木犀草素对 ICR 脾细胞和 S180 肉瘤细胞双向调节作用的实验研究

廖月霞[1]　孔桂美[2]　吴克艳[3]　陶文华[2]　卜　平[2]

摘要　**目的**　研究木犀草素对正常 ICR 小鼠脾细胞和 S180 肉瘤细胞活力的调节作用。**方法**　木犀草素浓度为 50、100、200、400 μmol/L 作用于 ICR 小鼠脾细胞和 S180 肉瘤细胞后，采用 MTT 法检测木犀草素对脾细胞和 S180 细胞增殖作用的影响；碘化丙啶单染流式检测细胞凋亡情况，流式细胞仪检测细胞内活性氧浓度，羟自由基、DPPH 自由基清除实验测定木犀草素清除自由基活性。**结果**　与溶媒对照组比较，200、400 μmol/L 木犀草素作用 ICR 小鼠脾细胞后细胞活力增加($P<0.05$)，100、200、400 μmol/L 木犀草素作用小鼠 S180 肉瘤细胞后细胞活力下降($P<0.01$)；200、400 μmol/L 木犀草素 Sub-G_1 期脾细胞比例减少($P<0.05$)，200、400 μmol/L 木犀草素 Sub-G_1 期 S180 细胞比例增加($P<0.05$)。与溶媒对照组比较，50、100、200 及 400 μmol/L 木犀草素作用 ICR 小鼠脾细胞后内活性氧水平均升高($P<0.05$)，不同浓度木犀草素作用 S180 细胞后内活性氧水平均降低($P<0.05$)。木犀草素有对羟自由基及 DPPH 自由基清除活性的作用，且成一定量效关系。**结论**　木犀草素能促进小鼠脾细胞活力，抑制脾细胞凋亡和抑制 S180 细胞活力，促进 S180 细胞凋亡的双向调节作用，具有进一步研究开发价值。

关键词　木犀草素；细胞活力；细胞凋亡；活性氧

Bilateral Regulation of Luteolin on Spleen Cells and Sarcoma S180 Cells of ICR Mice: an Experimental Study

LIAO Yue-xia[1], KONG Gui-mei[2], WU Ke-yan[3], TAO Wen-hua[2], and BO Ping[2]

1 Department of Nursing, School of Medicine, Yangzhou University, Jiangsu (225001), China; 2 Department of Integrative Medicine, School of Medicine, Yangzhou University, Jiangsu (225001), China; 3 Department of Gastroenterology, Yangzhou No. 1 People's Hospital, Jiangsu (225000), China

ABSTRACT　Objective　To study the regulation of luteolin on spleen cells and sarcoma S180 cells in normal ICR mice. Methods　Spleen cells and S180 cells were incubated with different concentrations of luteolin (50, 100, 200, and 400 μmol/L). The effect of luteolin on spleen cells and sarcoma S180 cells was determined by MTT assay. The apoptosis was detected using propidium iodide staining flow cytometry. Intracellular reactive oxygen species (ROS) was determined by flow cytometric analysis. Activities of free radicals scavenging were determined by hydroxyl radical and DPPH tests. Results　Compared with the solvent control group, 200 and 400 μmol/L luteolin increased the spleen cells viability ($P<0.05$). Luteolin at 100, 200, and 400 μmol/L decreased activities of S180 cells ($P<0.01$). The proportion of sub-G_1 phase spleen cells was reduced after treated with 200 and 400 μmol/L luteolin ($P<0.05$). The proportion of sub-G_1 phase S180 cells was elevated after treated with 200 and 400 μmol/L luteolin ($P<0.05$). Compared with the solvent control group, levels of intracellular ROS in spleen cells of ICR mice all increased; levels of intracellular ROS in S180 cells all decreased after treated with 50, 100, 200, and 400 μmol/L luteolin ($P<0.05$). Luteolin scavenged hydroxyl radical and DPPH in a dose dependent manner. Conclusion　Luteolin had bilateral regulation on viability and apoptosis of spleen cells and S180 cells

基金项目：国家自然科学基金资助项目(No. 30873343)

作者单位：1. 扬州大学医学院护理学系(江苏 225001)；2. 扬州大学医学院中西医结合系(江苏 225001)；3. 扬州市第一人民医院消化内科(江苏 225000)

通讯作者：卜　平，Tel：0514-8797887，E-mail：boping@yzu.edu.cn

DOI：10.7661/CJIM.2014.11.1374

(promoting the viability of spleen cells, inhibiting apoptosis of spleen cells, inhibiting the viability of S180 cells, and promoting apoptosis of S180 cells), which was worth further study and exploration.

