

白藜芦醇抑制人脑胶质瘤 U251 细胞增殖及诱导其凋亡的实验研究

刘宏胜¹, 王金环¹, 徐新女¹, 王淑杰¹, 祁建滨¹, 刘洪利²

(1. 天津市第一中心医院, 天津 300192; 2. 天津市药科中等专业学校, 天津 300400)

摘要:目的 研究白藜芦醇对人脑胶质瘤细胞 U251 细胞生长抑制及诱导细胞凋亡的作用。方法 采用 MTT 法检测白藜芦醇对 U251 细胞的增殖活性的影响, 采用流式细胞仪检测白藜芦醇对 U251 细胞早期、晚期凋亡率的影响, 用倒置显微镜观察不同浓度的白藜芦醇作用后 U251 细胞的形态学改变。结果 白藜芦醇对 U251 脑胶质瘤生长有抑制作用, 且具时间及剂量依赖性; 白藜芦醇能诱导 U251 细胞早、晚期凋亡, 且具时间及剂量依赖性。结论 白藜芦醇能抑制 U251 脑胶质瘤的增殖并能诱导细胞凋亡。

关键词: 白藜芦醇; 胶质瘤细胞 U251; 细胞凋亡**中图分类号:** R285.5**文献标识码:** A**文章编号:** 0253-2670(2006)09-1375-03

Proliferation inhibition and apoptosis inducement of resveratrol on U251 cells

LIU Hong-sheng¹, WANG Jin-huan¹, XU Xin-nü¹, WANG Shu-jie¹,QI Jian-bin¹, LIU Hong-li²

(1. The First Central Hospital in Tianjin, Tianjin 300192, China; 2. Pharmaceutical Section Secondary Special School in Tianjin, Tianjin 300400, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of resveratrol on inhibiting proliferation and inducing apoptosis of U251 cells. **Methods** The proliferation activity was detected by MTT assay, and apoptosis of early and late period by method of Annexin V-FITC apoptosis assay, and the cell morphological changes were observed by microscopy after U251 cells being treated with resveratrol. **Results** Resveratrol could significantly inhibit the proliferation and induce the apoptosis of early and late period of U251 cell in a time-and dose-dependent manner. **Conclusion** Resveratrol can significantly inhibit the proliferation and induce the apoptosis of early and late period of U251 cell.

Key words: resveratrol; glioma cell of U251; apoptosis

神经胶质瘤是最常见的中枢神经系统原发性肿瘤, 统计资料表明其发病率占全部颅内肿瘤的 40%。我国每年新查出此病患者约为 10 万人。胶质瘤的恶性度高, 患者的生存率极低。在美国每年新查出的 25 000 个病例中, 2/3 的人在当年死亡。可见, 神经胶质瘤病是当今医学界较难治愈的疾病之一。

白藜芦醇是 1940 年从毛叶藜芦 *Veratrum grandiflorum* (Maxim.) Loes. f. 中分离出来的, 是一种多酚类化合物, 化学名为芪三酚 (3, 5, 4'-trihydroxystilbene)。它是许多植物受到真菌感染、紫外线照射或病理状况下产生的一种抗毒素, 70 多种天然植物中含有白藜芦醇及其苷, 包括藜芦、决明、虎杖、葡萄、桑子、花生、凤梨等。迄今为止的研究表明, 白藜芦醇不但具有抗血栓、抗突变、抗氧化、抗炎等功效, 而且具有抑制肿瘤的效能^[1,2]。如对肺癌、肝癌、肠癌、胃癌、乳腺癌、白血病等均有拮抗作用。

