

## 荞麦壳黄酮诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡和抑制迁移的机制

姜鑫<sup>1</sup>, 李天竹<sup>1</sup>, 王玥<sup>1</sup>, 刘子琦<sup>1</sup>, 王秀娟<sup>1</sup>, 朴春红<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 吉林农业大学食品科学与工程学院 长春 130118

<sup>2</sup> 梧州学院食品与制药工程学院(六堡茶现代产业学院) 广西梧州 543002)

**摘要** 探究荞麦壳黄酮对人肝癌 HepG2 细胞凋亡和迁移机制的影响。在用 MTT 比色法评价荞麦壳黄酮对人肺癌 A549 细胞、人宫颈癌 Hela 细胞、人肝癌 HepG2 细胞和人正常肝 L-02 细胞抑制效果的基础上,将 HepG2 细胞株作为试验对象,通过细胞形态学观察、Hoechst 33345/碘化丙啶(PI)双染、JC-1 荧光探针检测、Annexin V-FITC/PI 流式细胞术、伤口愈合试验和蛋白免疫印迹法,分析荞麦壳黄酮预处理对 HepG2 细胞凋亡和迁移的影响。结果表明:荞麦壳黄酮能够有效抑制 A549 细胞、Hela 细胞和 HepG2 细胞的细胞活性,对 HepG2 细胞抑制效果最显著,50  $\mu\text{g/mL}$  干预 HepG2 细胞 48 h 后,细胞存活率为 53.62%,且对 L-02 细胞活性无影响。与未处理组相比,荞麦壳黄酮以剂量依赖性的方式抑制 HepG2 细胞增殖,降低线粒体膜电位,下调凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-xl 表达,上调 FADD、cleaved-Caspase-3 蛋白表达,并降低迁移蛋白 MMP 9 表达,且效果均显著高于阳性对照芦丁。研究结果说明荞麦壳黄酮具有抗肿瘤能力,其抑制 HepG2 细胞增殖可能与诱导线粒体、死亡受体细胞凋亡和抑制细胞迁移有关。

**关键词** 荞麦壳黄酮; 癌症; 肝癌; 细胞凋亡; 细胞迁移

**文章编号** 1009-7848(2024)07-0036-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.07.004

肝癌是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一。2020 年,全球新发肝癌占有肿瘤疾病发病的 4.69%,肝癌死亡占 8.3%,死亡率为 8.7/10 万人<sup>[1]</sup>。鉴于早期诊断困难和缺乏靶向药物,肝癌的生存率一直极低,现如今,肝癌的治疗主要以手术和化疗为主,在短期内往往就会出现明显的耐药性<sup>[2]</sup>。若长期化疗,还会引起对正常组织的毒性作用等问题。寻找新的、低毒、高效的天然辅助抗肝癌药物迫在眉睫。近期,黄酮类化合物因较好的抗肿瘤活性而被广泛关注<sup>[3-7]</sup>。例如:大豆异黄酮通过增加 H22 移植瘤组织中 P53 蛋白表达来诱导肝癌细胞凋亡<sup>[8]</sup>。黄芩素以剂量依赖性的方式调节细胞凋亡蛋白 Bax/Bcl-2,在体内外治疗人胃癌 SGC-7901 细胞<sup>[9]</sup>等。

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡,是通过自身消除不正常细胞和过剩细胞来调节形态发生以及机体稳定的主要路径。癌症和众多其它疾病,如阿尔茨海默病、艾滋病和血细胞疾病,都是细胞凋亡途径失衡和异常机制的结果<sup>[10]</sup>。因此,诱导细胞

凋亡的药物可能会成为癌症治疗的预防性或治疗性候选药物。细胞凋亡发生的整个过程中,有许多蛋白参与并被众多蛋白调节,如 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)家族、死亡域蛋白(Fas-associating protein with a novel death domain, FADD)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Cysteiny aspartate specific proteinase, Caspase)家族和胞浆信号转导蛋白等。另外,细胞迁移在肿瘤细胞转移中必不可少,其中基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase, MMP)2 和 MMP 9 是细胞迁移过程中主要的调控蛋白<sup>[11]</sup>。据报道,其过表达可减少细胞间的消化作用,增加移动能力。

荞麦(*Fagopyrum esculentum*)是一种无麸质的伪谷物,属于蓼科(Polygonaceae),广泛分布于世界各地。荞麦富含多种功能性化合物<sup>[12]</sup>,其中黄酮类化合物显示出抗炎、抗氧化、降血糖、抗糖尿病和抗肿瘤等作用<sup>[13-17]</sup>。荞麦壳是荞麦食品加工过程中主要的副产物<sup>[18]</sup>,大多数作为废弃物没有得到有效利用。越来越多的研究表明,荞麦壳黄酮类化合物具有抗氧化,调节脂质代谢<sup>[19]</sup>,改善胰岛素抵抗<sup>[20]</sup>等功能,而荞麦壳黄酮在抗肿瘤方面的研究成果甚少,有待进一步探索。

收稿日期: 2023-07-04

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20200403159SF)

第一作者: 姜鑫,女,硕士生

通信作者: 朴春红 E-mail: piaochunhong9111@163.com

本研究首先考察荞麦壳黄酮对人肺癌 A549 细胞、人宫颈癌 Hela 细胞和人肝癌 HepG2 细胞等 3 种癌细胞增殖的抑制作用,再通过 Hoechst 33345/PI 双染、细胞线粒体膜电位检测、流式细胞术、伤口愈合试验以及蛋白质免疫印记法等手段探究荞麦壳黄酮抗肝癌机制,旨在为荞麦壳黄酮预防和改善肝癌发展提供一定的理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

荞麦壳,中国内蒙古赤峰市。人肺癌 A549 细胞、人宫颈癌 Hela 细胞、人肝癌 HepG2 细胞、人正常肝 L-02 细胞,上海 iCell Bioscience 生物科技股份有限公司;高糖 DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基、胎牛血清(FBS)、青霉素链霉素溶液、磷酸缓冲液(PBS)、胰蛋白酶,美国 Gibco 公司;二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide,DMSO),美国 Sigma 公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT),中国上海能源化工;Hoechst 33258、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒,北京索莱宝生物科技有限公司;BCA 蛋白试剂盒,鼎国生物技术有限公司;MMP 9、cleaved-Caspase-3、FADD 多克隆抗体,沈阳万类生物科技有限公司;Bcl-XL、Bcl-2、Bax、GAPDH 单克隆抗体、辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase,HRP)标记的山羊抗鼠、山羊抗兔免疫球蛋白 G,英国 Abcam 公司。其余所用试剂均为国产分析纯级。

### 1.2 仪器与设备

HERAcell 150i CO<sub>2</sub> 恒温培养箱,美国 Thermo 公司;DMILLED Fluo 荧光倒置显微镜,中国 Motic 公司;FLUOstar Omega 荧光酶标仪,德国 BMG LABTECH 公司;Mini BIS Pro 荧光凝胶成像系统,以色列 DNR 公司;FACSCanto 流式细胞仪,美国 BD 公司。