KEYWORDS luteolin; cell viability; apoptosis; reactive oxygen species

木犀草素(3′,4′,5,7-四羟基黄酮,Luteolin)广泛存在于蔬菜、水果、中草药等天然植物中,具有低毒、无诱变性、抗氧化、细胞保护、抗炎、镇静和抗肿瘤等多种生物学作用,对过敏、肿瘤、呼吸道疾病治疗和维护心血管健康有积极意义,在我国富含木犀草素的植物被广泛应用于治疗炎症性疾病、高血压病和癌症[1-5]。有研究显示,木犀草素可能通过自身氧化、抑制相关酶类活性以及清除或减少自由基产生等途径发挥抗氧化活性,通过抑制致癌物质活化、抑制肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤血管生成及抗转移等途径发挥抗肿瘤作用,通过抑制炎症因子产生及其相关信号通路产生抗炎活性[6]。为进一步探索其生物学活性及机制,本实验将木犀草素作用于正常 ICR 小鼠来源脾细胞及小鼠 S180 肉瘤细胞,观察其对脾细胞活力、细胞凋亡及细胞内活性氧水平的影响,分析其抗羟自由基、DPPH 自由基清除活性,为进一步合理开发提供实验依据。

材料与方法

1 细胞及动物 小鼠 S180 肉瘤细胞购自中国科学院上海细胞库;4~6 周龄 SPF 级 ICR 小鼠购自江苏省比较医学中心(合格证号为 2023469),常规饲养。

2 主要试剂 木犀草素(luteolin,HPLC >95%,TCM028-090511,南京替斯艾么中药技术研究所),溶解于 20 mmol/L 碳酸钠溶液中现配现用;MTT(100 mg,Sigma 公司);水合硫酸铁(100 g,Sigma 公司);水杨酸粉剂(250 g,Sigma 公司);DPPH [2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl](100 mg,Sigma 公司);水溶性维生素 E(6-hydroxy 2-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Trolox, 1 g,Sigma 公司);碘化丙啶(10 mg,Sigma 公司);活性氧检测试剂盒(S0033,碧云天生物技术研究所),胎牛血清(100 mL/瓶,杭州四季青公司);RPMI 1640 培养基(500 mL/瓶,Gibco 公司)。

3 主要仪器 BioTek Synergy2 多功能酶标仪(BioTek, 美国),Model 680 酶标仪(Bio-Rad,美国),SUV-2120 分光光度仪(SCINCO,韩国),FACSCalibur 分析型流式细胞仪(Becton Dikinson,美国)。

4 方法

4.1 细胞培养 小鼠脾细胞分离及培养:4~6 周 SPF 级 ICR 小鼠脱颈处死,75% 乙醇浸泡 10 min,无菌操作取小鼠脾脏,放在装有预冷 PBS 的平皿中漂洗去血渍剔除外膜。用 PBS 溶液冲洗两遍,轻柔碾碎,200 目金属细胞滤网过滤,收集细胞悬液,加入红细胞裂解液,静置 5 min 后,用 PBS 溶液洗涤 3 次,调整细胞浓度 5×10^5/mL,培养于完全 RPMI 1640 培养基(含 10% FBS,100 IU/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素),置于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养。

小鼠 S180 肉瘤细胞:S180 细胞培养于完全 RPMI 1640 培养基(含 10% FBS, 100 IU/mL 青霉素和 100 μg/mL链霉素),取对数生长期 S180 细胞,调整细胞浓度为 5×10^4/mL,置于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养。

