

# 玉米须原花青素的提取及其抗肿瘤活性

熊川<sup>1</sup>, 王玥<sup>2</sup>, 金鑫<sup>1</sup>, 张娟<sup>3</sup>, 张利<sup>4</sup>, 李萍<sup>1</sup>, 黎青<sup>1</sup>, 朱宇<sup>1</sup>

(1. 四川省农业科学院生物技术核技术研究所, 四川成都 610061) (2. 四川师范大学生命科学学院, 四川成都 610068) (3. 四川省农业科学院茶叶研究所, 四川成都 610066) (4. 阿坝州林业科学技术研究所, 四川汶川 623000)

**摘要:** 探究色素玉米“紫糯8号”玉米须原花青素最佳提取条件并验证其抗肿瘤活性。设计四因素四水平正交实验, 探索 pH, 提取剂浓度, 提取温度及提取时间对原花青素提取得率的影响, 通过自由基清除实验验证玉米须原花青素的抗氧化活性, 不同浓度的玉米须原花青素处理 HeLa 细胞, MTT 法测定细胞存活率, 进一步测定 Bax/Bcl-2 表达情况和 Caspase-3 活性, 评价玉米须原花青素抗肿瘤活性并初步阐明机制。玉米须原花青素最佳提取条件为 pH=6, 50 °C 条件下, 通过 70% 的乙醇, 提取 3 h。玉米须原花青素对 DPPH 自由基具有较强的清除活性, 4 mg/mL 即可达到 86.09% 的清除率。细胞实验证实, 100 μg/mL 玉米须原花青素可以显著抑制 HeLa 细胞增殖, 细胞活性为 88.83%, 且抑制活性具有剂量依赖关系。此外, 玉米须原花青素能够提高 Bax/Bcl-2 比例, 启动凋亡并提高凋亡执行者 Caspase-3 活性。因此, 玉米须可作为一种具有抗氧化、抗肿瘤活性的保健品加以开发利用。

**关键词:** 原花青素; 提取条件; 抗氧化; 抗肿瘤

文章编号: 1673-9078(2020)09-195-201

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.9.0272

## Extraction and Antitumor Activity of Proanthocyanidins from Corn Silk

XIONG Chuan<sup>1</sup>, WANG Yue<sup>2</sup>, JIN Xin<sup>1</sup>, ZHANG Juan<sup>3</sup>, ZHANG Li<sup>4</sup>, LI Ping<sup>1</sup>, LI Qing<sup>1</sup>, ZHU Yu<sup>1</sup>

(1. Biotechnology and Nuclear Technology Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu

610061, China) (2. College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610068, China)

(3. Tea Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China)

(4. Sichuan Aba Forestry Science and Technology Research Institute, Wenchuan 623000, China)

**Abstract:** The optimal conditions for the extraction of proanthocyanidins from the corn silk of the pigmented corn cultivar “Zinuo 8” (PCZ) were investigated and the antitumor activity of the extracted PCZ was measured. An orthogonal experiment with four factors and levels was designed to investigate the influences of pH, extractant concentration, extraction temperature, and extraction time on PCZ yield. A free radical scavenging experiment was performed to measure the antioxidant activity of PCZ. HeLa cells were treated with different concentrations of PCZ, and cell viability was determined using the MTT assay. Subsequently, Bax/Bcl-2 expression and Caspase-3 activity were measured to evaluate the anti-tumor activity of PCZ and elucidation of relevant mechanisms. The optimum conditions for the extraction of PCZ were as follows: pH 6; temperature 50°C; extractant concentration 70%; ethanol; time 3 h. Results indicated that PCZ had high scavenging activity towards DPPH, with a clearance rate of 86.09% achieved with 4 mg/mL of PCZ. The cell experiment showed that 100 μg/mL of PCZ significantly inhibited HeLa cell proliferation in a dose-dependent manner, resulting in 88.83% cell viability. In addition, it was found that PCZ enabled an increase in the Bax/Bcl-2 ratio, initiation of apoptosis, and enhancement of the activity of the apoptosis executioner Caspase-3. Therefore, corn silk can be used in the development of health products with antioxidant and antitumor activities.

