论著

文章编号:1000-5404(2009)16-1566-03

3,6-二羟基黄酮对多种肿瘤细胞的增殖抑制及凋亡诱导作用

常 徽[1],糜漫天[1],顾艳艳[1],袁家林[1],凌文华[2],林 辉[1] ([1]第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆 400038;[2]中山大学公共卫生学院营养系,广州 510080)

摘 要:目的 观察3,6-二羟基黄酮对乳腺癌细胞株MCF-7(雌激素受体阳性ER$^+$)、MDA-MB-231(雌激素受体阴性ER$^-$)、直肠癌细胞株LoVo、DLD-1和前列腺癌细胞株PC3增殖和凋亡的影响。**方法** MTT法检测3,6-二羟基黄酮对不同肿瘤细胞生长存活的影响,计算半数抑制浓度(IC_{50});DAPI染色观察3,6-二羟基黄酮对肿瘤细胞生长状态及形态的影响,Annexin V/PI双染流式细胞仪检测细胞凋亡变化。**结果** 增殖检测结果表明,3,6-二羟基黄酮对于MCF-7、MDA-MB-231、LoVo、DLD-1和PC3细胞增殖均表现出显著抑制作用,48 h IC_{50}值分别为16.1、15.7、29.8、12.8和17.8 μmol/L;细胞形态观察和凋亡检测结果表明,10 μmol/L的3,6-二羟基黄酮作用24 h,5种肿瘤细胞的生长状态和形态均发生显著变化,大量细胞表现出凋亡或死亡细胞的形态特征,细胞凋亡率均显著升高。**结论** 3,6-二羟基黄酮具有显著的抗肿瘤效应,对于多种肿瘤细胞具有很强的增殖抑制和凋亡诱导作用。

关键词: 3,6-二羟基黄酮;肿瘤细胞;增殖;凋亡
中图法分类号: R730.23;R730.53;R977.9 **文献标识码:** A

Antiproliferative and proapoptotic effects of 3,6-dihydroxyflavone on different cancer cells

CHANG Hui[1], MI Man-tian[1], GU Yan-yan[1], YUAN Jia-lin[1], LING Wen-hua[2], LIN Hui[1] ([1]Department of Nutrition and Food Hygiene, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Nutrition, Public Health School, Sun Yet-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: Objective To observe the effects of 3,6-dihydroxyflavone on the proliferation and apoptosis in breast cancer cell lines MCF-7 (ER$^+$) and MDA-MB-231 (ER$^-$), colorectal carcinoma cell lines LoVo and DLD-1, prostatic cancer cell line PC3. Methods Cell proliferation was detected by MTT assay. The morphological changes in cancer cells were observed after DAPI staining. Cell apoptosis was determined by flow cytometry after Annexin V/PI staining. Results MTT assay showed that 3,6-dihydroxyflavone could significantly inhibit the proliferation of MCF-7, MDA-MB-23, LoVo, DLD-1 and PC3 cell lines. The IC_{50} value for 48 h was 16.1, 15.7, 29.8, 12.8 and 17.8 μmol/L, respectively. Morphological observation and apoptosis detection indicated dramatic proapoptotic morphological changes and enhanced cell apoptosis rate in all 5 cancer cells after treatment with 3,6-dihydroxyflavone at the dose of 10 μmol/L for 24 h. Conclusion 3,6-dihydroxyflavone has potent anti-cancer activity and can significantly inhibit the proliferation and induce apoptosis in cancer cells.

Key words: 3,6-dihydroxyflavone; cancer cells; proliferation; apoptosis

植物黄酮为一大类植物多酚化合物,广泛分布于各种植物性食物中,具有抗氧化、抗炎症等优良生物活性,特别是对于心血管疾病及肿瘤的防治作用一直倍受国内外关注[1-3]。我们的研究表明,植物黄酮3,6-二羟基黄酮可能具有较强的抗肿瘤活性[4,5],其抗肿瘤效应值得进一步研究和证实。本研究观察3,6-二羟基黄酮对乳腺癌细胞MCF-7等多种肿瘤细胞增殖、形态和凋亡的影响,探讨3,6-二羟基黄酮的抗肿瘤效应。