4.2 MTT 检测细胞活力 将与溶媒对照组(碳酸钠 2 mmol/L)、浓度为 50、100、200、400 μmol/L 木犀草素及阳性对照脂多糖(500 μg/mL)或 5 氟尿嘧啶(5-Fu)浓度为 100 μmol/L,孵育细胞培养 48 h 后,每孔加入 10 μL MTT (5 mg/mL)工作液, 37 ℃, 5% CO_2 孵育箱中培养 4 h,离心去上清,每孔加入 100 μL 二甲基亚砜(DMSO), 于振荡器上振荡 10 min,检测吸光度, 并计算细胞增殖率。细胞增殖抑制率(%) =1-(实验孔 A 均值-空白孔 A 均值)/(溶媒空均值-空白孔 A 均值)×100%。每组实验设平行 6 复孔,重复 3 次。

4.3 碘化丙啶单染检测细胞凋亡 以 5% 血清培养基重悬细胞,同上细胞浓度种板,24 h 后收集细胞。以 PBS 重悬细胞,加入-20 ℃预冷的 75% 乙醇中固定。4 ℃过夜后 PBS 重悬细胞 5 min。200 目筛网收集细胞。加入 1 mL 碘化丙啶染色液(50 μg/mL), 4 ℃、避光孵育 45 min。流式细胞仪分析 10 000 个细胞中 Sub-G_1 细胞百分率,实验重复 3 次。

4.4 细胞内活性氧浓度测定 细胞培养于完全 RPMI 1640 培养基(含 10% FBS,100 IU/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素),应用不同浓度木犀草素刺激脾细胞和 S180 细胞 24 h 后,调整 S180 细胞浓度为 2×10^6/mL,脾细胞浓度 5×10^7/mL,参照文献[7]方法,按照 1∶1 000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA,使终浓度为 10 μmol/L。细胞收集后悬浮于稀释好的 37 ℃ 二氯荧光二乙酸盐中 45 min,用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次。收集细胞后流式细胞仪检测,使用 488 nm 激发波长,525 nm 发射波长,检测荧光的

强弱，应用 WinMDI 2.9 分析软件分析门内细胞平均荧光强度，实验重复 3 次。

4.5　木犀草素清除自由基实验

4.5.1　羟自由基清除实验　参照参考文献[8]方法，以超纯水配置 6 mmol/L H_2O_2，6 mmol/L $FeSO_4$，乙醇配置 6 mmol/L 水杨酸。实验时试剂以 1∶1∶1 混合，设乙醇空白对照组，水溶性维生素 E 阳性对照组，待测样品组每个浓度样品设 3 复孔，加样室温避光 35 min，多功能酶标仪 517 nm 波长下读取吸光度，计算自由基清除能力 = [1 −（A_i − A_j）/Ac] × 100% 各组自由基清除率。式中 Ac 为加入自由基后空白对照的平均吸光值；A_i 为加入自由基后样品液或阳性对照的平均吸光值；A_j 为未加入自由基时样品液或阳性对照的平均吸光值，实验平行操作 3 次。

4.5.2　DPPH 自由基清除实验　参考文献[9]实验方法，乙醇现配 100 μmol/L DPPH 工作液，以乙醇为空白对照组，水溶性维生素 E 为阳性对照组，1∶2 加入样品和 DPPH，每个浓度样品设 3 复孔，室温避光 30 min，多功能酶标仪 517 nm 波长下读取吸光度，同上方法计算自由基清除能力，实验平行操作 3 次。

4.6　统计学方法　采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间均值的比较用单因素方差分析，组间两两比较采用 *LSD* 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

1　各组小鼠脾细胞及 S180 细胞活力比较（表 1）　与溶媒对照组比较，浓度 200、400 μmol/L 木犀草素及 500 μg/mL 脂多糖组 ICR 小鼠脾细胞数均增加，差异有统计学意义（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。与溶媒对照组比较，浓度为 100、200、400 μmol/L 木犀草素及 100 μmol/L 5-Fu 组 S180 肉瘤细胞细胞数均减少，差异有统计学意义（$P < 0.01$）。

表 1　各组小鼠脾细胞及 S180 细胞活力比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别		n	细胞活力	
			脾细胞（5×10^5/mL）	S180 细胞（5×10^4/mL）
溶媒对照		6	99.74 ± 0.69	99.43 ± 1.08
木犀草素	50 μmol/L	6	97.44 ± 6.22	89.44 ± 8.13
	100 μmol/L	6	109.22 ± 7.11	66.46 ± 7.95**
	200 μmol/L	6	121.31 ± 8.52*	54.65 ± 9.01**
	400 μmol/L	6	123.86 ± 9.21*	26.11 ± 10.05**
脂多糖	500 μg/mL	6	168.96 ± 7.80**	—
5-Fu	100 μmol/L	6	—	37.56 ± 6.45**