### 1.3 荞麦壳黄酮的制备方法

荞麦壳黄酮(Buckwheat hull flavonoids, BHF<sub>s</sub>)根据实验室前期研究方法<sup>[19,21]</sup>制备。荞麦壳粉与去离子水(1:20, *m/V*)在 121 ℃条件下提取 20 min,共提取 2 次,并经大孔树脂 D101 富集、大孔树脂 ADS-7 纯化后,获得黄酮含量最高的组分 BHF<sub>s</sub>。使用芦丁为参照品,利用 AlCl<sub>3</sub>-NaNO<sub>2</sub> 比色

法检测 BHF<sub>s</sub> 中的总黄酮含量,约为 90%,并鉴定 BHF<sub>s</sub> 中黄酮组成包括牡荆素、异红草素、金丝桃苷和芦丁<sup>[22]</sup>。

### 1.4 方法

1.4.1 细胞培养 HepG2 细胞单层培养在含有 10%FBS 和 1%青霉素链霉素溶液的高糖 DMEM 培养基中,Hela 细胞、A549 细胞和 L-02 细胞单层培养在含有 10%FBS 和 1%青霉素链霉素溶液的 RPMI 1640 培养基中,且所有细胞培养在 5%CO<sub>2</sub>, 37 ℃饱和湿度环境中。

1.4.2 细胞活力测定 将生长状态位于对数生长的 HepG2 细胞、Hela 细胞、A549 细胞以及 L-02 细胞通过台盼蓝染色并计数后,以每孔 1×10<sup>5</sup> 个接种至 96 孔板中培养 24 h,加入 BHF<sub>s</sub>,使其终质量浓度分别为 0, 50, 80, 100, 120, 200 μg/mL,并在培养箱中干预细胞 24, 48, 72 h,将 BHF<sub>s</sub> 吸出,向每个孔中缓慢填入 100 μL 终质量浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液,培养 4 h,仔细弃去培养基,加入 150 μL DMSO 溶液,在波长 490 nm 处测定吸光度(OD),通过吸光度计算出每组细胞的存活情况。细胞存活率的计算公式为:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{试验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}} \times 100 \quad (1)$$

1.4.3 Hoechst 33345/PI 染色分析细胞凋亡 细胞接种于 12 孔板中,培养过夜,用不同质量浓度的 BHF<sub>s</sub> (0, 10, 50, 100 μg/mL) 和芦丁 (200 μg/mL) 干预细胞 24 h,用预冷的 PBS 将细胞洗涤 2 次,填入染色缓冲液、Hoechst 33345 染色液和 PI 染色液进行染色,在避光环境下,冰上孵育 25 min,PBS 洗涤 1 次,用荧光倒置显微镜观察不同组细胞的染色情况,并拍照记录。

1.4.4 线粒体膜电位检测细胞凋亡 利用 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒观察 BHF<sub>s</sub> 处理 HepG2 细胞后的线粒体膜电位的变化。将在对数生长的 HepG2 细胞接种至 6 孔板中,培养过夜,用质量浓度分别为 0, 10, 50, 100 μg/mL 的 BHF<sub>s</sub> 和 200 μg/mL 的芦丁处理细胞 24 h。按照试剂盒说明,加入 JC-1 染色液孵育 20 min,在荧光显微镜下观察荧光强度。

1.4.5 Annexin V-FITC/PI 染色检测细胞凋亡 利用 Annexin V-FITC/PI 染色法检测 BHF<sub>s</sub> 干预

HepG2 后细胞凋亡分布情况,将生长状态处于对数期的 HepG2 细胞接种于 6 孔板,培养 24 h,更换成不同终质量浓度的 BHF<sub>s</sub> (0,10,50,100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和芦丁(200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 溶液诱导细胞 24 h,消化,台盼蓝染色计数,并取  $1 \times 10^6$  个细胞,经过离心机  $1\,000 \times g$  离心 5 min,加入 Annexin V-FITC 以及 PI 染色液,25  $^{\circ}\text{C}$  黑暗环境下静置 15 min,通过流式细胞仪检测和分析。

**1.4.6 伤口愈合试验** HepG2 细胞以每孔  $4 \times 10^4$  个接种于 6 孔板中,培养过夜至 80% 单层细胞状态,使用 200  $\mu\text{L}$  无菌枪头在细胞底部垂直滑动,力度尽量保持一致,PBS 洗涤 2 次,在倒置显微镜下记录 0 h 的划痕,用不同质量浓度的 BHF<sub>s</sub> (0,10,50,100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和芦丁(200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 处理细胞 48 h,通过倒置显微镜观察各组细胞迁移变化并拍照记录。伤口愈合面积通过软件 Image J 计算。

**1.4.7 蛋白质免疫印记** HepG2 细胞培养于 10 cm 培养皿中,不同质量浓度的 BHF<sub>s</sub> (0,10,50,100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和芦丁(200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 处理 24 h,PBS 洗涤 2 次,在 RIPA 裂解液(1% 磷酸酶抑制剂)的作用下提取各组细胞总蛋白,通过 BCA 试剂盒进行定量,并标准化,所有蛋白通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,采用电转移法将其转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,封闭 1.5 h,孵育抗 Bcl-XL、Bcl-2、Bax、cleaved-Caspase-3、FADD、MMP-9 抗体,再孵育对应二抗,TBST 洗涤,利用凝胶成像仪显影,Image J 软件分析灰度值。以抗 GAPDH 单抗作为内对照。

## 1.5 数据分析

所有试验数据以“平均值 $\pm$ 标准差”表示,试验平行数  $n \geq 3$ ,利用 Excel 软件处理试验数据,用 GraphPad Prism 7.0 软件绘图,数据统计分析采用 SPSS 26.0 软件, $P < 0.05$  表明差异显著,具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 BHF<sub>s</sub> 对不同癌细胞系存活率的影响

不同质量浓度的 BHF<sub>s</sub> 处理人肺癌 A549 细胞、人宫颈癌 Hela 细胞、人肝癌 HepG2 细胞和人正常肝 L-02 细胞后测定各自细胞存活率。如图 1 所示,BHF<sub>s</sub> 为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,对 3 种癌细胞增殖均

有抑制效果,且随着质量浓度的增加,3 种癌细胞存活率相比未经 BHF<sub>s</sub> 处理组更低,其中 BHF<sub>s</sub> 在 24 h 和 48 h 内对 Hela 细胞存活率无明显影响,干预 72 h 有一定的抑制效果。相同质量浓度的 BHF<sub>s</sub> 干预后,A549 和 HepG2 的抑制效果优于 Hela,且 HepG2 抑制效果更为显著,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 BHF<sub>s</sub> 干预 HepG2 细胞 48 h 后,细胞存活率为 53.62%。当 BHF<sub>s</sub> 处理人正常肝 L-02 细胞时,在干预 48 h 后,细胞存活率逐渐降低。因此,在随后的研究中将选用 HepG2 细胞为研究对象,最高干预质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 2.2 BHF<sub>s</sub> 对 HepG2 细胞形态的影响

