

地方。从虚拟评价结果来看,黄酮苷类化合物的结果更接近于文献报道,表明药物在体内的代谢是导致虚拟评价存在差异的主要因素,提示在可能的情况下尽量考虑代谢的因素。尽管虚拟评价预测出的其他作用还需要进一步的研究和探索,虚拟评价的技术对中药复杂作用系统的研究显示了较大的实用性。

参考文献:

- [1] 中国药典 [M]. 2005.
- [2] Shang Q, Liu W, Xu W R, *et al.* Virtual evaluation on the activities of flavonoids from [WTBX] *Scutellaria baicalensis* [WTBZ] Georgi [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 142-146
- [3] 路俊仙, 崔璐, 张才波, 等. 不同种质黄芩体外抑菌作用的研究 [J]. *现代药物与临床*, 2009, 24(6): 364-366.
- [4] 王晶晶, 刘巍, 徐为人, 等. 黄酮苷类与表皮生长因子受体结合模式的理论研究 [J]. *中草药*, 2009, 40(3): 420-423
- [5] 刘鹏, 王晶晶, 徐为人, 等. 黄酮苷元类与表皮生长因子受体结合模式的理论研究 [J]. *药物评价研究*, 2009, 32(1): 48-53
- [6] 裴媛, 谭初兵, 徐为人, 等. 当归苯酞类和萜类成分作用的虚拟评价 [J]. *中草药*, 2010, 41(6): 938-941.
- [7] 刘巍, 邢洁, 徐为人, 等. 查尔酮类衍生物活性作用的虚拟评价 [J]. *药物评价研究*, 2009, 32(2): 110-116
- [8] 周家驹, 谢桂荣, 严新建. *中药原植物化学成分手册* [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004
- [9] Friesner R A, Banks J L, Murphy R B, *et al.* Glide: A new method for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy [J]. *Med Chem*, 2004, 47(7): 1739-1749
- [10] Wang R, Fang X, Lu Y, *et al.* The PDB bind database: collection of binding affinities for protein-ligand complexes with known three dimensional structures [J]. *Med Chem*, 2004, 47(2): 2977-2980
- [11] 邢洁, 徐为人, 刘鹏, 等. 槲皮素和地黄环烯醚萜类成分抗炎作用的虚拟评价 [J]. *中草药*, 2009, 40(6): 930-935
- [12] 关晓燕, 杨洁. 黄芩药理研究概况 [J]. *中医药信息*, 2006, 23(4): 21-23
- [13] 符海霞, 刘鹏, 王玉丽, 等. 槲皮素环烯醚萜类成分活性作用的虚拟评价 [J]. *中草药*, 2009, 40(5): 767-771.

苦荞麦黄酮对人食管癌细胞 EC9706 增殖的影响

闫斐艳, 崔晓东, 李玉英, 王转花*

(山西大学生物技术研究所 化学生物学和分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006)

摘要:目的 研究苦荞麦黄酮在体外对 EC9706 细胞增殖的影响。方法 MTT 法观察苦荞麦黄酮对 EC9706 细胞的毒性, 荧光染色法观察细胞核的改变, 流式细胞术观察细胞周期和细胞内活性氧水平, Western blotting 分析凋亡蛋白表达。结果 苦荞麦黄酮明显抑制 EC9706 细胞的增殖, 其抑制率与药物浓度和作用时间呈正相关。经 DAPI 染色, 电镜观察细胞核, 可见多个凋亡小体的形成。流式细胞仪检测发现, 苦荞麦黄酮使细胞发生 G₂/M 期周期停滞, 细胞内活性氧水平明显增加, 且呈浓度依赖效应。Western blotting 分析表明, 苦荞麦黄酮能上调细胞内的促凋亡蛋白 Bax, 并下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量。结论 苦荞麦黄酮对人食管癌细胞株 EC9706 增殖具有明显的抑制作用, 使细胞发生周期阻滞, 并能通过调节活性氧水平及改变凋亡蛋白的表达量诱导其发生凋亡。

关键词: 苦荞麦; 黄酮; 人食管癌细胞 EC9706; 细胞增殖

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)07-1142-04

苦荞麦 *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. 属于双子叶蓼科荞麦属作物, 在我国种植广泛, 是一种药食两用植物^[1]。《本草纲目》记载苦荞麦能够: “降气宽肠, 磨积滞, 清热毒风痛”。现代研究结果表明, 苦荞麦具有防治心脑血管疾病、糖尿病, 抗菌, 抗炎, 抗乙肝表面抗原等作用^[2]。近年来, 苦荞麦的抗癌作用也越来越为研究者所关注^[3]。苦荞麦中含有

