· 药理实验与临床观察 ·

葡萄籽提取物原花青素诱导乳腺癌 MCF-7 细胞脱落凋亡

韩 炯[1], 李 莹[1], 刘新平[1], 汪 云[2], 药立波[1], 俞 强[3*]

(1. 第四军医大学基础部 生物化学与分子生物学教研室, 陕西 西安 710032; 2. 西安市天行健天然生物制品有限公司, 陕西 西安 710086; 3. 美国波士顿大学医学院肺研究中心, 美国)

摘 要: 目的 检测葡萄籽提取物原花青素诱导乳腺癌 MCF-7 细胞脱落凋亡的作用。方法 采用 DNA ladder 检测及软琼脂集落形成试验方法, 观察乳腺癌 MCF-7 细胞对脱落凋亡的敏感性以及原花青素诱导其脱落凋亡的作用。结果 MCF-7 细胞具有抗脱落凋亡的特性, 而 0.1 mmol/L 原花青素即可引起悬浮培养的 MCF-7 细胞凋亡。表现为细胞染色质 DNA 断裂及软琼脂集落形成受阻。结论 原花青素可诱导乳腺癌 MCF-7 细胞脱落凋亡。

关键词: 葡萄籽; 原花青素; 肿瘤细胞; 脱落凋亡

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)08-0722-04

Inducing effect of proanthocyanidin from seed of *Vitis vinifera* on anoikis of breast cancer cells MCF-7

HAN Jiong[1], LI Ying[1], LIU Xin-ping[1], WANG Yun[2], YAO Li-bo[1], YU Qiang[3]

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Xi'an Tianxingjian Natural Biological Products Co., Ltd, Xi'an 710086, China; 3. Research Center of Pneumopathy, School of Medicine, Boston University, USA)

Abstract: **Object** To study the inductive effect of proanthocyanidin from the seed of *Vitis vinifera* L. on anoikis of breast cancer cells MCF-7. **Methods** DNA laddering assay and soft agar assay were used to observe the sensitivity of MCF-7 cells to anoikis and the inductive effect of proanthocyanidins on anoikis. **Results** MCF-7 cells had the peculiarity of anoikis resistance, and proanthocyanidins at concentration of 0.1 mmol/L could remarkably induce apoptosis of suspended MCF-7 cancer cells. The chromatin DNA cleavage could be detected by agarose gel electrophoresis and the cell's potential of forming colonies was suppressed. **Conclusion** Proanthocyanidins from the seed of *V. vinifera* can induce anoikis of the breast cancer cell MCF-7.

Key words: seed of *Vitis vinifera* L.; proanthocyanidin; tumor cell; anoikis

正常来源的上皮或内皮细胞如果失去基质的支持, 细胞会发生程序性死亡, 称之为脱落凋亡 (anoikis)。脱落凋亡的意义在于防止脱落的细胞种植于其他地方继续生长。研究发现, 很多肿瘤细胞从瘤体上脱落后并不发生凋亡, 尤其是容易发生转移的恶性肿瘤细胞, 可以迁徙到其他部位再次生长。这种存在于某些肿瘤细胞的抗脱落凋亡现象, 被认为是转移瘤发生的重要原因之一。因此, 寻找能够诱导具有抗脱落凋亡特性的肿瘤细胞发生脱落凋亡的药物, 对于肿瘤的治疗, 尤其是转移瘤的治疗, 具有非常重要的意义。本研究利用 DNA ladder 检测及软琼脂集落形成试验方法, 观察葡萄籽提取物原花青素对悬浮培养的乳腺癌 MCF-7 细胞的诱导凋亡作用, 为寻找抗肿瘤药物提供理论依据。

1 材料

1.1 普通实验用材料: RPMI 1640 培养基购自德国 Gibco 公司。新生牛血清购自杭州四季青生物制品公司。琼脂粉购自北京百灵克公司 (Sigma 分装)。Poly-HEMA 购自美国 Sigma 公司。细菌培养皿购自美国 Grainer 公司。其余细胞培养用耗材购自荷兰 Nunc 公司, 美国 Costar 及 Falcon 公司。