**Key words:** proanthocyanidins; extraction conditions; antioxidant; antitumor

引文格式:

熊川,王玥,金鑫,等.玉米须原花青素的提取及其抗肿瘤活性[J].现代食品科技,2020,36(9):195-201

XIONG Chuan, WANG Yue, JIN Xin, et al. Extraction and antitumor activity of proanthocyanidins from corn silk [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(9): 195-201

收稿日期: 2020-03-23

基金项目: 四川省科技计划项目 (2017GZ0277); 四川省科协青年人才托举工程 (2018QNRC007)

作者简介: 熊川 (1990-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 天然产物研究与开发

通讯作者: 朱宇 (1969-), 男, 研究员, 研究方向: 食品生物技术

玉米须又名包谷须、蜀黍须,为禾本科 *Gramineae* 玉蜀黍属 *Zea* 植物玉米 *Zea mays* L.的花柱和柱头。玉米须在传统中医中应用广泛,性味甘、平、无毒;有利尿、泻热、止血、平肝、利胆之效,可用于治疗胆结石、糖尿病、肾炎、黄疸等症<sup>[1]</sup>。现代药理研究则进一步拓展了玉米须的药用价值,已报道玉米须具有利尿、降血糖、抑菌、降压、增强免疫等功效<sup>[2]</sup>。目前的研究证实,玉米须含有多种有益的功效成分,包括多酚、甾醇、皂苷、黄酮类、生物碱、脂溶性维生素 K 等<sup>[3,4]</sup>,上述活性物质是支撑玉米须多种生物学功效的基础。

2019年,我国玉米种植面积 3650 万  $\text{hm}^2$ ,作为玉米副产物的玉米须的资源十分丰富,估算玉米须的产量为 750 万 t 以上,但目前对玉米须的研究开发利用不够。紫糯 8 号是四川省农业科学院生物技术核技术研究所选育的玉米新品种,该品种不仅玉米籽粒中花青素含量高,而且玉米须产量和玉米须中花青素含量都较高。鉴于玉米须既有明显的药用价值,又具备一定的食疗特征,因此,对其进行功效成分的深入研究对其产品开发具有重要的意义。

原花青素是植物中的一类多酚化合物,通常以黄烷-3-醇单体为基本单位构成聚合体<sup>[5]</sup>。自然界中原花青素来源较广,木瓜、沙棘果、蓝莓、葡萄籽、火龙果等水果中原花青素含量较为丰富<sup>[6,7]</sup>。研究表明,原花青素具有很强的清除自由基、抗氧化、抗衰老、调节血脂等生理活性<sup>[8,9]</sup>。目前,对于玉米须中原花青素的研究较少,尚未见其提取工艺和生理活性的报道。

基于以上分析,本文收集色素玉米紫糯 8 号的玉米须,探索玉米须中原花青素提取工艺,获得高效率低毒性的提取方法。利用获得的玉米须原花青素作用于人宫颈癌细胞 (Hela 细胞),评价玉米须花青素的肿瘤抑制活性。本研究获得的提取工艺及功效评价数据将有利于玉米须的深度开发及综合利用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

紫糯 8 号玉米须,采集自四川省农业科学院现代农业示范基地。采集新鲜的玉米须,37 °C 烘箱中烘干后密封保存于阴凉处,待用;Hela (人宫颈癌细胞系, ATCC Number: CCL-2) 细胞美国 ATCC 菌种保藏中心;胎牛血清、DMEM 培养液,美国 Thermo Scientific 公司;青霉素、链霉素,美国 Sigma 公司;RNA 提取试剂盒及相关引物,美国 Invitrogen 公司提供, RNA 荧光测定试剂盒,美国 Selleck 公司;Caspase-3 Activity Assay Kit, 中国碧云天公司。

MCO-15AC CO<sub>2</sub> 细胞培养箱,日本 SANYO 公司; IX73 倒置显微镜,日本 Olympus 公司; Spectra max plus 384 酶标仪,美国 Molecular Devices 公司; LSC plus 真空冷冻干燥机,德国 Christ 公司; ME104E 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 玉米须原花青素 (the proanthocyanidins extracted from *Zea mays* L., PCZ) 得率测定

##### 1.2.1.1 提取方法

称取 37 °C 条件下烘干至恒重的玉米须 5.00 g,中药材粉碎机粉碎,置于 500 mL 圆底烧瓶中,加入一定体积的提取剂,水浴浸提,离心收集上清液,减压旋蒸,回收旋蒸液并冻干,备用<sup>[10]</sup>。

##### 1.2.1.2 PCZ 得率测定

将 1.2.1.1 提取到的玉米须原花青素用 100% 甲醇定容至 25 mL,取 1 mL 上述制备液加入试管,后依次加入体积比为 95:5 的正丁醇/盐酸溶液 6 mL, 0.2% 硫酸亚铁铵溶液 0.2 mL,震荡混匀,95 °C 水浴 40 min,冷却后,在 546 nm 下测定吸光值 (Abs),空白对照用 1 mL 100% 甲醇代替 PCZ 样品。

$$\text{原花青素得率}/\% = \frac{\text{Abs} \times 25 \times 7.2}{W \times 0.366} \times 100\%$$

式中: W 代表样品重量 (mg)。

##### 1.2.1.3 正交实验

选择 pH, 提取剂浓度, 提取温度及提取时间作为影响玉米须原花青素得率的考察对象,设计四因素四水平正交实验,如表 1 所示。

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

| 水平 | A pH | B 乙醇浓度/% | C 提取温度/°C | D 提取时间/h |
|----|------|----------|-----------|----------|
| 1  | 3    | 50       | 40        | 1        |
| 2  | 4.5  | 60       | 50        | 2        |
| 3  | 6    | 70       | 60        | 3        |
| 4  | 7.5  | 80       | 70        | 4        |

