

牡荆苷对人食管癌 EC-109 细胞生长及凋亡的影响

朱登祥, 安芳, 王书华*

河北北方学院 药学系, 河北 张家口 075000

摘要: 目的 观察金莲花中提取的牡荆苷体外对人食管癌 EC-109 细胞生长及诱导 EC-109 细胞凋亡的作用, 探讨 p53 及 bcl-2 蛋白表达在牡荆苷抗肿瘤细胞机制中的作用。方法 用不同浓度牡荆苷作用于对数生长期的 EC-109 细胞, 通过 CCK-8 法检测其对 EC-109 细胞体外生长、增殖的抑制作用; Hoechst33258 荧光染色观察细胞形态的变化; 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 条带; AnnexinV-FITC/PI 双标法流式细胞术观察牡荆苷对 EC-109 细胞凋亡的诱导作用; 流式细胞术检测 EC-109 细胞中抑癌基因 p53 和促癌基因 bcl-2 蛋白的表达。结果 牡荆苷对 EC-109 细胞生长、增殖具有明显的抑制作用, 能够诱导 EC-109 细胞凋亡, 且作用与牡荆苷浓度、作用时间呈正相关, 可上调 p53 蛋白表达, 下调 bcl-2 蛋白表达。结论 牡荆苷可能通过上调 p53 蛋白和下调 bcl-2 蛋白的表达, 促进 EC-109 细胞凋亡, 抑制 EC-109 细胞生长。

关键词: 金莲花; 牡荆苷; 人食管癌 EC-109 细胞; 细胞凋亡; p53; bcl-2

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)09-1781-04

Effects of vitexin on cell growth and apoptosis of human esophageal cancer EC-109 cells

ZHU Deng-xiang, AN Fang, WANG Shu-hua

Department of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

Abstract: Objective To observe the effects of vitexin extracted from the flowers and flower buds of *Trollius chinensis* on the cell growth and apoptosis of human esophageal cancer EC-109 cells, and to investigate the effect of p53 and bcl-2 protein expression in antitumor mechanism. **Methods** EC-109 cells in logarithmic growth phase were treated by vitexin at different concentration. The inhibitory effects on the growth and proliferation of EC-109 cells *in vitro* were detected by CCK-8 method. The morphological changes of cell nucleus were assayed by the cell death detection kit Hoechst33258, DNA bands were detected by agarose gel electrophoresis, and the apoptosis rate of EC-109 cells induced by vitexin was examined using flow cytometry (FCM) with AnnexinV-FITC/PI double-labeled technique. The protein expression of p53 and bcl-2 of EC-109 cells was detected by FCM. **Results** Vitexin had markedly inhibitory effect on the growth and proliferation of EC-109 cells, and the inhibitory rate increased with the concentration increasing and reaction time prolonging. Vitexin could induce the apoptosis of EC-109 cells and the protein expression of p53 was up-regulated while that of bcl-2 was down-regulated. **Conclusion** Vitexin could induce the apoptosis of EC-109 cells by up-regulating the expression of p53 and down-regulating that of bcl-2.

Key words: *Trollius chinensis* Bunge; vitexin; human esophageal cancer EC-109 cells; apoptosis; p53; bcl-2

金莲花是毛茛科植物金莲花 *Trollius chinensis* Bunge 的干燥花及花蕾, 在临床上主要用于抗菌、抗病毒。现代药理研究表明, 金莲花总黄酮及其单体牡荆苷具有抗氧化^[1-2]、抗肿瘤等作用^[3-5]。牡荆苷在金莲花中的量较高^[6], 与抗肿瘤作用较强的芹菜素^[7]具有相似的化学结构, 然而金莲花中牡荆苷抗肿瘤作用的研究鲜见报道。本研究观察牡荆苷对

人食管癌 EC-109 细胞的作用, 探讨其作用机制, 为确定金莲花总黄酮抗肿瘤药效物质基础提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

牡荆苷, 自制, 经中国科学院核磁共振所化学组进行结构鉴定, 质量分数为 98.8%。RPMI 1640

收稿日期: 2011-11-25

基金项目: 张家口市科技局资助项目 (11110015D)

作者简介: 朱登祥 (1966—), 男, 副教授, 研究方向为中药有效成分提取及其抗肿瘤研究。Tel: 18932637829 E-mail: zhudx1966@163.com

