

白藜芦醇对结肠癌 HT-29 细胞的增殖抑制作用研究

叶晓瑞¹ 金黑鹰²

(1.南京中医药大学第一临床学院,江苏南京 210023; 2.南京中医药大学第三附属医院,江苏南京 210001)

摘要 目的:观察白藜芦醇对体外培养的人结肠癌 HT-29 细胞的增殖抑制作用。方法:使用不同浓度白藜芦醇处理体外培养结肠癌细胞系 HT-29 后,运用细胞计数试剂盒检测法(CCK-8)检测白藜芦醇对 HT-29 细胞生长的影响,流式细胞术(FCM)检测白藜芦醇对 HT-29 细胞凋亡率的影响。结果:CCK-8 法检测显示白藜芦醇对 HT-29 细胞的增殖有明显抑制作用,且在一定浓度范围内呈剂量依赖性($P<0.01$)。FCM 法检测结果提示,与阴性对照组比较,不同浓度的白藜芦醇可以提高 HT-29 细胞凋亡率($P<0.05$)。结论:白藜芦醇对人结肠癌 HT-29 细胞的增殖有抑制作用,且能诱导 HT-29 细胞凋亡,是一种高效低毒的药物,其具体机制有待进一步探讨。

关键词 白藜芦醇 HT-29 细胞 细胞凋亡 细胞增殖 结肠癌细胞株 实验研究

中图分类号 R735.35 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2017)01-0076-03

白藜芦醇(resveratrol, Res)是一种重要的植物抗毒素,存在于多种天然植物中,具有抗突变、抗氧化等多种生物活性^[1]。近年来,国内外许多研究发现白藜芦醇对多种癌细胞具有明显的抑制作用^[2],并且具有低毒、无诱变等优势。本实验拟探讨白藜芦醇对人结肠癌细胞株 HT-29 的体外增殖抑制作用,为白藜芦醇防治结直肠癌提供实验依据。

1 实验材料

结肠癌细胞系 HT-29 购自美国 ATCC 公司;牛血清白蛋白(BSA)、培养基 RPMI1640 均购自 GIBCO 公司;细胞计数试剂盒(cell counting Kit-8, CCK-8)购自上海日本同仁研究所;Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒购自凯基生物公司;白藜芦醇购自美国 Sigma 公司;流式细胞仪购自 BD 公司;CO₂ 培养箱购自 THERMO 公司;低速离心机购自 Eppendorf 公司;倒置显微镜购自 OLYMPUS 公司。

2 实验方法

2.1 细胞培养 人结肠癌细胞株 HT-29 细胞培养于含 10%胎牛血清的 1640 培养基中,在 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中常规培养,用 0.25%胰酶-EDTA

消化传代。当细胞生长状态稳定,呈对数生长期时用于实验。

2.2 CCK-8 法检测 HT-29 细胞增殖反应 将对数生长期的细胞消化计数,以 5000 个/孔的密度将细胞铺入 96 孔板中,培养 24h,换无血清培养液,加 1%BSA 替代血清,试验组按照不同浓度梯度 125、62.5、31.25、15.625、7.8125 μg/mL 加入白藜芦醇,阳性对照组加入等体积 10 μg/mL 的 5-FU,空白组加入等体积培养基,药物作用 24h、48h 和 72h 后进行 CCK-8 检测,弃去培养液,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,继续培养 4h,吸去上清液后置于空气振荡器上振荡 10min,以酶标仪测定 450nm 下的吸光值(D450nm),根据吸光值算出抑制率。

细胞增殖抑制率 (%) = $(1 - \text{Res 作用细胞 D450nm} / \text{对照细胞 D450nm}) \times 100\%$

2.3 流式细胞仪检测白藜芦醇对 HT-29 凋亡的干预 将对数生长期的细胞消化计数,以 50000 个/孔的密度将细胞铺入 6 孔板中,24h 待细胞贴壁变形后,试验组分别以 IC₅₀ 剂量、2 倍 IC₅₀ 剂量、4 倍 IC₅₀ 剂量加入白藜芦醇,阳性对照组加入等体积 10 μg/mL 的 5-FU,空白组加入等体积的培养基。药物作用 48h

基金项目:南京市卫生局杰出青年项目(JQX13011)

