

越橘提取物抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖及诱导其凋亡的实验研究

唐丽萍^{1,2}, 杨艳梅³, 李艳凤^{1,2}, 马英丽^{1,2*}

(1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院, 黑龙江 哈尔滨 150081;

3. 哈尔滨医科大学肿瘤防治研究所, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要:目的 探讨越橘提取物抑制 HeLa 细胞增殖和诱导凋亡作用及其可能机制。方法 用浓度为 0、0.025、0.25、2.5、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的越橘提取物处理 HeLa 细胞 24 h 后,采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 方法检测越橘提取物对 HeLa 细胞增殖的抑制作用,采用 Hoechst 33342/PI 染色和 DNA ladder 方法观察越橘提取物对 HeLa 细胞凋亡的诱导作用,并采用 Western blotting 法检测 caspase-3 和 caspase-8 蛋白表达。结果 0.025、0.25、2.5 和 25 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的越橘提取物对 HeLa 细胞增殖的抑制率分别为 22.81%、36.75%、42.62% 和 45.22%;0.25~25 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的越橘提取物处理组细胞呈现明显的凋亡改变;Western blotting 结果显示越橘提取物处理组细胞中 caspase-8 和 caspase-3 酶原蛋白激活,出现裂解片段。结论 越橘提取物可通过诱导 HeLa 细胞凋亡而抑制其增殖。

关键词:越橘;细胞凋亡;HeLa 细胞;caspase-8;caspase-3

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)07-1120-03

越橘又名蓝莓,系杜鹃花科越橘属小浆果类果树,俗称红豆、牙疙瘩等。越橘属植物种类繁多,全世界有 400 多种,我国有 90 多种^[1]。目前我国主要开发利用的是高丛越橘和野生资源笃斯越橘。笃斯越橘广泛分布在黑龙江及内蒙古、大兴安岭地区。近来研究表明,越橘提取物具有抑制肿瘤生长的作用^[2~5],但是其对宫颈癌生长的影响鲜有报道。为此,本实验采用体外细胞培养技术,观察越橘提取物对 HeLa 细胞增殖的抑制作用及其对肿瘤细胞凋亡的诱导作用。

1 材料

越橘提取物购于大兴安岭华野生物工程有限公司,含 25.5% 花青素。MTT、胰酶和荧光染料 Hoechst 33342 均购自美国 Sigma 公司;DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司。兔抗人 caspase-3 和 caspase-8 抗体购于美国 Cell Signaling 公司。碱性磷酸酶标记羊抗兔二抗和 BCIP/NBT 显色系统购自美国 Promega 公司。DNA ladder 购自立陶宛 MBI 公司。细胞凋亡 DNA ladder 抽提试剂盒(离心柱式)购自碧云天生物技术有限公司。

人宫颈癌细胞株 HeLa 细胞由哈尔滨医科大学肿瘤防治研究所提供。细胞常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,取对数生长期细胞用于实验。越橘提取物溶于 PBS 中,配制成 10 g/L

的储备液,滤器滤过除菌,分装于 -20℃ 冷冻保存。临用时,用培养液稀释至所需浓度。

2 方法

2.1 细胞生长抑制率测定:采用 MTT 法,取对数生长期 HeLa 细胞 4×10^4 个/mL 接种于 96 孔板,每孔 0.1 mL,培养 24 h 后,加入不同剂量越橘提取物,使其最终浓度分别为 0.025、0.25、2.5、25 $\mu\text{g}/\text{L}$,每个浓度设 6 个平行孔,另设对照组。培养 24 h 后,每孔加入 0.5 g/L MTT 20 μL ,继续培养 4 h,弃去上清,每孔加入 DMSO 溶液 0.1 mL,振荡 10 min,待结晶物充分溶解后,在 490 nm 波长处读取吸光度 (A) 值,计算细胞增殖抑制率 (inhibitory rate, IR)。实验重复 3 次。

$$\text{IR} = (1 - \text{给药组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$$

2.2 荧光显微镜观察细胞凋亡形态:将适量细胞接种于 24 孔板,培养 24 h,观察细胞贴壁以后,分别加入不同浓度 0.25、2.5、25 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的越橘提取物,设对照组。继续培养 24 h,取出 24 孔板,弃培养基, PBS 洗涤 2 次,加入 Hoechst 33342 和 PI 染液,避光 4℃ 染色 20 min。吸出显色液, PBS 洗涤 2 次,置 Nikon 荧光显微镜下观察并拍照。检测凋亡。