*通讯作者 王书华 Tel: (0313)4029558 E-mail: shwang1988@yahoo.com.cn

培养基, 美国 Gibico 公司; 胎牛血清 (FCS), 杭州四季青生物工程材料有限公司; CCK-8 试剂盒, 上海玛芝佳公司; 细胞凋亡 Hoechst33258 染色试剂盒, 晶美生物工程有限公司; Annexin V-FITC/PI 试剂盒, 碧云天试剂公司; 胰蛋白酶, 华北制药集团; 二甲基亚砜 (DMSO), 北京化学试剂厂; 琼脂糖、100 bp DNA Marker, 北京六和同公司; FITC-p53、PE-bcl-2, 美国 BD 公司。

1.2 仪器

Spectra Max 全自动荧光酶标仪, 美国分子仪器有限公司; BioSpectrumAC System 凝胶成像系统, 美国 UVP 公司; FACS-Aria 流式细胞仪, 美国 BD 公司; ECLIPSE Ti-U 荧光倒置显微镜, 日本 Nikon 公司; 3319 型 CO₂ 培养箱, 美国 Forma 公司; ME235S 电子天平, 德国赛多利斯公司; SW-CJ-2FD 型超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; TDL-40B 型离心机, 上海安亭科学仪器厂; DK-8A 型电热恒温水浴槽, 上海精宏实验设备有限公司; DH 4000A 型电热恒温箱, 天津市泰斯特仪器有限公司。

1.3 细胞

人食管癌 EC-109 细胞株, 购自北京肿瘤研究所遗传室, 经河北北方学院实验中心细胞室传代冻存。

2 方法

2.1 细胞培养

RPMI 1640 培养液用前加入 10% FCS、庆大霉素 100 U/mL, 碳酸氢钠调 pH 值至 7.2~7.4, 加消化液 (0.25% 胰酶-0.02% EDTA 1:3) 混合。人食管癌 EC-109 细胞用含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基于 37 °C 饱和湿度、5% CO₂ 条件下培养, 取对数生长期细胞进行实验。

2.2 CCK-8 法检测细胞增殖

实验设空白对照组、溶剂 (0.2% DMSO) 对照组、牡荆苷 (溶于 0.2% DMSO) 5 个浓度组, 每组均设 5 个复孔。对数生长期的 EC-109 细胞消化、计数, 取 100 μ L 单细胞悬液加入 96 孔板, 每孔细胞 1×10^5 个。细胞贴壁后吸去上清, 牡荆苷各浓度组加入 100 μ L 培养液稀释后的牡荆苷, 使其终浓度分别为 5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 μ mol/L, 空白对照组加等量培养液, 溶剂对照组加入等量 DMSO (终体积分数 0.2%) 培养液。分别培养 24、48、72 h, 每孔加入 CCK-8 液 10 μ L, 继续培养 4 h, 采用全自动酶联免疫检测仪在 450 nm 波长处测定吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖抑制率。

抑制率 = $1 - \text{药物组 } A \text{ 值} / \text{空白对照组 } A \text{ 值}$

2.3 Hoechst33258 染色法观察 EC-109 细胞形态

实验设对照组, 牡荆苷 5.0、20.0、80.0 μ mol/L 组。EC-109 细胞以每孔 900 μ L (含 5×10^3 细胞) 接种于 24 孔培养板培养 6 h, 细胞贴壁后 3 个给药组加入不同浓度的牡荆苷 100 μ L, 使其终浓度分别为 5.0、20.0、80.0 μ mol/L, 对照组加等量空白培养液。培养 48 h 后 Hoechst33258 染色, 紫外光激发波长 340 nm, 荧光显微镜 ($\times 400$) 下观察、拍照。

2.4 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 条带

实验分组同“2.3”项。EC-109 细胞以 1×10^6 /mL 接种于 20 mL 培养瓶中, 每瓶 2.5 mL, 待细胞贴壁后, 3 个给药组加入牡荆苷, 使其终浓度分别为 5.0、20.0、80.0 μ mol/L, 对照组加等量空白培养液。培养 48 h 后收集细胞, 用 PBS 洗 3 次, 此后细胞移入 1.5 mL EP 管中, 加裂解液 615 μ L, 70 °C 水浴振荡 15 min, 操作重复 2 次。离心取上清液 500 μ L, 加无水乙醇 1 000 μ L 使 DNA 析出, 离心后用 TE 缓冲液 (pH 7.4) 20 μ L 溶解 DNA, 按照试剂盒操作说明进行琼脂糖凝胶电泳, 采用凝胶成像系统观察并拍照。

