

· 论 著 ·

葡萄皮渣中原花青素对 HL-60 细胞作用的研究*

方 莉^{1,2}, 陈绍兰², 蔡 燕¹, 蒋 红³, 黄光成², 杨明辉³, 唐 中^{1,2,△}

(1. 川北医学院附属医院检验科, 四川南充 637000; 2. 川北医学院医学检验系, 四川南充 637000;

3. 川北医学院风湿免疫研究所, 四川南充 637000)

摘要:目的 探讨原花青素(GPC)在体外对人白血病细胞(HL-60 细胞)增殖抑制及细胞凋亡的诱导作用。方法 体外培养 HL-60 细胞,分别用 100、200、300、400、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GPC 作用。MTT 法检测不同浓度 GPC 作用 24、48、72 h 后 HL-60 细胞的增殖抑制率,流式细胞术检测 24 h 后 HL-60 细胞的凋亡情况。结果 随着 GPC 药物浓度的增加,其对 HL-60 细胞的增殖抑制率逐渐增高,呈时间-剂量依赖效应关系;GPC 在低浓度(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)时可引起少量的细胞发生凋亡,随着 GPC 浓度的增加,细胞凋亡率也在不断增加,呈明显的量效关系。结论 GPC 可在体外抑制 HL-60 细胞的增殖,并诱导 HL-60 细胞凋亡。

关键词:白血病;原花青素类;HL-60 细胞;细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.19.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)19-1900-03

Study on the role of grape skin residue procyanidins on HL-60 cells*

Fang Li^{1,2}, Chen Shaolan², Cai Yan¹, Jiang Hong³, Huang Guangcheng²,
Yang Minghui³, Tang Zhong^{1,2,△}

(1. Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China;

2. Department of Laboratory Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China;

3. Institute of Rheumatology and Immunology, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

Abstract: **Objective** To probe the effects of procyanidins inducing inhibition of proliferation and apoptosis in human leukemia cells (HL-60 cells) *in vitro*. **Methods** Human leukemia HL-60 cells were respectively cultured with different concentrations of procyanidins (100, 200, 300, 400 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). We detected the proliferation of HL-60 cells after 24, 48 and 72 h by MTT methods. HL-60 cells were cultured with different concentrations of procyanidins for 24 h, and their apoptosis were determined through flow cytometry. **Results** The growth inhibitory rate of HL-60 cells increased along with the concentration of procyanidins and it had the concentration and time dependent; Treated by 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ procyanidins for 24 h could induce apoptosis of HL-60 cells, the apoptosis rate of HL-60 cells increased along with the concentration of procyanidins in an apparent concentration-effect dependant manner.

Conclusion Procyanidins can inhibit proliferation and induce apoptosis of HL-60 cells *in vitro*.**Key words:** leukemia; proanthocyanidins; HL-60 cells; apoptosis

白血病(leukemia)是临床上常见的血液系统恶性肿瘤,是严重危害人类健康的恶性疾病之一,近年发病率呈上升趋势,在儿童中尤为明显。有关白血病的治疗和发病机制研究一直很受关注。随着骨髓移植、靶向性治疗等手段应用,已使白血病的缓解率大大提高,部分病例甚至可治愈。但目前白血病的治疗仍以化疗为主,而化疗药物的非特异细胞毒性,在杀伤白血病细胞的同时,不加选择地对正常造血细胞和组织细胞造成损害,引起严重的不良反应。近年来,国内外学者对葡萄原花青素(grape procyanidins, GPC)进行了大量实验,研究表明 GPC 在预防和治疗人类疾病方面有独特的作用^[1-2]。本研究以 GPC 对人白血病细胞(HL-60 细胞)的凋亡作用进行研究,以期 GPC 治疗白血病提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂 RPMI 1640 培养基购于 Gibco 公司;小牛血清购于杭州四季青公司;荧光素标记的连接素 V (Annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC) 和碘化吡啶(propidium iodide, PI) 双染凋亡检测试剂盒购于嘉美生物有限责任公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购于成都科龙化工试剂厂;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑盐

(MTT)为 ATD 公司产品;提取 GPC 的酿酒葡萄皮渣来源于河北省昌黎县凤凰酒庄,采用 60%乙醇溶剂浸提法提取,紫外分光光度计测定,pH 值示差法计算提取率,用 DA-201 型大孔吸附树脂纯化;其余试剂均为国产分析纯;HL-60 细胞系本院风湿免疫研究所传代保存。

