

# 芡实壳醇提物抑制人胃癌 SGC7901 细胞和人肝癌 HepG2 细胞增殖并促进其凋亡

殷东杰<sup>1</sup>, 薛梦恒<sup>1</sup>, 杨过<sup>1</sup>, 黄永康<sup>1</sup>, 易阳<sup>2,3</sup>, 王宏勋<sup>1,3</sup>, 王丽梅<sup>1,3\*</sup>

(1. 武汉轻工大学生命科学与技术学院, 湖北武汉 430023) (2. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北武汉 430023) (3. 湖北省生鲜食品工程技术研究中心, 湖北武汉 430023)

**摘要:** 为明确芡实壳醇提物对 SGC7901 及 HepG2 细胞体外抑制作用及机制。该研究采用 75%乙醇对芡实壳超声提取, 采用福林酚法测定醇提物总酚含量, 采用 CCK-8 法检测醇提物对 SGC7901 和 HepG2 细胞的增殖作用抑制率并计算 IC<sub>50</sub> 值, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡、细胞周期、细胞线粒体膜电位及胞内钙离子浓度。结果表明, 醇提物对 SGC7901 和 HepG2 细胞具有增殖抑制作用, 浓度为 200 μg/mL 的醇提物作用细胞 48 h 后, 抑制率分别为 92.63%和 72.40%。细胞周期检测表明, 浓度为 200~800 μg/mL 的醇提物可使 SGC7901 细胞阻滞于 G0/G1 期; 浓度为 50~200 μg/mL 的醇提物可使 HepG2 细胞阻滞于 S 期。细胞线粒体膜电位测定表明, 醇提物可使 SGC7901 和 HepG2 细胞线粒体膜电位下降且具浓度依赖性, 醇提物浓度为 200 μg/mL 时, 细胞线粒体膜电位相对对照组分别下降 21.92%和 53.81%。细胞钙离子浓度测定表明, 醇提物可使 SGC7901 和 HepG2 细胞内钙离子浓度升高且具浓度依赖性, 醇提物浓度为 200 μg/mL 时, 胞内钙离子浓度相对对照组分别上升 21.85%和 14.14%。实验表明芡实壳醇提物可抑制 SGC7901 和 HepG2 细胞增殖并诱导其凋亡, 其作用机制可能与细胞线粒体膜电位降低及胞内钙离子浓度升高有关。

**关键词:** 芡实壳; 人胃癌 SGC7901 细胞; 人肝癌 HepG2 细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡

文章编号: 1673-9078(2022)06-55-65

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.6.0822

## The Alcoholic Extract of *Euryale ferox* Seed Shell Inhibits the Proliferation of Human Gastric Cancer SGC7901 Cells and Human Hepatoma HepG2 Cells and Promotes Their Apoptosis

YIN Dongjie<sup>1</sup>, XUE Mengheng<sup>1</sup>, YANG Guo<sup>1</sup>, HUANG Yongkang<sup>1</sup>, YI Yang<sup>2,3</sup>, WANG Hongxun<sup>1,3</sup>, WANG Limei<sup>1,3\*</sup>

(1.School of Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

(2.School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

(3.Hubei Engineering Research Center for Fresh Food, Wuhan 430023, China)

**Abstract:** To clarify the *in vitro* inhibitory effect and mechanism of the alcoholic extract from *Euryale ferox* seed shell on human stomach cancer SGC7901 and human liver cancer HepG2 cells. In this study, 75% ethanol was used for ultrasonic extraction of *Euryale ferox* seed shell and the Folin-Phenol method was used to determine the content of total phenolics; the cell counting Kit-8 (CCK-8) was used to detect the inhibitory rates of the alcoholic extract on the proliferation of SGC7901 and HepG2 cells, and then the IC<sub>50</sub> values were calculated. The flow cytometry was used to detect cell apoptosis, cell cycle, mitochondrial membrane potential and intracellular calcium ion concentration.

引文格式:

殷东杰,薛梦恒,杨过,等.芡实壳醇提物抑制人胃癌 SGC7901 细胞和人肝癌 HepG2 细胞增殖并促进其凋亡[J].现代食品科技,2022,38(6):55-65

YIN Dongjie, XUE Mengheng, YANG Guo, et al. The alcoholic extract of *Euryale ferox* seed shell inhibits the proliferation of human gastric cancer SGC7901 cells and human hepatoma HepG2 cells and promotes their apoptosis [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(6): 55-65

收稿日期: 2021-07-30

基金项目: 湖北省重点研发计划项目 (2020BBB074); 武汉轻工大学校立重点项目 (2013d11)

作者简介: 殷东杰 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 植物活性功能成分, E-mail: kimisayi@foxmail.com

通讯作者: 王丽梅 (1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 营养生物学, E-mail: wanglimeiyx@163.com

cytometer was used to detect the apoptosis, cell cycle, cell mitochondrial membrane potential and intracellular calcium concentration. The results showed that the alcoholic extract had an inhibitory effect on the proliferation of SGC7901 cells and HepG2 cells, with the inhibition rate being 92.63% and 72.40%, respectively after the treatment with the extract at 200  $\mu\text{g/mL}$  for 48 h. The cell cycle detection showed that the alcoholic extract at 200~800  $\mu\text{g/mL}$  could arrest SGC7901 cells in the G0/G1 phase; the alcoholic extract at 50~200  $\mu\text{g/mL}$  could arrest HepG2 cells in the S phase. The measurements of the cell mitochondrial membrane potential showed that the alcoholic extract could decrease the cell mitochondrial membrane potential of SGC7901 cells and HepG2 cells in a concentration-dependent manner, the cell mitochondrial membrane potential values of SGC7901 cells and HepG2 cells were reduced by 21.92% and 53.81%, respectively, compared with the control group, when the concentration of the alcoholic extract was at 200  $\mu\text{g/mL}$ . The determination of intracellular calcium concentration showed that the alcoholic extract could increase the intracellular calcium ion concentration of SGC7901 cells and HepG2 cells in a concentration-dependent manner. When the extract concentration was 200  $\mu\text{g/mL}$ , the intracellular calcium ion concentrations of SGC7901 cells and HepG2 cells increased by 21.85% and 14.14%, respectively, compared with the control group. Experimental results showed that the alcoholic extract of *Euryale ferox* seed shell could inhibit the proliferation and induce the apoptosis of SGC7901 and HepG2 cells, and the underlying mechanism might be related to the reduction of cell mitochondrial membrane potential and the increase of intracellular calcium ion concentration.

**Key words:** *Euryale ferox* seed shell; human gastric cancer SGC7901 cells; human hepatoma HepG2 cells; cell proliferation; apoptosis

芡实 (*Euryale ferox* Salib.) 又称卵菱, 为睡莲科一年生水生草本植物芡的干燥成熟种仁。芡实是我国传统的食用蔬果, 栽培历史悠久, 种植广泛, 在我国南北各省均有分布<sup>[1]</sup>。《神农本草经》记载, 芡实味甘、涩, 性平, 具有益肾固精、补脾止泻、除湿止带的疗效<sup>[2]</sup>, 中医将其归于脾、肾二经, 并广泛用于治疗遗精滑精, 遗尿尿频, 脾虚久泻之症<sup>[3]</sup>。现代药理学研究发现芡实具有抗炎<sup>[4]</sup>、抗心肌缺血<sup>[5]</sup>、降血糖<sup>[6,7]</sup>、抑制肿瘤<sup>[8,9]</sup>等作用。

多酚类化合物主要包括类黄酮、酚酸、单宁、香豆素类、木脂素类、芪类等物质。大量研究表明, 众多植物天然多酚具有抑制肿瘤等作用, 并且具有作用温和, 对机体细胞毒性较低的优点<sup>[10,11]</sup>。植物天然多酚已被证明在清除导致 DNA 损伤、促进肿瘤发生的单线态氧和各种自由基方面十分有效<sup>[12]</sup>。Zhang<sup>[13]</sup>发现芡实壳提取物表现出抗氧化活性、自由基清除能力及对脂质过氧化的抑制作用, 福林酚法及 HPLC 测定表明芡实壳提取物酚类物质含量丰富且主要成分为没食子酸及芦丁, 推测这可能是芡实壳提取物具抗氧化能力的主要原因。Fang 等<sup>[14]</sup>用植物多酚新绿原酸对移植了 AGS 胃癌细胞的小鼠进行处理, 结果显示新绿原酸能诱导癌细胞凋亡及阻止癌细胞的迁移和侵袭。

