柑普提取物对 HepG2 和 SGC-7901 肿瘤细胞系的抗增殖作用

俞乐安[1]，肖遂[2]，黄亚辉[1]，李小晓[1]，赖惠清[3]，郑意[3]，梁大华[3]，张旭[2]

（1.华南农业大学园艺学院，广东广州 510642）（2.华南农业大学林学与风景学院，广东广州 510642）

（3.广州市云鼎柑普茶业有限公司，广东广州 510642）

摘要：本实验研究了柑普茶加工后的成分变化以及对 HepG2 与胃癌细胞 SGC-7901 细胞的抗增殖作用。采用高效液相色谱法对柑普茶品质成分进行了鉴定；以肿瘤细胞 HepG2 与 SGC-7901 为模型，测定了柑普茶及其原料茶抗增殖活性（IC_{50}），对效果较明显的 HepG2 细胞系进行了进一步的细胞周期与凋亡分析。结果表明，柑普茶加工后，多酚类物质含量为 17.22%，较原料茶显著降低，其中，酯型儿茶素与非酯型儿茶素含量降低显著，而以茶黄素、茶红素为代表的茶色素含量则有所提高。柑普茶在抑制 SGC-7901 与 HepG2 细胞体外增值方面的作用明显强于普洱茶和柑橘皮，其 IC_{50} 分别为 176.61 μg/mL 与 143.60 μg/mL。通过对 HepG2 细胞周期与凋亡分析，表明柑普茶对肝癌细胞系的抑制作用主要通过阻滞细胞周期在 G0/G1 期后进而诱导细胞凋亡引起。柑普茶特殊加工工艺有利于其风味改善，也有利于活性物质积累，使得其在抑制 HepG2 与 SGC-7901 肿瘤细胞增殖方面表现出更好的活性。

关键词：柑普茶；品质成分；抗增殖；肿瘤；细胞系

文章篇号：1673-9078(2020)07-42-49 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.7.1222

The Antiproliferative Activities in Ganpu Tea on HepG2 and SGC-7901 Tumor Cell Lines

YU Le-an[1], XIAO Sui[2], HUANG Ya-hui[1], LI Xiao-xiao[1], LAI Hui-qing[3], ZHENG Yi[3], LIANG Da-hua[3], ZHANG Xu[2]

(1.College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2.College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(3.Yundingganpu Tea Company, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In this study, the changes of components in the processed ganpu tea and their antiproliferative effects on HepG2 and SGC-7901 cells were investigated. The change of quality components in ganpu tea was determined by high performance liquid chromatography, and the activity of ganpu tea extracts against HepG2 and SGC-7901 colonies was determined by the MTT method. Then, the cell cycle and apoptosis of HepG2 cell line with obvious effect were further analyzed. The results showed that after the processing, the content of polyphenols was 17.22% which was lower than the material tea. Among them, the ester catechins and non-ester catechins were remarkably reduced. Moreover, the increase of tea pigments (theaflavins and thearubigins) was prominent. Ganpu tea had a higher tumor inhibition rate on SGC-7901 and HepG2 cell lines than puer tea and citrus peel, and the IC50 values were up to 176.61 μg/mL and 143.60 μg/mL, respectively. The analysis of cell cycle and apoptosis indicated that ganpu tea induced cell apoptosis through retarding the G0/G1 in HepG2 cells. As a result, the special processing of ganpu tea not only prompted the amelioration of flavor but also improved the accumulation of active substances so that ganpu tea showed better

引文格式：

俞乐安,肖遂,黄亚辉,等.柑普提取物对 HepG2 和 SGC-7901 肿瘤细胞系的抗增殖作用[J].现代食品科技,2020,36(7):42-49

YU Le-an, XIAO Sui, HUANG Ya-hui, et al. The antiproliferative activities in ganpu tea on HepG2 and SGC-7901 tumor cell lines [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(7): 42-49

收稿日期：2019-12-12

基金项目：广东省茶叶产业体系(2019LM1117)

作者简介：俞乐安（1995-），女，硕士研究生，研究方向：茶叶内含物质与活性

通讯作者：张旭（1984-），男，博士，讲师，研究方向：药用植物的开发和利用

antiproliferative activities in HepG2 and SGC-7901 tumor cell lines.

Key words: ganpu tea; quality components; antiproliferation; tumor; cell lines

柑普茶是一种将柑橘果肉掏空，内部填塞普洱茶，后经日晒风干的复合茶类[1]。柑普茶的干燥工艺有别于其他茶类的快速高温干燥方式，以日光下的缓慢氧化为主，也带动了其内含物质，主要是酚类的缓慢热降解。柑普茶的原料为新会柑橘皮与云南普洱茶。柑橘种类繁多，以新会地区的柑橘皮制品为品质最佳，由新会柑橘制得的新会陈皮也是中国地理标志产品[2]。柑橘皮经日晒风干、陈化一系列工艺后，即成为陈皮。中医将陈皮入药，具有促消化，抗心脑血管疾病的功能[3,4]。普洱茶的主要产区是云南，以大叶种晒青绿茶为原料，主要活性成分为多酚类物质，以儿茶素、没食子酸与茶色素为主[5]。柑普茶结合原料的特点与功能，口感醇厚带柑橘香，迅速在市场上流行。