1.2 主要仪器 二氧化碳培养箱(Heal Force HF90)、生物安全柜(Heal Force HFSAFE-120)、电子分析天平(AW320)、酶标仪(Benchmark BIO-RAD)、流式细胞仪(BECKMAN XL-MCL)、冷冻离心机(Ilettich UNIVERSAC 16R)、低速离心机、荧光倒置显微镜(OLYMPUS CK40)、水平摇床、加样枪、96 孔板、12 孔板、一次性滤器。

1.3 试剂配制

1.3.1 GPC 的配制 准确称取 GPC 500 mg 于烧杯中,加入 10 mL 二甲基亚砜(DMSO)稀释,配制成浓度为 50 mg/mL 的 GPC 母液,0.22 μm 滤膜过滤后,分装入干净玻璃瓶中,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

1.3.2 MTT 准确称取 MTT 250 mg 于烧杯中,加入 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS 50 mL 稀释,配制成浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液,0.22 μm 滤膜过滤后,分装入干净玻璃瓶中,4 $^{\circ}\text{C}$ 避

表 1 GPC 对 HL-60 细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	24 h		48 h		72 h	
	OD 值	抑制率(%)	OD 值	抑制率(%)	OD 值	抑制率(%)
实验对照组	0.822±0.12	—	1.196±0.14	—	1.18±0.17	—
实验组($\mu\text{g}/\text{mL}$)						
100	0.843±0.14	-2.51	1.12±0.06	-2.20	0.37±0.08	-15.94
200	0.63±0.09	23.57	0.91±0.07	16.79	1.10±0.11	7.21
300	0.52±0.09	37.21	0.71±0.05	35.62	0.88±0.11	25.34
400	0.46±0.09	43.90	0.44±0.10	59.65	0.63±0.09	46.73
500	0.09±0.05	89.22	0.09±0.03	91.96	0.03±0.04	98.63

—:表示此项无数据。

光保存。

1.4 细胞培养

1.4.1 复苏细胞 调节水浴箱温度为 41℃,并提前在试管内放置 10 倍培养液,使培养液温度与室温一致。1 min 内融化细胞,移取至试管内,1 000 r/min,离心 5 min,弃上清液。

1.4.2 细胞培养 加入含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基,转入培养瓶中,并加入双抗(100 IU/mL 青霉素,100 IU/mL 链霉素)。37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养,每隔 24 h 观察细胞,如有抱团现象则换液,2~3 d,传代 1 次。

1.5 MTT 法检测细胞增殖抑制率 收集对数生长期 HL-60 细胞,加入含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基,调整细胞浓度为 1×10⁵/mL 左右。种 3 个 96 孔板,每板设 1 个实验对照组和 5 个药物浓度实验组,以及 1 个空白对照组和 5 个药物浓度空白对照组,每组设 6 个复孔;其中实验对照组和 5 个药物浓度实验组每孔加入 100 μL 细胞浓度为 1×10⁵/mL 的培养液,空白对照组和 5 个药物浓度空白对照组每孔加入含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基 100 μL 。置 37℃,5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h,倒置显微镜下观察细胞。实验对照组和空白对照组每孔加入含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基 100 μL ;5 个药物浓度实验组和 5 个药物浓度空白对照组分别加入 GPC 药物浓度为 200、400、600、800、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的培养基 100 μL ,使孔内药物浓度分别为 100、200、300、400、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。置 37℃,5%CO₂ 培养箱孵育 24 h,倒置显微镜下观察。

每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL,即 0.5% MTT),继续培养 4 h。1 000 r/min,离心 5 min,小心吸掉上清液,每孔加入 150 μL DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 490 nm 处(630 nm 校准)测量各孔的吸光值(OD)。增殖抑制率=1-(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)×100%。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡及周期 收集对数生长期 HL-60 细胞,调整细胞浓度至 1×10⁵/mL,接种于两个 12 孔板,每孔 500 μL ,置 37℃,5%CO₂ 培养箱孵育 24 h。实验对照组加入含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基 500 μL ,5 个药物实验组分别加入 GPC 药物浓度为 200、400、600、800、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的培养基 500 μL ,每组设 4 个复孔,使孔内药物浓度分别为 100、200、300、400、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$,置 37℃,5%CO₂ 培养箱孵育。将各孔内细胞转入流式管中,1 000 r/min,离心 5 min,弃培养基。用 4℃ 预冷的 PBS 重悬细胞 1 次,1 000 r/

min,离心 5 min,弃上清。用去离子水将 10×Binding Buffer 稀释成 1×Binding Buffer,每管加入 300 μL 1×Binding Buffer 悬浮细胞。Annexin V-FITC 标记:加入 5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀,避光,室温孵育 15 min。PI 标记:加入 5 μL PI 后轻轻混匀,避光,室温孵育 5 min。补加 300 μL 1×Binding Buffer。用流式细胞仪检测正常细胞、凋亡细胞和坏死细胞。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 法检测 HL-60 细胞增殖抑制率结果 不同药物浓度的实验组处理 24、48、72 h 后细胞增殖抑制率见表 1;随着 GPC 药物浓度的增加,其对 HL-60 细胞的增殖抑制率逐渐增高,呈时间-剂量依赖效应关系,见图 1。

