

黄酮类化合物抑制肿瘤细胞增殖活性及构效关系

彭钰芳, 许传莲

(浙江理工大学蛋白质组学与分子酶学实验室, 杭州 310018)

摘 要: 通过 MTT 法分析比较了 12 种黄酮类化合物对乳腺癌细胞(MCF-7L, MDA-MB-231)、肝癌细胞(SMCC-7721)、结肠癌细胞(HCT-15)增殖抑制和细胞形态变化。根据 12 种化合物对癌细胞增殖抑制作用及其构效关系发现化合物 FB4 的 A 环 6 位羟基化能显著提高黄酮苷元化合物对癌细胞的增殖抑制作用。这些结果为改造黄酮化合物的结构,从而增强其抑制癌细胞增殖活性提供了重要依据。

关键词: 黄酮类化合物; 结构; 抑制增殖

中图分类号: R915 **文献标识码:** A

0 引 言

杭白菊为菊科植物菊花(*Dendranthema morifolium*)的头状花序,是我国传统中药材“浙八味”之一,其中黄酮类化合物、三萜类化合物和挥发油是其主要有效成分。现代药理学实验证实菊花具有抗炎、抗菌、抗病毒、降血脂、改善心血管功能、抗氧化、抗肿瘤等多种药理活性,这与黄酮类化合物的生物活性相符。黄酮类化合物抗肿瘤机制包括抑制肿瘤细胞增殖,调节细胞信号通路,诱导肿瘤细胞凋亡,促进抑癌基因表达,抑制癌基因表达,抑制耐药蛋白的作用等。

芹菜素能强烈抑制 HER2/neu 过表达的乳腺癌细胞的生长,对基础水平表达的 HER2/neu 乳腺癌细胞的抑制作用较弱^[1]。5,7-二羟黄酮诱导表达 p21Waf1/Cip1 将 C6 神经胶质细胞阻断在 G1 期^[2]。槲皮素抑制 NFκB(核因子 κB)与 DNA 结合,还能抗过氧化氢引起的 DNA 断裂^[3],强烈抑制 HL-60PKC 活性和细胞膜 TPK 活性^[4],抑制 K-ras, H-ras 和 N-ras 基因的表达^[5]。Naringenin C 环 2,3 位没有双键,虽然比 myricetin, fisetin 等的疏水性更强,但对 P-gp(P-糖蛋白)没有抑制作用,因此黄酮类化合物的平面结构在与 P-gp 的相互作用中很重要。疏水基团和平面结构对黄酮类化合物抑制 P-gp 介导的转运至关重要^[6-7]。本研究利用实验室已有黄酮类化合物对不同的人源肿瘤细胞进行了抑制增殖活性研究,并根据它们抑制作用强弱和构效关系的分析,为黄酮类化合物的结构改造从而增强其抑制肿瘤细胞增殖活性提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

杭白菊购自上海虹桥中药饮片有限公司,MTT 购自 Sigma-Aldrich 公司。所用试剂均为分析纯。乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 由美国贝勒医学院乳腺癌研究中心 Suzanne A. W Fuqua 教授惠赠,乳腺细胞株 HBL-100 和肝细胞株 L-02 购自中科院上海生物化学与细胞生物研究所,肝癌细胞株 SMCC-7721 由浙江理工大学新元医学与生物技术研究钱程教授惠赠,结肠癌细胞株 HCT-15 由本实验室保存。

收稿日期: 2010-03-26

基金项目: 浙江省教育厅重点项目(Z200804057)

作者简介: 彭钰芳(1985-),女,四川眉山人,硕士研究生,主要从事天然药物化学及活性研究。

通讯作者: 许传莲,电子邮箱: chuanlianxu@163.com

1.2 MTT 试验

取对数生长期细胞(贴壁长满 80%左右)按每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板内,每孔 100 μL 培养液,培养过夜。加入不同浓度的黄酮类化合物,加药终浓度分别为:10、30、50、70、100 μM ,每孔总体积为 200 μL ,继续培养 48 h 或 72 h。细胞对照组铺板时加相同浓度的细胞悬液,加药时每孔加入 100 μL 培养液;空白对照组在铺板时不加细胞悬液,只加 200 μL 培养液。每个浓度各设 5 个平行孔,置 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。

到达相应时间点后,每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL),继续在培养箱中培养 4 h 后弃上清,加入 150 μL DMSO,振荡 10 min,酶标仪测 595 nm 处各孔吸光度 A 值,实验独立重复 3 次,结果统计学分析后(t 检验, $P<0.05$),SPSS13.0 计算得到半抑制浓度 IC_{50} 。

1.3 光学显微镜观察细胞形态变化

取 MDA-MB-231 对数生长期细胞按 1×10^4 个细胞每孔铺于 96 孔板内,每孔 100 μL ,培养过夜。细胞中加入木犀草素(FB5)稀释液 100 μL ,使 FB5 终浓度为 10、50、100 μM ,对照组加入 100 μL 培养液,48 h 后在光学显微镜下(10×10)观察细胞形态变化。

