

大果沙棘果渣黄酮对HT29肿瘤细胞活性抑制及DNA损伤作用研究

焦岩^{1,2}, 常影¹, 王振宇^{3,*}

(1. 齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006;

2. 齐齐哈尔大学农产品加工黑龙江省普通高校重点实验室, 黑龙江齐齐哈尔 161006;

3. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要: 目的: 研究大果沙棘果渣黄酮(Seabuckthorn residue flavonoids, SRF) 对人结肠癌 HT29 细胞生长抑制和 DNA 损伤的作用。方法: 利用 MTT 比色法测定大果沙棘果渣黄酮对 HT29 结肠癌细胞生长的抑制率; 用单细胞凝胶电泳技术(SCGE) 观察大果沙棘果渣黄酮对 HT29 细胞 DNA 的损伤情况。结果: 大果沙棘果渣黄酮在浓度 20~200mg/L 时对结肠癌细胞有明显的抑制作用, 作用 72h 最大抑制率为 81.28%; 单细胞凝胶电泳显示大果沙棘果渣黄酮作用细胞 48h 后可见明显的彗星状拖尾。结论: 大果沙棘果渣黄酮可抑制 HT29 细胞的生长, 对其 DNA 有致损效应。

关键词: 大果沙棘果渣, 黄酮, HT29 肿瘤细胞, DNA 损伤

Inhibition and DNA damage of seabuckthorn residue flavonoids on colon HT29 cancer cells

JIAO Yan^{1,2}, CHANG Ying¹, WANG Zhen-yu^{3,*}

(1. College of Food and Biological Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China;

2. Key Laboratory of Processing Agricultural Products of Heilongjiang Province, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China;

3. Forestry Department, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: Objective: To study the inhibition and DNA damage effects of seabuckthorn residue flavonoids (SRF) on colon HT29 cancer cells. Methods: The inhibition of SRF on human colon HT29 cancer cells was measured with MTT colorimetric method. The DNA damage of HT29 cell was studied in vitro by single cell gel electrophoresis (SCGE). Result: With SRF 20~200mg/L for 72h, the cell inhibition was significant, the optimized inhibition rate was 81.28%. SCGE showed comet-like tails. Conclusion: SRF can inhibit the growth of HT29 cancer cells and damage cells DNA. Key words: seabuckthorn residue; flavonoids; HT29 cancer cells; DNA damage

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)04-0362-03

沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 为胡颓子科 (Elaeagnaceae) 酸刺属的灌木或小乔木, 主要分布在欧亚大陆东经 2°~115°, 北纬 27°~68.5° 的广大地区, 以前苏联、蒙古、中国分布最多^[1], 我国主要分布在西北、华北、东北及西南等十多个省区, 主要有中国沙棘亚种(通常称为中国沙棘), 还有少量的柳叶沙棘、西藏沙棘、云南沙棘、中亚沙棘等亚种。大果沙棘是从沙棘栽培品种筛选培育出来的果^[2]。沙棘中含有丰富的黄酮类物质, 研究表明, 沙棘黄酮具有清除自由基、抗衰老、抗肿瘤、增强免疫、抗疲劳、改善心脑血管等多项生理功能^[3-5]。其中对大果沙棘黄酮对

HT29 肿瘤细胞生长抑制和 DNA 损伤的研究还未见报道。本文研究经大孔树脂纯化后的大果沙棘果渣总黄酮对 HT29 肿瘤细胞生长抑制和 DNA 损伤的作用, 为沙棘黄酮抗肿瘤作用研究和保健食品及抗癌辅助药品的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大果沙棘果渣 黑龙江省孙吴县林业局提供; 大果沙棘总黄酮 首先用超临界 CO₂ 萃取设备将大果沙棘果渣脱脂, 然后用 75% 的乙醇做溶剂, 将脱脂后的大果沙棘果渣粉以 10:1 液固比进行 3 次超声波提取, 将提取得到的黄酮液经离心、过滤、浓缩、除去乙醇得到 SRF 溶液, 将 SRF 溶液用 X-5 大孔树脂层析柱进行纯化, 纯化后真空冻干得橙黄色固体粉末, 最后用 0.5% DMSO 溶解, DMEM 培养基配制成总黄酮含量分别为 20~200mg/L 浓度的 SRF 溶液, 进行

收稿日期: 2009-12-25 * 通讯联系人

作者简介: 焦岩 (1981-), 男, 博士, 研究方向: 生物活性物质与功能食品。

基金项目: 黑龙江省重点科技攻关项目 (GB06B404-1)。

细胞实验;人结肠癌细胞株 HT29 哈尔滨市肿瘤医院;DMEM 培养基、FBS 胎牛血清 美国 Hyclone 公司;低熔点、正常熔点琼脂糖、溴化乙锭 上海生工;Triton X-100、MTT sigma 公司;其它生化试剂 均为国产分析纯。