1 材料与方法

1.1 材料

乳腺癌细胞株MCF-7(雌激素受体阳性ER$^+$)、MDA-MB-231(雌激素受体阴性ER$^-$)、直肠癌细胞株LoVo、DLD-1和前列腺癌细胞株PC3,均来自于中国科学院生物化学与细胞生物学研究所;3,6-二羟基黄酮、MTT、DMSO和4′,6二脒基-2-苯吲哚盐酸(DAPI)均为Sigma公司产品;细胞培养液DMEM/F12高糖培养液、DMEM和RPMI1640,以及小牛血清和胎牛血清均

基金项目: 国家自然科学基金(30671754)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30671754)
作者简介: 常 徽,男,山东省泗水县人,博士,讲师,主要从事植物化合物与肿瘤方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68752291,E-mail:Henry8010@126.com
通信作者: 糜漫天,电话:(023)68752292,E-mail:mimt2007@126.com
收稿日期: 2008-11-24;**修回日期:** 2009-02-17

购自 Hyclone 公司;AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购于晶美生物工程公司。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　　乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 培养于含 10% 小牛血清的 DMEM/F12 高糖培养液中,直肠癌细胞 LoVo 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养液中,直肠癌细胞 DLD-1 和前列腺癌细胞 PC3 培养于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 细胞培养液中,以上细胞均于 37°C、5% CO_2 下常规规培养传代。

1.2.2　MTT 法检测细胞存活状况　　将对数生长期的各肿瘤细胞以 5×10^4/ml 细胞密度接种于 24 孔培养板中,每孔 2 000 μl,每组作 3 个平行孔,培养过夜,加入 5、10、20、50 μmol/L 的 3,6-二羟基黄酮,每孔 DMSO 终浓度均为 0.5%,以 0.5% DMSO 为阴性对照,同时设空白对照(只加入细胞培养液),培养 48 h,收获细胞前 4 h,每孔加入 40 μl MTT(5 mg/ml),培养 4 h,去除培养液,每孔加入 200 μl DMSO,避光、室温振荡 10 min,让结晶充分溶解,用酶联仪测定波长 490 nm 处各组吸光度值[D(490)],以空白对照调零。

1.2.3　半数抑制浓度(IC_{50})的获得　　各实验组增殖抑制率按下列公式计算。

抑制率(%) = [阴性对照 D(490) − 实验组 D(490)]/阴性对照 D(490) ×100%。

计算各剂量 3,6-二羟基黄酮对肿瘤细胞的增殖抑制率,以 IC_{50} 分析软件(中国科学院药理研究所)进行曲线拟合,计算 50% 抑制率所对应药物浓度以及 95% 置信区间。

1.2.4　DAPI 染色及细胞形态观察　　各肿瘤细胞接种于 24 孔板内的盖玻片上,培养过夜待细胞贴壁且生长良好,加入终浓度 10 μmol/L 的 3,6-二羟基黄酮,以 0.5% DMSO 为对照组,24 h 后弃去培养基,PBS 洗 2 次,加入新鲜配制的 4% 多聚甲醛,固定细胞 45 min,PBS (pH 7.2) 冲洗 2 次,室温下加入终浓度为 2 μg/ml 的 DAPI 甲醇溶液,避光,在室温下放置 3 ~ 5 min,倒置相差显微镜下观察细胞形态变化,荧光显微镜下观察 DAPI 细胞核染色状况;按 Adam 等[6] 所描述,正常细胞核出现弥漫均匀的低强度荧光,凋亡细胞细胞核呈浓染致密的固缩形态或颗粒状荧光。

1.2.5　细胞凋亡检测　　细胞接种于 6 孔培养板中,每个组设 3 个平行,培养过夜,加入 10 μmol/L 3,6-二羟基黄酮,以 0.5% DMSO 为阴性对照,24 h 后收获细胞,用 4 ℃ 预冷的 PBS 洗细胞 2 次,再用 250 μl 稀释的 binding 缓冲液重新悬浮细胞,并使其浓度为 1×10^6/ml,取 100 μl 的细胞悬液于 5 ml 流式管中,加 5 μl Annexin V/FITC 溶液和 10 μl 的 PI 溶液(20 μg/ml),混匀后于室温避光放置 15 min,在反应管中加 400 μl PBS,流式细胞仪上机检测。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析,两组间差异比较采用 t 检验。

