

白杨素与咖啡酸苯乙酯抗肿瘤活性比较

王月华¹, 常化松¹, 尹旭升², 刘新迎², 玄红专^{1*}

¹聊城大学生命科学学院, 聊城 252059; ²山东省蜂业与蜂产品质量检验所, 泰安 271000

摘要: 研究白杨素和咖啡酸苯乙酯对不同肿瘤细胞的细胞毒性。正常培养的乳腺癌细胞(MCF-7、MDA-MB-231)、肺腺癌细胞(A549)、宫颈癌细胞(HeLa)及血管内皮细胞(HUVECs)经不同浓度的白杨素和咖啡酸苯乙酯(20, 40, 80, 160 μM)分别处理24和48 h, 倒置显微镜观察细胞形态, SRB法检测细胞存活率, 吖啶橙染色和Hoechst 33258检测了对MDA-MB-231细胞凋亡的影响; 划痕法检测了对细胞迁移的影响; 荧光探针DCFH-DA、JC-1检测细胞内活性氧(ROS)和线粒体膜电位, 免疫细胞化学法检测了NF- κ B p65水平。结果表明, 白杨素和咖啡酸苯乙酯以时间和剂量依赖的方式抑制肿瘤细胞增殖和迁移, 上调MDA-MB-231细胞内的ROS, 下调细胞内的线粒体膜电位和NF- κ B p65水平。白杨素和咖啡酸苯乙酯是潜在的抗肿瘤活性的天然产物。

关键词: 白杨素; 咖啡酸苯乙酯; 抗肿瘤

中图分类号: R73

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.6.004

Comparison of Anti-tumor Activity of Chrysin and Caffeic Acid Phenethyl Ester

WANG Yue-hua¹, CHANG Hua-song¹, YIN Xu-sheng², LIU Xin-ying², XUAN Hong-zhuan^{1*}

¹*School of Life Science, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China;*

²*Apidology and bee product quality inspection institute of Shandong Province, Taian 271000, China*

Abstract: To study the anti-tumor activities of chrysin and caffeic acid phenethyl ester (CAPE). The normal cultured human breast cancer (MCF-7, MDA-MB-231), human cervical cancer cells (HeLa), human lung carcinoma (A549) and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were treated with different concentrations of chrysin and caffeic acid phenethyl ester (20, 40, 80, 160 μM) for 24 and 48 h, respectively. The cell viability was measured by SRB method. Hoechst 33258 staining and acridine orange staining were used to observe apoptotic morphology and nuclear fragmentation, respectively. The cell migration was detected by scratch method. Intracellular reactive oxygen species (ROS) level and mitochondria membrane potential were determined by utilizing a fluorescent probe, 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and JC-1, and the level of NF- κ B p65 was tested by immunofluorescence. The results showed that chrysin and CAPE inhibited different tumor cells proliferation and migration, and upregulated ROS level and downregulated mitochondrial membrane potential and NF- κ B p65 levels. Chrysin and caffeic acid phenethyl ester were potential anti-tumor agents.

Key words: chrysin; caffeic acid phenethyl ester; anti-tumor

白杨素和咖啡酸苯乙酯(CAPE)是蜂胶中两种主要功效成分, 均具有如抗细菌、抗氧化、抗炎、抗肿瘤以及免疫调节等功效^[1-4]。在9种不同产地的中国蜂胶中, 白杨素的含量约为2.52~6.38%, CAPE的含量为0.08~1.71%^[5]。由此可以看出, 在蜂胶中白杨素的含量高于CAPE, 但这是否意味着蜂胶在发挥生物学功效时白杨素的贡献比CAPE大。因

此, 有必要比较白杨素与CAPE的功效, 以探讨蜂胶在发挥生物学活性时主要功效成分的作用。本研究主要比较了同等剂量的白杨素和CAPE的抗肿瘤功效, 对明确这两种成分在蜂胶发挥抗肿瘤功效中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DMEM培养基(美国Gibco公司)、胎牛血清(美国Hyclone公司); 胰酶、磺基若丹明B(SRB)、Hoechst 33258、吖啶橙(AO)、DCFH探针、JC-1探针

收稿日期: 2016-12-19 接受日期: 2017-03-02

基金项目: 国家自然科学基金(31672499); 山东省高等学校科技计划(J16LE21); 山东省农业创新体系(SDAIT-24-05)

