

文章编号:1673-1689(2005)06-0034-04

玉米蛋白粉中玉米黄素对人口腔鳞癌 细胞株 KB 增殖的抑制

孙 震, 姚惠源

(江南大学 食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 研究了玉米蛋白粉中玉米黄素的抗肿瘤活性。采用体外培养的人癌细胞株——人口腔鳞癌 KB 细胞作为对象, 观察玉米黄素对抑瘤活性、细胞周期的影响。发现玉米黄素对 KB 细胞 24 h 的半数抑制浓度 IC_{50} 为 $35 \mu\text{mol/L}$, 在 $20 \mu\text{mol/L}$ 时即明显抑制 KB 细胞的对数生长; 细胞周期分析显示时相左移, G_1 期细胞百分率增多, S 期、 $G_2 + M$ 期百分率降低。DNA 凝胶电泳显示 $30 \mu\text{mol/L}$ 玉米黄素作用 72 h 能使 KB 细胞的 DNA 发生明显的降解。因此从玉米蛋白粉中提取的玉米黄素能明显抑制 KB 细胞生长, 其抗肿瘤活性强, 对细胞周期的影响提示 G_0 期阻滞。

关键词: 玉米黄素; 人口腔鳞癌细胞; 抗肿瘤; 细胞周期

中图分类号: R 979.1

文献标识码: A

Inhibitory Effects of Zeaxanthin from Corn Gluten Meal on Human Oral Squamous Cell Carcinoma

SUN Zhen, YAO Hui-yuan

(Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: AIM: To determine the antitumor effects of zeaxanthin from corn gluten meal against human oral squamous carcinoma KB cellline in vitro. METHODS: Antitumor activity was measured using IC_{50} , cell growth curve and the cell cycle were analyzed by flowcytometric (FCM) technique and DNA electrophoresis. RESULTS: IC_{50} of zeaxanthin was $35 \mu\text{mol/L}$ on KB cellline when incubation for 24h. Zeaxanthin obviously inhibited the growth curve of KB cell at $20 \mu\text{mol/L}$, in the tumor cells of treated group. FCM analysis revealed that zeaxanthin KB cells percentage of G_2/M phase, the S phase, and G_1 phase decreased, but percentage of $G_1 + G_0$ phase increased. The tests of Agarose gel electrophoresis of DNA from cells treated with zeaxanthin revealed "DNA ladder". CONCLUSION: Zeaxanthin could remarkably inhibited KB cellline proliferation and showed a high antitumor activity. The effect of zeaxanthin on cell cycle might be the one of the important reasons for inhibiting carcinoma cell growth.

Key words: zeaxanthin; oral squamous carcinoma; anti-tumor; cell cycle.

叶黄素是含氧胡萝卜素, 分子中含有一个或多个氧原子, 形成羟基、羰基、甲基或环化物等结

收稿日期: 2004-12-15; 修回日期: 2005-02-25.

基金项目: 国家“863”计划项目(2001AA248011-01)资助课题.

作者简介: 孙震(1966-), 女, 山西太原人, 副教授, 食品科学与工程博士研究生.

构。玉米黄素是自然界存在最广泛的叶黄素,是人类日常膳食中的主要类胡萝卜素,也是人类血液和组织中的主要类胡萝卜素。大量流行病学研究表明^[1]:血液中较高的类胡萝卜素水平可降低癌症、心血管疾病和其他老化性疾病的发病率。Snodderly^[2]和 Chew^[3]分别在 1995 年和 1996 年提出,玉米黄素对减少癌症的发生、发展、增强免疫功能有着独特的生物功能。匈牙利学者 Gyorgy Rumi Jr^[4]用 HPLC 法对 40 名健康人与 98 名患有不同种类恶性肿瘤的患者(44 名肠癌患者、21 名胃癌患者、15 名肝脏腺癌患者、10 名胰腺癌患者以及 8 名食道癌患者)的血清中类胡萝卜素的含量进行了测定。结果发现:除了胰腺癌的患者,其余患者血清中维生素 A($P<0.01$)和玉米黄素($P<0.01$)的含量均显著低于健康人,其他种类的类胡萝卜素 α -隐黄质、 β -隐黄质和 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素以及黄体素的含量与健康人均没有显著差异。

