

血大鼠血清 CK 和 LDH 水平明显降低,能够恢复其血清及心肌组织中 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性,并减少 MDA 的生成,提示苦参碱可减轻细胞膜的损伤程度,降低细胞膜通透性,具有膜稳定性作用,能够通过增强内源性氧自由基清除系统的能力,进而减轻自由基对心肌组织的过氧化反应及其有害代谢产物对心肌细胞膜的损害发挥保护缺血心肌的作用。

通过本实验表明,苦参碱对高胆固醇血症大鼠缺血性心肌结构与功能具有保护作用,其作用机制与降低血清 TC 和/或 TG,提高机体抗氧化酶活性并维持心肌细胞膜稳定性有关。

参考文献:

- [1] 韩向东,陈长勋.苦参碱的心血管药理研究进展[J].中药新药与临床药理,2006,(1):72-75.
- [2] Yan L P, Chan S W, Chan A S, et al. Puerarin decreases serum total cholesterol and enhances thoracic aorta endothelial nitric oxide synthase expression in diet-induced hypercholesterolemic rats [J]. *Life Sci*, 2006, 79(4): 324-330.
- [3] Karthikeyan K Sarala Bai B R, Gauthaman K, Sathish K S, et al. Cardioprotective effect of the alcoholic extract of *Terminalia arjuna* bark in an *in vivo* model of myocardial ischemic reperfusion injury [J]. *Life Sci*, 2003, 73(21): 2727-2739.
- [4] Johann B, Hartmut B. Simvastatin improves left ventricular function after myocardial infarction in hypercholesterolemic rabbits by anti-inflammatory effects [J]. *Cardiovascular Res*, 2006, 72: 438-446.
- [5] Maczewski M, Maczewska J. Hypercholesterolemia exacerbates ventricular remodeling in the rat model of myocardial infarction [J]. *J Cardiac Failure*, 2006, 12(5): 399-405.
- [6] Di Filippo C, Cuzzocrea S, Rossi F, et al. Oxidative stress as the leading cause of acute myocardial infarction in diabetics [J]. *Cardiovasc Drug Rev*, 2006, 24(2): 77-87.
- [7] 黄彦生,许波实.氧化抗氧化失衡与动脉粥样硬化[J].四川大学学报:医学版,2007,38(2):339-341.

甜菜碱对 HepG₂ 人肝癌细胞周期及凋亡的影响

季宇彬^{1,2},高世勇^{1,2},杨红丹^{1,2},何立巍^{1,2}

(1. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心药物研究所 博士后科研工作站,黑龙江 哈尔滨 150076;

2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心,黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 研究甜菜碱对 HepG₂ 人肝癌细胞周期及细胞凋亡的影响。方法 MTT 法测定甜菜碱对 HepG₂ 的细胞毒作用;PI 染色,流式细胞术观察甜菜碱对 HepG₂ 人肝癌细胞周期及细胞凋亡的影响。结果 甜菜碱对 HepG₂ 细胞的 IC₅₀ 为 0.5 mol/L;甜菜碱使 HepG₂ 细胞 G₂/M 期比例下降;甜菜碱作用于 HepG₂ 细胞 24 h 后,3 个不同剂量组 (0.1、0.2、0.4 mol/L) 诱导细胞凋亡率分别为 (7.5±0.9)%、(11.5±1.1)%、(33.9±1.2)%,48 h 后凋亡率为 (13.4±1.9)%、(20.9±1.4)%、(67.8±1.8)%。结论 甜菜碱可抑制人肝癌细胞 HepG₂ 的生长,阻滞细胞进入 G₂/M 期进而诱导细胞凋亡。

关键词:甜菜碱;细胞周期;细胞凋亡

中图分类号:R979.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)06-0884-03

Effect of betaine on cell cycle and apoptosis of HepG₂ cells

Ji Yu-bin^{1,2}, GAO Shi-yong^{1,2}, YANG Hong-dan^{1,2}, HE Li-wei^{1,2}

(1. Postdoctoral Research Station, Institute of Materia Medica, Life Sciences and Environmental Sciences Research Center, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. Engineering Research Center

of Natural Anticancer Drugs, Ministry of Education, Harbin 150076, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of betaine on the cell cycle and apoptosis of HepG₂ cells. **Methods** The cytotoxic effect of betaine on HepG₂ cells was measured using MTT; The effect of betaine on the cell cycle and apoptosis of HepG₂ cells was observed using PI staining and flow cytometry. **Results** The IC₅₀ value for the inhibition of HepG₂ cells by betaine was 0.5 mol/L; Betaine lowered the percentage of HepG₂ cells in G₂/M phase; The apoptosis rates for the three dosage groups were found to be (7.5±0.9)%, (11.5±1.1)%, and (33.9±1.2)%, respectively, 24 h after betaine was applied to HepG₂ cells,