CO₂ 培养箱 Thermo Forma 公司;倒置显微镜、荧光显微镜 Nikon 公司;酶标仪 Biocell 公司;100mL 培养瓶 美国 Promega 公司;6 孔培养板 德国 Greiner;SW-CJ-IF 超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司;DYY-12 型电泳仪 北京六一仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 MTT 比色法测定人结肠癌细胞株的生长抑制率^[6] 将 HT29 肿瘤细胞以 10⁵ 个/mL 浓度接种于 96 孔板,每孔 100μL,24h 后更换培养液,实验组分别加入 20~100μg/mL 浓度的 SRF 溶液,空白对照只加培养液,每组设 6 个复孔,将培养板置 37℃、5% CO₂、饱和湿度下分别培养 24、48、72h,将培养后的 96 孔板每孔加入 5g/L 的 MTT 10μL,继续放入培养箱孵育 4h 后,小心吸出上清,加入 DMSO 150μL/孔,微量振荡器振荡 5min 后,在全自动酶标仪读取实验波长 570nm,参考波长 620nm 的吸光值(OD),计算细胞生长抑制率。

抑制率(%) = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 对照组 OD 值 × 100%

1.2.2 普通倒置显微镜观察 将处于对数生长期的 HT29 肿瘤细胞以 10⁵ 个/mL 浓度接种于 6 孔板,每孔 1.0mL,24h 后更换培养液,实验组分别加入 50、100、200μg/mL 浓度的 SRF 溶液,空白对照只加培养液,将培养板置 37℃、5% CO₂、饱和湿度下分别培养 48h,后于倒置显微镜下观察、拍照。

1.2.3 单细胞凝胶电泳实验^[6]

1.2.3.1 制片 取 0.5% 常温熔点琼脂糖溶液,加热熔化后,冷却至 45℃。取 100μL 滴于洁净的载玻片上,立即盖上盖玻片,使琼脂糖均匀地敷在载玻片上,置 4℃ 下 10min,待琼脂糖冷却变硬,为第一层。取下盖玻片,分别取经空白对照和经 SRF 处理后的细胞 10⁴ 个,与 75μL 0.5% 的琼脂糖溶液在 37℃ 下混匀,迅速滴在第一层琼脂糖上,加上盖玻片,4℃、10min 使琼脂糖硬化。

1.2.3.2 电泳 取下盖玻片,将玻片立即浸入预冷的裂解液(2.5mol/L NaCl, 100mmol/L Na₂EDTA, 10mmol/L Tris, 1% Triton X-100 及 10% DMSO 组成,临用前配制, pH 为 10) 中,4℃ 下放置 2h。取出玻片,用蒸馏水洗两次后,放置在水平电泳槽中,加入电泳液(1mmol/L Na₂EDTA, 300mmol/L NaOH),液面高出玻片 0.25cm,静置 20min,待 DNA 解螺旋后,以 25V 200mA 电泳 30min。

1.2.3.3 中和与染色 电泳后取出玻片,置于 pH7.5、0.4mol/L Tris 溶液中洗涤 3 次,每次 5min。再以 25mg/mL 的溴化乙锭(EB) 75μL 进行染色,加上盖玻片,尽快观察结果。以上步骤均在暗室中进行,以防止光线对 DNA 的损伤。

1.2.3.4 结果观察 观察 EB 染色需用荧光显微镜,激发波长 510~560nm,滤过波长 690nm,以 400 倍拍摄单细胞影像。

拖尾细胞率: 每张片子计数 100 个细胞,记录拖尾细胞数。

拖尾细胞率(%) = 拖尾细胞数 / 100 × 100%

拖尾细胞尾长: CASP 软件测量拖尾细胞的总长和头长。

拖尾细胞尾长(μm) = 总长 - 头长

1.2.4 数据分析 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析和 t 检验。对每一浓度 100 个细胞 DNA 的迁移率进行分析。彗星图像由 casp 软件分析细胞 DNA 拖尾率和尾长。

2 结果与分析

2.1 SRF 对 HT29 肿瘤细胞生长抑制作用

由表 1 可见,经 20~200μg/mL SRF 分别处理 HT29 肿瘤细胞后,随着 SRF 浓度的升高,对肿瘤细胞抑制率逐渐增强。浓度为 200μg/mL SRF 处理 72h 后,抑制率最高可达 81.28%,呈现明显的剂量效应关系;在 SRF 作用细胞 24、48、72h 后,细胞生长明显受到抑制,且随着作用时间的延长,增殖抑制率逐步增高,呈现时间依赖性抑制。

