

芦笋有效成分熊果酸诱导 HL-60 细胞凋亡的实验研究*

黄 镜 孙 燕 陆士新 苏 涛 焦顺昌

内容提要 目的:探讨芦笋有效成分熊果酸对 HL-60 细胞增殖、凋亡的影响。方法:用 MTT 法、DNA 凝胶电泳、形态学方法等测定熊果酸对 HL-60 细胞增殖、凋亡的影响。结果:熊果酸抑制 HL-60 细胞增殖,对 HL-60 细胞的半数生长的抑制剂量(IC_{50})为 $8.26\mu\text{mol/L}$,并能诱导其发生凋亡。结论:熊果酸通过抑制 HL-60 细胞增殖和诱导其凋亡发挥抗肿瘤作用。

关键词 熊果酸 HL-60 细胞 凋亡

Experimental Study on Apoptosis Induced by Ursolic Acid Isolated from Asparagus in HL-60 Cells Huang Jing, Sun Yan, Lu Shixin, et al *Cancer Hospital and Institute, Peking Union Medical University, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing (100021)*

Objective: To study the inhibitory effect of ursolic acid isolated from Asparagus on the proliferation of HL-60 cells. **Methods:** Effects of ursolic acid on the growth and apoptosis were evaluated by MTT assay, DNA gel electrophoresis and morphology observation respectively. **Results:** The IC_{50} value of ursolic acid for HL-60 cells was found to be $8.26\mu\text{mol/L}$ and $10\sim 50\mu\text{mol/L}$ of ursolic acid could induce apoptosis of HL-60 cells exposed to ursolic acid for 1 day. **Conclusion:** Ursolic acid can markedly inhibit HL-60 cells as well as induction of cells apoptosis.

Key words ursolic acid, HL-60 cells, apoptosis

芦笋有一定的抗肿瘤作用,为进一步探讨其作用机理,我们从中分离、提纯并鉴定了熊果酸。熊果酸属于三萜类化合物,具有抗突变、抗促癌及抗肿瘤增殖的作用,已引起了国内外学者的广泛注意。细胞凋亡是细胞死亡的两种方式之一,不同于细胞坏死。细胞凋亡具有特殊的生化和形态变化⁽¹⁾。迄今发现,许多抗肿瘤药物能够诱导肿瘤细胞产生凋亡,有些抗肿瘤药的抗肿瘤作用强度平行于它们诱导肿瘤细胞凋亡的活性⁽²⁾。本研究以 HL-60 细胞为材料,研究熊果酸的细胞毒作用和对 HL-60 细胞凋亡的影响,探索熊果酸抗癌作用及其机理。

材料和方法

1 材料

1.1 人急性早幼粒白血病细胞株(HL-60)由美国 Mount Sinai 医学院 Scanlon K. 博士赠送,在中国医学科学院药物所传代培养,接种于含 10% 小牛血清(天津产,经 56°C , 30min 灭活)、双抗的 RPMI-1640(GIBCO)培养液,在 37°C , 5% CO_2 的培养箱内传代。

1.2 药品 熊果酸由天津市医药科学研究所植

物化学室提供,纯度 $>99.9\%$,不溶于水,二甲基亚砷浓度不超过 0.1%。RNA 酶(RNaseA, Sigma 公司产品)和蛋白酶 K(Proteinase K, Merk 公司产品):均按分子克隆实验指南⁽³⁾配成 10mg/ml ,分装后置 -20°C 备用。Nonidet P-40(NP-40):Fluka 公司产品。溴化噻唑蓝四唑(MTT):ICN 公司产品。琼脂糖、台盼蓝:均为 Sigma 公司产品。

