

苦丁茶黄酮通过 caspases 活化诱导人 HSC-3 口腔癌细胞凋亡的效果

赵欣¹, 王睿¹, 庞凉^{2,3}, 邱丽华^{2,3}

(1. 重庆第二师范学院生物与化学工程系, 重庆 400067) (2. 重庆医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 重庆 401147) (3. 重庆医科大学附属口腔医院口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室, 重庆 401147)

摘要: 本研究对苦丁茶黄酮通过 caspases (半胱氨酸蛋白酶蛋白) 活化诱导人 HSC-3 口腔癌细胞凋亡的效果进行了观察。通过 MTT 实验发现在 0~150 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, 苦丁茶黄酮可以抑制 HSC-3 癌细胞的生长, 但不影响 HOK 口腔角质细胞 (正常细胞) 的增殖。150 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下苦丁茶黄酮对 HSC-3 癌细胞的生长抑制率 (78.9%) 超过同浓度下市售大豆异黄酮胶囊物 (42.8%)。通过检测癌细胞的 mRNA 表达强度发现, 相对于对照癌细胞, 苦丁茶黄酮可以上调 HSC-3 癌细胞中 caspase-3、caspase-8、caspase-9、Bax (Bcl-2 相关 X 蛋白)、Fas (凋亡相关因子) 和 FasL (凋亡相关因子配体) 的表达, 下调 Bcl (B 淋巴细胞瘤)-2、Bcl-xL、cIAP (细胞凋亡抑制蛋白)-1 和 cIAP-2 的表达, 并且随着苦丁茶黄酮浓度的升高, 这些趋势进一步加强。实验结果证实苦丁茶黄酮可以在体外通过 caspases 的活化实现诱导 HSC-3 癌细胞凋亡的效果。

关键词: 苦丁茶黄酮; HSC-3 口腔癌细胞; 凋亡; caspase; mRNA

文章编号: 1673-9078(2015)4-1-7

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.001

The Apoptosis-inducing Effects of Kuding Tea Flavonoids on Human Oral Cancer HSC-3 Cells Through Caspase Activation

ZHAO Xin¹, WANG Rui¹, PANG Liang^{2,3}, QIU Li-hua^{2,3}

(1. Department of Biological and Chemical Engineering, Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China)

(2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing 401147, China) (3. Chongqing Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences, The Affiliated

Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing 401147, China)

Abstract: The apoptosis-inducing effects of Kuding tea flavonoids on human oral cancer HSC-3 cells through caspase activation (cysteine1 aspartate specific proteinase) were observed in this study. The MTT assay showed that Kuding tea flavonoids inhibited the growth of HSC-3 cancer cells at a concentration of 0~150 $\mu\text{g/mL}$; however, the flavonoids did not influence the proliferation of human oral keratinocyte cells (normal cells). Kuding tea flavonoids (concentration, 150 $\mu\text{g/mL}$) showed a better growth inhibitory effect (78.9%) on HSC-3 cancer cells compared to the soybean isoflavones capsule substance (42.8%) available in the market. Analysis of the mRNA expression in cancer cells showed that Kuding tea flavonoids upregulated caspase-3, caspase-8, caspase-9, Bcl-2 associated X protein (Bax), factor associated suicide (Fas), and Fas ligand (FasL) mRNA expressions, and downregulated the expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-xL, cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (cIAP-1), and cIAP-2 mRNA, compared to the control. This increase and decrease in mRNA expression was observed to be correlated to the increase in concentration of Kuding tea flavonoids. These results demonstrated that Kuding tea flavonoids induced *in vitro* apoptosis in HSC-3 cancer cells via caspase activation.

Key words: Kuding tea flavonoid; human oral cancer HSC-3 cells; apoptosis; caspase; mRNA

收稿日期: 2014-08-11

基金项目: 重庆第二师范学院引进高层次人才科研启动费; 重庆市医学科技计划资助项目 (2011-1-060); 重庆第二师范学院创新团队计划 (KYC-cxtd03-20141002)

作者简介: 赵欣 (1981-), 男, 博士, 教授, 研究方向为食品营养和功能性食品

通讯作者: 邱丽华 (1964-), 女, 副教授, 研究方向为口腔颌面部肿瘤

苦丁茶是冬青科冬青属的苦丁茶种常绿乔木树叶制成的一种传统饮品,在四川、贵州、云南和湖南等省份都有出产^[1]。同时,苦丁茶也作为中医上的药用植物使用,常被用于清热消暑、生津止渴和润喉止咳^[2]。现代医学研究证明苦丁茶还有具有抗氧化、抗衰老和预防癌症等多种功效^[3]。苦丁茶含有多种有效成分,包括多酚类物质、维生素、氨基酸和黄酮类物质^[4]。

