样的粪质，既不会象硬质粗粪那样，引起肛门灼热、出血、剧痛，也不会象水样稀便那样嵌入创面诱发感染，避免了使用通便药的弊端。口服进入肠道内，保持肠道微生物平衡，有助于促进肠蠕动，缓解术后便秘及其他由排便困难诱发的诸多症状。

参考文献：

[1] 王晓燕. 口服痔瘘汤预防肛肠病术后并发症 80 例观察 [J]. 中国肛肠病杂志，2003，23(4)：39

[2] 刘 平，倪 是，宋笑玲. 痔疮清内服液应用于肛门病术后疗效观察 [J]. 浙江临床医学，2002，4(2)：120-121

[3] 杨 巍，汪庆明. 痔血宁合剂治疗痔出血作用机理的实验研究 [J]. 辽宁中医杂志，2003，30(8)：686

胭脂树橙对白血病 K562 细胞凋亡及 PPARγ 蛋白表达的影响

郭朋辉，赵文恩*，张 夏，李倩倩，李 晓

（郑州大学化学工程学院，河南 郑州 450001）

摘 要：目的 探讨胭脂树橙在诱导白血病 K562 细胞凋亡过程中对 PPARγ 蛋白表达的影响。方法 用胭脂树橙作用于 K562 细胞一定时间后，通过台盼蓝拒染法观察 K562 细胞生长曲线，MTT 法检测其对细胞的抑制率，Hoechst 33258 染色后，荧光显微镜下观察细胞核形态；流式细胞仪检测细胞的凋亡率；采用 Western-blotting 技术从蛋白分子水平上检测胭脂树橙对 PPARγ 蛋白表达的影响。结果 胭脂树橙显著抑制 K562 细胞的增殖并呈浓度依赖关系。电泳的结果显示一定浓度的胭脂树橙能够上调 PPARγ 蛋白的表达，进而可能诱导 K562 细胞的凋亡。结论 PPARγ 蛋白表达的上调可能是胭脂树橙抑制 K562 细胞增殖诱导凋亡的原因之一，其中，胭脂树橙具有 PPARγ 非特异配体的作用。

关键词：K562 细胞；胭脂树橙；PPARγ 蛋白

中图分类号：R285 文献标识码：A 文章编号：0253-2670(2009)05-0782-03

胭脂树橙（bixin）为类胡萝卜素即共轭多烯烃的加氧衍生物，是类胡萝卜双羧酸的单甲基酯化物，具有不同程度的淬灭单线态氧（激发态氧）的抗氧化和清除自由基的功能[1]。PPARγ 是一类由配体调节的核激素受体，属于核激素受体超家族。越来越多的研究显示 PPARγ 在肿瘤的发生中起着重要的作用[2]。近年来研究表明 PPARγ 以失活状态在多种肿瘤中高表达，同时大量文献证实 PPARγ 配体可以通过激活 PPARγ 而发挥潜在抗肿瘤作用[3,4]。但是绝大多数的研究只是通过 PPARγ 的天然和合成配体对其诱导激活，从而发挥 PPARγ 在肿瘤细胞中的作用。类胡萝卜素在自然界中广泛存在，而且无毒性；但是对于能否通过类胡萝卜素诱导 PPARγ 表达的研究甚少。本研究以白血病细胞系 K562 细胞为靶细胞，探讨胭脂树橙对 K562 细胞的凋亡诱导作用及其可能机制，并利用 Western blotting 技术从蛋白分子水平上探讨胭脂树橙对 PPARγ 蛋白表达的影响，研究胭脂树橙在分子水平上的机制。

1 材料与方法

1.1 材料：胭脂树橙购自 Extrasynthese 公司；MTT 购自美国 Gibco 公司；β-actin 抗体和 PPARγ 抗体购自 Santa Cruz 公司；人白血病 K562 细胞由郑州大学医学院病理生理研究室赠予。

