

## 茶黄素的分离纯化及 TFDG 对肝癌和结肠腺癌细胞的抑制作用

卓允允, 蔡为荣\*, 汪玉玲, 王晴晴  
(安徽工程大学 安徽芜湖 241000)

**摘要** 茶黄素是红茶的优质成分,具有良好的保健功能。本文通过高速逆流色谱(HSCCC)分离技术批量提取茶黄素(TFs),选择茶黄素-3,3'-没食子酸酯(TFDG)研究其对肝癌细胞(HepG-2)、结肠腺癌细胞(Caco-2)的作用。HSCCC 分离制备得到 6 个组分,通过高效液相(HPLC)检测,可确定组分 F4 中含有茶黄素(TF),F5 含有茶黄素-3-没食子酸酯(TF-3-G)和茶黄素-3'-没食子酸酯(TF-3'-G),F6 中含有茶黄素-3,3'-没食子酸酯(TFDG)。选择 TFDG 研究对癌细胞的抑制作用,CCK-8 法检测其对 HepG-2 和 Caco-2 的作用,发现 TFDG 随着浓度的增大,时间的延长,对 HepG-2 和 Caco-2 细胞有明显的抑制作用,且呈时间和剂量依赖性。本文从分配系数  $K$  和分离因子  $\alpha$  研究筛选出可大批量制备茶黄素的溶剂系统。有研究证实癌症的预防和醌还原酶(QR)存在某种关系,将试验数据和理论联合,采用分子对接技术验证 TFDG 和 QR 能够形成稳定的络合物,诱导 QR 的活性,可以增强抗癌效果,研究结果为以后深入研究茶黄素对癌细胞的作用提供参考。

**关键词** 高速逆流色谱; 肝癌细胞; 结肠腺癌细胞; 分子对接

**文章编号** 1009-7848(2024)06-0107-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.06.010

茶黄素为红茶茶色素的主要成分,由茶多酚氧化形成的具有多个羟基或酚羟基的苯并卓酚酮化合物。茶黄素(Theaflavin,TF)、茶黄素-3-没食子酸酯(Theaflavin-3-gallate, TF-3-G)、茶黄素-3'-没食子酸酯(Theaflavin-3'-gallate, TF-3'-G)和茶黄素-3,3'-双没食子酸酯(Theaflavin-3,3'-gallate, TFDG)是红茶中发现的 4 种主要茶黄素衍生物,红茶中的 TFs 总含量在 0.3%~1.5%<sup>[1]</sup>。茶黄素还有多种药理功能与保健功效<sup>[2]</sup>,如降血压<sup>[3]</sup>、降血脂<sup>[4]</sup>、抗氧化<sup>[5]</sup>、抗肿瘤<sup>[6]</sup>、保护骨骼健康等<sup>[7]</sup>。目前茶黄素的分离纯化主要采用聚酰胺树脂洗脱、大孔吸附树脂分离和高速逆流分离纯化。HSCCC 是一种独特的液-液分配色谱法,使用液体固定相和无固体支撑,且不可逆吸附,样品变性风险低,总回收率高,负载量大,成本低。HSCCC 被报道多用于黄酮类物质的分离,本研究通过分析 HSCCC 的溶剂系统来确定茶黄素的分离条件。

茶黄素通过预防肿瘤的产生,诱导肿瘤细胞凋亡等多种方式来预防、减轻乃至抑制肿瘤细胞增殖。众多研究发现茶黄素在抗癌方面效果显著<sup>[8-9]</sup>。而茶黄素对 HepG-2 和 Caco-2 细胞的影

响,研究甚少。Gao 等<sup>[10]</sup>研究了 TF 对卵巢癌细胞凋亡的影响,发现 TF 能够促进卵巢癌细胞的凋亡;Bhattacharya 等<sup>[11]</sup>研究了茶黄素在结肠癌细胞系(HCT-116)和 EAC 诱导的小鼠实体瘤中的作用,研究发现低剂量的茶黄素可以抑制 HCT-116 细胞的增殖。目前 TFDG 对癌细胞的作用效果报道较少,研究 TFDG 对 HepG-2 和 Caco-2 细胞具有一定的现实意义。

醌还原酶(QR)是一种细胞质黄蛋白,可催化醌类的双电子还原成稳定的对苯二酚类,从而抑制有毒半醌自由基的形成,这些半醌自由基易于自氧化产生超氧阴离子自由基。Prester 等<sup>[12]</sup>提出,一些膳食抗癌药可能通过打破致癌物,激活 I 期酶和 II 期解毒酶之间的平衡来抑制致癌物的激活。其中 QR 就是其中的一种食物因子,它可能对外源生物介导的细胞损伤起保护作用,从而保护正常细胞,防止产生癌变。

分子对接广泛应用于结构分子生物学和药物发现,是识别配体-蛋白质复合物结合模式或作用力的有用技术。蛋白质和配体相互作用的重要标准主要是结合能,最低结合能被认为更稳定<sup>[13]</sup>。本研究借用分子对接来研究 QR 和 TFDG 的相互作用和结合模式,观察 QR 和 TFDG 之间是否形成稳定的配合物,中间存在哪些相互作用。王佐等<sup>[14]</sup>通过提取、分离纯化得到的冬凌草甲素,在酶活性

收稿日期: 2023-06-17

基金项目: 安徽省重点研发项目(202004a06020022)

第一作者: 卓允允,女,硕士生

通信作者: 蔡为荣 E-mail: 422868828@qq.com

水平上和基因转录、翻译水平上诱导 QR 活性显著倍增,从而增强冬凌草甲素的抗癌活性。侯磊<sup>[15]</sup>对醛糖还原酶和 HCV NS5B 聚合酶抑制剂的研究中,在 3D-QSAR 和对接分析的基础上总结调控规律,设计一些新的抑制剂具有较高活性,为试验工作者提供了理论参考。以上研究表明,分子对接结果能够了解物质间的相互作用力,并更好地理解其催化机理,验证试验结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