口腔癌是一种常发生的恶性疾病,大部分情况是口腔鳞状上皮细胞发生癌变,使口腔黏膜出现变异病变,口腔不卫生,长期被刺激物刺激和营养不良都可能导致口腔癌的发生^[5]。通过食品对口腔癌进行预防已经得到了初步证实,已有的研究表明苦丁茶粗提取物对体外培养的癌细胞具有良好的抑制作用^[6]。茶叶中提取的黄酮类作为茶叶中很重要的成分也被证实具有诱导癌细胞凋亡的作用^[7]。Caspase 是一类蛋白酶,关系着细胞凋亡,同时在细胞的生长、分化与凋亡过程中起着重要的作用,特别是 caspase 的激活是癌细胞凋亡机制中最关键的环节之一^[8]。在细胞生长、成熟和其他的大部分生理阶段中,caspase 都可以控制细胞程序性细胞死亡和细胞凋亡,细胞凋亡的失控可以导致肿瘤的发展和自身免疫性疾病的发生^[1]。早在 90 年代中期就已经有研究关注 caspase 对癌症治疗的作用,包括刺激 caspase 家族中的蛋白酶作为癌症靶点治疗的手段^[9]。本研究也观察了通过苦丁茶中提取的黄酮物质刺激和活化口腔癌细胞的 caspase 蛋白酶和 caspase 相关蛋白酶来达到诱导癌细胞凋亡的作用,得到的研究数据将对苦丁茶这种宝贵的食品资源的开发提供新的指向。

1 材料与方法

1.1 样品

虫茶:市售澄迈万昌苦丁茶场生产椰仙牌野生苦丁茶,冷冻干燥后粉碎,取 100 g 冷冻干燥的苦丁茶粉末,加入 1 L 的 70%乙醇溶液,在 70 °C 水浴下浸提 4 h,滤液过硅藻土除去脂溶性杂质,收集提取液再通过 ADS-17 树脂使黄酮类物质被树脂吸附,再用 90%的乙醇溶液洗脱下树脂吸附的黄酮物质,最后旋转蒸发蒸干溶剂得到苦丁茶黄酮提取物^[10]。

1.2 癌细胞株

人口腔癌 HSC-3 细胞购自于美国典型微生物菌种保藏中心(ATCC);正常 HOK 人口腔角质细胞购自于美国 Sciencell 公司。

1.3 试剂

芦丁标准品,上海源叶生物科技有限公司;大豆异黄酮软胶囊,康恩贝公司;RPMI-1640 细胞培养液、胎牛血清和 MTT (3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐),DMSO(二甲基亚砜),Sigma 公司,美国;CycleTESTTM PLUS DNA 染色试剂盒,Becton Dickinson 公司,德国;Trizol 试剂、oligo dT₁₈、RNase、dNTP 和 MLV,Invitrogen 公司,美国;RT-PCR(反转录聚合酶链式反应)引物 caspase-3、caspase-8、caspase-9、Bax、Bcl-2、Bcl-xL、Fas、FasL、cIAP-1 和 cIAP-2,Eppendorf 公司,德国;其余试剂均为国产分析纯。

1.4 仪器与设备

R1002VN 旋转蒸发仪,郑州长城科工贸有限公司;TG1650-WS 高速离心机,重庆春鑫科技有限公司;Thermo 3110 二氧化碳细胞培养箱,Thermo 公司,美国;Bio-Rad 680 酶标仪、Bio-Rad 小型水平电泳槽,Bio-Rad 公司,美国;ABI 2720 PCR 仪,Applied Biosystems 公司,美国。

1.5 方法

1.5.1 苦丁茶黄酮提取物纯度测定

称取芦丁标准品,加入 90%的乙醇溶液,制成浓度为 10、20、30、40 和 50 μg/mL 浓度的芦丁标准液。再将苦丁茶黄酮提取物也溶于 90%的乙醇溶液,根据芦丁标准品溶液的标准曲线进行对比,用分光光度仪在 500 nm 处测定吸光度,计算得苦丁茶黄酮提取物中黄酮物质(芦丁计)的纯度。