1.2 药物: 原花青素是由西安市天行健生物制品有

* 收稿日期: 2002-10-11
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30000067); 全军医药卫生重点资助课题 (01Z081)
作者简介: 韩 炯 (1970—), 男, 陕西西安人, 讲师, 博士, 第四军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室博士生, 主要从事肿瘤细胞信号转导及抗肿瘤药物的筛选。Tel: (029) 3374516—11 E-mail: han_jon@hotmail.com
* 通讯作者

限公司从葡萄 *Vitis vinifera* L. 籽中提取而得, 纯度大于 95%。用 DMSO 配成 50 mmol/L 储存液, 分装, – 20 ℃ 保存。

1.3 细胞系: 乳腺癌 MCF–7 细胞系为本室保存。狗肾脏上皮细胞系 MDCK 为美国波士顿大学医学院医学与生物化学系俞强教授惠赠。细胞培养于含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基中。

2 方法

2.1 细胞悬浮培养皿的准备[1]: 将 10 mg/mL 的 Poly–HEMA 无水乙醇溶液 2 mL 加入直径 55 mm 细菌培养皿中, 室温待其完全干燥, 重复上述步骤一次。使用前用 1×PBS 将平皿洗 4 遍, 置于超净台中紫外照射消毒待用。

2.2 细胞脱落凋亡特性的检测

2.2.1 DNA ladder 检测[1]: 将培养的乳腺癌细胞 MCF–7 及阳性对照 MDCK 细胞分别用 0.25% 的胰蛋白酶进行消化, 制成约 0.75×10^6/mL 的单细胞悬液。将 2 mL 细胞接种于 Poly–HEMA 包被的培养皿中, 同时取 2 mL 接种于普通的细胞培养皿中作为阴性对照。将细胞置于 37 ℃, 5% CO_2 孵箱中培养 15 h 后, 分别离心收集细胞, 加入 600 μL 细胞裂解液 (10 mmol/L Tris. Cl, pH 7.6; 10 mmol/L EDTA, pH 8.0; 0.5% Triton x–100), 混匀, 冰浴 1 h 并间或振摇, 高速离心 5 min 后取上清, 分别用等体积 Tris 平衡酚、酚–氯仿各抽提一遍, 上清加入 2 倍体积的无水乙醇及终浓度为 0.2 mmol/L NaCl, – 20 ℃ 放置 1 h。高速离心 10 min, 弃上清, 加入 13 μL TE (pH 7.4) 及 2 μL RNase (10 mg/mL) 充分溶解沉淀。0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果。

2.2.2 软琼脂集落形成实验: ①制备底层琼脂: 将 1% 琼脂粉凝胶微波炉化开后放置于 45 ℃ 水浴中, 温度平衡后与等体积 45 ℃ 预温的含 20% 新生牛血清的 2×RPMI 1640 培养基混匀, 加入 6 孔板中, 每孔 4 mL, 室温放置 1 h 以上, 待其充分凝固。剩余的琼脂粉–培养基混合物置于 42 ℃ 水浴中待用。②制备顶层琼脂: 将 MCF–7 细胞及 MDCK 细胞分别用 0.25% 胰蛋白酶进行消化, 制备单细胞悬液, 并用正常培养基稀释到 2×10^3/mL, 置室温备用。取上述琼脂粉–培养基混合物 3.0 mL 与 2.0 mL 细胞悬液迅速混匀, 取 2.5 mL 铺于底层琼脂之上, 每个样品做一复孔。置室温待其充分凝固后, 于 37 ℃, 5% CO_2 孵箱中培养两周, 显微镜下观察集落形成情况并计数。集落计数方法: 在镜下随机计数 10 个视野中的集落数, 取其平均数作比较。

