

马尾松树皮提取物体外抑制人大肠癌细胞生长机理初探

崔映宇¹ 王宏斌¹ 谢衡² 伍春莲¹ 彭青青¹ 郑光耀² 王金发¹

(1. 生物防治国家重点实验室/教育部基因工程重点实验室/中山大学 生命科学院, 广州 510275;

2. 广州高珍营养源研究所, 广州 510645)

摘要 为探讨马尾松树皮提取物(PMBE)体外抑制大肠癌 LoVo 细胞生长的作用特点和机理,通过 MTT、显微镜术、凝胶电泳和流式细胞术,研究 PMBE 抑制 LoVo 细胞生长的特点,运用免疫组化和 RT-PCR 探究相关分子机理。结果表明:PMBE 时间-剂量依赖地抑制 LoVo 细胞的体外生长;PMBE 处理后,流式细胞检测发现 LoVo 细胞周期阻滞于 G₁ 或 S 期,同时可检测到亚二倍体峰的出现;荧光镜检和透射电镜观察可看到 LoVo 细胞的核皱缩、边集甚或碎裂,以及有凋亡小体形成,其基因组经过凝胶电泳呈现典型的梯形 Ladder;RT-PCR 和免疫组化结果显示 PMBE 处理可上调 LoVo 细胞中 p53 和 p21 基因的转录效率,并下调 Bcl-2 的蛋白表达量。说明 PMBE 通过上调 p53 和 p21 的表达量阻滞细胞周期、下调 Bcl-2 的表达量诱导细胞凋亡的双重机制,抑制 LoVo 细胞的体外生长,可供进一步探索相关信号传导通路参考。

关键词 马尾松树皮提取物;人大肠癌 LoVo 细胞;基因表达;细胞周期阻滞;凋亡

中图分类号 R 735.34; R 733; Q 949.665 **文章编号** 1007-4333(2007)04-0007-08 **文献标识码** A

Primary exploration of mechanism of *Pinus massoniana* bark extract inhibiting growth of human colorectal carcinoma cells in vitro

Cui Yingyu¹, Wang Hongbin¹, Xie Heng², Wu Chunlian¹, Peng Qingqing¹,
Zheng Guangyao², Wang Jinfa¹

(1. State Key Laboratory for Biocontrol/ Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education/ College of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Institute of Songzhen Nutritional Resource, Guangzhou 510645, China)

Abstract To explore the character and mechanism of *Pinus massoniana* bark extract (PMBE) inhibiting the growth of human colorectal carcinoma LoVo cells in vitro. MTT, microscopy, gel electrophoresis and flow cytometry were used to identify the characters of PMBE inhibiting LoVo cell growth and inducing apoptosis. Immunohistochemistry analysis and RT-PCR were used to explore the related molecular mechanism. PMBE inhibits the growth of LoVo cells in a time- and dose-dependent manner. PMBE treatment resulted in cell cycle arrest at G₁/S phase, Sub-G₁ curve, genomic DNA ladder pattern, and morphological changes, including nuclear condensation, boundary aggregation or split, and apoptotic body formation. In addition, PMBE up-regulates the expression of p53 and p21 and down-regulates the expression of Bcl-2. PMBE inhibits the growth of LoVo cells in vitro via double mechanisms of cell cycle arrest through up-regulation of p53 and p21 expression and apoptosis induction through down-regulation of Bcl-2 expression, which laid foundation for further research of the related signal transduction pathways.

Key words *Pinus massoniana* bark extract (PMBE); human colorectal carcinoma LoVo cell; gene expression; cell cycle arrest; apoptosis

收稿日期: 2007-01-12

基金项目: 广东省工业攻关计划资助项目(2004B10401033)

作者简介: 崔映宇, 北京大学博士后, 主要从事生物化学与分子生物学研究, E-mail: yy-cui@126.com; 王金发, 教授, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事细胞生物学与分子遗传学研究, E-mail: ls19@zsu.edu.cn

马尾松树皮提取物 (*Pinus massoniana* bark extract, PMBE) 是富含原花青素的一种多酚类物质,能广谱抑制人体外癌细胞的生长^[1]。法国海松 (*Pinus maritima*) 树皮提取物 (Pycnogenol) 能诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡,而对正常乳腺 MCF-10 细胞无不良影响^[2],但相应的分子机理未见报道。2005 年,笔者曾报道 PMBE 通过诱导细胞凋亡下调 Bcl-2 的表达抑制人肝癌细胞 BEL-7402 的体外生长^[3],而后又对其抑制人大肠癌 LoVo 细胞生长的规律进行了初步研究^[4]。近年来,原花青素等天然多酚类物质通过下调 Bcl-2^[5]、上调 P53 表达^[6]等分子事件抑制癌细胞生长的研究屡见报道。基于 PMBE 具有强抗氧化性和活性氧自由基清除能力^[7]及广谱抑制癌细胞体外生长活性^[1]。为从深层次开发利用 PMBE,本研究进一步探讨其抑制人大肠癌 LoVo 细胞生长的机理。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

