

抑制异质黏附,能够降低肝癌 7721 细胞侵袭转移的能力,这可能与下调 VEGF 和 MMP-2 的表达有关,但其具体机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Chang F R, Hayashi K, Chen I H, *et al.* Antitumor agents. 228. five new agarofurans, reissantins A-E, and cytotoxic principles from *Reissantia buchananii* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66(11): 1416-1419.
- [2] 张舰,王维明,刘延庆,等. 南蛇藤提取物体内抗肿瘤作用的实验研究 [J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(18): 1514-1516.
- [3] Shim H Y, Park J H, Paik H D, *et al.* Acacetin-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells involves caspase cascade, mitochondria-mediated death signaling and SAPK/JNK1/2-c-Jun activation [J]. *Mol Cells*, 2007, 24

(1): 95-104.

- [4] 郝钰,徐泊文,吴瑁,等. 小檗碱对高转移性人巨细胞肺癌 PG 细胞黏附特性的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2006, 22(11): 1025-1031.
- [5] Tosetti F, Ferrari N, De Flora S, *et al.* Angioprevention: angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents [J]. *FASEB*, 2002, 16(1): 2-14.
- [6] Orr F W, Wang H H, Lafrenie R M, *et al.* Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis [J]. *Pathology*, 2000, 190(3): 310-329.
- [7] Huang S, Robinson J B, Deguzman A, *et al.* Blockade of nuclear factor-kappa B signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8 [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(19): 5334-5339.

菱角提取物诱导 HL-60 细胞凋亡的机制探讨

赵文静,牛凤兰*

(吉林大学公共卫生学院,吉林 长春 130021)

摘要:目的 探讨菱角提取物对人早幼粒细胞性白血病细胞株 HL-60 细胞增殖和凋亡的影响及凋亡的分子机制。方法 采用 MTT 法检测菱角提取物对 HL-60 细胞的增殖抑制作用;吖啶橙染色和 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡;流式细胞仪检测细胞凋亡率及线粒体膜电位的变化;比色法测定 Caspase-3、9 蛋白活性。结果 菱角提取物能抑制 HL-60 细胞的增殖,其作用呈明显的时间和剂量依赖性。菱角提取物可诱导 HL-60 细胞凋亡并显示一定的剂量依赖关系。与对照组比较,菱角提取物可明显降低 HL-60 细胞线粒体膜电位,上调 Caspase-3、9 蛋白活性。结论 菱角提取物可抑制 HL-60 细胞的增殖,其机制与降低线粒体膜电位、激活 Caspase-3、9 蛋白继而诱导 HL-60 细胞凋亡有关。

关键词:菱角; HL-60 细胞; 凋亡; 线粒体膜电位

中图分类号:R733.7 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)03-0437-04

菱角又称菱、菱实。近年来对菱角的抗肿瘤成分进行了广泛的研究,主要包括多糖、挥发油、酚类等成分,从菱角提取物中分离出抗肿瘤活性成分 3,4,5-三羟基苯甲酸二聚体^[1]。菱角提取物对人早幼粒细胞性白血病细胞株 HL-60 的抑制作用未见报道,为此本实验以 HL-60 细胞为研究对象,采用 MTT 比色法、DNA 琼脂糖凝胶电泳、流式细胞术等方法,通过观察菱角提取物对 HL-60 细胞凋亡、线粒体膜电位、Caspase-3、9 蛋白活性影响,初步探讨菱角提取物诱导 HL-60 细胞凋亡的线粒体途径,为进一步研究菱角在抗肿瘤方面的功效提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料:RPMI 1640 培养基购于 Gibco 公司;四甲基偶氮唑盐 (MTT)、罗丹明 123 (Rh123) 为 Sigma 公司产品;Caspase-3、9 分光光度法检测试剂盒购自南京凯基生物有限公司;其他化学试剂均为国产分析纯;MK3 型酶标仪 (Labsystem, Helsinki, 芬兰);CK-18 倒置荧光显微镜 (Olympus, 日本);Epics 流式细胞仪 (Beckman, 美国)。新鲜菱角采集于吉林省大安县,经吉林农业大学樊绍钵教授鉴定为东北菱 *Trapa manshurica* Fler.。