丰富的黄酮, 黄酮类化合物的抗肿瘤作用已成为人们研究的热点之一, 其研究主要表现在对细胞的增殖抑制、诱导凋亡、阻断周期和调控蛋白表达等方面^[4~6]。前期研究初步表明, 苦荞麦黄酮可抑制白血病细胞株 HL-60 的生长并诱导其凋亡^[7]。本实验拟研究苦荞麦黄酮在体外对人食管癌 EC9706 细胞增殖的影响, 为新一代抗肿瘤药物的研发提供实

* 收稿日期: 2009-10-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30870525, 30671084); 山西省自然科学基金资助项目 (2007011077)

作者简介: 闫斐艳 (1983-), 女, 山西临汾人, 硕士研究生。研究方向: 蛋白质化学与工程。

Tel: (0351) 7019371 E-mail: yz2003529@163.com

* 通讯作者 王转花 Tel: (0351) 7019371 E-mail: Zhw ang@sxu.edu.cn

验和理论依据。

1 材料

1.1 药品与试剂: 苦荞麦 (贵州威黑荞, 山西省农业科学院农作物品种资源研究所提供) 经乔治军研究员鉴定。RPMI 1640 培养液 (美国 Hyclone); 小牛血清 (杭州四季青公司); MTT (Sigma 公司); 二甲基亚砜 (DMSO, 北京夏新生物公司); DAPI (Sigma 公司); PI 试剂盒、活性氧检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 兔 β -actin 抗体 (博士德生物公司); 鼠抗 Bcl-2 抗体、兔抗 Bax 抗体、兔抗羊辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗 (Stanta Cruz 公司); 其余试剂均为分析纯。

1.2 细胞: 人食管癌细胞 EC9706 (中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室惠赠)。

1.3 主要仪器: Hetor-Holten A/S CO₂ 细胞培养箱 (Denmark); BIO-RAD 酶联免疫检测仪; Elite ESP 流式细胞仪 (Coulter); BX-51 荧光显微镜、U-SPT 倒置显微镜 (Olympus); D-37520 离心机 (Biofuge stratos, Osterode); Labo Autoclave 高温灭菌箱 (SANYO); SW-CJ-1F 超净台 (苏净集团苏州安泰空气技术有限公司); FA1004A 型电子天平 (上海天平仪器厂)。

2 方法

2.1 苦荞麦黄酮样品制备: 苦荞麦黄酮样品制备按照文献方法^[8]进行, 提取的黄酮化合物进一步处理后经 HPLC 分析证明, 其中的主要成分为槲皮素 (60.12%) 和芦丁 (1.65%)。

2.2 细胞培养: 人食管癌细胞 EC9706 在含体积分数为 10%~15% 小牛血清的 RPMI 1640 的全培养基中, 于 37℃、5% CO₂ 孵育箱中培养, 细胞呈贴壁生长, 2~3 d 传代 1 次。取对数生长期的细胞进行实验。

2.3 MTT 法检测 EC9706 细胞生长情况: 取处于对数生长期的 EC9706 细胞, 经胰蛋白酶消化后, 调细胞浓度 1×10^6 /mL, 96 孔细胞培养板每孔接种 100 μ L 细胞液, 37℃、5% CO₂ 过夜培养。加入用 DMSO 溶解 (DMSO 体积分数 $\leq 0.1\%$) 的不同质量浓度的苦荞麦黄酮 (0、10、30、60 μ g/mL) 100 μ L, 设 3 个复孔, 分别培养 24、48、72 h 后, 每孔加入 20 μ L MTT (5 mg/mL), 继续培养 4 h。加入 150 μ L DMSO 孵育 10 min 溶解, 于酶标免疫测定仪测定 490 nm 处的吸光度 (A) 值, 各组实验重复 3 次。计算细胞增殖抑制率。

增殖抑制率 = (对照组 A 值 - 处理组 A 值) / 对照组 A 值 $\times 100\%$

2.4 EC9706 细胞核的形态学观察: EC9706 细胞在 96 孔板 (每孔细胞浓度为 1×10^6 /mL, 100 μ L 细胞液) 中经 0.1% DMSO (对照组, 下同) 和终质量浓度为 30 μ g/mL 的苦荞麦黄酮处理 48 h 后, 收集细胞, 用预冷的磷酸缓冲溶液洗涤后重悬于固定液 (4% 多聚甲醛) 中。10 min 后, 悬液 1 000 r/min 离心, 收集沉淀, 用同样缓冲溶液洗涤两次。将细胞悬液滴到载玻片上, 用 0.1 μ g/mL DAPI 染色 5 min, 在荧光显微镜下观察细胞核的形态学变化。