通过显微镜检测 BHF<sub>s</sub> 和芦丁干预 24 h 后 HepG2 细胞形态的变化。如图 2 所示,未经 BHF<sub>s</sub> 处理的 HepG2 细胞呈无规律的多边形形态,BHF<sub>s</sub> 和芦丁干预 24 h 后,与未处理组相比,HepG2 细胞形态由于 BHF<sub>s</sub> 质量浓度的不断增加,逐渐变圆、疏松,呈现凋亡的特征,芦丁处理后,HepG2 细胞形态也呈现变圆形态,而变圆细胞数量相对 BHF<sub>s</sub> 处理组较少。结果表明 BHF<sub>s</sub> 可能通过诱导细胞凋亡抑制 HepG2 细胞增殖。

### 2.3 BHF<sub>s</sub> 对 HepG2 细胞凋亡的影响

**2.3.1 Hoechst 33342/PI 双染检测细胞凋亡** 细胞发生凋亡时,染色质固缩,细胞核体积增大。采用 Hoechst 33342/PI 染色法观察 BHF<sub>s</sub> 是否诱导 HepG2 细胞凋亡。Hoechst 33342 可使凋亡细胞染色为蓝色,蓝色光强弱与凋亡程度呈正比,PI 将坏死细胞染色,使其显示出红色荧光。如图 3 所示,在荧光显微镜下观察到 HepG2 细胞的蓝色荧光强度随 BHF<sub>s</sub> 质量浓度的增加而逐渐增强,与芦丁处理后的细胞荧光强度有差异。此外,当 BHF<sub>s</sub> 质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,染色细胞出现少量红色荧光,说明出现部分坏死细胞。

**2.3.2 线粒体膜电位检测细胞凋亡** 细胞凋亡的整个进程都伴有线粒体跨膜电位的改变,这种改变是线粒体凋亡过程的开始。正常细胞在不受到刺激的状态下,线粒体膜电位不会发生改变,JC-1 荧光探针运用细胞膜特有的极性穿入线粒体内,并随着其浓度逐渐升高而慢慢聚集,转变为多聚体,散发出红色荧光。而在凋亡细胞中,线粒体跨膜电位会根据凋亡进程发生不同程度的去极化,



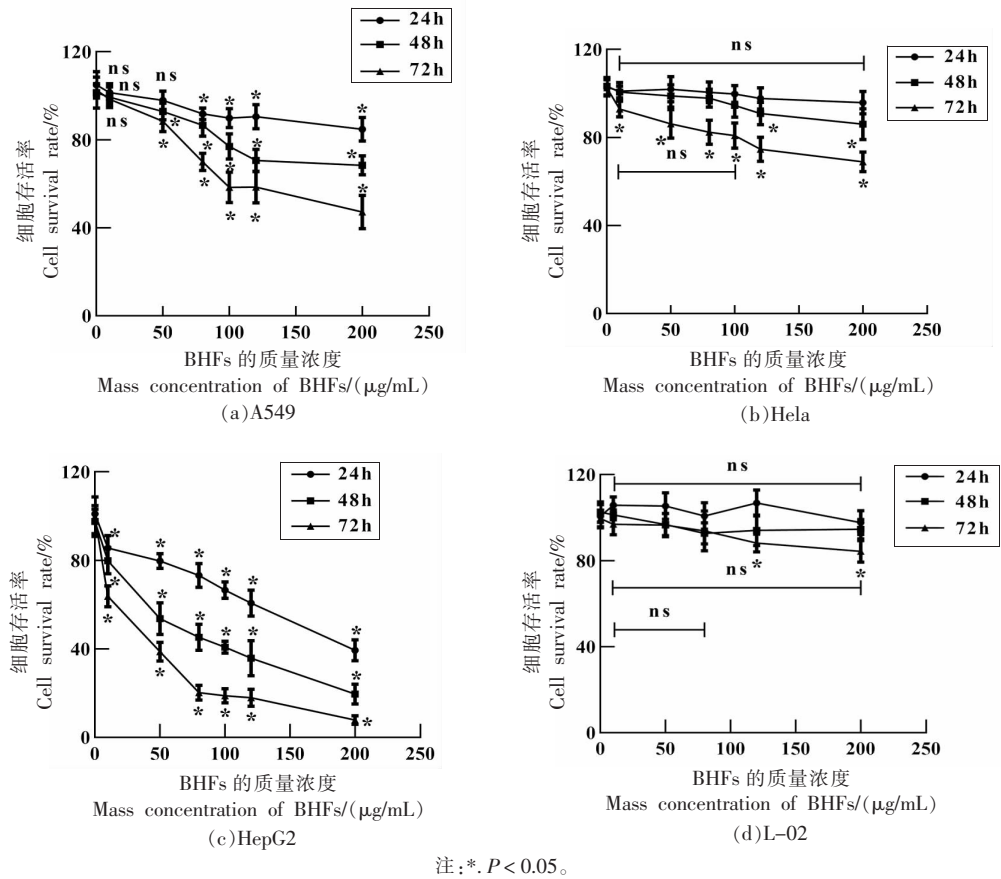


图 1 BHF 对人肺癌 A549 细胞(a)、人宫颈癌 Hela 细胞(b)、人肝癌 HepG2 细胞(c)和人正常肝 L-02 细胞(d)增值的影响

Fig.1 Effects of BHF on proliferation of human lung cancer A549 cells (a), human cervical cancer Hela cells (b), human hepatocellular carcinoma HepG2 cells (c) and human normal liver L-02 cells (d)

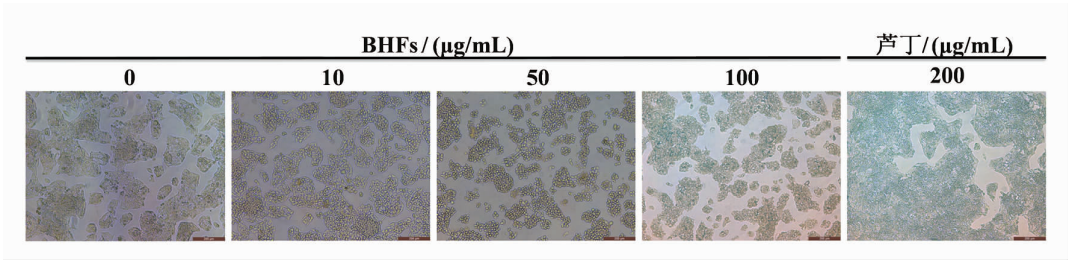


图 2 BHF 和芦丁对人肝癌 HepG2 细胞形态的影响(400×)

Fig.2 Effects of BHF and rutin on morphology of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells (400×)

使得 JC-1 被释放出来,导致其浓度下降,并由多聚体转变为单体,散发出绿色荧光。由图 4 检测结果显示,与未处理组相比,BHF 处理 24 h 后,由于 BHF 质量浓度的不断增加,HepG2 细胞内红色荧光强度随之变弱,而绿色荧光强度则出现增强的趋势,与芦丁处理后相比,BHF 处理绿色荧光更明显。结果表明 BHF 处理可以使 HepG2 细