但其对脑胶质瘤的抑制作用少见报道。本实验研究白藜芦醇对人脑胶质瘤 U251 细胞生长抑制及诱导细胞凋亡的作用。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂与仪器: 白藜芦醇, 购自中国药品生物制品检定所。批号 11535-200301, 质量分数 99%。二甲基亚砜 (DMSO, Sigma 公司产品), 无水乙醇、含 10% 小牛血清 DMEM 培养液 (圣东生物科技发展有限公司), 0.25% 胰酶-0.02% 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA)、1×PBS (2 L): 16 g NaCl、0.4 g KCl、3.07 g Na₂HPO₄ · 12H₂O、0.4 g KH₂PO₄, 加入经 EASY pure LF 超纯水系统净化的蒸馏水至 2 000 mL、MTT (噻唑蓝, Sigma 公司产品), 青霉素、链霉素 (华北制药有限公司), 96 孔板、6 孔板 (美国 Corning 公司), Clinio Bio128 酶标仪、REVCOLind Berg28804 CO₂ 培养箱、Annexin V-FITC 凋亡检测

试剂盒 (美国 BD 公司), 包括: 膜联蛋白 (Annexin) V-FITC、碘化丙啉 (PI)、10×Annexin V 结合缓冲液, HB-10101 AF 倒置显微镜 (日本尼康公司)。

1.2 细胞来源: 人星形胶质瘤细胞株 U251 购自武汉大学中国典型培养物保存中心。该细胞经一系列体外和体内培养传代生长稳定。

1.3 细胞培养: 将 U251 细胞于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中 (含青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL), 放入 CO₂ 培养箱 (37 ℃) 培养, 隔日用 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化传代用于 MTT 检测细胞的增殖活性及流式细胞仪检测凋亡。

1.4 白藜芦醇对细胞生长的抑制作用: 分别取对数生长期细胞, 用 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化并计数, 按 1×10⁵/mL 将 90 μL 细胞混悬液分别接种于 96 孔培养板中。24 h 后, 待细胞融合达 80% 左右时, 分别加入终浓度为 592、395、263、175、116 μmol/L 白藜芦醇 (白藜芦醇先用无水乙醇溶解, 再用 DMEM 培养液稀释)。每孔 10 μL, 每个浓度设 3 个复孔。对照组加 DMEM 培养液 (含醇量与实验组等量), 置 CO₂ 培养箱 (37 ℃) 培养 24、48、72 h 后, 加入 5 g/L MTT (临用前用 PBS 溶解, pH 7.4) 振荡摇匀, 置 37 ℃ 培养箱培养 4 h, 弃去液体, 每孔加入 100 μL DMSO, 室温振荡 10 min, 用 Clinio Bio128 酶标仪 492 nm 处测吸光度 (A) 值, 作为反应细胞代谢状况的参数。

1.5 白藜芦醇对 U251 细胞形态学的影响: U251 细胞经白藜芦醇 (终浓度为 592、395、263、175、116 μmol/L) 作用 72 h, 用倒置显微镜观察细胞形态学变化。

1.6 流式细胞仪检测 U251 细胞凋亡: 分别取对数生长期细胞, 用 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化并计数, U251 细胞按 2×10⁵/mL 将 1 mL 细胞混悬液分别接种于 6 孔培养板中, 分为 5 组, 分别为加药组 (加膜联蛋白 V 和 PI)、PI 组、膜联蛋白 V 组、空白对照组 (2 种染剂都不加) 及对照组 (2 种染剂都加)。24 h 后, 待细胞融合达 80% 左右时, 加药组加入白藜芦醇终浓度分别为 592、395、263、175、116 μmol/L。将其置 CO₂ 培养箱 (37 ℃) 培养 24、48、72 h 后, 用 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化离心处理后, 用冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 然后加入 1×结合缓冲液使细胞再次悬浮, 并使细胞浓度为 1×10⁶/mL; 移出 100 μL 溶液 (1×10⁶ 个细胞) 至 5 mL 培养管内; 相应地加入 5 μL 膜联蛋白 V 或 5 μL PI,

轻微地涡动细胞, 并在避光温箱 (25 ℃) 中孵育 20 min 后, 每管中添加 400 μL 1×结合缓冲液, 用流式细胞仪在 1 h 内检测。

1.7 统计学方法: 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 10.0 统计软件分析, 组间比较采用方差分析 (One Way ANOVA)。

2 结果

2.1 白藜芦醇对 U251 细胞增殖活性的影响: 结果见表 1。可见随着白藜芦醇浓度的增加及作用时间的延长, 细胞的 A 值降低, 表明白藜芦醇对 U251 细胞的增殖抑制作用呈剂量与时间依赖性。