后,用无 EDTA 胰酶消化收集细胞于各流式管中, PBS 洗涤 2 次, 1000r/min 离心 5min 收集细胞, 弃上清, 每管加入 500 μ L Binding Buffer 重悬细胞, 然后加入 5 μ L Annexin V-FITC 染料混匀后, 再加入 5 μ L PI 染料混匀, 室温避光反应 20min, 最后用流式细胞仪检测。上述试验至少重复 3 次, 并取平均数进行统计分析。

2.4 统计学方法 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件分析, 组间数据比较采用独立样本 t 检验, 多组间的数据比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 白藜芦醇对人结肠癌 HT-29 细胞生长的影响

经不同浓度白藜芦醇 (125、62.5、31.25、15.625、7.8125 μ g/mL) 处理 HT-29 细胞后, HT-29 细胞增殖受到显著抑制, 这种抑制作用在一定浓度范围内呈剂量依赖性。62.5 μ g/mL 白藜芦醇作用 72h 的抑制率高达 80.41%, 而相应阳性对照组的抑制率则为 73.26%, 经计算白藜芦醇抑制 HT-29 细胞增殖 24h 的 IC_{50} 为 25.43 μ g/mL, 48h 为 27.01 μ g/mL, 72h 为 23.14 μ g/mL。见表 1。

3.2 白藜芦醇对人结肠癌 HT-29 细胞周期及凋亡率的影响 药物处理 48h 后, 不同浓度的白藜芦醇 (25、50、100 μ g/mL) 可以明显促进人结肠癌 HT-29 细胞凋亡, 且总的凋亡率呈剂量依赖性, 与阴性对照组比较, 细胞凋亡率差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果见表 2 和图 1。

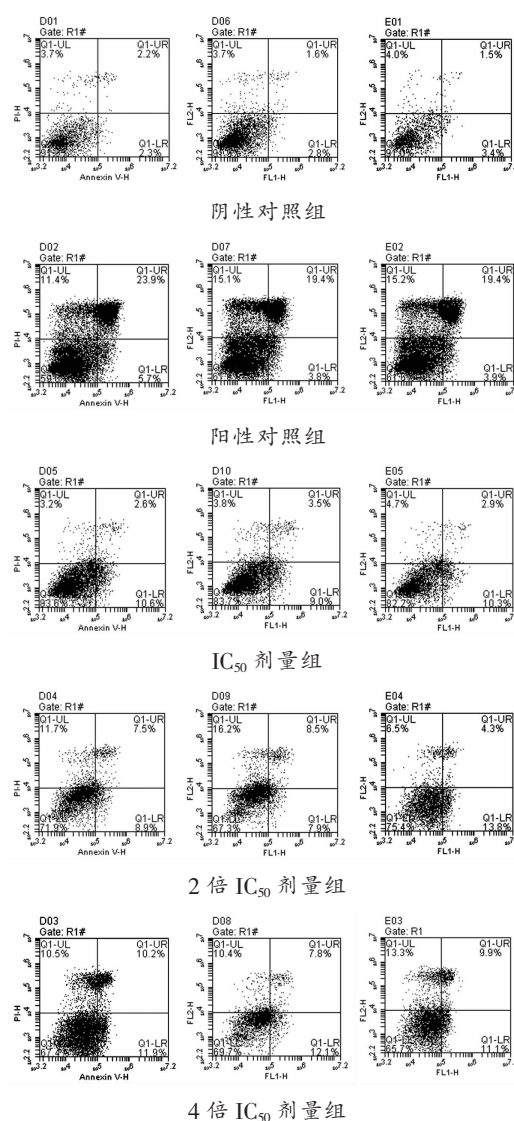


图 1 各组 HT-29 细胞凋亡流式结果

表 1 受试药物作用不同时间对 HT-29 细胞的增殖抑制作用 (24h)