2.5 细胞周期的检测: 将接种于 6 孔细胞培养板中的 EC9706 细胞无血清培养 36 h, 使细胞同步于 G₀ 期。分别经 0.1% 的 DMSO, 终质量浓度为 30、60 μ g/mL 的苦荞麦黄酮处理 48 h 后, 收集细胞, 制备成单细胞悬液, 将细胞悬液移入 50 mL 试管中, 1 000 r/min 离心 6 min, PBS 清洗 3 次, 再离心。用 70% 乙醇于 4℃ 固定。加 RNase A, 37℃ 水浴 30 min, PI 染色, 用流式细胞分析仪进行细胞周期分析, 实验平行重复 3 次。

2.6 Western blotting 分析: 将细胞接种于 6 孔细胞培养板, 经 0.1% DMSO 和苦荞麦黄酮 30 μ g/mL 作用 24 h 后, PBS 洗涤 3 次, 加入冷的细胞裂解液冰上作用 30 min, 刮取细胞于微量离心管中。4℃, 10 000 r/min 离心 15 min 后, 吸取上层澄清液。紫外分光光度计测定各样品总蛋白浓度, 并调节浓度一致。样品在 12.5% SDS-PAGE 上进行电泳后, 转印于硝酸纤维素膜上。硝酸纤维素膜经封闭液 (5% 脱脂乳, 0.05% 聚山梨酯 20, pH 7.6) 封闭 2 h 后, TBST (20 mmol/L, pH 7.6) 洗涤 3 次, 于第一抗体工作液中孵育 2 h。TBST 洗涤 3 次, 第二抗体工作液中孵育 30 min, TBST 洗涤 3 次, DAP 显色液显色, 感光 X 光片后, 显影定影, β -actin 作为内参蛋白。

2.7 细胞内活性氧测定: 分别经 0.1% DMSO 和 30、60 μ g/mL 苦荞麦黄酮处理细胞 48 h 后, 离心收集各组细胞, 用无血清培养基悬浮, 将细胞稀释到 DCFH-DA 中, 浓度调节为 1×10^6 /mL。37℃ 细胞培养箱内孵育 20 min, PBS 洗涤 3 次。重复 3 次实验, 流式细胞仪检测细胞荧光强度 (激发波长为 488 nm, 发射波长为 525 nm)。

2.8 统计学分析: 采用 SPSS 12.0 软件, 进行统计分析, 组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 对 EC9706 细胞生长的影响: 结果见图 1, 苦荞麦黄酮对 EC9706 细胞增殖抑制率具有时间和剂量依赖性。10~60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苦荞麦黄酮能明显抑制 EC9706 细胞的增殖, 随药物质量浓度的增加, 抑制作用逐渐增强。60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苦荞麦黄酮体外诱导 EC9706 细胞 24 h 后, 抑制率达到 55%。作用 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为 (42.90 $\pm$ 1.27)、(35.07 $\pm$ 1.72)、(24.50 $\pm$ 1.41) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。苦荞麦黄酮各组抑制率与对照组比较, 均呈现显著差异 ($P < 0.05$ 、0.01)。

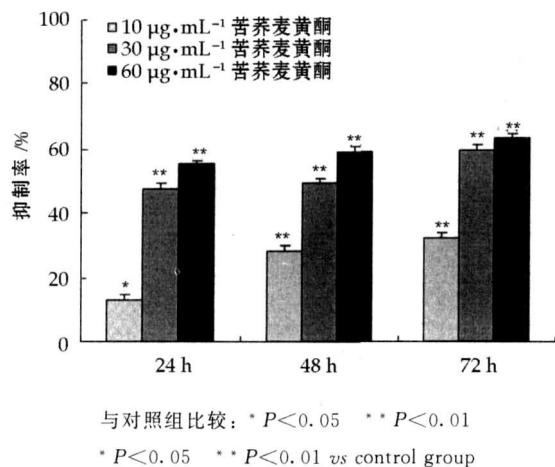


图 1 苦荞麦黄酮对 EC9706 细胞的生长抑制作用

ig. 1 Inhibition of flavonoids in [WTHX] F. tataricum [WTHZ]