2 结果与讨论

2.1 MTT 结果

采用 MTT 试验分析了杭白菊中黄酮类化合物对 MDA-MB-231、SMCC-7721 细胞增殖的影响,结果见图 1。木犀草素(FB5)可抑制 SMCC-7721 细胞和 MDA-MB-231 细胞的生长,处理 72 h 后 IC_{50} 分别为 56.67 μM 和 72.92 μM ,100 μM 木犀草素处理 MCF-7L 细胞 48 h 后增殖抑制率达 60%,100 μM 槲皮素(FS1)处理 SMCC-7721 细胞 48 h 后增殖抑制率达 40%。

2.2 各黄酮类化合物对肿瘤细胞增殖作用的构效关系比较

由 IC_{50} 比较得出,受测黄酮类化合物官能团类型及取代位置与活性大小排序如下:6—OH>5—OH>7—OH>5,7—OH>3—OH,3'— OCH_3 >3'—OH>2'— OCH_3 。其中 A 环 6 位羟基取代能显著提高黄酮类化合物的抑制肿瘤细胞增殖的作用,C 环 3 位羟基取代能显著降低黄酮类化合物的抑制肿瘤细胞增殖的作用。2'位甲氧基取代使黄酮类化合物失去抑制肿瘤细胞增殖的作用。见表 1。

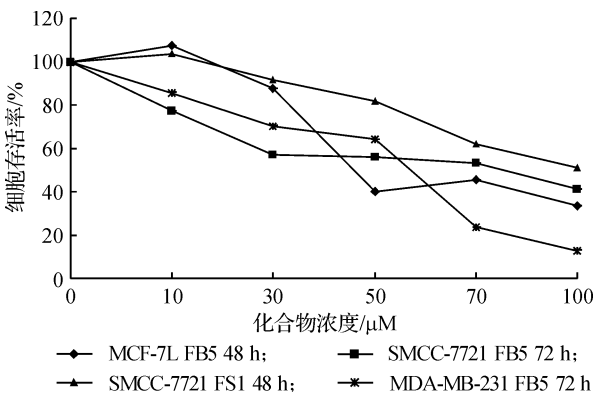


图 1 黄酮化合物对肿瘤细胞的增殖抑制作用

表 1 黄酮类化合物的 IC_{50} 和构效分析

化合物编号	取代官能团	$\text{IC}_{50}/\mu\text{M}$			
		MCF-7L	MDA-MB-231	SMCC-7721	HCT-15
FB1	5—OH,3'— OCH_3	32.01	—	—	—
FB2	7—OH,2'— OCH_3	—	—	—	—
FB3	7—OH,3'— OCH_3	35.39	—	—	—
FB4	6—OH,3'— OCH_3	20.80	—	—	—
FB5	5,7,3',4'-OH	37.67	56.67	72.92	—
FB6	5—OH,7-O- β -D-glucopyranosid,3',4'-OH	—	—	—	—
FB7	5—OH,7-O-(6"-O-malonyl)- β -D-glucopyranosid,3'4'-OH	—	—	—	—
FB8	5—OH,7-O- β -D-glucopyranosid,3'-OH	—	—	—	—
FB9	5—OH,7-O-(6"-O-malonyl)- β -D-glucopyranosid,3'-OH	—	—	—	—
FS1	Quercetin	—	—	110.83	—
FS2	Kaempferol	—	—	—	—
FS3	Rutin	—	—	—	—

注:“—”表示在实验浓度范围内受测黄酮类化合物没有抑制该肿瘤细胞增殖的作用。

2.3 光学显微镜观察细胞形态变化结果

在两组实验中,对照组细胞均形态饱满、增殖迅速、成簇正常生长。10 μM FB5 处理 MDA-MB-231 48 h 后,虽然细胞仍有大量增殖,但形态发生改变,细胞皱缩变圆,50 μM 处理组细胞变得扁平细长,呈不正常的状态,100 μM 组呈现出大量细胞死亡,见图 2。

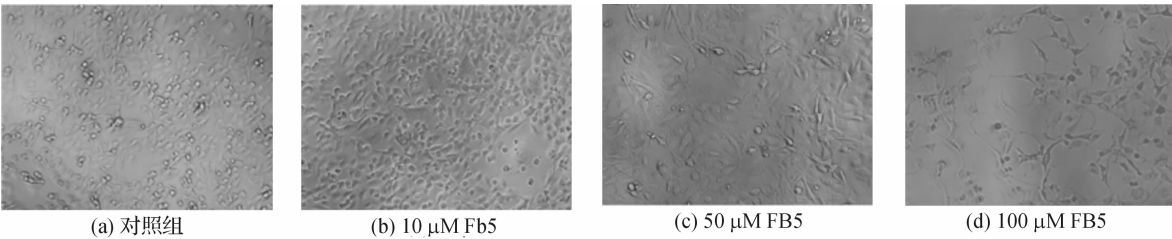


图2 MDA-MB-231 细胞形态对比图(48 h)