马尾松树皮提取物 (PMBE) 由广州嵩珍营养源研究所膜分离法分离纯化;HEPES、MTT 和 DAPI 购自 Sigama 公司。

人大肠癌 LoVo 细胞株 ($p53^{WT}$),购自中山大学医学院动物细胞中心。

二甲亚砜 (DMSO)、RPMI 1640 和青-链霉素 (青霉素 10 000 U/mL,链霉素 10 000 μ g/mL) 分别为 Amresco、HyClone 和 Gibco BRL 公司产品,胎牛血清 (FBS) 为杭州四季青公司产品;鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体购自 Oncogene 公司,SABC 显色试剂盒为博士德 (Boster) 产品;SV Total RNA Isolation System 和 One Step RNA PCR Kit 分别为 Promega 和 TaKaRa 公司产品。其余试剂均为分析纯级。

1.2 方法

1.2.1 PMBE 的配制 10 mg/mL 的 PMBE 贮存液以 DMSO 溶解配制而成,过 0.22 μ m 微孔滤膜,并分管置 -20 $^{\circ}$ C 冻存。用前室温放置解冻,以 10% (体积分数,下同) FBS-RPMI 1640 培养液稀释成相应浓度的工作液。

1.2.2 细胞培养和处理 人 LoVo 细胞以含 10% FBS、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素和 10 mmol/L HEPES 的 RPMI 1640 培养液 (pH7.4),置 37 $^{\circ}$ C,含 5% (体积分数) CO₂ 的湿润培养箱中培

养。以含不同质量浓度 PMBE 的 10%FBS RPMI 1640 培养液培养 48 h 或含 140 μ g/mL PMBE 的 10%FBS RPMI 1640 培养液培养不同时间后进行实验分析。

1.2.3 MTT 检测 PMBE 抑制 LoVo 细胞生长作用的特点通过稍加修饰的 MTT 实验测定。以细胞适宜密度 (10^4 个/mL) 接种 LoVo 单细胞至 96 孔微培养板,至对数生长期时分别以 40、80、120、160 和 200 μ g/mL PMBE 处理 48 h 或以 140 μ g/mL PMBE 分别处理 24、48 和 72 h。每一质量浓度和时间点均做 4 个复孔。到预定时间点前 4 h,各培养孔分别加入 20 μ L 5 mg/mL MTT 的无菌溶液,置 37 $^{\circ}$ C 继续培养 4 h 后,小心吸弃各孔中的上清液,然后加入 150 μ L DMSO,置摇床 200 r/min 振摇 10~20 min,以充分溶解各孔中的紫色结晶,微孔板阅读仪上测定 570 nm 波长下各孔吸光度值 (A)。所有实验中均包含无 PMBE 的培养液和 DMSO 对照孔。细胞生长抑制率由下列公式算出

$$\text{生长抑制率} = (1 - A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}) \times 100\%$$

上述实验重复 3 次,取均值进行分析。

1.2.4 细胞形态和亚显微结构观察

1) 荧光镜检。以 10^5 /mL 的密度接种 LoVo 单细胞至 Φ 3 cm 无菌培养皿 (内放盖玻片) 中,贴壁后以 0.5% FBS-RPMI 1640 同步化 56 h,再换上等体积的 10%FBS-RPMI 1640,继续培养至对数生长期。而后处理组以含 140 μ g/mL PMBE 的 10% FBS-RPMI 1640 分别处理 24、48 和 72 h,对照组以不含 PMBE 的 10% FBS-RPMI 1640 培养 24 h。相应时间点取出各培养皿中的盖玻片,以含 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 PBS 液洗盖玻片 5 min,共 3 次。然后以等量的甲醇 DAPI 溶液 (1 000 1) 4 $^{\circ}$ C 避光浸泡盖玻片 15~30 min,再以含 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 PBS 液洗盖玻片 5 min,3 次脱背景。最后,固定有 LoVo 细胞的盖玻片细胞面向内扣在干燥洁净的载玻片上,放在荧光显微镜 (BH-2, Olympus, Japan) 下观察, Olympus 数码相机拍照。

2) 电镜观察。对数生长期的 LoVo 细胞以含 140 μ g/mL PMBE 的 10% FBS-RPMI 1640 分别处理 24、48 和 72 h,对照组以不含 PMBE 的 10% FBS-RPMI 1640 培养 24 h,至相应时间点时,以 0.25 g/100 mL 胰酶消化 2~3 min 后,以 0.5% FBS-RPMI 1640 终止消化,10 000 r/min 离心 5 min

收集细胞, PBS液洗5 min, 2次后, 细胞沉淀以2.5%(体积分数)的戊二醛溶液4 固定过夜。次日, PBS洗10 min, 3次, 1%(体积分数)锇酸室温孵育1 h后, 以PBS液洗涤细胞沉淀10 min, 3次, 再先后以30%、50%、70%、80%和95%(体积分数)梯度乙醇室温脱水, 每梯度点10 min。之后, 再进一步以无水丙酮室温脱水10 min, 3次, 而后用1:1的50%(体积分数)丙酮:50%(体积分数)环氧树脂室温孵育1 h, 再以100%(体积分数)环氧树脂室温浸透1 h, 3次。最后, 环氧树脂浸透的细胞沉淀加上过量的环氧树脂包埋到胶囊中, 70 过夜聚合。以热膨胀式超薄切片机(LKB-NoVa, 瑞士)制备500 Å的超薄切片。经醋酸铀和柠檬酸铅染色, 置透射式电子显微镜(JEM 100CX, Houghton, MI)下观察拍照。