1.5.2 MTT 法测定苦丁茶黄酮对细胞生长抑制率的影响

用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 细胞培养基将人口腔癌 HSC-3 细胞和 HOK 正常口腔上皮角质细胞培养在 37 °C,5% CO₂ 环境中,2~3 d 更换一次培养基。传代一次后将细胞浓度调整为 1×10⁵ 个/mL,在 96 孔板各孔中加入 100 μL 细胞悬液,然后培养 24 h 至细胞贴壁,吸出原有培养基后,再在对照组(癌细胞阴性对照)孔中加入新的 100 μL 的 RPMI-1640 细胞培养基;苦丁茶黄酮处理组各孔中加入含 25 到 200 μg/mL 浓度苦丁茶黄酮的培养液 100 μL;大豆异黄酮(阳性对照)组孔中加入含 150 μg/mL 浓度大豆异黄酮胶囊物的培养基,然后继续培养 48 h 后再次吸出各孔内培养基,接着在各孔中加入含 MTT 试剂的培养基(培养基中 MTT 试剂浓度为 0.5 mg/mL)继续培养

4 h。4 h 后将 96 孔板上各孔内培养液再次吸出，然后在各孔中加入 100 μL 的 DMSO 后室温避光放置 30 min，最后在 490 nm 处测定 OD 值，通过计算 OD 值可得到苦丁茶黄酮对细胞生长抑制率=[(对照孔 OD 值-样品处理孔 OD 值)/对照孔 OD 值]×100%^[6]。

1.5.3 RT-PCR 法检测苦丁茶黄酮对人口腔癌细胞基因表达的影响

将人口腔癌 HSC-3 细胞接种于直径为 10 cm 细胞培养皿中，按 1.5.2 方法进行苦丁茶黄酮处理和细胞培养后用 RNAzol 试剂提癌细胞的总 RNA。将提取的总 RNA 浓度调整至 1 μg/μL。取 2 μL 的 RNA 提取液分别加入 oligodT₁₈，RNase，dNTP 和 MLV 酶各 1 μL，5×buffer 10 μL，在 37 °C 120 min，99 °C 4 min，4 °C 3 min 的条件下合成 cDNA。然后以反转录-聚合酶链反应法扩增 caspase-3、caspase-8、caspase-9、Bax、Bcl-2、Bcl-xL、Fas、FasL、cIAP-1 和 cIAP-2 表达，同时以持家基因 (GAPDH) 作为对照内参照。最后以含浓度溴化乙锭的 1%琼脂电泳检查 PCR 扩增产物

^[2]，再用 Image1.44 软件对表达进行定量分析。

1.5.4 数据分析

所有的实验进行 3 次平行实验，将 3 次得到的实验数据结果以平均值±标准偏差表示，然后使用 SAS9.1 统计软件对所得数据采用 one-way ANOVA 分析方法对结果在 p<0.05 水平上是否具有显著性差异进行分析。

2 结果与讨论

2.1 苦丁茶黄酮提取物的纯度

芦丁作为标准品测定植物中含有的总黄酮含量是初步检测植物中总黄酮的常用方法。通过测定到的 10、20、30、40、50 μg/mL 浓度的芦丁标准液的吸光度，得到黄酮标准液的标准曲线为 y=0.0014x-0.0083 (x 为黄酮浓度，y 为吸光值，表 1，图 1)。通过对照标准曲线可以检测出苦丁茶黄酮提取物中黄酮类物质的含量达到 41.3% (芦丁计)。

表 1 芦丁标准液吸光度

Table 1 Absorption of rutin standard solution

芦丁浓度/(μg/mL)	10	20	30	40	50
吸光度	0.008±0.002 ^e	0.017±0.003 ^d	0.025±0.005 ^c	0.038±0.003 ^b	0.062±0.006 ^a

注：不同英文字母表示差各组数据平均值显著性差异 (p<0.05)，见表 2，图 4~7。

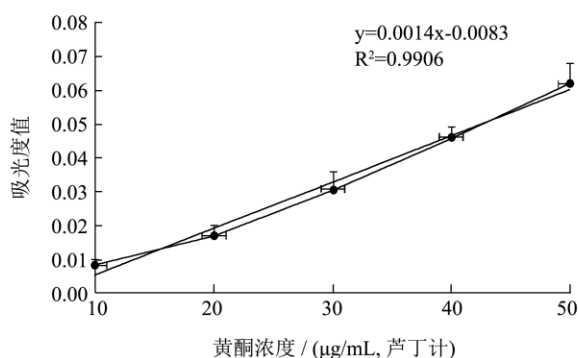


图 1 芦丁标准液标准曲线

Fig.1 Standard curve of the rutin standard solution

2.2 苦丁茶黄酮对细胞生长抑制率的影响

食品中功能性物质对体外培养的细胞作用时，仅对癌细胞有影响，而对正常细胞没有影响时，该物质可以初步判断为对癌细胞的致死作用是由于其对癌细胞具有凋亡诱导作用，而不是对细胞的毒性作用^[11]。苦丁茶黄酮作用在细胞后，经过 0~150 μg/mL 浓度苦丁茶黄酮处理的人口腔癌 HSC-3 细胞生长率逐渐下降，当苦丁茶黄酮浓度达到 175 μg/mL 浓度后 HSC-3 癌细胞的生长被完全抑制，癌细胞全部死亡 (图 2)。采用同样的浓度处理正常 HOK 口腔上皮角质细胞