柑普茶的主要活性物质是儿茶素、咖啡碱、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素等[6,7]，兼具普洱茶与柑橘皮的香气成分，其挥发性成分主要有烯烃类、酯类、醇类等[8]。作为饮料，无论是茶、柑橘皮，还是柑普茶，水溶性物质均可直接作用于人消化道细胞。其中，世界范围内，中国胃癌调整死亡率居于首位，90 年代，胃癌调整死亡率男性增长 11.0%，女性增长 6.3%[9]。同时，也有报道指出柑橘中提取的黄酮类化合物（主要物质为柚皮苷，含量为 2.99%；橙皮苷，含量为 2.10%）通过抑制 p-Akt 途径诱导 HepG2 细胞系的细胞凋亡，进而抑制其增殖[10]，该抑制活性可能与其 *α*-环甲氧基化的结构有关[11]。尽管，柑普茶兼具普洱茶的酚类物质与柑橘皮的黄酮类物质，但迄今为止，除了对柑普茶的橙皮苷、儿茶素与挥发性成分的研究外[6-8]，还没有对其加工前后的成分变化与活性的相关研究。因此，有必要对柑普茶加工工艺对其内含物质变化，与其对肿瘤细胞抑制活性进行研究。本实验以简单高效的高效液相色谱法为主要研究手段，采用新会柑皮和云南生普为原料加工而成并经两年存放的柑普茶及其原材料为研究材料。将柑普茶成品的柑橘皮部分与普洱茶分开，分别测量其内含物质，对比分析柑普茶原料与成品之间差异。选取陈皮与普洱茶活性较好的肿瘤细胞 HepG2 与 SGC-7901，探究柑普茶及其原料对两种肿瘤细胞的抑制活性差异，选取其中抑制活性较好的 HepG2 细胞系进行细胞周期与凋亡的分析，旨在阐明柑普茶加工工艺对其主要活性物质的影响及其对肿瘤细胞抑制作用，为科学饮用、加工柑普茶提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

经历两年存放的柑橘皮、普洱茶、柑普茶中剥出茶（以下简称剥出茶）、柑普茶中剥出柑橘皮（剥出皮）和柑普茶，均购于云鼎柑普有限公司；儿茶素单体（CG，EGC，C，EGCG，EC，GCG，ECG，CG）标准品、橙皮苷标准品、川陈皮素标准品、7-甲氧基黄酮标准品、橘皮素标准品、辛弗林标准品，均购于美国 Sigma 公司；异丙醇，十二烷基苯磺酸钠，磷酸，三氟乙酸（AR 级）均购于天津科密欧化学试剂有限公司；甲醇（HPLC 级），购于美国 ThermoFisher 公司。实验室自制：1640 高糖培养基，胎牛血清，0.25% 胰蛋白酶，50 μg/mL 青霉素和 50 μg/mL 链霉素，均购于美国 Glibco 公司；二甲基亚砜（DMSO）国产分析纯，购于上海沪试公司；四甲基偶氮唑盐（MTT）购于美国 Sigma 公司，配制成 5 mg/mL 的原药贮存液，-20 ℃保存；SGC-7901 人胃癌细胞株和 HepG2 肝癌细胞株，均购于 American type culture collection；临使用时以 1640，购于美国 Glibco 公司（完全培养基稀释）；Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒，凯基生物。

1.2 仪器与设备

酶标仪，美国 Thermo 公司产品；超净工作台，上海瑞净智化设备有限公司产品；倒置相差显微镜购自日本 Olympus 公司；真空冷冻干燥机，上海源起有限公司；旋转蒸发仪，上海亚荣化学仪器厂；高压蒸汽灭菌锅，上海申安医疗设备厂；离心机，-80 ℃低温冰箱，美国赛默飞世尔科技公司；96 孔板，美国 Corning 公司；高效液相色谱仪，美国 Aglient 公司；分光光度计，流式细胞仪（Guava easy Cyte TM）Merck。

1.3 柑普茶及其原料体外抑制肿瘤细胞活性测定

1.3.1 柑普茶生晒与存放过程

生晒：样品均摊在竹制篾子，置于室外，阳光直射区域，15 d，时间从 2016 年 10 月 16 日至同月 10

月 31 日。温度维持在 18~27 ℃，湿度维持在 75%~85%。

存放：样品均摊在竹制篾子，置于室内干燥区域，2 a，时间从 2016 年 11 月 1 日至 2018 年 11 月 1 日。温度维持在 10~30 ℃，湿度维持在 75%~85%。

1.3.2 生化成分指标测定

茶多酚含量参照 GB/T 8313-2013 的方法进行测定；茶色素含量（茶黄素，茶红素，茶褐素），采用比色系统分析法测定；儿茶素，四种黄酮含量采用高效液相色谱法（HPLC）测定。将不同样品经 100 ℃水浴浸提 45 min，趁热抽滤，滤液转入 100 ml 容量瓶，定容后，上样测定。色谱柱：Aglient Eclipse XDB-C18（5 μm，150 mm×4.6 mm）分析柱；柱温 38 ℃；进样量 10 μL；流动相流速 0.8 mL/min。

儿茶素测定条件：运行时间 45 min；检测波长 278 nm。流动相 A：0.1%三氟乙酸水溶液，流动相 B：甲醇。流动相洗脱梯度（以 A 相的变化为准）：0~30 min，70%；30~40 min，20%；40~40.1 min，90%；40.1~45 min，保持 90%。

