

原花青素对 SMMC-7721 肿瘤细胞凋亡 及其端粒酶活性的影响*

鲍永华¹, 郭永臣², 郭延君³, 吕学讷⁴, 刘英芹⁴, 赵志辉¹

(1 吉林大学 农学部 畜牧兽医学院, 吉林 长春 130062; 2 佳木斯大学 附属第一医院 核医学科, 黑龙江 佳木斯 154002;
3 长春市九十中学 西校, 吉林 长春 130012; 4 佳木斯大学 生物教研室, 黑龙江 佳木斯 154002)

[摘要] 采用 MTT 法、HE 染色、DNA 电泳、TUNEL 法和 TRAP 法(端粒重复序列扩增法), 研究原花青素对人肝癌细胞 SMMC-7721 株凋亡及端粒酶活性的影响, 探讨了其抗癌机制。结果表明, 原花青素可抑制 SMMC-7721 肿瘤细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 降低细胞端粒酶活性。说明原花青素具有诱导肿瘤细胞凋亡和降低肿瘤细胞端粒酶活性 2 种抗肿瘤作用。

[关键词] 原花青素; 肝癌细胞; 细胞凋亡; 端粒酶

[中图分类号] R73-36⁺ 1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)01-0037-04

Effect of proanthocyanidins on apoptosis and telomerase activity in SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma

BAO Yong-hua¹, GUO Yong-chen², GUO Yan-jun³, LU Xue-shen⁴, LU Ying-qin⁴, ZHAO Zhi-hui¹

(1 *Animal Husbandary and Veterinary College, Agronomy Department, Jilin University, Changchun, Jilin 130062 China;*

2 *The First Affiliated Hospital Nuclear Medicine Department, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154002 China;*

3 *The Ninetieth Secondary School in Changchun, Changchun, Jilin 130012, China;*

4 *Department of Biology, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154002, China)*

Abstract: To illustrate the effect of proanthocyanidins on apoptosis and telomerase activity in hepatocellular carcinoma as well as its antitumor mechanism, the effect of PC on SMMC-7721 cell line *in vitro* was studied by using MTT method, HE dying, DNA electrophoresis, TUNEL and TRAP (telomeric repeat amplification protocol). PC inhibited the growth of SMMC-7721 cell line by inducing apoptosis and down-regulating the telomerase activity.

Key words: proanthocyanidins; hepatocellular carcinoma; apoptosis; telomerase

从中草药等天然资源中寻找低毒、高效的抗肿瘤药物一直是抗肿瘤研究的热点。原花青素(proanthocyanidins, PC)是广泛存在于多种植物中的一种酚类聚合物, 尤以葡萄皮、葡萄籽中含量最多, 具有很强的生理活性和药理作用。原花青素的研究已有 30 余年的历史, 早期的研究主要集中于抗炎、抗氧化、抗自由基作用等方面^[1-2], 有关原花青素在抗肿瘤方面的研究资料非常有限。有研究^[3]表明, 原花青

素对乳腺癌、肺癌、原发性骨髓白血病等肿瘤细胞均有显著的抑制作用。另外, 越来越多的体内、外研究结果显示, 原花青素不仅可以抑制肿瘤细胞的生长, 诱导肿瘤细胞的凋亡, 而且可以拮抗化疗药物对正常细胞的毒性作用, 这个特性是其他抗肿瘤药物无法比拟的^[3]。因此, 原花青素在抗肿瘤方面有着巨大的潜力, 应对其进行系统研究。

本试验用 PC 处理 SMMC-7721 人肝癌细胞,

* [收稿日期] 2005-12-19

[作者简介] 鲍永华(1977-), 女, 黑龙江海伦人, 博士, 主要从事动物分子遗传学研究。E-mail: baoyonghua2005@126.com

[通讯作者] 赵志辉(1965-), 男, 河北无极人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物分子遗传学研究。