1.2.5 琼脂糖凝胶电泳 LoVo单细胞以 10^5 /mL的密度接种到25 mL培养瓶中, 以10% FBS-RPMI 1640培养至对数生长期时, 换上不含PMBE或含不同质量浓度PMBE的培养液处理不同时间。常规法收集沉淀细胞。细胞沉淀重悬于40 µL 0.2 mol/L NaH_2PO_4 /0.1 mol/L citric acid (192:8)混合液中, 室温放置1 h, 480 r/min离心30 min后, 上清转移到1.5 mL微量离心管中, 各管加入3 µL NP-40 (2.5 mg/mL)和3 µL RNase A (10 mg/mL), 37 孵育1 h后, 再分别加入3 µL Proteinase K (10 mg/mL), 50 孵育1 h。反应结束后, 各管加入5 µL上样缓冲液、混匀, 含0.5 µg/mL EB的1 g/100 mL琼脂糖凝胶, 75 V恒压电泳1.5 h, 以凝胶成像分析系统(BIO-RAD公司)观察拍照。

1.2.6 流式细胞分析 细胞DNA含量和细胞周期分布可以通过流式细胞仪分析细胞吸收碘化丙锭(PI)的荧光量间接定量。收集PMBE处理后的LoVo细胞, PBS液洗涤后, 70%(体积分数)乙醇4 固定过夜。再以1×PBS洗涤, 细胞沉淀以碘化丙锭染液(含50 µg/mL PI, 10 µg/mL RNase, 0.5%(体积分数)Triton X-100和0.1 mg/mL醋酸钠)室温避光染色30 min。而后, 上流式细胞仪(ELITE, Beckman公司产品), MULTICYCLE软件(Phoenix公司产品)分析细胞中DNA含量的变化、细胞周期的分布以及表征凋亡的亚二倍体细胞的量。

1.2.7 免疫组化分析 以 10^5 /mL的密度接种LoVo单细胞到放有无菌盖玻片的无菌培养皿中, 常规

法培养, 并设对照。对数生长期时, 实验组细胞换上含140 µg/mL PMBE的10% FBS-RPMI 1640, 分别处理24、48和72 h, 对照组则以不含PMBE的10% FBS-RPMI 1640培养24 h。至相应时间点时, 1×PBS洗涤1 min×2, 冷丙酮固定10 min后, 弃丙酮, 加入0.75%(体积分数)的 H_2O_2 -PBS, 37 放置30 min灭活内源性过氧化物酶, 1×PBS洗3 min×2, 加入正常山羊血清封闭非特异性抗原, 接着加入鼠抗人Bcl-2单克隆一抗, 室温放置30 min后, 1×PBS洗5次, 而后加入生物素标记的二抗羊抗鼠IgG, 37 孵育30 min, 以基于免疫氧化酶的检测系统SABC试剂盒(武汉博士德公司产品)显色, 相差显微镜下观察拍照。计数300个细胞中阳性着染细胞。按说明书要求, 用140 µg/mL PMBE处理24 h不加一抗的LoVo细胞作为阴性对照, 细胞膜结构被染成褐色或咖啡色的细胞为阳性着染细胞。

1.2.8 RT-PCR检测 以含不同浓度PMBE的10% FBS-RPMI 1640分别处理LoVo细胞24、48和72 h, 然后按试剂盒提取各组细胞的总RNA。DU[®]530核酸蛋白分析仪测定RNA的浓度和纯度。按试剂盒说明书进行一步RT-PCR。25 µL RT-PCR混合液50 热孵30 min进行反转录, 接着94 预变性模板2 min, 而后置T-GRADIENT PCR热循环仪(Biometra, 德国)上进行30轮(94 变性30 s, 52 退火30 s, 72 延伸1.5 min)目的基因片段的扩增。*p21*和*p53*基因的相应片段用合成的特异引物扩增, β -actin为内对照用以排除假阴性并用于半定量(表1)。扩增产物经含0.5 µg/mL EB的1.2%(质量分数)琼脂糖凝胶, 80 V恒压电泳分离1.5 h, 凝胶成像分析系统Gene Genius Bio Imaging System GeneSnap (SynGene Co., USA)观察拍照。每条扩增带的面积灰度值由GeneTools软件(SynGene Co., USA)扫描分析。

1.2.9 统计分析 所有数据均以平均值±标准差表示。除特殊标示外, 各实验均重复3次。组间统计差异性由*t*检验或one-way ANOVA经SPSS 10.0软件评估($P < 0.05$, 差异显著; $P < 0.01$, 差异极显著)。

