

红甜菜提取物对 HeLa 细胞增殖和荷瘤鼠瘤体生长的影响

雒秋江*, 包晓玮, 张志泉, 翟荣仙, 王颖

新疆农业大学药学院 新疆百草药用植物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830052

摘要: 目的 研究红甜菜提取物对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖和对荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用。方法 采用细胞计数法观察红甜菜提取物对 HeLa 细胞的抑制作用, 在人宫颈癌荷瘤鼠模型上观察红甜菜提取物对肿瘤生长的抑制作用, 并用病理切片观察瘤体细胞变化。结果 甜菜提取物对人宫颈癌 HeLa 细胞具有抑制作用, 并具有剂量-时间依赖关系。荷瘤鼠动物实验表明, 红甜菜提取物对裸鼠肿瘤生长也具有抑制作用, 剂量为 20 mg/d 时抑瘤率为 40%; 摄入红甜菜提取物组的裸鼠瘤体细胞出现坏死。结论 红甜菜提取物对 HeLa 细胞的生长和对荷瘤裸鼠肿瘤生长具有抑制作用。

关键词: 红甜菜; 人宫颈癌 HeLa 细胞; 裸鼠; 肿瘤

中图分类号: R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2012)01-0010-04

Effect of red beet extract on HeLa cell proliferation *in vitro* and tumor growth in tumor-bearing mice

LUO Qiu-jiang, BAO Xiao-wei, ZHANG Zhi-quan, ZHAI Rong-xian, WANG Ying

Xinjiang Baicao Institute of Medicinal Plants, College of Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China

Abstract: Objective To study the effects of red beet extract on human cervical HeLa cell proliferation and tumor growth in tumor-bearing mice. **Methods** The inhibition of red beet extract on HeLa cell proliferation was determined by cell counting assay; Human cervical carcinoma HeLa cells were treated with red beet extract to detect the inhibition on the tumor growth of human cervical carcinoma HeLa cells in nude mice; The morphogeny of tumor cells was observed with a pathological section. **Results** The inhibition of red beet extract on HeLa cells was in a time- and dose-dependent manner; The red beet extract could inhibit the growth of HeLa cells in nude mice, the tumor-inhibitory rate (20 mg/d) was 40% for HeLa cells transplanted tumors; There was cell necrosis of the tumor in the groups fed with red beet extract. **Conclusion** The red beet extract could inhibit the growth of HeLa cells *in vitro* and the tumor growth in tumor-bearing mice.

Key words: red beet; human cervical carcinoma HeLa cells; nude mice; tumors

从天然植物中寻找具有抗肿瘤作用的成分, 是研发新抗肿瘤药物的途径之一, 被研究的植物或植物提取物包括紫杉醇^[1]、枸杞多糖^[2-3]、紫草^[4]、茜草^[5]、槲皮素^[6-7]等。红甜菜是一种食用蔬菜, 一些欧美著名医生和中国药学家从动物试验和临床试验都证实, 红甜菜具有抗癌、抗疲劳、抗辐射、治疗胃炎和增强免疫力等功能。在国外一直有红甜菜抗癌的观点^[8], 也有一些相关的实验研究^[9-10], 但在国内对此研究较少, 大都是对其保健作用的研究。而本实验则是在体外培养和裸鼠荷瘤条件下, 用 HeLa 细胞及其肿瘤动物模型对红甜菜提取物抑制肿瘤功效进行了初步研究, 结果表明, 甜菜提取物对 HeLa

细胞有显著的抑制作用, 此结果为该肿瘤的治疗与预防提供了新途径, 也为红甜菜产品的开发应用提供了新的依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

BALB/c nu/nu 品系裸鼠, 雌性, SPF 级, 由中科院上海实验动物中心提供。

红甜菜提取物由新疆西番生物科技有限公司提供, 其色价为 4 986.4/g 干物质 (535 nm, pH 5.4 醋酸-醋酸盐缓冲液), 使用前用 PBS 稀释, 经 0.2 μm 滤膜滤过, -40 °C 保存。人子宫颈上皮癌细胞系 HeLa 细胞由新疆大学生物技术实验室赠送。新生犊

收稿日期: 2011-08-16

基金项目: 新疆维吾尔自治区教育厅项目 (XJEDU2008120)

