

文章编号:1673-1689(2007)04-0105-05

十字花科蔬菜提取物抗肿瘤作用的研究

吕静¹, 陶文沂¹, 程景才², 张家骥¹

(1. 江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 美国杰西联合研究中心, 江苏 无锡 214122)

摘要:研究了十字花科蔬菜提取物 6320(主要含异硫氰酸酯)的抗肿瘤活性。体外实验应用 MTT 法、观察细胞形态、测定细胞生长曲线、流式细胞仪分析细胞凋亡及细胞周期观察提取物 6320 对不同肿瘤细胞生长的影响。并通过建立小鼠 B16 实体瘤模型来考察提取物 6320 的体内抗肿瘤作用。结果表明提取物 6320 在体内外均可明显抑制肿瘤的生长及增殖, 并诱导细胞凋亡, 但有可能对机体的免疫系统造成一定的影响。

关键词:十字花科蔬菜; 异硫氰酸酯; 抗肿瘤; 小鼠 B16 黑色素瘤

中图分类号:S 635

文献标识码:A

Antitumor Effects of Extract from Cruciferous Vegetables

LÜ Jing, TAO Wen-yi, CHEN Jing-cai, ZHANG Jia-li

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. JC Company, Inc., Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The present study was to investigate antitumor effects of Extract from Cruciferous Vegetables 6320 (isothiocyanate, basically). In vitro, MTT assay, cell morphological changes, cell growth curve were used to observe the inhibitory effects of Extract 6320 on tumor cells. Cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. In vivo, the antitumor effect of Extract 6320 was evaluated by observation of growth inhibition of B16 melanoma inoculated into mice. The results suggest that Extract 6320 can obviously inhibit the growth and proliferation of tumor cells in vitro and in vivo, induce apoptosis of B16 cells, but Extract 6320 have side effects on immunologic system possibly.

Key words: cruciferous vegetables; isothiocyanate; antitumor; B16 melanoma

流行病学研究结果表明经常食用辣根、芥末、甘蓝、花椰菜、卷心菜等十字花科蔬菜能够降低人们患肺癌、胃癌、前列腺癌、肠道癌的危险^[1-3]。异硫氰酸酯是天然存在于各种十字花科蔬菜中的硫代葡萄糖苷的降解产物, 是研究的最多的十字花科

蔬菜的成分, 研究表明异硫氰酸酯具有高度的生物活性, 如杀菌、抑制血小板聚集等作用^[4], 同时也是十字花科蔬菜最主要的抗肿瘤活性成分, 但是目前国内尚未有研究报道。本文主要从体外和体内两个方面对十字花科蔬菜提取物 6320(主要含异硫氰

收稿日期: 2006-10-20.

作者简介: 吕静(1981-), 女, 江苏萍乡人, 微生物与生化药学硕士研究生。

通讯作者: 张家骥(1962-), 女, 江苏宝应人, 副教授, 理学博士, 主要从事生物制药专业研究. Email: 9989card@sina.com

酸酯)的抗肿瘤作用进行初步评价。

1 材料与方法

1.1 肿瘤细胞株和实验动物

小鼠黑色素瘤细胞 B16、小鼠肉瘤细胞 S180、大鼠神经胶质瘤细胞 C6、大鼠乳腺癌细胞 SHZ-888、人乳腺癌细胞 MCF-7、人肝癌细胞 Bel-7402、人口腔上皮癌细胞 KB、人肝癌细胞 HepG-2、人胃癌细胞 SGC-7901 均购于中国科学院上海细胞研究所。

昆明种小鼠,鼠龄 4~6 wk,体重(18~22) g,雄性,购于南京市江宁区青龙山动物繁殖场(合格证号:SCXK 苏(苏)-0018)。

1.2 药物和试剂

提取物 6320:由江南大学-美国杰西联合研究中心提供;谷氨酰胺:Sigma 公司产品;RPMI-1640 细胞培养基:Gibco 公司产品;小牛血清:上海华美生化试剂公司产品;胰蛋白酶(Amresco);MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyltetrazolium];Sigma 公司产品;96 孔(平底)、24 孔细胞培养板:美国 Costar 公司产品;二甲亚砜(DMSO):上海医药(集团)上海化学试剂公司产品;台盼兰:Sigma 公司产品;DNA P_{REP}™ Reagents Kit;美国 BECKMAN COULTER 公司产品;环磷酰胺(CTX):江苏恒瑞医药股份有限公司产品。