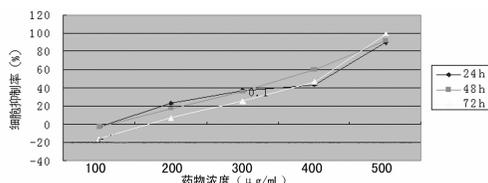


图 1 GPC 对 HL-60 细胞增殖率的影响

2.2 HL-60 细胞凋亡的检测 HL-60 细胞经不同浓度的 GPC 处理 24 h,用流式细胞仪检测 GPC 诱导的 HL-60 细胞凋亡;结果显示,GPC 在低浓度(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)时可引起少量的细胞发生凋亡。随着浓度的增加,GPC 的细胞凋亡率也在不断增加,呈明显的量效关系。见图 2。

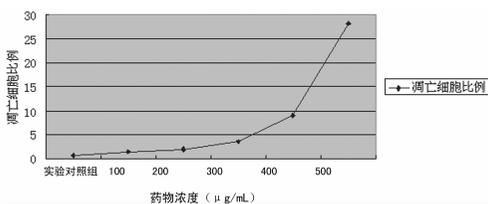


图 2 GPC 对 HL-60 细胞凋亡的影响

3 讨 论

目前白血病的治疗仍以化疗为主,引起严重的不良反应,因此寻找新的不良反应小的抗白血病药物非常重要。从天然植物中寻找毒性低、疗效高,与其他化疗药物配伍使用的抗癌活性成分是抗肿瘤药物的重要来源之一。这些抗癌活性成分可提高抗肿瘤药物的抗肿瘤活性或降低其毒性,且其本身也具有一定的抗肿瘤活性,具有广阔的应用前景。

GPC 由不同数目的黄烷-3-醇或黄烷-3,4-二醇聚合而成。GPC 广泛存在于葡萄、山楂、松树、银杏、花生、番荔枝、野草莓、可可豆等植物中,尤其以葡萄皮、籽中含量最多。近年来,国内外许多学者的研究表明,GPC 在预防和治疗人类疾病方面有独特的作用。Eng 等^[3]从红葡萄酒中提取出 GPC 的 B 二聚体,发现这种成分可以使实验鼠的乳腺癌瘤变小。用红葡萄酒中提取的 GPC 的 B 二聚体对乳腺癌不如人工合成药物的效果明显。Shih 等^[4]研究发现,GPC 不仅可以抑制胃腺癌细胞的增殖,而且可以诱导其凋亡。Chen 等^[5]发现桑葚中的花青素矢车菊-3-葡萄糖甙和矢车菊-3-芸香甙对人类肺癌细胞 A549 的转移和入侵具有阻止作用。Feng 等^[6]发现黑树梅中的花青素矢车菊-3-芸香甙对癌细胞 HL-60 有杀灭作用而对正常细胞无影响。杀灭作用机制为矢车菊-3-芸香甙刺激 JNK 激酶,由 JNK 激酶蛋白调节癌细胞的凋亡程序而杀死癌细胞。国内学者研究发现,GPC 具有抗氧化、抗自由基损伤、抗突变、抗肿瘤、抗病毒、抗炎、抗衰老、保护心血管系统等多种生理、药理功效^[7]。多项实验研究表明,GPC 体外对前列腺癌细胞^[8-9],人肝癌细胞^[10-11],肺癌细胞^[12]等都有明显的增殖抑制和诱导肿瘤细胞凋亡的作用,张海晖等^[13]同时研究了莲房 GPC 对肺癌 LETP-2 细胞、胃腺癌 SGC-7901 细胞、黑色素瘤 A375 细胞的作用,得出莲房 GPC 体外对此 3 种细胞均有显著性抑制作用。池余刚等^[14]还通过 PCR 检测发现 GPC 可以明显降低 survivin 的 mRNA 和蛋白水平的表达,可能通过降低 survivin 的表达,在体外抑制 SKOV3 细胞增殖,并促进其凋亡。高爱霞等^[15]的体内研究表明 GPC 能明显抑制肺癌细胞 NCI-H460 细胞的增殖、诱导细胞凋亡和抑制裸鼠肿瘤的生长。虽然现在国内外在 GPC 对白血病细胞,特别是 HL-60 细胞的作用研究还很少,但从上述研究中可以看出,GPC 在对肿瘤细胞的增殖抑制和促凋亡作用是非常明显的,这也为作者提供了大量的参考资料和实验依据。