2 结果分析与讨论

2.1 结果与分析

2.1.1 PMBE时间-剂量依赖地抑制LoVo细胞的体外增殖 人类大肠癌LoVo细胞以含40~200

表 1 引物序列和 PCR 产物大小

Table 1 Primer sequence and size of PCR products

基因名称	引物序列	扩增片段大小/ bp	退火温度/
β -actin	a 5' GGCA TGGGTCA GAA GGATTCG-3' b 5' ATGTCACGCACGATTTCCCGC-3'	500	52
p53	a 5' TCTGGGACA GCCAA GTCTGT-3' b 5' GGA GTCTTCCA GTGTGA TGA-3'	434	52
p21	a 5' AA GACCATGTGGACCTGTCA-3' b 5' GGCTTCCTCTTGGAGAA GA T-3'	170	52

注: a 为上游引物, b 为下游引物。

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同质量浓度的 PMBE 的 10% FBS-RPMI 1640 处理不同时间后,以 MTT 检测各处理组与对照组之间的细胞吸光度值的变化。发现 PMBE 能时间-剂量依赖地抑制 LoVo 细胞的体外增殖。40、80、120、160 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMBE 处理 48 h 后,Lo-

Vo 细胞生长抑制率分别为 5.08%、7.50%、8.40%、23.64%和 44.77%(图 1(a));140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMBE 处理 LoVo 细胞 24、48、和 72 h 后,其生长抑制率分别为 21.75%、23.64%和 25.62%(图 1(b))。

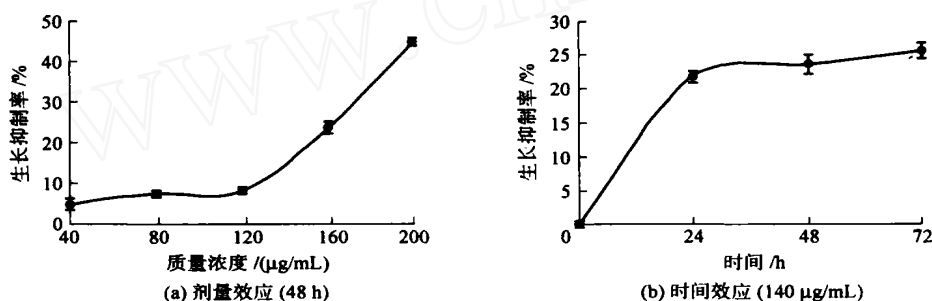
图 1 PMBE 对人 LoVo 细胞生长的抑制效应 ($n=3, \bar{x} \pm \text{SD}$)

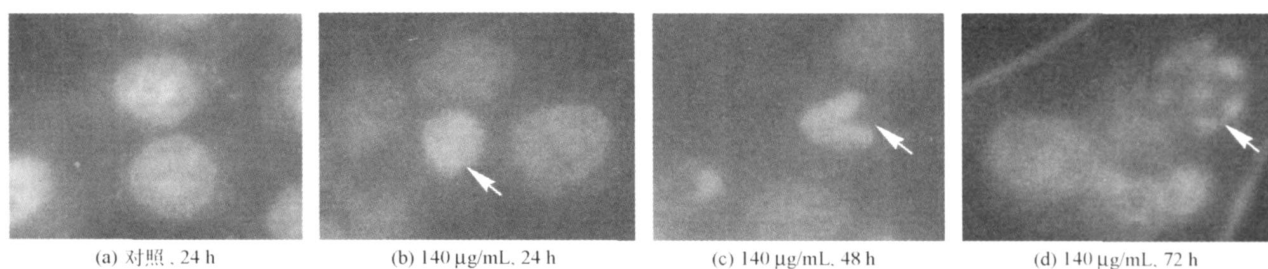
Fig. 1 Effects of PMBE on human LoVo cell growth (Dose-/ Time-dependent effects)

2.1.2 PMBE 处理后 LoVo 细胞的形态学变化
荧光镜检发现,未经 PMBE 处理的 LoVo 细胞胞体平展,核染色均匀(图 2(a));140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMBE 处理 24、48 和 72 h 后,依次呈现凋亡特有的核形态变化,包括核皱缩(图 2(b))、边集或碎裂(图 2(c))、甚至出现 DNA 片段(图 2(d))。且随处理时间的增加,细胞凋亡的形态变化越明显。透射电镜下,可见其他一些细胞器的损伤和凋亡小体出现(图 3)。

2.1.3 PMBE 诱导 LoVo 细胞核小体间 DNA 的断裂
为确证 PMBE 是否诱导了 LoVo 细胞凋亡反应,用琼脂糖凝胶电泳分析 PMBE 处理前后 LoVo 细胞的 DNA 降解情况,结果发现不同质量浓度的 PMBE 处理 LoVo 细胞至相应的时间段,都可以检测到标示凋亡的 180~200 bp 或其整数倍的 DNA Ladder,且质量浓度越大、处理时间越长,DNA Lad-