2.3 DNA ladder 法检测细胞凋亡:常规培养 HeLa 细胞,按 1×10^6 个/孔接种于 6 孔细胞培养板。24 h 后,用含不同质量浓度 (0、0.025、0.25、2.5、25 $\mu\text{g}/\text{L}$) 的越橘提取物的 2% DMEM 培养基

* 收稿日期:2008-10-22

基金项目:黑龙江省人事厅博士后基金 (LBH-Z06252)

作者简介:唐丽萍(1973—),女,哈尔滨人,副主任医师,博士学位,博士后在站,研究方向为妇科肿瘤的诊断和治疗。

Tel: (0451) 86298381 E-mail: hanzhigang@medmail.com.cn

*通讯作者 马英丽 Tel: (0451) 82196178 E-mail: mylt666@sina.com

处理 24 h。PBS 洗涤,按试剂盒说明书提取 DNA。取样品于 1 % 琼脂糖凝胶电泳,60 V 电泳 1 h,凝胶成像图像分析系统照相记录结果。

2.4 Western blotting 方法检测蛋白表达:收集不同浓度 (0、0.025、0.25、2.5、25 $\mu\text{g/L}$) 越橘提取物处理 24 h 的 HeLa 细胞,提取细胞总蛋白。用 Bradford 法测定蛋白量后,取 50 μg 总蛋白经 10 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移至硝酸纤维素膜上。用含 10 % BSA 的 TBST 室温封闭 2 h;一抗孵育 (抗体稀释浓度为 1 : 500) 2 h,用 TBST 漂洗 3 次,加 1 : 7500 稀释的碱性磷酸酶标记的二抗,室温孵育 1 h。用 TBST 漂洗 3 次,TBS 漂洗 2 次,NBT/BCIP 显色,去离子水漂洗终止显色,凝胶成像仪照相。

2.5 统计学处理:各实验均重复 3 次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用统计学软件 SPSS 13.0 进行单因素方差分析,组间比较用 LSD 法。

3 结果

3.1 越橘提取物对 HeLa 细胞增殖的抑制作用:在 0.025 ~ 25 $\mu\text{g/L}$ 质量浓度时,越橘提取物对 HeLa 细胞的增殖有明显抑制作用,并且其抑制作用随着越橘提取物质量浓度的提高而增强,当提取物质量浓度达

到 25 $\mu\text{g/L}$ 时,抑制率达到最大,结果见表 1。

表 1 越橘提取物对 HeLa 细胞增殖的影响

Table 1 Effect of bilberry extracts on proliferation of HeLa cells

组别	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	A	抑制率/ %
对照组	-	0.122 $\pm$ 0.012	0
越橘提取物	25	0.067 $\pm$ 0.004 *	44.70 $\pm$ 6.75 *
	2.5	0.070 $\pm$ 0.006 *	42.10 $\pm$ 7.79 *
	0.25	0.077 $\pm$ 0.005 *	36.04 $\pm$ 9.33 *
	0.025	0.094 $\pm$ 0.005 *	22.08 $\pm$ 9.39 *

与对照组比较: * $P < 0.05$

与 0.025 $\mu\text{g/L}$ 组比较: $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; $P < 0.05$ vs 0.025 $\mu\text{g/L}$ group

3.2 荧光显微镜观察越橘提取物对 HeLa 细胞凋亡的诱导作用:在荧光显微镜下观察,正常细胞呈现弥散均匀蓝色荧光,细胞边缘整齐;凋亡细胞变圆、体积缩小、核染色质致密深染形成浓染致密的颗粒块状蓝色荧光,核碎裂呈大小不等的圆形小体。对照组和 0.025 $\mu\text{g/L}$ 越橘提取物处理组偶见凋亡细胞,而 0.25 ~ 25 $\mu\text{g/L}$ 越橘提取物处理组则可见较多的凋亡细胞,并且随着提取物浓度的提高,凋亡细胞数明显增多,见图 1。