2 方法

2.1 熊果酸的细胞毒作用 按 MTT 法测定,见文献⁽⁴⁾。实验中设加熊果酸组和等浓度溶剂(二甲基亚砷)对照组,分别与 HL-60 细胞培养 4 天后检测。

2.2 细胞 DNA 的提取及琼脂糖凝胶电泳 分别以 5、10、20、30、 $50\mu\text{mol/L}$ 熊果酸处理 HL-60 细胞 24h,参照文献⁽⁵⁾收集 3×10^5 细胞,用含 2mmol/L EDTA 的 PBS 洗两次,加 0.1ml TBE 缓冲液(Tris, HCl 45mmol/L pH8.0,含 1mmol/L EDTA),0.25% NP-40 及 RNaseA(终浓度为 1%),混匀后, 37°C 保温 30min;再加入 Proteinase K(终浓度为 1mg/L , 37°C 继续保温 30min。取上清液 $30\mu\text{l}$ 加 $5\mu\text{l}$ 上样缓冲液,在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳(4V/cm),紫外光下观察并摄影。

2.3 细胞形态观察 收集适量细胞、涂片、晾干后,以 Wright-Giemsa 染色 10min, Olympus/BH2 型显微镜油镜($\times 1000$)观察并摄影。

*“八五”国家医学科技攻关项目资助课题(No. 85-914-03-02)

中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院肿瘤研究所肿瘤医院(北京 100021)

结 果

1 熊果酸的细胞毒作用 见图 1。与对照组比较,熊果酸对 HL-60 细胞生长的抑制很明显,其作用与浓度呈依赖性,经直线回归法算出 $IC_{50} = (8.26 \pm 0.57) \mu\text{mol/L}$ ($n = 3$)。