### 1.2.2 玉米须原花青素 (PCZ) 自由基清除活性

依据 Oktay 等的方法完成自由基清除活性测定<sup>[1]</sup>, 选择 DPPH 自由基、羟自由基及超氧阴离子自由基为清除对象, PCZ 样品 (5 mg) 溶解于 1 mL 的纯水中, 稀释成浓度为 0~4 mg/mL 待用。阳性对照设定为 Vc, 同一测定重复 3 次。

### 1.2.3 玉米须原花青素 (PCZ) 的抗肿瘤活性

#### 1.2.3.1 PCZ 对 HeLa 细胞增殖活性的影响

HeLa 细胞用体积分数为 10% 的胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 完全培养基培养, 置于 CO<sub>2</sub> 浓度为 5% 的细胞培养箱中培养, 每 2 d 传 1 代, 取对数期生长的 HeLa 细胞进行实验。

称取 100 mg 的 PCZ 样品溶于 250  $\mu$ L DMSO 中, 配制样品储备液, 其浓度为 400 mg/mL。储备液在振荡混合仪上震荡混匀, 经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌后分装, 于 -20  $^{\circ}$ C 条件下保存。实验过程中用含血清的 DMEM 培养基配制 PCZ 工作液, 浓度设定依次为 6.25、12.5、25、50、100、200、400 和 800  $\mu$ g/mL, 保证 DMSO 的终浓度小于 0.1%。

取对数生长期的 HeLa 细胞接种于 96 孔板, 细胞悬液浓度设定为 10<sup>4</sup> 个/孔, 每孔 100  $\mu$ L 铺板。待细胞贴壁后, 将细胞分为 8 组, 每组 8 个复孔, 分别为对照组 (100  $\mu$ L 含血清 DMEM)、7 个 PCZ 组 (100  $\mu$ L 终浓度分别为含 12.5、25、50、100、200、400 和 800  $\mu$ g/mL PCZ 的 DMEM 溶液), 空白孔加入 100  $\mu$ L 含血清 DMEM, 处理好的 96 孔板置于 CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h。采用 MTT 法测定细胞的存活率。每孔避光加入 10  $\mu$ L 5mg/mL 的 MTT, CO<sub>2</sub> 培养箱 37  $^{\circ}$ C 培养 2 h 后, 吸去上清, 每孔加入 100  $\mu$ L DMSO, 振荡 10 min 后, 于 490 nm 波长下测定各孔吸光值 (OD), 计算各组细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}/\% = \frac{\text{OD实验组}-\text{OD空白组}}{\text{OD对照组}-\text{OD空白组}} \times 100\%$$

#### 1.2.3.2 PCZ 抗肿瘤活性机制探索

取对数生长期的 HeLa 细胞, 经最适浓度的 PCZ 作用后, 收集细胞, 用结合缓冲液调节细胞密度为 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 个/mL, 取 100  $\mu$ L 细胞悬液, 加 5  $\mu$ L Annexin/FITC 和 10  $\mu$ L 碘化丙锭溶液, 常温避光孵育 15 min, 加入 400  $\mu$ L PBS 混匀, 流式细胞仪分析。

采用实时定量荧光 PCR 完成 Bax 和 Bcl-2 基因的定量分析。正常培养的 HeLa 细胞加入 PCZ 后, 继续培养 8 h, 通过 Trizol 试剂 (Sigma, 美国) 完成 HeLa 细胞 RNA 提取。Bax 引物: F: 5'-CTGCAGAGGATGATTGCTGA-3', R: 5'-GAGGAAGTCCAGTGTCCAGC-3'; Bcl-2 引物: F: 5'-ATCTTCTCCTTCCAGCCTGA-3', R: 5'-TGCAGCTGACTGGACATCTC-3'; 内参基因选择 GAPDH: F: 5'-CACTCACGGCAAATCAACGGCA-3', R: 5'-GACTCCACGACATACTCAGCAC-3'。应用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒 (Selleckchem, 美国), 完成 30 次循环。

通过 Caspase-3 Activity Assay Kit 测定 HeLa 细胞中 Caspase-3 活性。收集处理后的 HeLa 细胞, 加入细胞裂解液, 冰上裂解 5 min, 重悬, 离心收集上清液用以测定 Caspase-3 活性。405 nm 条件下读数并统计。

#### 1.2.4 数据处理及统计

实验获得的数据以平均值 $\pm$ 标准差 (x $\pm$ s) 表示并采用 SPSS 17.0 进行差异分析, 采用 ANOVA 检验进行多组均数比较, p<0.05 视为显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCZ 最适提取条件