四种黄酮测定条件：运行时间 50 min；检测波长 330 nm。流动相 A：0.1%三氟乙酸水溶液，流动相 B：甲醇。流动相洗脱梯度（以 A 相的变化为准）：0~15 min，80%；15~25 min，60%；25~30 min，40%；30~38 min，40%；38~43 min，10%；43~50 min，保持 80%。

1.3.3 茶样感官品质审评

根据 GB/T 23776-2018 茶叶感官审评方法进行审评[12]。分别称取各样品 3.0 g，用容积为 200 mL 的白瓷审评碗，以 150 mL 80℃的沸水冲泡 5 min；由 8 名具有高级评茶员资质的自愿者组成审评小组，采用密码审评方法，对供试茶样的外形、汤色、香气和滋味 4 项因子进行评分，将所得分数去掉 1 个最高分和 1 个最低分后的 6 个分数进行平均，最后计算总分。因为柑普茶有苷皮包裹，外形，叶底审评较普洱茶较为不一致，故而不对外形与叶底进行评分。感官审评总分按照公式进行计算：

$$C = 30\% * C_{\alpha} + 30\% * C_{\beta} + 40\% * C_{\gamma}$$

其中：C 表示感官总分，C_{α} 表示汤色评分，C_{β} 表示香气评分，C_{γ} 代表滋味评分。

1.3.4 供试样品提取

经历两年存放的柑橘皮、普洱茶与柑普茶，柑普茶内的剥出皮与剥出茶，共计五个样品研磨成粉末，过五十目筛，与水以 1:20 的比例，100 ℃水浴提取 60 min，反复浸提三次，过滤后，合并滤液。于旋转蒸发仪进行浓缩，置于真空冷冻干燥机，72 h，制得水溶性冻干粉。

1.3.5 细胞培养

采用含有 10%灭活胎牛血清（FBS）和 1%双抗（50 μg/mL 青霉素和 50 μg/mL 链霉素）的 1640 高糖培养基培养（5% CO_2，37 ℃）对细胞进行培养。待细胞生长至视野 80%时采用胰蛋白酶，进行消化、传代。

1.3.6 MTT 法测量半致死率

将 SGC-7901 和 HepG2 细胞株经胰酶消化后，以每孔 3000 个，100 μL 接种到 96 孔板，设置 3 个平行对照和一个不加药完全培养基作为空白对照。次日，每孔加入 100 μL 含有不同浓度柑普茶、柑橘皮与普洱茶水溶性物质的培养液，每个浓度设三个平行，培养 48 h 后，每孔中加入 20 μL MTT 溶液，于 37 ℃细胞培养箱中孵育 4 h，小心吸去上清液体，每孔加入 100 μL DMSO 溶液，避光条件下在缓慢摇动的摇床上反应 10 min，在酶联免疫检测仪上读数，波长为 570 nm 处测量各孔吸光度值（OD 值），将空白对照组的 OD 值设为 100%，计算不同处理组中的细胞存活率。

其中细胞存活率计算公式：

$$A(\%) = \frac{A_i}{A_o} \times 100\%$$

其中，A 表示细胞存活率，Ai 表示不同处理组的 OD 值；Ao 表示空白对照组的 OD 值。

1.3.7 流式细胞术检测细胞周期

将细胞密度为 2×10^4 细胞/孔接种于六孔板中，培养 24 h 后，行加药操作。其中对照组不加药，处理组加入不同浓度（80、160、240 μg/mL）柑普茶水浸出物溶液，培养箱培养 48 h 后，用冷 PBS 洗涤两次，加入 1 mL 75%的冰乙醇固定，置于 4 ℃冰箱过夜。次日离心，加入 400 μL PI 工作液，置于 4 ℃冰箱避光孵育 30 min 后流式细胞仪检测。

1.3.8 流式细胞术检测细胞凋亡

细胞密度为 2×10^4 细胞/孔接种于六孔板中，培养 24 h 后，行加药操作。其中对照组不加药，处理组加入不同浓度（120、240 μg/mL）柑普茶水浸出物溶液，培养箱培养 48 h 后，用不含 EDTA 的胰酶消化收集、用磷酸缓冲盐溶液洗涤细胞 2 次，于 1000 r/min 离心 5 min，弃上清，PBS 洗 2 次，加入 500 μL 1X Annexin V buffer 轻轻重悬细胞，再加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL 碘化丙啶染色液，轻轻混匀，室温（20~25 ℃）避光孵育 15 min，随即进行流式细胞仪检测。

1.4 统计分析

所有指标均进行 3 次重复测定，取平均值。采用 Excel 制图，用 SPSS 22.0 进行分析，计量资料以 x±s 表示，采用单样本均数的方差检验（ANOVA）分析

数据间的差异，显著性检验水平 α=0.05，p<0.05 视为有统计学差异。

2 结果与讨论

2.1 柑普茶及其原料内含物质变化

样品内含物成分由表 1 所示。与普洱茶原料相比，剥出茶茶色素含量显著增加（p<0.05），达到 0.42%，其中茶黄素与茶褐素含量极显著增加（p<0.01）。茶色素中，茶黄素对茶汤的感官品质起着重要作用，主要影响茶汤亮度、滋味鲜爽度和强度。茶红素是茶汤汤色中的主体物质，对茶汤滋味与汤色浓度起极重要作用。茶褐素是由茶黄素与茶红素进一步氧化形成的，主要反映为茶汤汤色中的褐色，只有在茶黄素与茶红素含量都较高且比例适当时才能形成普洱茶优良的品质。Obanda 等人的研究证实，提高温度会加速儿茶素降解，茶黄素水平的变化方向与温度和时间有关，发酵温度不同，茶黄素单体变化速率不同。因此，提高温度与延长时间（超过 60 min）可加速茶黄素降解，而该降解加速可能与前体物质 EGCG 与 ECG 存在有关[13]。