表 1 白藜芦醇对 U251 细胞增殖活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	C/ (μmol·L ⁻¹)	A		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	0.208 3±0.061 6	0.219 3±0.050 9	0.237 6±0.050 6
白藜芦醇	116	0.194 3±0.014 0	0.185 0±0.034 3*	0.171 6±0.066 0*
	175	0.187 0±0.021 3	0.177 0±0.042 3*	0.164 0±0.073 6*
	263	0.179 0±0.029 3*	0.163 3±0.053 0*	0.155 7±0.082 0*
	395	0.167 0±0.041 3*	0.150 7±0.068 6*	0.137 6±0.100 1*
	592	0.137 7±0.070 7*	0.120 7±0.098 7*	0.101 0±0.136 7*

与对照组比较: *P<0.05

*P<0.05 vs control group

2.2 白藜芦醇对 U251 细胞形态学的影响: 见图 1。不同浓度白藜芦醇处理 U251 细胞 72 h 后, 与对照组相比, 随着药量加大细胞开始由梭形变成圆形, 胞膜皱缩, 胞体缩小, 间隙增大, 细胞逐渐失去其原有贴壁特性。细胞数量也随着剂量的增加而减少, 细胞破碎, 崩解等坏死表现明显加重。

2.3 细胞凋亡的检测: 不同浓度的白藜芦醇作用 U251 细胞 24、48、72 h 后, 流式细胞仪测定早期、晚期凋亡率。结果见表 2。可见白藜芦醇诱导 U251 细胞凋亡呈时间及剂量依赖性。各组与对照组相比均有显著性差异。

3 讨论

胶质瘤是常见的原发性颅内肿瘤, 其传统的治疗方式 (手术治疗、化学疗法、放射疗法) 疗效很不理想。可见研究医治脑胶质瘤药物非常必要。文献已经报道白藜芦醇对多种肿瘤均有抑制、杀伤作用。其可能的生化机制包括: (1) 抑制核苷酸还原酶、Cox、细胞色素、P450、DNA 聚合酶、DNAH: 辅酶 Q 氧化还原酶。(2) 诱导 p53、抑制 Bcl-2、拓朴异构酶 (topoisomerase) II 表达。对癌症发生的 3 个阶段——起始、促进、发展均有抑制作用^[3,4]。从本实验结果可知, 白藜芦醇能明显抑制人脑胶质瘤 U251