表 1 SRF 对 HT29 肿瘤细胞增殖抑制作用

浓度 (μg/mL)	不同时间抑制率(%)		
	24	48	72
20	4.23 ± 0.52	10.28 ± 1.84	19.25 ± 2.22
40	8.64 ± 1.86	16.45 ± 2.59	33.52 ± 3.68
60	13.86 ± 2.14	27.75 ± 4.25	44.21 ± 3.14
80	20.39 ± 3.58	44.31 ± 2.15	56.83 ± 3.86
100	26.32 ± 4.04	54.23 ± 4.25	70.21 ± 4.23
120	29.41 ± 3.89	62.14 ± 5.78	75.56 ± 4.51
160	34.26 ± 4.82	68.12 ± 3.25	78.28 ± 5.21
180	40.31 ± 4.08	73.28 ± 4.20	80.42 ± 3.17
200	44.26 ± 4.01	76.61 ± 6.14	81.28 ± 4.36

2.2 SRF 对 HT29 肿瘤细胞形态的影响

HT29 肿瘤细胞经不同浓度的 SRF 作用 48h 后,倒置显微镜下观察细胞,由图 1(B、C、D) 中可以看出,和对照组相比(图 1A),细胞数目逐渐减少,细胞间隙增加,细胞变圆、细胞缩小,细胞周围有数个圆形小体(凋亡小体) 围绕,部分细胞从瓶壁脱落悬浮于培养液中,随着提取物浓度增大和时间延长,这种变化越来越明显;而对照组(图 1A) 中细胞呈梭形、多角形,生长旺盛,贴壁良好。

2.3 SRF 对 HT29 肿瘤细胞凝胶电泳结果的影响

HT29 肿瘤细胞经 50、100、200μg/mL SRF 作用 48h 后,可见明显的彗星状拖尾,如图 2(F、G、H),而对照组呈现明亮的圆点,几乎看不到拖尾现象(图 2E),说明 SRF 能够损伤 HT29 细胞的 DNA。从表 2 可以看出,和对照组比较,SRF 组细胞的 DNA 损伤细胞率和细胞拖尾长度随着药物浓度的升高而增大,且都具有极显著差异(P < 0.01)。说明不同浓度的 SRF 对 HT29 肿瘤细胞 DNA 有不同程度的损伤,200μg/mL SRF 损伤细胞最多,细胞拖尾长度最长。

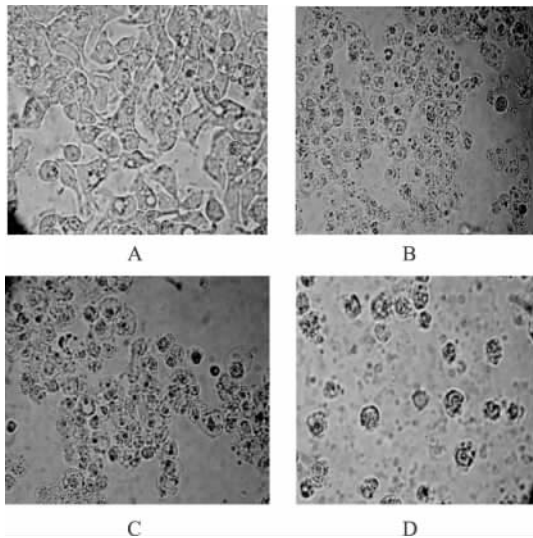


图1 不同浓度的SRF对HT29肿瘤细胞形态的影响

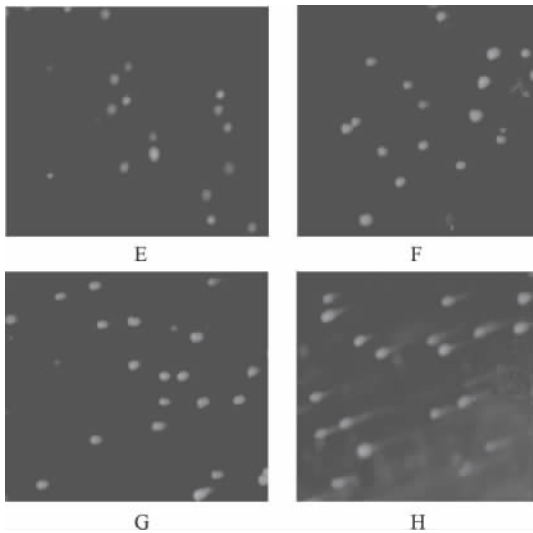


图2 不同浓度SRF对HT29肿瘤细胞凝胶电泳结果的影响

表2 单细胞凝胶电泳检测SRF对HT29肿瘤细胞的影响($\bar{x} \pm s, n=100$)