1.2 细胞培养及分组：取适量冻存细胞复苏，置于细胞培养瓶中，加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基，于 37 ℃、5% CO_2 饱和浓度的培养箱中培养。实验分为实验组（分别用 0.2、0.4、2.0、4.0、8.0 mg/L 胭脂树橙处理 K562 细胞）和对照组（加入完全培养基），每次实验重复 3 次。

1.3 台盼蓝拒染法检测生长曲线：取对数生长期 K562 细胞，接种量为 8×10^4 个/mL，分别在台盼 24、48、72、96、120 h 时取实验组及对照组细胞，用 0.4% 的台盼蓝染液染色后计数。每组设 3 个复孔，取其平均值。

1.4 MTT 检测细胞抑制率：取对数生长期 K562 细胞接种于 96 孔培养板，每孔 150 μL（约 3×10^4 个细胞），培养 24 h 后，实验组加入不同浓度胭脂树橙，对照组加完全培养基。每组设 6 个复孔，培养 24、48、72 h 后，分别在各时间段结束前 4 h 每孔加

* 收稿日期：2008-10-17

作者简介：郭朋辉（1981—），男，河南偃师人，硕士研究生，研究方向为天然产物化学与生物化学。

Tel：13733820589 E-mail：guopenghui@yahoo.com.cn

MTT（5 mg/mL）150 μL 检测前离心弃上清液，每孔加 DMSO 150 μL，用 Bio-RAD680 酶标仪于 570 nm 波长处测吸光度（A）值。计算细胞抑制率。

细胞抑制率=（$A_{对照}$－$A_{实验}$）/ $A_{对照}$×100%

1.5 细胞超微结构观察：取对数生长期 K562 细胞，分别在作用 24、48、72 h 收集实验组及对照组细胞，用 0.01 mol/L pH 7.2 的冷 PBS 洗两次，加 Hoechst 33258 使其终浓度为 10 mg/L，室温避光染色 15 min，离心后弃上清液，加入适量的 PBS 悬浮细胞，涂片，紫外光激发，荧光显微镜下观察，照相。

1.6 流式细胞仪检测凋亡率：在 72 h 收集实验组及对照组细胞，以 2 000 r/min 离心 5 min，弃上清。用 PBS 洗涤细胞两次，并调整细胞密度为 1×10^6～5×10^6/mL。加入 500 μL Binding Buffer 重新悬浮细胞，与 2 μL Annexin V-FITC 混匀后，加入 5 μL PI，混匀。避光室温反应 15 min，立即检测。使用 Cell Quest 软件获取细胞信息，Modifit 软件分析细胞的凋亡。

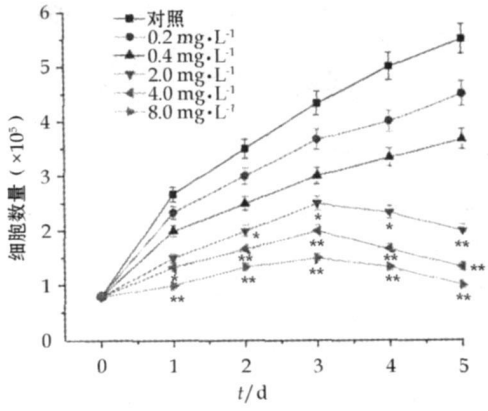
1.7 Western-blotting 检测：提取实验组和对照组细胞中的总蛋白，测定蛋白水平，用 BCA 蛋白分析试剂盒测定总蛋白浓度。取总蛋白 50 μg 上样，用 10% 聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）分离蛋白，电泳后将凝胶中的蛋白电转移至纤维素膜上，进行抗原抗体反应。一抗为兔抗人 PPARγ 多克隆抗体，按 1∶800 稀释；二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 多克隆抗体，按 1∶5 000 稀释。最后经 ECL 超敏发光物检测底物显色。底片上的条带相对强度用 NH Image 软件分析。