1.2 药物提取:菱角晒干,取 500 g 菱皮,以 8 倍量水煎煮 3 h,定性滤纸滤过,保存滤液,残渣再重复煎煮 2 次,定性滤纸滤过。将 3 次所得滤液合并,减压滤过,浓缩至 600~700 mL,加 95% 乙醇,调整

* 收稿日期:2008-05-05

基金项目:长春市科技攻关项目 (2006319)

* 通讯作者 牛凤兰(1951—),女,吉林省长春市人,教授,博士生导师,研究方向为药食同用植物与健康研究。

E-mail: jlniuniu@yahoo.com.cn

至乙醇质量分数为60%,醇沉24 h。将醇沉液滤过浓缩并水浴蒸干、减压干燥得菱角提取物。HPLC法测定提取物中主要有效成分没食子酸的量为0.08%。提取物溶解于磷酸盐缓冲液(PBS)中,终浓度为10 mg/mL,离心上清,0.22 μm滤膜滤过,即得菱角提取物溶液,4℃冰箱保存备用。

1.3 细胞培养:人早幼粒细胞性白血病细胞株HL-60购于中科院上海细胞生物研究所,用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液(另加青霉素100 kU/L、链霉素100 mg/L)于37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱内培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.4 MTT法测定菱角提取物对HL-60细胞的影响:接种HL-60细胞于96孔板,每孔 2×10^4 个细胞(100 μL)。37℃、5% CO₂条件下培养24 h后,实验组依次加6.25、12.5、25、50、100、200 μg/mL的菱角提取物,继续培养24、48、72 h后,终止培养,对照组只加培养液,每个剂量组设4个复孔。实验结束前4 h,每孔加入20 μL MTT溶液(5 g/L),继续孵育4 h,终止培养,小心吸弃上清液,每孔加入150 μL DMSO,震荡10 min,选择570 nm波长,在自动酶联检测仪上测定吸光度(A)值,实验重复3次,并计算其生长抑制率(CI)。

$CI = (\text{对照组 } A \text{ 值} - \text{实验组 } A \text{ 值}) / \text{对照组 } A \text{ 值} \times 100\%$

1.5 吖啶橙(AO)染色观察HL-60细胞核:收集0、25、50、100 μg/mL菱角提取物处理48 h的各组细胞,PBS液洗涤2遍,制成活细胞悬液,浓度为 1×10^7 /mL,取95 μL细胞悬液,加入5 μL吖啶橙(0.1 mg/mL)储存液混匀,于荧光显微镜下观察,摄片。

1.6 HL-60细胞DNA提取及琼脂糖凝胶电泳:收集0、25、50、100 μg/mL菱角提取物处理48 h的各组细胞,参考文献的方法^[2]提取DNA。取DNA样品在含溴化乙锭(0.5 g/mL)的1%琼脂糖凝胶恒压(40 V)电泳1 h。电泳结束后,凝胶成像系统观察DNA带型并摄片。

1.7 流式细胞术测定HL-60细胞凋亡率:收集0、25、50、100 μg/mL菱角提取物处理48 h的各组细胞,PBS洗涤2次,加入预冷的70%乙醇,于-20℃固定24 h,离心洗涤后加入200 μL PI染液,50 μL RNA酶,4℃避光放置20 min,1500 r/min离心5 min。调整细胞浓度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ /mL,上流式细胞仪分析,激发光源为氩离子激光,激发波长为488 nm。

1.8 HL-60细胞线粒体跨膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的测定^[3]:

收集0、25、50、100 μg/mL菱角提取物处理48 h的各组细胞 1×10^6 个,PBS洗涤2遍,然后与10.0 mg/mL的Rh123,37℃下共同孵育30 min,用PBS洗去未结合的染色剂后置流式细胞仪进行Rh123荧光强度测定。用其表示线粒体膜电位的大小。

1.9 Caspase-3、9蛋白活性的测定:收集0、25、50、100 μg/mL菱角提取物处理48 h的各组细胞 5×10^6 个,严格按照说明书裂解细胞并测定细胞裂解上清液蛋白浓度,调整蛋白浓度为3 g/L,每孔加入50 μL含150 μg蛋白的细胞裂解上清液,同时取50 μL裂解液作空白对照;每孔已配置2×反应缓冲液(每50 μL 2×反应缓冲液加入0.5 μL DTT),最后加入5 μL Caspase-3、9的底物,37℃避光孵育4 h,酶标仪405 nm测A值。