采用 MTT 法检测了 SMMC-7721 对 PC 的敏感性,探讨了 PC 对人肝癌细胞的抑制作用;并采用形态学观察、DNA 电泳、TUNEL 法、端粒酶活性测定等方法,研究了不同浓度 PC 对 SMMC-7721 细胞的形态、凋亡指数及端粒酶活性的影响,以期对 PC 临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞 SMMC-7721 株引自武汉冷藏中心;RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司;体积分数 10% 小牛血清购自杭州四季青生物工程公司;原花青素由天津市尖峰天然产物研究开发有限公司提供,属葡萄籽提取物,纯度 > 95%;四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、细胞凋亡检测试剂盒、多聚赖氨酸 DAB 显色试剂盒等均购自武汉博士得生物工程有限公司;端粒酶活性检测试剂盒购自北京华美生物工程公司。

1.2 PC 对 SMMC-7721 肿瘤细胞增殖的影响

选择对数生长期的 SMMC-7721 细胞,用 2.5 g/L 胰酶消化,用完全培养液调整细胞浓度为 1×10^5 /mL,然后接种于 96 孔板(每孔 100 μ L)培养。24 h 后弃培养液换含不同浓度(0.025, 0.25, 2.5, 25, 250 μ g/mL)原花青素的培养液 20 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 继续培养。分别于 24, 48 h 后弃上清,每孔加新配制的 5 mg/mL MTT 液 20 μ L,37 $^{\circ}$ C 继续培养。4 h 后终止培养,轻轻吸弃孔中上清,每孔加入 DM SO 150 μ L 溶解甲簪沉淀,用微型超声震荡器震荡摇匀 10 min,使紫色结晶充分溶解,在酶标仪上测定 570 nm 下的吸光值,以空白孔调零。同时设阴性对照组(加入 20 μ L 完全培养基)和空白对照孔(只加入 20 μ L 完全培养基,不含细胞),每组浓度设 3 个平行孔,结果取其平均值。

细胞增殖抑制率/% = (对照组 OD - 试验组 OD) /

(对照组 OD - 空白组 OD) \times 100%。

1.3 PC 对 SMMC-7721 肿瘤细胞凋亡的影响

待细胞爬片长满皿底 80% 以上时,加入原花青素至终浓度为 50 μ g/mL,作用 24 h 后,常规 HE 染色,镜下观察凋亡细胞。

1.4 PC 对 SMMC-7721 肿瘤细胞 DNA 的影响

收集 50 μ g/mL PC 作用 24 h 的细胞,酚、氯仿法提取 DNA 后进行 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察并拍照。

1.5 PC 对 SMMC-7721 肿瘤细胞凋亡指数的影响

操作方法严格按细胞凋亡检测试剂盒说明 (TUNEL 法) 书进行。结果判断:细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞。随机选取 10 个高倍镜视野,每个高倍镜视野的细胞应大于 1 000 个,分别计数总细胞数和凋亡细胞数,计算凋亡指数 (AI): AI = 凋亡细胞数/总细胞数。

1.6 PC 对 SMMC-7721 肿瘤细胞端粒酶活性的影响

操作方法严格按端粒酶活性检测试剂盒说明书进行,最后在波长 450 nm 处测定 OD 值。

1.7 数据处理

采用 *F* 检验及均数 *t* 检验,应用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析,计算 *P* 值。

2 结果与分析

2.1 不同浓度原花青素对 SMMC-7721 肝癌细胞增殖的影响

由表 1 可知,PC 作用 24 h,低浓度试验组 (0.025 μ g/mL) 细胞增殖抑制率与对照组相比,无显著差异;中高浓度 (0.25~250 μ g/mL) 试验组显著或极显著高于对照组;PC 作用 48 h,试验组细胞增殖抑制率均显著或极显著高于对照组。

表 1 PC 对 SMMC-7721 肝癌细胞增殖抑制率的影响

Table 1 Effect of PC on inhibition rate of the SMMC-7721 tumor cell proliferation

药物浓度/ (μ g \cdot mL $^{-1}$) Drug concentration	24 h		48 h	
	光密度值 OD value	C 增殖抑制率/% Cell proliferation inhibition rate	光密度值 OD value	C 增殖抑制率/% Cell proliferation inhibition rate
CK	0.561 \pm 0.007		0.639 \pm 0.008	
0.025	0.526 \pm 0.019	6.24	0.512 \pm 0.019	22.64*
0.25	0.477 \pm 0.029	14.97*	0.422 \pm 0.036	38.68*
2.5	0.384 \pm 0.022	31.55*	0.358 \pm 0.037	50.01**
25	0.289 \pm 0.075	48.48*	0.234 \pm 0.040	72.19**
250	0.179 \pm 0.047	68.09**	0.157 \pm 0.035	85.92**