1.8 统计分析：实验采用 SPSS 13.0 软件包进行分析。MTT 检测结果采用方差分析，组间两两比较用 q 检验。

2 结果

2.1 胭脂树橙对 K562 细胞生长曲线的影响：结果见图 1。胭脂树橙对 K562 细胞增殖和存活均有显著影响，其中≥2.0 mg/L 胭脂树橙处理后，随着作用时间的延长，细胞增殖抑制作用及存活率下降比低浓度胭脂树橙明显。同时显示大于 2.0 mg/L 浓度的胭脂树橙作用 3 d 后，细胞基本不增殖，总细胞数呈缓慢下降的趋势。

2.2 胭脂树橙对 K562 细胞增殖的抑制作用：结果见图 2。MTT 法显示胭脂树橙对 K562 细胞增殖有较强的抑制作用，胭脂树橙浓度越高，作用时间越长，对细胞的抑制作用越强，呈较明显的时间-剂量



与对照组比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$

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

图 1 胭脂树橙对 K562 细胞生长的影响

Fig. 1 Effect of bixin on K562 cells growth

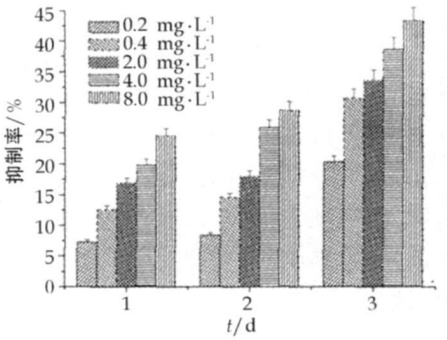


图 2 胭脂树橙对 K562 细胞增殖的抑制作用

Fig. 2 Inhibition of bixin on proliferation of K562 cells

依赖性关系。同时显示小剂量的胭脂树橙在作用 3 d 后较作用 1、2 d 后抑制率有明显提高。

2.3 胭脂树橙对 K562 细胞形态学的影响：对照组中 K562 细胞呈原始未分化状态，细胞大而圆、胞质少、胞核大、核质比例大，核染色质细腻，见核仁呈现弥漫性均匀荧光。2.0、4.0、8.0 mg/L 胭脂树橙作用 24～72 h 后，可见部分细胞呈现典型的细胞凋亡形态：核染色质呈固缩状或片段状、胞膜突起，细胞核或细胞浆内可见致密的颗粒状强荧光，严重时细胞出泡形成凋亡小体。

2.4 流式细胞仪分析 K562 细胞凋亡率：对照组的 K562 细胞凋亡率是（5.34±1.02）%，胭脂树橙处理 K562 细胞 72 h 后，2.0、4.0、8.0 mg/L 实验组的凋亡率分别是（16.26±1.25）%、（23.74±1.67）%、（29.69±1.86）%，与对照组相比差异显著（$P<0.01$），说明胭脂树橙能促进 K562 细胞凋亡，且在一定范围内细胞凋亡率与药物浓度呈依赖性。

2.5 胭脂树橙对 K562 细胞中 PPARγ 蛋白表达的影响：结果（图 3 和表 1）显示 4.0 mg/L 胭脂树

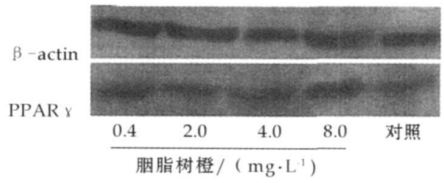


图 3 胭脂树橙对 PPARγ 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of bixin on expression of PPARγ protein

表 1 胭脂树橙对 PPARγ 蛋白表达相对强度的影响

Table 1 Relative intensity of bixin on expression of PPARγ protein

组 别	质量浓度/(mg·L⁻¹)	条带强度
对照	—	1.000±0.050
胭脂树橙	0.4	1.150±0.058
	2.0	1.311±0.066
	4.0	1.779±0.089*
	8.0	2.511±0.126**

与对照组比较：*$P<0.05$ **$P<0.01$

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

橙处理后的细胞 PPARγ 蛋白的表达量为 1.779±0.089（$P<0.05$）；8.0 mg/L 为 2.511±0.126（$P<0.01$），与对照组相比差异显著，说明经胭脂树橙处理后，PPARγ 蛋白的表达量随药物浓度的增加而增加；胭脂树橙可上调 PPARγ 蛋白的表达，并呈明显的剂量依赖性。