柑普茶中，儿茶素的主要成分为 EGCG，ECG，EGC 与 EC。剥出茶中，总儿茶素含量降低极为显著（p<0.01），为 6.34%，是普洱茶原料相应含量的 28.69%。其中以 EGCG 为代表的酯型儿茶素含量降低极为显著（p<0.01），为 3.17%，是原料相应含量的 22.64%。以 EC 和 C 为代表的非酯型儿茶素含量降低程度极显著(p<0.01)，达到 3.17%。在柑普茶长时间的生晒与存放加工中，这些消耗的酯型儿茶素 EGCG 与 ECG 作为前体物质，在缓慢的热降解过程中，促进了茶黄素的降解。

表 1 样品总酚、儿茶素、茶色素与部分黄酮含量

Table 1 The content of total polyphenols, catechins, tea pigments and flavonoids in samples

含量/%	普洱茶	剥出茶	柑橘皮	剥出皮	柑普茶
橙皮苷	-	-	3.20±0.24	4.20±0.23**	0.85±0.11
川陈皮素	-	-	0.67±0.07	0.69±0.07	0.18±0.01
7-甲氧基黄酮	-	-	0.28±0.03	0.34±0.03*	0.07±0.01
橘皮素	-	-	0.31±0.03	0.53±0.05**	0.11±0.01
总黄酮	-	-	4.49±0.22	6.11±0.32*	1.18±0.17
GA	1.47±0.21	1.27±0.15*	-	-	1.19±0.14
GC	0.45±0.07	0.33±0.06*	-	-	0.23±0.06
EGC	1.26±0.00	1.24±0.02	-	-	0.69±0.01
C	1.70± 0.07	0.88±0.08**	-	-	0.60±0.10
EC	3.22±0.20	1.21±0.18**	-	-	0.83±0.02
非酯型儿茶素总量	8.10±0.31	4.93±0.17**	-	-	2.31±0.01
EGCG	4.10±0.21	3.14±0.11**	-	-	0.68±0.04
GCG	1.31±0.01	0.77±0.02**	-	-	0.06±0.01
ECG	3.72±0.10	2.94±0.10**	-	-	0.49±0.01
CG	4.87±0.15	3.98±0.22*	-	-	0.06±0.00
酯型儿茶素总量	14.00±0.41	10.83±0.28**	-	-	1.30±0.11
儿茶素总量	22.10±1.45	15.76±1.43**	-	-	4.79±0.26
茶黄素	0.12±0.02	0.21±0.02**	-	-	0.13±0.01
茶红素	1.80±0.12	2.03±0.10*	-	-	1.79±0.12
茶褐素	1.35±0.41	1.63±0.08**	-	-	1.35±0.12
茶色素	3.25±0.60	3.67±0.42*	-	-	3.24±0.43
多酚总量	25.31±2.11	17.22±2.09**	2.36±0.12	2.43±0.13	7.73±1.35

注：剥出茶和剥出皮的*分别表示与普洱茶和柑橘皮组比较具有显著性差异（p<0.05）；**表示与普洱茶和柑橘皮组比较具有极显著性差异（p<0.01）；“-”表示未检出。

表 2 样品感官审评结果

Table 2 The results for the sensory evaluation of samples

	汤色	香气	滋味	总评分	名次
普洱茶	红浓尚明亮 23.51±2.11	香气纯正 24.55±1.78	较醇厚，略带涩味 36.32±1.84	84.38±3.12	3
剥出茶	红浓明亮 22.71±1.98	香气纯正，带柑橘香 26.33±1.96	醇厚，有回味 37.65±2.32	86.69±2.98	2
柑普茶	橙红明亮 27.56±2.08**	香高爽，柑橘香明显 28.51±2.45**	醇厚，回味甘爽 39.66±2.71*	95.72±3.44*	1

注：柑普茶的*表示与普洱茶组比较具有显著性差异（$p<0.05$）；**表示与普洱茶组比较具有极显著性差异（$p<0.01$）。

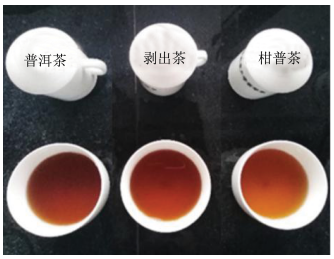

图 1 样品茶感官审评汤色结果

Fig.1 The sensory result of liquor color in samples

茶多酚含量极显著下降（$p<0.01$），同时茶色素含量则显著增加（$p<0.05$），这些内含物质的变化进一步形成柑普茶口感与茶汤色泽。与此同时，相较原料茶，剥出茶的茶多酚总量为 17.22%，其降低程度极为显著（$p<0.01$），表明柑普茶的加工工艺有助于多酚类物质热降解与茶色素物质的合成，进一步促进柑普茶品质形成。有研究证实，茶色素抑制肿瘤繁殖活性突出，Chakrabarty 等的研究指出 50 μg/mL 茶黄素和 20 μg/mL EGCG 的组合可以有效抑制 Hela 细胞通过 G(2)/M 期，进而诱导细胞凋亡发生[14]。