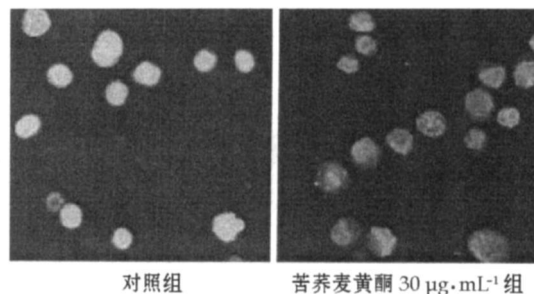


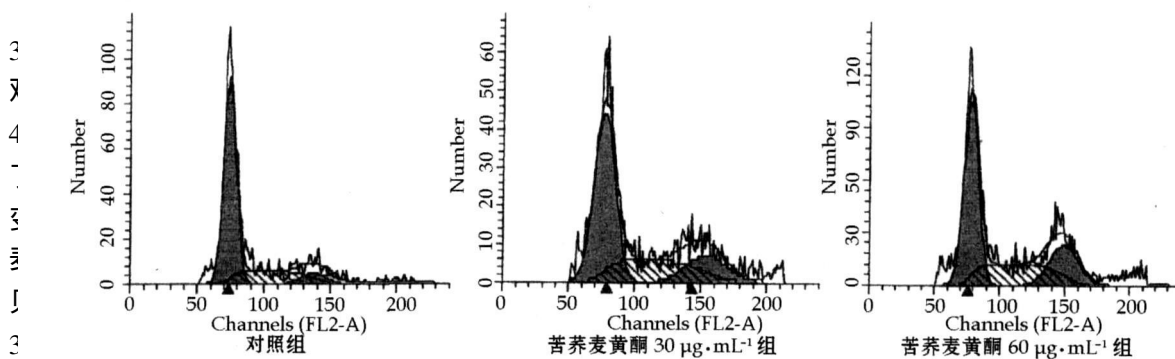
图 2 苦荞麦黄酮作用于 EC9706 细胞 48 h 后的荧光显微镜观察

Fig. 2 Fluorescent micrographs of EC9706 cells treated with flavonoids for 48 h

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 苦荞麦黄酮处理后, G_0/G_1 期细胞数量由 69.47% 减少为 49.79%, 而 G_2/M 期数量由 7.69% 增加到 21.53%。初步推断苦荞麦黄酮可使 EC9706 细胞周期阻滞于 G_2/M 期。

3.4 Western blotting 分析: EC9706 细胞经 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苦荞麦黄酮作用 48 h 后, Western blotting 检测结果显示, 抗凋亡蛋白 Bcl2 表达水平明显下降, 促凋亡蛋白 Bax 表达水平上升。初步分析判断, 苦荞麦黄酮抑制肿瘤细胞生长, 促使其凋亡与线粒体上的 Bcl2 家族凋亡蛋白的调控有关。结果见图 4。

3.5 对 EC9706 细胞内活性氧的影响: 30、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$



EC9706 细胞经不同质量浓度的苦荞麦黄酮作用 48

h 后, G_0/G_1 期的细胞数量逐步下降, S 期细胞数量

无明显变化, 而 G_2/M 期细胞数量明显上升。60

苦荞麦黄酮作用 EC9706 细胞 48 h 后, 活性氧的量升高, 峰值明显右移。对照组和苦荞麦黄酮 (30、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组的荧光强度分别为 (28.26 $\pm$ 2.16) %、(58.25 $\pm$ 0.91) %、(67.77 $\pm$ 4.78) %。药物处理组与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$)。见图 5。

4 讨论

本实验主要通过食管癌 EC9706 细胞来探讨苦荞麦黄酮对肿瘤细胞增殖的影响。MTT 法检测结果表明, 苦荞麦黄酮以浓度和时间依赖方式抑制

EC9706 细胞的增殖, 结果与大多植物来源的黄酮的作用基本一致。

利用 DAPI 核染色技术, 在荧光显微镜下观察到了细胞形态的不规则变化及细胞核的碎裂现象, 并同时伴有凋亡小体的出现。本实验同时运用流式细胞仪分析了苦荞麦黄酮对 EC9706 细胞周期及细胞内活性氧水平的影响, 发现苦荞麦黄酮能诱发 EC9706 细胞在 G_2/M 期出现细胞阻滞效应, 并且随着质量浓度的增加, 细胞内活性氧的量明显增加,

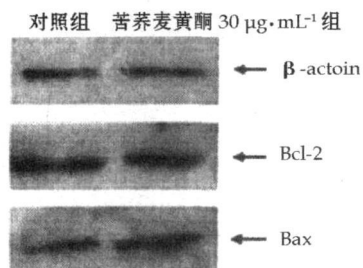


图 4 苦荞麦黄酮对 EC9706 细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of flavonoids in *F. tataricum* on Bcl-2 and Bax protein expression in EC9706 cells