我国芡实种植范围广, 产量高, 但芡实壳作为副产品被大量丢弃, 未被深入研究及开发利用。相关研究表明芡实壳醇提物中含有大量酚类物质, 能清除体外自由基, 具有良好的抗氧化能力<sup>[15-19]</sup>。Lee 等<sup>[20]</sup>发现芡实提取物具有清除高水平的 DPPH 自由基, 抑制脂质过氧化, 促进细胞活力, 保护  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的细胞凋亡并增强各种抗氧化酶的作用。WU 等<sup>[21]</sup>通过小鼠体内抗氧化试验, 表明口服芡实壳酚提取物可提高衰

老小鼠肝、肾中 SOD、CAT、GSH-Px 的活性, 降低 MDA 水平及降低小鼠游泳后 BUN 含量, 增加 HG 含量, 证实了芡实壳酚提取物的抗氧化活性和抗疲劳作用。

本课题组前期通过实验筛选发现, 芡实壳醇提物对人肝癌 HepG2 细胞及人胃癌 SGC7901 细胞的抑制增殖作用较强。为进一步评价芡实壳醇提物生物活性, 本文考察芡实壳醇提物对人肝癌 HepG2 细胞及人胃癌 SGC7901 细胞的体外抗肿瘤活性并初步探讨可能的作用机理, 为抗肿瘤天然产物资源筛选提供依据, 也为芡实资源综合开发利用提供了理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

芡实壳, 购买自武汉武商量贩超市; DMEM、F12 培养基、PBS, Hyclone 公司; FBS、双抗、胰蛋白酶, 杭州四季青生物工程材料公司; 细胞凋亡试剂盒、细胞周期检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒、细胞内钙离子浓度检测试剂盒, Solaibio 公司; 人胃癌细胞株 SGC7901、人肝癌细胞株 HepG2, 湖北百奥斯生物技术有限公司。

### 1.2 仪器与设备

酶标仪, Thermo Fisher 公司; 离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; 微量移液器, 德国 Eppendorf 公司; T25 培养瓶、96 孔板、冻存管、6 孔板, 美国 Coming 公司; SCHP-80  $\text{CO}_2$  培养箱, 常州恒德仪器有限公司; 流式细胞仪, BD 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 芡实壳醇提取物制备过程

取新鲜芡实壳置于 50 °C 烘箱内烘干, 研磨机磨碎后用 75% 乙醇超声提取, 经真空冷冻干燥机浓缩冻干后得到芡实壳醇提取物冻干粉。

#### 1.3.2 CCK-8 法检测芡实壳提取物对肿瘤细胞的抑制率<sup>[22,23]</sup>

取处于对数生长期的 SGC7901 细胞及 HepG2 细胞, 用胰蛋白酶进行消化, 用含有 10% 胎牛血清及 1% 双抗的 DMEM 培养基吹打为细胞悬液, 调整细胞密度为  $4 \times 10^4$  cells/mL, 接种于 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ L。于 37 °C, 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h, 弃去培养基, PBS 冲洗后加入含有不同浓度芡实壳醇提取物的培养基 100  $\mu$ L, 分别培养 24 h、48 h, 每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂, 孵育 3 h 后用酶标仪测定 450 nm 处吸光值。细胞增殖抑制率计算公式为:

$$\text{抑制率}/\% = (1 - \frac{OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}}}{OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}}}) \times 100\%$$

#### 1.3.3 Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡<sup>[24,25]</sup>

取处于对数生长期且密度为  $1 \times 10^5$  cells/mL 的细胞悬液并接种于 6 孔板中, 每孔 1 mL, 培养 24 h 后加入 1 mL 含不同浓度芡实壳醇提取物的培养基, 继续培养 24 h。胰蛋白酶消化离心后收集细胞, 预冷 PBS 洗涤细胞两次, 弃去 PBS, 用 Annexin V 结合液调整悬浮细胞密度为  $5 \times 10^4$  cells/mL, 加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 染色液 4 °C 避光染色 15 min, 加入 10  $\mu$ L PI 染色液 4 °C 避光孵育 5 min, 用流式细胞仪进行检测。

#### 1.3.4 细胞周期检测<sup>[26,27]</sup>

取处于对数生长期且密度为  $1 \times 10^6$  cells/mL 的细胞悬液并接种于 6 孔板中, 每孔 1 mL, 培养 24 h 后加入 1 mL 含不同浓度芡实壳醇提取物的培养基, 继续培养 24 h。胰酶消化细胞, 4 °C、1500 r/min 离心 5 min 收集细胞, 预冷 PBS 洗涤细胞两次, 弃去 PBS, 加入预冷的 75% 乙醇, 4 °C 固定过夜。离心收集固定后的细胞, 加入 RNA 酶 200  $\mu$ L, 37 °C 避光孵育 30 min, 再加入 PI 100  $\mu$ L 并在 4 °C 避光染色 30 min, 用流式细胞仪进行检测。

#### 1.3.5 细胞线粒体膜电位检测

取处于对数生长期且密度为  $1 \times 10^5$  cells/mL 的细胞悬液并接种于 6 孔板中, 每孔 1 mL, 培养 24 h 加入 1 mL 含不同浓度芡实壳醇提取物的培养基, 继续培养 24 h。胰蛋白酶消化离心后收集细胞, 加入 0.5 mL JC-1 染色工作液 37 °C 孵育 20 min, JC-1 染色缓冲液冲洗细胞 2 次, 并调整悬浮细胞密度为  $5 \times 10^4$  cells/mL,

用流式细胞仪进行检测。

#### 1.3.6 细胞钙离子浓度检测

取处于对数生长期且密度为  $1 \times 10^5$  cells/mL 的细胞悬液并接种于 6 孔板中, 每孔 1 mL, 培养 24 h 后加入 1 mL 含不同浓度芡实壳醇提取物的培养基, 继续培养 24 h。胰蛋白酶消化离心后收集细胞, HBSS 清洗两次后调整细胞密度为  $5 \times 10^4$  cells/mL, 加入 BB cell Probe TM F3 染色工作液, 在 37 °C 孵育 20 min。HBSS 洗涤细胞 2~3 次重悬细胞, 37 °C 孵育 10 min, 用流式细胞仪进行检测。

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析, 统计数据采用均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD), 组间差别采用独立样本 *t* 检验,  $\alpha=0.05$ ,  $p<0.05$  则表明差异具统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 芡实壳提取物组分分析

用 75% 乙醇对芡实壳回流提取并采用福林酚法测定其总酚含量<sup>[28]</sup>, 由表 1 可知, 芡实壳醇提取物样品中总酚含量约为 43.96%, 得率达 9.19%。用 UPLC-HR-MS 法鉴定芡实壳醇提取物中主要有效成分, 结果表明老鹳草素、柯里拉京、1,2,3,6-四-O-没食子酰- $\beta$ -D-葡萄糖、鞣花酸、石榴皮苦素 B 为醇提取物中主要的多酚类物质。单恬恬<sup>[29]</sup>通过 CCK-8 增殖实验表明, 芡实壳醇提取物中具抗肿瘤活性的主要多酚类物质有鞣花酸、柯里拉京、老鹳草素。

表 1 芡实壳醇提取物多酚含量

Table 1 The content of polyphenols in the ethanol extract of

*Euryale ferox* seed shell

样品	得率/%	总酚含量/%
芡实壳醇提取物	9.19	43.96 $\pm$ 0.09

### 2.2 芡实壳醇提取物对肿瘤细胞体外抑制作用

利用 CCK-8 法分别测定芡实壳醇提取物对 SGC7901 及 HepG2 细胞的生长抑制作用。由表 2 数据分析可知, 芡实壳醇提取物作用 SGC7901 细胞 24 h 后, 在 100~800  $\mu$ g/mL 浓度范围内有显著抑制作用, 抑制率在 37.40%~58.22%之间 ( $p<0.05$ ); 醇提取物作用 SGC7901 细胞 48 h 后, 在 50~800  $\mu$ g/mL 浓度范围内有显著抑制作用, 抑制率在 33.44%~92.31%之间 ( $p<0.05$ ); 醇提取物作用 HepG2 细胞 24 h 后, 在 200~800  $\mu$ g/mL 浓度范围内有显著抑制作用, 抑制率在 35.52%~57.26%之间 ( $p<0.05$ ); 醇提取物作用 HepG2