胞线粒体膜电位下降,引起细胞凋亡。  
2.3.3 BHF 对 HepG2 细胞凋亡的影响 为进一步研究 BHF 诱导 HepG2 细胞凋亡分布情况,利用流式细胞术对干预后的 HepG2 细胞进行分析。由图 5 结果显示,BHF 干预后 HepG2 细胞凋亡数量增加,与未处理组相比,质量浓度为 10,50,100 µg/mL 的 BHF 处理后,HepG2 细胞的凋亡率

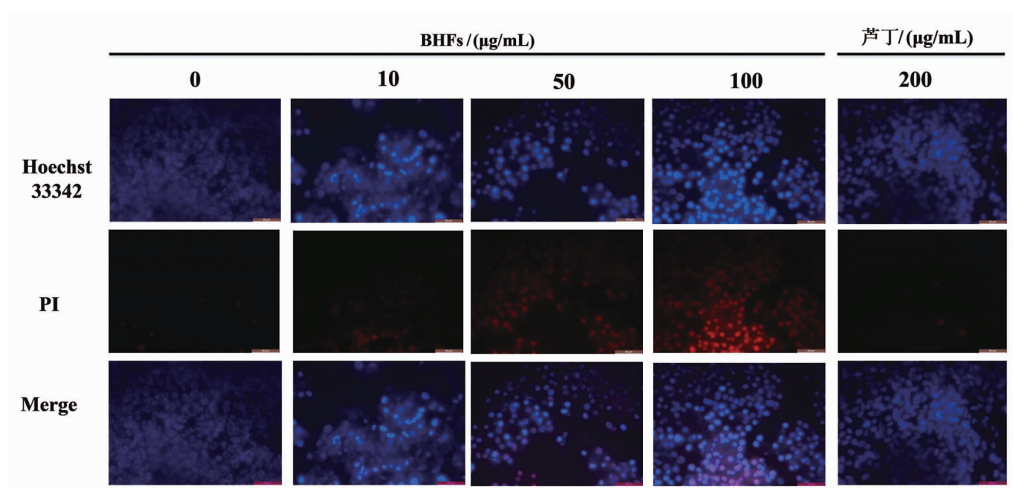


图3 Hoechst 33342/PI 双染检测 BHF 和芦丁对人肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响(40 $\times$ )

Fig.3 Effects of BHF and rutin on apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG 2 cells by Hoechst 33342/PI double staining detection (40 $\times$ )

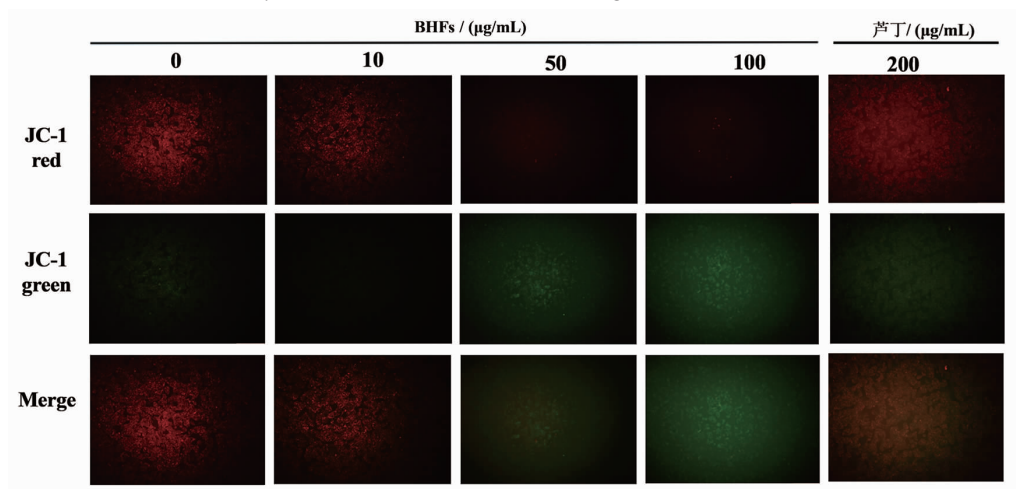


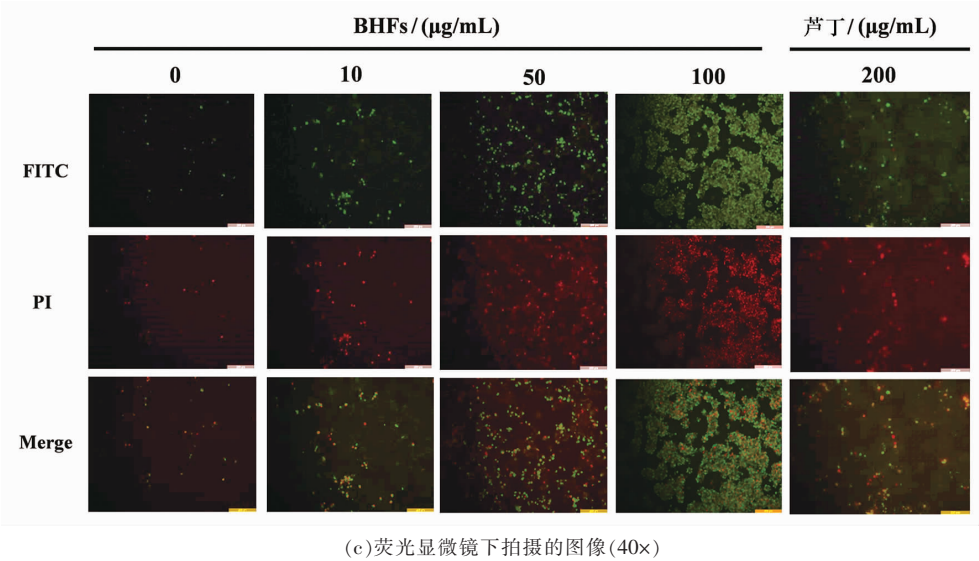
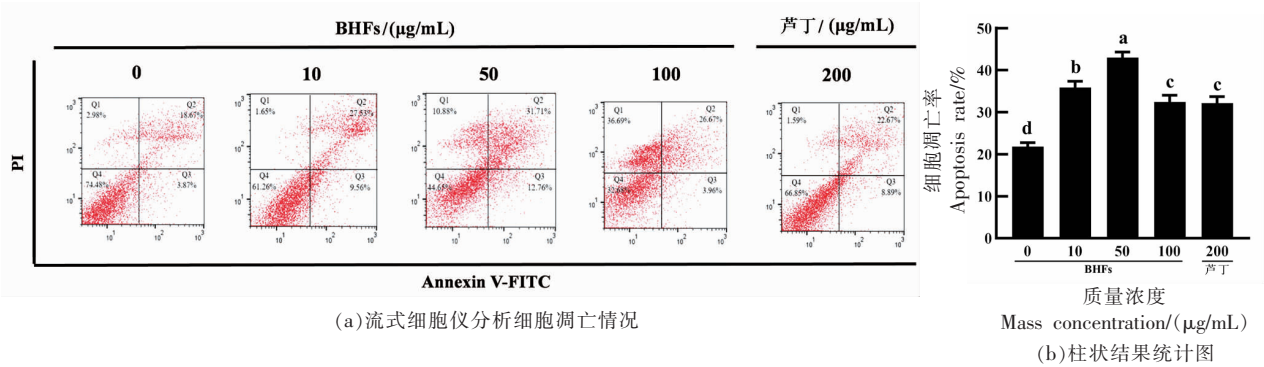
图4 BHF 和芦丁对人肝癌 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响(40 $\times$ )