3 讨 论

黄酮类化合物具有多种生理药理活性,在传统中药中应用广泛且历史悠久。现在肿瘤治疗仍然是医药领域无法攻克的难关,中医已成为肿瘤治疗的方法之一。本实验采用了乳腺癌细胞株 MCF-7 和 MDA-MB-231,肝癌细胞株 SMCC-7721,结肠癌细胞株 HCT-15 以及乳腺细胞株 HBL-100,肝细胞株 L-02 为实验对象,考察了 12 种黄酮类化合物对这些肿瘤细胞增殖抑制作用,为寻找有效的抗肿瘤药物,研究药物作用机制和寻找新靶点提供依据。

本实验应用 MTT 法检测了 12 种黄酮类化合物对 3 种肿瘤细胞增殖抑制作用。结果表明,FB5(木犀草素)对 MCF-7,MDA-MB-231,SMCC-7721 的增殖均有时间和剂量依赖性的抑制作用,FS1(槲皮素)对 SMCC-7721 的增殖也有类似抑制作用,但没有 FB5 作用显著,其 IC_{50} 值为 110.83 μM (FB5 抑制 SMCC-7721 的 IC_{50} 为 72.92 μM)。12 个受测化合物对 HCT-15 的细胞增殖均无影响。

Katayama^[8]筛选了 32 种黄酮化合物对 BCRP 的抑制活性,其中以 3',4',7-三甲氧基取代黄酮化合物对肿瘤细胞抑制活性最强。构效关系为:a)C 环 2,3 位双键结构具有较强的抑制 BCRP 活性;b)B 环 4'-OCH₃ 或 4'-OH 取代,对 BCRP 具有较高的抑制活性;c)C 环 3-OH 或 B 环 3'-OH 取代,降低抑制 BCRP 的活性;d)黄酮类化合物糖苷化显示很强的抗 BCRP 活性。根据 MTT 结果,本实验分析了各黄酮类化合物结构与抑制增殖作用大小之间的关系,结果表明 A 环 6 位被羟基取代时,化合物的抑制增殖作用明显增强,C 环 3 位被羟基取代时,其抑制增殖作用则明显降低,不同位置的基团取代和相应活性大小排序为:6-OH>5-OH>7-OH>5,7-OH>3-OH,3'-OCH₃>3'-OH>2'-OCH₃,与已有研究结果基本相符,这为黄酮类化合物的结构改造提供了线索。

参考文献:

[1] Lin Jen Kun, Tzong Der Way. Apigenin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-dependent pathway[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(6): 4479-4489.

[2] Weng Meng Shih, Ho Yuan Soon, Lin Jen Kun. Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase[J]. Biochemical Pharmacology, 2005, 69(12): 1815-1827.

[3] Lee T J, Kim O H, Kim Y H, et al. Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells [J]. Cancer Lett, 2006, 240(2): 234-242.

[4] Kang T B, Liang N C. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells[J]. Biochem Pharmacol, 1997, 54(9): 1013-1018.

[5] Ranelletti F O, Maggiano N, Serra F G, et al. Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors[J]. Int J Cancer, 2000, 85(3): 438-445.

[6] Kitagawa S, Nabekura T, Takahashi T, et al. Structure-activity relationships of the inhibitory effects of flavonoids on P-

glycoprotein-mediated transport in KB-C2 cells[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2005, 28(12): 2274-2278.

[7] Kitagawa S. Inhibitory effects of polyphenols on P-glycoprotein-mediated transport[J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(11): 1-6.

[8] Katayama K, Masuyama K, Yoshioka S, et al. Flavonoids inhibit breast cancer resistance protein-mediated drug resistance: transporter specificity and structure-activity relationship[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2007, 60(6): 789-797.

Antiproliferation and SARs of Flavonoids on Human Cancers

PENG Yu-fang, XU Chuan-lian

(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The authors evaluate 12 flavonoids(including flavonoid aglycones and their glycosides) on cell proliferation by MTT assay, cell lines include breast cancer MCF-7L, MDA-MB-231, liver cancer SMCC-7721, colon cancer HCT-15. Meaning while, the cellular morphology changes are observed by optical microscopy. The authors compare the structure and activity relationships (SARs) based on the different activities of 12 flavonoids, 6-hydroxylation on ring A significantly increases the inhibitory activity, the results provide a clue for us to modulate the structure of flavonoids and to inhibit the proliferation of cancer cells more efficiently.

Key words: flavonoids; structure; antiproliferation

(责任编辑: 许惠儿)