茶黄素粗品(实验室自提)。乙腈(色谱纯), NaHCO<sub>3</sub>、甲醇、三氯甲烷、乙酸乙酯、正己烷(均为分析纯),冰醋酸(优级纯),以上试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。茶黄素(TF)、茶黄素-3-没食子酸酯(TF-3-G)、茶黄素-3'-没食子酸酯(TF-3'-G)、茶黄素-3,3'-没食子酸酯(TFDG),均为标准品,纯度均大于 96%,购自上海同田生物技术有限公司)。96 孔板(细胞级)、高糖 DMEM、南美胎牛血清、二甲基亚砜(DMSO)、PBS、胰蛋白酶、青霉素-链霉素抗体,均购自无锡芦中润生物科技有限公司。CCK-8 检测试剂盒购自 Biosharp。肝癌细胞(HepG-2)、结肠腺癌细胞(Caco-2),均购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。

### 1.2 主要仪器与设备

半制备型高速逆流色谱仪(TBE-300B),上海同田生物技术有限公司;半制备高效液相色谱仪(1525),美国 Waters 公司;倒置荧光显微镜(XDY-200),上海上光新光学科技有限公司;真空冷冻干燥机,松源华兴科技发展有限公司;微孔滤膜;酶标仪(Multiskan FC),赛默飞世尔仪器有限公司;恒温培养箱(WJ-80B-II),上海圣科仪器设

备有限公司;超净台(SW-CJ-2F),安徽杰克欧德实验室设备有限公司;离心机(TG16B),盐城市凯特实验仪器有限公司;灭菌锅(LS-35HD),江阴滨江医疗设备有限公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 茶黄素粗品的制备 参考杨子银等<sup>[16]</sup>的文献对茶黄素粗分进行热水浸提(75 °C, 10 min),离心(3 500 r/min, 10 min),依次进行乙酸乙酯、氯仿、2.5% NaHCO<sub>3</sub> 水溶液萃取,冷冻干燥后得到茶黄素组分,纯度在 40%左右。

1.3.2 高速逆流(HSCCC)分离纯化 根据茶黄素萃取条件,溶剂体系的条件从乙酸乙酯-甲醇-水-正己烷-冰醋酸中筛选,调整各组成溶剂比。采用 HPLC 测定 HSCCC 各体系萃取后分层上、下相的峰面积,根据现有条件和溶剂体系极性的相关文献[17-21]选取各溶剂体系。按式(1)和(2)计算目标组分的分配系数  $K$  和分离因子  $\alpha$ ,  $K$  值的范围在 0.5 到 2 之间是最合适的 HSCCC 溶剂系统。

$$K = \frac{S_{\text{上}}}{S_{\text{下}}} \quad (1)$$

$$\alpha = \frac{K_i}{K_j} \quad K_i \geq K_j \quad (2)$$

式中: $S_{\text{上}}$ 为测得的目标组分在上相中的峰面积; $S_{\text{下}}$ 为测得的目标组分在下相中的峰面积; $K_i$ 和  $K_j$ 分别为不同组分在溶剂体系中的分配系数。

1.3.3 HPLC 条件的选择 准确称取 1.3.1 节 HSCCC 分离得到的各目标组分,用乙腈溶解配成 1 mg/mL 样品溶液,并配制 1 mg/mL 的 4 种单体标准溶液,过 0.45  $\mu\text{m}$  有机滤膜,用于 HPLC 法定性和定量分析,得到标准品 HPLC 图,如图 1 所示。根据保留时间,结合在各组分中添加微量标准品,观察峰面积变化,鉴定样品成分。将样品峰面积代入标准曲线公式计算样品纯度<sup>[22]</sup>。

表 1 标准曲线结果

Table 1 Standard curve results

茶黄素	标准曲线	决定系数	线性范围/(mg/mL)
TF	$y = 3\ 475x - 148.09$	0.9996	0.02~1
TF-3-G	$y = 3\ 801x - 230.36$	0.9935	0.02~1
TF-3'-G	$y = 3\ 729x - 134.12$	0.9996	0.02~1
TF-3-3'-G	$y = 3\ 130x - 177.75$	0.9990	0.02~1

参考费璠等<sup>[23]</sup>的色谱条件并稍作改动,即色谱条件:Sun Fire® C18柱(150 mm×4.6 mm,5 μm)。流动相A为0.1%甲酸乙腈,流动相B为0.1%甲酸水。线性梯度洗脱程序:0~20 min,30%~35% A;20~25 min,35%~37% A;25~30 min,37%~10% A。流速:1 mL/min;检测波长:280 nm;柱温:30 °C;进样量:20 μL。

