

松树皮中原花青素对荷 S₁₈₀ 肉瘤小鼠抗肿瘤作用的研究

张秀娟^{1,2}, 张鑫^{1,2}, 季宇彬^{1,2} (1. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心, 生物安全性评价研究所, 哈尔滨 150076; 2. 国家教育部抗肿瘤天然药物教育部工程研究中心, 哈尔滨 150076)

摘要: 目的 研究松树皮原花青素小鼠体内抗肿瘤作用。方法 采用小鼠移植性肿瘤模型考察松树皮原花青素对荷瘤小鼠 S₁₈₀ 肉瘤抑制作用; 流式细胞仪检测原花青素对肿瘤细胞周期的影响; ATPase 试剂盒检测原花青素对肿瘤细胞中钙泵活性的影响; 激光共聚焦显微镜观察原花青素对肿瘤细胞中钙离子含量的影响。结果 松树皮原花青素抑制荷瘤小鼠 S₁₈₀ 肉瘤的生长; 抑制肿瘤细胞中钙泵活性, 升高钙离子的含量并使肿瘤细胞 G₀/G₁ 期比例降低, S 期细胞的比例增加。结论 松树皮原花青素体内对 S₁₈₀ 肿瘤细胞具有一定的抗肿瘤作用。

关键词: 松树皮原花青素; 细胞周期; 钙离子; 抗肿瘤作用

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)13-1304-03

原花青素(procyanidins)是植物中广泛存在的一大类多酚化合物的总称, 具有广泛的生物学活性, 特别是其强大的抗氧化和清除自由基作用引起了广泛关注^[1-3]。松树在我国生长广泛, 其松树皮提取物的主要成分为原花青素, 国内对松树皮提取物的研究较少, 为了充分开发和利用其药用价值, 本研究对从松树皮中提取的原花青素体内抗肿瘤活性进行了初步探讨。

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂

松树皮原花青素(徐州弘康科技有限公司, 原花青素的含量 $\geq 95\%$, 批号: 20071219); 环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号 080623210); ATP 酶测定试剂盒、考马斯亮兰测定试剂盒(南京建成生物工程研究所); DMSO(北京化工厂); 胎牛血清、碘化丙啶(PI)均购自 Hyclone 公司。

1.2 瘤株

S₁₈₀ 肉瘤、昆明种小鼠, ♀♂兼用, 均由哈尔滨医科大学附属肿瘤医院动物养殖中心提供, 实验动物合格证号: 医动字第 09-3-3 号。

1.3 仪器

激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司); 可见紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司); 流式细胞仪(美国 Beckman-Coulter 公司)。

2 方法

2.1 原花青素对荷瘤小鼠 S₁₈₀ 肉瘤的抑制作用

无菌抽取传代后 8 d 的荷瘤小鼠的腹水, 用无菌生理盐水稀释, 调整细胞浓度至 5.0×10^7 个 $\cdot$ mL⁻¹, 取 0.2 mL 接种于小鼠右前肢腋下, 24 h

后随机分为 5 组, 每组 10 只, 分别为对照组(生理盐水灌胃给药)、环磷酰胺组(20 mg $\cdot$ kg⁻¹)、松树皮原花青素低剂量组(30 mg $\cdot$ kg⁻¹)、中剂量组(60 mg $\cdot$ kg⁻¹)、高剂量组(120 mg $\cdot$ kg⁻¹), 灌胃给药, 每日 1 次, 连续 10 d。第 11 天处死动物, 剥取瘤块称重, 计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率}(\%) = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{实验组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

2.2 原花青素对荷瘤小鼠 S₁₈₀ 肿瘤细胞周期的影响

2.2.1 实验分组 将接种小鼠随机分为 4 组, 每组 10 只。分别为原花青素高、中、低剂量组、对照组。

2.2.2 样品制备 单位体积细胞悬液(约 10^6 个细胞)加 9 倍量体积预冷的 70%乙醇于 -20℃ 固定细胞, 至少 12 h。离心, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤除去乙醇。

2.2.3 染色 离心后, 细胞重悬于 1 mL PI 染液(生理盐水 32.4 mL; PI 2.5 mg; RNaseA 0.5 mg; TritonX-100 0.25 mL; 枸橼酸钠 0.5 mg; 加蒸馏水至 50 mL, 避光, 4℃ 保存), 37℃ 染色 30 min。用 488 nm 激光激发后, 流式细胞仪检测红色荧光。

2.3 原花青素对荷瘤小鼠 S₁₈₀ 肿瘤细胞 Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 含量的影响

按“2.2.1”项下方法分组, 无菌条件抽取肿瘤细胞 1 mL, 用预冷的生理盐水洗涤, 2 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心, 制成 10%细胞悬液, 匀浆器匀浆以破碎细胞。其余按试剂盒说明书进行。ATP 酶活力按下式计算: ATP 酶活力=[(测定管 OD 值-对照管 OD 值)/标准管 OD 值-空白管 OD 值]×标