*通讯作者 雒秋江 (1956—) 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为营养学。E-mail: qjlxjau@yahoo.com.cn

牛血清由本实验室自行制备。胰蛋白酶(美国 Sigma 公司), SW—CJ—2FD 型双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司), Shellab 型医用二氧化碳培养箱(英国), AE—31 数码倒置显微镜(Motic)。

1.2 方法

1.2.1 红甜菜提取物对体外 HeLa 细胞生长的影响 将液氮保存的 HeLa 细胞复苏, 连续传代 3~5 次。犊牛在出生后不饲喂牛乳及水等, 8 h 内采取颈动脉血分离血清, 滤过并进行杂检。

HeLa 细胞用含 10% 新生犊牛血清的 1640 培养液于 96 孔板在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。每孔培养液体积 200 μL, 培养时加入的细胞浓度为 (7.5~9.5) × 10⁴ 个/mL。

细胞培养在 2 h 后大部分贴壁, 此时在各培养孔分别加入 10 μL 红甜菜提取物, 使培养液中红甜菜提取物的质量分数分别为 0、1.56 × 10⁻⁵、3.12 × 10⁻⁵、6.25 × 10⁻⁵、1.25 × 10⁻⁴、2.50 × 10⁻⁴、5.00 × 10⁻⁴, 每次培养每个处理重复 3 孔。

在加入红甜菜提取物培养后 24、48、72 h 时, 分别取出培养板, 倒去上清, 用 PBS 冲洗一次, 加入 50 μL 0.25% 胰蛋白酶消化约 3 min, 吸净消化液, 加入 200 μL PBS 吹打细胞后移入离心管, 摇匀后取样计数。用血球计数板于 10 × 10 倍光学显微镜计数, 每孔计数 3 次, 取平均值。

红甜菜提取物抑制细胞生长抑制率计算公式为抑制率 = [1 - (试验孔细胞数 - 0 h 对照孔细胞数) / (对照组孔细胞数 - 0 h 对照孔细胞数)]。

1.2.2 红甜菜提取物对荷瘤鼠肿瘤生长的影响 试验用 BALB/c nu/nu 品系裸鼠, 约 4 周龄, 体质量约 15 g, 雌性, SPF 级, 由中国科学院上海实验动物中心提供。实验鼠颗粒饲料由新疆流行病研究所实验动物中心提供。在试验期间, 裸鼠按不同处理分笼饲养, 每笼 4~5 只, 自由采食, 自由饮水。饲养室环境温度为 22~24 °C。

将培养的 HeLa 细胞用胰蛋白酶消化后, 用 1640 培养基(含 10% 新生犊牛血清)将细胞稀释到 1 × 10⁶ / mL, 然后注射于每只裸鼠右侧肩胛与颈部皮下 0.2 mL, 建立荷瘤鼠模型。

将注射了 HeLa 细胞的裸鼠随机分为 A(14 只)、B(12 只)、C(15 只) 3 组, 从注射后第 2 周起分别饲喂红甜菜提取物 0、10、20 mg/d。以每笼鼠为单位, 先将红甜菜提取物溶于水, 然后滴在饲料颗粒上, 晾干后喂给裸鼠。每天先喂含有提取物的

料, 吃完后再喂不含提取物的。含提取物的饲料量约占裸鼠每日采食量的 70%。

从注射细胞第 2 周开始到第 10 周, 每周观察各笼裸鼠的发瘤情况, 用游标卡尺测量发瘤裸鼠瘤体的长轴和短轴。瘤体体积根据以下公式计算, 即瘤体体积 = (长轴 × 短轴²) / 2^[11]。在注射细胞的第 10 周即饲喂红甜菜提取物的第 8 周, 处死裸鼠, 切开肩胛与颈部, 取出皮下瘤体, 称质量。

1.2.3 统计分析 本试验采用 SPSS13.0 的 GLM 模块中的 Univariate 功能进行显著性分析, 多重比较采用 Duncan 法进行。

在本试验发现裸鼠在注射 HeLa 细胞后发瘤是陆续的, 从注射后的 2 周到 8 周不等, 而且发瘤时间也是决定瘤体体积大小的因素之一, 因此在裸鼠试验中, 在分析瘤体体积时考虑了发瘤时间、各周瘤体体积大小和红甜菜提取物剂量 3 个因素, 而在分析瘤体质量时考虑了发瘤时间和红甜菜提取物剂量 2 个因素。