注：与溶媒对照组比较，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$

2　各组小鼠脾细胞及 S180 细胞凋亡的比较（表 2）　与溶媒对照组比较，浓度为 200、400 μmol/L 木犀草素组 Sub-G_1 期 ICR 小鼠脾细胞比例减少，100 μmol/L 5-Fu 组脾细胞比例增多，差异均有统计学意义（$P < 0.05$）；与溶媒对照组比较，浓度为 200、400 μmol/L 木犀草素组及 100 μmol/L 5-Fu 组 Sub-G_1 期 S180 细胞比例均增加，差异有统计学意义（$P < 0.05$）。

表 2　各组小鼠脾细胞及 S180 细胞 Sub-G_1 期细胞比例比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别		n	Sub-G_1 期细胞比例	
			脾细胞（5×10^5/mL）	S180 细胞（5×10^4/mL）
溶媒对照		3	16.4 ± 1.3	3.0 ± 0.5
木犀草素	50 μmol/L	3	16.0 ± 2.2	6.6 ± 3.6
	100 μmol/L	3	15.6 ± 2.7	8.6 ± 3.0
	200 μmol/L	3	12.6 ± 2.2*	9.7 ± 3.5*
	400 μmol/L	3	12.0 ± 2.5*	10.4 ± 4.0*
5-Fu	100 μmol/L	3	22.7 ± 2.5*	11.3 ± 3.0*

注：与溶媒对照组比较，*$P < 0.05$

3　各组小鼠脾细胞及 S180 细胞内活性氧浓度比较（表 3）　与溶媒对照组比较，不同浓度木犀草素组及阳性对照组 ICR 小鼠脾细胞内活性氧水平均升高，差异有统计学意义（$P < 0.05$，$P < 0.01$），且成一定量效关系；不同浓度木犀草素组作用的 S180 细胞内活性氧水平均降低，阳性对照组水平升高，差异有统计学意义（$P < 0.05$，$P < 0.01$），与剂量相关性不明显。

表 3　各组小鼠脾细胞及 S180 细胞内活性氧浓度比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别		n	细胞内活性氧浓度（DCF 荧光强度）	
			脾细胞（5×10^7/mL）	S180 细胞（2×10^6/mL）
溶媒对照		3	102 ± 6.5	98 ± 7.7
木犀草素	50 μmol/L	3	131 ± 14.0*	55 ± 10.7**
	100 μmol/L	3	141 ± 13.0**	63 ± 7.9**
	200 μmol/L	3	159 ± 16.0**	70 ± 12.4*
	400 μmol/L	3	179 ± 14.0**	65 ± 9.8**
活性氧阳性对照	100 μg/mL	3	216 ± 15.0**	177 ± 5.7**