细胞 48 h 后, 在 100~800  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内有显著抑制作用, 抑制率在 50.83%~98.18%之间 ( $p<0.05$ )。随细胞处理时间及芡实壳醇提物剂量的增加, 两种细胞的增殖抑制率呈现明显上升趋势, 这表明芡实壳醇提物对 SGC7901 及 HepG2 细胞增殖影响具有显著的时间及剂量依赖性。Nam 等<sup>[7]</sup>研究结果表明, 150  $\mu\text{g/mL}$  芡实壳醇提物作用 A549 细胞、HepG2 细胞、Hep3B 等细胞 24 h 后, 对各种细胞抑制率都在 35%以上, 说

明芡实壳醇提物对这些肿瘤细胞的增殖都具有一定抑制作用。

由表 3 可知, 芡实壳醇提物对 SGC7901 和 HepG2 细胞作用 24 h 的  $\text{IC}_{50}$  分别为 457.69、556.52  $\mu\text{g/mL}$ ; 作用 48 h 的  $\text{IC}_{50}$  分别为 87.05、148.59  $\mu\text{g/mL}$ 。数据表明芡实壳醇提物对 SGC7901 细胞的增殖抑制效果略高于 HepG2 细胞。

表 2 芡实壳醇提物对 SGC7901 及 HepG2 细胞增殖影响

Table 2 Inhibition of SGC7901 and HepG2 cells by *Euryale ferox* seed shell ethanol extract

剂量 /( $\mu\text{g/mL}$ )	SGC7901 细胞增殖抑制率/%		HepG2 细胞增殖抑制率/%	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	-	-	-	-
50	18.23 $\pm$ 2.10	33.44 $\pm$ 1.12*	4.97 $\pm$ 2.08	27.42 $\pm$ 3.07
100	37.40 $\pm$ 1.07*	82.16 $\pm$ 2.06**	18.21 $\pm$ 1.13	50.83 $\pm$ 4.15*
200	58.31 $\pm$ 1.13*	92.63 $\pm$ 1.13**	35.52 $\pm$ 2.02*	72.40 $\pm$ 2.13**
400	57.59 $\pm$ 1.71*	92.60 $\pm$ 1.11**	56.58 $\pm$ 2.12*	88.67 $\pm$ 1.12**
800	58.22 $\pm$ 1.11*	92.31 $\pm$ 3.14**	57.26 $\pm$ 3.09*	98.18 $\pm$ 2.11**

注: -表示无抑制效果; 与空白组相比, \*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$ 。

表 3 芡实壳醇提物对 SGC7901 及 HepG2 细胞作用  $\text{IC}_{50}$  值

Table 3  $\text{IC}_{50}$  of SGC7901 and HepG2 cells by effect of *Euryale ferox* seed shell ethanol extract

时间/h	SGC-7901 细胞作用 $\text{IC}_{50}$ 值/( $\mu\text{g/mL}$ )	HepG2 细胞作用 $\text{IC}_{50}$ 值/( $\mu\text{g/mL}$ )
24	457.69	556.52
48	87.05	148.59

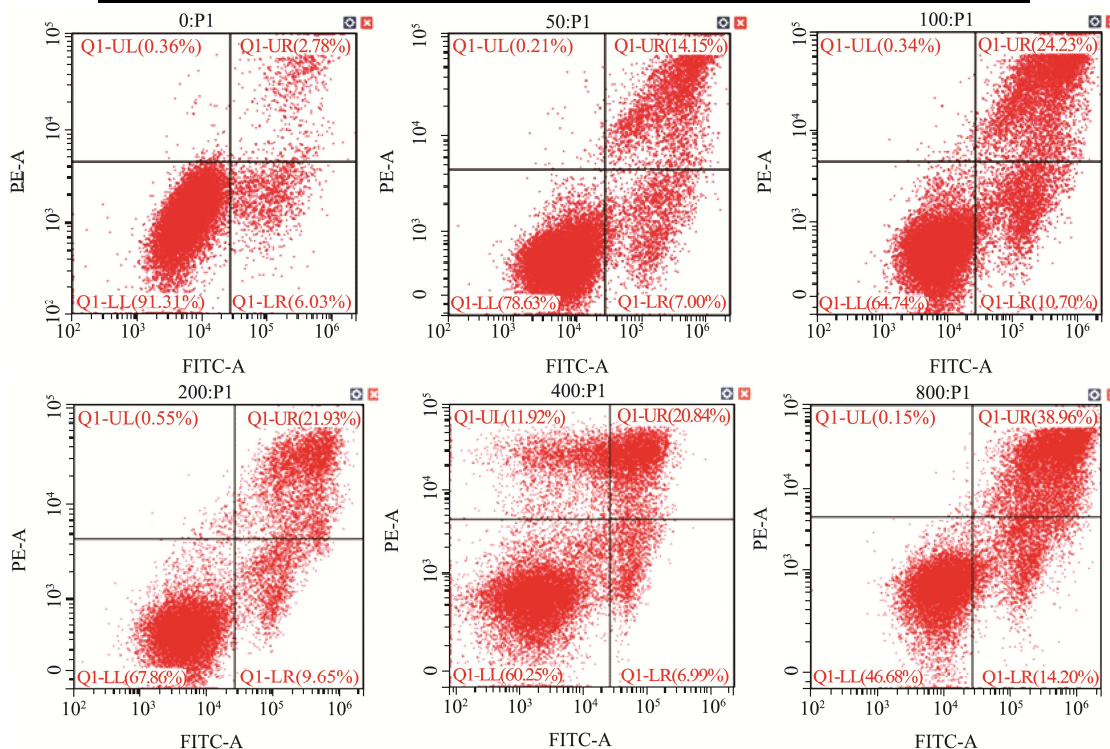


图 1 FITC-Annexin V/PI 双染法检测 SGC7901 细胞凋亡率 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Fig.1 FITC-Annexin V/PI fluorescence staining for the detection of apoptosis of SGC7901 cells ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

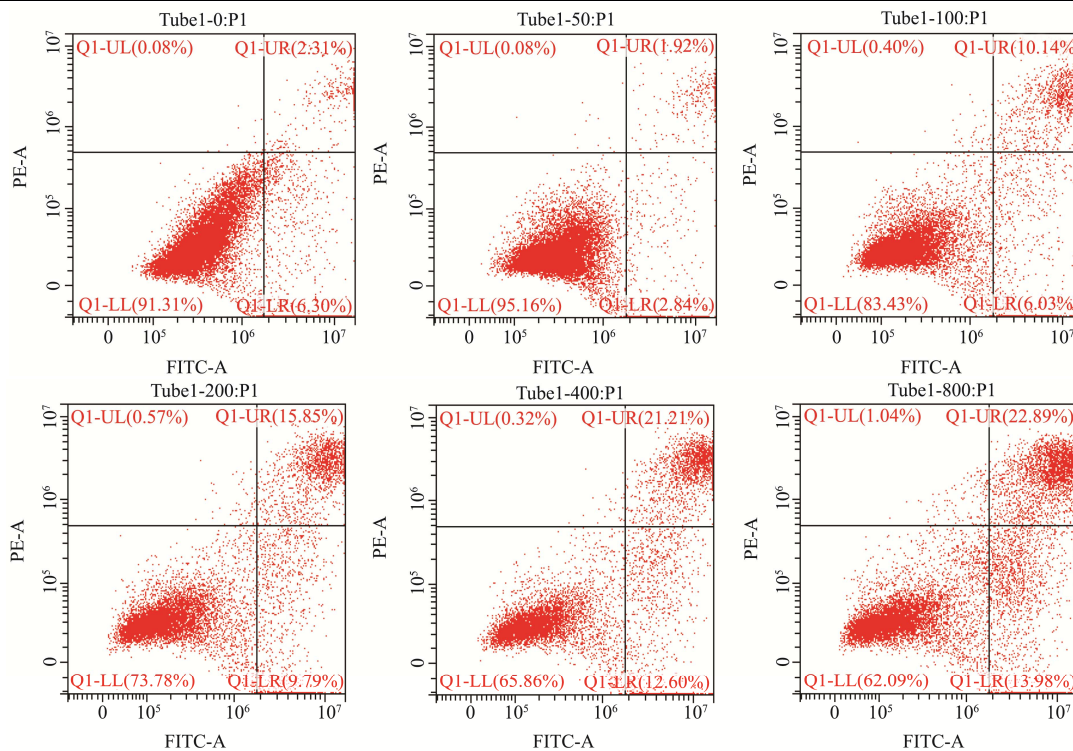


图2 FITC-Annexin V/PI 双染法检测 HepG2 细胞凋亡率 (x±s, n=3)