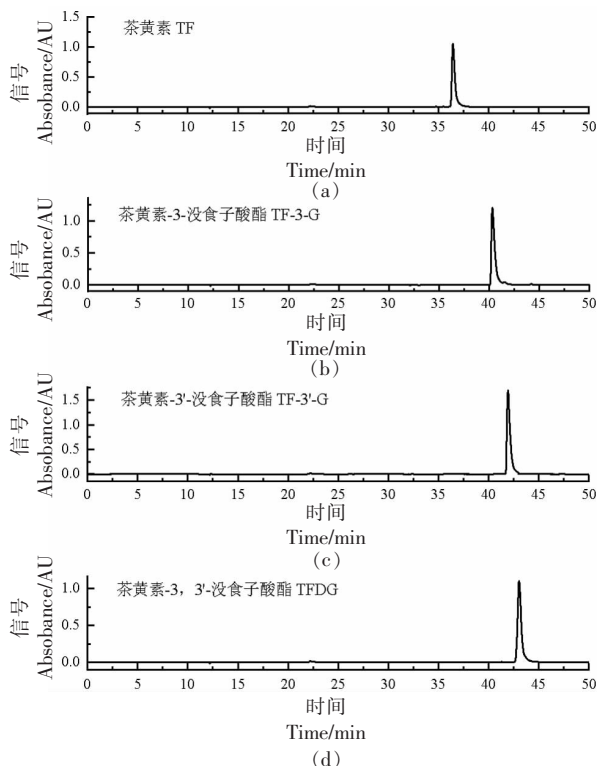


图1 标准品 HPLC 图

Fig.1 HPLC diagram of standard

**1.3.4 细胞的培养与传代** DMEM 完全培养基配制:含有 10%FBS 和 1%双抗,HepG-2 和 Caco-2 细胞培养条件:DMEM 完全培养基,恒温培养箱保持恒湿,37 °C 和 5% CO<sub>2</sub>。细胞每隔两天传代 1 次,传代时要求细胞密度长到 80%以上,PBS 清洗细胞,HepG-2 细胞胰酶消化 3 min,Caco-2 细胞胰酶消化 6 min。加入培养基终止消化,细胞经吹打吸取至离心管中,离心(800 r/min,5 min)。离心结束弃上清液,加入培养基,吹打之后分装至培养皿,加入新的培养基,传代完成。

**1.3.5 CCK-8 法检测细胞增殖<sup>[24]</sup>** 细胞培养至对数期,胰蛋白酶消化,HepG-2 细胞以每孔 2×10<sup>3</sup> 个接种于 96 孔板中,Caco-2 细胞以每孔 8×10<sup>3</sup>

个接种于 96 孔板中,每孔体积约 100 μL。配制 1 mg/mL 的 TFDG 药物溶液 3 mL,稀释至培养至质量浓度 100,80,60,40,20,10,8,6,4,2 μg/mL 各 1 mL。细胞培养 24 h 后,将 HepG-2 细胞和 Caco-2 细胞依次加入稀释之后的药物浓度梯度,两种细胞每种浓度处理均按 24,36,48 h 处理时间梯度,3 个重复平行处理培养。培养至预设时间,每孔加入 10 μL 的 CCK-8。继续在培养箱培养,每隔半个小时观察 1 次颜色变化,3 h 后颜色发生明显变化。用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度。根据公式(1)计算细胞抑制率:

$$\text{细胞抑制率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{实验组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}} \times 100 \quad (1)$$

试验组:添加细胞、培养基、CCK-8 溶液和药物溶液的孔的吸光值;对照组:添加细胞、培养基、CCK-8 溶液,没有药物溶液的孔的吸光值;空白组:添加培养基、CCK-8 溶液,没有细胞的孔的吸光值。

**1.3.6 分子对接研究** 醌还原酶的结构从 RCSB 蛋白质数据库(<http://www.rcsb.org/pdb>)下载。对接之前,利用 PyMOL 优化醌还原酶并删除醌还原酶中的水分子和其它配体。为了避免不必要的计算,选择保留结构的 A 链<sup>[25]</sup>。使用 Auto Dock4.2 对接软件对醌还原酶和 TFDG 之间可能的结合位点进行研究。然后,根据分子对接结果,选择对接能量最低(得分最高)的结合位姿作为最合适的结合模型。之后,使用 PyMOL 软件对分子对接结果进行可视化和分析。最后,为获得详细的蛋白质-配体相互作用,通过 Discovery Studio 2021 Client 软件生成醌还原酶与 TFDG 活性位点的二维图片<sup>[26]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 HSCCC 溶剂系统的选择条件

参照茶黄素粗体物的 HPLC 色谱图(图 2),结合茶黄素标准品出峰时间,选取和标准品出峰时间接近的物质组分作为分析组分,选取如图 2 所标示的 4 个色谱峰。

按照 1.3.2 节用高效液相色谱测定,计算选定 4 个色谱峰的分配系数  $K$  和分离因子  $\alpha$ ,结合 Wang 等<sup>[27]</sup>研究条件,见表 2。根据所得数据,结合

具体分离效果,当溶剂体系对不同组分的分配系数  $K$  接近 1,分离因子  $\alpha$  接近 1.5 时,选取乙酸乙酯-正己烷-甲醇-水-冰醋酸(体积比 5:1:1:5:

0.25)作为分离茶黄素的 HSCCC 溶剂体系,得到较优的结果。此次分离结果可为后续提高茶黄素的分离效率提供借鉴。

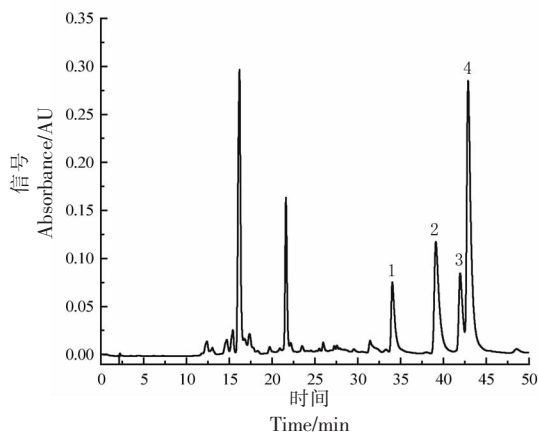


图2 茶黄素粗提物 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of theaflavin crude extract

表2 不同溶剂体系中 6 个目标组分的分配系数和分离因子

Table 2 Partition coefficient and resolution of six target components in different solvent systems