Fig.4 Effects of BHF and rutin on mitochondrial membrane potential in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells (40 $\times$ )

分别增加到  $(37.09 \pm 0.86)\%$ ,  $(44.47 \pm 2.34)\%$ ,  $(30.63 \pm 2.82)\%$ ,  $P < 0.05$ , 芦丁处理后凋亡率增加到  $(31.56 \pm 0.96)\%$ ,  $P < 0.05$ ; 随着 BHF 质量浓度的增加, 凋亡细胞逐渐增多, 在质量浓度为  $100 \mu\text{g/mL}$  时, 早期凋亡细胞数量相对减少, 可能是由于高质量浓度的 BHF 可以促进早期凋亡加速发展至晚期凋亡, 并引起细胞坏死, 这一结果与 FITC 染色(图 5c)和 Hoechst 33345/PI 染色(图 3)现象保持一致。综合上述结果说明 BHF 可以诱导 HepG2 细胞凋亡, 且效果显著高于芦丁。

#### 2.3.4 BHF 对 HepG2 细胞凋亡蛋白的影响

细胞凋亡从开始到结束的整个过程中被各种蛋白调控, 主要参与调控的蛋白家族有 Caspase 家族和 Bcl-2 家族蛋白, 它们在细胞凋亡的诱导和抑制中占据重要地位。由图 6 可知, 与未处理组相比, 经过 BHF 处理, HepG2 细胞内 Bcl-2 和 Bcl-XL 的蛋白表达量显著降低, 且芦丁处理 24 h 后 HepG2 细胞内 Bcl-2 和 Bcl-XL 蛋白表达量也有降低趋势; 与芦丁处理组相比, BHF 处理组细胞内 Bcl-2 和 Bcl-XL 蛋白表达水平降低更明显; 而与未处理组相比, BHF 处理组 Bax 蛋白表达增高,  $100 \mu\text{g/mL}$  时表达降低, 且 BHF 和芦丁两组细胞 Bax/



(c) 荧光显微镜下拍摄的图像(40 $\times$ )  
注:图 b 中不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

图 5 BHF 和芦丁对人肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响

Fig.5 Effects of BHF and rutin on apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG2 cell

Bcl-2 比值均显著升高。此外,BHF 的处理与未处理组相比,上调了 FADD 和 Caspase-3 蛋白表达,且呈一定剂量依赖性。综上所述,BHF 通过激活 Bcl-2 和 FADD 蛋白表达水平诱导 HepG2 细胞凋亡。

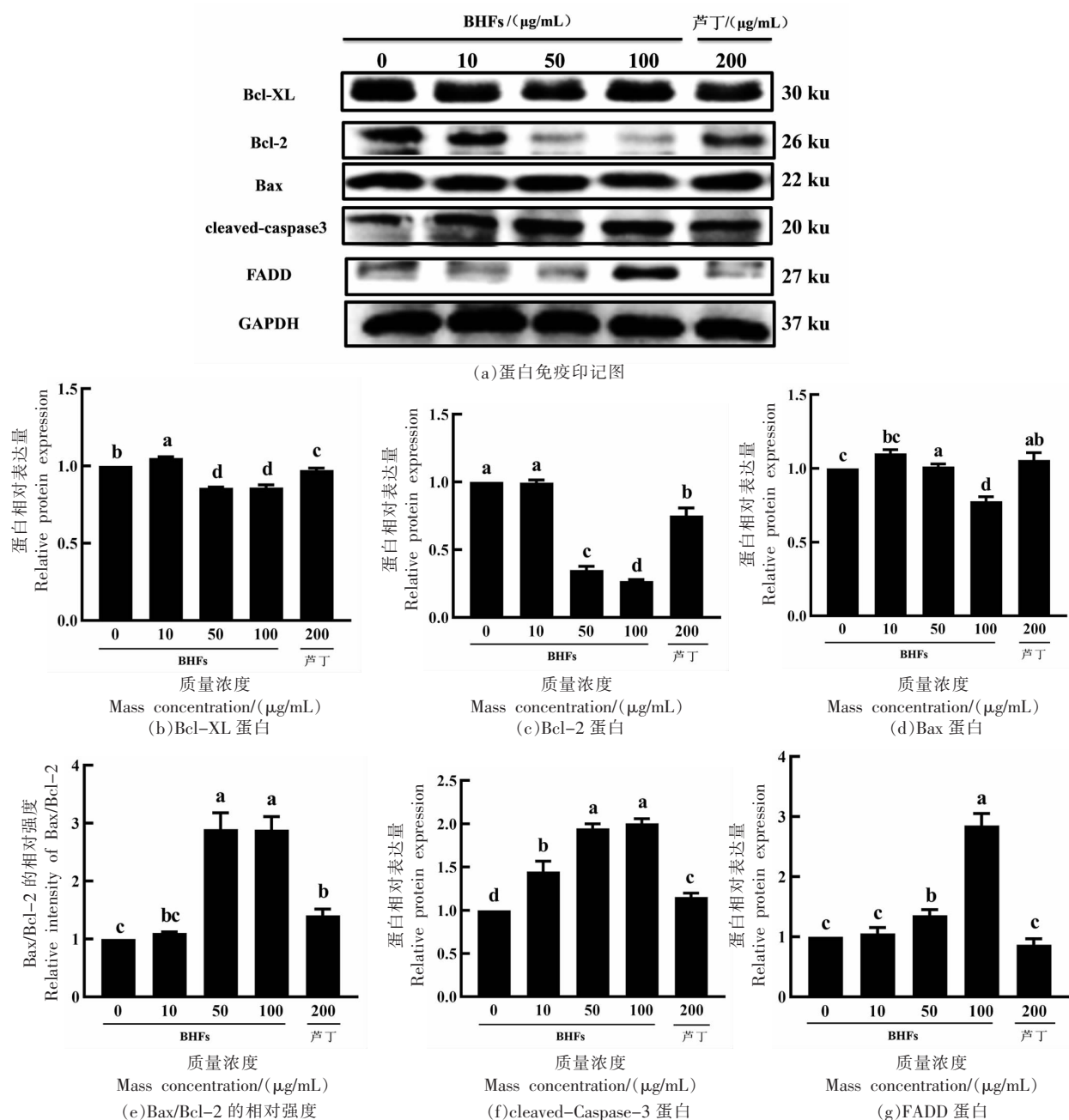
2.4 BHF 对 HepG2 细胞迁移的影响

转移是癌症复发和死亡的主要原因,预防肿瘤的转移是治疗癌症的一个首要目标。因此,研究了 BHF 对 HepG2 细胞迁移能力的影响。如图 7 所示,以 0 h 时细胞划痕面积为参照,BHF 和芦丁处理 48 h 后,HepG2 细胞向划痕中间迁移,且随着 BHF 质量浓度的增加,细胞迁移速度逐渐缓慢,抑制迁移作用增强。结果表明,BHF 具有抑