后，在 0~150 μg/mL 下，HOK 细胞的生长没有受到苦丁茶黄酮的影响 (图 3)，可见在 0~150 μg/mL 浓度下苦丁茶黄酮对正常细胞没有毒性作用，不会影响人体正常细胞的增殖生长，但是对癌细胞的增殖有显著的抑制作用，其作用可能是苦丁茶黄酮对癌细胞的凋亡诱导作用。

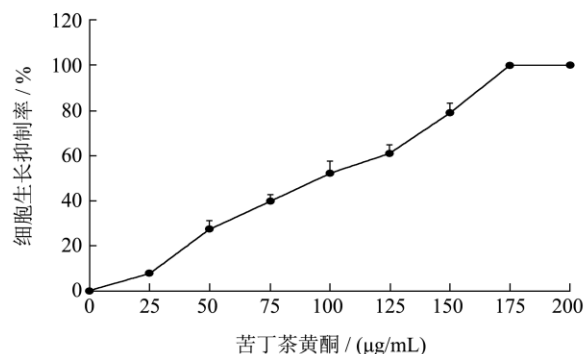


图 2 苦丁茶黄酮对 HSC-3 人口腔癌细胞的体外生长抑制效果

Fig.2 In vitro inhibitory effect of Kuding tea flavonoids on the growth of human oral cancer HSC-3 cells

由表 2 可以看出苦丁茶黄酮可以显著降低 HSC-3 癌细胞中的增殖，150 μg/mL 浓度下苦丁茶黄酮较对照组癌细胞 (阴性对照) 存活率仅为 21.1%，大部分细胞经苦丁茶黄酮作用后已死亡 (生长抑制率达到

78.9%)。市售康恩贝大豆异黄酮胶囊作为国家批准的保健食品含有黄酮类成分大豆异黄酮(大豆苷、大豆苷元、染料木苷、染料木素), 150 μg/mL 浓度大豆异黄酮胶囊物(阳性对照)对 HSC-3 癌细胞也具有一定的增殖抑制效果, 抑制率为 42.8%。可见本研究中提取的苦丁茶黄酮对 HSC-3 口腔癌细胞的增殖抑制效果高于同浓度的市售大豆异黄酮胶囊物, 苦丁茶黄酮可以达到和超过市售保健食品的体外抗癌效果。通过图 2 计算得到苦丁茶黄酮处理浓度与抑制率之间的关系为 y (生长抑制率) = $0.5246x$ (苦丁茶黄酮浓度, μg/mL) - 1.1571 , 可以计算得出苦丁茶黄酮对 HSC-3 癌细胞 IC₅₀ 为 97.52 μg/mL, 因此选择 50、100 和 150 μg/mL 浓度继续实验, 观察苦丁茶黄酮通过活化 caspase 相关酶对 HSC-3 癌细胞凋亡诱导效果。

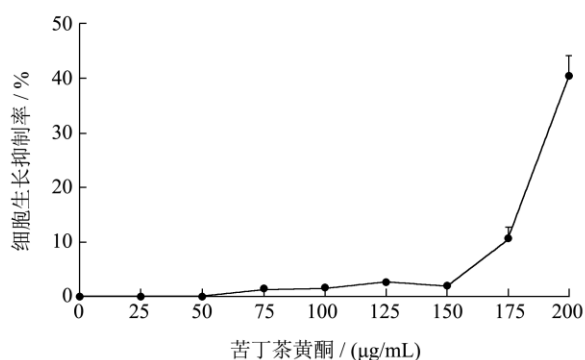


图 3 苦丁茶黄酮对 HOK 人口腔角质细胞的体外生长抑制效果

Fig.3 *In vitro* inhibitory effect of Kuding tea flavonoids on the growth of human oral keratinocytes (HOK)

表 2 苦丁茶黄酮和市售大豆异黄酮胶囊物对 HSC-3 癌细胞的增殖抑制效果

Table 2 Growth inhibitory effect of Kuding tea flavonoids and soybean isoflavone capsule substance (available in the market) on HSC-3 cancer cells