表 2 L<sub>16</sub>(4<sup>4</sup>) 正交实验结果

Table 2 Results of L<sub>16</sub>(4<sup>4</sup>) orthogonal experiment

| 实验号 | 因素   |          |                      |          | 得率/%             |
|-----|------|----------|----------------------|----------|------------------|
|     | A pH | B 乙醇浓度/% | C 提取温度/ $^{\circ}$ C | D 提取时间/h |                  |
| 水平  |      |          |                      |          |                  |
| 1   | 1    | 1        | 1                    | 1        | 3.31 $\pm$ 0.24  |
| 2   | 1    | 2        | 2                    | 2        | 4.25 $\pm$ 0.31  |
| 3   | 1    | 3        | 3                    | 3        | 7.96 $\pm$ 0.52  |
| 4   | 1    | 4        | 4                    | 4        | 5.21 $\pm$ 0.33  |
| 5   | 2    | 1        | 2                    | 4        | 9.95 $\pm$ 0.86  |
| 6   | 2    | 2        | 1                    | 3        | 8.85 $\pm$ 0.57  |
| 7   | 2    | 3        | 4                    | 2        | 10.02 $\pm$ 0.79 |
| 8   | 2    | 4        | 3                    | 1        | 8.39 $\pm$ 0.42  |

转下页

| 接上页  |       |      |   |      |            |
|------|-------|------|---|------|------------|
| 9    | 3     | 1    | 3   | 2    | 8.92±0.56  |
| 10   | 3     | 2    | 4   | 1    | 12.62±0.93 |
| 11   | 3     | 3    | 1   | 4    | 11.24±0.85 |
| 12   | 3     | 4    | 2   | 3    | 13.86±0.90 |
| 13   | 4     | 1    | 4   | 3    | 7.85±0.61  |
| 14   | 4     | 2    | 3   | 4    | 8.82±0.75  |
| 15   | 4     | 3    | 2   | 1    | 10.01±0.82 |
| 16   | 4     | 4    | 1   | 2    | 9.57±0.73  |
| k1   | 5.18  | 7.51 | 8.24  | 8.58 |            |
| k2   | 9.30  | 8.64 | 9.52  | 8.19 |            |
| k3   | 11.66 | 9.81 | 8.52  | 9.63 |            |
| k4   | 9.06  | 9.26 | 8.93  | 8.81 |            |
| R    | 6.48  | 2.30 | 1.28  | 1.44 |            |
| 主次因素 |       |      | A>B>D>C   |      |            |
| 最佳组合 |       |      | A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub> D <sub>3</sub> |      |            |

通过不同 pH 条件下, 结合不同乙醇浓度, 提取温度及提取时间进行正交实验, 获得 PCZ 的得率如表 2。实验条件下 PCZ 的得率在 3.31%~13.86% 之间, 影响得率的主要因素为提取时的 pH(A) 和乙醇浓度(B), 最佳提取条件为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 即 pH=6, 50 °C 条件下, 通过 70% 的乙醇, 提取 3 h。进一步采用上述条件提取, 发现 PCZ 的得率为 14.35%。

## 2.2 PCZ 的自由基清除活性

测定了 PCZ 对 DPPH 自由基, 超氧阴离子自由基和羟自由基的清除活性。结果如图 1 所示。在浓度范围内, PCZ 的 DPPH 自由基清除率从 22.26% 增加到了 86.09%。高浓度的 PCZ 的 DPPH 自由基清除活性与 Vc 相近, 低浓度时弱于 Vc (图 1a)。在浓度范围内, PCZ 的超氧阴离子自由基清除率从 30.46% 增加到 76.25% (图 1c), PCZ 超氧阴离子自由基清除活性较弱于 Vc。在浓度范围内 PCZ 羟基自由基清除率变化不明显, 14.87% 增加到 17.59%, PCZ 羟基自由基清除活性弱 (图 1b)。