2　结果

2.1　3,6-二羟基黄酮对肿瘤细胞增殖的影响

MTT 检测结果表明,3,6-二羟基黄酮能够有效抑制乳腺癌细胞株 MCF-7 (ER^+)、MDA-MB-231 (ER^-)、直肠癌细胞株 LoVo、DLD-1 和前列腺癌细胞株 PC3 的增殖,其 48 h IC_{50} 值分别为 16.1、15.7、29.8、12.8 和 17.8 μmol/L,见表 1。

表 1　不同剂量 3,6-二羟基黄酮对不同肿瘤细胞增殖的抑制作用

(%, $\bar{x} \pm s$)

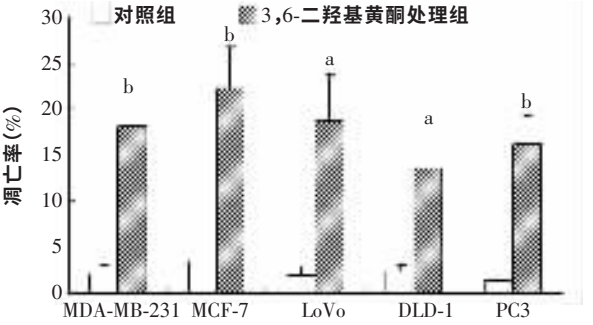
肿瘤细胞	5 μmol/L	10 μmol/L	20 μmol/L	50 μmol/L
MCF-7 细胞	21.3 ±2.6	48.1 ±6.6	58.3 ±8.6	68.7 ±9.7
MDA-MB-231 细胞	15.3 ±3.1	44.0 ±6.6	68.3 ±8.4	72.7 ±6.2
LoVo 细胞	11.2 ±2.6	21.8 ±3.1	44.4 ±9.1	61.4 ±5.3
DLD-1 细胞	23.1 ±3.1	56.9 ±8.7	65.6 ±9.2	68.4 ±8.6
PC3 细胞	13.6 ±3.2	49.4 ±7.4	59.0 ±6.8	68.2 ±9.4

2.2　3,6-二羟基黄酮对肿瘤细胞生长形态的影响

细胞生长状态及形态观察可见,正常对照组肿瘤细胞生长状态良好,形态完整,乳腺癌 MDA-MB-231 细胞呈纺锤形,MCF-7 细胞呈鹅卵石形,LoVo 细胞呈蜂窝形,DLD-1 细胞呈卵石形,PC3 细胞呈圆环形,5 种肿瘤细胞均贴壁生长,彼此聚集,连接成甸;10 μmol/L 的 3,6-二羟基黄酮处理 24 h 后,5 种肿瘤细胞的生长状态和形态均发生显著变化,表现为细胞生长稀疏,排列紊乱,形态异常,大量细胞皱缩变圆,细胞质凝缩,并与其周边细胞分离,细胞贴壁性下降,甚至离开瓶壁漂浮到培养基中,这些形态变化都是凋亡细胞或死亡细胞的表现特征。DAPI 染色后荧光显微镜观察可见,对照组肿瘤细胞出现凋亡形态(固缩形态的亮蓝色颗粒)的比率很低,而 10 μmol/L 的 3,6-二羟基黄酮处理 24 h 后,5 种肿瘤细胞出现凋亡形态的比率均明显升高。

2.3　3,6-二羟基黄酮对肿瘤细胞凋亡的影响

细胞凋亡流式分析结果表明,10 μmol/L 的 3,6-二羟基黄酮处理 24 h 后,5 种肿瘤细胞的凋亡率均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),这与 DAPI 染色观察的结果一致,见图 1、2。