1.3 主要仪器

CO₂ 培养箱 MODEL TC 2323 (Thermo-Forma);倒置相差显微镜 CKX41(日本 OLYMPUS 公司);酶联免疫检测仪 Multiskan MK3 (Thermolabsystems);流式细胞仪 EPICS XL(美国库尔特公司);游标卡尺(上海恒胜工具有限公司)。

1.4 药物配制方法

体外:将提取物 6320 用 DMSO 溶解,临用前用含 10%小牛血清的 RPMI-1640 培养液稀释至所需浓度,DMSO 终浓度<0.01%(此浓度对细胞生长无影响)。

体内:临用前用生理盐水将提取物 6320(含量 14.27%)溶解,并稀释到所需浓度,阴性对照组为提取物 6320 所含溶剂及生理盐水。

1.5 细胞培养

肿瘤细胞均于含体积分数为 10%的小牛血清、100 U/mL 的青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI-1640 完全培养液中,37℃、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中生长,贴壁细胞用 0.25% 胰酶消化传代,悬浮细胞离心传代。

1.6 细胞增殖活性测定(MTT 法)

取对数生长期的肿瘤细胞,贴壁细胞经 0.25% 胰酶消化,用 RPMI-1640 完全培养液调整细胞浓度为 $3\sim 6\times 10^4$ /mL,接种于 96 孔板中,每孔 150 μ L,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后,实验组加入含不同浓度的提取物 6320 的培养液 150 μ L,对照组加入等体积的 RPMI-1640 完全培养液,每组设 4 个复孔,继续培养 48 h。培养结束后,每孔加入 MTT 溶液 20 μ L(5 mg/mL),再培养 4 h 后,对于悬浮细胞,微板离心(1 000 r/min,10 min),然后小心吸取上清液,每孔加入 150 μ L DMSO,振荡 10 min 后,用酶标仪测定 OD₅₇₀。^[5]

按下式计算抑制率。

肿瘤细胞生长抑制率(%)=(对照组 OD 值-给药组 OD 值)/对照组 OD 值 $\times 100\%$

1.7 细胞形态学观察

取对数生长期 B16 细胞,经 0.25% 的胰蛋白酶消化,用 RPMI-1640 完全培养液调整细胞浓度为 3×10^4 /mL,接于细胞培养瓶中,培养 24 h 后,实验组加入含提取物 6320 的培养液,使提取物 6320 的终浓度为 7.5 μ mol/L,对照组加等体积 RPMI-1640 完全培养液,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 48 h,在倒置相差显微镜下观察细胞的生长状态并摄影。

1.8 细胞生长曲线的测定

取对数生长期的 B16 细胞,经 0.25% 的胰酶消化后,用 RPMI-1640 完全培养液调整细胞浓度约 2×10^4 /mL,然后将细胞接种于 24 孔培养板中,每孔 1 mL,培养 24 h 后,将含提取物 6320 培养液加入各培养孔中,使提取物 6320 的终浓度为 5、10、15 μ mol/L,每个浓度设 3 个复孔,对照组加等体积 RPMI-1640 完全培养液,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 0~5d。分别取不同培养时间的细胞,利用台盼兰染色法进行活细胞计数,每个浓度的活细胞数取 3 个复孔的平均值,并绘制细胞的生长曲线。

1.9 细胞凋亡及细胞周期测定

取对数生长期的 B16 细胞,接种于细胞培养瓶中,细胞浓度为 3×10^4 /mL,24 h 后加入含提取物 6320 的培养液,使其终浓度为 2.5、5、7.5 μ mol/L,同时不加提取物 6320 为空白对照,继续培养 48 h 后,用 0.25% 胰酶消化,收集于离心管内,PBS 洗 2 次(1 000 r/min,5 min),用 500 μ L PBS 将细胞重悬,用 300 目尼龙网过滤。按 DNA P_{REP}™ Reagents Kit 说明书操作,加入 DNA-P_{REP} LRP 220 μ L,DNA-P_{REP} Stain 2.1 mL,混匀,避光染色,室温 30 min。用流式细胞仪进行检测,modfit 软件分析结果。

1.10 B16 黑色素瘤实体瘤模型

在无菌条件下剥离小鼠腋下传代的黑色素瘤 B16 瘤块,剪成碎块,用玻璃匀浆器加生理盐水(1 : 3)磨成匀浆,用生理盐水制成单细胞悬液,台盼蓝拒染法计活细胞数达 98% 以上,用生理盐水调整细胞浓度为 1×10^7 /mL,每只小鼠右腋下接种 0.2 mL,接种后随机分成 4 组,每组 10 只,实验组设高、低剂量组(70、120 mg/kg/d)灌胃,阴性对照组采用含有相同溶剂的生理盐水灌胃,阳性对照组采用腹腔注射环磷酰胺(20 mg/kg/d),次日开始给药,连续给药 15 d。停药 24 h 后处死小鼠,取瘤称重,计算抑瘤率。^[6]