注: * 表示与空白组比较差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示与空白组比较差异极显著 ($P < 0.01$)。下表同。

Note: * Significant difference ($P < 0.05$); ** Extremely significant difference ($P < 0.01$). It's the same in the following table

2.2 凋亡 SMMC-7721 肿瘤细胞的 HE 染色观察

镜下见凋亡细胞体积缩小, 为卵圆形, 细胞浆浓缩, 细胞核深染且染色不均, 染色质沿细胞膜聚集, 出现凋亡细胞核的特有形态, 以新月形多见, 还可见由膜包裹的染色质块形成的凋亡小体(图 1)。

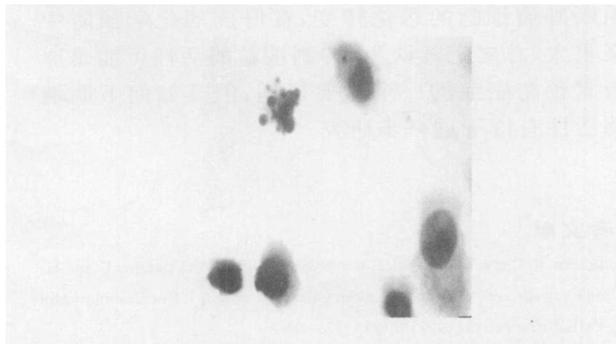


图 1 凋亡的 SMMC-7721 肿瘤细胞(HE 染色, ×400)

Fig. 1 HE staining of apoptosed SMMC-7721 tumor cells

2.3 PC 处理后 SMMC-7721 肿瘤细胞 DNA 片段化分析

结果表明, PC 处理后 SMMC-7721 肿瘤细胞 DNA 电泳未见梯形条带(图 2)。

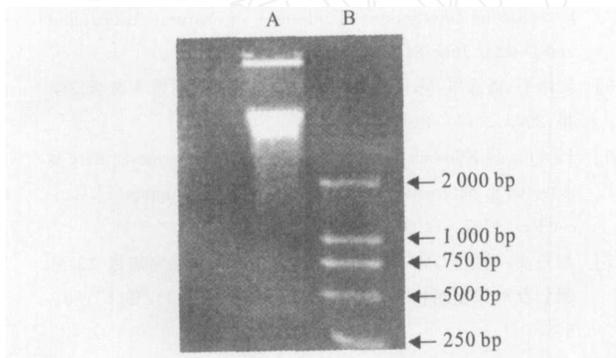


图 2 PC 处理后 SMMC-7721 肝癌细胞 DNA 电泳图
A. PC 处理组; B. DNA Marker(DL-2000)

Fig. 2 Electrophorogram of PC-treated SMMC-7721 tumor cells
A. PC-treated; B. DNA Marker

2.4 凋亡 SMMC-7721 肝癌细胞的 TUNEL 法检测结果

阴性对照组细胞核未见棕褐色颗粒(图 3 A); 阳性凋亡细胞表现为细胞核呈棕褐色、浓缩(图 3 B)。A I 计算结果显示, 空白对照组细胞的凋亡指数为 1.03 ± 0.58 ; 试验组细胞凋亡指数为 15.93 ± 1.66 , 与对照组相比, 差异极显著($P < 0.01$)。

2.5 PC 处理后 SMMC-7721 肝癌细胞的端粒酶活性

由表 2 可见, 当 PC 浓度为 2.5 和 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 作用 48 h 端粒酶活性受抑制; 当 PC 浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 作用 24 h 端粒酶活性受抑制, 且这种抑