收稿日期:2007-12-20

基金项目:国家自然科学基金项目(30400352);教育部科学技术研究重点项目(205045);黑龙江省自然科学基金项目(D200611);黑龙江省研究生创新基金项目(YJSCX2006-0077HSD)

作者简介:季宇彬(1956—),男,博士,教授,博士生导师,多年来一直致力于中药药理、肿瘤药理及分子药理学研究。

and $(13.4 \pm 1.9)\%$, $(20.9 \pm 1.4)\%$, and $(67.8 \pm 1.8)\%$, respectively, 48 h after it was applied.

Conclusion Betaine could inhibit the growth of HepG₂ cells and block their entry to G₂/M phase, thus inducing apoptosis of these cells.

Key words: betaine; cell cycle; apoptosis

甜菜碱 (betaine) 是有机胺类生物碱中的一种季胺型水溶性生物碱,系甘氨酸三甲基衍生物,又名甘氨酸甜菜碱、三甲基甘氨酸等^[1~5],化学名称为三甲基铵乙内酯,相对分子质量 117.15。研究表明甜菜碱可抑制 L₁₂₁₀白血病细胞、肉瘤 37 及埃利希瘤等肿瘤细胞株的有丝分裂,当和维生素 C 的同分异构体 D-异抗坏血酸联合作用时,这种抑制作用更为显著^[6]。本实验主要研究甜菜碱对人肝癌细胞 HepG₂ 细胞周期及凋亡的影响,以期进一步探讨其抗肿瘤作用。

1 材料

1.1 肿瘤细胞株:人肝癌细胞 HepG₂ (购自美国 ATCC,黑龙江省肿瘤医院肿瘤研究所传代保种)。

1.2 药品与试剂:胎牛血清 (Gibco 公司);RPMI-1640 培养基 (Gibco 公司);胰酶 (Gibco 公司);甜菜碱 (浙江绿成生物技术有限公司,质量分数 95%);MTT (Sigma 公司);碘化丙啶 (PI, Angus 公司);核糖核酸酶 A (RNase A, 北京化学试剂公司);Triton X-100 (Farco 公司);其余试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器:CO₂培养箱 (美国 NBS 公司);奥林巴斯 CKX-41-32 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司);超净工作台 (江苏苏净集团有限公司);纯水仪 (美国 Milipore 公司);旋涡混合器 (美国 Bohemia N. Y 公司);流式细胞仪 (美国 Beckman-Coulter 公司)。

1.4 试剂配制:1×PBS 缓冲液:NaCl 8 g、KCl 0.2 g、Na₂HPO₄ · 12H₂O 3.63 g、KH₂PO₄ 0.24 g,加蒸馏水至 1 000 mL;PI 染液:生理盐水 32.4 mL、PI 2.5 mg、RNase A 0.5 mg、TritonX-100 0.25 mg、枸橼酸钠 50 mg,加蒸馏水至 50 mL,于棕色容量瓶 4℃ 避光贮存。

2 方法

2.1 MTT 法测定肿瘤细胞的存活率:将对数生长期的 HepG₂ 细胞用胰酶消化后配制成浓度为 5×10^4 /mL 的细胞液,接种于 96 孔板,每孔加 100 μL。设 5 个甜菜碱剂量组,24 h 后加入甜菜碱,使其终浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mol/L;阳性对照组阿霉素的浓度为 2×10^{-9} 、 2×10^{-8} 、 2×10^{-7} 、 2×10^{-6} 、 2×10^{-5} mol/L;阴性对照组加相同体积的培

养基,每孔加 100 μL,每组设 6 个平行孔,于 37℃、5% CO₂ 培养箱继续培养 72 h。弃上清,每孔加 100 μL 含 0.5 mg/mL MTT 的无血清培养基,继续培养 4 h,弃培养上清,每孔加 200 μL DMSO 溶解,用微型振荡器振荡混匀,用酶标仪在检测波长 570 nm 条件下测定吸光度 (A) 值,以溶剂对照处理的肿瘤细胞为对照组,计算药物对肿瘤细胞的增殖抑制率,并计算 IC₅₀。