组别	OD 值	增殖抑制率/%
对照组 (阴性对照)	0.493±0.003 ^a	/
苦丁茶黄酮 (μg/mL)	50	0.357±0.007 ^c 27.6±3.7 ^d
	100	0.235±0.011 ^e 52.3±5.2 ^b
	150	0.104±0.008 ^f 78.9±4.6 ^a
大豆异黄酮胶囊物 (阳性对照, μg/mL)	50	0.437±0.006 ^b 11.3±1.9 ^e
	100	0.366±0.010 ^f 25.8±2.6 ^d
	150	0.282±0.010 ^d 42.8±3.1 ^c

2.3 苦丁茶黄酮对口腔癌细胞 caspases 表达的影响

由图 4 可以看出苦丁茶黄酮可以使 HSC-3 癌细胞中的 caspase 表达发生变化, 相对于没有经过任何处

理的对照癌细胞, 不同浓度的苦丁茶黄酮都可以显著上调 HSC-3 癌细胞中的 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 的 mRNA 表达强度 ($p < 0.05$), 其中 150 μg/mL 浓度的苦丁茶黄酮处理后癌细胞的 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 表达最为强烈, 癌细胞的 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 表达与苦丁茶黄酮处理浓度呈正相关。Caspase-8 和 caspase-9 是细胞凋亡信号转导过程的上游的 caspase, caspase-3 是一个下游的 caspase, 它们都是细胞凋亡效应中的效应分子。Caspase-9 是线粒体通道的细胞凋亡效应分子, 被活化后, 启动细胞内的死亡程序, 激活下游的 caspase-3 将凋亡信号放大并执行, 导致细胞出现凋亡^[12]。有研究表明, 随着外界功能性物质的刺激, 体外培养的癌细胞的 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 表达强度将上升, 可以诱导癌细胞凋亡^[11]。本研究也得出了相同的结果, 苦丁茶黄酮处理后的癌细胞中的 caspase 表达强度增强, 能诱导 HSC-3 癌细胞凋亡。

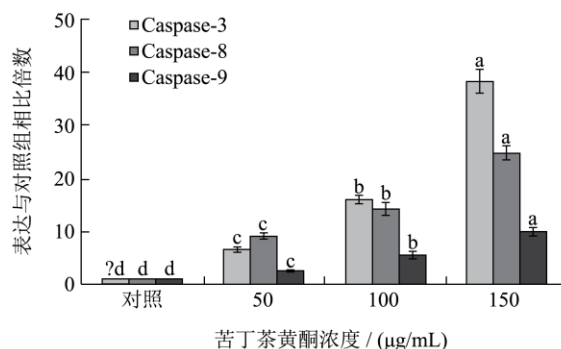
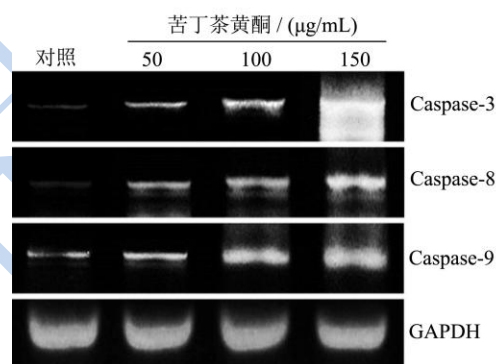


图 4 苦丁茶黄酮处理 HSC-3 人口腔癌细胞 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 的 mRNA 表达水平

Fig.4 mRNA expression levels of caspase-3, caspase-8, and caspase-9 in human oral cancer HSC-3 cells treated with Kuding tea flavonoids

2.4 苦丁茶黄酮对口腔癌细胞 Bax、Bcl-2 和 Bcl-xL 表达的影响

在细胞凋亡过程中, Bcl-2 家族基因起着很重要的

作用, 家族基因中的 Bax 基因可以促进凋亡, Bcl-2 和 Bcl-xL 基因则起细胞凋亡的作用。Bcl-2 蛋白是 Bcl-2 家族中最主要的成员, 被认为是细胞凋亡的抑制基因^[12]。在凋亡信号传导的过程中, Bcl-2 的作用在 caspase-3 活化的上游, 通过抑制 caspase-3 的活化起到抑制凋亡的作用。有研究表明 Bcl-2 不仅能在 caspase-3 的上游发挥作用, 同时 Bcl-2 还是 caspase-3 的直接底物, 被 caspase-3 特异性酶解后的 Bcl-2 片段, 其功能发生转换, 变为触发凋亡^[11], Bcl-2 家族基因和 caspase 家族基因间的相互作用在诱导癌细胞凋亡中具有很强的联系。苦丁茶黄酮也可以通过促进 HSC-3 癌细胞的 Bcl-2 家族基因变化, 来促进 HSC-3 癌细胞 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 表达上调, 苦丁茶黄酮可以上调 Bax 基因, 下调 Bcl-2 和 Bcl-xL 基因, 且随着苦丁茶黄酮浓度的升高, 上调和下调相关基因的幅度也越大 (图 5), 150 $\mu\text{g/mL}$ 浓度苦丁茶黄酮处理下 Bax 的 mRNA 表达显著高于 50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 苦丁茶对癌细胞的处理, 受高浓度苦丁茶黄酮作用癌细胞的 Bcl-2 和 Bcl-xL 显著低于受低浓度苦丁茶黄酮作用癌细胞 ($p < 0.05$)。