3.3 DNA ladder 法检测越橘提取物对 HeLa 细胞

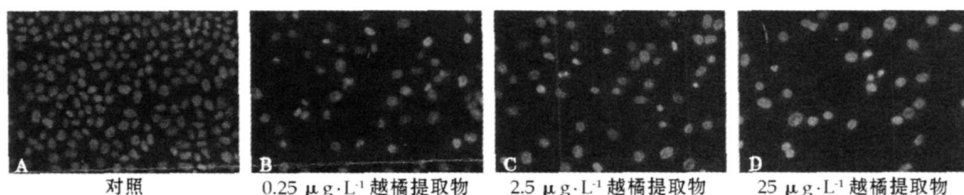


图 1 越橘提取物诱导的 HeLa 细胞形态学改变

Fig. 1 Effect of bilberry extracts on morphological change of HeLa cells

凋亡的诱导作用:琼脂糖凝胶电泳可见,对照组细胞未发生凋亡,DNA 相对分子质量大,滞留在加样孔附近,未形成 DNA ladder。经越橘提取物处理后,HeLa 细胞核 DNA 断裂成 180 ~ 200 bp 及其倍数的片段,电泳后在琼脂糖凝胶上呈梯形条带,25 $\mu\text{g/L}$ 越橘提取物处理组梯形条带更为明显,见图 2。

3.4 越橘提取物对蛋白表达的影响:HeLa 细胞经越橘提取物作用后,procaspase-3 和 procaspase-8 表达水平下降,其裂解片段明显增加,见图 3。

4 讨论

越橘的应用已有多年的历史,但随着近年来对越橘研究的不断增多,其广泛的抗肿瘤作用逐渐引起关注^[6]。越橘中含有维生素 A、E、C 及 Ca、P、Fe、Zn 等微量元素以及大量的原花青素等特殊成分。研究表明,原花青素是一种天然有效的自由基清除剂,具有抑制乳腺癌细胞、前列腺癌细胞等多种

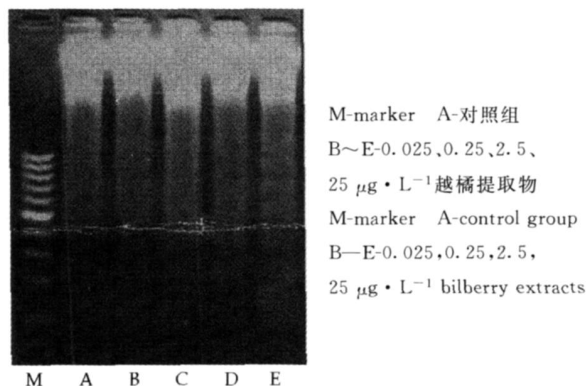
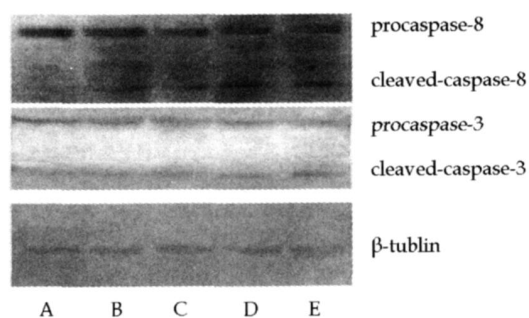


图 2 越橘提取物诱导 HeLa 细胞的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of HeLa cells induced by bilberry extracts

肿瘤细胞生长、诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[7~9]。因此,一般认为越橘具有抗癌的作用主要与其含有原花青素有关。但是,最近的一项研究结果提示,越橘



A-对照组 B~E-0.025、0.25、2.5、25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 越橘提取物
A-control group B—E-0.025, 0.25, 2.5, and 25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
bilberry extracts

图3 Caspase-3 和 caspase-8 蛋白表达情况

Fig. 3 Protein expression of caspase-3 and caspase-8

的抗癌作用还与其他酚类或非酚类成分有关^[10]。因此,本实验观察越橘水提取物对宫颈癌 HeLa 细胞生长的影响。采用 MTT 法检测不同浓度越橘提取物对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的影响,发现在 0.025~25 $\mu\text{g/L}$ 内,随着越橘提取物浓度的增加,细胞增殖抑制率逐渐升高,表明越橘提取物可以使 HeLa 细胞的增殖受到明显的抑制,并且这种抑制作用具有剂量依赖性。