药物名称	给药剂量 (μ g/mL)	作用 24h		作用 48h		作用 72h	
		OD 值 (Mean $\pm$ SD)	抑制率 (%)	OD 值 (Mean $\pm$ SD)	抑制率 (%)	OD 值 (Mean $\pm$ SD)	抑制率 (%)
空白	-	1.5353 $\pm$ 0.0196	-	1.6480 $\pm$ 0.0226	-	1.4687 $\pm$ 0.0607	-
5-FU	10	0.6933 $\pm$ 0.0237**	54.84	0.5320 $\pm$ 0.0267**	67.72	0.3927 $\pm$ 0.0146**	73.26
白藜芦醇	125	0.3773 $\pm$ 0.0096**	73.43	0.4083 $\pm$ 0.0120**	75.22	0.3420 $\pm$ 0.0155**	76.71
白藜芦醇	62.5	0.3243 $\pm$ 0.0114**	78.88	0.3847 $\pm$ 0.0414**	76.66	0.2917 $\pm$ 0.0061**	80.41
白藜芦醇	31.25	0.5203 $\pm$ 0.0171**	66.11	0.6777 $\pm$ 0.0345**	58.88	0.5183 $\pm$ 0.0208**	64.71
白藜芦醇	15.625	1.0280 $\pm$ 0.0505**	33.04	1.0740 $\pm$ 0.0614**	34.85	0.9580 $\pm$ 0.0360**	34.77
白藜芦醇	7.8125	1.1167 $\pm$ 0.0093**	27.27	1.2073 $\pm$ 0.0420**	26.74	1.0637 $\pm$ 0.0670**	27.58

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 2 白藜芦醇对 HT-29 细胞凋亡率的影响

组别	早期凋亡率 (%)	总凋亡率 (%)
空白组	2.83 $\pm$ 0.55	4.60 $\pm$ 0.26
IC_{50} 组 (25 μ g/mL)	9.97 $\pm$ 0.85**	12.97 $\pm$ 0.40**
2 倍 IC_{50} 组 (50 μ g/mL)	10.20 $\pm$ 3.16*	16.97 $\pm$ 0.98**
4 倍 IC_{50} 组 (100 μ g/mL)	11.70 $\pm$ 0.53**	21.00 $\pm$ 1.10**
5-FU 组 (10 μ g/mL)	4.47 $\pm$ 1.07**	25.37 $\pm$ 3.67**

注: 与阴性对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

4 讨论

结直肠癌是目前影响人类健康的最重要的肿瘤之一, 其发病率和死亡率占有肿瘤第 3 位, 且其发病率呈逐渐上升趋势。尽管结直肠癌防治研究近年来取得了长足的进步, 但是其总体 5 年生存率仍然徘徊在 50%~60% 之间, 仍然有 30%~40% 的患者死于复发和转移^[3-4], 治疗效果仍然不十分理想。因此开发新的低毒高效抗结肠癌的药物, 逐渐成为结肠癌防治研究的重点之一。

白藜芦醇是一种天然的含有芪类结构的多酚化合物, 广泛存在于虎杖、葡萄、桑葚、花生等 70 多种天然植物中, 尤以新鲜葡萄皮中含量最高。其具有广

泛的生理和药理活性,如抗炎、抗菌、抗癌、抗动脉粥样硬化、抑制血小板聚集、降血脂及免疫调节等^[5-6]。早在1997年已有研究表明,白藜芦醇对癌症的起始、促进、发展3个阶段均有明显的抑制作用^[7]。近年来,随着研究的不断深入,发现其对乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌等多种恶性肿瘤细胞均具有显著的抑制作用^[8-9]。但目前关于白藜芦醇对结肠癌的作用研究仍较少,且具体分子机制仍未完全清楚。

本研究采用CCK-8法检测不同浓度和时间白藜芦醇对人结肠癌HT-29细胞增殖的影响,实验结果表明白藜芦醇在7.8125~125 μ g/mL对人结肠癌HT-29细胞的增殖具有显著的抑制作用,且在7.8125~62.5 μ g/mL浓度范围内呈剂量依赖性,而125 μ g/mL白藜芦醇组的癌细胞增殖抑制率并没有随其浓度增加而增加。之前已有体外研究表明,白藜芦醇能剂量依赖性抑制包括HT-29、HCT116、Caco-2、SW480等多种人结肠癌细胞增殖^[10-11]。这显然和我们的实验结果有一些出入,笔者发现他们实验用的白藜芦醇最大浓度为200 μ mol/L,而我们使用的最大剂量为125 μ g/mL,约相当于548 μ mol/L。因此笔者猜想可能存在一个峰值浓度,较低浓度范围的白藜芦醇呈剂量依赖性抑制结肠癌细胞增殖,而高于峰值浓度的白藜芦醇增殖抑制作用反而下降,具体的峰值浓度及其相关机制需进一步的实验证实。众多研究已表明,白藜芦醇能通过多种途径诱导细胞凋亡而发挥抗结直肠癌功效,如上调促凋亡基因Bax表达、线粒体依赖途径等^[12-13],且促凋亡作用均呈现出剂量依赖性。同样,我们的实验研究进一步证实了这一点,流式细胞分析结果表明白藜芦醇能诱导人结肠癌HT-29细胞凋亡,且总的凋亡率随着白藜芦醇浓度的增加而增加。

