胞的抑制作用是由细胞凋亡引起的。

参 考 文 献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA—A Cancer Journal For Clinicians*, 2021, 71(3): 209–249.
- [2] 廖月霞. 半枝莲黄酮活性成分双向调节肿瘤免疫作用及机制[D]. 扬州: 扬州大学, 2014.
LIAO Y X. A Biphasic concentration–response effect of the flavonoids from *scutellaria barbara* in regulating tumor immune and its potential mechanism[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2014.
- [3] YEN S C, CHEN L C, HUANG H L, et al. Investigation of selected flavonoid derivatives as potent FLT3 inhibitors for the potential treatment of acute myeloid leukemia[J]. *J Nat Prod*, 2021, 84(1): 1–10.
- [4] 焦岩. 大果沙棘黄酮分离纯化及生物活性研究[D]. 沈阳: 东北林业大学, 2010.
JIAO Y. Studies on separation, purification and bioactivity of flavonoids from seabuckthorn[D]. Shenyang: Northeast Forestry University, 2010.
- [5] DZUBAK P, HAJDUCH M, VYDRA D, et al. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications[J]. *Natural Product Reports*, 2006, 23(3): 394–411.
- [6] 陈琼. 枣主要功能因子综合评价及抗氧化、抑肿瘤活性成分鉴定[D]. 天津: 天津大学, 2015.
CHEN Q. Comprehensive evaluation of the main functional factors and identification of the antioxidant and tumor–inhibition compounds in Jujube[D]. Tianjin: Tianjin University, 2015.
- [7] NASO L G, VR MARTÍNEZ, FERRER E G, et al. Antimetastatic effects of VOflavonoid complexes on A549 cell line [J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2021, 64(79): 126690.
- [8] TERRY P, GIOVANNUCCI E, MICHELS K B, et al. Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(7): 525–533.
- [9] MICHELS K B, EDWARD G, JOSHIPURA K J, et al. Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(21): 1740–1752.
- [10] 李湘洲, 栾芳菲, 张胜. 黄酮类化合物的抗肿瘤和抗血管生成作用研究进展[J]. *食品与机械*, 2016, 32(1): 199–201.
LI X Z, LUAN F F, ZHANG S. Antitumor and antiangiogenic effects of flavonoid[J]. *Food and Machinery*, 2016, 32(1): 199–201.
- [11] 胡迎芬. 冬枣黄酮的提取分离及抗氧化、抑瘤活性研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2009.
HU Y F. The extraction and separation of flavone in Dongzao jujube as well as the study of their anti-oxidation and anti-tumor activities[D]. Qingdao: Qingdao University, 2009.
- [12] EBRAHIMI S, MOLLAEI H, HOSHYAR R. Ziziphus Jujube;a review study of its anticancer effects in various tumor models invitro and invivo[J]. *Cellular and Molecular Biology*, 2017, 63(10): 122–127.
- [13] LIANG Q, WANG X Y, YANG S et al. Character-