Fig.2 FITC-Annexin V/PI fluorescence staining for the detection of apoptosis of HepG2 cells (x±s, n=3)

### 2.3 芡实壳醇提取物对细胞凋亡的影响

如图1和图2所示,采用FITC-Annexin V/PI双染法检测芡实壳醇提取物对SGC7901及HepG2细胞凋亡影响。结果显示芡实壳醇提取物可促进SGC7901及HepG2细胞凋亡,随芡实壳醇提取物浓度增加,细胞凋亡比例也随之增大,表明芡实壳醇提取物对两种癌细胞的促凋亡作用具有浓度依赖性。

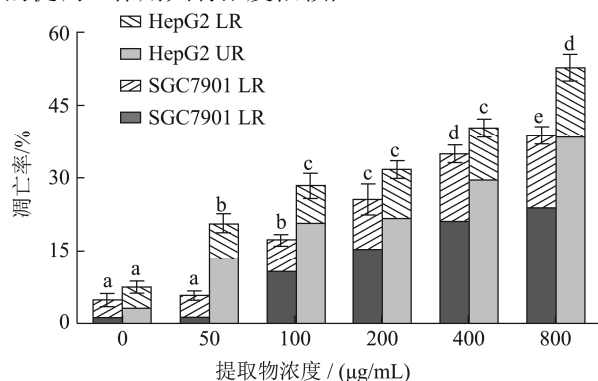


图3 FITC-Annexin V/PI 双染法检测芡实壳醇提取物对SGC7901及HepG2细胞凋亡影响

Fig.3 FITC-Annexin V/PI fluorescence staining for the detection of apoptosis of SGC7901 and HepG2 cells by *Euryale ferox* seed shell ethanol extract

注: 相同细胞在不同芡实壳醇提取物浓度下显著性差异采用不同小写英文字母表示 ( $p < 0.05$ )。

由图3可知,晚期凋亡细胞在总凋亡细胞中占多

数,表明流式结果具说服力;SGC7901在芡实壳醇提取物作用下凋亡率高于HepG2细胞。与空白组相比,醇提取物浓度高于50 µg/mL时可显著促进SGC7901细胞凋亡,高于100 µg/mL时可显著促进HepG2细胞凋亡。曾军英等<sup>[30]</sup>用垂盆草醇提取物对HepG2细胞进行处理,表明该醇提取物可通过抑制Mcl-1和Bcl-2的表达来抑制HepG2细胞的增殖并诱导其凋亡。

### 2.4 芡实壳醇提取物对细胞周期的影响

芡实壳醇提取物对HepG2及SGC7901细胞的细胞周期均存在一定影响。细胞周期检查点被阻滞可引起细胞异常增殖及引发细胞凋亡。由图4可知,芡实壳醇提取物浓度在50~200 µg/mL范围时,随芡实壳醇提取物浓度增加,HepG2中G0/G1期细胞含量显著降低而S期细胞含量显著升高,G2/M期细胞含量无明显变化,表明细胞被阻滞在S期检查点,醇提取物浓度继续升高则对细胞周期无明显影响。

图5中,芡实壳醇提取物浓度低于200 µg/mL时对SGC7901细胞周期无明显影响;当浓度在200 µg/mL以上时,随着醇提取物浓度升高,G0/G1期细胞含量逐渐增加,细胞阻滞于G0/G1期,这表明细胞无法顺利通过G1检查点而被阻滞在G0/G1期。芡实壳醇提取物浓度为800 µg/mL时,HepG2和SGC7901细胞中处于G2/M期的细胞所占比例较其他对应组别明显增加。G2/M检查点有着调节细胞复制的作用,推测芡实壳醇

提取物可能通过影响细胞周期来促使凋亡过程发生。

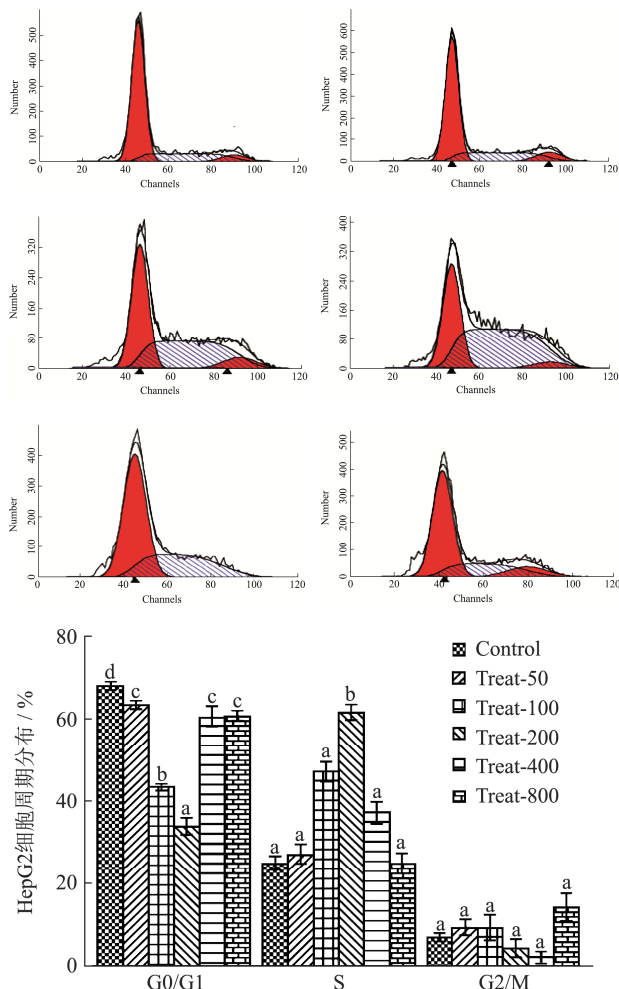


图4 芡实壳醇提取物对 HepG2 细胞周期的影响 (x±s, n=3)  
Fig.4 The effect of *Euryale ferox* seed shell ethanol extract on cell cycle of HepG2 cells (x±s, n=3)

注: 不同芡实壳醇提取物浓度下 HepG2 细胞周期显著性差异采用不同小写英文字母表示 ( $p<0.05$ )。

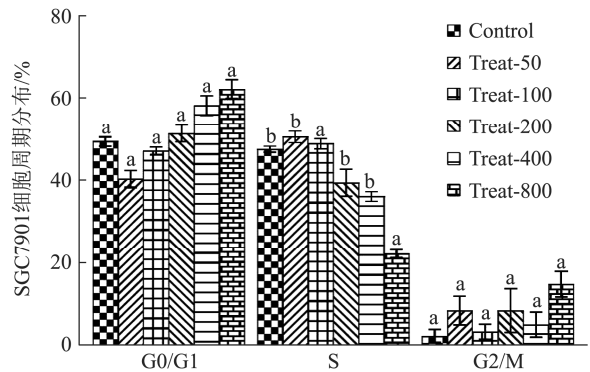
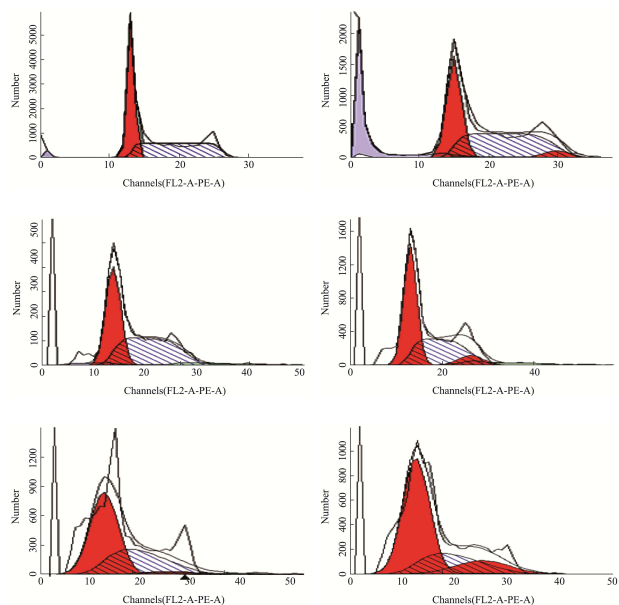