与原料柑橘皮对比，剥出皮的黄酮含量更高，达到 6.11%，远高于 Wang 等人之前对大红袍茶枝柑橘皮的黄酮含量[15]。剥出皮中，以橙皮苷含量增加最为显著（$p<0.01$），增加了 1.00%，是柑橘皮原料的 31.25%。

结合感官审评评价，柑普茶的加工工艺，有利于水分挥发，茶色素增加，主要体现在茶黄素与茶红素含量增加带来的汤色明亮度与色泽的改变。在香气上，与剥出皮相比较柑橘皮历经两年储存，黄酮类内含物质，橙皮苷、多甲氧基黄酮与橘皮素含量增加显著（$p<0.05$），也进一步促进柑普茶的高爽、柑橘香等香气品质形成。Xu 等人发现，绿茶茶汤中苦味主要由儿茶素（EGCG、ECG）决定，涩味主要由儿茶素（EGCG、ECG）决定[16]。而在柑普茶生晒加工过程中，柑普茶的多酚类物质中的酯型儿茶素发生了热降解，同时也促进了非酯型儿茶素的缓慢积累，使得剥出茶口感上的苦涩味较普洱茶原料降低，形成了柑普茶醇厚、回味甘爽的品质。

总体来说，由于柑普茶特殊的加工工艺，在缓慢的热降解过程中，内部柑普茶中的多酚类物质发生缓慢降解，促进了色素类物质与黄酮类物质的积累，同时其风味改变也更为充分、协调。

2.2 柑普茶水溶性物质对肿瘤细胞增殖的体外抑制作用

2.2.1 柑普茶水溶性物质对 SGC-7901 与 HepG2 细胞系增殖的体外抑制作用

用 MTT 法评价了不同浓度普洱生茶、柑橘皮与柑普茶对 HepG2 和 SGC-7901 细胞系的体外生长抑制作用，其中普洱茶、柑橘皮与柑普茶对 SGC-7901 和 HepG2 细胞系存活率的影响如图 2 所示。

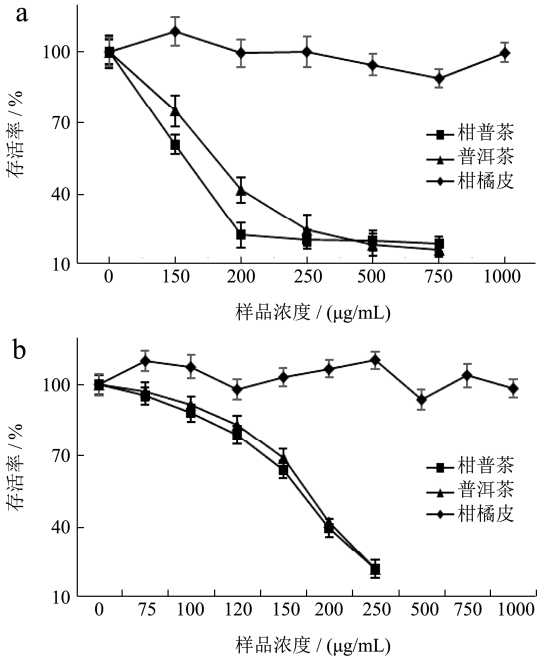

图 2 不同浓度柑普茶、普洱茶和柑橘皮对 HepG2 和 SGC-7901 细胞系存活率影响

Fig.2 The survival rate in SGC-7901 and HepG2 of different concentration of Ganpu tea, Puer tea and citrus peel

注：a：为不同浓度柑普茶、普洱茶与柑橘皮对 HepG2 细胞存活率影响，b：为不同浓度样品对 SGC-7901 存活率影响。

由图 2 可知，柑普茶水浸出物的浓度与 SGC-7901 和 HepG2 细胞系的存活率呈剂量依赖关系，随着柑普茶水浸出物的浓度的增大，细胞存活率逐渐降低。

将柑普茶、柑橘皮与普洱茶冻干粉作用于 SGC-7901 细胞系，与对照相比，当柑普茶提取物浓度高于 100 μg/mL 时，细胞存活率有显著性降低（$p<0.05$），说明高剂量柑普茶提取物对 SGC-7901 细胞繁殖有一定抑制作用；柑普茶提取物浓度在 0~75 μg/mL 范围，对细胞存活率没有显著性影响（$p<0.05$）。经计算普洱茶，柑普茶对 SGC-7901 细胞作用 48 h 的半数生长抑制浓度（IC_{50}）分别为 176.61 μg/mL，145.00 μg/mL，柑普茶对 SGC-7901 的抑制活性显著强于普洱生茶（$p<0.05$），柑橘皮水溶性物质对 SGC-7901 无抑制活性。

表 3 普洱茶与柑普茶作用于 HepG2 与 SGC-7901 细胞系的 IC_{50}

Table 3 The IC_{50} of puer tea and ganpu tea in HepG2 and SGC-7901

IC_{50}/(μg/mL)	HepG2	SGC-7901
普洱茶	143.60±5.98	176.61±6.03
柑普茶	83.65±4.56**	145.00±6.34**