制作用随 PC 浓度的增大和作用时间的延长而增强。

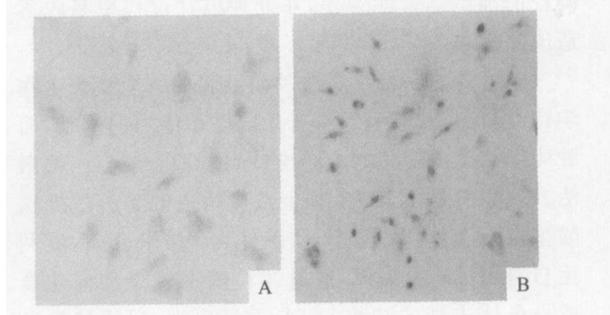


图 3 SMMC-7721 肿瘤细胞凋亡照片
A. 对照组; B. 实验组

Fig. 3 Apoptosis of SMMC-7721 tumor cells
A. Control group; B. Experiment group

表 2 不同浓度 PC 对 SMMC-7721 肝癌细胞端粒酶活性的影响 ($n=3$)

Table 2 Effect of PC of different concentrations on SMMC-7721 tumor cells ($n=3$)

PC/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	OD		
	24 h	48 h	72 h
CK	0.986 ± 0.038	0.980 ± 0.090	0.960 ± 0.012
2.5	0.977 ± 0.023	$0.915 \pm 0.024^*$	$0.628 \pm 0.016^{**}$
25	0.964 ± 0.028	$0.864 \pm 0.026^*$	$0.525 \pm 0.037^{**}$
250	$0.931 \pm 0.013^*$	$0.800 \pm 0.019^{**}$	$0.440 \pm 0.085^{**}$

3 讨论

本试验结果显示, PC 对 SMMC-7721 细胞的生长抑制作用随其浓度的增大和作用时间的延长而增强, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PC 作用 24 和 48 h, 对肝癌细胞 SMMC-7721 的生长增殖抑制率分别为 48.48%, 72.19%, 这与 Jo shi 等^[4]的研究结果不同, 作者认为细胞种类不同是造成差异的主要原因。有研究表明, 肿瘤不仅是细胞增殖和分化异常的疾病, 也是细胞凋亡异常的疾病^[5]。细胞凋亡现象的发现, 使人们认识到恶性癌变是肿瘤细胞丧失自发凋亡反应能力的结果, 通过诱发肿瘤细胞凋亡来抑制、消灭肿瘤成为肿瘤治疗的一个新策略, 加强对药物诱导肿瘤细胞凋亡的研究, 无疑会给肿瘤的预防和治疗提供新的思路和途径。本试验 TUNEL 法结果表明, 原花青素可诱导 SMMC-7721 人肝癌细胞发生凋亡, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的原花青素作用 24 h, 肝癌细胞凋亡指数为 15.93 ± 1.66 , HE 染色的结果与此相近, 但在镜下活体观察时, 作者发现出现凋亡细胞的比例远高于此。虽然形态学观察的结果不是细胞凋亡定量的可靠指标, 但作者认为实际的凋亡指数应高于 15.93 ± 1.66 。造成这种差异的原因有多种, 作者认

为采用爬片法收集细胞应该是主要原因,因为晚期凋亡的细胞贴壁能力差,在处理玻片过程中易脱落造成漏检。

永生性的获得是恶性肿瘤细胞的一个显著生物学特性,也是肿瘤组织具有无限增殖能力的基础,而肿瘤细胞无限增殖能力的维持则依赖于端粒酶的激活。端粒酶是由 RNA 和蛋白质构成的一种核糖核酸蛋白复合物,属 RNA 依赖性 DNA 聚合酶,能利用自身 RNA 为模板,通过端粒酶逆转录酶催化合成染色体末端的端粒 DNA 重复序列,以维持染色体的完整和稳定。端粒酶活性在正常人的体细胞中(生殖细胞、部分造血细胞除外)为阴性,然而在约 90% 的肿瘤细胞中均呈阳性。有研究表明,端粒酶活性对于人肿瘤细胞的发生具有极其重要的作用,在大多数实验性肿瘤的发生过程中,如果没有端粒酶的激活,仅仅通过癌基因的表达不能诱导细胞产生恶性表型^[6]。