1.10 统计学分析:实验结果应用统计分析软件SPSS 13.0处理,所有实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较要用单因素方差分析。

2 结果

2.1 菱角提取物对HL-60细胞生长的影响:对照组HL-60细胞生长活跃,经6.25、12.5、25、50、100、200 μg/mL的菱角提取物处理24、48、72 h后,HL-60细胞生长均不同程度的减慢,并呈时间、浓度依赖性。与对照组比较,不同质量浓度菱角提取物作用48 h后HL-60细胞的生长抑制率在13.92%~82.04%,不同浓度、不同时间HL-60细胞生长抑制率有显著性差异($P < 0.05$),结果见表1。

表1 菱角提取物对HL-60细胞增殖的影响

($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 1 Effect of *T. manshurica* extracts on proliferation of HL-60 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

菱角提取物/ (μg · mL ⁻¹)	增殖抑制率/ %		
	24 h	48 h	72 h
6.25	4.3 ± 0.8	9.8 ± 1.3 *	13.4 ± 2.2
12.5	9.6 ± 1.4	21.5 ± 2.4 **	28.9 ± 3.1 **
25.0	14.5 ± 1.7	32.7 ± 2.8 **	49.8 ± 5.1 **△
50.0	20.7 ± 2.4	46.3 ± 5.7 **	61.2 ± 6.7 **△△
100.0	34.8 ± 3.5	59.8 ± 4.2 **	70.3 ± 7.2 **△
200.0	45.6 ± 2.8	64.5 ± 5.8 *	75.4 ± 6.7 **

与细胞培养24 h比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

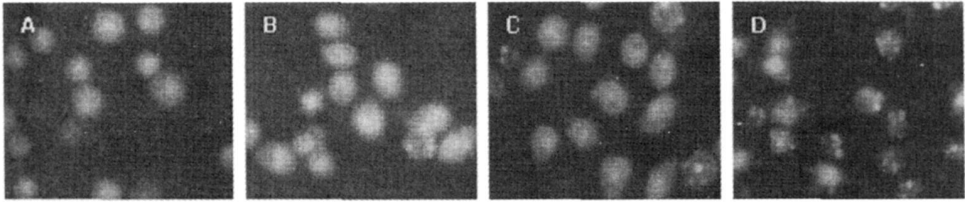
与细胞培养48 h比较: △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs cell culture for 24 h

△ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$ vs cell culture for 48 h

2.2 菱角提取物对HL-60细胞形态的影响:HL-60细胞经吖啶橙染色后,荧光显微镜下可见,对照组细胞核呈均染绿色荧光,表现为正常细胞的染色

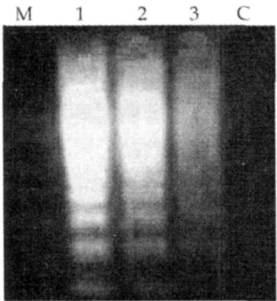
特征。菱角提取物 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用 48 h 细胞染色增强,荧光更为明亮,呈均匀一致的圆状或固缩状结构。50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 菱角提取物作用 48 h 后,细胞核固缩为新月状、念珠状,表现为晚期凋亡细胞核的形状和特征(图 1)。



A-对照 B~D-25、50、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 菱角提取物处理 48 h
A-control group B~D-treated with 25, 50, and 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ *T. manshurica* extracts for 48 h

图 1 吖啶橙染色检测 HL-60 细胞凋亡

Fig. 1 Observation by acridine orange fluorescent staining for apoptosis of HL-60 cells



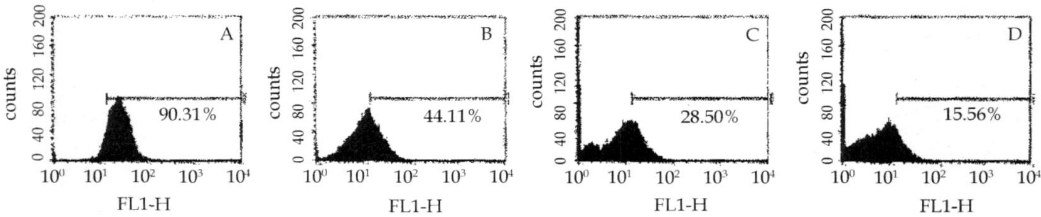
M-Marker C-对照 1~3-100、
50、25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 菱角提取物处
理 48 h
M-Marker C-control group
1—3-treated with 100, 50,
and 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ *T. manshurica*
extracts for 48 h