*通信作者 Tel: 86-635-8230739; E-mail: xuanhongzhuan@lcu.edu.cn

(美国 Sigma 公司);细胞培养皿、96 孔板(美国 Falcon 公司);Tris(上海生工),其它试剂均为分析纯。

MCF-7、MDA-MB-231、A549、HeLa 和 HUVECs 细胞由本实验保存。

1.2 主要仪器

Heal Force 生物安全柜、Heal Force CO₂ 培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司);TE2000S 倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);MK3 酶标仪(芬兰雷勃公司);AR2140 电子分析天平(美国奥豪斯公司);Milli-Q Synthesis 超纯水(美国密理博公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞的培养

MCF-7、MDA-MB-231、A549、HeLa 细胞培养在添加 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中;HUVECs 细胞培养在添加 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。孵育条件为:5% CO₂、37 °C、饱和湿度 CO₂ 培养箱中。倒置相差显微镜下观察细胞形态。

1.3.2 细胞存活率的测定

将处于对数生长期的细胞按 4000 个/孔种植到 96 孔板,37 °C、5% CO₂ 孵育,待肿瘤细胞细胞长到 60% 以上,血管内皮细胞长到 80% 以上,除正常组外所有处理组分别经不同浓度的白杨素和 CAPE 分别处理 24 和 48 h 后,弃细胞培养液,用 10% 三氯乙酸 4 °C 固定 1 h,然后用 SRB 染色 10 min,晾干,100 mM Tris 碱溶解,在 492 nm 处测吸光值。

细胞存活率(%) = (处理组 OD 值/对照组 OD 值) × 100%

1.3.3 细胞核凝集和片段化测定

将处于对数生长期的细胞按 4 × 10⁴ 个/孔种植到 24 孔板中,37 °C、5% CO₂ 孵育,待肿瘤细胞细胞长到 60% 以上,加药处理 24 h,弃培养液,用 1 × PBS 冲洗细胞,加入吖啶橙染液 1 min,弃吖啶橙染液,用 1 × PBS 冲洗两次,倒置相差显微镜观察、分析结果。

1.3.4 细胞凋亡检测

将处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞按 4 × 10⁴ 个/孔种植到 24 孔板中,37 °C、5% CO₂ 孵育,待肿瘤细胞细胞长到 60% 以上,加药处理 24 h,弃培养液,用 1 × PBS 冲洗细胞,将 Hoechst 33258 应用液代替细胞培养液,37 °C 孵育 15 min;弃 Hoechst 33258 染液,加入 PBS 倒置相差显微镜观察、分析结果。

1.3.5 细胞迁移率的测定

将处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞按 4 × 10⁴ 个/孔种植到 24 孔板中,37 °C、5% CO₂ 孵育,肿

瘤细胞长到 60% 以上,用无菌枪尖在单层细胞层划出 1 mm 的伤口,用 PBS 洗三遍,加药处理 48 h,在划痕形成后的 0、24、48 h,倒置相差显微镜观察、分析结果。

1.3.6 细胞内活性氧的测定

将处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞按 8 × 10⁴ 个/孔种植到共聚焦小皿中,37 °C、5% CO₂ 孵育,待肿瘤细胞长到 60% 以上,加药处理 24 h,弃培养液,用 1 × PBS 冲洗细胞,将 DCHF 应用液代替细胞培养液,37 °C 孵育 30 min;弃 DCHF 染液,用 1 × PBS 冲洗两次,加入 DMEM 原液用激光扫描共聚焦显微镜观察、分析结果。

1.3.7 细胞内线粒体膜电位的测定

将处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞按 8 × 10⁴ 个/孔种植到共聚焦小皿中,37 °C、5% CO₂ 孵育,待肿瘤细胞长到 60% 以上,加药处理 24 h,弃培养液,用 DMEM 原液冲洗细胞,将 JC-1 应用液代替细胞培养液,37 °C 孵育 20 min;弃 JC-1 染液,用 DMEM 原液冲洗两次,加入 DMEM 原液用激光扫描共聚焦显微镜观察、分析结果。