der 越明显,呈现出时间-剂量依赖性,为典型的凋亡细胞特征性的 DNA 梯状带;而未处理组细胞则未见到明显的类似 DNA 降解现象(图 4)。

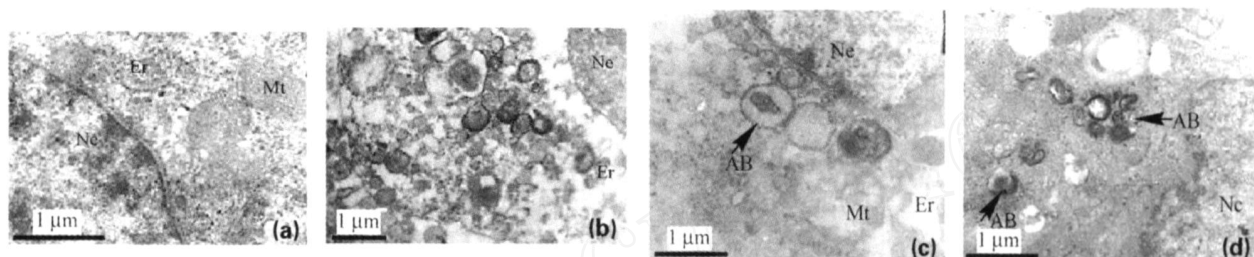
2.1.4 PMBE 诱导 LoVo 细胞凋亡的定量检测
凋亡细胞可通过由于细胞 DNA 降解而渗出导致与其特异性结合的碘化丙锭(PI)的荧光减少而识别。DNA 降解形成的亚二倍细胞群(DNA 含量直方图上的 sub- G_1 峰)可通过流式细胞仪定量。此外, PMBE 对 LoVo 细胞周期分布的影响也可以通过流式细胞分析定量展示。流式分析结果提示 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMBE 处理不同时间,或 120、140 和 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMBE 处理 24 h,随着细胞增殖的阻碍,均导致 G_1 期或 S 期细胞积聚(图 5(a)和(b))。随着 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMBE 处理时间的延长, G_1 期或 S 期细胞阻滞最终导致细胞死亡,诱导逐渐增强的凋亡反应,进



箭头示浓缩、边集或碎裂的核(×400)

图 2 PMBE 处理 LoVo 细胞核形态变化的荧光镜检

Fig. 2 Morphological changes in LoVo cell nuclei under G B filter, fluorescence microscope



(a) 对照 24 h, 示完整的核双层膜, 正常线粒体和内质网(×19 000);

(b) 24 h, 示核膜降解, 细胞质空泡化和异常的内质网(×10 000);

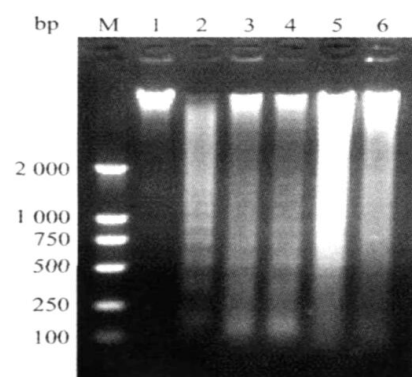
(c) 48 h, 示核降解, 线粒体和内质网肿胀, 出现凋亡小体(×14 000);

(d) 72 h, 可见凋亡小体(×14 000);

Mt 为线粒体; Er 为内质网; Nc 为细胞核; AB 为凋亡小体。

图 3 LoVo 细胞核形态变化的电镜观察

Fig. 3 Morphological changes in LoVo cells under a transmission electron microscope



M 为 DNA 分子量标准 DL2 000;

PMBE 处理质量浓度及时间:

1 为对照, 0 µg/mL, 24 h; 2 为 140 µg/mL, 24 h;

3 为 120 µg/mL, 24 h; 4 为 140 µg/mL, 48 h;

5 为 160 µg/mL, 48 h; 6 为 140 µg/mL, 72 h。

图 4 LoVo 细胞凋亡的凝胶电泳检测

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from LoVo cells

而导致表征凋亡的亚二倍体细胞的快速出现(图 5(c))。

PMBE 剂量依赖地诱导 LoVo 细胞凋亡。120、

140 和 160 µg/mL PMBE 处理 24 h 后, 细胞平均凋亡率由未处理细胞组的 1.2%, 分别增至 19.4%、28.1% 和 31.5%(图 5(d))。而 140 µg/mL PMBE 处理 24、48 和 72 h 后, 细胞平均凋亡率由未处理细胞组的 1.2%, 分别增至 26%、50.8% 和 38.6%(图 5(e))。这些结果提示, PMBE 诱导 LoVo 细胞凋亡具有时间和剂量依赖性。

2.1.5 Bcl-2, p53 和 p21 参与 PMBE 诱导的 LoVo 细胞凋亡 bcl-2 基因已被证实参与了几种抗癌药物诱导的细胞凋亡^[8-10]。免疫组化分析显示, Bcl-2 蛋白也参与了 PMBE 诱导的人大肠癌 LoVo 细胞的凋亡。对照组细胞培养 24 h 后, 有较高的 Bcl-2 蛋白表达水平, 阳性着染率达(24.7 ± 1.5)%, 而以 140 µg/mL PMBE 处理 24、48 和 72 h 后的各处理组相应的阳性细胞着染率则分别为(16.7 ± 1.4)%, (10.3 ± 0.6)% 和(11.1 ± 1.0)%(图 6(a))。与对照组相比, 均具有显著差异性($P < 0.05$, $n = 3$)。同一质量浓度 PMBE 处理不同时间, 细胞中 Bcl-2 蛋白的着染率随处理时间的延长而逐渐降低, 提示 PMBE 可能通过下调 bcl-2 基因的表达在诱导人大