增殖抑制率 = $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$

2.2 流式细胞仪分析甜菜碱对 HepG₂ 人肝癌细胞周期及凋亡的影响:取对数生长期的人肝癌细胞 HepG₂,PBS 洗 2 遍后,0.25% 胰蛋白酶液消化,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基制备成浓度为 3×10^5 /mL 的细胞悬液,于 6 孔板中每孔接种 1 mL。将平板置于 37℃、5% CO₂ 培养箱。24 h 后加入不同浓度的甜菜碱,使其终浓度分别 0.1、0.2、0.4 mol/L;阳性对照组加阿霉素,其终浓度为 1×10^{-5} mol/L;阴性对照组加相同体积的培养液。分别在给药后 24、48 h,细胞用胰酶消化,离心收集细胞,细胞沉淀用 70% 乙醇悬浮,在 4℃ 冰箱固定 12 h 以上。固定后的细胞用 PBS 洗两遍并悬浮,加入 PI 染液 (终质量浓度为 50 μg/mL),37℃ 避光温育 30 min,300 目尼龙网滤过后,在流式细胞仪上计数 10 000 个细胞,测定细胞各期 DNA 量,分析细胞周期并测定凋亡率 (激发波长 488 nm,发射波长 630 nm)。

3 结果

3.1 MTT 实验结果:用 MTT 法检测了甜菜碱对体外培养的 HepG₂ 细胞生长的影响,结果表明阳性药阿霉素对 HepG₂ 细胞株的细胞毒作用显著,其 IC₅₀ 为 1.5×10^{-7} mol/L;甜菜碱对 HepG₂ 也具有一定的细胞毒,IC₅₀ 为 0.5 mol/L。

3.2 甜菜碱对 HepG₂ 人肝癌细胞细胞周期的影响:HepG₂ 细胞的细胞周期特点是细胞群分布于细胞的各个期。表 1 和 2 结果可见,甜菜碱作用 24、48 h 后使 G₂/M 期细胞的比例减少,且呈明显的剂量依赖性,表明甜菜碱对细胞向 G₂/M 期移行有一定的抑制作用。

3.3 甜菜碱诱导 HepG₂ 人肝癌细胞细胞凋亡作

用:甜菜碱对 HepG₂细胞作用 24、48 h 后经 PI 染色,用流式细胞仪测定 sub-G₀期细胞群的量,结果见表 1 和 2。甜菜碱可以诱导肿瘤细胞产生凋亡,并且发现随甜菜碱浓度的升高凋亡率增加,呈一定剂量依赖性。

表 1 甜菜碱作用 24 h 后对 HepG₂人肝癌细胞细胞周期和凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of betaine on cell cycle and apoptosis rate of HepG₂ cells after 24 h treatment ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ (mol·L ⁻¹)	细胞周期分布/%			凋亡率/ %
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
阴性对照	—	65.94±2.12	21.72±1.11	12.34±0.29	4.5±0.6
阿霉素	1×10 ⁻⁵	74.85±1.43	24.51±1.89	0.69±0.09**	13.2±0.8*
甜菜碱	0.1	61.30±1.78	31.35±2.34	7.35±0.98**	7.5±0.9
	0.2	72.55±1.65	22.95±1.11	4.51±0.89**	11.5±1.1*
	0.4	75.90±1.96	22.46±1.86	1.46±0.45**	33.9±1.2**

与阴性对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs negative control group

表 2 甜菜碱作用 48 h 后对 HepG₂人肝癌细胞细胞周期和凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of betaine on cell cycle and apoptosis rate of HepG₂ cells after 48 h treatment ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ (mol·L ⁻¹)	细胞周期分布/%			凋亡率/ %
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
阴性对照	—	57.73±2.46	26.21±2.53	16.06±2.11	5.2±0.8
阿霉素	1×10 ⁻⁵	78.36±1.66	21.04±1.23	0.60±0.18**	18.5±1.3**
甜菜碱	0.1	67.61±2.09	18.65±1.45	13.74±1.17**	13.4±1.9*
	0.2	75.25±1.87	17.16±1.21	7.60±0.98**	20.9±1.4**
	0.4	69.65±1.65	24.04±1.43	6.31±0.76**	67.8±1.8**