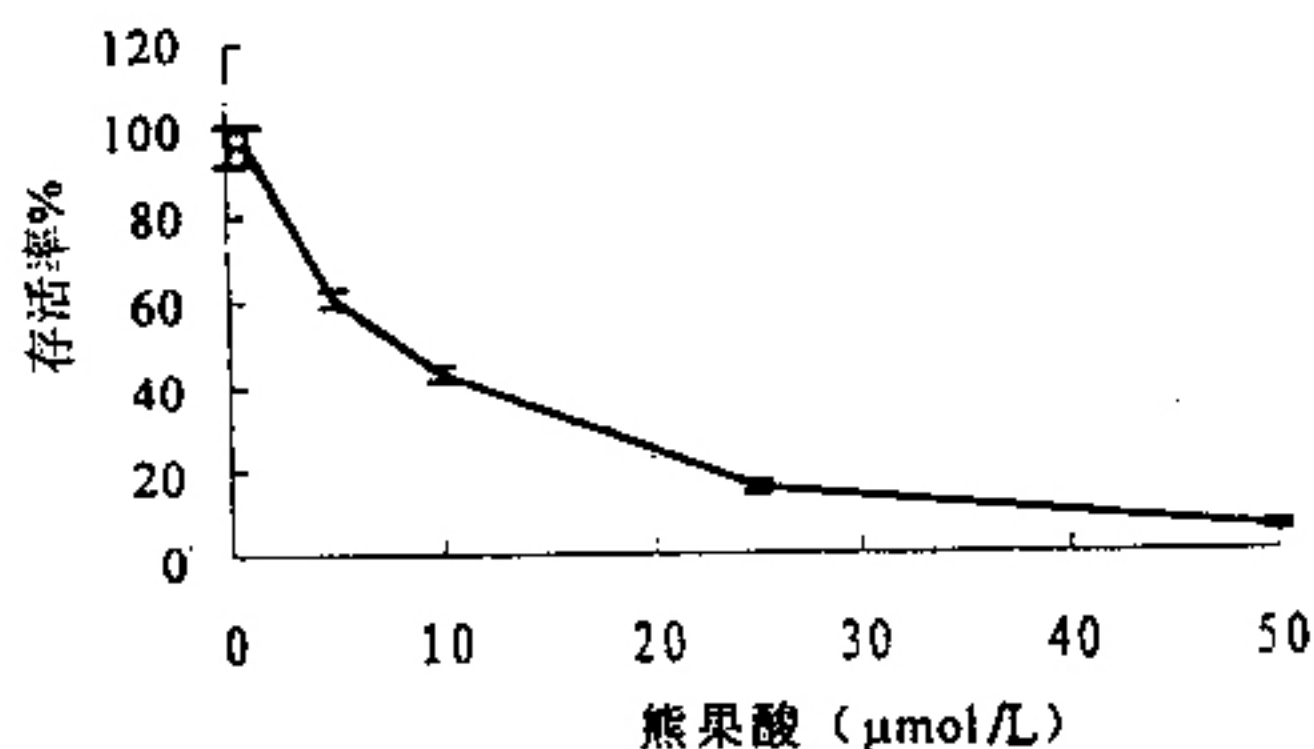


图 1 熊果酸处理 HL-60 细胞后的量效曲线

2 熊果酸诱导 HL-60 细胞凋亡(以 DNA Ladder 为标志) 见图 2。用 $10 \sim 50 \mu\text{mol/L}$ 熊果酸处理 HL-60 细胞 24h, 细胞 DNA 在琼脂糖凝胶上显示清晰的 DNA 梯带(DNA Ladder), 大小相当于 $180 \sim 200 \text{bp}$ 的整倍数, 提示熊果酸能够诱导 HL-60 细胞产生凋亡。同时随着药物浓度的增加, DNA 条带的亮度增加, 说明熊果酸的这一作用具有浓度依赖性。



图 2 HL-60 细胞经熊果酸诱导后, 提取 DNA 琼脂糖电泳。1 为 DNA 分子量标记($\lambda\text{HindIII}$); 2 为对照组; 3 为 $10 \mu\text{mol/L}$ 诱导 1 天后的细胞; 4 为 $10 \mu\text{mol/L}$ 诱导 3 天后的细胞; 5 为 $10 \mu\text{mol/L}$ 诱导 4 天后的细胞; 6 为 $50 \mu\text{mol/L}$ 诱导 1 天后的细胞

3 细胞形态检测 见图 3。未经药物处理的 HL-60 细胞呈圆形, 细胞核呈圆形或椭圆形, 且大, 胞浆少, 内含嗜天青颗粒, 约 97% 的细胞呈早幼粒形态。经 $10 \sim 50 \mu\text{mol/L}$ 熊果酸处理 24h 后, 细胞出现一系列变化: 核染色体发生聚集、断裂, 部分细胞核膜崩解后, 断裂的染色体形成粗细不均的颗粒弥散于胞浆, 部分细胞可见胞浆空泡及固缩。