3 讨论

有关 PPARγ 在胭脂树橙诱导 K562 细胞凋亡过程中的作用，国内尚研究较少。本研究表明，经胭脂树橙处理的 K562 细胞，采用台盼蓝拒染法和 MTT 法检测显示，胭脂树橙对 K562 细胞的抑制作用同其浓度和作用时间呈依赖性关系，即使小剂量的胭脂树橙（0.2 mg/L）作用 K562 细胞 3 d 后，仍能较显著地抑制细胞增殖。荧光显微镜观察形态学显示，对照组呈弥漫性均匀荧光，核/质比例大；给药组细胞核变小，浓缩，荧光加强，并观察到有大量细胞碎片，呈现典型凋亡细胞的特征性变化。在此基础上，进一步研究了胭脂树橙诱导 K562 细胞凋亡的机制，通过 Western-blotting 检测 PPARγ 基因的表达产物，显示胭脂树橙显著上调 PPARγ 基因的蛋白表达，并呈剂量依赖性，提示胭脂树橙诱导 K562 细胞凋亡和 PPARγ 基因的表达有密切关系。提示胭脂树橙可能是通过上调 PPARγ 基因的表达来促进 K562 细胞的凋亡和抑制其增殖的，其中，胭脂树橙起着 PPARγ 非特异配体的作用。

PPARγ 具有调控细胞因子生成，调节体内糖平衡，控制炎症形成和影响肿瘤生长等作用。最近有研究显示，PPARγ 配体抗肿瘤作用不需激活 PPARγ 或 PPARγ 激活与其他途径共同起作用[5]。可见有关胭脂树橙诱导细胞凋亡及 PPARγ 表达的分子机制有待进一步研究和证实。

参考文献：

[1] Woodall A A, Lee S W, Weesie R J, *et al*. Oxidation of carotenoids by free radicals: Relationship between structure and reactivity [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 133: 33-42

[2] Berger J, Moller D E. The mechanisms of action of PPARs [J]. *Annu Rev Med*, 2002, 53: 409-435

[3] Willson T M, Brown P J, Sternbach D D, *et al*. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery [J]. *J Med Chem*, 2000, 43(4): 527-550

[4] Baek S J, Wilson L C, His L C, *et al*. Troglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptorγ (PPARγ) ligand, selectively induces the early growth response-1 gene independently of PPARγ [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(8): 5845-5853

[5] Shen Z N, Nishida K, Doi H, *et al*. Suppression of chondrosarcoma cells by 15-deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J_2 is associated with altered exp ression of Bax/Bcl-xL and P21 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328: 375-382

生当归、酒当归和油当归体外清除自由基活性研究

邓红娟，郭延生，曲亚玲，杨小虎，秦 亮，魏彦明*

（甘肃农业大学动物医学院，甘肃 兰州 730070）

摘 要：目的 研究生当归、油当归和酒当归的水提取液体外对羟自由基（·OH）和氧自由基（$O_2^{\cdot-}$）的清除作用。方法 应用分光光度法测定生当归、油当归和酒当归水提液对 Fenton 反应产生的·OH 和邻苯三酚自氧化产生的 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率。结果 生当归、油当归和酒当归水提液在 5～80 mg/mL 的质量浓度内对·OH 有明显的抑制作用，随着当归及其炮制品水提液质量浓度的增加，抑制率明显升高。生当归、油当归和酒当归水提液对·OH 清除

* 收稿日期：2008-10-06
基金项目：国家自然科学基金资助项目（30671541）
作者简介：邓红娟（1981—），女，山东潍坊人，在读硕士，从事中药药理及中药免疫研究。 E-mail：diaopengfeiluky@163.com
*通讯作者 魏彦明 Tel：（0931）7631077 E-mail：weiym@gsau.edu.cn