溶剂系统	$K_1$	$K_2$	$K_3$	$K_4$	$\alpha_{12}$	$\alpha_{34}$
乙酸乙酯:正己烷:甲醇:水:冰醋酸(体积比 5:1:1:5:0.25)	0.647	1.162	0.754	1.063	1.795	1.410
乙酸乙酯:正己烷:甲醇:水(体积比 5:1:1:5)	0.457	0.870	0.851	0.654	1.904	0.768
乙酸乙酯:正己烷:甲醇:水(体积比 3:1:1:6)	0.647	1.167	0.879	1.101	1.804	1.253
乙酸乙酯:正己烷:甲醇:水:冰醋酸(体积比 3:1:6:1:0.25)	0.546	1.301	0.633	1.108	2.382	1.750

## 2.2 HSCCC 分离制备结果

经分离萃取得到的茶黄素组分,再经过 HSCCC 分离技术条件:选择分离体系乙酸乙酯:正己烷:水:甲醇:冰醋酸(体积比 5:1:5:1:0.25),增加上样量至 200 mg,转速提升至 750 r/min。可得 HSCCC 分离效果图 3,根据分离结果计算质量和得率分别为 F1(36.5 mg, 18.25%)、F2(25.45 mg, 25.45%)、F3(10.5 mg, 5.25%)、F4(28.3 mg, 14.15%)、F5(29.75 mg, 14.85%)、F6(37.6 mg, 18.80%)。

## 2.3 HPLC 分析结果

对茶黄素 HSCCC 分离所得的 6 个组分(F1、F2、F3、F4、F5、F6)进行高效液相色谱检测,其结果如图 4 所示。与茶黄素单体的保留时间标品进行对比可知,F1、F2、F3 中的主要物质是儿茶素类物质,而 F4、F5、F6 中含有茶黄素的 4 个单体物质。通过标准曲线对这 3 个组分中目标物质进行纯度计算,得出结果 F4 中 1 是茶黄素 TF(23.11%); F5 中 2 是茶黄素-3-没食子酸酯 TF-3-G(50.68%),3 是茶黄素-3'-没食子酸酯 TF-3'-G

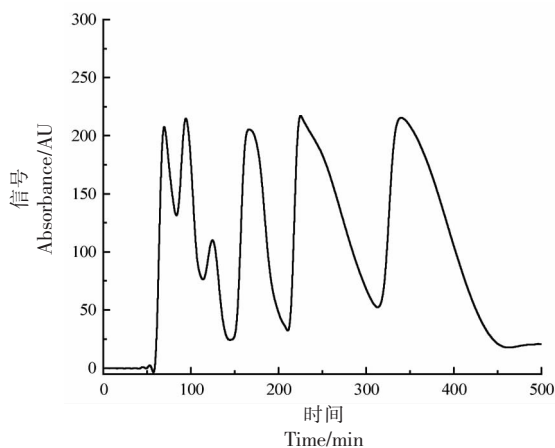


图3 HSCCC 分离茶黄素色谱图

Fig.3 Chromatogram of theaflavins separated by HSCCC

(36.35%); F6 中 4 是茶黄素-3,3'-没食子酸酯 TFDG(89.68%)。对上述 3 个组分分别进行细胞实验的预实验,结果发现 TFDG 的抑制效果最好。茶黄素经 HSCCC 分离后纯度达到理想效果,得到的 TFDG 可进一步做细胞试验。