1.3.8 细胞内 NF-κB P65 的测定

将处于对数生长期的细胞 MDA-MB-231 按 8 × 10⁴ 个/孔种植到共聚焦小皿中,37 °C、5% CO₂ 孵育,待肿瘤细胞长到 60% 以上,加药处理 24 h,弃培养液,用 0.1 M PBS 冲洗细胞三次,4% 多聚甲醛固定 15 min,5% 正常血清封闭液应用液室温封闭,加入一抗和二抗稀释液,0.1 M PBS 冲洗细胞三次,PI 应用液染色 15 min,弃 PI 染液,用超纯水冲洗三次,加入 0.1 M PBS 用激光扫描共聚焦显微镜观察、分析结果。

1.4 数据统计

采用 SPSS v11.5 软件包统计分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm S$)表示,采用 *t* 检验进行统计学分析,*P* < 0.05 为差异显著。

2 实验结果

2.1 不同浓度的白杨素和 CAPE 抗肿瘤活性

由图 1 可以看出,不同浓度的白杨素和 CAPE 能够显著抑制乳腺癌(MCF-7、MDA-MB-231)、肺癌 A549 细胞和宫颈癌 HeLa 细胞的增殖,且同浓度的 CAPE 较白杨素效果更显著,并呈现时间和剂量依赖性,对正常培养的 HUVECs,白杨素高于 40 μM 和 CAPE 高于 20 μM 具有细胞毒性(**P* < 0.05, ***P* < 0.01)。

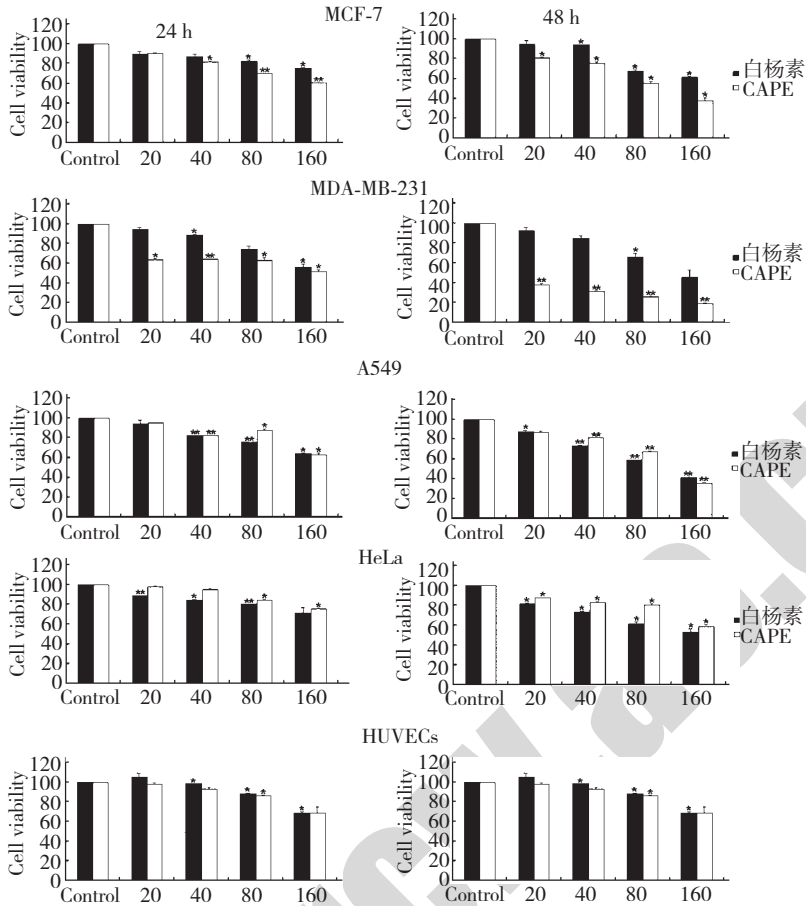


图 1 不同浓度的白杨素和 CAPE 对不同细胞存活率的影响

Fig. 1 Effects of chrysin and CAPE on cell viability in different cells for 24 and 48 h