许多合成的化合物和天然产物对肿瘤具有预防作用,一些已进入临床试验阶段,这些化合物包括多酚类化合物和黄酮类化合物^[7]。原花青素属于典型的多酚类化合物,体内、外试验证明其具有抗氧化和抑制肿瘤细胞生长的功效,但对于它能否作为端粒酶的抑制剂,国内外未见报道。本试验结果显示,肝癌细胞经原花青素作用后端粒酶活性明显下降,证实了肝癌抑制端粒酶活性治疗的有效性,为原花青素应用于临床抗肿瘤治疗提供了实验依据。

由端粒酶活性抑制引发的端粒缩短,以至肿瘤细胞凋亡需要一个过程,这期间肿瘤仍可继续生长,甚至对机体产生致命伤害,这一点可能在部分具有较长端粒的肿瘤细胞中表现得更为明显。这种“效应滞后”现象的存在,决定了在将端粒酶抑制剂应用于临床抗肿瘤治疗时,必须与其他的治疗手段相结合,以弥补这一不足。设想如果能将抗端粒酶活性疗法与诱导肿瘤细胞凋亡结合起来,既能减少抗肿瘤药物的用药剂量,又能弥补端粒酶抑制剂“效应滞后”的不足,可达到扬长避短、相互促进的效果^[8]。

Wu 等^[9]发现,黄连素诱导的白血病细胞凋亡与端粒酶活性降低有关,Akeshima 等^[10]也发现,卵巢癌细胞凋亡后,端粒酶活性显著降低,且受到 P53 基因的调控。本试验结果发现,原花青素在诱导肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡的同时,可降低肝癌细胞端

粒酶的活性,从而说明了原花青素抗肿瘤的两种作用机理。

肿瘤的发生可分为启动、促癌、演进 3 个阶段,端粒酶的激活可能发生于启动阶段的后期^[11],在此期,使用端粒酶抑制剂,干预端粒酶激活的过程,继而阻断肿瘤细胞的恶化转变,在肝癌的化学预防中意义重大。总之笔者认为,抑制端粒酶活性可能是原花青素预防癌症的一个重要机制,但其如何下调端粒酶活性有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Bagchi D. Oxygen free radical scavenging abilities of Vitamin C and E, and a grape seed Proanthocyanidin extract *in vitro* [J]. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1997, 95 (21): 179-189.
- [2] Lotito S B, Actis Goretta L. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 276 (3): 945-51.
- [3] 韩炯, 李莹, 刘新平, 等. 葡萄籽提取物原花青素诱导乳腺癌 MCF-7 细胞脱落凋亡 [J]. 中草药, 2003, 34 (8): 722-725.
- [4] Joshi S S. Cytotoxicity of a novel grape seed proanthocyanidins extract against selected human cancer cells [R]. Helsinki, Finland: Second International Conference on Natural Antioxidant and Disease June 24-27, 1998.
- [5] 周语平, 杨志军, 陈彻. 细胞凋亡与肿瘤 [J]. 甘肃中医学院学报, 2003, 20 (4): 48-51.
- [6] Hiyama E, Kddama T, Shinara K, et al. Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors [J]. Cancer Res, 1997, 57 (2): 326-331.
- [7] 黎丹戎, 侯华新, 张玮, 等. 汉黄素诱导人卵巢癌细胞 A2780 凋亡及对细胞端粒酶活性的影响 [J]. 癌症, 2003, 22 (8): 801-805.
- [8] Sallinen P, Miettinen H, Sallinen S, et al. Increased expression of telomerase RNA component is associated with increased cell proliferation in human astrocytomas [J]. Am J Pathol, 1997, 150: 1159-1164.
- [9] Wu H L, Hsu C Y, Liu W H, et al. Berberine-induced apoptosis of human HL-60 cells is associated with down-regulation of nucleophosmin/B23 and telomerase activity [J]. Int Cancer, 1999, 81: 923-929.
- [10] Akeshima R, Kigawa J, Takahashi M, et al. Telomerase activity and P53-dependent apoptosis in ovarian cancer cells [J]. Br Cancer, 2001, 84: 1551-1555.
- [11] Herbert B S, Wright A C, Passons C M, et al. Effects of chemopreventive and antitelomerase agents on the spontaneous immortalization of breast epithelial cells [J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93: 39-45.