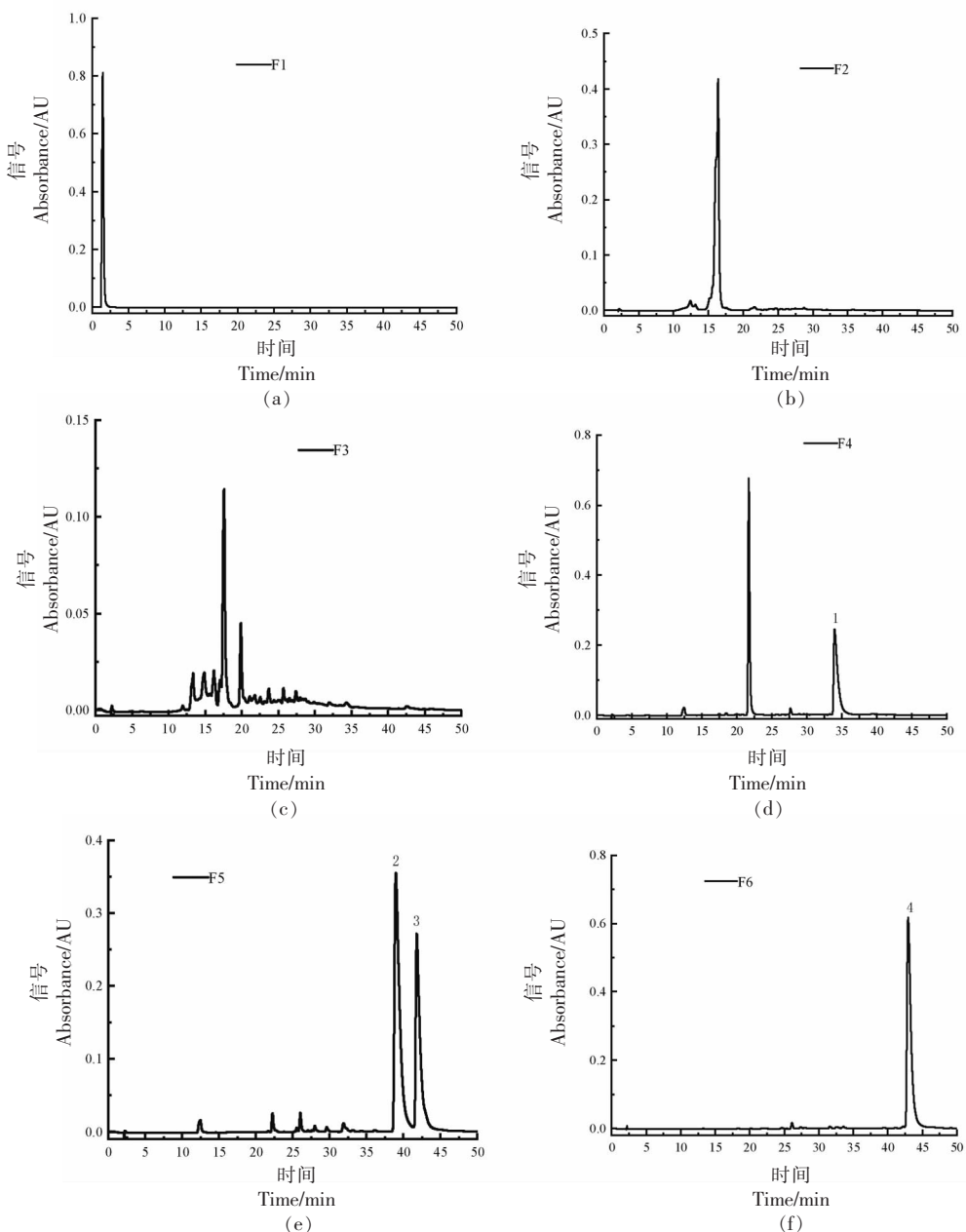


图 4 茶黄素 HSCCC 分离纯化的各组分的 HPLC 图

Fig.4 HPLC diagram of components separated and purified by theaflavin HSCCC

2.4 CCK-8 对细胞的抑制率

Lu 等<sup>[28]</sup>总结了茶黄素对 WI38 人细胞(WI38VA)和 Caco-2 结肠癌细胞细胞生长、凋亡和基因表达的影响,结果表明茶黄素对癌细胞有抑制作用,对正常细胞不会造成影响。而通过 CCK-8 数据来看,用 TFDG 对 Caco-2 和 HepG-2 细胞处理后,细胞增值率明显降低,并呈时间和剂量依赖方式。表 3 列出了 TFDG 处理不同时间的 Caco-2 和 HepG-2

表 3 TFDG 作用下 HepG-2 细胞和 Caco-2 不同时间的 IC<sub>50</sub>

Table 3 IC<sub>50</sub> of HepG-2 cells and Caco-2 cells at different times under the action of TFDG

	24 h	36 h	48 h
HepG-2	7.46 ± 0.87	16.51 ± 1.22	69.99 ± 1.85
Caco-2	55.88 ± 1.75	31.31 ± 1.50	16.47 ± 1.22

细胞中获得的  $IC_{50}$  值, Caco-2 和 HepG-2 细胞在经过不同质量浓度的 TFDG 试剂处理 48 h 之后, TFDG 质量浓度分别在 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$

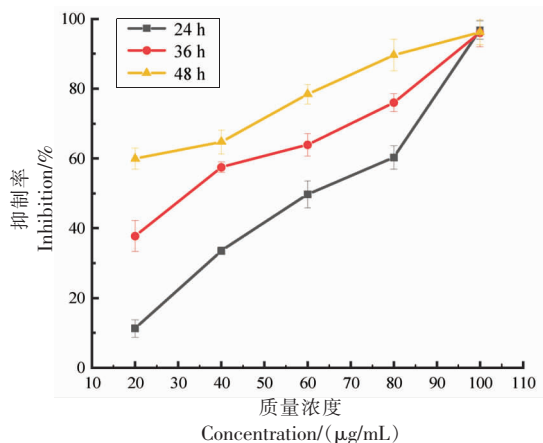


图5 TFDG 对 Caco-2 细胞的抑制率

Fig.5 Inhibition rate of TFDG on Caco-2 cells

## 2.5 分子对接结果

Hashimoto 等<sup>[29]</sup>研究表明, HepG-2 细胞和 QR 的活性存在某些联系, HepG2 细胞可作为检测食品衍生物中 QR 诱导因子的有用工具。由于 QR 催化的反应底物广泛, 对诱导剂良好的响应性, 因此其活性被认为是癌症预防的重要指标, 被广泛用作筛选诱导醌还原酶活性物质的标记物<sup>[30-31]</sup>。根据 2.3 节结果, TFDG 在一定浓度范围可以抑制 Caco-2 和 HepG-2 细胞的增殖, 说明 TFDG 和 QR 的活性之间存在一定关系。

使用分子对接技术研究 TFDG 和 QR<sup>[32]</sup>的相互作用。对 TFDG 和醌还原酶系统执行 A. to dock 4.2, 选择最优的对接效果, 最低结合能只有  $-22.55 \text{ kJ}/\text{mol}$ , 证明 TFDG 与 QR 形成的络合物较稳定。如图 7 中 QR 和 TFDG 的对接结果显示, 其中 A 图显示, QR 被表示成一个卡通, TFDG 被表示为棒状, 通过放大局部图可以看出, TFDG 被捆绑在 QR 周围。观察 B 图, 是将 QR 展示成球面, TFDG (棒状表示) 能够稳定在 QR 的活性位点上方, 形成一个口袋, 包裹在 QR 内部。插图则是口袋的特写示意图。

C 图显示 TFDG 和 QR 中几种活性键能的相互作用, 其中通过氢键相接的有亮氨酸 (LEU)、酪氨酸 (TYR)、苏氨酸 (THR)、组氨酸 (HIS)、异亮氨