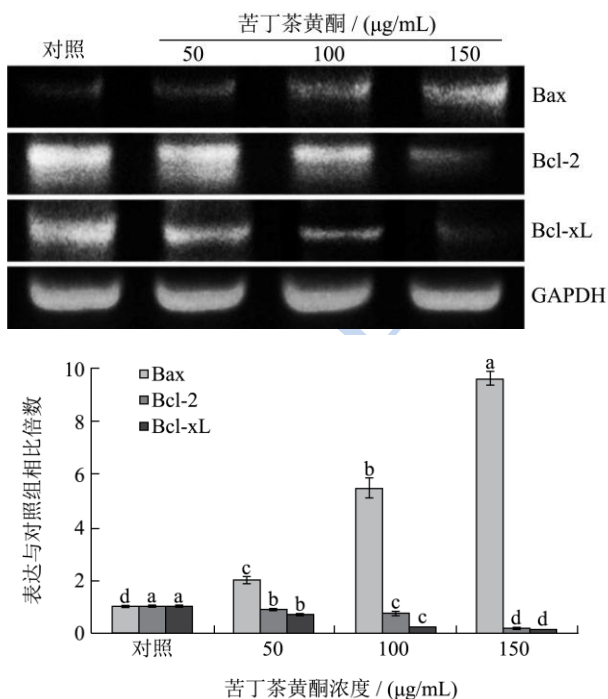


图5 苦丁茶黄酮处理 HSC-3 人口腔癌细胞 Bax、Bcl-2 和 Bcl-xL 的 mRNA 表达水平

Fig5 mRNA expression levels of Bax, Bcl-2, and Bcl-xL in human oral cancer HSC-3 cells treated with Kuding tea flavonoids

2.5 苦丁茶黄酮对口腔癌细胞 Fas 和 FasL 表

达的影响

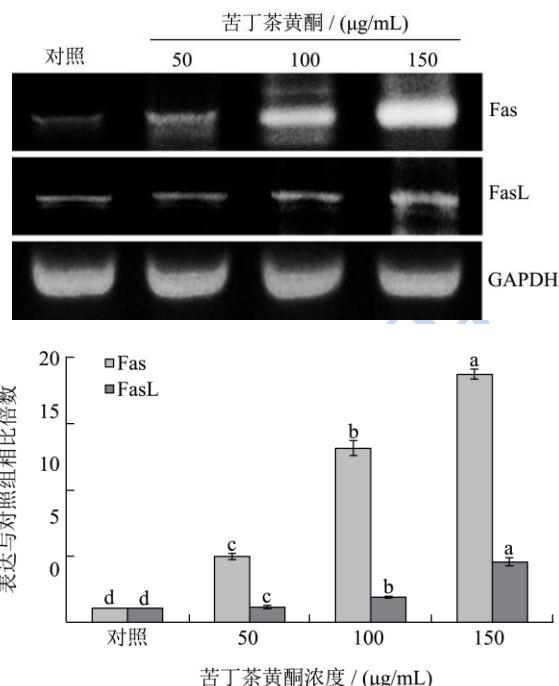


图6 苦丁茶黄酮处理 HSC-3 人口腔癌细胞 Fas 和 FasL 的 mRNA 表达水平

Fig6 mRNA expression levels of Fas and FasL in human oral cancer HSC-3 cells treated with Kuding tea flavonoids

Fas 是细胞死亡受体, FasL 是可以结合死亡受体的因子, Fas 和 FasL 结合能诱导细胞凋亡, Fas 和 Fas-L 作用后传递凋亡信号给 caspase 家族基因, 激活一系列的 caspase 参与细胞凋亡, 并通过循环放大实现 caspase 系列酶的自我调控, 增强 caspase 家族活性^[12]。通过图 6 可以观察到对比对照癌细胞, 苦丁茶黄酮可以大幅度提高 Fas 的表达强度, 同时苦丁茶黄酮也可以使 FasL 表达强度提升, 但是提升的幅度较 Fas 较小, 150 $\mu\text{g/mL}$ 浓度苦丁茶黄酮处理下癌细胞的 Fas 和 FasL 表达强度为对照癌细胞的 18.63 和 4.50 倍, 且各组癌细胞间的表达均具有显著差异 ($p < 0.05$)。由此看出, 苦丁茶黄酮可以通过提高 Fas 和 FasL 表达强度, 活化和放大 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 的活性, 增强诱导癌细胞凋亡的效果。