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

分组、给药与细胞培养时间同“2.4”项, 每组设 5 个复孔。各组收集 EC-109 细胞 1×10^6 个, 离心, 弃上清, 用冷 PBS 洗涤 2 次, 按照 Annexin V-FITC/PI 染色试剂盒说明操作, 分别加入缓冲液 185 μ L、Annexin V 10 μ L、PI 5 μ L, 混匀, 避光 20 min, 离心后弃去上清液, 再加入冷 PBS 洗涤 1 次, 用 PBS 400 μ L 悬浮细胞, 流式细胞仪检测细胞早期凋亡率。

2.6 流式细胞仪检测 p53 和 bcl-2 蛋白表达

EC-109 细胞按 1×10^6 /mL 接种于 20 mL 培养瓶, 待细胞贴壁后, 3 个给药组加入牡荆苷, 使其终浓度分别为 5.0、20.0、80.0 μ mol/L, 设空白对照组, 每组 5 个复孔。培养 48 h 后收集细胞, 分别加入 FITC-p53 及 PE-bcl-2 各 20 μ L, 培养 20 min, 流式细胞仪检测。

2.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 16.0 统计软件进行方差分析。

3 结果

3.1 对 EC-109 细胞生长的抑制作用

结果显示, DMSO 对细胞活性及增殖几乎没有

影响,最大抑制率 $<1\%$,故此实验不再设溶剂对照组。在同一检测时相,牡荆苷对 EC-109 细胞生长的抑制率随药物浓度的增加而增大 ($P<0.05$);在不同检测时相,同一浓度的牡荆苷对 EC-109 细胞生长的抑制率随时间的延长而增大 ($P<0.05$)。牡荆苷 $80.0\ \mu\text{mol/L}$ ($35.6\ \text{mg/L}$) 作用 EC-109 细胞 24 h,对 EC-109 细胞生长的抑制率为 20.08% ;而前期研究显示金莲花总黄酮 ($793.0\ \text{mg/L}$) 作用 EC-109 细胞 24 h,对 EC-109 细胞生长的抑制率为 28.00% ^[4],提示牡荆苷可能是金莲花总黄酮抑制 EC-109 细胞生长的药效物质之一,且其抗肿瘤活性优于金莲花总黄酮。结果见表 1。

3.2 对 EC-109 细胞形态的影响

对照组 EC-109 细胞核大小较均一,呈圆形或椭圆形,染色质分布均匀,在紫外线下呈均一的蓝色荧光,可见处于分裂期的细胞。经牡荆苷处理的 EC-109 细胞出现典型的凋亡形态学改变,即胞体缩小、核染色质染色明亮,核浓缩、分叶、边集、核染色质碎裂,且随着药物浓度增大,凋亡细胞数逐渐增多。结果见图 1。

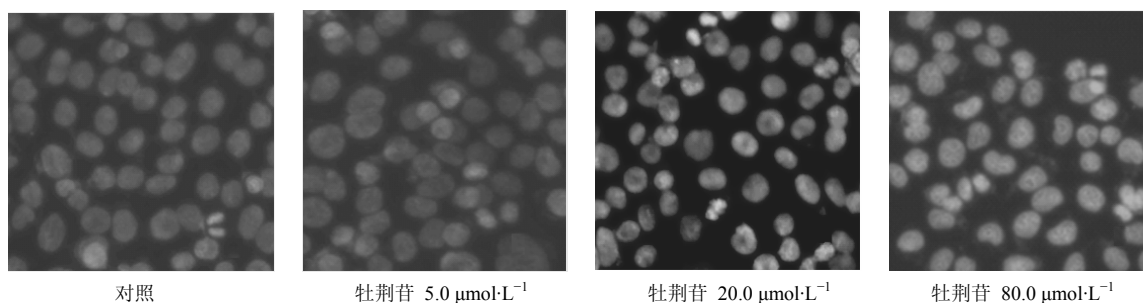


图 1 牡荆苷对 EC-109 细胞形态的影响

Fig. 1 Effects of vitexin on morphological changes of cell nucleus of EC-109 cells

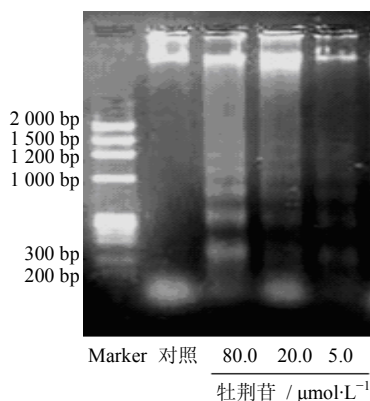


图 2 牡荆苷对 EC-109 细胞 DNA 条带的影响

Fig. 2 Effects of vitexin at different concentration on DNA bands of EC-109 cells