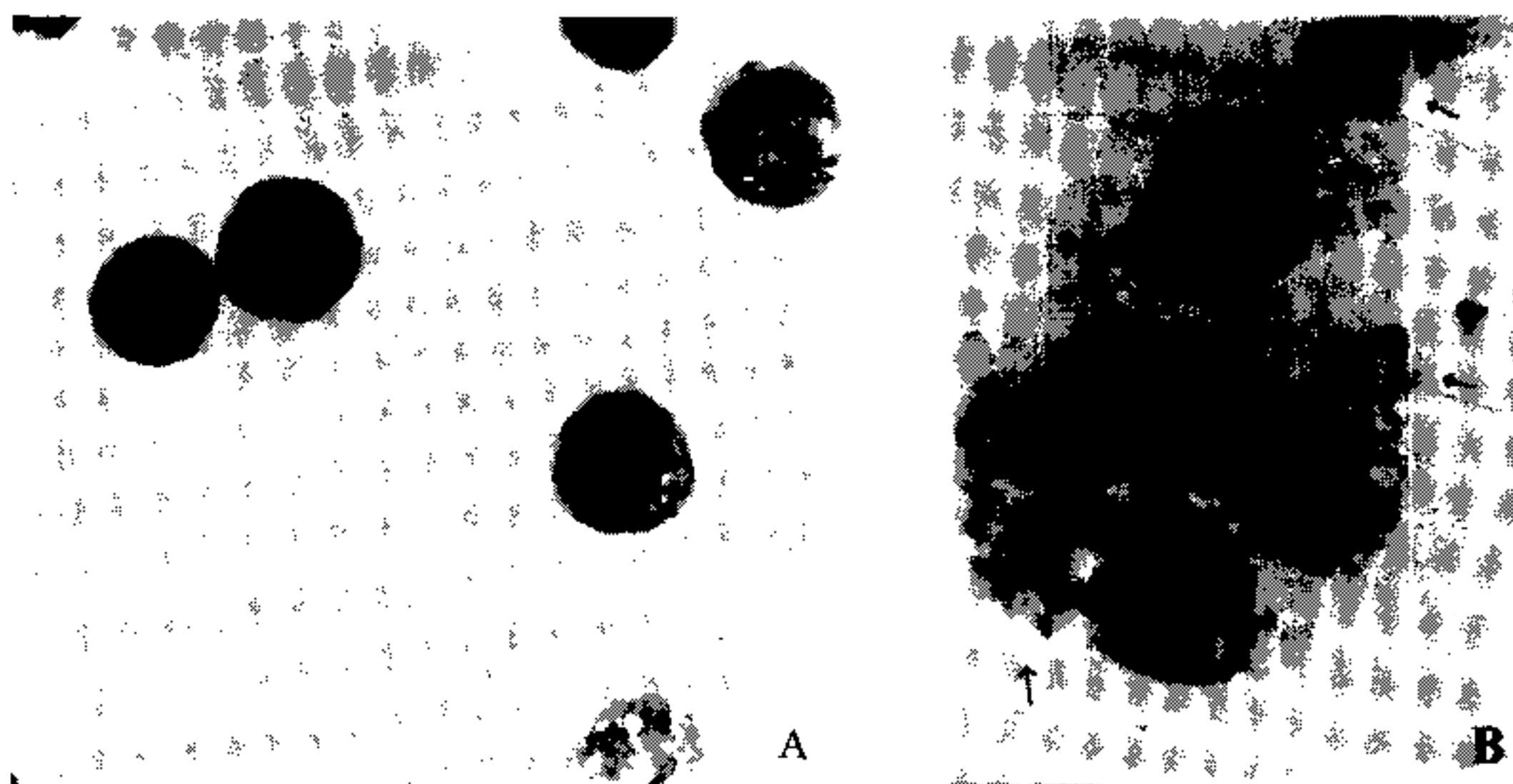


图 3 HL-60 细胞经熊果酸处理后的形态改变, 经瑞氏-吉姆萨染色, 在油镜下观察 ($\times 1000$)。A 为未经处理的 HL-60 细胞; B 为 $50 \mu\text{mol/L}$ 熊果酸处理 24h 后的 HL-60 细胞, 可见细胞核染色体断裂($\rightarrow$)

讨 论

熊果酸广泛存在于抗炎植物中,近年来研究表明,熊果酸可以对抗致癌物如 B(α)P、黄曲霉素 B₁ 诱发的基因突变,抑制 TPA 对二甲基苯并蒽(DMBA)诱导的小鼠皮肤癌的促癌作用,因而认为熊果酸具有抗突变、抗促癌作用^[6-8]。另外, Lee 等报道熊果酸对 P-388 和 L-1210 白血病细胞, A-549 人肺腺癌细胞等多种肿瘤细胞有细胞毒作用^[9], IC₅₀ < 4 μ g/ml。因此,熊果酸的抗癌作用引起了人们的重视。本实验可以看到,熊果酸对 HL-60 细胞生长的抑制明显,其 IC₅₀ < 10 μ mol/L,说明熊果酸具有抗肿瘤增殖作用。