2.6 苦丁茶黄酮对口腔癌细胞 cIAP-1 和

cIAP-2 表达的影响

cIAP-1 和 cIAP-2 都是癌细胞凋亡抑制因子, cIAP-1 能直接与 caspase-3 结合而达到降解 caspase-3 的凋亡作用; 同样, cIAP-2 也能阻断 caspase-9 的活性,

控制 cIAP-1 和 cIAP-2 在诱导癌细胞凋亡过程的含量,可以减少对 caspase 家族诱导癌细胞凋亡过程的影响^[13]。50、100 和 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度苦丁茶黄酮使癌细胞的 cIAP-1 表达强度分别降低到对照组癌细胞的 0.60、0.32 和 0.14 倍;以上浓度对 cIAP-2 强度也降低到对照癌细胞的 0.40、0.24 和 0.11 倍。通过实验证明,苦丁茶黄酮可以通过减弱 cIAP-1 和 cIAP-2 在 HSC-3 癌细胞中的表达强度来保证 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 等促凋亡基因发挥作用,随着苦丁茶黄酮剂量的增加,cIAP-1 和 cIAP-2 进一步减弱,对增强 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 的影响越小,诱导癌细胞凋亡的效果越好(图 7)。

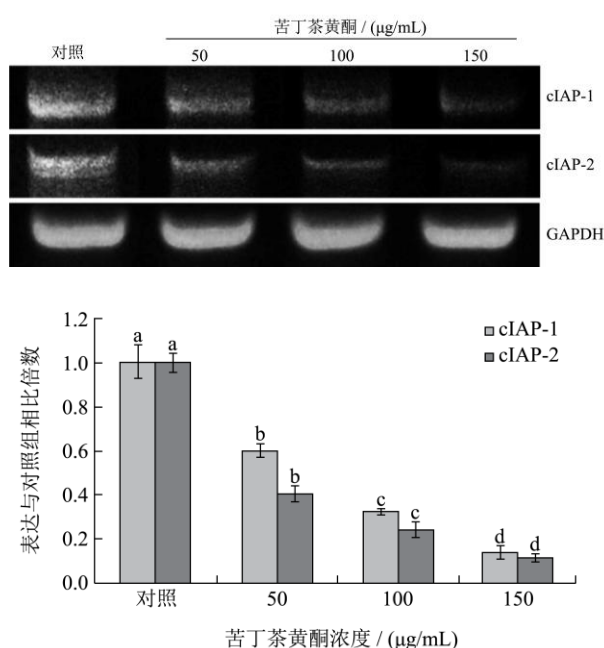


图7 苦丁茶黄酮处理 HSC-3 人口腔癌细胞 cIAP-1 和 cIAP-2 的 mRNA 表达水平

Fig.7 mRNA expression levels of cIAP-1 and cIAP-2 in human oral cancer HSC-3 cells treated with Kuding tea flavonoids

3 结论

调控癌细胞的 caspase 和 Bcl-2 等家族基因可以起到诱导癌细胞凋亡的效果, caspase 家族基因的变化除了和 Bcl-2 家族基因有很强的关联外,也和 Fas、FasL、cIAP-1 和 cIAP-2 基因相互促进或抑制,通过调节这些基因在癌细胞中的含量也可以进一步加强癌细胞中 caspase-3、8、9 表达^[11-13],黄酮类化合物已经被证明对癌细胞中的 caspase 和 Bcl-2 家族基因有明显的影响作用,黄酮类化合物通过调控癌细胞中相关基因的强度起到诱导癌细胞凋亡的作用^[14],本研究对苦丁茶黄酮的体外抗癌效果进行了研究,也发现苦丁茶黄酮可以通过活化 caspase 来达到诱导 HSC-3 人口腔癌细胞