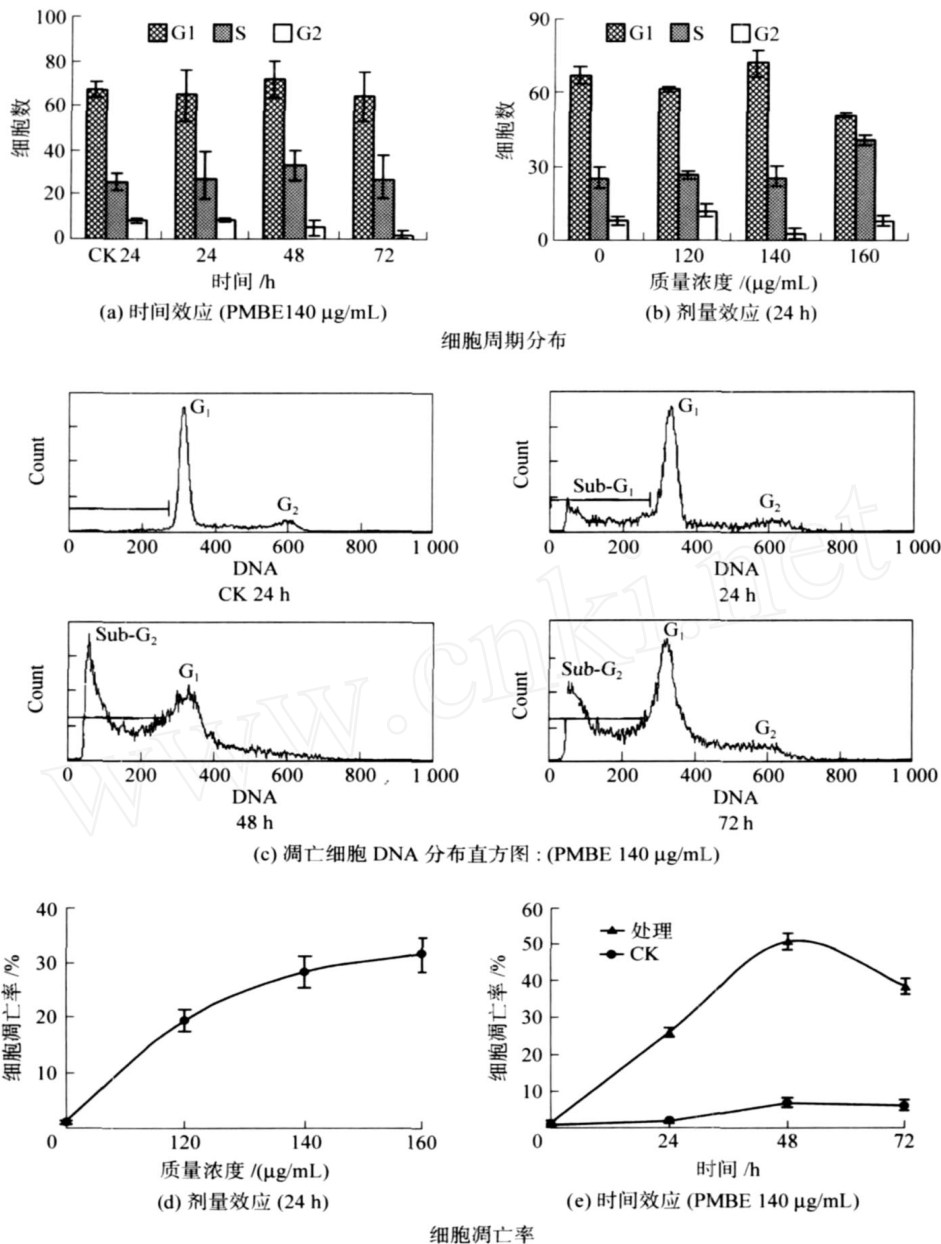


图5 不同质量浓度 PMBE 处理 LoVo 细胞不同时间后,凋亡细胞的流式定量检测 ($n=3, \bar{x} \pm SD$)

Fig. 5 Quantitative detection of apoptotic LoVo cells treated with several concentrations of PMBE for various time periods by flow cytometry

肠癌细胞凋亡中发挥作用。

RT-PCR 检测 $p53$ 和 $p21$ 的表达水平,并进行特异性扩增条带的灰度值扫描,以 β -actin 为内参,计算二者在 PMBE 处理前后的相对表达量。结果显示, PMBE 可以时间-剂量依赖地激活 $p53$ 和 $p21$ 的表达(图 6(b))。图中可见,二者表达量的增加趋势平行,几乎相近,但后者表达量比前者高。