制 HepG2 细胞迁移的能力,且与质量浓度成正比。

2.5 BHF 对 HepG2 细胞迁移蛋白的影响

MMP 9 被确定为与肿瘤发生迁移、浸润以及新血管形成等密切相关过程的关键介质,是抗肿瘤治疗中的一个有力目标<sup>[23]</sup>。介于 MMP 9 在细胞迁移中的重要作用,检测了 0,10,50,100  $\mu\text{g/mL}$  的 BHF 作用于 HepG2 细胞 24 h 后 MMP 9 蛋白表达情况。如图 8 所示,BHF 干预 HepG2 细胞后,与未干预组相比,BHF 降低了 HepG2 细胞中 MMP 9 蛋白表达,且与芦丁组差异显著。结果表明 BHF 抑制 HepG2 细胞迁移与下调 MMP 9 蛋白表达有关。

图6 BHF<sub>s</sub>和芦丁对人肝癌 HepG2 细胞凋亡蛋白的影响Fig.6 Effects of BHF<sub>s</sub> and rutin on apoptotic proteins in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells

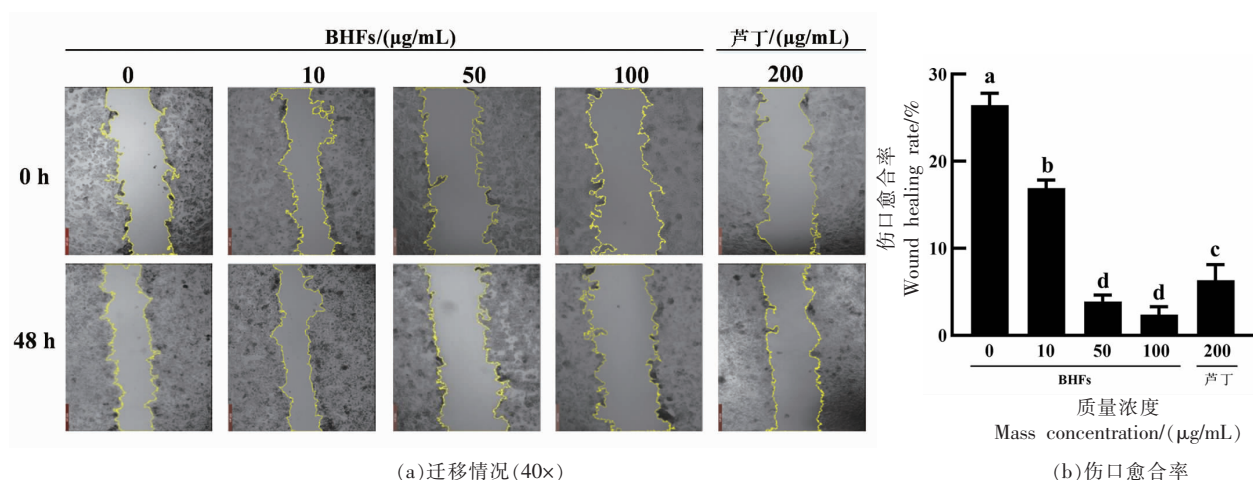
### 3 讨论

黄酮类化合物具备丰富的生物活性功能,包括抗炎、抗氧化、清除自由基以及抗肿瘤<sup>[24-26]</sup>等。近年来,黄酮类化合物由于具有较好的疗效和较低的毒副作用在抗肿瘤方面被广泛关注。课题组前期研究发现荞麦壳中含有丰富的黄酮类化合物,然而其抗肿瘤效果鲜有报道。本试验 MTT 结果表

明荞麦壳黄酮 BHF<sub>s</sub> 通过一定的时间和剂量依赖方式可以显著降低肝癌 HepG2 细胞的增殖活性,且在相同干预时间和相同质量浓度的 BHF<sub>s</sub> 处理下,抑制 HepG2 细胞比抑制 A549 细胞和 Hela 细胞的增殖活性更明显。

细胞凋亡是不引起炎症反应的自主程序性死亡<sup>[27]</sup>,受一系列信号转导通路和相关细胞蛋白的

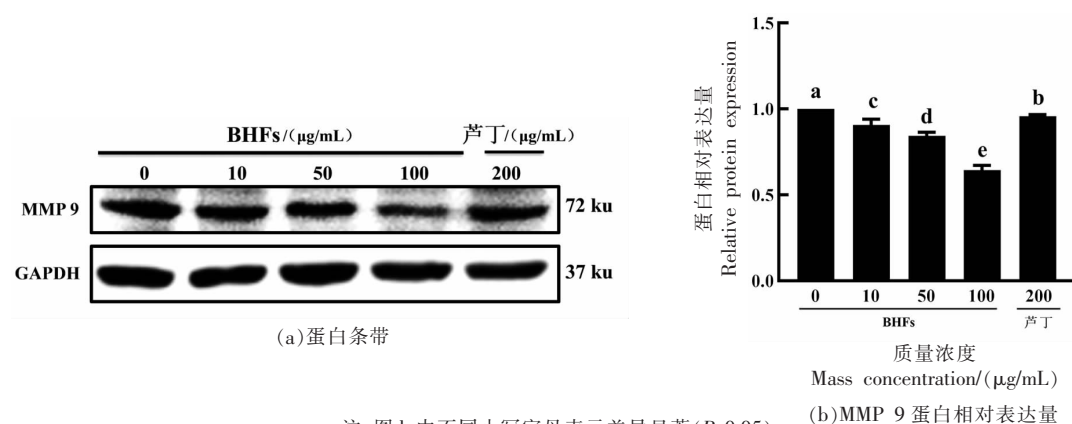




注:图 b 中不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

图 7 BHF 和芦丁对人肝癌 HepG2 细胞迁移的影响

Fig.7 Effects of BHF and rutin on migration of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells



注:图 b 中不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

图 8 BHF 和芦丁对肝癌 HepG2 细胞 MMP 9 蛋白相对表达量的影响

Fig.8 Effect of BHF and rutin on the relative expression of MMP 9 protein in hepatocellular carcinoma HepG2 cells

调控。线粒体应激的内在途径和外源性/死亡受体途径被认为是细胞凋亡的主要途径。Bcl-2 家族蛋白可以直接调控由线粒体诱导的内在细胞凋亡途径。它通过增强促凋亡蛋白(Bax、Bak)和降低抗凋亡蛋白(Bcl-2、Bcl-xl)的表达进一步诱导细胞凋亡。Bcl-2 蛋白家族定位在细胞线粒体外膜,通过抑制 Bcl-2 和 Bcl-xl 蛋白表达可以进一步激活 Bax 和 Bak 蛋白,导致线粒体形成孔隙,并且线粒体膜电位发生改变,最终蛋白酶细胞色素-C 被线粒体从空隙中释放出来,从而进一步唤醒 Caspase 级联反应过程中的下游蛋白 Caspase-3,导致其裂解,增强细胞凋亡级联反应。已有研究证明,黄酮