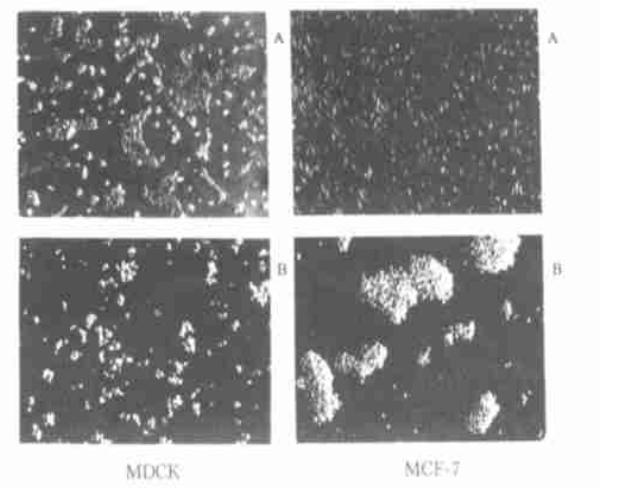
2.3 原花青素对悬浮培养的乳腺癌 MCF–7 细胞的诱导凋亡作用

2.3.1 DNA ladder 检测: 方法同 2.2.1。设立 3 个样品组, 分别为空白悬浮对照组, 悬浮加 DMSO 对照组 (排除溶剂的影响) 以及悬浮加原花青素组。原花青素的终浓度为 0.1 mmol/L, 对照组 DMSO 的加入量与所加入的原花青素的溶剂量相当, 分别于细胞接种后 12 h 加入。

2.3.2 软琼脂集落形成实验: 方法同 2.2.2。设立 3 个样品组, 分别为空白对照组, 加 DMSO 对照组以及加原花青素组。原花青素的终浓度为 0.1 mmol/L, 对照组 DMSO 的加入量与所加入的原花青素的溶剂量相当, 分别于细胞接种后 12 h 加入。

3 结果

3.1 乳腺癌 MCF–7 细胞具有抗脱落凋亡的特性: 悬浮培养的 MCF–7 细胞相互之间聚集成比较致密的团块, 散在的细胞很少。相反, 悬浮培养的 MDCK 细胞基本呈散在形式, 所形成的细胞团也很小, 并且很疏松, 见图 1。DNA ladder 检测的结果显示悬浮培养的 MDCK 细胞出现了凋亡特有的染色体 DNA 断裂, 琼脂糖凝胶电泳显示有特征性的 DNA ladder 出现。而悬浮培养的 MCF–7 细胞则没有这种现象, 见图 2。软琼脂集落形成实验则显示, 阳性对照 MDCK 细胞无法在软琼脂上生长, 无细胞集落形成; 而 MCF–7 细胞则在软琼脂中生长良好, 镜下可见有多个细胞集落, 见表 1。



A–贴壁细胞 B–悬浮培养细胞

A–attached cells B–suspended cells

图 **1** 细胞脱落后的形态学表现

Fig. 1 Cytomorphological changes of cells suspended

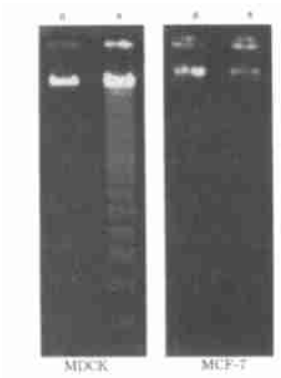
表 1 原花青素对 MCF-7 细胞软琼脂集落形成能力的影响 ($\bar{x}\pm s$, n= 10)

Table 1 Effect of proanthocyanidin on MCF-7 cell's potential of forming colonies in soft agar ($\bar{x}\pm s$, n= 10)

组 别	剂量/(mmol·L⁻¹)	细胞集落数/(个·视野⁻¹)
阴性对照	–	11.5±2.17
DMSO 对照	0.4%	10.8±1.93
原花青素	0.1	0.2±0.42*

与阴性对照组及加 DMSO 组比较: * P< 0.01

* P< 0.01 *vs* control added DMSO groups



a-贴壁细胞 s-悬浮培养细胞

a-attached cells s-suspended cells

图 2 细胞脱落后 DNA ladder 检测

Fig. 2 DNA ladder assay of cells suspended

3.2 原花青素诱导乳腺癌 MCF-7 细胞脱落凋亡的作用: 在悬浮培养的乳腺癌 MCF-7 细胞中加入终浓度为 0.1 mmol/L 的原花青素, 可见到多数细胞失去了聚集成细胞团的能力, 表现为单个散在分布, 见图 3。DNA ladder 检测则显示原花青素可诱导悬浮培养的 MCF-7 细胞凋亡, 表现出特征性的 DNA ladder, 见图 4。