黄玉米中含有丰富的类胡萝卜素,主要包括黄体素、玉米黄素、 β -隐黄素、 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素、新黄素和金莲花黄素等成分。在玉米中主要以类胡萝卜素-蛋白质复合物的形式存在。在玉米淀粉的生产中,类胡萝卜素与蛋白质一起被分离,富集于副产物玉米蛋白粉中,用于饲料工业和发酵行业,其中所富含的类胡萝卜素尤其是黄体素和玉米黄素未能得到充分合理的利用。

作者通过体外细胞培养方法,研究玉米蛋白粉中玉米黄素对口腔上皮细胞癌 KB 增殖的影响,并采用流式细胞仪和 DNA 凝胶电泳等手段研究玉米黄素抑制 KB 细胞增殖的机理,为玉米黄素的开发、利用以及在癌症的预防和治疗上提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 玉米蛋白粉中类胡萝卜素的提取

玉米蛋白粉+工业酒精→以料液质量体积比 1 g:10 mL 进行混合→磁力搅拌 6 h→过滤→滤饼用无水乙醇重复提取 3~4 次(至滤液无色为止)→收集滤液→旋转蒸发至干(水浴温度为 55 ℃)→用乙醇提取,即为类胡萝卜素提取液→放入棕色瓶内备用,低温保存(以上操作均应在避光条件下进行)^[5]。

1.2 玉米蛋白粉中玉米黄素的分离

选用氧化镁薄层板,以 V(石油醚):V(丙酮)=65:35 为展开剂^[6],对黄体素和玉米黄素进行薄层层析制备。刮取相应的斑块,用无水乙醇溶解,过滤,并用 N_2 气浓缩,避光保存于 -18 ℃,

2 周内使用,临用前用无水乙醇配成所需体积分数加入培养液中。

1.3 细胞株与细胞培养

口腔鳞癌 KB 细胞系由江南大学生物工程学院药理实验室保存。培养基为 RPMI-1640 培养液(含体积分数为 10% 的小牛血清、0.25 g/dL 双抗以及 1 g/dL 谷氨酰胺,pH 值 7.2~7.6)。细胞接入 50 mL 培养瓶中,37 ℃,体积分数 5% 的 CO_2 ,于饱和湿度空气中培养。0.4 g/dL 台盼蓝鉴定活细胞数应为 98% 以上。

1.4 玉米黄素对细胞生长的影响

将对数生长期的 KB 细胞,用完全培养基悬浮并计数,调整细胞浓度 3×10^4 个/mL,然后将细胞接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μ L,培养 24 h 后,将不同浓度的玉米黄素加入各培养孔中,每种浓度设 4 个复孔,培养 24,48,72 h,每天半量换液,同时设不含玉米黄素的乙醇为对照组,用 MTT 法测定细胞的存活率。每个试验重复两次以上。

1.5 对细胞生长曲线的影响

将对数生长期的 KB 细胞,用完全培养基悬浮并计数,调整细胞浓度 5×10^4 个/mL,然后将细胞接种于 24 孔培养板中,每孔 1 mL,将不同浓度的玉米黄素加入各培养孔中,每种浓度设 3 个复孔,同时设含体积分数 1:80 乙醇 3 个孔为对照,每隔 24 h 取出,进行细胞计数,每个浓度的细胞数取 3 个复孔的平均值,绘制细胞生长曲线。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期分布

将 KB 细胞接种于 50 mL 细胞培养瓶中,24 h 后加入 30,40 μ mol/L 的玉米黄素,分别继续培养 24,48,72 h,每天半量换液一次,作用结束后,用 0.25% 胰蛋白酶消化,PBS 漂洗,体积分数为 70% 的乙醇溶液固定,调细胞浓度为 1×10^6 个/mL。1 500 μ L PI-碘化丙啶(含 RNase 100 μ g/mL)避光作用 15 min 以上^[7],200 目尼龙筛网过滤,以保证样品呈单细胞悬液状态,上机检测。