时, 癌细胞抑制率达 90% 以上。以上数据可以看出 TFDG 具有明显的抑癌效果, 可诱导癌细胞凋亡。

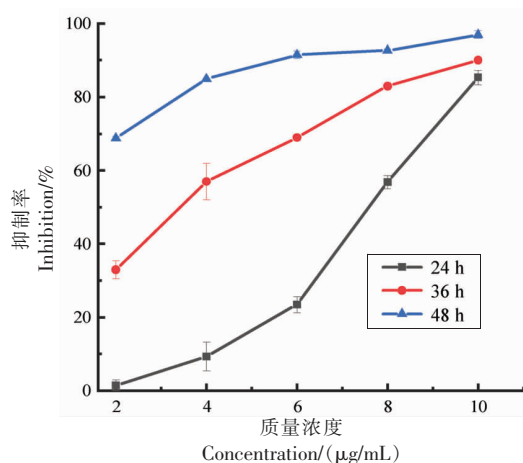


图6 TFDG 对 HepG-2 细胞的抑制率

Fig.6 Inhibition rate of TFDG on HepG-2 cells

酸 (ILE)。碳氢键相互作用的有组氨酸 (HIS)、甘氨酸 (GLY)、苏氨酸 (THR)。其中, 起主要作用的还是相互链接的氢键。

## 3 结论

本文从茶黄素粗分中提取茶黄素单体, 采用 HPLC 计算分离系数  $K$  和分离度  $\alpha$ , 筛选出合适 HSCCC 的溶剂条件。通过 HSCCC 分离可得到 6 个组分, 计算得率为 F1 (36.5 mg, 18.25%)、F2 (25.45 mg, 25.45%)、F3 (10.5 mg, 5.25%)、F4 (28.3 mg, 14.15%)、F5 (29.75 mg, 14.85%)、F6 (37.6 mg, 18.80%)。由此可考虑大批量制备茶黄素。与标品的保留时间作对比, 带入标准曲线公式, 计算出纯度为 F4 中 TF (23.11%), F5 中 TF-3-G (50.68%)、TF-3'-G (36.35%), F6 中茶 TFDG (89.68%)。HSCCC 分离技术分离纯化茶黄素可被广泛推荐, HPLC 技术研究分离系数  $K$  和分离度  $\alpha$ , 可帮助研究者快速筛选出合适 HSCCC 的溶剂体系, 缩短试验时间。通过采取不同质量浓度的 TFDG 处理 HepG-2 和 Caco-2 细胞, 并且在同一浓度 TFDG 不同处理时间下观察 HepG-2 和 Caco-2 细胞的存活率, 发现在质量浓度分别在 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 处理时间 48 h, CCK-8 处理两种细胞, 癌细胞的抑制率可达 90% 以上, 说明

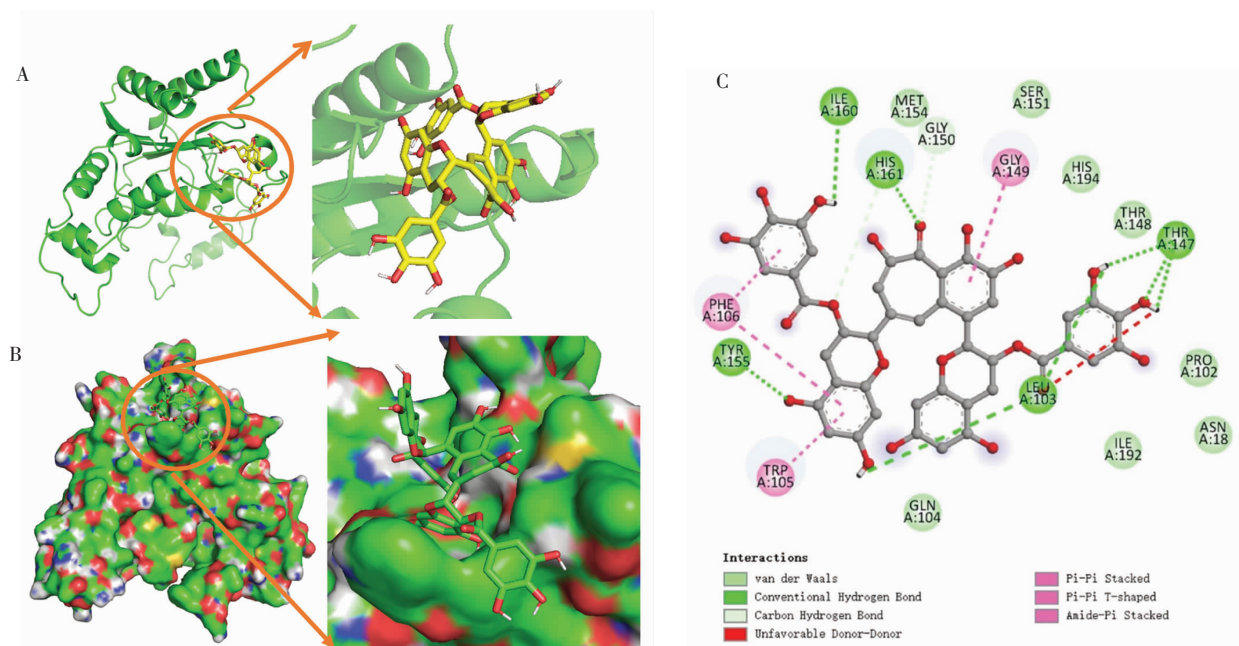


图 7 QR 与 TFDG 分子对接效果图

Fig.7 Docking effect of Quinone reductase and TFDG

TFDG 对部分癌细胞具有一定的抑制增殖作用。基于 QR 的活性被认为是化学预防癌症的重要指标,因此从天然植物中筛选较强的诱导 QR 活性组分,对癌症化学预防具有重要意义。用 Auto dock 4.2 执行 QR 和 TFDG 的对接,选择结合能最低的结合物,分子对接初步验证 TFDG 与 QR 能够形成络合物,且 TFDG 能够稳定连接在 QR 的活性位点上方,在一定程度上诱导 QR 的活性,增强抗癌效果。与试验结果相符合,从而验证茶 TFDG 抑制 HepG-2 和 Caco-2 细胞增殖与 QR 之间存在一定的关系,研究结果为以后深入研究茶黄素的抗癌作用提供借鉴。根据以上结论,可有针对设计相关的抗癌药物,增强药物抗癌效果。