类化合物可通过增加 Bax 蛋白表达和降低 Bcl-2 蛋白表达,提高 Bax/Bcl-2 比值,Bax 转位到线粒体诱导癌细胞凋亡<sup>[28-30]</sup>。与报道相似的是,本研究结果显示,荞麦壳黄酮 BHF 通过下调 Bcl-2 和 Bcl-xl 蛋白表达,上调 Bax 蛋白表达,升高 Bax/Bcl-2 的比值诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡,表明 BHF 可能通过调控线粒体途径 Bcl-2 家族蛋白诱导 HepG2 细胞凋亡。

FADD 蛋白被认为是由死亡受体诱导的凋亡途径中的关键连接蛋白<sup>[31]</sup>,在凋亡信号传递过程中起着衔接作用,当与 Fas 胞浆区特异性结合后,启动 Caspase-8,通过重组人 BH3 结构域凋亡诱



导蛋白(Bid)在线粒体扩增环的激活中发挥作用,激活 Caspase-3,从而促进细胞凋亡。Caspase-3 在 Caspase 家族中有着重要地位,是最重要的凋亡调节蛋白,是细胞凋亡过程中的实施者<sup>[32]</sup>。在肝癌中,Caspase-3 通过参与多种信号途径诱导肝癌细胞凋亡<sup>[33-34]</sup>。本研究结果显示,荞麦壳黄酮 BHF<sub>s</sub> 上调 FADD 蛋白表达,激活 Caspase-3,导致 cleaved-Caspase-3 蛋白水平升高,说明 BHF<sub>s</sub> 诱导 HepG2 细胞凋亡可能与激活死亡受体途径有关。

癌症细胞转移和侵袭的进程中,细胞外基质和基质的分解,起着关键性作用,MMP 2 和 MMP 9 是癌细胞进入转移部位过程中的重要连接蛋白<sup>[35]</sup>,MMP 2 和 MMP 9 在细胞外基质的降解中起协同作用,并共同推进了恶性肿瘤细胞向前移动。杨树蜂胶可以降低肝癌 HepG2 细胞中 MMP 2 和 MMP 9 蛋白的表达,抑制细胞迁移<sup>[36]</sup>。本试验中,荞麦壳黄酮 BHF<sub>s</sub> 处理 HepG2 细胞后,也显示出下调 MMP 9 蛋白表达,结果说明 BHF<sub>s</sub> 可能通过降低 HepG2 细胞内 MMP 9 蛋白表达来抑制其迁移。

综上所述,荞麦壳黄酮 BHF<sub>s</sub> 可诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡,凋亡途径可能与触发的线粒体凋亡途径有关,且 BHF<sub>s</sub> 可抑制 HepG2 细胞迁移,这可能与下调 MMP 9 蛋白表达有关,可绘制出 BHF<sub>s</sub> 对肝癌 HepG2 细胞凋亡和迁移大致通路图,见图 9。

## 参 考 文 献

- [1] 曹毛毛,李贺,孙殿钦,等.全球肝癌 2020 年流行病学现状[J].中华肿瘤防治杂志,2022,22(5): 322-328.  
CAO M M, LI H, SUN D Q, et al. Epidemiological status of global liver cancer in 2020[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2022, 22(5): 322-328.
- [2] EL-SERAG H B, MARRERO J A, RUDOLPH L, et al. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2008, 134(6): 1752-1763.
- [3] CAO H J, SUN S J, YAN C, et al. Total

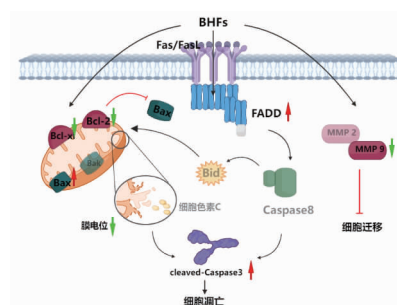


图 9 BHF<sub>s</sub> 诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡和抑制迁移图

Fig.9 BHF<sub>s</sub> induced apoptosis and inhibited migration of hepatocellular carcinoma HepG2 cells

flavonoid aglycones extract in *Radix scutellariae* inhibits lung carcinoma and lung metastasis by affecting cell cycle and DNA synthesis [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 194: 269-279.

- [4] LI H M, JIANG D Z, ZHANG L, et al. Inhibition of tumor growth of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells in a nude mouse xenograft model by the total flavonoids from *Arachniodes exilis*[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017, 2017: 1-9.
- [5] LI X J Y, SUN R, LIU R P. Natural products in licorice for the therapy of liver diseases: Progress and future opportunities [J]. Pharmacological Research, 2019, 144: 210-226.
- [6] HUSSAIN S S, ZHANG F, ZHANG Y, et al. Stevenleaf from *Gynostemma pentaphyllum* inhibits human hepatoma cell (HepG2) through cell cycle arrest and apoptotic induction[J]. Food Science and Human Wellness, 2020, 9(3): 295-303.
- [7] CHEN T P, HAO J X, HE J F, et al. Cannabisin B induces autophagic cell death by inhibiting the AKT/mTOR pathway and S phase cell cycle arrest in HepG2 cells[J]. Food Chemistry, 2013, 138(2/3): 1034-1041.
- [8] 田笑,金梅花,刘莉园,等.大豆异黄酮诱导小鼠肝癌移植瘤细胞凋亡的机制[J].食品科学,2018,39(17): 122-126.  
TIAN X, JIN M H, LIU L Y, et al. Mechanism of soy isoflavones inducing apoptosis in transplanted tumor tumors of mouse liver cancer[J]. Food Science, 2018, 39(17): 122-126.
- [9] MU J S, LIU T R, JIANG L, et al. The traditional Chinese medicine baicalein potently inhibits gastric