与阴性对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs negative control group

4 讨论

细胞凋亡是指维持机体环境稳定,有多种基因控制的细胞自主的有序死亡过程,所以也被称为细胞程序死亡。它不是病理条件下的一种自我损伤现象,而是一个主动过程,涉及一系列的基因激活、表达以及调控等作用,是为更好地适应生存环境而主动争取的一种死亡过程。但在恶性肿瘤的发生、发展中则是肿瘤细胞增殖过度、分化异常的结果,而且

与肿瘤细胞凋亡减少有关。因此细胞凋亡调控异常在恶性肿瘤的演进过程中具有重要意义,肿瘤防治的关键是抑制细胞的增殖和/或促进细胞的凋亡^[7]。

本研究在体外实验中观察到甜菜碱可抑制人肝癌细胞 HepG₂的生长。MTT 法测得其在体外 IC₅₀ 为 0.5 mol/L。采用流式细胞仪观察了不同浓度甜菜碱作用于 HepG₂细胞 24、48 h 后,对其细胞周期分布的影响。结果表明,甜菜碱使细胞各时相都有所抑制,同时使 G₂/M 期细胞的比例减少,S 期细胞的比例增加,且呈明显的剂量依赖性,表明甜菜碱对 S 期细胞向 G₂/M 期移行有一定的阻断作用。经不同浓度的甜菜碱作用于 HepG₂细胞 24、48 h 后,测定肿瘤细胞的凋亡率。HepG₂细胞的凋亡率均随甜菜碱浓度的升高而增多,推测甜菜碱通过改变细胞周期来诱导凋亡。

综上所述,甜菜碱对人肝癌细胞 HepG₂具有一定的抗肿瘤活性,可通过改变细胞周期来诱导肿瘤细胞的凋亡。有关甜菜碱具体改变细胞周期诱导凋亡的作用机制,还有待进一步研究证实。

参考文献:

- [1] 李红,聂泽民. 甜菜碱的研究进展 [J]. 湖南农业科学, 2005 (2): 33-36.
- [2] Slow S, Lever M, Lee M B, et al. Betaine analogues alter homocysteine metabolism in rats [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(5): 870-880.
- [3] Ueland P M, Holm P I, Hustad S. Betaine: A key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2005, 43(10): 1069-1075.
- [4] Schwahn B C, Wendel U, Lussier-Cacan S, et al. Effects of betaine in a murine model of mild cystathionine-beta-synthase deficiency [J]. *Metabolism*, 2004, 53(5): 594-599.
- [5] 傅冬和. 高效液相色谱法测定葡萄叶叶甘氨酸甜菜碱、脯氨酸及葫芦巴碱 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(2): 313-315.
- [6] Freidel J F, Fardon J C, Tsuchiya Y, et al. In vitro effect of D-isoascorbic acid and betaine hydrate alone and in combination on normal and malignant cells [J]. *Exp Cell Biol*, 1979, 47: 463-469.
- [7] Ohata M, Koyama Y, Suzuki T, et al. Effects of tea constituents on cell cycle progression of human leukemia U937 cells [J]. *Biomed Res*, 2005, 26(1): 1-7.

甜菜碱对HepG2人肝癌细胞周期及凋亡的影响

作者：[季宇彬](#), [高世勇](#), [杨红丹](#), [何立巍](#), [JI Yu-bin](#), [GAO Shi-yong](#), [YANG Hong-dan](#),
[HE Li-wei](#)
作者单位：[哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心药物研究所博士后科研工作站](#), [黑龙江](#), [哈尔滨](#),
[150076](#); [国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心](#), [黑龙江](#), [哈尔滨](#), [150076](#)
刊名：[中草药](#) [ISTIC](#) [PKU](#)
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年, 卷(期): 2008, 39(6)
被引用次数: 3次

参考文献(7条)

