

文章编号 :1009-038X(2001)02-0205-03

柠檬苦素类化合物对人乳腺癌细胞(MCF-7)的生长抑制及细胞周期动力学的影响

唐莉莉¹, 曾祥斌², 田庆国¹, 丁霄霖¹

(1. 无锡轻工大学食品学院, 江苏无锡 214036; 2. 上海医科大学公共卫生学院, 上海 200032)

摘要:为了探讨柠檬苦素类似物对乳腺癌细胞 MCF-7 生长抑制和对细胞周期的影响,应用 MTT 法和流式细胞仪检测癌细胞株生长和细胞周期。结果显示柠檬苦素类似物能明显抑制 MCF-7 的生长,抑制率高于 70%,并随作用时间和剂量增加其效果增强。柠檬苦素可以影响细胞周期 G₂/M 期。柠檬苦素类似物可以明显抑制 MCF-7 的增殖,并有可能是通过阻滞细胞在 G₂/M 期而降低其生长能力。

关键词:柠檬苦素类似物;乳腺癌细胞;生长抑制;细胞周期

中图分类号:TS 218

文献标识码:A

The Effect of Limonoid on the Growth-Inhibition and Cell Cycle of Human Mammary Cancer Cell Line(MCF-7)

TANG Li-li¹, ZENG Xiang-bin², TIAN Qing-guo¹, DING Xiao-Lin¹

(1. School of Food Science & Technology, Wuxi Light Industry University, Wuxi 214036, China; 2. School of Public health, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

Abstract: To explore the effect of Limonoid on the growth-inhibition and cell cycle of human mammary cancer cell lines(MCF-7), the growth and cell cycle of MCF-7 were detected by MTT assay and FCM. The Limonoid can inhibit the growth of MCF-7. The rate of inhibition was more than 70 percent and related to dose and time. The cells show G₂/M arrest. Limonoid has effects on inhibiting MCF-7, and the mechanism of action may be associated with influence of the G₂/M arrest.

Key words: limonoid; human mammary cancer cell; growth-inhibition; cell cycle

柠檬苦素类化合物(limonoid)是三萜类的植物次生代谢产物,主要存在于芸香科(Rutaceae)和桉科(Meliaceae)植物中,尤其在柑桔属(Citrus)的种子及皮中含量丰富,迄今为止,已发现 300 余种柠檬苦素类似物。柠檬苦素类似物是引起桔汁苦味的主要原因之一^[1],最近的研究表明,柠檬苦素类似

物可以激活体内主要的解毒酶谷胱甘肽 S-转移酶的活性,大量的动物试验也表明,柠檬苦素类化合物可以抑制由化学物质引起的肝癌、小肠癌、口腔癌和胃癌等^[2~4]。作者报道了柠檬苦素类似物对人乳腺癌细胞 MCF-7 的抑制作用及可能机制。

收稿日期 2000-03-25,修订日期 2000-11-09.

作者简介:唐莉莉(1964-),女,江苏无锡人,工学硕士,副教授。

万方数据

1 材 料

1.1 细胞株

人类乳腺癌细胞株MCF-7 ,购自中科院上海细胞生物研究所.

1.2 主要试剂

RPMI-1640、胰蛋白酶为 Gibco 产品 ;二甲亚砜 (DMSO)和噻唑蓝 (MTT)为 Sigma 产品 ;细胞培养基为含 10% 胰岛素、10% 小牛血清并加入双抗的 RPMI-1640 培养基柠檬苦素类似物样品由无锡轻工大学田庆国博士提供.

1.3 主要器材

流式细胞仪 FACS Calibur 美国 Becton Dickinson 公司产品 ;Bio-Tek 全自动酶标分析仪、96 孔培养板 美国 Corning-Costar 公司产品.

2 方 法

2.1 柠檬苦素类似物溶液的制备

柠檬苦素类似物溶解于二甲基亚砜 (DMSO) 中 ,配成 100 mg/mL 储存液于 -20 ℃ 备用.临用前用培养液配成 500 μg/mL 4 倍递减稀释.