软琼脂集落形成实验结果显示, 0.1 mmol/L 原花青素可明显抑制 MCF-7 细胞在软琼脂中的生长, 其形成集落能力与对照组相比显著下降, 镜下每个视野中的细胞集落明显少于对照组, 而 DMSO 则对细胞在软琼脂中的生长无明显影响, 见表 1。

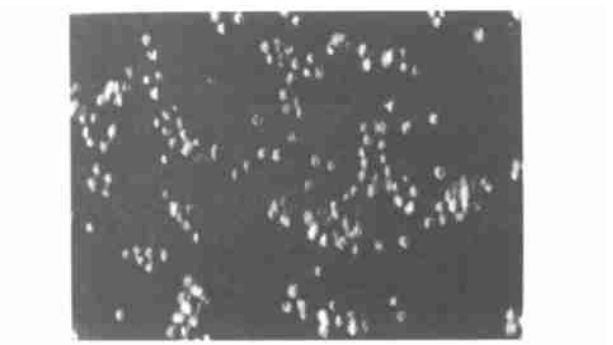


图 3 悬浮培养的 MCF-7 细胞加入原花青素后的形态学表现

Fig. 3 Cytomorphological changes of suspended MCF-7 cell treated with proanthocyanidin

4 讨论

天然植物药以其疗效广泛、确切、毒性低, 受到国内外广泛的关注。近年来, 关于中草药抗癌作用机制的研究不断发展。一些中草药复方或单味药的有效成分具有诱导肿瘤细胞的凋亡的作用, 例如莪术的提取物榄香烯、龙葵等茄科植物的提取物澳洲茄边碱以及桦木酸、丹参、姜黄素、儿茶素、紫杉醇、槲皮素等植物药成分均可诱导肿瘤细胞凋亡[2]。原花青素是一类多酚类化合物的总称, 广泛存在于多种植物中, 尤其在葡萄籽及葡萄皮中含量较高。因其在酸性介质中加热后均可得到花青素 (cyanidins), 故此而得名。科学实验证明, 原花青素是一种强抗氧化剂, 其抗氧化能力是维生素 C 的 20 倍, 维生素 E 的 50 倍, 因此在抗衰老、预防心脑血管病方面有广泛的应用前景。在肿瘤的预防及治疗方面, 可能通过改变致癌物的代谢过程而减少肿瘤的发生[3]。另外的研究则发现原花青素只对某些肿瘤细胞有细胞毒作用而对正常细胞有促进生长及存活的作用[4]。

S-悬浮培养阴性对照 S+ D-悬浮培养加等量 DMSO 对照 S+ P-悬浮培养加终浓度为 0.1 mmol/L 原花青素

S-suspended cell as negative control S+ D-supended cell with DMSO as control S + P-suspended cell with 0.1 mmol/L as final concentration of proanthocyanidins

图 4 DNA ladder 检测原花青素对悬浮培养的 MCF-7 细胞诱导凋亡作用

Fig. 4 Inducing-apoptosis effect of proanthocyanidins detected by DNA ladder assay on MCF-7 cells

本研究初步检测原花青素诱导乳腺癌 MCF-7 细胞脱落凋亡作用。结果发现 0.1 mmol/L 原花青素可诱导悬浮培养的乳腺癌 MCF-7 细胞发生凋亡, 表现为悬浮培养性状的改变, 在原花青素存在时, 肿瘤细胞由原来的聚集成团变为单个散在, 这一现象的发生可能是肿瘤细胞黏附分子表达水平下降的结果[5]。而细胞之间相互聚集似乎正是肿瘤细胞在悬浮培养时与正常上皮细胞相区别的形态学特征之一。这一特性的失去可能是原花青素诱导悬浮培养乳腺癌细胞发生凋亡机制之一。原花青素诱导乳腺癌 MCF-7 细胞脱落凋亡作用还表现在细胞染色质 DNA 断裂, 琼脂糖凝胶电泳呈现特性的 DNA ladder 以及在软琼脂中形成集落的能力显著下降。这些结果均提示原花青素可直接诱导肿瘤细胞发生脱落凋亡, 但其作用机制有待进一步研究。

References:

[1] Wei L, Yang Y, Yu Q. Tyrosine kinase-dependent PI3-kinase and mitogen-activated protein-kinase-independent signaling pathways prevent lung adenocarcinoma anoikis [J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 2439-2444.