注：柑普茶的*表示与普洱茶组比较具有显著性差异（$p<0.05$）；**表示与普洱茶组比较具有极显著性差异（$p<0.01$）。

Zhang 等人的研究表明 EGCG 可降低 SGC-7901 细胞迁移速度[17]，而柑普茶的 EGCG，可能导致柑普茶的抑制 SGC-7901 细胞增殖活性。曹等人研究发现，川陈皮素对人胃癌细胞 SGC-7901 有较强的增殖抑制作用，含量在 2.5~80 mg/L 时，对 SGC-7901 细胞的抑制率为 19%~90%，抑制作用呈明显时效和量效关系[18]。而柑普茶中川陈皮素含量在 0.18%，柑橘皮的含量在 0.67%，均没有达到此前报导的有效浓度。闫等人研究结果证实，茶色素通过使胃粘膜腺体的萎缩及肠化不典型增生等病理情况发生逆转，从而对胃癌早期病变存在一定治疗效果[19]。因此，柑普茶水溶性物质的较强抑制 SGC-7901 细胞系生长活性，可能源于柑橘皮中的黄酮类物质与普洱茶的多酚类物质与茶色素的协同作用。这表明柑普茶的独特加工工艺有助于其抑制肝癌肿瘤细胞增殖活性进一步增强。

将柑普茶、柑橘皮与普洱茶冻干粉作用于 HepG2 细胞系。与对照相比，当柑普茶提取物浓度高于 100 μg/mL 时，细胞存活率有极显著性降低（$p<0.01$），说明高剂量柑普茶提取物对 HepG2 细胞繁殖有一定抑制作用；柑普茶提取物浓度在 0~100 μg/mL 范围，对细胞存活率没有显著性影响（$p>0.05$）。经计算普洱生茶，柑普茶对 HepG2 细胞作用 48 h 的半数生长抑制浓度（IC_{50}）分别为 83.65 μg/mL，143.60 μg/mL，柑普茶对 HepG2 的抑制活性显著强于普洱生茶（$p<0.05$），柑橘皮水溶性物质对 HepG2 细胞系无抑制活性。有研究表明，EGCG 和 EC 通过增加 HepG2 细胞的凋亡和引起细胞周期阻滞来降低癌细胞活力[20]。同时，茶多酚与茶色素可以通过抑制 Bcl-2 表达，诱导 Bax 蛋白表达，从而进一步诱导 HepG2 细胞凋亡的发生[21]。对柑橘皮黄酮类物质活性的研究主要集中在肝细胞脂质积累上，有报道指出柑橘皮中的川陈皮素可通过激活 Amp 激活的蛋白激酶依赖性信号，来减弱高糖诱导的肝细胞脂质积累[22]，Shi 等人的研究发现川陈皮素（2.5 μM）显著抑制 HepG2 细胞的侵袭和迁移，以及抑制抗肝细胞生长因子引起的细胞结构改变，而橘皮素没有显著的抑制相关性[23]。有实验证明，柑橘内的多甲氧基黄酮可通过促进细胞凋亡，抑制人肝癌细胞株 HepG2 的生长[24]。因此，柑普茶水溶性物质的较强抑制 HepG2 细胞系增殖活性，可能源于柑橘皮水溶性物质中多甲氧基黄酮与普洱茶内的酚类物质的协同作用。

柑普茶独特的加工工艺，使得内含物质主要是酚类物质发生了热降解，同时促进茶色素积累。这些内含物质的变化，在促进柑普茶风味转化的同时，也使得其在抑制 SGC-7901 和 HepG2 细胞系活性较普洱生茶强。

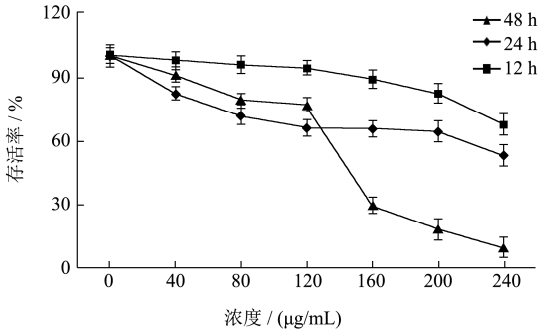

图 3 不同浓度的柑普茶处理 HepG2 细胞不同时间对其细胞存活率的影响

Fig.3 Effects of ganpu tea with different concentrations and different periods oftime on cell viability of HepG2 cells

其次，采取 MTT 法评价柑普茶水溶性物质对 HepG2 细胞系存活率的影响，从而进一步筛选出对 HepG2 细胞存活率影响最大的柑普茶水溶性物质浓度和作用时间。实验结果如图 3 所示。由图 3 可知，当柑普茶水溶性物质处理 HepG2 细胞 12 h 后，随着柑普茶水溶性物质浓度（40~240 μg/mL）的升高，细胞存活率从 98.01%降低到 68.01%。当处理时间从 12 h 增加到 48 h 时，随着柑普茶水溶性物质浓度（40~240

μg/mL）的升高，细胞存活率从 91.51%降低到 10.33%。实验结果表明，HepG2 细胞存活率均随柑普茶水溶性物质浓度的升高和处理时间的增加呈下降趋势。当柑普茶水溶性物质为 240 μg/mL 处理 HepG2 细胞 48 h 后，其细胞存活率达到最低为 10.33%。

2.2.2 柑普茶水溶性物质对 HepG2 细胞系周期与细胞凋亡的影响

由表 4 可知，S 期细胞比例由对照组的 18.36%明显下降至 9.55%（$p<0.01$），而 G0/G1 期细胞比例由 52.36%显著上升至 66.26%（$p<0.01$），提示细胞 DNA 可能受损，细胞周期无法通过 G1 DNA 损伤检查点，被阻滞在 G0/G1 期。这些细胞可能在修复受损 DNA 失败后启动凋亡程序。