2.2 细胞生长抑制实验 (MTT 法)

用 0.25% 胰蛋白酶消化培养细胞 ,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液配成单个细胞悬液 ,以每孔 1.0×10^4 细胞接种于 96 孔培养板中 ,每孔体积 200 μL.

将培养板移入 CO₂ 培养箱中 ,在 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养.培养结束后 ,每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20 μL ,37 ℃ 继续孵育 4 h ,终止培养 ,小心吸弃孔内培养上清液.每孔加入 150 μL DMSO ,振荡 10 min ,使结晶物充分溶解.选择 490 nm 波长 ,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值 ,记录结果 ,每浓度设 3 个平行孔.

2.3 柠檬苦素对细胞周期的影响

将乳腺癌细胞按 5×10^5 密度接种于 60 mL 培养瓶中 ,24 h 后 ,加入不同剂量的柠檬苦素 ,染毒时间为 24 h ,染毒结束后 ,胰酶消化 ,细胞放置 37 ℃ 水浴 ,PBS 洗一遍 ,离心加入 0.1% TritonX-100 的 PBS 室温放置 3 min ,PBS 洗二遍 ,调节细胞每管 10^6 ,RNase 处理 37 ℃ 水浴 15 min ,离心后加入溴化丙啶 (PI ,15 μg/mL) ,放置暗处 1 h 后上机 ,上机前用滤网过滤.采集 3 000 个细胞 ,用 ModFit 软件分析细胞周期各时相百分比列.

3 结 果

3.1 不同剂量柠檬苦素类似物对癌细胞生长抑制的影响

培养 48 h 后 MTT 测定 ,测定结果表明 ,柠檬苦素类似物能够有效地抑制 MCF-7 细胞生长 ,且有剂量效应关系 ,5 种样品高剂量组的抑制率均超过 70% ,见图 1.

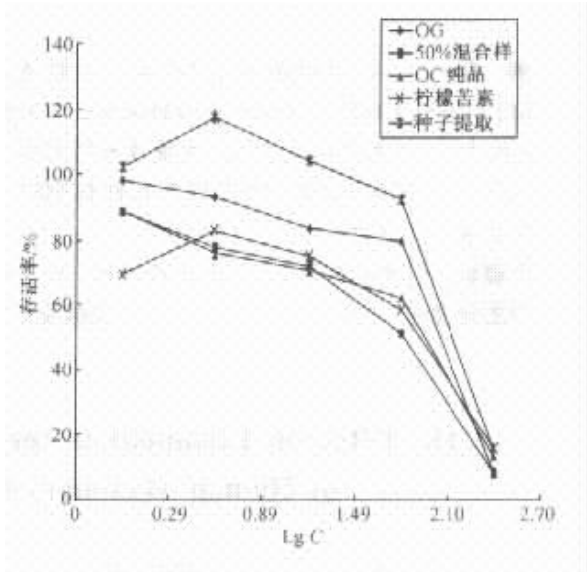


图 1 柠檬苦素类似物对癌细胞存活率的影响

Fig.1 The effect of limonoid on the livability of human mammary cancer cell line MCF-7

3.2 作用天数对细胞存活率的影响

为观察作用时间对细胞存活率的影响 ,分别测定作用 24、48、36 h 后癌细胞的存活率.图 2 可见 ,作用时间与存活率呈负相关.

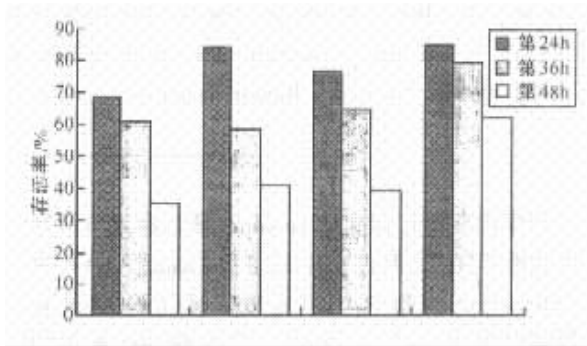


图 2 作用时间对细胞存活率的影响(样品质量浓度为 30 mg/mL)

Fig.2 The effect of time on the livability of cells(the concentration is 30 g/mL

3.3 柠檬苦素对乳腺癌细胞周期动力学的影响

收集对照组及柠檬苦素剂量组 MCF-7 细胞进行流式细胞仪测试 ,结果见表 1. G_0/G_1 、S 期细胞

减少 , G_2/M 期细胞增多 ,这个结果提示 ,柠檬苦素通过阻滞细胞在 G_2/M 期来抑制 MCF-7 细胞的增殖.