作者简介: 张秀娟, 女, 博士, 教授 Tel: 13115317578 E-mail: zxj1717@yahoo.com.cn

准管浓度 $\times 6 \times 7.8 \div$ 匀浆蛋白浓度。

2.4 原花青素对荷瘤小鼠 S₁₈₀ 肿瘤细胞钙离子浓度的影响

按“2.2.1”项下方法分组，无菌条件下抽取荷瘤小鼠腹水 1 mL，加 1 mL PBS 混匀，1 000 r·min⁻¹，离心 10 min，去上清，重复 2 遍，用 PBS 调浓度为 1×10^6 个·L⁻¹，加入浓度为 $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Fluo-3/AM 荧光探针 200 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温育 30 min；将孔中的盖玻片取出，盖在载玻片上，避光，激光共聚焦显微镜扫描观察。激发波长 488 nm，发射波长 540~570 nm^[4]。

2.5 数据处理

所有数据用 SPSS 15.0 进行方差分析。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 原花青素对荷瘤小鼠 S₁₈₀ 肉瘤的抑制作用

原花青素随剂量的增加对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤的抑制作用增强，结果见表 1。

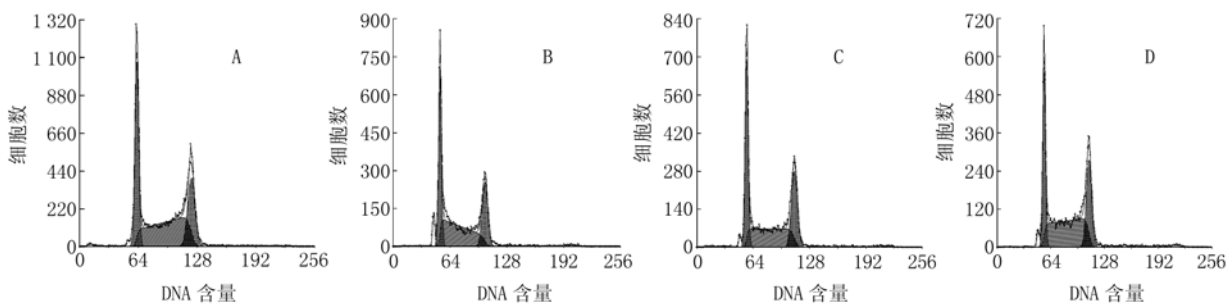


图 1 原花青素对荷瘤小鼠 S₁₈₀ 细胞周期的影响
A—对照组；B—原花青素高剂量组；C—原花青素中剂量组；D—原花青素低剂量组

Fig 1 Procyanidins on tumor-bearing mice S₁₈₀ cell cycle

A—control; B—procyanidins high dosage group; C—procyanidins middle dosage group; D—procyanidins low dosage group

3.3 原花青素对荷瘤小鼠 S₁₈₀ 肿瘤细胞 Ca²⁺，Mg²⁺-ATPase 含量的影响

原花青素对 S₁₈₀ 肿瘤细胞钙泵活性的实验结果见表 2。实验结果表明，与对照组相比，原花青素高、中、低剂量组都能明显降低 S₁₈₀ 肿瘤细胞膜上的钙泵活性具有显著性作用($P < 0.05$)，中、高剂量组对降低 S₁₈₀ 肿瘤细胞膜上的钙泵活性更加显著($P < 0.01$)。

3.4 原花青素对荷瘤小鼠 S₁₈₀ 肿瘤细胞钙离子浓度的影响

原花青素可升高 S₁₈₀ 肿瘤细胞内钙离子的浓度，并且随着原花青素剂量的增加，细胞内钙离子浓度增幅也相应地增大，且与对照组相比具有

表 1 原花青素对荷瘤小鼠 S₁₈₀ 肿瘤重量的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$ ， $n=10$)

Tab 1 The effect of procyanidins on tumor weight of mice S₁₈₀ ($\bar{x} \pm s$ ， $n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	瘤重/g	抑制率/%
对照组	—	1.056 1 $\pm$ 0.076	—
环磷酸胺组	20	0.378 2 $\pm$ 0.035 ²⁾	64.18
原花青素低浓度组	30	0.777 5 $\pm$ 0.013 ¹⁾	26.38
原花青素中浓度组	60	0.678 5 $\pm$ 0.015 ²⁾	35.75
原花青素高浓度组	120	0.530 8 $\pm$ 0.024 ²⁾	49.73

注：与对照组比较，¹⁾ $P < 0.05$ ，²⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

3.2 原花青素对荷瘤小鼠 S₁₈₀ 肿瘤细胞周期的影响

原花青素使细胞各时相都有所抑制，同时使 G₀/G₁ 期细胞的比例减少，S 期细胞的比例增加，G₂/M 期细胞比例无明显变化，表明原花青素对肿瘤细胞周期有一定的影响，能够对肿瘤细胞 G₁ 和 S 期有一定的阻滞作用，抑制 DNA 合成，使肿瘤细胞不能进入下一期的正常有丝分裂，结果见图 1。