2.2 讨论

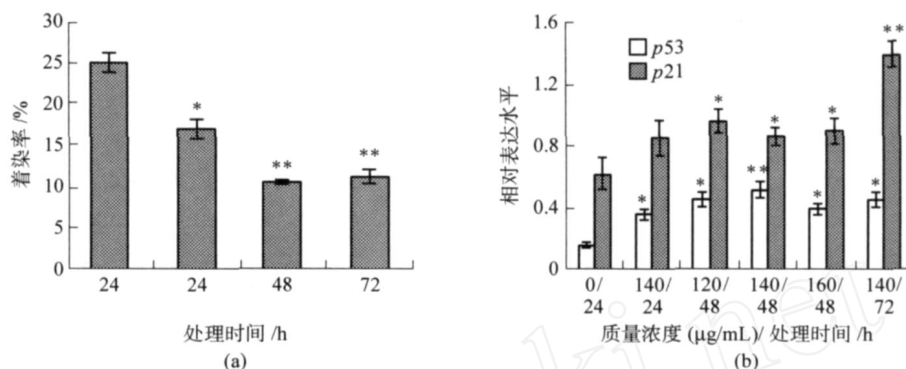
1) PMBE 对体外培养的多种人癌细胞株,包括

HL-60, BEL-7402, Hela 和 LoVo 等都有生长抑制作用^[1],本文以 LoVo 细胞株为模型,探索 PMBE 对癌细胞增殖和凋亡的影响,进而评估其在癌症预防及治疗中的作用,并试图揭示其潜在的分子机制。主要通过凋亡细胞鉴定和 $bcl-2$, $p53$ 和 $p21$ 的表达水平检测,探索了 PMBE 诱导 LoVo 细胞周期阻滞和细胞凋亡的特点和机制。

细胞凋亡是基因水平调控的细胞编程性死亡过程,被认为是细胞自杀的终末途径,在胚胎发育、组

织稳态维持及迷途细胞或 DNA 损伤细胞的清除过程中发挥作用。凋亡细胞具有特异性的形态特征, 包括细胞收缩, 核染色质浓集、固缩, 核片段化, 细胞质浓缩, 核与细胞膜外翻等^[11]。本研究发现 40 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMBE 能时间-剂量依赖地抑制 LoVo 细胞增殖, 并诱导凋亡相关的形态和生化改变。在相

同质量浓度下, PMBE 对凋亡的诱导强于生长抑制, 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMBE 分别处理 LoVo 细胞 24、48 和 72 h 后, LoVo 细胞的生长抑制率和凋亡率分别为 21.75%、23.64%、25.62% 和 26.0%、50.8%、38.6%, 提示细胞可能存在不依赖于生长抑制的凋亡途径, 这是值得深入研究的问题。



(a) 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMBE 处理 LoVo 细胞不同时间 Bcl-2 表达变化;

(b) p53 和 p21 表达水平的相对定量 0/24 为对照;

与对照比 * $P < 0.05$, 差异显著, ** $P < 0.01$ 差异极显著。

图 6 相关分子事件的检测 ($n = 3, \bar{x} \pm \text{SD}$)

Fig. 6 Detection of the related molecular events

许多分子如 Bcl-2 家族, P21 和 P53 等参与了细胞凋亡的调控, Bcl-2 在人前列腺癌、肝癌、大肠癌、肺癌, 以及其他类型的实体瘤中表达, 并刺激相应癌细胞生长; Bcl-2 可通过诱导细胞永生, 活跃细胞增殖阻断许多刺激 (包括放疗、化疗试剂及抗癌药物) 对细胞凋亡的诱导^[12]。P53 和 P21 则是与 Cyclins 及 CDKs 等促生长因子相拮抗的细胞周期抑制子, DNA 损伤或环境胁迫可激活 P53, 通过抑制或激活其下游基因, 导致细胞生长阻滞或凋亡^[13-14]。P21 就是 P53 诱导的 G₁ 期细胞 CDKs 的广谱抑制子, 其激活将导致细胞周期受阻、生长停滞。近来体外研究发现, DNA 诱变剂处理或生长因子突然撤除的细胞中, P21 也调控着 P53 诱导的凋亡。总之, 大量事实表明, P53 和 P21 能促进细胞生长停滞并诱导凋亡^[15], 而 Bcl-2 则抑制该过程^[16]。

2) 鉴于原癌基因如 *bcl-2*, 常常参与肿瘤发生, 且与肿瘤细胞耐药性相关, 因此在探求相关分子机理方面, 首先检测了 PMBE 处理后 LoVo 细胞中 Bcl-2 表达水平的变化。结果表明, PMBE 不仅诱导 LoVo 细胞凋亡, 而且能显著降低 Bcl-2 蛋白的表达, 可降低癌细胞的耐药性, 有助于癌症的临床辅助治疗。PMBE 处理 LoVo 细胞不同时间后, p21 和

p53 的表达特征分析结果提示 p21 和 p53 的表达之间有一定的协同相关性。譬如, PMBE 处理后, p53 mRNA 的增加与 p21 mRNA 的增加相平行, 但后者明显高于前者, 提示 p21 激活可能通过 p53 依赖性途径实现, 但也可能存在其他途径。因此, 探索这一现象究竟是 LoVo 细胞对 PMBE 刺激本身的特异性应答, 还是凋亡和细胞损伤相关基因间的一种普遍现象就显得尤为重要。基于此, 进一步深入研究该效应背后的分子事件, 包括上游分子及上、下游信号通路将是一件十分有趣的事情。