- ization of the antioxidative polysaccharides from *Ziziphus jujube* cv. Goutouzao and its tumor-inhibitory effects on human colorectal carcinoma LoVo cells via immunocyte activation[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44(11): 13462.
- [14] CHOI S H, AHN J B, KIM H J, et al. Changes in free amino acid, protein, and flavonoid content in Jujube (*Ziziphus jujube*) fruit during eight stages of growth and antioxidative and cancer cell inhibitory effects by extracts[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2012, 60(41): 10245-10255.
- [15] QIN S, WEI Z, LIU S, et al. Icariin stimulates the proliferation of rat bone mesenchymal stem cells via ERK and p38 MAPK signaling[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015, 8(5): 7125-7133.
- [16] 赵亚蕊, 曹鹏程, 赵峰梅, 等. 重组 TRAIL (114-281)片段的表达纯化及抗肿瘤活性分析[J]. *山西师范大学学报(自然科学版)*, 2018, 32(1): 53-56.
- ZHAO Y R, CAO P C, ZHAO F M, et al. Expression and purification of recombinant TRAIL (114-281) and the detection of its antitumor activity[J]. *Journal of Shanxi Normal University (Natural Science Edition)*, 2018, 32(1): 53-56.
- [17] 张九凯. 瓯柑和胡柚果实黄酮类化合物组分鉴定、分离纯化及生物活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- ZHANG J K. Determination and purification of flavonoids from *Citrus reticulata* CV. *Suavissima* and *Citrus changshanensis* fruit and their bioactivity evaluation[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.
- [18] 崔雪琴. 红枣和枣叶中化学成分分析及生物活性研究[D]. 西安: 西北大学, 2017.
- CUI X Q. Study on chemical component analysis and biological activity of *Z. jujuba* fruits and leaves [D]. Xian: Northwest University, 2017.
- [19] 王学军. 系列黄酮类化合物的合成以及生物活性评价[D]. 西安: 西北大学, 2012.
- WANG X J. Synthesis and bioactivity evaluation of a series of flavonoids[D]. Xian: Northwest University, 2012.
- [20] BATRA P, SHARMA A K. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives[J]. *Biotech*, 2013, 3(6): 439-459.
- [21] 袁亚娜. 冬枣黄酮类提取、纯化及其抗氧化性能的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.
- YUAN Y N. Study on extraction, purification, antioxidant properties of flavonoids from Winter Jujube [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2013.
- [22] 曹良启. 蛇葡萄素对人早幼粒细胞白血病细胞生长抑制作用及其机制的研究[D]. 广州: 中山大学, 2005.
- CAO L Q. Effect of human promyelocytic leukemia cells growth inhibition by ampelopsin and the research of its mechanism[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2005.
- [23] 侯娟娟. 蛇葡萄素对 HepG2 和 K562 细胞生长抑制和凋亡作用的研究[D]. 广州: 中山大学, 2005.
- HOU J J. The research of HepG2 and K562 cells growth inhibition and apoptosis effect by ampelopsin [D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2005.
- [24] 曹良启, 王晓黎, 刘德育. 黄酮类化合物诱导肿瘤细胞凋亡的研究进展[J]. *中药材*, 2004, 27(10): 785-788.
- CAO L Q, WANG X L, LIU D Y. Research progress of flavonoids inducing tumor cell apoptosis [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2004, 27(10): 785-788.
- [25] 张志国. 冬枣核类黄酮的提取工艺研究及其生物功能初探[D]. 西安: 陕西师范大学, 2006.
- ZHANG Z G. Extraction of flavonoids from Winter-jujube stone and preliminary exploration of its biological function[D]. Xian: Shaanxi Normal University, 2016.
- [26] 林文翰, 陈学军, 郎伟军, 等. 多糖抗肿瘤作用及相关机制研究[J]. *哈尔滨商业大学学报(自然科学版)*, 2019, 35(5): 534-538.
- LIN W H, CHEN X J, LANG W J, et al. Advances in anti-tumor effects and related mechanisms of polysaccharides[J]. *Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition)*, 2019, 35(5): 534-538.
- [27] KUMAR S, PANDEY A K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview[J]. *The Scientific World Journal*, 2013, 2013: 162750.
- [28] 赵欣, 张健. 槲皮素抑制肺癌肿瘤细胞的生长和转移的机制[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2015, 40(6): 592-597.
- ZHAO X, ZHANG J. Mechanisms for quercetin in prevention of lung cancer cell growth and metastasis [J]. *Journal of Central South University (Medical Science)*, 2015, 40(6): 592-597.
- [29] DENG X H, SONG H Y, ZHOU Y F, et al. Ef-

fects of quercetin on the proliferation of breast cancer cells and expression of survivin *in vitro*[J]. *Experimental & Therapeutic Medicine*, 2013, 6(5): 1155-1158.

[30] TEEKARAMAN D, ELAYAPILLAI S P, VISWANATHAN M P, et al. Quercetin inhibits human

metastatic ovarian cancer cell growth by modulating intrinsic apoptotic pathway in PA-1 cell line [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2019, 300: 91-100.

Studies on the Anti-tumor Activity of Flavonoids from Youzao Jujube

Wang Zhengzheng^{1,2}, Zhao Yi², Pan Weiwei², Zhao Yaru², Zhang Huixia³, Wang Rufu^{3*}

¹College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030800, Shanxi

²Shanxi Biological Research Institute Co., Ltd, Taiyuan 030006

³College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030800, Shanxi)

Abstract In this paper, the anti-tumor activities of different flavonoids from Youzao jujube were studied by cell proliferation, cell migration and cell apoptosis. All five flavonoids had inhibitory effect on cell growth of pancreatic cancer cell BXPC-3, colon cancer cell HT-29 and lung adenocarcinoma cell A549. Among the flavonoids, Quercetin had the most obvious inhibitory effect on BXPC-3 and HT-29, with inhibition rates 79.08% and 89.09%, respectively. Hyperoside had the most obvious inhibitory effect on A549, and the inhibitory rate was 74.32%. Quercetin had a strong inhibition on migration of BXPC-3, but no obvious effect on HT-29 and A549. TUNEL staining was used to access cell apoptosis. Results suggest that the inhibitory effect of flavonoids of Youzao jujube may be mediated by cell apoptosis.

Keywords Youzao jujube; flavonoid; anti-tumor activity