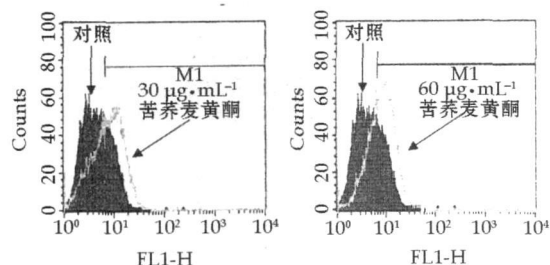


图 5 苦荞麦黄酮对 EC9706 细胞活性氧水平的影响

Fig. 5 Effects of flavonoids in *F. tataricum* on ROS level in EC9706 cells

这与显微镜下观察凋亡小体的形成结果相一致。

Bcl-2 和 Bax 是重要的细胞凋亡调控蛋白,二者在体内可形成同源二聚体 Bax/Bax,也可形成异源二聚体 Bax/Bcl-2,但生理作用相反,Bcl-2 能抑制多种因素引起的细胞凋亡,而 Bax 能促进细胞凋亡,Bax 蛋白高表达可对抗 Bcl-2 抑制作用。研究表明^[9],Bcl-2 和 Bax 的表达程度及其比例决定细胞接受凋亡信号后的命运,Bcl-2 表达量较大时细胞生存,细胞凋亡减少,而 Bax 蛋白大量表达时形成 Bax 同源二聚体,加速细胞凋亡。可见抗凋亡蛋白与促凋亡蛋白的比例在一定程度上决定了细胞是否发生凋亡。本研究使用 Western blotting 方法分析了苦荞麦黄酮对凋亡相关蛋白的影响,苦荞麦黄酮能够调节相应蛋白的表达,使 Bcl-2 表达量明显减少,而 Bax 表达量增多,二者比例的相对减少导致了 EC9706 细胞的凋亡。

活性氧是真核细胞有氧呼吸的产物,是细胞增殖的重要细胞内信号。已有研究证实,低微水平的活性氧升高可促进细胞增殖,而较高水平的活性氧则引发细胞凋亡,更高水平的活性氧则直接导致细胞坏死。本实验结果表明苦荞麦黄酮对 EC9706 细胞的增殖具有抑制作用,发现其能在细胞内引发活性氧的产生,造成活性氧水平显著升高,并有效诱导 EC9706 细胞发生凋亡。因此,引发活性氧并诱导细胞凋亡,这可能是植物多酚化合物发挥抗肿瘤作用的一个重要机制,而其中涉及的分子信号机制有待于进一步深入探讨。

综上所述,本实验证实苦荞麦黄酮能抑制 EC9706 细胞增殖的同时,用多种方法证实苦荞麦黄酮作用后的 EC9706 细胞有典型的凋亡发生,说明苦荞麦黄酮可能通过诱导 EC9706 细胞凋亡来发挥其抑制细胞增殖的作用,这一研究结果为进一步研究苦荞麦黄酮抑制其他肿瘤细胞的增殖提供了一定的实验依据。

参考文献:

- [1] 王敏,高锦明,王军,等.苦荞茎叶粉中总黄酮酶法提取工艺研究[J].中草药,2006,37(11):1645-1648
- [2] 张瑞,王英平,任贵兴.苦荞麦的药理研究进展[J].特产研究,2008(1):74-77
- [3] Wang Z H, Gao L, Li Y Y, et al. Induction of apoptosis by buckwheat trypsin inhibitor in chronic myeloid leukemia K562 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(4): 783-786
- [4] Neuhauser M L. Flavonoids and cancer prevention: What is the evidence in humans [J]. *Pharm Biol*, 2004, 42(Suppl): 36-45
- [5] Kuo H M, Chang L S, Lin Y L, et al. Morin inhibits the growth of human leukemia HL-60 cells via cell cycle arrest and induction of apoptosis through mitochondria dependent pathway [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(1A): 395-405
- [6] Michels G, Watjen W, Niering P, et al. Proapoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells [J]. *Toxicology*, 2005, 206(3): 337-348
- [7] Ren W, Qiao Z, Wang Z H, et al. Molecular basis of Fas and cytochrome c pathways of apoptosis induced by tartary buckwheat flavonoid in HL-60 cells [J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2003, 25(6): 431-436
- [8] Xiao S, Zhang Z, Li Y, et al. Study on extraction conditions of flavonoids from skin powder of tartary buckwheat [J]. *Food Sci*, 2005, 12(1): 88-90
- [9] 杨连君,王文亮,司晓辉.肝癌细胞凋亡相关蛋白 Bax 的表达及意义[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2001,8(1):75-79