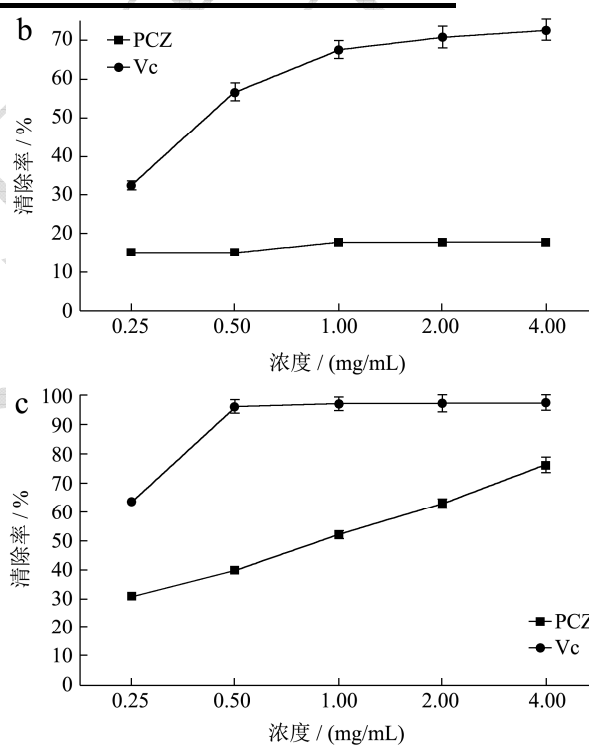
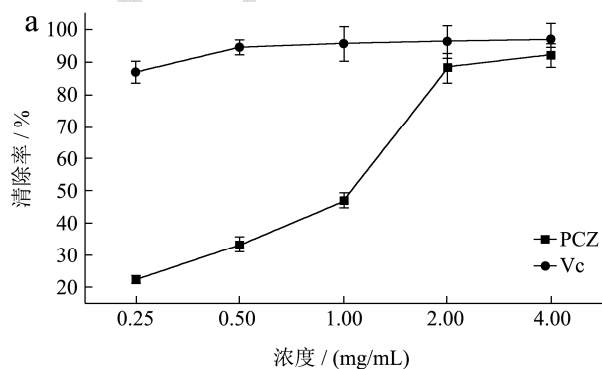


图 1 PCZ 的自由基清除活性

Fig.1 Scavenging activity of PCZ

注: a: DPPH 自由基; b: 超氧阴离子自由基; c: 羟自由基。

## 2.3 PCZ 的抗肿瘤活性

培养人宫颈癌细胞 HeLa 细胞, 通过添加 PCZ 并测定其对 HeLa 细胞的杀伤作用。结果发现, PCZ 对 HeLa 细胞具有较强的抑制作用, 当 PCZ 浓度为 100 μg/mL 时, HeLa 的存活率为 88.83%, 与空白对照呈现



显著差异,随着 PCZ 浓度的增高,HeLa 细胞活性进一步降低,400  $\mu\text{g/mL}$  PCZ 处理细胞,细胞存活率为 65.53%,与对照组呈现极显著差异。因此,PCZ 在实验设定浓度下能显著抑制 HeLa 细胞的增殖,具有抗肿瘤活性。

表 3 不同浓度 PCZ 对 HeLa 细胞活性的影响

Table 3 Cell viability of various concentrations of PCZ-induced

| HeLa cells |                        |                    |
|------------|------------------------|--------------------|
| 组别         | 浓度/ $(\mu\text{g/mL})$ | 细胞存活率/%            |
| 对照组        | 0                      | 100.0              |
| PCZ 组      | 25                     | 95.75 $\pm$ 2.34   |
|            | 50                     | 94.26 $\pm$ 1.58   |
|            | 100                    | 88.83 $\pm$ 3.31*  |
|            | 200                    | 76.09 $\pm$ 0.98** |
|            | 400                    | 65.53 $\pm$ 1.46** |
|            | 800                    | 60.26 $\pm$ 1.13** |

注:与空白对照组比较,\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$ 。

中药是我国的传统医药,传统中药中存在许多抗肿瘤有效成分,目前报道的有近 200 种,喜树碱、苦参碱、紫杉醇、青蒿素等都被证实具有抗肿瘤活性<sup>[12]</sup>。目前对玉米须药理作用的研究集中于降血糖<sup>[13]</sup>、降血糖<sup>[14]</sup>、利尿和抗尿路结石形成<sup>[15]</sup>等,对其抗肿瘤活性的研究较少。本实验通过 MTT 法,测定了 PCZ 对 HeLa 细胞增殖的抑制作用,证实较低浓度的 PCZ 就有显著的抗肿瘤活性。