图5 芡实壳醇提取物对 SGC7901 细胞周期影响 (x±s, n=3)  
Fig.5 The effect of *Euryale ferox* seed shell ethanol extract on cell cycle of SGC7901 cells (x±s, n=3)

注: 不同芡实壳醇提取物浓度下 SGC7901 细胞周期显著性差异采用不同小写英文字母表示 ( $p<0.05$ )。

综上所述, 芡实壳醇提取物浓度在 50~200 µg/mL 范围内可使 HepG2 细胞阻滞于 S 期检查点。李科<sup>[31]</sup>研究白藜芦醇对 HepG2 细胞周期的影响, 结果表明白藜芦醇可以将 HepG2 细胞阻滞在 S 期从而抑制 HepG2 细胞的增殖, 作用机制可能与 CDK2 及 Cyclin E 的活性有关; 当提取物浓度在 200 µg/mL 以上时, SGC7901 细胞被阻滞在 G0/G1 期而无法顺利通过 G1 检查点。闫开旭<sup>[32]</sup>将没食子酸作用于 SGC7901 细胞, 结果显示 G0/G1 期细胞数目与没食子酸浓度呈正比, 且早期凋亡细胞数目与没食子酸浓度也呈现出正相关, 表明没食子酸可影响 SGC7901 细胞周期并促使其凋亡, Western Blot 检测结果表明其机制可能是阻断了 Cyclin D1 的表达。

### 2.5 芡实壳醇提取物对细胞线粒体膜电位的影响

芡实壳醇提取物可使 SGC7901 细胞线粒体膜电位下降且呈显著浓度依赖性。线粒体膜电位对营养物质氧化分解、维持胞内能量供应有着重要作用。由图 6 可知, 芡实壳醇提取物可使 SGC7901 细胞线粒体膜电位下降且呈显著浓度依赖性 ( $p<0.01$ ), 醇提取物浓度为 200 µg/mL 时 SGC7901 细胞线粒体膜电位下降率达 21.92%。随提取物浓度不断升高, 线粒体膜电位持续下降; 醇提取物浓度为 800 µg/mL 时线粒体膜电位较对照组降低 56.58%。

由图 7 可知, 相较于 SGC7901 细胞, 芡实壳醇提取物可使 HepG2 细胞线粒体膜电位下降更为明显, 且呈显著浓度依赖性 ( $p<0.01$ )。醇提取物浓度为 200 µg/mL 时 HepG2 细胞线粒体膜电位下降 53.81%; 醇提取物浓度为 800 µg/mL 时线粒体膜电位较对照组降低 84.90%。有研究表明, 线粒体通透性转换孔 (MPTP) 对线粒体内钙离子稳态具有重要作用, MPTP 的形成主要受 Bcl-2 家族调节。MPTP 的开放会使线粒体膜

电位去极化, ATP 合成不足, 使得 Caspases 被活化, 最终导致线粒体凋亡通路激活<sup>[33,34]</sup>。

综上所述, 芡实壳醇提物可能通过作用线粒体膜上的 Bcl-2 家族蛋白来使 SGC7901 和 HepG2 细胞线粒体膜电位下降, 进而激活线粒体凋亡通路从而促进细

胞凋亡的发生。杭佳等<sup>[35]</sup>用白藜主要药效成分之一没食子酸处理人肝癌 HepG2 细胞以研究其作用机制, 结果显示没食子酸在 12.5~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内对 HepG2 细胞生长有明显抑制作用, 其抗肿瘤作用机制可能为通过降低细胞线粒体膜电位而诱导 HepG2 细胞凋亡。

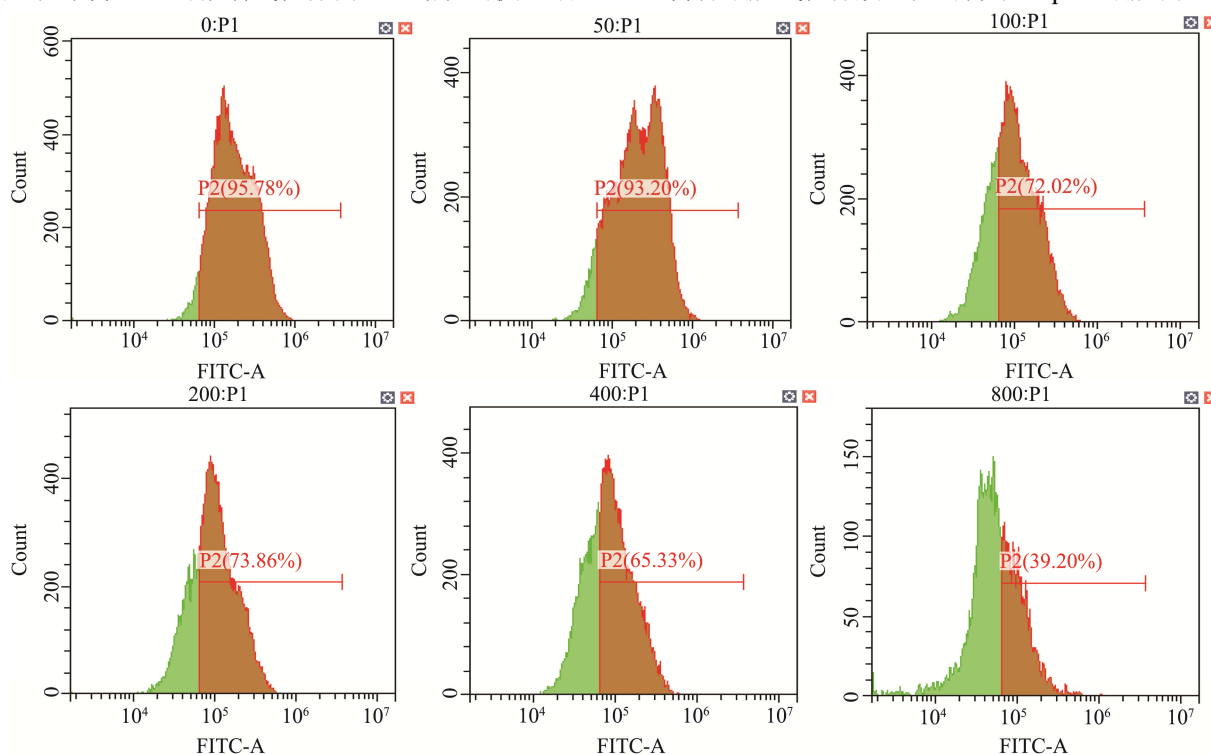


图 6 芡实壳醇提物对 SGC7901 细胞线粒体膜电位的影响

Fig.6 Effect of *Euryale ferox* seed shell ethanol extract on mitochondrial membrane potential of SGC7901 cells