凋亡,起到体外抗癌效果,进一步证明了苦丁茶含有的黄酮类成分也能达到诱导 HSC-3 癌细胞凋亡的作用。通过苦丁茶黄酮作用在体外培养的癌细胞和正常细胞的比较发现,苦丁茶黄酮在 0~150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度内仅对 HSC-3 癌细胞有效果,对正常的口腔细胞的生长没有明显的影响。在得到的仅对癌细胞有反应的安全浓度内进行了进一步分析,在 50、100 和 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下苦丁茶黄酮对 HSC-3 癌细胞的体外生长抑制率显著高于同浓度下市售大豆异黄酮胶囊物。苦丁茶黄酮对 HSC-3 癌细胞中 caspase 家族基因和与 caspase 直接相关凋亡基因的表达有显著影响,实验结果显示苦丁茶黄酮可以上调 HSC-3 癌细胞中 caspase-3、caspase-8、caspase-9、Bax、Fas 和 FasL 的 mRNA 表达,下调 Bcl-2、Bcl-xL、cIAP-1 和 cIAP-2 的表达,并且随着苦丁茶黄酮浓度的升高,上调和下调表达的幅度也增加。由这些结果可以得出在一定浓度下,苦丁茶黄酮可以通过 caspase 相关基因促进 caspase 活化来达到诱导 HSC-3 人口腔癌细胞凋亡的作用,且 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用浓度下诱导癌细胞凋亡效果最好。

参考文献

- [1] Zhao X, Wang Q, Qian Y, et al. Ilex kudingcha C.J. Tseng (Kudingcha) has in vitro anticancer activities in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells and exerts anti-metastatic effects in vivo [J]. *Oncology Letters*, 2013, 5(5): 1744-1748
- [2] 冯霞,赵欣.苦丁茶对SD大鼠的胃损伤预防效果[J].现代食品科技,2014,30(4):21-25
FENG Xia, ZHAO Xin. Preventive effect of Ilex kudingcha C.J. Tseng on gastric injury SD-rats [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(4): 21-25
- [3] 王睿,赵欣.苦丁茶香气成分分析和体外功能性效果研究[J].食品工业科技,2013,35(8):131-134
WANG Rui, ZHAO Xin. Study on component analysis and in vitro functional effects of aroma components of Kuding tea [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 35(8): 131-134
- [4] Song JL, Qian Y, Li GJ, et al. Anti-inflammatory effects of kudingcha methanol extract (Ilex kudingcha CJ Tseng) in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2013, 8(4): 1256-1262
- [5] Zhao X, Pang I, Qian Y, et al. An animal model of buccal mucosa cancer and cervical lymph node metastasis induced by U14 squamous cell carcinoma cells [J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2013, 5(4): 1083-1088
- [6] 赵欣,王强,蹇宇,等.不同浓度苦丁茶对TCA8113人舌鳞癌细

- 胞的体外抗癌效果[J].食品工业科技,2013,34(4):153-155
- ZHAO Xin, WANG Qing, QIAN Yu, et al. Anticancer effect of different concentrations of Ilex kudingcha C.J. Tseng in TCA8113 human tongue squamous carcinoma cells in vitro [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(4): 153-155
- [7] Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2007, 18(7): 427-444
- [8] Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature [J]. Cell, 1996,87(2):171
- [9] Pradelli LA, Bénéteau M, Ricci JE. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1996, 67(10): 1589-1597
- [10] 毛莉娟,刘学文,冉旭.苦丁茶中黄酮的提取工艺[J].食品科技,2002,28(11):18-19,24
- MAO Li-juan, LIU Xue-wen, RAN Xu. The extraction conditions of bioflavonoids from Kuding tea [J]. Science and Technology of Food Industry, 2002, 28(11): 18-19, 24
- [11] 宋家乐,李贵节,赵欣.金莲花总黄酮诱导人HT-29结肠癌细胞凋亡机制的研究[J].现代食品科技,2014,30(6):7-12
- SONG Jia-le, LI Gui-jie, ZHAO Xin. Apoptotic mechanism in human HT-29 colon cancer cells induced by total flavones from Trollius chinensis Bunge [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(6): 7-12
- [12] Zhao X, Pang L, Li J, et al. Apoptosis inducing effects of Kuding tea polyphenols in human buccal squamous cell carcinoma cell line BcaCD885 [J]. Nutrients, 2014, 6(7): 3084-3100
- [13] Choi EA, Park C, Han MH, et al. Induction of apoptosis by sarijang, a bamboo salt sauce, in U937 human leukemia cells through the activation of caspases [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2013, 6(2): 381-387
- [14] 曾适,杨勇,郭青龙.黄酮类化合物诱导肿瘤细胞凋亡的机制及其实验研究进展[J].药学进展,2009,33(9):402-408
- ZENG Shi, YANG Yong, GUO Qing-long. Mechanism of flavonoids-induced apoptosis in cancer cells and related experimental researches: a review [J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2009, 33(9): 402-408