### 2.4 PCZ 抗肿瘤活性的分子机制

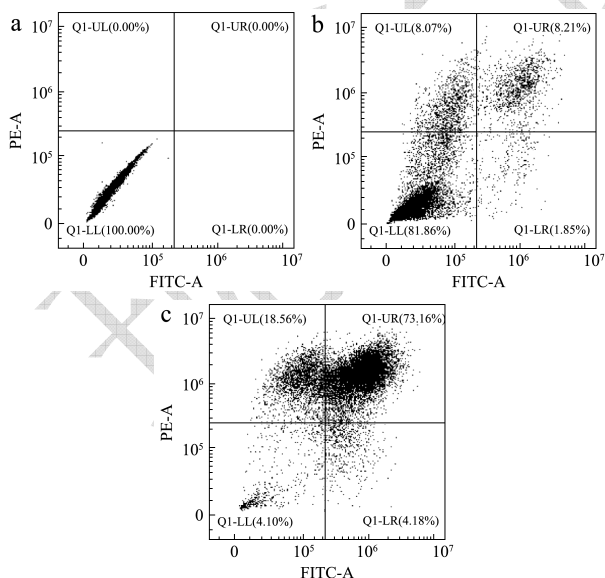


图 2 PCZ 对 HeLa 细胞活性的影响

Fig.2 Effects of PCZ on the activity of HeLa cells

注: a: 空白; b: 正常生长的 HeLa 细胞; c: 400  $\mu\text{g/mL}$  PCZ 处理后的 HeLa 细胞。

通过流式细胞术检测能发现 PCZ 对 HeLa 细胞活性的影响(图 2),PCZ 作用 HeLa 细胞后,细胞处于晚期凋亡状态(Q1-UR)的比例明显升高,达到了 73.16%(图 2c),正常培养的细胞晚期凋亡比例仅为 8.21%(图 2b)。可见,PCZ 能够诱导 HeLa 细胞凋亡,从而抑制 HeLa 细胞的增殖。

细胞凋亡又称程序性细胞死亡(programed cell death, PCD)<sup>[16]</sup>,是由基因控制的细胞自主的有序死亡。目前的研究表明,在肿瘤发生的过程中,既存在细胞快速增殖的正调控,也存在细胞凋亡的负调控<sup>[17]</sup>,从细胞凋亡入手,也是研究抗肿瘤活性的有效途径之一<sup>[18]</sup>。已有学者报道了原花青素通过诱导肿瘤细胞凋亡实现抗肿瘤活性,80  $\mu\text{g/mL}$  葡萄籽原花青素处理人皮肤鳞癌细胞(A431)24 h 后,A431 细胞的凋亡率达到 58%<sup>[19]</sup>,本实验中,400  $\mu\text{g/mL}$  浓度的 PCZ 使得 HeLa 细胞凋亡率达到 73.16%。

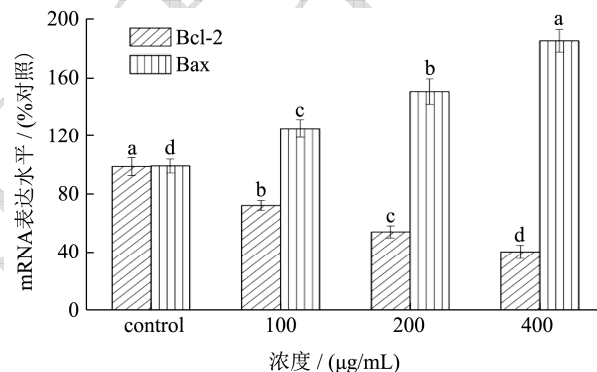


图 3 PCZ 对 HeLa 细胞 Bcl-2 及 Bax 基因表达的影响

Fig.3 Effects of PCZ on Bcl-2 and Bax gene expression in HeLa cells

注:同组中不同字母表示差异显著( $p < 0.05$ ),下同。

通过荧光定量 PCR 法测定了 HeLa 细胞中 Bcl-2 及 Bax 基因的表达情况。低浓度的 PCZ 就能改变 Bcl-2 及 Bax 的表达。100  $\mu\text{g/mL}$  的 PCZ 处理后,HeLa 细胞中 Bax mRNA 的表达量显著上升,达到 125.24%,而 Bcl-2 mRNA 的表达量则显著下降,为 72.16%。随着 PCZ 浓度的增加,Bax mRNA 的表达量继续上升,而 Bcl-2 mRNA 的表达量则持续下降。以上结果表明,PCZ 可以调节 HeLa 细胞中 Bax/Bcl-2 的比率,从而促进细胞凋亡的发生。

进一步的实验测定了凋亡执行者 Caspase-3 的活性,结果发现,100  $\mu\text{g/mL}$  的 PCZ 处理可以显著提高 HeLa 细胞中 Caspase-3 的活性,到达 164.20%,随着 PCZ 浓度的增加,Caspase-3 的活性进一步升高,400  $\mu\text{g/mL}$  的 PCZ 可以使 Caspase-3 活性达到 196.21%,但 200  $\mu\text{g/mL}$  和 400  $\mu\text{g/mL}$  的 PCZ 处理 HeLa 细胞后,其 Caspase-3 的活性没有明显变化。