1. [李红](#); [聂泽民](#) [甜菜碱的研究进展](#)[期刊论文]-[湖南农业科学](#) 2005(02)
2. [Slow S](#); [Lever M](#); [Lee M B](#) [Betaine analogues alter homocysteine metabolism in rats](#)[外文期刊] 2004(05)
3. [Ueland P M](#); [Holm P I](#); [Hustad S](#) [Betaine: A key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status](#)[外文期刊] 2005(10)
4. [Schwahn B C](#); [Wendel U](#); [Lussier-Cacan S](#) [Effects of betaine in a murine model of mild cystathionine-beta-synthase deficiency](#)[外文期刊] 2004(05)
5. [傅冬和](#) [高效液相色谱法测定葡萄叶叶甘氨酸甜菜碱、脯氨酸及葫芦巴碱](#)[期刊论文]-[天然产物研究与开发](#) 2007(02)
6. [Freidel J F](#); [Fardon J C](#); [Tsuchiya Y](#) [In vitro effect of D-isoascorbic acid and betaine hydrate alone and in combination on normal and malignant cells](#) 1979
7. [Ohata M](#); [Koyama Y](#); [Suzuki T](#) [Effects of tea constituents on cell cycle progression of human leukemia U937 cells](#)[外文期刊] 2005(01)

本文读者也读过(10条)

1. [王淑芳](#). [张巍](#). [周凤](#). [陈盛铎](#) [甜菜碱对非酒精性脂肪性肝炎大鼠胰岛素抵抗的影响](#)[期刊论文]-[中西医结合肝病杂志](#) 2010, 20(6)
2. [张勇](#). [严少南](#). [龚作炯](#). [孙小梅](#). [施金枝](#). [ZHANG Yong](#). [YAN Shaonan](#). [GONG Zuojiang](#). [SUN Xiaomei](#). [SHI Jinzhi](#) [甜菜碱对非酒精性脂肪性肝炎大鼠氧化应激及炎症因子的影响](#)[期刊论文]-[武汉大学学报\(医学版\)](#) 2008, 29(5)
3. [季宇彬](#). [高世勇](#). [杨红丹](#). [何立巍](#) [甜菜碱对HepG2人肝癌细胞基因组范围DNA甲基化表达的影响](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2008, 39(8)
4. [程容懿](#). [叶希韵](#). [张隆](#). [任宇丹](#). [王耀发](#) [甜菜碱预防小鼠高血脂症和脂肪肝的实验研究](#)[期刊论文]-[中国药师](#) 2004, 7(6)
5. [欧元祝](#). [居漪](#). [唐立萍](#). [王美娟](#). [虞啸炫](#). [OU Yuan-zhu](#). [JU Yi](#). [TANG Li-ping](#). [WANG Mei-juan](#). [YU Xiao-xuan](#) [甜菜碱对血清酶ALT活性的稳定作用及其基质效应的研究](#)[期刊论文]-[中华检验医学杂志](#) 2011, 34(2)
6. [汪以真](#). [王友明](#). [傅剑云](#) [盐酸甜菜碱安全性的初步评价](#)[期刊论文]-[中国兽医学报](#) 2002, 22(3)
7. [卢霞](#). [王君](#). [王颖](#). [蔺美玲](#). [瞿颂义](#). [郑天珍](#). [LU Xia](#). [WANG Jun](#). [WANG Hao](#). [LING Mei-lin](#). [Qu Song-yi](#). [ZHENG Tian-zhen](#) [甜菜碱对高脂性肥胖大鼠体重和生化指标的影响](#)[期刊论文]-[营养学报](#) 2008, 30(3)
8. [李焰](#) [甜菜碱的营养功能及其在养殖业中的应用](#)[期刊论文]-[中国牧业通讯](#) 2005(20)
9. [许贵斌](#) [酶促牛黄与天然牛黄中枢神经药理作用的比较研究](#)[学位论文] 2010
10. [马晓茜](#) [甜菜碱对大鼠酒精性肝损伤的保护作用与机制研究](#)[学位论文] 2009

引证文献(3条)

1. [季宇彬](#), [高世勇](#), [杨红丹](#), [何立巍](#). [甜菜碱对HepG2人肝癌细胞基因组范围DNA甲基化表达的影响](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2008(8)
2. [张静](#), [杨光](#), [单保恩](#), [张超](#), [赵瑞攀](#), [刘江惠](#). [杠柳苷对H22荷瘤小鼠的抑瘤作用及其机制研究](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2010(8)
3. [黄红娜](#), [张丹参](#), [郑晓霞](#), [张力](#), [薛贵平](#). [甜菜碱药理作用的研究进展](#)[期刊论文]-[医学综述](#) 2009(24)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200806029.aspx