3.3 对 EC-109 细胞 DNA 条带的影响

对照组 EC-109 细胞未出现梯形 DNA 条带;与对照组相比,牡荆苷 $80.0\ \mu\text{mol/L}$ 组 EC-109 细胞出现明显的 DNA 条带,牡荆苷 20.0 、 $5.0\ \mu\text{mol/L}$ 组的 DNA 条带虽较模糊、变暗,但与对照组相比也有较明显的差异。结果见图 2。

表 1 牡荆苷对 EC-109 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effects of vitexin on proliferation of EC-109 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	C/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	抑制率 / %		
		24 h	48 h	72 h
牡荆苷	5.0	$2.24 \pm 0.11^{*\Delta}$	$4.82 \pm 0.33^{*\Delta}$	$8.28 \pm 0.36^{*\Delta}$
	10.0	$3.67 \pm 0.26^{*\Delta}$	$8.06 \pm 0.32^{*\Delta}$	$14.65 \pm 0.56^{*\Delta}$
	20.0	$8.35 \pm 0.44^{*\Delta}$	$15.02 \pm 0.30^{*\Delta}$	$26.70 \pm 0.52^{*\Delta}$
	40.0	$13.43 \pm 0.51^{*\Delta}$	$21.90 \pm 0.60^{*\Delta}$	$33.04 \pm 0.63^{*\Delta}$
	80.0	$20.08 \pm 1.16^{*\Delta}$	$31.60 \pm 1.45^{*\Delta}$	$38.30 \pm 1.24^{*\Delta}$
DMSO	—	0.66 ± 0.23	0.58 ± 0.15	0.49 ± 0.44

同一时相不同浓度组间比较: $^{*}P<0.05$

不同时相同一浓度间比较: $^{\Delta}P<0.05$

$^{*}P<0.05$ vs vitexin groups at different concentration, same phase

$^{\Delta}P<0.05$ vs different phases of same concentration of vitexin

3.4 对 EC-109 细胞凋亡的影响

AnnexinV-FITC/PI 双标法检测结果显示,不同浓度的牡荆苷均可诱导 EC-109 细胞凋亡,凋亡率随牡荆苷浓度的升高而增大,与对照组比较差异显著 ($P<0.05$),且牡荆苷不同浓度组间 EC-109 细胞凋亡率比较也有显著差异 ($P<0.05$)。结果见表 2 和图 3。

3.5 对 EC-109 细胞 p53 和 bcl-2 蛋白表达的影响

与对照组相比,不同浓度的牡荆苷作用于 EC-109 细胞 48 h 后,EC-109 细胞 p53 蛋白表达显著增强,bcl-2 蛋白表达明显降低,并呈浓度相关性 ($P<0.05$)。结果见表 3。

表 2 牡荆苷对 EC-109 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 2 Effects of vitexin on apoptosis of EC-109 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组 别	C / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞凋亡率 / %
对照	—	0.64 ± 0.12
牡荆苷	5.0	1.68 ± 0.15* [▲]
	20.0	3.83 ± 0.22* [▲]
	80.0	12.38 ± 0.42* [▲]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 不同浓度牡荆苷比较: [▲] $P < 0.05$, 下表同
* $P < 0.05$ vs control group; [▲] $P < 0.05$ vs vitexin groups at different concentration, same as below

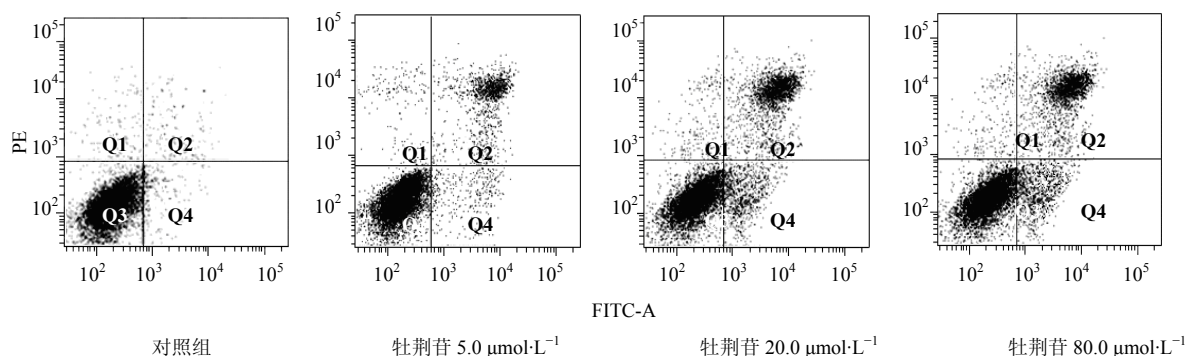


图 3 牡荆苷对 EC-109 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effects of vitexin on apoptosis of EC-109 cells