统计学意义。结果见图 2。

表 2 原花青素对荷瘤小鼠 S₁₈₀ 肿瘤细胞 Ca²⁺，Mg²⁺-ATPase 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$ ， $n=10$)

Tab 2 The effect of the procyanidins on tumor cell membrane Ca²⁺，Mg²⁺-ATPase activity of S₁₈₀ mice($\bar{x} \pm s$ ， $n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Ca ²⁺ ，Mg ²⁺ -ATPase 活性/ $\mu\text{molPi} \cdot \text{mgprot}^{-1}$
对照组	—	3.719 9 $\pm$ 0.402
原花青素低浓度组	30	3.151 6 $\pm$ 0.233 ¹⁾
原花青素中浓度组	60	2.178 5 $\pm$ 0.238 ²⁾
原花青素高浓度组	120	1.023 9 $\pm$ 0.030 ²⁾

注：与对照组比较，¹⁾ $P < 0.05$ ，²⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

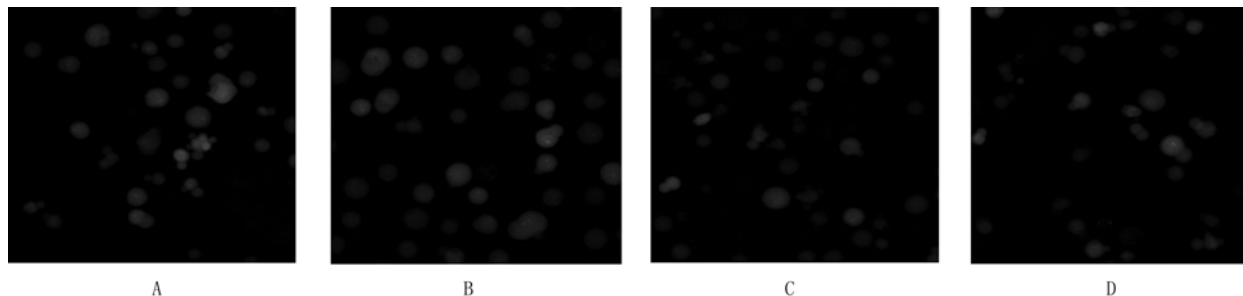


图2 激光共聚焦观察原花青素对S₁₈₀细胞内Ca²⁺含量变化
A-对照组; B-原花青素高剂量组; C-原花青素中剂量组; D-原花青素低剂量组

Fig 2 Confocal observation of S₁₈₀ cells of procyanidins on the content of Ca²⁺
A-control; B-procyanidins high dosage group; C-procyanidins middle dosage group; D-procyanidins low dosage group

4 讨论

钙泵是细胞膜及某些细胞器质膜上的一种Ca²⁺激活的ATP酶。除ATP外,其激活依赖Mg²⁺的存在,故又称Ca²⁺, Mg²⁺-ATP酶。钙泵的主要功能是结合细胞内钙,将Ca²⁺转运并释放到细胞外,以维持细胞内钙浓度在10⁻⁸~10⁻⁷ mol·L⁻¹低钙水平。细胞外Ca²⁺浓度约10⁻³ mol·L⁻¹,所以细胞内外有一个很大的负浓度梯度。要维持这种浓度差,主要依赖于膜上钙泵的主动转运,即细胞内钙离子浓度与钙泵活性有着密切的关系^[5-6]。

由于肿瘤细胞凋亡时Ca²⁺大量内流,而对Ca²⁺起到调控作用的是Ca²⁺, Mg²⁺-ATPnase即钙泵的活性,通过影响钙泵活性改变细胞内Ca²⁺浓度,原花青素对S₁₈₀荷瘤小鼠肿瘤细胞中钙泵活性均有抑制作用,同时影响S₁₈₀肿瘤细胞,使G₀/G₁期细胞的比例减少,S期细胞的比例增加,G₂/M期细胞的比例无明显变化而发挥抗肿瘤作用。

参考文献

- [1] ZHANG B R, LAO Y X, SU W W. Study and development of procyanidins [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2003, 26(12): 905-908.
- [2] GAO Y, DONG Z. Progress on study of pharmacological effects of procyanidins [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2009, 34(6): 651-654.
- [3] LAI F, XIE H, WANG J F. Functions of biology and disease control with Pycnogenol from pine bark extract [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2005, 36(1): 127-131.
- [4] ORRENIUS S, ZHIVOTOVSK B, NICOTERA P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(7): 552-565.
- [5] JI Y B, GAO S Y, ZHANG X Z. Influence of sargassum fusiforme polysaccharide on apoptosis of tumor cells [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2004, 29(3): 245-247.
- [6] SUQIYAMA H, AKAZOME Y, SHOJI T, et al. Oligomeric procyanidins in applepolyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(11): 4604-4609.

收稿日期: 2010-06-12