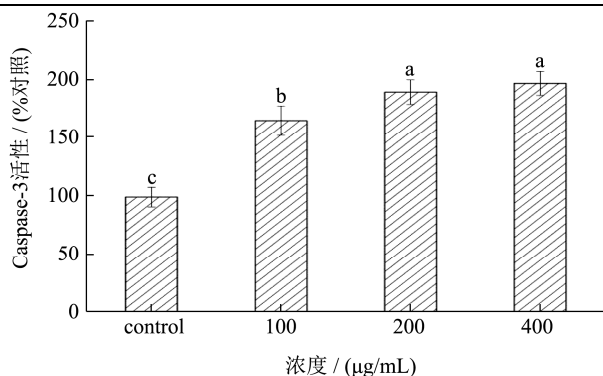


图4 PCZ对Hela细胞Caspase-3活性的影响

Fig.4 Effects of PCZ on Caspase-3 activity in HeLa cells

细胞凋亡中最经典的途径之一为内部线粒体途径(内途径),在该途径中,Bcl-2家族蛋白通过调节膜电位从而控制线粒体外膜通透性而发挥关键作用。Bcl-2家族蛋白是控制线粒体相关的凋亡因子释放的主要调节因子<sup>[20]</sup>。实验发现,PCZ能够降低Bax表达及促进Bcl-2表达,调节线粒体膜电位,开启细胞凋亡控制的分子开关。半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(Caspase)家族成员与真核细胞凋亡密切相关,是凋亡的核心效应器,并能够调节细胞的生长、分化与凋亡<sup>[21]</sup>。已有报道确认植物花青素类可通过线粒体内途径中的Caspase依赖途径诱导肿瘤细胞凋亡,紫葛葡萄花青素可作用于Bcl家族和IAP家族,在人白血病细胞(U937)中激活Caspase依赖的级联凋亡反应<sup>[22]</sup>。因此,本实验证实PCZ可通过内途径最终激活Caspase-3,执行Hela细胞凋亡,抑制Hela细胞增殖。

### 3 结论

本实验分离获得紫糯8号色素玉米的玉米须原花青素(PCZ)并验证其抗肿瘤活性。通过正交实验,发现PCZ的最适提取条件为pH=6,50℃条件下,通过70%的乙醇,提取3h。自由基清除实验确认PCZ具有优良的自由基清除活性,对DPPH自由基及羟自由基表现出较强的清除活性。通过对Hela细胞增殖活性的实验,发现100μg/mL的PZC就能显著抑制Hela细胞的增殖,进一步机制研究表明,PCZ可以诱导Hela细胞凋亡,通过调控凋亡分子开关Bax/Bcl-2的比例,促进凋亡执行者Caspase-3的表达实现。因此,PCZ具有抗氧化活性,能够抑制肿瘤细胞增殖,可作为一种功能食品或保健品加以开发利用。

### 参考文献

[1] 徐燕,梁敬钰.玉米须的化学成分研究[J].中草药,2006,37(6):831-833  
XU Yan, LIANG Jin-yu. Study on the chemical constituents

of corn silk [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2006, 37(6): 831-833

[2] 李博文,张兵帅,邱智东,等.玉米须活性研究进展[J].中华中医药杂志,2018,33(6):2495-2498

LI Bo-wen, ZHANG Bin-shuai, QIU Zhi-dong, et al. Research progress on pharmacological activities of corn stigma [J]. China J of Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(6): 2495-2498

[3] 关海宁,刁小琴,乔秀丽,等.响应面优化超临界CO<sub>2</sub>萃取玉米须多酚工艺及抗氧化性研究[J].食品研究与开发,2019,40(6):120-125

GUAN Hai-ning, DIAO Xiao-qin, QIAO Xiu-li, et al. Optimization of supercritical CO<sub>2</sub> extraction conditions of polyphenols from corn silk by response surface methodology and its antioxidant activities [J]. Food Res Develop, 2019, 40(6): 120-125

[4] 任顺成,丁霄霖.玉米须黄酮类测定方法的研究[J].食品科学,2004,24(3):116-119

REN Shun-cheng, DING Xiao-lin. Study on determination methods of flavonoids from corn silk [J]. Food Science, 2004, 24(3): 116-119

[5] Payne MJ, Hurst WJ, Suart DA, et al. Determination of total procyanidins in selected chocolate and confectionery products using DMAC [J]. J Aoac Int, 2019, 93(1): 89-96

[6] 姚开,何强,吕远平,等.葡萄籽提取物中原花青素含量的测定[J].食品与发酵工业,2002,28(3):17-19

YAO Kai, HE Qiang, LYU Yuan-ping, et al. Determination of proanthocyanidin from grape-seed extracts [J]. Food Ferment Ind, 2002, 28(3): 17-19

[7] 张霞,姜力,李娜,等.白花木瓜多聚原花青素降解条件优化[J].西南林业大学学报(自然科学),2017,37(2):215-221

ZHANG Xia, JIANG Li, LI Na, et al. Optimization for degradative process of polymeric proanthocyanidins from *Chaenomeles cathayensis* [J]. J Southwest for Univ (Nat Sci), 2017, 37(2): 215-221

[8] 徐怀德,闫宁环,陈伟,等.黑莓原花青素超声波辅助提取优化及抗氧化性研究[J].农业工程学报,2008,2:272-277

XU Huai-de, YAN Ning-huan, CHEN Wei, et al. Ultrasonic assisted extraction technology and its antioxidative activity of blackberry anthocyanin [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2008, 2: 272-277