2.2 白杨素和 CAPE 对细胞核凝集和片段化的影响

由图 2 可以看出,不同浓度的白杨素和 CAPE

处理 MDA-MB-231 细胞后,经 AO 染色可以看出白杨素和 CAPE 显著促进酸性膜泡的增多。

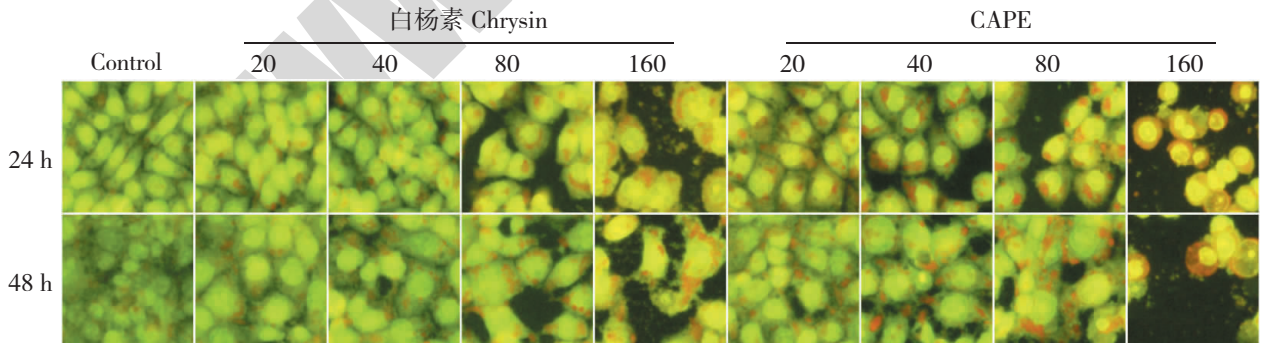


图 2 不同浓度的白杨素和 CAPE 对细胞核的影响

Fig. 2 Effects of chrysin and CAPE on nuclear in MDA-MB-231 cells for 24

2.3 白杨素和 CAPE 对细胞凋亡的影响

由图 3 可以看出,不同浓度的白杨素和 CAPE 处理 MDA-MB-231 细胞后,经 Hoechst33258 染色

后,细胞核断裂数目明显增加,且同浓度的 CAPE 较白杨素效果更显著。

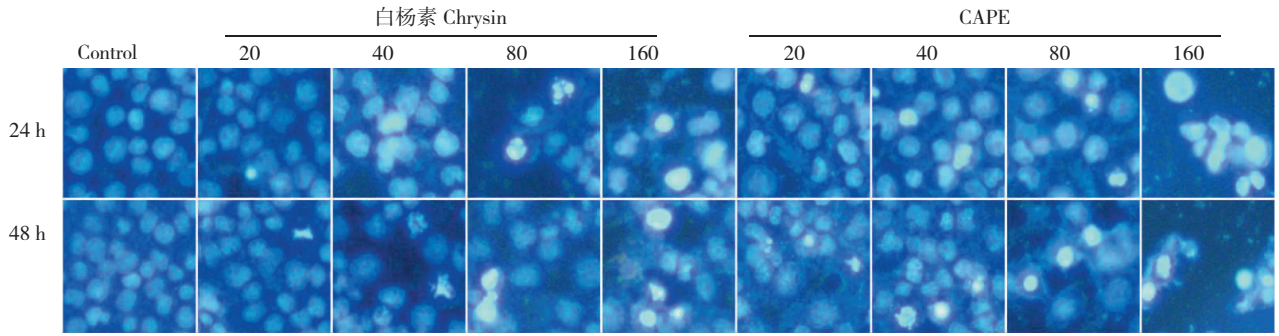


图3 不同浓度的白杨素和 CAPE 对细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effects of chrysin and CAPE on apoptosis in MDA-MB-231 cells for 24

2.4 白杨素和 CAPE 对细胞迁移率的影响

由图 4 可以看出,白杨素和 CAPE 能够明显抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移,且同浓度的 CAPE 较

白杨素抑制效果更显著,48 h 时,CAPE 在浓度为 160 μM 细胞的迁移率为 0.03 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