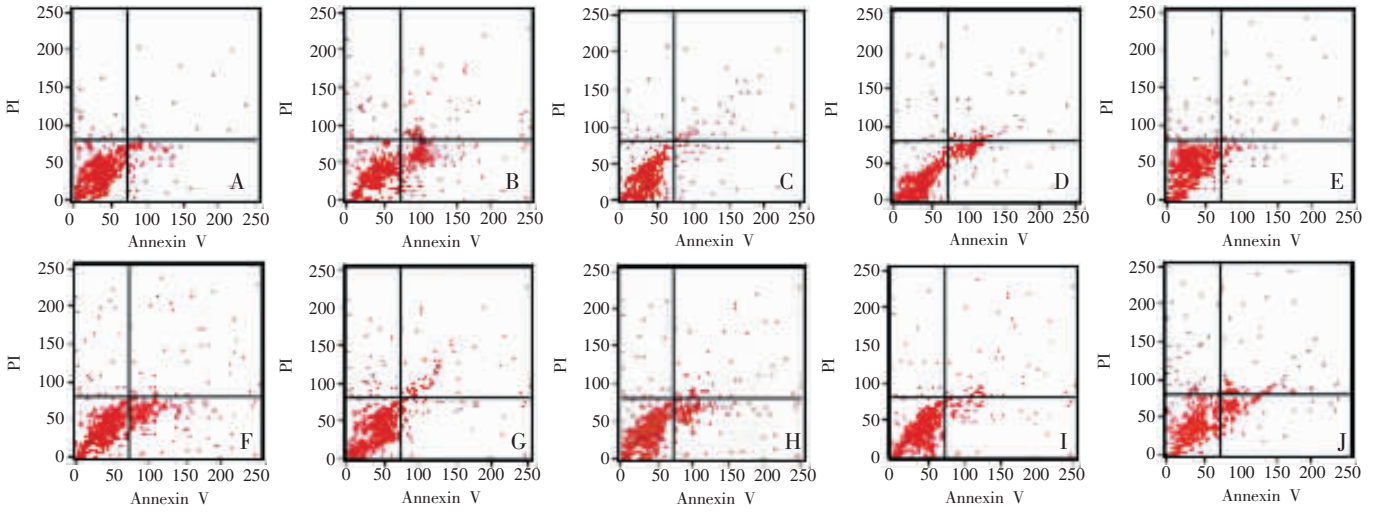


a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较

图 1　3,6-二羟基黄酮对不同肿瘤细胞凋亡的影响

3　讨论

植物黄酮是膳食中一类较为重要的植物化合物,人群膳食调查表明,在西方膳食结构中,美国成年人植物黄酮每人每日平均摄入量为 200 mg,澳大利亚为 350 mg[7, 8]。我国传统膳食结构以植物性膳食为主,近些年来虽然膳食结构向增加动物性食物发展,但相比西方膳食仍是植物性膳食占主导,因此应提高植物黄酮的摄入量。从天然产物中寻找高效抗肿瘤化合物以作为先导化合物进一步开发为抗肿瘤药物,已成为现阶段一个研究热点,而植物黄酮抗肿瘤作用以其天然、低毒、高效而倍受关注,成为药物筛选的一个重要研究领域。



A:正常组 MCF-7 细胞; B:实验组 MCF-7 细胞; C:正常组 MDA-MB-231 细胞; D:实验组 MDA-MB-231 细胞; E:正常组 LoVo 细胞; F:实验组 LoVo 细胞; G:正常组 DLD-1 细胞; H:实验组 DLD-1 细胞; I:正常组 PC3 细胞; J:实验组 PC3 细胞