表 4 柑普茶对 HepG2 细胞系的细胞周期影响

Table 4 The influence of ganpu tea in the cell cycle of HepG2 cell lines

样品浓度	G0/G1 期/%	S 期/%	G2/M 期/%
240 μg/mL	66.26±3.21**	9.55±1.54**	21.01±2.87**
160 μg/mL	62.07±3.09**	7.06±1.89**	26.71±3.08*
80 μg/mL	61.98±2.98**	11.26±2.43**	24.16±2.56*
0 μg/mL	52.36±2.77	18.36±2.75	26.92±3.43

注：*表示与 0 μg/mL 组比较具有显著性差异（$p<0.05$）；**表示与 0 μg/mL 组比较具有极显著性差异（$p<0.01$）。

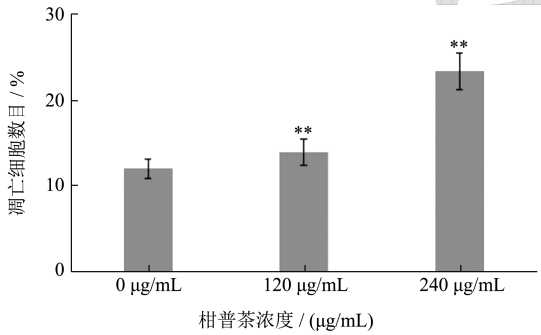

图 4 不同浓度的柑普茶对 HepG2 细胞凋亡数目的影响

Fig.4 Effects of different concentration of ganpu tea inclusion complex on population of apoptotic HepG2 cells

注：*表示与 BC 组比较具有显著性差异（$p<0.05$）；**表示与 BC 组比较具有极显著性差异（$p<0.01$）。

在肿瘤细胞中，抑制肿瘤细胞增殖常常是通过诱导细胞凋亡和诱导细胞周期阻滞实现的。为了进一步阐明柑普茶抑制 HepG2 肿瘤细胞增殖的机理，采用流式细胞仪考察不同浓度柑普茶对 HepG2 细胞周期分布的影响。细胞凋亡比率的测定可进一步验证柑普茶对 HepG2 细胞存活率的影响。柑普茶对 HepG2 细胞凋亡比率的影响如图 4 所示。细胞凋亡的数目随着柑普茶浓度的增加呈现增加的趋势，空白对照组细胞凋亡比率仅为 8.92%，当 120 μg/mL 柑普茶处理 HepG2 细胞 12 h 后，细胞凋亡数量为 13.86%，极显著高于对照（$p<0.01$）。当柑普茶的浓度提高到 240 μg/mL 时，其细胞凋亡总数提高到 23.34%，极显著高于对照组（$p<0.01$）。上述结果表明，柑普茶通过诱导细胞凋亡来抑制 HepG2 细胞系增殖。

3 结论

本研究通过对柑普茶酚类物质成分测定，测得柑普茶及其原料中儿茶素、茶色素、黄酮类物质含量，探明柑普茶加工工艺使得其内含物质发生转化并带动风味优化，主要体现在多酚类物质缓慢的热降解。其中，以 EGCG 为代表的酯型儿茶素含量降低最为显著，同时茶色素与黄酮类物质进一步积累。将柑普茶、柑橘皮与普洱茶分别作用于 HepG2 与 SGC-7901 细胞系。结果表明，柑普茶水溶性物质能通过阻滞细胞周期在 G0/G1 期进而显著抑制细胞增殖。总之，柑普茶的加工工艺带动风味优化，促进活性物质积累的同时，也使得其抑制肿瘤细胞增殖活性较原料进一步增强。因此，在日常生活中适当饮用柑普茶，会对肝癌与胃癌有一定防治作用。

参考文献

[1] DBS 44/010-2018,新会柑皮含茶制品[S]
DBS 44/010-2018, The Tea Product with Xinhui Citrus Peel [S]

[2] 罗政,郭媛媛,陈飞平,等.广陈皮原料茶枝柑与其他典型柑橘成分差异分析[J].热带作物学报,2019,40(1):174-179
LUO Zhen, GUO Yuan-yuan, CHEN Fei-ping, et al. Difference between ingredients of *Citrus chachiensis* tanaka and other typical citrus [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2019, 40(1): 174-179

[3] 傅曼琴,肖更生,吴继军,等.广陈皮促消化功能物质基础的研究[J].中国食品学报,2018,18(1):56-64
FU Man-qin, XIAO Geng-sheng, WU Ji-jun, et al. Studies on chemical basis of digestion promoting function of pericarpium citri reticulatae (citrus reticulate 'Chachi') [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(1): 56-64

[4] 俞静静,苏洁,吕圭源.陈皮抗心脑血管疾病相关药理研究进展[J].中草药,2016,47(17):3127-3132
YU Jing-jing, SU Jie, LYU Gui-yuan. Research progress in anti-cardiovascular and cerebrovascular disease activity of *Citri reticulatae* pericarpium [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(17): 3127-3132

[5] Shao W, Powell C, Clifford MN. The analysis by HPLC of

green, black and Pu'er teas produced in Yunnan [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1995, 69(4): 535-540