注：与溶媒对照组比较，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$

4　木犀草素自由基清除作用（图 1）　木犀草素及水溶性维生素 E 均具有对羟自由基及 DPPH 自由基清除活性的作用，且成一定量效关系。

讨　论

木犀草素是半枝莲、野菊花等天然植物中的活性黄酮[10,11]，具有抗肿瘤、心血管保护、免疫调节、抗炎等

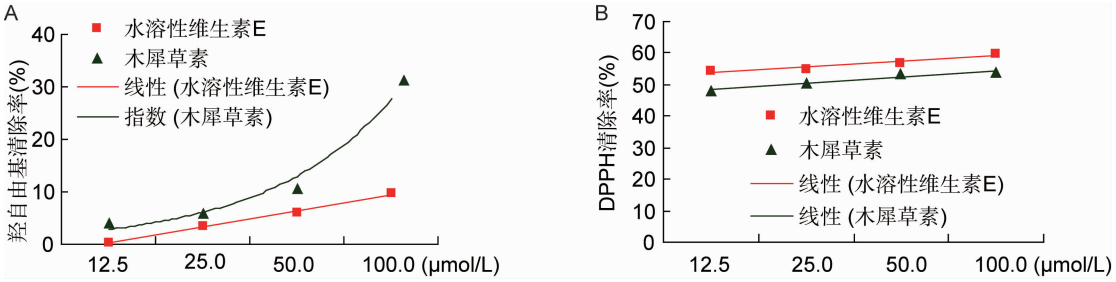

图 1 木犀草素对羟自由基及 DPPH 自由的基清除作用

生物学活性[12]。实验结果显示木犀草素对脾细胞和 S180 细胞具有双向调节细胞活力、细胞凋亡、细胞内活性氧作用和抗氧化活性。

研究显示，木犀草素能增强淋巴细胞转化能力[13]，降低小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能及体内溶菌酶活力[14]，也能抑制多种恶性肿瘤细胞增殖[15]，本次实验中木犀草素促进脾细胞活力、抑制其凋亡，抑制 S180 肉瘤细胞活力、促进其凋亡。这些结果提示木犀草素对小鼠脾细胞和 S180 细胞活力及细胞凋亡具有双向调节作用，提示木犀草素可能通过抑制小鼠脾细胞凋亡促进其细胞活力，通过促进小鼠 S180 细胞凋亡抑制其细胞活力。

由超氧离子、过氧化氢和羟自由基组成的活性氧是细胞代谢的副产品，在细胞增殖、分化和凋亡中具有调控作用[16]。研究证实，低微水平的活性氧升高可促进细胞增殖，而较高水平的活性氧则引发细胞凋亡，更高水平的活性氧则直接导致细胞坏死[17]。本次实验中木犀草素可升高脾细胞内活性氧水平，并促进脾细胞活力、抑制其凋亡，推测木犀草素可能是通过升高脾细胞内活性氧水平，调控细胞活力和凋亡。肿瘤细胞本身具有较高的氧化压力，轻度氧化应激可促进肿瘤发生发展，重度氧化应激，可以增强瘤细胞对药物促凋亡的易感性[18]。本次实验中木犀草素降低了 S180 肉瘤细胞内活性氧水平，却抑制其细胞活力、促进细胞凋亡，提示木犀草素通过影响脾细胞和 S180 细胞内活性氧水平，减轻了肿瘤细胞的氧化压力可能是其调控 S180 肉瘤细胞增殖和凋亡的机制之一。

Fenton 反应是生物体内产生羟自由基的主要反应[8]，DPPH 自由基结构简单，性质稳定，反应容易控制，是抗氧化剂自由基清除活性筛选的首选试剂[18]。本次实验显示木犀草素可剂量依赖地清除这两种自由基，其抗氧化性与 S180 细胞内活性氧水平降低一致，而与脾细胞内活性氧水平升高不一致，提示木犀草素可能不是直接进入细胞内发挥抗氧化作用，对不同细胞内活性氧双向调节的机制可能不一致。

本次实验结果显示木犀草素具有促进脾细胞活力、抑制其凋亡、促进细胞内活性氧产生，抑制 S180 细胞活力、促进其凋亡、降低细胞内活性氧产生的双向调节作用，提示其具有免疫调节和抗肿瘤作用，具有进一步开发和利用价值。

参 考 文 献

[1] Seelinger G, Merfort I, Schempp CM. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin[J]. Planta Med, 2008, 74(14): 1667 -1677.

[2] Ou YC, Kuan YH, Li JR, et al. Induction of apoptosis by luteolin involving Akt inactivation in human 786-O renal cell carcinoma cells[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013: 109105 2013:109105.

[3] 杨颖，宋曙辉，徐桂花. 黄酮类化合物木犀草素研究进展[J]. 粮食与油脂, 2009, (9): 45 -47.

[4] Jiang D, Li D, Wu W. Inhibitory effects and mechanisms of luteolin on proliferation and migration of vascular smooth muscle cells[J]. Nutrients, 2013, 5(5): 1648 -1659.

[5] Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992[J]. Phytochemistry, 2000, 55(6): 481 -504.

[6] Lin Y, Shi R, Wang X, et al. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2008, 8(7): 634 -646.

[7] Ju W, Wang X, Shi H, et al. A critical role of luteolin-induced reactive oxygen species in blockage of tumor necrosis factor-activated nuclear factor-kappaB pathway and sensitization of apoptosis in lung cancer cells[J]. Mol Pharmacol, 2007, 71(5): 1381 -1388.