近年来人们认为,肿瘤是细胞增殖和死亡失衡所致。细胞凋亡不同于细胞坏死。细胞的凋亡与肿瘤的发生、发展和消退有密切关系,具有独特的生化和形态特征。生物化学上凋亡最主要的变化是一种内源性 Ca²⁺、Mg²⁺ 依赖性核酸内切酶被激活,使染色体 DNA 双链降解、断裂, DNA 断裂的部分恰发生在核小体之间(inter-nucleosomal),形成寡聚核小体,在 DNA 琼脂凝胶电泳上显示核小体(180~200bp)大小的 DNA 梯带(DNA Ladder)。目前认为这是判断细胞发生凋亡的主要标志。形态上表现为细胞核染色体发生断裂、聚集,进而固缩、核膜崩解;细胞浆空泡变,最后胞膜凸出,形成凋亡小体(apoptotic vehicles)。凋亡的这些形态变化是一个连续的,不同步过程。本项实验以熊果酸诱导 HL-60 细胞发生的生化和形态特征均同文献报道的细胞凋亡的特征性变化一致,说明熊果酸诱导 HL-60 细胞凋亡。某些化疗药物, X-射线均可引起肿瘤细胞的凋亡,熊果酸能抑制致癌物与促癌物的致癌作用,在本实验中熊果酸引起 HL-60 细胞的凋亡,它的

作用与抗癌药物相似,表明熊果酸有抗癌作用,其作用机理是抗增殖和诱导肿瘤细胞凋亡。

参 考 文 献

1. Arendts MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Inv. Rev. Exp. Path* 1991;32:233—254.
2. Barry MA, Behnke CA, Eastman A. Activation of programmed cell death(apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem. Pharmacol* 1990;40:2353—2362.
3. 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E. F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫等译. 北京:科学出版社, 1995:930.
4. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1983;55:63—65.
5. 李 林, 夏丽娟, 蒋 超, 等. 三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱诱导人早幼粒白血病细胞的程序性死亡. *药学学报* 1994;29(9):667—672.
6. Niikawa M, Hayashi H, Sato T, et al. Isolation of substances from glossy privet (*Ligustrum lucidum* Ait) inhibiting the mutagenicity of benzo(α) pyrene in bacteria. *Mutat Res* 1993;319(1):1—9.
7. Young HS, Chung HY, Lee CK, et al. Ursolic acid inhibits aflatoxin B₁-induced mutagenicity in a *Salmonella* assay system. *Biol Pharm Bull* 1994;17(7):990—992.
8. Huang MT, Ho CT, Wang ZY, et al. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Res* 1994;54(3):701—708.
9. Lee KH, Lin YM, Wu TS, et al. The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens*, and *Hyptis capitata*: ursolic acid and related derivatives. *Planta Med* 1988;54(4):308—310.

(收稿:1998-03-20 修回:1998-07-15)

· 书 讯 ·

《现代中西医结合系列丛书》出版

中西医结合是我国医学科学的一大优势。已引起国内外医学界的高度重视。建国 40 余年来,通过大量的医疗实践,不仅积累了丰富的临床经验和取得了丰硕的科研成果,而在中西医结合的理论、临床诊断、辨证互参以及治疗、护理等方面逐步形成了规范化的体系,取得了令人瞩目的成就。中西医结合学术的相互渗透,也促使西学中,中学西的人员的大量增加,扩大了中西医结合的影响,创造了学习中西医结合知识和技能的良好气氛。为了适应这种形势的发展,陈可冀教授组织了尚天裕、张梓荆、俞 瑾等数名国内从事中西医结合多年富有实践经验的专家和医师编写了一套“中西医结合系列丛书”:《中西医结合内科学》、《中西医结合儿科学》、《中西医结合骨伤科学》、《中西医结合妇产科学》。

本套书内容丰富、可读性强,并有很强的实用价值,适于有一定临床经验的工作者,为工作中重要的参考用书,本书的出版将有助于中西医结合学在世界各国的发展和提高。

如需用书者可与出版社联系,地址:北京东单三条九号,邮编:100730,电话:(010)65295940,联系人:中国协和医科大学出版社发行部。