图 2 菱角提取物作用后 HL-60 出现 DNA 片段变化

Fig. 2 DNA Ladder changes of HL-60 cells treated
with *T. manshurica* extracts

2. 4 流式细胞术检测 HL-60 细胞凋亡:经流式细胞仪分析,不同浓度的菱角提取物作用 48 h 后,细胞 G_1 期峰前均出现了代表细胞凋亡的亚二倍体峰,在一定浓度范围内随着菱角提取物浓度升高,HL-60 细胞凋亡率升高,其中 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 菱角提取物作用 48 h 凋亡率达到 (27. 56 $\pm$ 4. 87) % (表 2)。

2. 5 菱角提取物对 HL-60 细胞线粒体膜电位的影



A-对照 B~D-25、50、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 菱角提取物处理 48 h
A-control group B~D-treated with 25, 50, and 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ *T. manshurica* extracts for 48 h

图 3 流式细胞仪检测 HL-60 细胞线粒体膜电位

Fig. 3 Flow cytometry analysis of mitochondrial membrane potential in HL-60 cells

2. 6 菱角提取物对 Caspase-3、9 蛋白活性的影响:在菱角提取物作用下,Caspase-3、9 活性比对照

2. 3 HL-60 细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析:对照组和菱角提取物在靠近加样孔处均有一亮带,是未裂解的 DNA 条带,菱角提取物 50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用 48 h 可见典型的 DNA 梯形条带,显示凋亡细胞的典型特征(图 2)。

表 2 菱角提取物作用 48 h 后对 HL-60 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Effect of *T. manshurica* extracts on apoptosis
of HL-60 cells after 48 h treatment ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组 别	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	凋亡率/ %
对照	-	0. 32 $\pm$ 0. 18
菱角提取物	25	7. 54 $\pm$ 0. 98 *
	50	16. 25 $\pm$ 3. 13 **
	100	27. 56 $\pm$ 4. 87 **

与对照组比较: * $P < 0. 05$ ** $P < 0. 01$

* $P < 0. 05$ ** $P < 0. 01$ vs control group

响:流式细胞仪检测结果见图 3。与对照组比较,不同浓度菱角提取物作用 48 h 后线粒体膜电位降低,峰值明显左移,并呈一定的量效关系。对照组和 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 药物组弱荧光强度细胞比率分别为 (9. 03 $\pm$ 0. 87) %、(54. 68 $\pm$ 5. 38) %、(72. 35 $\pm$ 8. 39) %、(85. 25 $\pm$ 10. 6) %,药物处理组与对照组比较有显著性差异 ($P < 0. 05$)。

(0. 152 $\pm$ 0. 015) 和 (0. 122 $\pm$ 0. 017) 增加,25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 菱角提取物作用 48 h, A_{405} 值分别为

0.213 ± 0.025、0.411 ± 0.054、0.289 ± 0.032 和 0.183 ± 0.015、0.281 ± 0.021、0.245 ± 0.018, 药物处理组与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$), 其中 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 菱角提取物引起 Caspase-3、9 的活化程度最高。

3 讨论

菱角是我国南北均有分布的药用植物, 在民间广泛用于治疗肝腹水、肝癌等, 是对肿瘤有治疗和辅助治疗作用的药物。前期研究表明菱角提取物含有 3,4,5-三羟基苯甲酸在内的多种活性物质, 对肿瘤细胞具有较强的抑制作用。本实验表明菱角提取物能抑制 HL-60 细胞增殖, 并呈量效和时效关系。通过对 HL-60 细胞的形态学观察, 发现细胞在不同浓度的菱角提取物作用下表现出一系列凋亡形态特征变化, 如细胞核固缩、边缘化、凋亡小体形成等, 结合 DNA 电泳呈现的典型梯状条带, 表明菱角提取物能诱导 HL-60 细胞凋亡。通过流式细胞仪定量显示细胞凋亡率。通过流式细胞仪定量显示细胞凋亡率, 菱角提取物在 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下诱导 HL-60 细胞凋亡呈浓度依赖性, 凋亡率分别为 (7.54 ± 0.98) %、(16.25 ± 3.13) % 和 (27.56 ± 4.87) %。