凋亡是有机体细胞在基因调控下完成的有序的主动死亡过程,与肿瘤的发生、发展、转归有密切的关系。多项研究结果表明,越橘中的原花青素等成分具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用。为了探讨越橘提取物对 HeLa 细胞生长的抑制作用与细胞凋亡的关系,本研究采用 Hoechst 33342/PI 荧光染色和 DNA ladder 两种实验方法观察越橘提取物能否诱导肿瘤细胞凋亡,结果均可观察到明显的细胞凋亡特征性变化,证明越橘提取物能诱导 HeLa 肿瘤细胞发生凋亡。

目前,认为细胞凋亡是受细胞内源性基因、酶类和信号传导途径调控的一个“瀑布式”激活过程,caspase 蛋白酶家族在整个过程中起着至关重要的作用。Caspases 家族的成员都是以酶原形式存在,经水解激活后,可对多种蛋白底物进行降解,被认为是细胞凋亡的中心环节和执行者。参与细胞凋亡的 caspase 被分为启动型 (initiator) 和效应型 (executioner 或 effector) 两类,启动型 caspase 包括 caspase-2、8、9、10,通过自身活化启动凋亡并调节效应型 caspase;效应型 caspase 包括 caspase-3、6、7,能分解细胞蛋白,执行凋亡。在死亡受体 Fas 等介导的细胞凋亡途径中,caspase-8 是关键的启动型

caspase^[11]。当细胞膜表面的 Fas 与其配体 (FasL) 结合后,FADD 作为平台供 procaspase-8 聚和并相互剪切,procaspase-8 的 ICE 同源区暴露后表现出蛋白酶活性并通过自身催化形成有活性的 caspase-8。活化后的 caspase-8 随后活化其下游的其他 caspase。Caspase-3 是 caspase 家族的重要成员,是细胞凋亡调控的重要因子,以无活性前体存在于细胞质中,当细胞进入凋亡时被激活,并可促进家族其他成员一起促进细胞凋亡^[12]。在本研究中,越橘提取物处理 HeLa 细胞后出现 caspase-3 和 caspase-8 的活化,并随提取物浓度增大而增加,提示 caspase-3 和 caspase-8 参与了越橘提取物对 HeLa 细胞凋亡的诱导作用。

参考文献:

- [1] 方瑞征. 中国越橘属的研究 [J]. 云南植物研究, 1986, 8 (3): 239-258.
- [2] Park E J, Cuendet M, Gills J J, et al. Natural inhibitors of carcinogenesis [J]. *Planta Med*, 2004, 70 (8): 691-705.
- [3] Zhao C, Gusti M M, Malik M, et al. Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52 (20): 6122-6128.
- [4] Cooke D, Schwarz M, Boocock D, et al. Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the ApcMin mouse model of intestinal carcinogenesis-relationship with tissue anthocyanin levels [J]. *Int J Cancer*, 2006, 119 (9): 2213-2220.
- [5] Katsube N, Iwashita K, Tsuchida T, et al. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51 (1): 68-75.
- [6] 刘淑兰, 吕秀莲, 王晓军, 等. 越橘的化学成分与药理活性研究进展 [J]. 中医药学报, 2006, 34: 53-54.
- [7] Faria A, Calhau C, de Freitas V, et al. Procyranidins as antioxidants and tumor cell growth modulators [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54 (6): 2392-2397.
- [8] Schmidt B M, Erdman J W Jr, Lila M A. Differential effects of blueberry proanthocyanidins on androgen sensitive and insensitive human prostate cancer cell lines [J]. *Cancer Lett*, 2006, 231 (2): 240-246.
- [9] Hu H, Qin Y M. Grape seed proanthocyanidin extract induced mitochondria-associated apoptosis in human acute myeloid leukaemia 14. 3D10 cells [J]. *Chin Med J*, 2006, 119 (5): 417-421.
- [10] Wu Q K, Koponen J M, Mykkanen H M, et al. Berry phenolic extracts modulate the expression of p21 (WAF1) and Bax but not Bcl-2 in HT-29 colon cancer cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55 (4): 1156-1163.
- [11] Tang J, Kawadler H, Yang X. Lymphocyte life and death: the caspase-8 connection [J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4 (7): 700-702.
- [12] Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis [J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 414 (10): 13-21.