组别 ($\mu\text{g/mL}$)	DNA 损伤细胞率 (%)	细胞拖尾长度 (μm)
对照组	8.24 ± 1.45	6.2 ± 1.6
50	$48.64 \pm 4.82^{**}$	$35.3 \pm 5.5^{**}$
100	$87.68 \pm 6.74^{**}$	$63.5 \pm 8.2^{**}$
200	$96.41 \pm 9.81^{**}$	$101.2 \pm 11.8^{**}$

注: **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$, 与对照组相比。

3 讨论

沙棘黄酮类化合物具有抗肿瘤功能国内外已有相关报道^[7-9]。本研究首先考察了不同浓度大果沙棘果渣黄酮在不同时间内对HT29肿瘤细胞生长抑制作用,MTT法检测到细胞的凋亡;同时,观察到了细胞形态上的改变(图1):细胞变圆、细胞缩小,细胞周围有数个圆形小体等凋亡的现象,说明了不同浓度SRF对HT29肿瘤细胞具有抑制生长和促进凋亡作用。

单细胞凝胶电泳技术(SCGE)又称彗星实验(comet assay),是近年来发展起来的一种检测单个哺乳动物细胞DNA断裂的方法,具有所需样品量少、快速、灵敏、简便、适用范围广等优点,近年来广泛用于检测人和动物各种细胞DNA损伤情况^[10],其原理是动物细胞核DNA损伤的严重程度与尾部的长度和荧光强度成正比。因此,测定DNA迁移部分的光密度或迁移长度可定量单个细胞的损伤程度^[11]。从图2可以看出,未经SRF处理的HT29细胞几乎没有或极少产生彗星状拖尾,随着药物浓度的增加,出现彗尾的细胞数越来越多,细胞彗星状拖尾变长。说明了SRF可能是通过对肿瘤细胞的DNA损伤来抑制肿瘤细胞生长和促使细胞凋亡的。

本研究应用MTT法检测到SRF对HT29细胞生长有抑制作用,且呈明显的量效关系;单细胞凝胶电泳检测到SRF作用于HT29细胞可引起细胞核DNA的损伤,这对SRF抗肿瘤作用和作用机制的研究有重要意义,但细胞凋亡机理和凋亡途径尚不清楚,需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 王大明,房用,刘德玺.大果沙棘及其开发前景[J].经济林研究,2000,18(2):56-57.
- [2] 周张章,周才琼,阚健全.沙棘的化学成分及保健作用研究进展[J].粮食与食品工业,2005(2):15-18.
- [3] 李焱,张慧颖,王鹏祖.沙棘营养成分及作用的研究进展[J].中国卫生保健,2007,3(21):73-75.
- [4] Sezai Ercisli, Emine Orhan, Ozlem Ozdemir, et al. The genotypic effects on the chemical composition and antioxidant activity of sea buckthorn berries grown in Turkey [J]. Scientia Horticulturae, 2007, 115: 27-33.
- [5] 田涛.沙棘药理作用[J].西南国防医学,2006,16(1):115-117.
- [6] 谢红,陈立军,姚丽,等.单细胞电泳观察双氢青蒿素对K562细胞DNA的损伤作用[J].武警医学院学报,2008,17(1):4-6.
- [7] 章平.沙棘籽渣黄酮类化合物诱导人肿瘤细胞凋亡及其机理的研究[D].华东师范大学,2004.
- [8] 罗昕.中药沙棘提取液对血液肿瘤细胞杀伤作用研究[J].中国实用医药,2008,20(3):97-98.
- [9] Bao-song Teng, Yan-Hua Lua, Zheng-Tao Wang, et al. In vitro anti-tumor activity of isorhamnetin isolated from *Hippophae rhamnoides* L. against BEL-7402 cells [J]. Journal of Pharmacological Research, 2006, 54: 186-194.
- [10] 陈建明,张国伟,李耀平,等.单细胞凝胶电泳技术检测甲醛对人肝癌细胞HepG2的遗传毒性效应[J].杭州师范大学学报,2009,8(3):199-201.
- [11] 潘洪志,万丽葵,李辉,等.番茄红素对镉中毒大鼠肝细胞DNA损伤的影响[J].营养学报,2006,28(1):83-84.