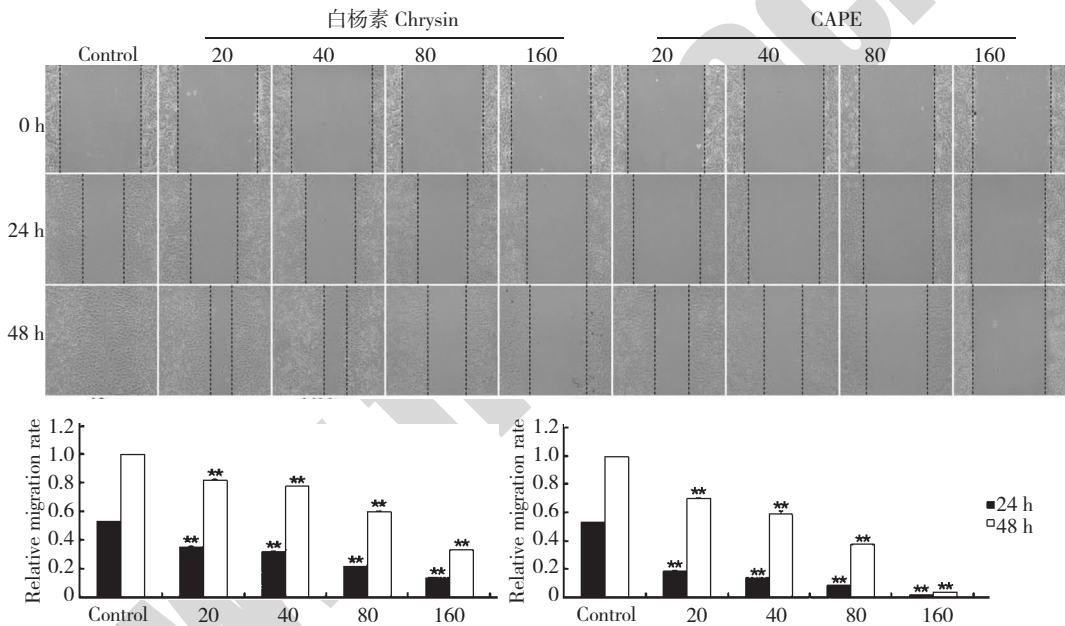


图4 不同浓度的白杨素和 CAPE 对细胞迁移的影响

Fig. 4 Effects of chrysin and CAPE on cell migration in MDA-MB-231 cells for 24 and 48 h

2.5 白杨素和 CAPE 对细胞内活性氧和线粒体膜电位的影响

由图 5 可以看出,80 μM 白杨素和 CAPE 处理 MDA-MB-231 细胞后,显著提高了细胞内 ROS 的水平,降低了线粒体膜电位的水平,且 CAPE 影响更显著 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

2.6 白杨素和 CAPE 对细胞内 NF- κ B P65 的影响

由图 6 可以看出,80 μM 白杨素和 CAPE 处理 MDA-MB-231 细胞后,显著降低了细胞内 NF- κ B p65 的水平(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

3 讨论与结论

蜂胶的化学成分非常复杂,Bankova 把世界不同地区的蜂胶大致分为六类,分别是:杨树型蜂胶、桦树型蜂胶、巴西绿胶、红胶、太平洋蜂胶以及加那利群岛蜂胶^[6],不同蜂胶之间化学成分相差很大,因而,根据蜂胶的化学成分很难建立蜂胶的质量标准^[7,8]。中国蜂胶属于杨树型蜂胶,其主要成分为酚酸类物质和黄酮类化合物^[9,10],白杨素和 CAPE 作为中国蜂胶中主要成分,目前很多研究表明其能