于流式细胞仪上作 DNA 细胞周期分析。数据处理采用 B. D 公司 Cellfit 软件,每个样品均分析 10 000 个细胞。

增殖指数(proliferation index PI)=[(S+G₂M)/(G₀/G₁+G₂M)] $\times$ 100%

1.7 DNA 提取及凝胶电泳检测

将收集的细胞(3×10^6),1 500 g 离心 5 min,弃上清液。PBS 洗涤两遍,加入 DNA 抽提缓冲液(10 mmol/L Tris-Cl,pH 8.0;150 mmol/L NaCl;10 mmol/L EDTA;质量分数 0.4% SDS)0.5 mL,

移入 Eppendorff 管,加入蛋白酶 K,终质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,充分混匀,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 3 h,不时振摇。取出,加入等体积 0.5 mol/L Tris-Cl(pH 8.0)平衡的酚,缓慢来回颠倒 10 min,5 000 g 离心 15 min。吸出上清液于另一离心管中,加入等体积 V(氯仿):V(异丙醇)=24:1 充分混匀,5 000 g 离心 15 min。吸出上清液,加入 2 倍体积无水乙醇及质量分数为 10%的 NaAc(pH 5.2)溶液,-20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。室温 12 000 g 离心沉淀 DNA,体积分数 70%乙醇洗 1 次后,室温干燥,适量 TE 溶解,加 RNA 酶 20 μg ,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h。取制备的 DNA 样品,1.5 g/dL 琼脂糖凝胶电泳约 2 h,电泳缓冲液为 TBE。紫外灯下观察 DNA 条带)并摄影。

2 实验结果

2.1 玉米蛋白粉中黄体素和玉米黄素纯度的鉴定

黄体素和玉米黄素样品的 TLC 图谱见图 1。

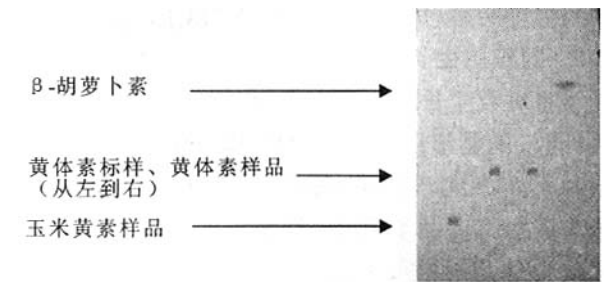


图 1 黄体素和玉米黄素样品的 TLC 图谱

Fig. 1 The TCL graph of the sample lutein and zeaxanthin

2.2 玉米黄素对 KB 细胞生长增殖的影响

玉米黄素对 KB 细胞存活率的影响见图 2。

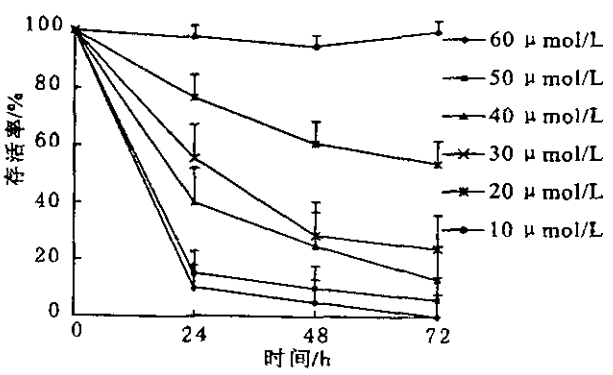


图 2 玉米黄素对 KB 细胞存活率的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of zeaxanthin on KB cell survival percentage

从图 2 中可以看出,玉米黄素对 KB 细胞的增殖具有显著的抑制作用。随着玉米黄素作用剂量和时间的增加,细胞存活率显著降低。且具有较强

的时间—效应和剂量效应。50~60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的玉米黄素作用 72 h,细胞存活率仅为 10%,而 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的玉米黄素作用 72 h,细胞存活率保持在 100%左右。24 h 时的 IC_{50} 约为 35 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