表 1 柠檬苦素对乳腺癌细胞周期动力学的影响
Tab.1 The effect of limonoid on the cell cycle of human

质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	(G_0/G_1)/ %	S/%	(G_2/M)/ %
10	62.10	29.34	8.57
20	59.60	30.74	9.65
30	54.46	33.97	11.57
40	59.14	26.51	14.35
50	57.48	25.49	17.03

4 结 论

乳腺癌是发达国家的高发生率疾病 ,每年以 2% 的速率递增^[5]. 目前 ,我国也呈高增长趋势. 流行病学调查显示 ,植物性食物可以一定程度上减少乳腺癌的危险性. 因此 ,寻求食物中的效抗癌因子已成当今保健的新时尚. 我国自古以来就有用柑桔之成分治病的历史 ,对柠檬苦素类似物最初的研究是为了将其从柑桔中除去 ,以提高柑桔制品的商品价值. 而现在已注意到柠檬苦素类似物的生物学活

性作用. 作者研究显示 ,柠檬苦素类似物在体外能显著抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 的生长 ,且存在剂量效应关系.

正常的细胞周期是细胞进行正常代谢和增殖过程的重要保证 ,细胞周期各时相参数的改变 ,将干扰和破坏细胞的正常功能 ,并因此达到抑制癌细胞生长的目的. 用柠檬苦素处理乳腺癌细胞后观察各时相细胞增殖周期的移行变化 ,发现柠檬苦素能影响 MCF-7 细胞周期 , G_1 、S 期细胞减少 , G_2/M 期细胞增多 ,显示柠檬苦素通过阻滞细胞在 G_2/M 期来抑制 MCF-7 细胞的增殖. 细胞周期中有两个最为基本的调控点 ,一个位于 G_1 期和 S 期的过渡时期 ,决定着是否进入细胞周期 ;另一个位于 G_2 与 M 期之间 ,又叫 G_2/M 过渡点. G_2/M 期阻滞可能也是 DNA 的修复期 ,使损伤 DNA 在染色体分离前得到修复 ,不能修复者则退出增殖周期 ,进入凋亡途径. 本次研究也观察到用柠檬苦素处理 48 h 后出现凋亡细胞.

柠檬苦素类似物作为天然抗癌剂的实际应用还有待于更全面的研究. 开展柑桔中柠檬苦素类似物的研究 ,对提取更多的生物活性物质和开发更多的功能性食品 ,很有探索价值.

参考文献 :

[1] CHAAMPAGNE D E , KOUL O , ISMAN M B , *et al.* . Biological activity of limonoids from the rutales[J] . **Phytochemistry** , 1992 , 31 : 377~394.

[2] LAM Lkt , LI Ying , HASEGAWA S. Effect of citrus limonoids on glutathione S-transferase activity in mice[J] . **J Agric Food Chem** , 1989 , 37 : 878~880.

[3] MILLER E G , FANOUS R , RIVERA-HIDALGO F , *et al.* . The effect of citrus limonoids on hamster buccal pouch carcinogenesis[J] . **Carcinogenesis** , 1989 , 10 : 1535~1537.

[4] MILLIER E G , GONZALES-SANDERS A P , COUVILLON A , *et al.* . Inhibition of hamster buccal ppuch carcinogenesis by limonin 17- β -D-glucopyranoside[J] . **Nutr Cancer** , 1992 , 17 : 1~7.

[5] PISANI. Breast Cancer : Geographic Variation and Risk Factors[J] . **J Environ Pathol Toxicol Oncol** , 1992 , 11 : 313~316.

(责任编辑 朱 明)