- cancer cells[J]. Journal of Cancer, 2016, 7(4): 453–461.
- [10] INDRAN I R, TUFO G, PERVAIZ S, et al. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1807(6): 735–745.
- [11] EGBLAD M, WERB Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression[J]. Nature Reviews Cancer, 2002, 2(3): 161–174.
- [12] 李思萱, 宗丽娜, 张家瑜, 等. 甜荞麦中生物活性成分及其功效研究进展[J]. 粮食加工, 2019, 44(6): 56–59.
- LI S X, ZONG L N, ZHANG J Y, et al. Research progress on bioactive components and their efficacy in sweet buckwheat[J]. Grain Processing, 2019, 44(6): 56–59.
- [13] KANG M S, HAM Y M, DAE-JU O H, et al. Lapathoside A isolated from *Fagopyrum esculentum* induces apoptosis in human pancreatic cancer cells[J]. Anticancer Research, 2021, 41(2): 747–756.
- [14] LEE L, HOU Y, HSIEH Y, et al. Dietary supplementation of rutin and rutin-rich buckwheat elevates endogenous glucagon-like peptide 1 levels to facilitate glycemic control in type 2 diabetic mice[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 85: 104653.
- [15] ZIELIŃSKI H, SZAWARA-NOWAK D, WRONKOWSKA M. Bioaccessibility of anti-AGEs activity, antioxidant capacity and phenolics from water biscuits prepared from fermented buckwheat flours[J]. LWT, 2020, 123: 109051.
- [16] HUANG Z R, DENG J C, LI Q Y, et al. The protective mechanism of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) against nonalcoholic fatty liver disease associated with dyslipidemia in mice fed a high-fat and high-cholesterol diet[J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(24): 6530–6543.
- [17] TOMOTAKE H, KAYASHITA J, KATO N. Hypolipidemic activity of common (*Fagopyrum esculentum* Moench.) and tartary (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) buckwheat[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015, 95(10): 1963–1967.
- [18] 张超, 李冀新. 荞麦壳的研究进展[J]. 粮油食品科技, 2006(3): 8–9.
- ZHANG C, LI J X. Research progress of buckwheat husk[J]. Cereals, Oils and Food Science and Technology, 2006(3): 8–9.
- [19] LI P C, TANG Y F, LIU L M, et al. Therapeutic potential of buckwheat hull flavonoids in db/db mice, a model of type 2 diabetes – ScienceDirect[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 52: 284–290.
- [20] LI T Z, YANG Y Y, WANG X J, et al. Flavonoids derived from buckwheat hull can break advanced glycation end-products and improve diabetic nephropathy[J]. Food & Function, 2021, 12(16): 7161–7170.
- [21] 赵梓瀛, 朴春红, 王玉华, 等. 荞麦壳提取物有效组分的分离及体外抗糖尿病活性[J]. 食品科学, 2018, 39(3): 21–27.
- ZHAO Z Y, PIAO C H, WANG Y H, et al. Isolation of active components of buckwheat husk extract and antidiabetic activity *in vitro*[J]. Food Science, 2018, 39(3): 21–27.
- [22] CUI Y, ZHAO Z Y, LIU Z Q, et al. Purification and identification of buckwheat hull flavonoids and its comparative evaluation on antioxidant and cytoprotective activity *in vitro*[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(7): 3882–3892.
- [23] AUGOFF K. MMP9: A tough target for targeted therapy for cancer[J]. Cancers (Basel), 2022, 14(7): 1407–1847.
- [24] SONG Y G, KANG L, TIAN S, et al. Study on the anti-hepatocarcinoma effect and molecular mechanism of *Prunella vulgaris* total flavonoids[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 273: 113891.
- [25] ZHAO X Y, CHEN R Y, SHI Y Y, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids from *Smilax glabra* Roxb[J]. Molecules, 2020, 25(22): 5295.
- [26] GRIGALIUS I, PETRIKAITĖ V. Relationship between antioxidant and anticancer activity of trihydroxyflavones[J]. Molecules, 2017, 22(12): 2169.
- [27] XU X B, LAI Y Y, HUA Z C. Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials[J]. Bioscience Reports, 2019, 39(1): BSR20180992.
- [28] KHORSANDI L, ORAZIZADEH M, NIAZVAND F, et al. Quercetin induces apoptosis and necroptosis in MCF-7 breast cancer cells[J]. Bratislava Medical Journal, 2017, 118(2): 123–128.

- [29] KASHAFI E, MORADZADEH M, MOHAMAD-KHANI A, et al. Kaempferol increases apoptosis in human cervical cancer HeLa cells via PI3K/AKT and telomerase pathways[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 89: 573–577.
- [30] ZHANG H T, LUO H. Galangin induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through the caspase 8/t-Bid mitochondrial pathway[J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2012, 14(7): 626–633.
- [31] RANJAN K, WAGHELA B N, VAIDYA F U, et al. Cell-penetrable peptide-conjugated FADD induces apoptosis and regulates inflammatory signaling in cancer cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(18): 6890.
- [32] MCILWAIN DR B T M T. Caspase functions in cell death and disease[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(4): a8656.
- [33] YANG A H, ZHANG P, SUN Z, et al. Lysionotin induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via caspase-3 mediated mitochondrial pathway[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2021, 344: 109500.
- [34] SIDDIQUI S, UPADHYAY S, AHMAD I, et al. Cytotoxicity of *Moringa oleifera* fruits on human liver cancer and molecular docking analysis of bioactive constituents against caspase-3 enzyme[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2021, 45(5): e13720.
- [35] PARK K S, KIM S J, KIM K H, et al. Clinical characteristics of TIMP2, MMP2, and MMP9 gene polymorphisms in colorectal cancer[J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2011, 26(2): 391–397.
- [36] LIU H, LI J Y, YUAN W W, et al. Bioactive components and mechanisms of poplar propolis in inhibiting proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 144: 112364.

### Mechanism of Buckwheat Hull Flavonoids in Inducement Apoptosis and Inhibition Migration of Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells

Jiang Xin<sup>1</sup>, Li Tianzhu<sup>1</sup>, Wang Yue<sup>1</sup>, Liu Ziqi<sup>1</sup>, Wang Xiujuan<sup>1</sup>, Piao Chunhong<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118

<sup>2</sup>School of Food and Pharmaceutical Engineering (Guangxi Liupao Tea Modern Industry College), Wuzhou University, Wuzhou 543002, Guangxi)

**Abstract** To investigate the effect of buckwheat hull flavonoids (BHF) on apoptosis and migration of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. The inhibitory effect of BHF on human lung cancer A549 cells, human cervical cancer HeLa cells, human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and human normal liver L-02 cells was evaluated by MTT colorimetric method, and HepG2 cells were further selected as experimental subjects. Cell morphology was analyzed by Hoechst 33345/PI double staining, JC-1 fluorescence probe detection, Annexin V-FITC/PI flow cytometry, wound healing assay, and Western blot analysis of BHF pretreatment to investigate the effects of apoptosis and migration of HepG2 cells and the potential mechanism. The results showed that BHF could effectively inhibit the viability of A549, HeLa and HepG2 cells, the inhibitory effect on HepG2 cells was the most significant, the survival rate of HepG2 cells was 53.62% after treatment with 50  $\mu\text{g/mL}$  for 48 h, and had no effect on L-02 cells viability. Compared with the untreated group, BHF inhibited the proliferation of HepG2 cells in a dose-dependent manner, decreased mitochondrial membrane potential, down-regulated the expression of apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-XL, increased the expression of FADD and cleaved-Caspase-3, and decreased the expression of migratory protein MMP 9, and the effect was significantly superior to that of positive control of rutin. The results indicate that BHF have anti-tumor ability, and the inhibition of HepG2 cell proliferation may be related to the induction of mitochondrial, death receptor cell apoptosis and the inhibition of cell migration.

**Keywords** buckwheat hull flavonoids; cancer; hepatocellular carcinoma; cell apoptosis; cell migration