表 3 牡荆苷对 EC-109 细胞 p53 和 bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 3 Effects of vitexin at different concentration on p53 and bcl-2 protein expression of EC-109 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组 别	C / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	p53 / %	bcl-2 / %
对照	—	1.74 ± 0.11	3.61 ± 0.13
牡荆苷	5.0	2.95 ± 0.14* [▲]	3.48 ± 0.07* [▲]
	20.0	7.23 ± 0.05* [▲]	1.79 ± 0.06* [▲]
	80.0	14.06 ± 0.07* [▲]	0.89 ± 0.09* [▲]

48 h 与 72 h 比较, 抑制率均有显著差异, 提示研究 EC-109 细胞早期凋亡, 在药物作用细胞 48 h 后的检测结果较好, 所以此后牡荆苷对细胞凋亡影响的实验选择药物作用时间为 48 h。

在细胞早期凋亡发生时, 细胞核内 NDA 可控制降解, 形成不同长度的核酸片段, 这与细胞坏死、DNA 降解不同, 所以 DNA 条带的出现提示细胞凋亡发生。本实验结果还表明, 牡荆苷具有诱导 EC-109 细胞凋亡的作用且与浓度相关, 但流式细胞仪检测显示, 随着凋亡细胞数量的增多, 死亡细胞数目也同步增加, 这种现象有待进一步研究。

细胞内与凋亡有关的基因分为诱导凋亡基因和抑制凋亡基因 2 类, 药物诱导肿瘤细胞凋亡和坏死

4 讨论

本实验结果表明, 牡荆苷浓度为 5.0、20.0、80.0 $\mu\text{mol/L}$, 明显抑制人食管癌 EC-109 细胞生长, 药物浓度越高、培养时间越长, 抑制率越高。从时效走势看, 在同一检测时相, 高浓度组给药初期作用即明显, 且随给药浓度的增加, 抑制率增大, 但未呈现浓度-效应的线性正比关系, 提示理想的药物浓度为 5.0~80.0 $\mu\text{mol/L}$ 。同一浓度的牡荆苷在不同检测时相对 EC-109 细胞抑制率由小到大依次为 24 h < 48 h < 72 h, 也未呈现线性正比关系, 48 h 与 24 h、

受一个或多个基因的调控。本实验结果表明, 牡荆苷可上调抑癌基因 p53、下调促癌基因 bcl-2 蛋白的表达, 从而诱导 EC-109 细胞凋亡。

综上, 牡荆苷对人食管癌 EC-109 细胞生长具有抑制作用, 诱导其出现早期凋亡。牡荆苷作为新型抗食管癌候选药物, 具有深入研究的价值和较好的开发前景。

参考文献

- [1] 颜 娟, 胡海娜, 田嘉铭, 等. 金莲花中总黄酮抗氧化作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2): 386-387.
- [2] 杨国栋, 饶 娜, 田嘉铭, 等. 金莲花中荜苳苔和牡荆苷的抗氧化作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(9): 2172-2173.
- [3] 孙 黎, 罗 强, 张 力, 等. 金莲花黄酮对 A549 细胞生长及凋亡的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(1): 82-83.
- [4] 孙 黎, 程建贞, 罗 强, 等. 金莲花黄酮对 K562、Hele、Ec-109、NC1-H446 细胞增殖的影响 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2009, 44(5): 981-983.
- [5] 孙 黎, 刘 芳, 刘 华, 等. 金莲花黄酮对人体乳腺癌细胞作用的研究 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(5): 1098-1099.
- [6] 曲彩虹, 颜 娟, 田嘉铭, 等. HPLC 测定金莲花中三种黄酮苷的含量 [J]. 中成药, 2010, 32(3): 162-164.
- [7] 常 徽. 植物黄酮抗肿瘤效应的结构-构效关系及 ROS 相关作用机制研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2008.