细胞凋亡是由基因调控的细胞主动死亡过程, 线粒体依赖性细胞凋亡通路是抗肿瘤药的诱导细胞凋亡的核心通路^[4]。在凋亡诱导信号的作用下, 线粒体膜通透性转运通道 (mitochondrial membrane permeability transition pore, MMPT) 开放, 或者线粒体肿胀, 导致线粒体膜电位下降, 释放的细胞色素 C 与凋亡蛋白酶激活因子-1 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1) 和 Caspase-9 形成复合体, 激活 Caspase 级联反应, 导致细胞凋亡^[5]。

Hengartner 等^[6]研究认为线粒体膜电位的丧失是诱导细胞凋亡的重要途径。本研究结果表明: 菱角提取物作用 HL-60 细胞 48 h 后, 弱荧光细胞明显增多, 呈剂量依赖性。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 菱角提取物作用 48 h 弱荧光细胞比达到了 (85.25 ± 10.6) %, 提示线粒体功能已经严重受损。Caspase-9 是线粒体凋亡途径的关键蛋白酶, 处于 Caspase “瀑布式”激活的顶端; Caspase-3 是细胞凋亡的主要执行者, 通过特异性地裂解一套底物而导致细胞凋亡。实验结果表明, 不同浓度菱角提取物作用 48 h, Caspases-9、3 蛋白活性显著增加。

综上所述, 菱角提取物可诱导 HL-60 细胞凋亡, 其在诱导细胞凋亡过程中细胞线粒体膜电位下降, 并激活 Caspase-9、3。这些结果表明菱角提取物可能通过线粒体信号传导通路诱导 HL-60 细胞凋亡。但是, 由于细胞凋亡是一个多系统参与、多阶段的复杂生化反应, 菱角提取物诱导肿瘤细胞凋亡的机制有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Niu F L, Wang X D, Wang Y L, et al. Trihydroxybenzoic acid dimer-induced apoptosis effect *in vitro* [J]. *Chem Res Chin U.*, 2005, 21(4): 463-467.
- [2] 吴国东, 周惠君. 青蒿琥酯诱导人脐静脉内皮细胞凋亡 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2004, 18(4): 294-299.
- [3] 唐旭东, 周克元, 侯 敢, 等. 白藜芦醇诱导鼻咽癌细胞 CNE-2Z 凋亡的线粒体机制 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2004, 18(3): 171-177.
- [4] Gottlieb R A. Mitochondrial execution central [J]. *Febs Let*, 2000, 482(1-2): 6-12.
- [5] Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death [J]. *Science*, 1998, 282(5381): 1317-1322.
- [6] Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis [J]. *Nature*, 2000, 407(12): 770-776.

藿香正气提取物对腹泻型肠易激综合征大鼠免疫功能的调节作用

李 丹, 吕 妍, 唐 方*

(天津医科大学总医院 中医科, 天津 300052)

摘 要:目的 研究藿香正气提取物调节腹泻型肠易激综合征 (IBS) 大鼠免疫功能机制。方法 30 只 Wistar 大鼠随机分成 3 组: 对照组、模型组和藿香正气提取物组, 对照组未作任何处理, 余两组采用番泻叶水煎剂 ig 给药联合肢体束缚应激的方法制备 IBS 模型。模型组大鼠给予高压灭菌蒸馏水, 藿香正气提取物组 ig 给予藿香正气提取物, 连续 6 d。通过放免法和酶联免疫吸附法测定各组大鼠 P 物质 (SP)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-2 的水平。结果 模型组大鼠胸腺、脾脏指数、IL-2 水平下降, IL-1 β 、SP 水平显著升高, 与对照组相比具有统计学差异 ($P <$

* 收稿日期: 2008-11-20

作者简介: 李 丹, 硕士。E-mail: ech012_22@163.com