### 参 考 文 献

- [1] 王洪新, 孙军涛, 吕文平, 等. 茶黄素的制备、分析、分离及功能活性研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(1): 12-19.  
WANG H X, SUN J T, LÜ W P, et al. Research progress in preparation, analysis, separation and functional activity of theaflavins [J]. Journal of Food and Biotechnology, 2011, 30(1): 12-19.
- [2] 刘伟, 周洁, 龚正礼, 等. 茶黄素的功能活性研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 386-391.  
LIU W, ZHOU J, GONG Z L, et al. Research progress on the functional activities of theaflavins [J]. Food Science, 2013, 34(11): 386-391.
- [3] WU Y H, KURAJI R, TAYA Y, et al. Effects of theaflavins on tissue inflammation and bone resorption on experimental periodontitis in rats [J]. Journal of Periodontal Research, 2018, 53(6): 1009-1019.
- [4] TANAKA Y, KIRITA M, MIYATA S, et al. O-methylated theaflavins suppress the intracellular accumulation of triglycerides from terminally differentiated human visceral adipocytes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(51): 12634-12639.
- [5] FATIMA M, KESHARWANI R K, MISRA K, et al. Protective effect of theaflavin on erythrocytes subjected to *in vitro* oxidative stress [J]. Biochemistry Research International, 2013, 2013: 649759.
- [6] TAN Q Y, PENG L J, HUANG Y Y, et al. Structure-activity relationship analysis on antioxidant and anticancer actions of theaflavins on human colon cancer cells [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(1): 159-170.
- [7] 左灵妮, 刘康, 马晓勤, 等. 茶黄素通过调控 miR-

- 190 表达对 LPS 诱导的结肠上皮细胞炎症损伤的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(17): 2087-2092.
- ZUO L N, LIU K, MA X Q, et al. Effect of theaflavin on LPS induced inflammatory injury of colon epithelial cells by regulating miR-190 expression[J]. Chinese Journal of Immunology, 2021, 37(17): 2087-2092.
- [8] WEBER F, SCHMUTH M, SEPP N, et al. 8-甲氧补骨脂素浴水的 PUVA 治疗蕈样霉菌病的研究[J]. 世界核心医学期刊文摘 (皮肤病学分册), 2005, 1(11): 20-21.
- WEBER F, SCHMUTH M, SEPP N, et al. PUVA of 8-methoxypsoralen bath water in the treatment of mycosis fungoides[J]. Abstracts of World Core Medical Journal (Dermatology), 2005, 1(11): 20-21.
- [9] 刘昌伟, 张梓莹, 王俊懿, 等. 茶黄素生物学活性研究进展[J]. 食品科学, 2021, 43(19): 318-329.
- LIU C W, ZHANG Z Y, WANG J Y, et al. Research progress in biological activity of theaflavins [J]. Food Science, 2021, 43(19): 318-329.
- [10] GAO Y, GARY O RANKIN, TU Y Y, et al. Inhibitory effects of the four main theaflavin derivatives found in black tea on ovarian cancer cells[J]. Anticancer Res, 2017, 36(2): 643-651.
- [11] RITWIJA B, RANODEEP C, ABUL K, et al. Theaflavin-containing black tea extract: A potential DNA methyltransferase inhibitor in human colon cancer cells and ehrlich ascites carcinoma-induced solid tumors in mice[J]. Nutrition and Cancer, 2020, 73(12): 1-13.
- [12] PRESTERA T, ZHANG Y, SPENCER S R, et al. Talalay, the electrophile counterattack response: Protection against neoplasia and toxicity[J]. Adv. Enzyme Regul, 1993, 33: 281-296.
- [13] 沈乐乐, 席建元, 孙立新, 等. 基于网络药理学及分子对接技术分析“半边莲-白花蛇舌草”药对治疗银屑病的作用机制[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(12): 2136-2145.
- CHEN L L, XI J Y, SUN L X, et al. Based on network pharmacology and molecular docking technology, analyze the mechanism of ‘Lobelia chinensis Hedyotis diffusa’ medicine in the treatment of psoriasis[J]. Research and Development of Natural Products, 2021, 33(12): 2136-2145.
- [14] 王佐, 王璐, 陈忠正, 等. 冬凌草甲素诱导小鼠肝癌细胞醌还原酶活性及其机理研究[J]. 食品科学, 2017, 38(7): 193-200.
- WANG Z, WANG L, CHEN Z Z, et al. Study on quinone reductase activity and its mechanism in mouse hepatocellular carcinoma cells induced by Rudocretin[J]. Food Science, 2017, 38(7): 193-200.
- [15] 侯磊. 醛糖还原酶和 HCV NS5B 聚合酶与药物分子的 3D-QSAR 和分子对接研究[D]. 济南: 山东大学, 2010.
- HOU L. Studies on 3D-QSAR and molecular docking of aldose reductase and HCVNS5B polymerase with drug molecules[D]. Jinan: Shandong University, 2010.
- [16] 杨子银, 屠幼英, 赵勤, 等. 高速逆流色谱分离茶黄素单体的初步研究[J]. 食品科学, 2005, 26(10): 87-90.
- YANG Z Y, TU Y Y, ZHAO Q, et al. Preliminary study on the separation of theaflavins by high-speed countercurrent chromatography[J]. Food Science, 2005, 26(10): 87-90.
- [17] ZHANG S T, LI L X, CUI Y, et al. Preparative high-speed counter-current chromatography separation of grape seed proanthocyanidins according to degree of polymerization[J]. Food Chemistry, 2017, 219(10): 399-407.
- [18] DEGENHARDT A, ENGELHARDT U H, LAKENBRINK C, et al. Preparative separation of polyphenols from tea by high-speed countercurrent chromatography[J]. J Agric Food Chemistry, 2000, 48(8): 3425-3430.
- [19] LÜ H H, YANG J O, WANG X Y, et al. Separation and purification of four flavan-3-ols from iris lactea pall. var. chinensis (Fisch.) koidz by high-speed counter-current chromatography with flow-rate gradient[J]. J Chromatogr B, 2015, 988(15): 127-134.
- [20] CHENG C, YIN L, CAO X L, et al. Preparative separation of catechin and epi-catechin by high performance counter-current chromatography[J]. Food Science, 2012, 33(15): 140-143.
- [21] SHIBUSAWA Y, YANAGIDA A, ISOZAKI M, et al. Separation of apple procyanidins into different degrees of polymerization by high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatogr A, 2001, 915(1): 253-257.
- [22] 刘雪娜, 吴雪娇, 刘顺航, 等. 高效液相色谱法测定速溶滇红茶制品中茶黄素含量[J]. 食品安全质量