2 结果

2.1 红甜菜提取物对体外 HeLa 细胞生长的影响

如表 1 所示, 在培养的第 24、48、72 h, 红甜菜提取物均抑制 HeLa 细胞的生长, 而且抑制程度与剂量有关, 在最高质量分数 5.00 × 10⁻⁴ 条件下, HeLa 细胞计数分别比对照少 48.4% (P < 0.01)、49.0% (P < 0.01)、50.0% (P < 0.01), 其对 HeLa 细胞生长的抑制率分别为 86.5%、69.8%、66.5%。红甜菜提取物在本试验最低质量分数 1.56 × 10⁻⁵ 条件下对 HeLa 细胞生长仍有抑制作用, 在培养 24、48、72 h 时抑制率分别为 22.5% (P < 0.05)、16.8% (P < 0.05)、18.9% (P > 0.05)。

表 1 红甜菜提取物对体外 HeLa 细胞生长的影响 (n = 6)
Table 1 Effect of red beet extract on *in vitro* growth of HeLa cells (n = 6)

质量分数/ (10 ⁻⁵)	细胞数目/(10 ⁴ mL ⁻¹)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
对照	7.0 ± 1.6	15.9 ± 1.9	24.9 ± 1.6	28.2 ± 3.9
1.56	-	13.9 ± 1.7*	21.9 ± 2.7*	24.2 ± 4.2*
3.12	-	12.0 ± 1.1**	20.0 ± 2.1**	21.9 ± 5.5*
6.25	-	10.8 ± 1.4**	17.0 ± 2.2**	19.1 ± 5.6**
12.50	-	10.0 ± 1.2**	14.5 ± 2.4**	17.9 ± 6.1**
25.00	-	9.3 ± 1.3**	13.7 ± 3.0**	15.6 ± 6.0**
50.00	-	8.2 ± 1.1**	12.7 ± 1.7**	14.1 ± 6.8**

与对照组比较: *P < 0.05 **P < 0.01 下表同

*P < 0.05 **P < 0.01 vs control group, same as follows

2.2 红甜菜提取物对荷瘤鼠肿瘤生长的影响

2.2.1 对荷瘤鼠肿瘤生长的影响 从注射 HeLa 细胞 2 周起测定各组裸鼠肿瘤的体积,并在第 10 周将动物处死后取瘤体称质量。结果表明,瘤体的大小和质量与裸鼠 ig 给予红甜菜提取物的剂量有关,在 20 mg/d 时,其瘤体体积比对照组小 40% ($P < 0.05$),质量低 29% ($P < 0.05$),而在 10 mg/d 时差异不显著(表 2)。

2.2.2 瘤体组织的细胞学观察 饲喂红甜菜提取物对瘤体的细胞学形态影响见图 1。图 1-A 为接种 HeLa 细胞荷瘤裸鼠瘤体的细胞切片,可见细胞为卵圆形,胞浆少,细胞核多为卵圆形,部分核内可见小核仁,部分核深染,呈圆形、不规则形。核浆比例失调。并可见核分裂像等比较典型的肿瘤细胞特

征。B 组裸鼠饲喂 10 mg/d 红甜菜提取物,细胞切片结果可见细胞边界模糊,部分细胞结构不清,提示有细胞发生坏死(图 1-B)。C 组裸鼠饲喂 20 mg/d 红甜菜提取物,细胞切片结果提示有大片细胞坏死(图 1-C)。表明红甜菜提取物可导致瘤体癌细胞的坏死,并且其作用的程度与剂量有关。

表 2 饲喂 8 周红甜菜提取物对荷瘤鼠肿瘤体积和质量的影响

Table 2 Tumor volumes and weights of tumor-bearing mice after feeding red beet extract for eight weeks

分组	剂量/(mg·d ⁻¹)	瘤体体积/cm ³	瘤体质量/g
A (n=14)	0	0.298±0.256	0.257±0.170
B (n=12)	10	0.301±0.141	0.246±0.137*
C (n=15)	20	0.179±0.172*	0.183±0.194*