此外, 本研究还发现 PMBE 能诱导细胞周期阻滞于 G₁ 期或 S 期, 并证实 PMBE 时间-剂量依赖地诱导癌细胞凋亡。这些活性可以解释笔者以前报道的该提取物的细胞毒效应^[17]。因此, PMBE 的抑瘤效应可能有多重机制, 譬如, 可能经由激活 p53 上调 p21 表达阻滞细胞周期和/或通过下调 *bcl-2* 的表达诱导凋亡等。

本研究表明: PMBE 对人大肠癌细胞有明显的抗增殖和诱导凋亡作用, PMBE 诱导的 LoVo 细胞周期阻滞和凋亡至少存在双重机制: 通过激活 p53 上调 p21 的表达抑制癌细胞生长, 和/或通过下调 *bcl-2* 的表达促进癌细胞凋亡。PMBE 对细胞周期

进程和凋亡的这些影响提示 PMBE 可激活不同的信号传导通路,对癌症治疗过程中的 2 个关键过程发挥作用。因此, PMBE 对人大肠癌有潜在的治疗功效,可作为一种抗癌药物候选前体物进行开发。

3 结 论

本研究表明: PMBE 时间-剂量依赖地分别通过上调 *p53* 和 *p21* 的表达效率、下调 *bcl-2* 的表达效率抑制人大肠癌细胞的体外生长并诱导其凋亡。因此, PMBE 具有作为细胞生长抑制剂和抗癌药物的开发前景。

参 考 文 献

- [1] 崔映宇, 谢衡, 王金发. 马尾松树皮提取物对人体外癌细胞的广谱作用研究[J]. 药学进展, 2004, 28(9): 418-421
- [2] Huynh H T, Teel R W. Selective induction of apoptosis in human mammary cancer cells (MCF-7) by Pycnogenol [J]. Anticancer Res, 2000, 20(4): 2417-2420
- [3] Cui Yingyu, Xie Heng, Qi Kangbiao, et al. Effects of *Pinus massoniana* bark extract on cell proliferation and apoptosis in human hepatoma BEL-7402 cells[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(34): 5277-5282
- [4] 崔映宇, 陈小红, 伍春莲, 等. 马尾松树皮提取物体外抑制人大肠癌细胞生长规律初探[J]. 中国农业大学学报, 2006, 11(1): 11-16
- [5] Pellicchia M, Reed J C. Inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins by natural polyphenols: new avenues for cancer chemoprevention and chemotherapy [J]. Curr Pharm Des, 2004, 10(12): 1387-1398
- [6] Kaur M, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract induces anoikis and caspase-mediated apoptosis in human prostate carcinoma LNCap cells: Possible role of ataxia telangiectasia mutated-*p53* activation [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(5): 1265-1274
- [7] 崔映宇, 谢衡, 赖斐, 等. 马尾松树皮提取物的抗氧化性初步研究[J]. 食品科学, 2004, 25(9): 179-183
- [8] 袁静, 顾振纶, 周文轩, 等. 榄香烯诱导人白血病 K562 细胞凋亡及调控 Bcl-2 蛋白的表达[J]. 中国药理学报, 1999, 20(2): 103-106
- [9] 李贵新, 张玲, 王芸, 等. 淫羊藿甙诱导肿瘤细胞凋亡及其机制的研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1999, 6(2): 131-135
- [10] 刘琳, 邱少敏, 赵伟, 等. 三氧化二砷诱导人类大肠癌细胞凋亡的分子机制[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(7): 1550-1554
- [11] Toki T, Horiuchi A, Ichikawa N, et al. Inverse relationship between apoptosis and Bcl-2 expression in syncytiotrophoblast and fibrin-type fibrinoid in early gestation[J]. Mol Hum Reprod, 1999, 5(3): 246-251
- [12] Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis[J]. Nat Med, 1997, 3(6): 614-620
- [13] Bai L, Merchant J L. ZBP-89 promotes growth arrest through stabilization of *p53* [J]. Mol Cell Bio, 2001, 21(14): 4670-4683
- [14] Nakahara T, Hashimoto K, Hirano M, et al. Acute and chronic effects of alcohol exposure on expression skeletal muscle *c-myc*, *p53*, and Bcl-2 mRNA[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003, 285(6): 1273-1281
- [15] Chiarugi V, Ruggiero M. Role of three cancer "master genes" *p53*, *bcl-2* and *c-myc* on the apoptotic process [J]. Tumori, 1996, 82(3): 205-209
- [16] Ruvolo P P, Deng X, May W S. Phosphorylation of Bcl-2 and regulation of apoptosis[J]. Leukemia, 2001, 15(4): 515-522
- [17] Cui Yingyu, Xie Heng, Wang Jinfa. Potential biomedical properties of *Pinus massoniana* bark extract [J]. Phytother Res, 2005, 19(1): 34-38