[9] 梁祖培,张燕,熊波,等.天然植物中原花青素提取和纯化方法研究进展[J].食品安全质量检测学报,2017,8(8):3029-3036

LIANG Zu-pei, ZHANG Yan, XIONG Bo, et al. Advances in

- extraction and purification methods of procyanidine from natural plants [J]. *J Food Safe Qual*, 2017, 8(8): 3029-3036
- [10] 戚向阳,黄红霞,巴文广.苹果中原花青素提取工艺的研究[J].*食品工业科技*,2003,24(3):63-65  
QI Xiang-yang, HUANG Hong-xia, BA Wen-guang. Study on the extraction of proanthocyanidins from apple [J]. *Sci Tech Food Ind*, 2003, 24(3): 63-65
- [11] Oktay M, Gulcin I, Kufrevioglu OI. Determination of *in vitro* antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts [J]. *LWT Food Sci Tech*, 2003, 36: 263-271
- [12] 朱华,周春山,白燕远,等.抗癌中草药有效成分的研究进展[J].*时珍国医国药*, 2002,13(11):682-684  
ZHU Hua, ZHOU Chun-shan, BAI Yan-yuan, et al. Research progress on anticancer Chinese herbal active ingredients [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2002, 13(11): 682-684
- [13] 苗明三,孙艳红.玉米须总皂苷降糖作用研究[J].*中国中药杂志*,2004,29(7):711-712  
MIAO Ming-san, SUN Yan-hong. Study on the hypoglycemic effect of total corn saponins [J]. *China J Chin Mater Med*, 2004, 29(7): 711-712
- [14] 张海波.玉米须的生药学研究[D].郑州:河南大学,2007  
ZHANG Hai-bo. Study on the pharmacognosy of corn silk [D]. Zhengzhou: Henan University, 2007
- [15] Velazquez DVO, Xavier HS, Batista JEM, et al. *Zea mays* L. extracts modify glomerular function and potassium urinary excretion in conscious rats [J]. *Phytomedicine*, 2005, 12(5): 363-369
- [16] ZHAO Jun-jie, LIU Zun-wei, WANG Bo, et al. Inhibiting endogenous tissue plasminogen activator enhanced neuronal apoptosis and axonal injury after traumatic brain injury [J]. *Neur Regen Res*, 2020, 15(4): 667
- [17] Dull AB, Wilsker D, Hollingshead M, et al. Development of a quantitative pharmacodynamic assay for apoptosis in fixed tumor tissue and its application in distinguishing cytotoxic drug-induced DNA double strand breaks from DNA double strand breaks associated with apoptosis [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(24): 17104
- [18] 陈永顺.青蒿琥酯体外抗肿瘤效应及其分子机制研究[D].南宁:广西医科大学,2008  
CHEN Yong-shun. Study the effect of art on anti-tumor *in vitro* and explore its possible molecular mechanism [D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2008
- [19] Meeran SM, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins promote apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells through alterations in Cdk1-Cdk-cyclin cascade, and caspase-3 activation via loss of mitochondrial membrane potential [J]. *Exp Dermatol*, 2007, 16(5): 405-415
- [20] HUANG Xiu-lan, CUI Guo-hui, ZHOU Ke-yuan. Correlation of PI3K-Akt signal pathway to apoptosis of tumor cells [J]. *Chin J Cancer*, 2008, 3: 331-336
- [21] Cho SO, Lim JW, Kim H. Oxidative stress induces apoptosis via calpain- and caspase-3- mediated cleavage of ATM in pancreatic acinar cells [J]. *Free Radical Res*, 2019, 3: 1-241
- [22] Choi. Induction of apoptosis in human leukemia U937 cells by anthocyanins through down-regulation of Bcl-2 and activation of caspases [J]. *Int J Oncol*, 2009, 34(4): 1077-1083
- 
- (上接第 227 页)
- [34] SUN Jian, ZHOU Bo, TANG Chao, et al. Characterization, antioxidant activity and hepatoprotective effect of purple sweet potato polysaccharides [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 115: 69-76
- [35] 李化强,吴菲菲,龙艳珍,等.隆回龙牙百合多糖的体外抗氧化活性研究[J].*食品安全质量检测学报*,2017,8(8):3068-3073  
LI Hua-qiang, WU Fei-fei, LONG Yan-zhen, et al. The extraction and antibacterial activity of lily polysaccharide [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2017, 8(8): 3068-3073
- [36] 黄玉龙,高雅清,全婷,等.不同提取方法对兰州百合多糖结构及抗氧化活性的影响[J].*现代食品科技*,2018,34(11):126-131,94  
HUANG Yu-long, GAO Qing-ya, QUAN Ting, et al. Effects of different extraction methods on the structure and antioxidant activity of polysaccharides from lily of Lanzhou [J]. *Modern Food Technology*, 2018, 34(11): 126-131, 94