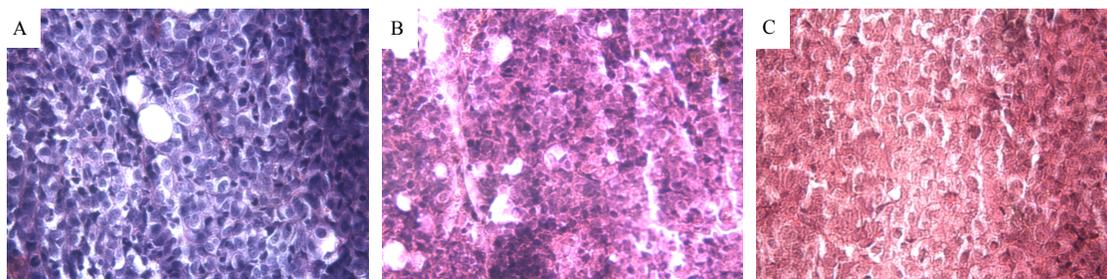


图 1 0 (A)、10 (B)、20 (C) mg/d 红甜菜提取物对荷瘤鼠瘤体的细胞学形态影响 (HE 染色)

Fig. 1 Effect of 0 (A), 10 (B), and 20 (C) mg/d red beet extract on tumor cellular morphology of tumor-bearing mice

3 讨论

3.1 红甜菜抑制肿瘤生长的作用

红甜菜被认为具有抗癌、抗疲劳、抗辐射、治疗胃炎、增强免疫力和补血等功能,并且其抗癌作用主要是由于红甜菜中的天然红色素^[8],红甜菜色素和 tahebo 提取物能降低紫外线照射实验动物的肿瘤发生率^[9],口服红甜菜食用色素能够抵消实验大鼠食道癌的发生^[10]。本研究也表明,红甜菜提取物可极显著地抑制 HeLa 细胞的生长,并且荷瘤鼠瘤体的体积显著减小,特别是瘤体的细胞切片表明,红甜菜提取物可使瘤体细胞发生严重坏死,细胞核消失,细胞结构不清。并且,红甜菜提取物的作用,无论在体外细胞培养还是在裸鼠试验,都与其浓度或剂量相关。因此,从本试验看,所用的红甜菜提取物对 HeLa 细胞肿瘤具有明显的抑制作用。

红甜菜提取物抑制肿瘤生长的机制目前尚无研究,但是鉴于红甜菜作为一种传统的可食蔬菜,其对机体正常细胞的毒性应该很小,从而推断这种抑

制作用可能是肿瘤细胞特异性的。

3.2 HeLa 细胞的定量培养与计数

细胞培养的定量化对于试验结果来说很重要,本实验通过定量加入培养细胞、规范细胞培养的程序,使在每次培养的第 1 和第 2 天,每 24 h 增加的细胞数均为 8×10^4 /mL 左右,基本上实现了定量化培养,但在培养的第 3 天,每次培养间增加的细胞数变异仍较大。在培养期间细胞生长快,有助于减小实验误差、凸显被研究对象。

四嗪唑蓝 (MTT) 法是定量活细胞数较普遍使用的方法^[12-14],但本实验仍采用传统的显微镜下计数的方法,因为本实验室的前期工作表明,在对照组,显微镜计数法与 MTT 法间的数据有一定相关性,然而从各组在不同培养时间计数的总体结果看,两者的相关性很差。MTT 法测定的是琥珀酸脱氢酶催化的琥珀酸脱氢反应,用这个反应来定量细胞数,实际上已假定每个活细胞的琥珀酸脱氢酶活性或产生的琥珀酸量是既定的,然而,对于处于分裂期和

静止期或不同生理状态的细胞, 由于其代谢强度不一样, 其琥珀酸脱氢酶活性或产生的琥珀酸量不一定相同, 并且, 很多试剂、药物影响细胞的代谢, 因而其琥珀酸脱氢酶活性或产生的琥珀酸量也不一定是一样的。因此, 虽然 MTT 法被认为是一种快速、可靠的活细胞计数方法^[15-16], 应用时还要充分考虑其测定原理和具体操作设计。

3.3 裸鼠的发瘤

根据文献, 裸鼠在接种 HeLa 细胞后 1 周^[17]或第 2 周^[18-19]发瘤, 而在本试验中, 裸鼠的发瘤时间由 2~8 周不等, 并且结果表明发瘤时间也是瘤体大小的重要决定因素之一, 而且对照文献, 发现瘤体体积也偏小^[17-18], 这是由于裸鼠品系问题还是接种细胞问题, 或是别的问题不得而知, 但是建议对于发瘤裸鼠试验的设计, 最好是先接种, 发瘤后再分组, 将发瘤时间相近的裸鼠均匀分在各试验组, 而不是接种后就分组。