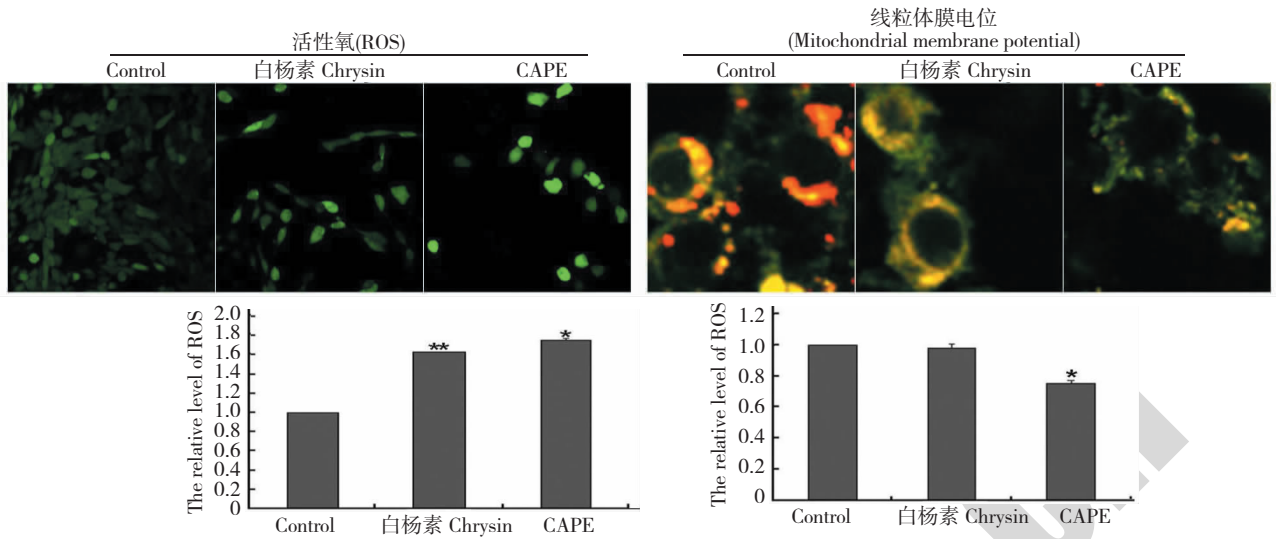


图5 不同浓度的白杨素和 CAPE 对 ROS 和线粒体膜电位的影响

Fig. 5 Effect of chrysin and CAPE on the levels of ROS and Mitochondrial membrane potential for 24 h

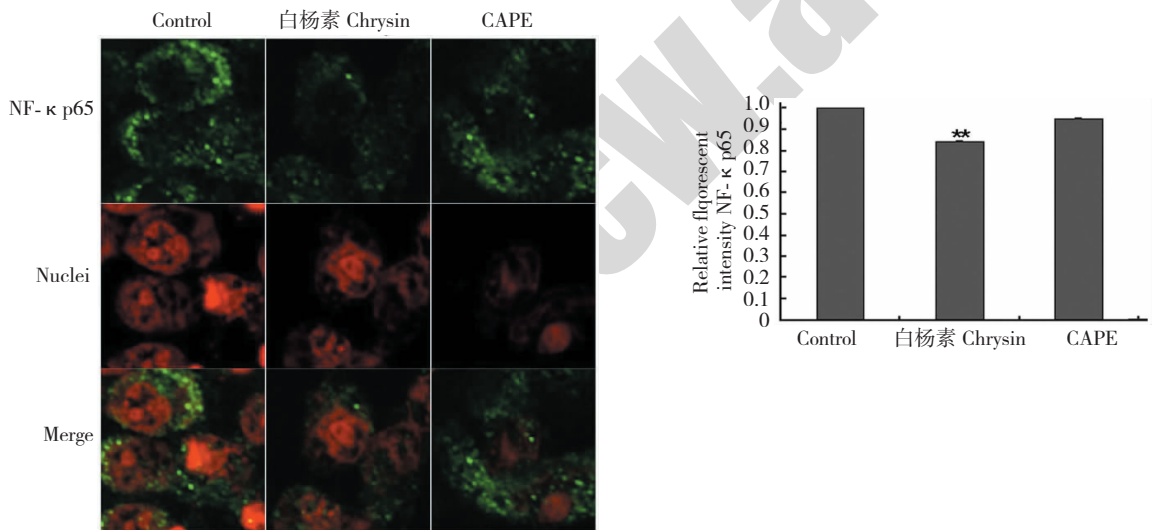


图6 不同浓度的白杨素和 CAPE 对 NF-κB p65 的影响

Fig. 6 Effects of different concentrations of chrysin and CAPE on NF-κB p65 level for 24 h

够抑制肺癌、肝癌、鼻咽癌和乳腺癌等细胞的增殖^[11-18]。因此,有学者提出建立以功效成分为依据的蜂胶质量评价体系^[13-15],那么首先要明确功效成分的含量与功效之间的问题。

本研究以白杨素和 CAPE 的抗肿瘤功效为突破口,通过不同的指标检测了白杨素和 CAPE 的功效。由结果可以看出,白杨素和 CAPE 均具有较好的抗肿瘤功效,但同等浓度的 CAPE 比白杨素对 MCF-7、MDA-MB-231 细胞的抑制功效更强;而且,白杨素和 CAPE 均可以通过促进细胞凋亡,上调 ROS,破坏线粒体膜电位以及抑制 NF-κB p65 的活性发挥抗肿瘤

功效,说明白杨素和 CAPE 抗肿瘤的作用机理相似。总之,本实验的研究揭示蜂胶中功效成分的作用不是依赖于含量的高低,而在于功效的大小。白杨素和 CAPE 抗肿瘤活性和机理的研究将为蜂胶的进一步开发奠定基础。

参考文献

- 1 Wu J, Omene C, Karkoszka J, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. *Cancer Lett*, 2011, 308:43-53.