- 检测学报, 2021, 12(9): 3808-3812.
- LIU X N, WU X J, LIU S H, et al. Determination of theaflavins in instant Yunnan black tea products by high performance liquid chromatography[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2021, 12(9): 3808-3812.
- [23] 费璠, 张梓莹, 胡松, 等. HPLC同时检测红茶中儿茶素和茶黄素含量的方法[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(5): 275-280.
- FEI F, ZHANG Z Y, HU S, et al. HPLC based method for simultaneous determination of catechin and theaflavin in black tea[J]. Food and Fermentation Industry, 2022, 48(5): 275-280.
- [24] 马二兰, 张帆, 吕春秋, 等. 荔浦芋球蛋白结构表征及其对HepG2细胞糖代谢的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(15): 359-365.
- MA E L, ZHANG F, LV C Q, et al. Structural characterization of Lipu taro globulin and its effect on glucose metabolism in HepG2 cells [J]. Food Industry Science and Technology, 2022, 43(15): 359-365.
- [25] LI S Y, LIN Y, YI J Z. Insight into interaction mechanism between theaflavin-3-gallate and  $\alpha$ -glucosidase using spectroscopy and molecular docking analysis[J]. Food Biochemistry, 2020, 00: 1-11.
- [26] YU X, CAI X H, LI S. Studies on the interactions of theaflavin-3,3'-digallate with bovine serum albumin: Multi-spectroscopic analysis and molecular docking[J]. Food Chemistry, 2021, 366(1): 1-8.
- [27] WANG K B, LIU Z H, HUANG J A. Preparative isolation and purification of theaflavins and catechins by high-speed countercurrent chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 2008, 867(2): 282-286.
- [28] LU J B, CHI-TANG HO, GEETHA G, et al. Differential effects of theaflavin monogallates on cell growth, apoptosis, and cox-2 gene expression in Cancerous versus normal cells[J]. Cancer Research, 2000, 60(15): 6465-6471.
- [29] KEI H, SHINSUKE K, NAOMI U, et al. *In vitro* induction of the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase, in human hepatoma cells by food extracts[J]. Cancer Letters, 2002, 180: 1-5.
- [30] 李锋. 生姜化合物诱导II相酶及抗炎活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011: 7.
- LI F. Studies on the induction of phase II enzyme by ginger compound and its anti-inflammatory activity [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011: 7.
- [31] 王佐, 王璐, 陈忠正, 等. 冬凌草甲素诱导小鼠肝癌细胞醌还原酶活性及其机理研究[J]. 食品科学, 2017, 38(7): 193-200.
- WANG Z, WANG L, CHEN Z Z, et al. Study on quinone reductase activity and its mechanism in mouse hepatocellular carcinoma cells induced by Rudocentim[J]. Food Science, 2017, 38(7): 193-200.
- [32] 何嘉欣. 紫丁香苷的提取分离工艺优化对HGC-27细胞增殖抑制作用机制研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2021.
- HE J X. Study on the mechanism of inhibiting the proliferation of HGC-27 cells by optimizing the extraction and separation process of syringin [D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2021.

## Isolation and Purification of Theaflavins and Inhibitory Effect of TFDG on Hepatocarcinoma and Colon Cancer Cells

Zhuo Yunyun, Cai Weirong\*, Wang Yuling, Wang Qingqing  
(Anhui University of Engineering, Wuhu 241000, Anhui)

**Abstract** Theaflavin is a high-quality component of black tea, which has good medical and health functions. High-speed countercurrent chromatography (HSCCC) has been applied for the separation of theaflavins and catechins, and examined the cytotoxic activity of the individual theaflavins against human liver cancer (HepG2) cells, Colonic adenocarcinoma (Caco-2) cells. Six components were separated and prepared by HSCCC. Further analysis of these compounds by HPLC indicated that that each component F4 contains theaflavin (TF), F5 contains theaflavin-3-gallate (TF-3-G) and theaflavin-3'-gallate (TF-3'-G), and F6 contains theaflavin-3,3'-gallate (TFDG). The results show TFDG was selected to study the inhibitory effect on cancer cells. CCK-8 was used to assess cell proliferation. TFDG has a significant in-

hibitory effect on HepG-2 and Caco-2 cells in a time-dependent and dose-dependent manner with the increase of concentration and time. It found a solvent system for the preparation of theaflavins in large quantities was selected based on the partitioning coefficient  $K$  and separation factor  $\alpha$ . Also, we acknowledged that there is a certain relationship between cancer prevention and quinone reductase (QR). Combining experimental data with theory, by linking molecular docking technology was used to verify that TFDG and QR can form stable complexes, It also inducing QR activity can enhance the anticancer effect, it can providing a basis for further research on the effect of theaflavin on cancer cells.

**Keywords** high speed countercurrent chromatography; hepatoma cells; colon adenocarcinoma cells; molecular docking