图2 流式细胞检测不同肿瘤细胞凋亡结果

我们前期研究表明,植物黄酮3,6-二羟基黄酮可能具有较强的抗肿瘤活性,其对白血病细胞 HL-60 的增殖抑制作用远强于槲皮素、白杨黄素等研究较多的植物黄酮[4,5]。而3,6-二羟基黄酮的抗肿瘤作用尚需要进一步证实和探讨。不同组织来源的肿瘤细胞其生物特性可能存在很大差异,植物黄酮对其作用也可能存在很大差异,例如乳腺癌细胞 MCF-7 为雌激素受体阳性(ER^+)细胞,雌激素效应对其增殖影响甚大,而植物黄酮具有类雌激素效应,因此3,6-二羟基黄酮对于 ER^+ 和 ER^- 及不同组织来源的肿瘤细胞其作用可能不同。本研究选用乳腺癌细胞 MCF-7(ER^+)和 MDA-MB-231(ER^-)、直肠癌细胞 LoVo 和 DLD-1,以及前列腺癌细胞 PC3 五种不同组织来源和具有不同生物特性的肿瘤细胞为研究对象,观察3,6-二羟基黄酮对它们的细胞毒作用,结果表明3,6-二羟基黄酮均能有效抑制其增殖,显示出很强的细胞毒作用。同时我们观察并检测了3,6-二羟基黄酮处理后5种肿瘤细胞形态和凋亡的变化,结果表明3,6-二羟基黄酮能够显著诱导细胞凋亡,有力地支持了3,6-二羟基黄酮的强效抗肿瘤作用。诱导凋亡是抗肿瘤药物发挥作用的重要途径,本研究结果表明,3,6-二羟基黄酮可有效诱导多种肿瘤细胞凋亡。

植物黄酮抗肿瘤作用机制涉及众多方面,包括抑制肿瘤细胞的蛋白酶体活性[9]、拓扑异构酶Ⅱ活性[10]、脂肪酸合成酶活性[11]等,但其核心机制尚不明确。前期研究[4]表明,黄酮分子中C环2,3位双键、B环定位于2位、3位羟基、6位羟基、B环邻位羟基是黄酮发挥抗肿瘤效应的关键结构-效应元件,3,6-二羟基黄酮分子中的3位羟基、6位羟基和C环2,3位双键可能在其抗肿瘤效应的发挥中占据重要地位,其详细机制有待研究。

参考文献:

[1] Hertog M G, Hollman P C, Katan M B, *et al*. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands [J]. Nutr Cancer, 1993, 20(1): 21-29.

[2] 唐 勇, 赵 靖, 徐 静, 等. 植物总抗氧化能力的微孔板定量测定及评价[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(6): 517-520.

[3] 常 徽, 糜漫天, 顾艳艳, 等. 黑米花色苷对白血病细胞株 HL-60 及正常淋巴细胞活性氧及线粒体膜电位的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7): 585-587.

[4] 常 徽, 糜漫天, 顾艳艳, 等. 植物黄酮抗人白血病 HL-60 细胞增殖的结构-效应关系[J]. 癌症, 2007, 26(12): 1309-1314.

[5] 林 辉, 糜漫天, 常 徽, 等. 3,6-二羟黄酮降低白血病细胞 HL-60 抗氧化酶活性并影响 MAPKs 信号通路[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(10): 895-897.

[6] Adam L, Crepin M, Savin C, *et al*. Sodium phenylacetate induces growth inhibition and Bcl-2 down-regulation and apoptosis in MCF7ras cells *in vitro* and in nude mice [J]. Cancer Res, 1995, 55(22): 5156-5160.

[7] Chun O K, Chung S J, Song W O. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U. S. adults[J]. J Nutr, 2007, 137(5): 1244-1252.

[8] Song W O, Chun O K, Chung S. Tea Consumption is a determinant of flavonoid intake among US adults [J]. J Am Diet Assoc, 2006, 106(8): A80.

[9] Chen D, Chen M S, Cui Q C, *et al*. Structure proteasome inhibitory activity relationships of dietary flavonoids in human cancer cells[J]. Front Biosci, 2007, 12: 1935-1945.

[10] Cortazar T M, Coombs G H, Walker J. Leishmania panamensis: comparative inhibition of nuclear DNA topoisomerase II enzymes from promastigotes and human macrophages reveals anti-parasite selectivity of fluoroquinolones, flavonoids and pentamidine [J]. Exp Parasitol, 2007, 116(4): 475-482.

[11] Li Y, Fang H, Xu W. Recent advance in the research of flavonoids as anticancer agents [J]. Mini Rev Med Chem, 2007, 7(7): 663-678.

(编辑 邓强庭)