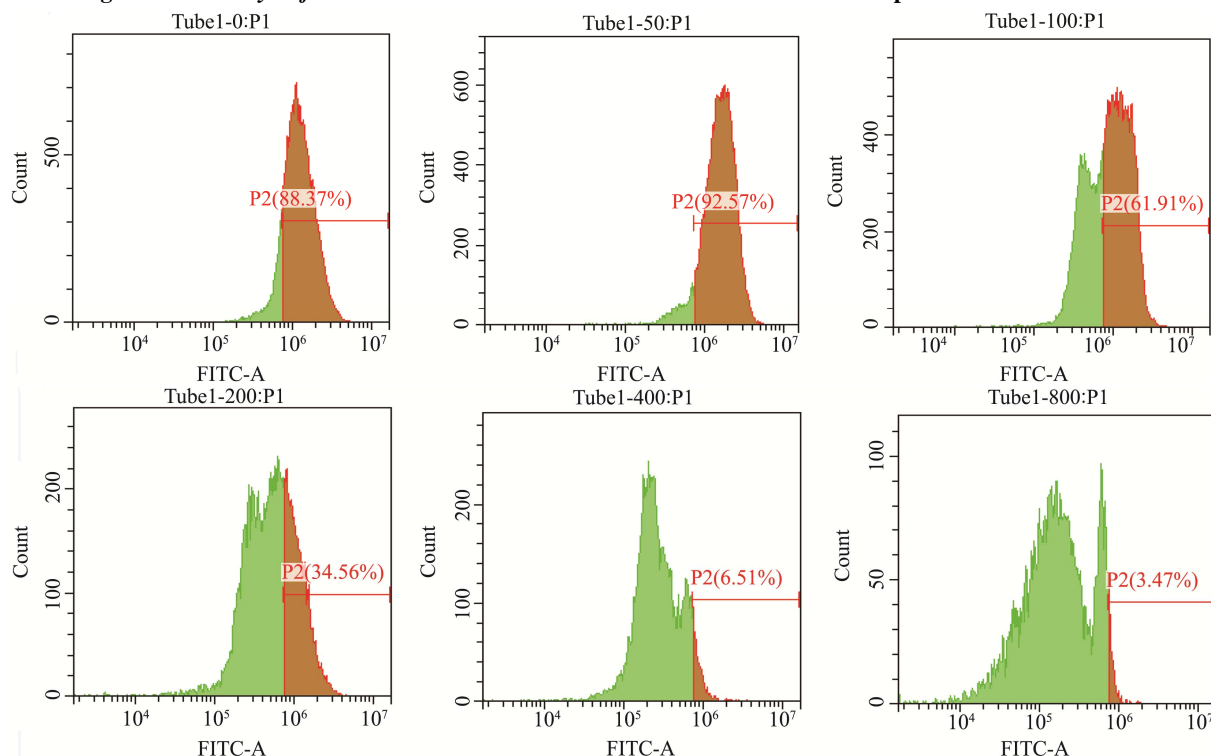


图 7 芡实壳醇提物对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响

Fig.7 Effect of *Euryale ferox* seed shell ethanol extract on mitochondrial membrane potential of HepG2 cells

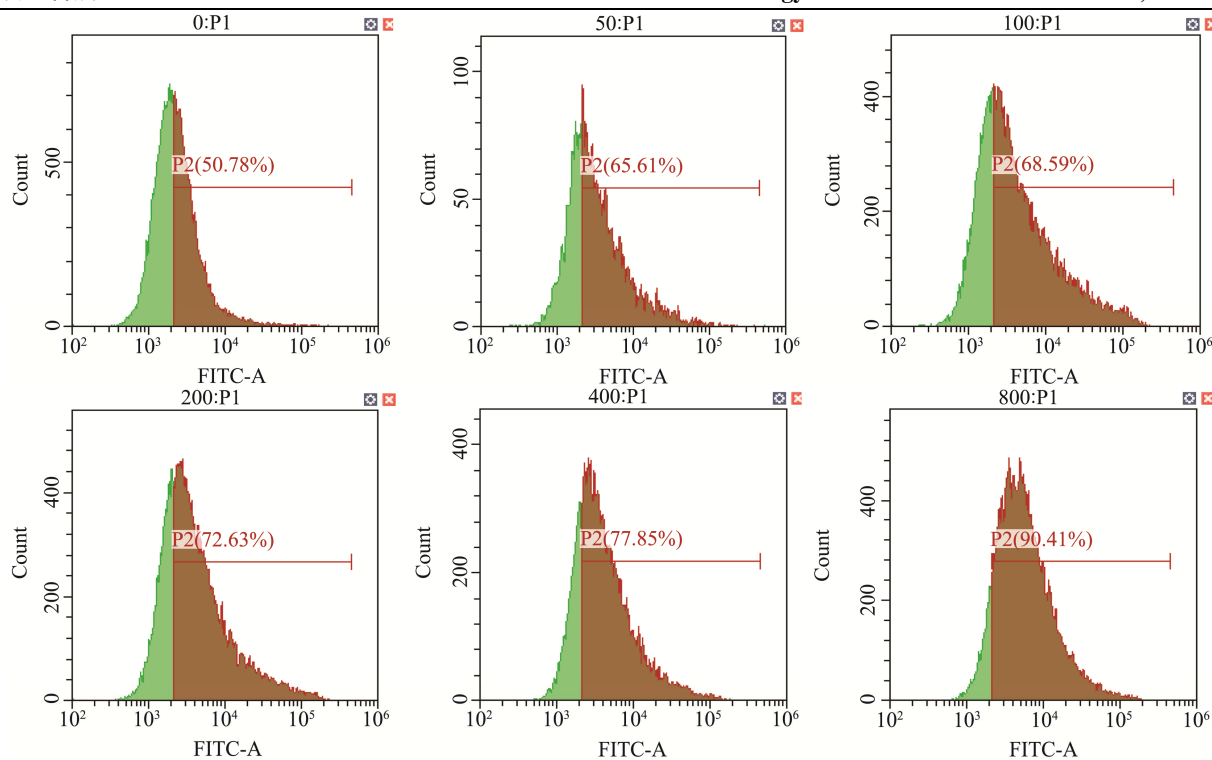


图8 芡实壳醇提取物对SGC7901细胞钙离子浓度影响

Fig.8 Effect of *Euryale ferox* seed shell ethanol extract on intracellular calcium concentration in SGC7901 cells

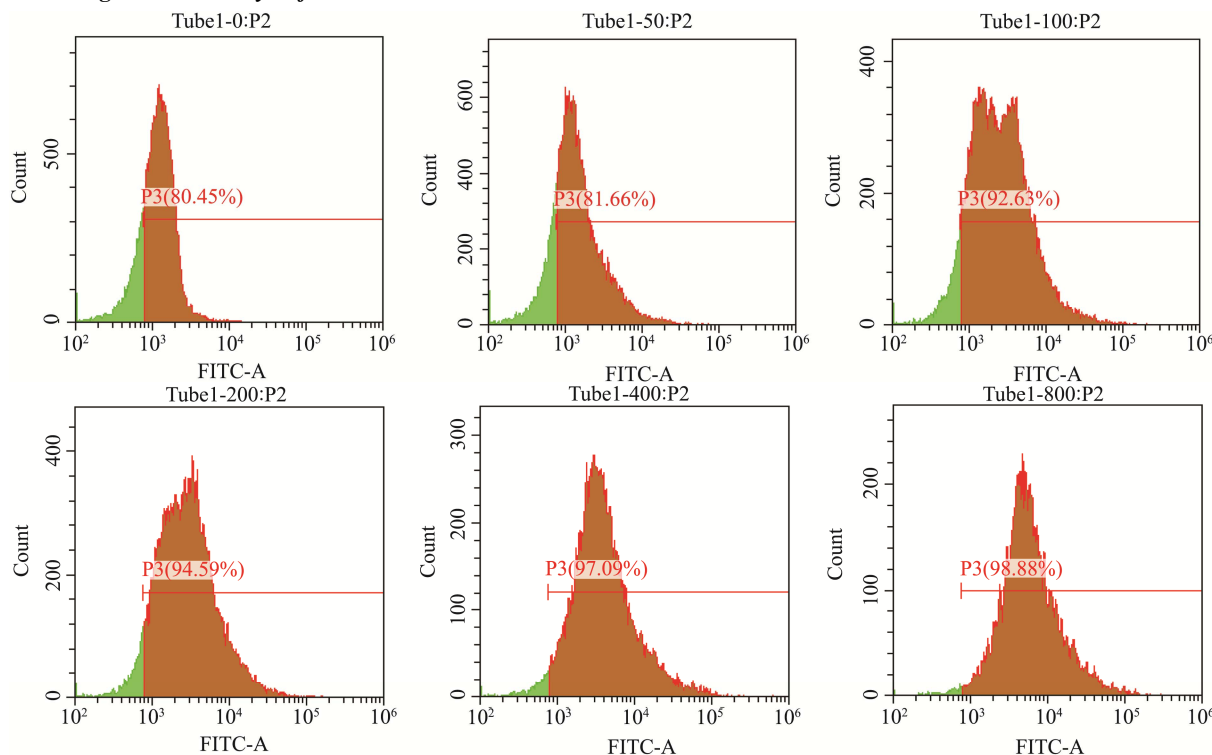


图9 芡实壳醇提取物对HepG2细胞钙离子浓度影响

Fig.9 Effect of *Euryale ferox* seed shell ethanol extract on intracellular calcium concentration in HepG2 cells