[2] Zhou Z H, Song M Z, Yu E X, *et al*. Progress on apoptosis induction of cancer cells by Chinese traditional herbs [J]. *Foreign Med Sci—Tradit Chin Med* (国外医学 · 中医中药分册), 1998, 20(3): 3-6.

[3] Sun Z G, Zhao W Z, Lu Y, *et al*. Inhibitory effects of proanthocyanidins from the seed of *Vitis vinifera* on forming of micronucleus of mouse bone marrow polysomic red blood cells induced by cyclophosphamide and study of its mechanism [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2000, 11(5): 386-387.

[4] Ye X, Krohn R L, Liu W, *et al*. The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 1999, 196(1-2): 99-108.

[5] Sen C K, Bagchi D. Regulation of inducible adhesion molecule expression in human endothelial cells by grape seed proanthocyanidin extract [J]. *Mol Cell Biochem*, 2001, 216(1-2): 1-7.

红花黄色素 A 在大鼠体内的药动学研究

刘月庆, 李 康, 毕开顺*

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘 要: 目的 研究红花黄色素 A 在大鼠体内的药动学。方法 建立 RP-HPLC 法定量测定大鼠血浆中红花黄色素 A 含量。色谱条件: 色谱柱为 Hypersil ODS2 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.2% 乙酸水溶液(24∶76); 流速为 0.8 mL/min; 核黄素为内标; 检测波长为 410 nm。健康大鼠禁食 24 h 后, 尾 iv 红花黄色素 A 生理盐水溶液, 测定不同时间的血药浓度。用 3P87 药动学程序对血药浓度-时间数据进行拟合。结果 大鼠 iv 红花黄色素 A 后, 其主要药动学参数为: V_c(0.30±0.04) L/kg, CL (1.12±0.33) mL/mim, K_e(0.91±0.19) h^{-1}, $t_{1/2}$ (0.76±0.10) h, 曲线下面积 AUC (24.97±4.83) (μg · h)/mL。结论 红花黄色素 A 在大鼠体内呈一室开放模型, 进入体内迅速分布, 代谢消除也较快。

关键词: 红花黄色素 A; 反相高效液相色谱; 药动学

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)08-0000-00

Pharmacokinetics of safflower yellow A in rats *in vivo*

LIU Yue-qing, LI Kang, BI Kai-shun

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: **Object** To study the pharmacokinetics of safflower yellow A, a major ingredient in the crude drug of *Carthamus tinctorius* L., in rats *in vivo*. **Methods** RP-HPLC method was set up used to determine the content of safflower yellow A in plasma of rat. The chromatographic condition included Hypersil ODS2 column (200 mm×4.6 mm, 5 μm); the mobile phase consisting of methanol-0.2% acetic acid (24∶76); the flow rate at 0.8 mL/min; the detective wavelength at 410 nm. Riboflavin was used as internal standard. Safflower yellow A was injected into the rats through caudal vein, and its concentrations at different time were determined in healthy rat after 24 h fasting. The data were processed with the software 3P87. **Results** The primary pharmacokinetic parameters were: V_c(0.30±0.04) L/kg, CL (1.12±0.33) mL/min, K_e(0.91±0.19) h^{-1}, $t_{1/2}$(0.76±0.10) h, AUC (24.97±4.83) (μg · h)/mL, respectively in iv safflower yellow A to the rats. **Conclusion** The safflower yellow A in rats is fited to one-compartment model, and it is distributed and eliminated quickly.

Key words: safflower yellow A; RP-HPLC; pharmacokinetics

红花系菊科红花属红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 是活血化瘀的传统中药。其活血通经、祛瘀止痛功效在中药中具有一定的代表性。在现代医学中是预防和治疗冠心病、心肌梗死和脑血栓等中老年疾病的重要中药。研究表明, 红花中起活血化瘀作用的主要成分是红花黄色素[1,2]。红花黄色素的

* 收稿日期: 2002-11-29

作者简介: 刘月庆(1973—), 男, 安徽怀宁人, 沈阳药科大学药物分析专业 2000 级研究生, 研究方向: 中药质量标准化研究。

* 通讯作者 Tel: (024) 2384371-3363 E-mail: ksbi@mail.sy.ln.cn