[8] 冯慧萍，李亦聪. 羟自由基与水杨酸反应机理的初探[J]. 光谱实验室, 2009, 26(4): 931 -938.

[9] Booth NL, Overk CR, Yao P, et al. The chemical and biological profile of a red clover (*Trifolium*

pratense) phase Ⅱ clinical extract[J]. J Altern Complement Med, 2006, 12(2): 133 -139.
[10] 陈艳. 半枝莲的化学成分研究[D]. 沈阳, 沈阳药科大学: 2007.
[11] 申海进,郭巧生,房海灵, 等. RP-HPLC 测定野菊花中槲皮素、木犀草素、芹菜素和刺槐素[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(2): 191 -193.
[12] 韩炜,邢燕,康廷国. 木犀草素生物活性研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2010, 31(4): 60 -62.
[13] 陈海英,孔月红,蔡兆明. 胸腺细胞的年龄分布及木犀草素对其免疫功能的调节.徐州医学院学报[J]. 2006, 26(4): 302 -305.
[14] 闫庆峰,杨达宽. 木犀草素对小鼠巨噬细胞免疫功能的影响[J]. 昆明医学院学报, 2007, 28(3): 39 -42.
[15] 王洪燕,全康,蒋燕灵, 等. 木犀草素抗肿瘤细胞增殖及增敏抗肿瘤药物作用研究[J]. 浙江大学学报:医学版, 2010, 39(1): 30 -36.
[16] 易静. 活性氧调控蛋白质修饰影响肿瘤细胞行为机制的研究进展[J]. 上海交通大学学报:医学版, 2012, 32(9): 1122 -1127.
[17] Tsai TM, Nakamura BN, Luderer U. Induction of apoptosis by 9,10-dimethyl-1,2 benzanthracene in cultured preovulatory rat follicles is preceded by a rise in reactive oxygen species and is prevented by glutathione[J]. Biol Report, 2007, 77(3): 442 -451.
[18] 熊双丽,卢飞,史敏娟, 等. DPPH 自由基清除活性评价方法在抗氧化剂筛选中的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(8): 380 -383.

(收稿:2013 -06 -29　修回:2014 -09 -01)

沉痛悼念本刊编委周文泉教授

我国著名中医学家、老年病医学家,享受国务院政府特殊津贴专家,中央保健委员会中央保健会诊专家,本刊编委周文泉教授于2014 年10 月11 日因病去世,享年74 岁。

周文泉教授出生于1940 年9 月23 日,吉林省吉林市人,中共党员。1963 年7 月毕业于长春中医药大学医疗系,毕业后分配到重庆中医研究所,1976 年6 月调入中国中医科学院西苑医院,一直工作至今。周文泉教授参与创建了老年病研究室、老年病科、老年医学研究所,担任老年病科主任,主任医师,教授,博士生导师。

周文泉教授为国家中医药管理局全国中医老年病医疗中心学术带头人,清宫医案研究室研究员,首批国家中医药管理局传承博士后合作导师,全国老中医药专家学术经验继承工作指导老师。曾担任中国药膳研究会会长、荣誉会长;世界中医药学会联合会老年病专业委员会会长;中国中西医结合学会养生学及康复医学专业委员会主任委员、名誉主任委员;中国中医科学院学术委员会委员及高级职称评审委员会委员。

周文泉教授一生致力于中医药事业,躬耕杏林。主持起草了《延缓衰老临床观察规范及实验研究规程》,至今仍被广泛采用。主持国家级、部级课题等10 余项,获得多项科研成果奖,曾获国家银牌奖和国际尤里卡奖。发表学术论文200 余篇,编撰论著20 余部,培养研究生、经验继承人30 余人,为我国培养出了大批优秀临床和科研人才。

周文泉教授学术精湛、学识广博、治学严谨、德高望重、为世人所敬仰,一生锲而不舍,为中医药事业的发展做出了杰出贡献。周文泉教授虽然离开了我们,但是他对事业执着热爱、工作精益求精的优秀品质将永远激励我们为中医药事业的发展而奋斗,我们永远怀念他!

(中国中医科学院西苑医院供稿)

中国中西医结合杂志