## 2.6 芡实壳醇提取物对细胞钙离子浓度的影响

细胞内钙离子是细胞中重要的第二信使，胞质钙离子浓度变化一定程度上可以反映出细胞所处状态，其改变与胞内多种调控相关。染料 Fluo-3-AM 可在胞

内被分解为 Fluo-3 探针，结合游离钙离子后发出的荧光可被流式细胞仪捕捉，借此可对胞内钙离子浓度进行测定。图8及图9中显示各组细胞总荧光强度，Count轴为细胞数量，FITC-A表示细胞内结合钙离子后的染料荧光强度。分析可知，与空白组相比，芡实壳醇提



物可显著使 SGC7901 和 HepG2 细胞内钙离子浓度升高, SGC7901 细胞内钙离子浓度变化仅在醇提物浓度高于 100  $\mu\text{g/mL}$  时才具有显著性差异, 醇提物浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  时可使 SGC7901 细胞内钙离子荧光强度升高 17.81%, 且具有浓度依赖性; HepG2 细胞内钙离子浓度变化仅在醇提物浓度高于 200  $\mu\text{g/mL}$  时才具有显著性差异, 醇提物浓度为 200  $\mu\text{g/mL}$  时可使 HepG2 细胞内钙离子荧光强度升高 14.14%, 且具有浓度依赖性。细胞胞质钙离子浓度可作为信号来对细胞多种活动进行调节。

相关研究表明, 胞质钙离子浓度升高可使胞内稳态失调, 由内质网释放至胞质中的钙离子会使细胞核及线粒体内钙离子浓度升高, 线粒体摄取过多游离钙离子后会出现过载, 使线粒体内膜出现损伤, 导致细胞色素 C 释放, 进而活化 Caspases 导致细胞凋亡<sup>[36]</sup>。由此可知芡实壳醇提物介导的 SGC7901 细胞凋亡可能与钙离子浓度升高密切相关。魏剑锋等<sup>[37]</sup>发现三七总皂苷在 200~800  $\mu\text{g/mL}$  范围内能够抑制 HepG2 细胞的生长并诱导其凋亡, 并且具有浓度和时间依赖, 检测表明其机制可能是通过影响细胞内钙离子浓度来达到肿瘤抑制作用。

### 3 结论

3.1 芡实壳醇提物对人胃癌 SGC7901 细胞及人肝癌 HepG2 细胞增殖皆具有一定的抑制作用, 且呈时间及剂量依赖性。流式细胞仪 FITC-Annexin V/PI 双染法结果显示芡实壳醇提物对两种细胞均具有凋亡诱导作用。福林酚法测定结果表明芡实壳醇提物总酚含量达 43.96%, 推测芡实壳醇提物内含有的多酚可能是通过对活性氧进行调控来抑制肿瘤细胞增殖。

3.2 根据细胞周期、细胞线粒体膜电位及细胞内钙离子浓度的检测结果可知, 细胞周期检测表明, 浓度为 200~800  $\mu\text{g/mL}$  的醇提物可使 SGC7901 细胞阻滞于 G0/G1 期; 浓度为 50~200  $\mu\text{g/mL}$  的醇提物可使 HepG2 细胞阻滞于 S 期; 醇提物对两株细胞系线粒体膜电位均有显著影响, 表明芡实壳醇提物可能通过激活肿瘤细胞线粒体通路来进一步促进细胞凋亡; 芡实壳醇提物浓度升高可使两种细胞胞内钙离子浓度增高, 但 SGC7901 细胞对醇提物的变化更为敏感。芡实壳醇提物对两种细胞作用模式不尽相同, 对不同细胞可能通过激活不同的凋亡通路来诱发凋亡。

3.3 综上所述, 芡实壳醇提物对人胃癌 SGC7901 细胞及人肝癌 HepG2 细胞的增殖具有一定的体外抑制作用并可促进其凋亡, 且对人胃癌 SGC7901 细胞的抑制效果好于人肝癌 HepG2 细胞。推测芡实壳醇提物可

能主要通过升高细胞胞质钙离子浓度使得线粒体膜电位降低, 从而激活线粒体相关凋亡通路来促使 HepG2 细胞和 SGC7901 细胞的凋亡。目前, 芡实壳在抗肿瘤方面的机理性研究依旧较少, 结合其他多酚类物质的作用机制推测其抗肿瘤作用可能涉及多条代谢通路, 具肿瘤抑制作用的芡实壳有极大的潜在商业价值, 其在食品、化工等行业的开发利用还有待研究。

### 参考文献

- [1] 张丽, 曾嘉程, 王梦, 等. 不同产地芡实的品质特性评价[J]. 食品工业科技, 2019, 40(11): 70-78  
ZHANG Li, ZENG Jiacheng, WANG Meng, et al. Quality characteristics evaluation of *Euryale Ferox* Salisb. from different growing regions [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(11): 70-78
- [2] 林红强, 王涵, 谭静, 等. 药食两用中药-芡实的研究进展[J]. 特产研究, 2019, 41(2): 118-124  
LIN Hongqiang, WANG Han, TAN Jing, et al. Research progress on a medicinal and edible product-*Euryale ferox* seeds [J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2019, 41(2): 118-124
- [3] 李云, 李伟, 张雪廷, 等. 山药芡实药对在不同剂量对脾虚模型小鼠免疫功能的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(8): 535-538  
LI Yun, LI Wei, ZHANG Xueting, et al. Effects of the herbal pair Shanyao and Qianshi at different dosage ratios on spleen-deficiency mice's immune function [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2015, 38(8): 535-538
- [4] Yan Y F, Sun T, Zhang H B, et al. *Euryale ferox* seed - inspired super lubricated nanoparticles for treatment of osteoarthritis [J]. Advanced Functional Materials, 2019, 29(4): 1807559
- [5] Das S, Der P, Raychaudhuri U, et al. The Effect of *Euryale ferox* (Makhana), an herb of aquatic origin, on myocardial ischemic reperfusion injury [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2006, 289(1): 55-63
- [6] Zhang W N, Su R N, Gong L L, et al. Structural characterization and in vitro hypoglycemic activity of a glucan from *Euryale ferox* Salisb. seeds [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 209(1): 363-371
- [7] Yuan H, Gong Z, Meng S, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of a triterpenoid-rich extract from *Euryale* shell on streptozotocin-induced diabetic mice [J]. Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical

- Sciences, 2013, 68(3): 227-231
- [8] Nam G H, Jo K J, Park Y S, et al. *In vitro* and *in vivo* induction of p53-dependent apoptosis by extract of *Euryale ferox* Salisb in A549 human caucasian lung carcinoma cancer cells is mediated through Akt signaling pathway [J]. *Frontiers in Oncology*, 2019, 9: 406
- [9] 沈蓓, 吴启南, 陈蓉, 等. 芡实的现代研究进展[J]. *西北药学杂志*, 2012, 27(2): 185-187
- SHEN Bei, WU Qi'nan, CHEN Rong, et al. The modern research progress of *Euryale ferox* [J]. *Northwest Pharmaceutical Journal*, 2012, 27(2): 185-187
- [10] 徐茜, 徐斐然, 陈琳, 等. 薏米多酚对 HepG2 细胞中抗氧化酶活性的影响[J]. *食品科技*, 2018, 43(10): 278-284
- XU Qian, XU Feiran, CHEN Lin, et al. Effect of adlay polyphenols on antioxidant enzyme activity in HepG2 cells [J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(10): 278-284
- [11] 胡会刚, 赵巧丽. 菠萝皮渣多酚的提取分离及其抗氧化活性评价[J]. *食品科技*, 2020, 45(1): 286-293
- HU Huigang, ZHAO Qiaoli. Extraction, separation and antioxidant activities of polyphenols from pineapple pomace [J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(1): 286-293
- [12] Laura B, Ph D. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance [J]. *Nutrition Reviews*, 1998, 56(11): 317-333
- [13] Zhang C. *In vitro* antioxidant properties of *Euryale ferox* seed shell extracts and their preservation effects on pork sausages [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2015, 39(6): 1172-1182
- [14] Wei F, Yuntao M, Juan W, et al. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of neochlorogenic acid in human gastric carcinoma cells are complemented with ROS generation, loss of mitochondrial membrane potential and apoptosis induction [J]. *Journal of Buon*, 2019, 24(1): 221-226
- [15] 张余, 徐幸莲, 周光宏. 芡种壳乙醇提取物组成及其抗氧化稳定性分析[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(21): 57-61
- ZHANG Cuan, XU Xinglian, ZHOU Guanghong, et al. Antioxidative stability of extracts from *Euryale ferox* seed shell [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(21): 57-61
- [16] 国海东, 张清峰, 蒋艳, 等. 芡实壳中鞣花酸的 HPLC-DAD-MS/MS 鉴定与含量检测[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(11): 221-226
- GUO Haidong, ZHANG Qingfeng, JIANG Yan, et al. Identification and quantification of ellagic acid in seed shells of Gordon *Euryale* by HPLC-DAD-MS/MS [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2016, 16(11): 221-226
- [17] 孙文凯. 芡实壳提取物抗氧化作用与降血糖功效初探[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2012
- SUN Wenkai. Study on the effect of anti-oxidation function and hypoglycemic by *Euryale ferox* Salisb. shells extract [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2012
- [18] 张余, 徐幸莲, 周光宏, 等. 芡种壳提取物多酚组成及对猪肉乳化肠贮存期质量的影响[J]. *食品科学*, 2013, 34(8): 48-52
- ZHANG Cuan, XU Xinglian, ZHOU Guanghong, et al. Effect of extract from *Euryale ferox* seed shell on quality of pork sausage during storage [J]. *Food Science*, 2013, 34(8): 48-52
- [19] 孙文凯, 袁怀波, 许卫, 等. 芡实壳提取物抗氧化能力研究[J]. *食品工业科技*, 2011, 4: 100-102
- SUN Wenkai, YUAN Huaibo, XU Wei, et al. Study on anti-oxidative activity of *Euryale ferox* Salisb. shells extracts [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2011, 4: 100-102
- [20] Lee S E, Ju E M, Kim J H. Antioxidant activity of extracts from *Euryale ferox* seed [J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2002, 34(2): 100-106
- [21] Wu C Y, Chen R, Wang X S, et al. Antioxidant and anti-fatigue activities of phenolic extract from the seed coat of *Euryale ferox* Salisb. and identification of three phenolic compounds by LC-ESI-MS/MS [J]. *Molecules*, 2013, 18(9): 11003-11021
- [22] 柴冰阳, 陈泽慧, 张闪闪, 等. 4 种细胞毒活性方法评价紫草素体外肿瘤细胞抑制作用效果[J]. *中草药*, 2019, 50(1): 172-177
- CHAI Bingyang, CHEN Zehui, ZHANG Shanshan, et al. Evaluation effects of four cytotoxicity methods on *in vitro* inhibition of shikonin against tumor cells [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2019, 50(1): 172-177
- [23] 范作鹏, 梁珊, 聂巍, 等. 基于细胞计数试剂盒 8 的药物淋巴细胞刺激试验在急性药物性肝损伤诊断中的应用[J]. *临床肝胆病杂志*, 2016, 32(8): 1562-1565
- FAN Zuopeng, LIANG Shan, NIE Wei, et al. Application of drug lymphocyte stimulation test using cell counting kit-8 assay in diagnosis of acute drug-induced liver injury [J]. *Journal of Clinical Hepatology*, 2016, 32(8): 1562-1565
- [24] Guo C, Liu S, Dong P, et al. Akbu-LAAO exhibits potent anti-tumor activity to HepG2 cells partially through produced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via TGF- $\beta$  signal pathway [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 18215

- [25] Liu H Z, Schmitz J C, Wei J T, et al. Clove extract inhibits tumor growth and promotes cell cycle arrest and apoptosis [J]. *Oncology Research*, 2014, 21(5): 247-259
- [26] Anand G M, Mahesh S. Hydroxychavicol from *Piper betle* induces apoptosis, cell cycle arrest, and inhibits epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2019, 166: 274-291
- [27] Yun T L, So H L, Boram L, et al. Compound C inhibits B16-F1 tumor growth in a syngeneic mouse model via the blockage of cell cycle progression and angiogenesis [J]. *Cancers*, 2019, 11(6): 823
- [28] 谭晓舒,吴建文,梨贵卿,等.火麻仁油总酚含量福林酚测定法的优化[J].*食品研究与开发*,2021,42(2):166-173  
TAN Xiaoshu, WU Jianwen, LI Guiqing, et al. Optimization of folin-ciocalteu method for the determination of total polyphenols in hemp seed oil [J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(2): 166-173
- [29] 单恬恬.芡实壳多酚分离鉴定及体外抑肿瘤机制研究[D].武汉:武汉轻工大学,2020  
SHAN Tiantian. Isolation and identification polyphenols from the seed shell of *Euryale ferox* Salisb. and the mechanism of anti-tumor *in vitro* [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2020
- [30] 曾军英,李胜华,伍贤进,等.垂盆草醇提取物抑制 HepG2 细胞 STAT-3 信号通路诱导细胞凋亡的研究[J].*中国中药杂志*, 2014,39(17):3349-3352  
ZENG Junying, LI Shenghua, WU Xianjin, et al. Study on impact of ethanol extracts from *Sedum sarmentosum* in inhibiting STAT-3 signaling and inducing apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2014, 39(17): 3349-3352
- [31] 李科,田雪梅,王美芝.白藜芦醇对人肝癌 HepG2 细胞周期影响的实验研究[J].*中国临床解剖学杂志*,2009,27(3):317-320  
LI Ke, TIAN Xuemei, WANG Meizhi. Experimental study on the effects of resveratrol on cell cycle of HepG2 cells [J]. *Chinese Journal of Clinical Anatomy*, 2009, 27(3): 317-320
- [32] 闫开旭.没食子酸对胃癌细胞株 SGC7901 生物学行为的影响[D].兰州:甘肃中医药大学,2017  
YAN Kaixu. The influence of gallic acid to gastric cancer cellline SGC7901 about biological behaviour [J]. Lanzhou: Gansu University of Chinese Medicine, 2017
- [33] 李敏,林俊.细胞凋亡途径及其机制[J].*国际妇产科学杂志*, 2014,41(2):103-107  
LI Min, LIN Jun. The apoptotic pathways and their mechanisms [J]. *Journal of International Obstetrics and Gynecology*, 2014, 41(2): 103-107
- [34] Du Y Q, Zhang J, Tao Z H, et al. Aloe emodin exerts potent anticancer effects in MIAPaCa-2 and PANC-1 human pancreatic adenocarcinoma cell lines through activation of both apoptotic and autophagic pathways, sub-G1 cell cycle arrest and disruption of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) [J]. *Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 2019, 24(2): 746-753
- [35] 杭佳,张梦美,叶晓川,等.白藜药效成分没食子酸抑制人肝癌 HepG2 细胞生长及作用机制研究[J].*中国实验方剂学杂志*,2013,19(1):291-295  
HANG Jia, ZHANG Mengmei, YE Xiaochuan, et al. HepG2 proliferation restriction and active mechanism of gallic acid as active compound in *Ampelopsis japonica* [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2013, 19(1): 291-295
- [36] Jayant D, Sonal S, Sakshi M, et al. Chetomin induces apoptosis in human triple-negative breast cancer cells by promoting calcium overload and mitochondrial dysfunction [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 495(2): 1915-1921
- [37] 魏剑锋,许泽波,王伟,等.三七总皂苷对肝癌细胞株 HepG2 的钙离子平衡和生长的影响[J].*中华实验外科杂志*,2020, 37(10):1815-1818  
WEI Jianfeng, XU Zebo, WANG Wei, et al. Effects of *Panax notoginseng* saponins on calcium balance and growth of hepatocellular carcinoma cell line HepG2 [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2020, 37(10): 1815-1818