2.3 玉米黄素对 KB 细胞生长曲线的影响

玉米黄素对 KB 细胞生长曲线的影响见图 3。

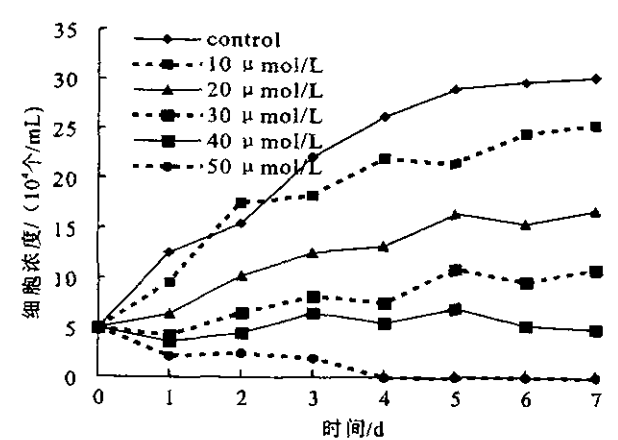


图 3 玉米黄素对 KB 细胞生长曲线的影响

Fig. 3 Effect of different concentrations of zeaxanthin on KB cell growth curve

从图 3 可以看出,人口腔鳞癌细胞对照组细胞生长曲线呈“S”形,接种后第二天开始快速生长,而经玉米黄素处理的细胞均受到不同程度的抑制,且随着玉米黄素浓度的增加,抑制作用越加明显,其中 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 剂量处理的细胞在 24 h 后受到明显抑制。

2.4 玉米黄素对 KB 细胞细胞周期的影响

玉米黄素对 KB 细胞细胞周期的影响见表 1。

表 1 玉米黄素对 KB 细胞细胞周期的影响

Tab. 1 Effect of different concentrations of zeaxanthin on cell cycle distribution

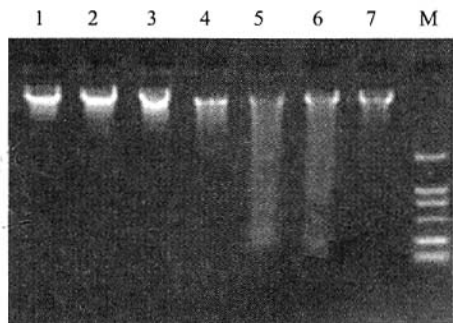
时间/ h	浓度/ ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	细胞周期分布			增殖指数 PI/%
		$G_0 + G_1$	S	$G_2 + M$	
24	对照	42.6	34.5	22.9	87.6
	30	50.8	27.4	21.8	67.8
	40	57.6	27.6	14.9	58.6
48	30	58.2	22.5	19.3	53.9
	40	57.9	22.5	19.6	54.5
72	30	62.8	22.8	14.4	48.2
	40	65.1	20.8	14.1	44.1

由表 1 可见,经玉米黄素处理后,随时间作用的延长,剂量的增加,和对照组相比, $G_0 + G_1$ 期细胞的百分率明显增加,S 期细胞百分率明显降低,细胞增殖指数(PI)也显著下降,但在 DNA 组直方图上并没有出现典型的凋亡细胞峰(亚 G_1 峰)。上述结果表明玉米黄素对 KB 细胞周期有明显的影

DNA 的复制受到阻滞后使之不能大量繁殖. 说明玉米黄素对 KB 细胞增殖的抑制是通过影响细胞 DNA 的合成,使其向正常细胞转化而实现的.

2.5 DNA 凝胶电泳观察 DNA“梯状带”

玉米黄素对 KB 细胞的 DNA 凝胶电泳图见图 4.