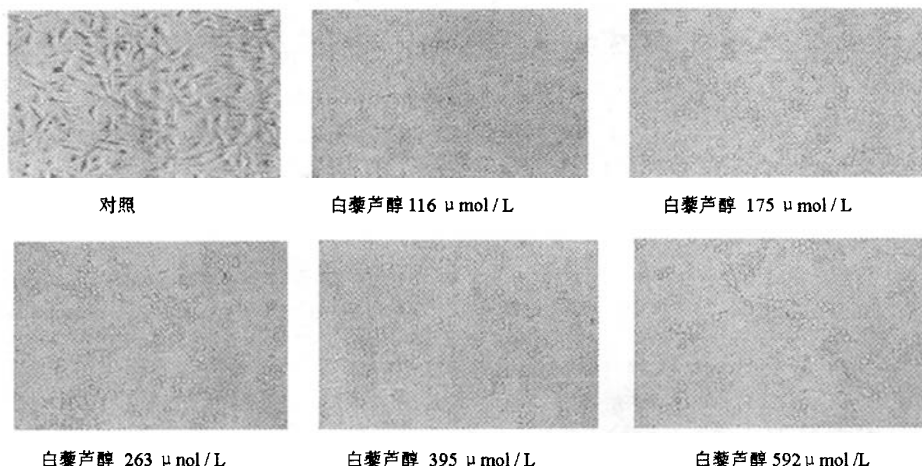


图 1 U251 细胞形态学变化

Fig. 1 Morphological changes of U251 cells

表 2 白藜芦醇对 U251 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of resveratrol on apoptosis of U251 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	C/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	作用 24 h 细胞凋亡率/%		作用 48 h 细胞凋亡率/%		作用 72 h 细胞凋亡率/%	
		早期	晚期	早期	晚期	早期	晚期
对照	—	1.76 $\pm$ 0.21	4.21 $\pm$ 0.11	6.86 $\pm$ 0.26	9.86 $\pm$ 0.17	9.91 $\pm$ 0.91	11.61 $\pm$ 0.11
白藜芦醇	116	2.30 $\pm$ 0.12	5.90 $\pm$ 0.36	8.88 $\pm$ 0.19	11.89 $\pm$ 0.55*	14.60 $\pm$ 0.81*	18.91 $\pm$ 0.30*
	175	9.32 $\pm$ 0.41*	4.63 $\pm$ 0.35	13.11 $\pm$ 0.80*	25.20 $\pm$ 0.36*	15.61 $\pm$ 0.03*	46.21 $\pm$ 0.61*
	263	5.56 $\pm$ 0.11*	20.87 $\pm$ 0.31*	16.10 $\pm$ 0.31*	37.48 $\pm$ 0.45*	10.65 $\pm$ 0.33*	71.37 $\pm$ 0.02*
	395	3.05 $\pm$ 0.13*	25.27 $\pm$ 0.22*	7.57 $\pm$ 0.40*	32.38 $\pm$ 0.16*	3.42 $\pm$ 0.66*	32.29 $\pm$ 0.53*
	592	3.42 $\pm$ 0.09*	32.29 $\pm$ 0.18*	6.18 $\pm$ 0.06*	38.20 $\pm$ 0.61*	5.03 $\pm$ 0.07*	42.50 $\pm$ 0.56*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

细胞增殖并诱导其凋亡,并呈时间及剂量依赖性。形态学观测也显示随着药量加大细胞逐渐失去其原有贴壁特性,细胞数量逐渐减少,细胞破碎。体外实验表明白藜芦醇能抑制、杀伤胶质瘤细胞,白藜芦醇对脑胶质瘤细胞的作用将进行更深入研究。

References:

- [1] Jang M, Cai L, Udeani G O, *et al.* Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes [J]. *Science*, 2003, 275(5297): 218-220.

- [2] Ouria M, Gukovskaya A, Jung Y, *et al.* Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis [J]. *Int J Cancer*, 2002, 8(5): 767-769.
- [3] Dorrie J, Gerauer H, Wadter Y, *et al.* Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activated caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(12): 4731-4739.
- [4] Tinhofer I, Bernhard D, Senfter M, *et al.* Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2 [J]. *FASEB J*, 2001, 15(9): 1613-1615.

《国外医药·植物药分册》2007 年征订启事

《国外医药·植物药分册》是由天津药物研究院和中国药学会共同主办的集学术、技术和信息于一体的医药专业期刊,是目前国内全方位报道国外植物药研究信息与动态的国家级专业期刊。本刊以准确、迅速、全面、系统地报道国外植物药研究的新技术、新理论和新动向为宗旨,设置的栏目包括综述与编译、特别报道、文摘(包括植化研究、药理研究、质量研究、临床研究等)、法规与管理、市场动态、专利摘要、植物药数据库、综合信息、参考资料等。全方位向读者提供国外有关植物药有效成分的提取、分离和结构鉴定,生化药理活性与临床研究,生产工艺与质量控制,组织培养与生物技术工程,各国传统药的开发与植物药专利,市场动态与植物药管理法规等方面新颖、翔实的信息。本刊为双月刊,全年 6 期,公开发行,可随时向编辑部订阅。每期定价 13.00 元,全年 78.00 元(含邮资)。现有少量 1996~2006 年的合订本,每年一本,每本 80 元(含邮资)。

地址:天津市南开区鞍山西道 308 号《国外医药·植物药分册》编辑部

邮编:300193

电话:(022) 23006823

传真:(022) 27381305

电子信箱:zhiwuyao@163.com

开户银行:天津市工商银行南门外支行

户名:天津药物研究院

帐号:0302070109009716502