综上所述,白藜芦醇可以显著抑制结肠癌HT-29细胞的增殖,并诱导其发生凋亡,但对其抑制结直肠癌增殖和诱导凋亡的确切机制了解甚少,且多数研究还停留在体外细胞实验和体内动物实验阶段,缺乏相关的临床研究。因此,对其相关机制的探讨以及相关临床疗效有待更深入的研究,使其有望成为新型的高效、低毒抗结肠癌药物。

参考文献

- [1] UNGVARI Z,SONNTAG W E,DE CABO R,et al. Mitochondrial protection by resveratrol[J].Exerc Sport Sci Rev,2011,39(3):128.
- [2] ALUYEN J K,TONG Q N,TRAN T,et al.Resveratrol:

potential as anticancer agent[J].J Diet Suppl,2012,9(1):45.

- [3] STRACCI F,ZORZI M,GRAZZINI G.Colorectal Cancer Screening:Tests,Strategies,and Perspectives [J].Frontiers in Public Health,2014,2:210.
- [4] HWANG M,JAYAKRISHNAN T T,GREEN D E,et al. Systematic review of outcomes of patients undergoing resection for colorectal liver metastases in the setting of extra hepatic disease[J].Eur J Cancer,2014,50(10):1747.
- [5] BHULLAR K S,HUBBARD B P.Lifespan and healthspan extension by resveratrol[J].Biochim Biophys Acta,2015,1852(6):1209.
- [6] SUMMERLIN N,SOO E,THAKUR S,et al.Resveratrol nanoformulations:challenges and opportunities[J].Int J Pharm,2015,479(2):282.
- [7] JANG M,CAI L,UDEANI GO,et al.Cancer chemopreventive activity of resveratrol,a natural product derived from grapes[J].Science,1997,275(5297):218.
- [8] SHETH S,JAJOO S,KAUR T,et al.Resveratrol reduces prostate cancer growth and metastasis by inhibiting the Akt/MicroRNA-21 pathway[J].PLoS ONE,2012,7(12):e51655.
- [9] IGNORELLI P,MUNOZ-OLAYA J ,GAGLIOSTRO V,et al.Dihydroceramide intracellular increase in response to resveratrol treatment mediates autophagy in gastric cancer cells[J].Cancer Lett,2009,282(2):238.
- [10] YANG J,LIU J,LYU X,et al.Resveratrol inhibits cell proliferation and up-regulates MICA/B expression in human colon cancer stem cells[J].Chinese journal of cellular and molecular immunology,2015,31(7):889.
- [11] LIU B,ZHOU Z,ZHOU W,et al.Resveratrol inhibits proliferation in human colorectal carcinoma cells by inducing G1/S-phase cell cycle arrest and apoptosis through caspase/cyclin-CDK pathways [J].Mol Med Rep,2014,10(4):1697.
- [12] MAHYAR-ROEMER M,K?HLER H,ROEMER K.Role of Bax in resveratrol-induced apoptosis of colorectal carcinoma cells[J].BMC Cancer,2002,2:27.
- [13] JUAN M E,WENZEL U,DANIEL H,et al.Resveratrol induces apoptosis through ROS-dependent mitochondria pathway in HT-29 human colorectal carcinoma cells [J].J Agric Food Chem,2008,56(12):4813.

第一作者:叶晓瑞(1989—),男,医学硕士,从事中医肛肠病学临床研究。

通讯作者:金黑鹰,博士,主任医师,博士研究生导师。jinheiying@hotmail.com

收稿日期:2016-09-11

编辑:吴宁