(1,3,5:30 $\mu\text{mol/L}$ 分别作用 24,48,72 h; 2,4,6:40 $\mu\text{mol/L}$ 分别作用 24,48,72 h; 7:对照; 8:marker)

图 4 玉米黄素对 KB 细胞的 DNA 凝胶电泳图

Fig. 4 Graph of different concentrations of zeaxanthin on DNA gel electrophoresis

由图 4 可以看出,玉米黄素在作用 KB 细胞 72 h 后,开始发生 DNA 断裂,并形成以 200 bp 左右为最小单位的 DNA 梯形电泳结果,处理 72 h 后形成的 DNA ladder“梯状带”明显,40 $\mu\text{mol/L}$ 处理 48 h 后 DNA 略有断裂,但形成的 DNA 片段较大.而处理 24 h 和对照均无 DNA ladder. 图 4 显示出随着玉米黄素作用时间的增加,KB 细胞 DNA 断裂明显.但在 72 h 处理后,DNA 电泳显示并不与剂量呈正相关.

3 讨 论

通过观察玉米黄素对体外培养的口腔鳞癌细

胞增殖的影响,发现 20 $\mu\text{mol/L}$ 以上的玉米黄素对 KB 细胞具有抑制作用,且呈剂量—效应关系;台盼蓝拒染法绘制的生长曲线变化趋势与 MTT 结果相符,说明结果可信.

将玉米黄素与 KB 细胞共培养后,流式细胞仪观察各时相细胞增殖周期的移行变化,可以看到 KB 细胞的细胞周期发生了明显的变化, G_1+G_0 期所占的比例逐渐增多,由 42.6% 增至 65.1%,S 期和 G_2/M 期所占的比例逐渐减少,分别由 34.5% 和 22.9% 减少至 20.8% 和 14.1%. 说明玉米黄素具有阻断肿瘤细胞在 G_1+G_0 期的作用,从而干扰了肿瘤细胞的正常的增殖活动,达到抑制肿瘤生长的作用. 肿瘤细胞的细胞周期动力学特点是细胞群主体分布在 DNA 合成活跃的 S 期,而分化细胞群主体细胞分布于 DNA 合成静止的 G_1/G_0 期. 化学物质对细胞周期中某一点或某一部分产生阻滞或延缓作用,可影响细胞在周期中的进程,导致细胞增殖的减慢或停止. 研究也表明肿瘤细胞的增殖指数 PI 明显下降,由 87.6% 下降至 44.1%. 但从 DNA 分布的直方图上并没有显示亚二倍体峰,说明玉米黄素对 KB 细胞的抑制,主要是改变其细胞周期,使肿瘤细胞向分化细胞群转变.

在 DNA 凝胶电泳中显示玉米黄素能将 KB 细胞的 DNA 降解成为 200 bp 的片断,形成 DNA“梯状带” Ladder,表明玉米黄素在一定程度上也能引起细胞核酸内切酶的改变,能显著诱导细胞发生凋亡.

综上所述,从玉米蛋白粉中提取的玉米黄素能够显著地抑制人口腔鳞癌细胞的增殖,但对玉米黄素抑制肿瘤细胞增殖的机制还有待进一步研究.

参考文献:

- [1] Vainio H, Rauralahti M. An international evaluation of the cancer preventive potential of carotenoids, *Cancer Epidemiol [J]*. *Biomarkers Prev*, 1998,7: 72—78.
- [2] Snodderly M. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins [J]. *Am J Clin Nutr*, 1995,62:1448—1461.
- [3] Chew B P, Wong M W, Wong T S. Effects of lutein from marigold extract on immunity and growth of mammary tumors in mice[J]. *Anticancer Res*, 1996,16:3689—3694.
- [4] Gyorgy R J, Zoltan M, Gyula T, *et al*. Changes of serum carotenoids in patients with esophageal,gastric, hepatocellular, pancreatic and colorectal cancer[J]. *J of Physiology*,2001,95:2239—2415.
- [5] Francisco D V, Octavio P. Correlation of HPLC and AOAC methods to assess all-trans-lutein content in Marigold flowers [J]. *J Sci Food Agric*, 1996,72:283—290.
- [6] Mohammed H S, Barrie T. Separation and identification of cis/trans carotenoid isomers[J]. *J Agric Food Chem*,1991,39: 1438—1443.
- [7] 姜泊. 细胞凋亡基础与临床[M]. 北京:人民军医出版社, 1999.