4 结论

红甜菜提取物可以抑制 HeLa 细胞的生长, 并且这种抑制作用与剂量有关, 细胞在质量分数为 1.56×10^{-5} 和 5.00×10^{-4} 条件下培养 24 h, 其抑制率分别为 22.5% ($P < 0.05$) 和 86.5% ($P < 0.01$)。

红甜菜提取物可以抑制荷 HeLa 细胞瘤裸鼠瘤体的生长, 在剂量为 20 mg/d 时, 瘤体细胞大片坏死, 比对照组瘤体体积小 40% ($P < 0.05$), 质量低 29% ($P < 0.05$)。

致谢: 感谢新疆煤矿总医院病理科江瑞康副主任医师对本实验细胞切片中细胞病理的分析指导。

参考文献

- [1] 袁金辉, 郭立霞, 王兴旺, 等. 紫杉醇的最新研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2000, 17(2): 135-139.
- [2] 顾树南, 焦克智. 枸杞多糖综合治疗原发性肝癌 20 例分析 [J]. 中国药理及临床, 1996, 6: 38-43.
- [3] 崔晓燕, 罗琼, 杨明亮, 等. 枸杞多糖对人宫颈癌细胞生长及细胞凋亡影响 [J]. 中国公共卫生, 2006, 22(12): 1411-1412.
- [4] 葛锋, 王晓东, 王玉春, 等. 药用紫草的研究进展 [J]. 中草药, 2003, 34(9): 7-10.
- [5] 晏媛, 郑萍. 茜草的药理作用研究进展 [J]. 中医药研究, 2002 18(6): 46-47.
- [6] Iwase Y, Takemura Y, Ju-ichi M, et al. Inhibitory effect of

- flavonoid derivatives on Epstein-Barr virus activation and two-stage carcinogenesis of skin tumors [J]. *Cancer Lett*, 2001, 173(2): 105-109.
- [7] 张杰, 吕蔡, 张平安, 等. 槲皮素抑制人宫颈癌 HeLa 细胞增殖的实验研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2006, 33(8): 436-438.
- [8] 章传华, 娄仁树, 欧荣, 等. 红甜菜的临床医疗功效 [J]. 中国甜菜糖业, 2007, 56(1): 145-146.
- [9] Harukuni T, Akira I, Manabu O, et al. Potential natural compounds for chemopreventive activity on UVB-induced carcinogenesis [J]. *Proc Amer Assoc Cancer Res*, 2006, 47: Abstract 4792.
- [10] Lechner J, Wang L S, Schwartz S, et al. Drinking water with red beetroot food dye antagonizes esophageal carcinogenesis in NMBA-treated rats [J]. *Cancer Prev Res*, 2008, 1(7): A47.
- [11] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [12] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1/2): 55-63.
- [13] 张卓然. 培养细胞学与细胞培养技术 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 310-311.
- [14] 武晓丹, 金哲雄, 宛春雷, 等. 仙鹤草醋酸乙酯有效部位体外诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡及其机制研究 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(2): 119-122.
- [15] Zund G, Ye Q, Hoerstrup S P, et al. Tissue engineering in cardiovascular surgery: MTT, a rapid and reliable quantitative method to assess the optimal human cell seeding on polymeric meshes [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1999, 15(4): 519-524.
- [16] Florian M F, Claude A J, Markus A, et al. The MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(8): 3727-3729.
- [17] 杜可, 田道法. 益气解毒颗粒对 HNE3 细胞及其裸鼠移植瘤的抑制作用 [J]. 湖南中医学院学报 2005, 25(3): 7-10.
- [18] 张化莲, 张梅月, 周爱青, 等. 紫杉醇对宫颈癌 HeLa 细胞增殖和荷瘤裸小鼠肿瘤生长抑制作用 [J]. 肿瘤基础与临床, 2006, 19(4): 291-293.
- [19] 唐丽萍, 徐向英, 娄阁, 等. 开普拓对人宫颈癌荷瘤鼠放射增敏作用的实验研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(22): 3368-3379.