本研究采用 MTT 法检测细胞增殖抑制率,通过实验结果可以看出,不同浓度 GPC 对 HL-60 细胞的生长具有明显的抑制作用,随着 GPC 浓度的增加和作用时间的延长,其对 HL-60 细胞增殖抑制率逐渐升高,GPC 可显著抑制 HL-60 细胞体外生长,并呈时间-剂量效应;同时 Annexin V-FITC 和 PI 双染,采用流式细胞术检测以不同浓度 GPC 作用 24 h 后 HL-60 细胞的凋亡,发现 GPC 具有诱导 HL-60 细胞凋亡的能力,并且随着 GPC 药物浓度的增加,HL-60 细胞发生凋亡的比例也随之增加。

综上所述,葡萄皮渣中提取的 GPC 在体外可明显抑制增殖 HL-60 细胞的增殖并诱导其凋亡,且抑制细胞增殖作用呈时间-剂量依赖效应。GPC 为白血病治疗的新药物选择提供了新的参考,但尚需进一步研究其抗肿瘤的机制及其在体内的详细药理过程。

参考文献:

[1] 陈美,梁统,周克元.原花青素的抗炎作用及其作用机制探讨[J].国际检验医学杂志,2008,29(12):1080-1082,1087.

- [2] Actis-Goretta L,Romanczyk LJ,Rodriguez CA,et al. Cytotoxic effects of digalloyl dimer procyanidins in human Cancer cell lines[J]. J Nutr Biochem,2008,19(12):797-808.
- [3] Eng ET,Ye J,Williams D,et al. Suppression of estrogen biosynthesis by procyanidin dimers in red wine and grape seeds[J]. Cancer Res,2003,63(23):8516-8522.
- [4] Shih PH,Yeh CT,Yen GC. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells[J]. Food Chem Toxicol,2005,43(10):1557-1566.
- [5] Chen PN,Chu SC,Chiou HL,et al. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung Cancer cell line[J]. Cancer Lett,2006,235(2):248-259.
- [6] Feng RT,Ni HM,Wang SY,et al. Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant,selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress[J]. J Biol Chem,2007,282(18):13468-13476.
- [7] 周素娟.葡萄籽提取物原花青素的研究概况及其在我国保健食品中的应用[J].中国食品卫生杂志,2007,19(3):284-286.
- [8] 孙怡,商学军.原花青素诱导前列腺癌 PC-3 细胞凋亡的机制研究[J].安徽中医学院学报,2009,28(1):47-49.
- [9] Kampa M,Theodoropoulou K,Mavromati F,et al. Novel oligomeric proanthocyanidin derivatives interact with membrane androgen sites and induce regression of hormone-independent prostate Cancer[J]. J Pharmacol Exp Ther,2011,337(1):24-32.
- [10] 梁慧敏,时小燕,梁志刚,等.原花青素对人肝癌细胞 SMMC-7721 的诱导分化作用[J].中国医疗前沿,2010,5(21):13-14,20.
- [11] 杜宏,张娜,高霞,等.莲房原花青素对人肝癌细胞 HepG2 生长及凋亡的作用[J].实用医学杂志,2008,24(6):891-893.
- [12] 卢婷婷,梁统.原花青素对 IL-1 β 诱导的 A549 细胞环氧化酶-2 启动子活性的影响[J].郑州牧业工程高等专科学校学报,2010,30(2):1-7.
- [13] 张海晖,段玉清,陈乾,等.莲房原花青素体外抗肿瘤作用研究[J].食品科技,2007,32(10):251-254.
- [14] 池余刚,钟玲,伍霞,等.原花青素对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖和凋亡的影响[J].第三军医大学学报,2008,30(23):2203-2206.
- [15] 高爱霞,罗巨东,吴庆婷,等.花青素对肺癌细胞 NCI-H460 的体内外抗肿瘤效应[J].实验动物与比较医学,2008,28(2):85-89.

(收稿日期:2011-09-20 修回日期:2012-01-29)