[6] 朱国军,区棋铭,李振球,等.高效液相色谱法同时测定柑普茶中橙皮苷和 6 种儿茶素[J].化学分析计量,2018,27(6):51-55
ZHU Guo-jun, QU Qi-ming, LI Zhen-qiu, et al. Determination of hesperidin and six catechins in ganpu tea by high performance liquid chromatography [J]. Chemical Analysis and Meterage, 2018, 27(6): 51-55

[7] 郑玉莹,郭芳,彭维,等.新会柑普茶高效液相色谱指纹图谱研究[J].中南药学,2018,16(6):721-725
ZHENG Yu-ying, GUO Fang, PENG Wei, et al. HPLC fingerprints of ganpu tea from Xinhui [J]. Central South Pharmacy, 2018, 16(6): 721-725

[8] 郑敏,黄晓兵,彭政,等.柑普茶挥发性成分分析[J].热带作物学报,2017,38(4):758-762
ZHENG Ming, HUANG Xiao-bing, PENG Zhen, et al. Analysis of volatile components in gan-pu tea [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2017, 38(4): 758-762

[9] 孙秀娣,牧人,周有尚,等.中国胃癌死亡率 20 年变化情况分析及其发展趋势预测[J].中华肿瘤杂志,2004,1:6-11
SUN Xiu-di, MU Ren, ZHOU You-shang, et al. Analysis of mortality rate of stomach cancer and its trend in twenty years in China [J]. Chinese Journal of Oncology, 2004, 1: 6-11

[10] Lee SH, Yumnam S, Hong GE, et al. Flavonoids of Korean *Citrus aurantium* L. induce apoptosis via intrinsic pathway in human hepatoblastoma HepG2 cells [J]. Phytotherapy Research, 2015, 29(12): 1940-1949

[11] Lin Y, Vermeer MA, Bos W, et al. Molecular structures of citrus flavonoids determine their effects on lipid metabolism in HepG2 cells by primarily suppressing apob secretion [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(9): 4496-4503

[12] GB/T 23776-2018, 茶叶感官审评方法[S]
GB/T 23776-2018, The Sensory Evaluation Method of Tea [S]

[13] Obanda M, Owuor PO, Mang'Oka R. Changes in the chemical and sensory quality parameters of black tea due to variations of fermentation time and temperature [J]. Food Chemistry, 2001, 75(4): 395-404

[14] Chakrabarty S, Nag D, Ganguli A, et al. Theaflavin and epigallocatechin-3-gallate synergistically induce apoptosis through inhibition of PI3K/Akt signaling upon depolymerizing microtubules in HeLa cells [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2019, 120(4): 5987-6003

[15] Wang F, Chen L, Chen H, et al. Analysis of flavonoid metabolites in citrus peels (*Citrus reticulata* "Dahongpao") using UPLC-ESI-MS/MS [J]. Molecules, 2019, 24(15): 2680

[16] Xu Y, Zhang Y, Chen J, et al. Quantitative analyses of the bitterness and astringency of catechins from green tea [J]. Food Chemistry, 2018, 258(16-24)

[17] Zhang J, Zhou Y, Chen H, et al. Effect of EGCG on SGC-7901 cells migration and metastasis [C]. Faseb Journal, Boston, MA: Federation American Social Experimental Biology, 2008: 22

[18] 曹弟勇,曾云,唐建平.川陈皮素对人胃癌细胞 SGC-7901 抑制作用的实验研究[J].临床合理用药杂志,2009,2(21):18-19
CAO Di-yong, ZENG Yun, TANG Jian-ping. The experimental research of inhibitory effect of nobiletin on human gastric carcinoma cell lineSGC-7901 [J]. Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use, 2009, 2(21): 18-19

[19] 闫小雪,袁红霞,雒名池.茶色素治疗胃癌前期病变临床观察[J].天津医科大学学报,2001,2:268-270
YAN Xiao-xue, YUAN Hong-xia, LUO Ming-chi. Clinical observation on the treatment of precancerous lesion with tea pigment [J]. Journal of Tianjin Medical University, 2001, 2: 268-270

[20] Khiewkamrop P, Phunsomboon P, Richert L, et al. Epistructured catechins, EGCG and EC facilitate apoptosis induction through targeting de novo lipogenesis pathway in HepG2 cells [J]. Cancer Cell International, 2018, 18(1): 46

[21] 贾旭东,韩驰,陈君石.茶多酚和茶色素对人肝癌细胞株 HepG2 细胞凋亡的影响[J].卫生研究,2005,1:73-75
JIA Xu-dong, HAN Chi, CHEN Jun-shi. Effects of tea polyphenols and tea pigments on apoptosis in HepG2 cell line [J]. Journal of Hygiene Research, 2005, 1: 73-75

[22] Park Y, Yuk T, Lee J. Nobiletin attenuates high glucose-induced lipid accumulation in HepG2 hepatocytes through activation of AMP-activated protein kinase-dependent signaling [C]. Faseb Journal, Boston, MA: Federation American Social Experimental Biology, 2015: 29

[23] Shi M, Liao Y, Shih Y, et al. Nobiletin attenuates metastasis via both ERK and PI3K/Akt pathways in HGF-treated liver cancer HepG2 cells [J]. Phytomedicine, 2013, 20(8-9): 743-752

[24] Vermeer MA, Lin Y, Bos W, et al. Molecular structures of citrus polymethoxylated flavonoids (PMFs) determine their inhibitory effect on apoB secretion in HepG2 cells [C]. Faseb Journal, Boston, MA: Federation American Social Experimental Biology, 2010: 24