抑瘤率(%) = (阴性对照组瘤重 - 给药组瘤重) / 阴性对照组瘤重 $\times 100\%$

并取出脾脏和胸腺称重,并按下式计算脾指数和胸腺指数。

脾指数 = 脾脏平均重量(mg) / 平均体重(g)

胸腺指数 = 胸腺平均重量(mg) / 平均体重(g)

1.11 统计学分析

应用 SPSS12.0 统计软件进行数据分析。

2 结果和讨论

2.1 提取物 6320 对体外肿瘤细胞增殖的影响

由表 1 可知,提取物 6320 对不同的肿瘤细胞株的增殖具有显著的抑制作用,表明提取物 6320 具有广谱的抗肿瘤作用,且不同的肿瘤细胞株对提取物 6320 的敏感性不同,其中以小鼠黑色素瘤细胞 B16 最为敏感,IC₅₀ 为 9.60 μ mol/L。同时也可看出,鼠源性的肿瘤细胞(S180、SHZ-888、B16、C6)对提取物 6320 较人源性的肿瘤细胞(MCF-7、SGC-7901、KB、HepG 2、Bel-7402)更为敏感。由于本实验中所使用的细胞株较少,需要更多不同分化程度和多种系统来源的肿瘤细胞株来进一步实验,以检测提取物 6320 的抗癌谱。

表 1 6320 对体外不同肿瘤细胞株增殖抑制的 IC₅₀

Table. 1 The IC₅₀ of 6320 on different tumor cells lines in vitro

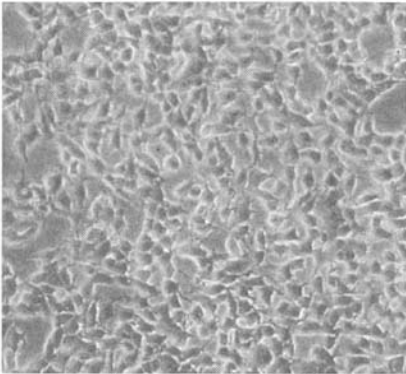
肿瘤细胞系	IC ₅₀ / (μ mol/L)
MCF-7	24.34
SHZ-888	12.42
S180	20.87
SGC-7901	25.92
KB	21.68
B16	9.60
HepG 2	22.73
Bel-7402	27.77
C6	20.20

2.2 提取物 6320 对细胞形态的影响

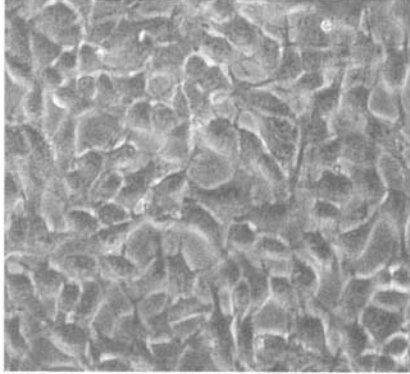
用小鼠黑色素瘤细胞 B16 研究提取物 6320 对细胞生长状态的影响,结果表明,对照组 B16 细胞呈多层不规则生长,具有重叠的圆形细胞。经提取物 6320 作用后,细胞生长变慢,密度减小,细胞呈一定的极性生长,铺展很好,无明显堆积或多层生长现象。多数细胞体积变大,具有树突状结构,部分细胞连成网状(见图 1)。

2.3 提取物 6320 对细胞生长曲线的影响

由图 2 可以看出,由于 B16 细胞增殖速度快,倍增时间短,对照组的 B16 细胞在培养 96 h 后,少部分细胞开始死亡,细胞数量有所减少。在培养相同天数时,给药组的活细胞数明显少于对照组,说明提取物 6320 明显抑制 B16 细胞的生长,且随着提取物 6320 作用浓度的增加,抑制作用愈明显。但是给药组在培养 48 h 后,细胞数量有所增加,可能是因为提取物 6320 在 RPMI-1640 完全培养液中不稳定,失去部分药效或者细胞对提取物 6320 产生耐药性,这需要进行进一步验证。



(a) 空白对照组 (100 $\times$)



(b) 空白对照组 (200 $\times$)

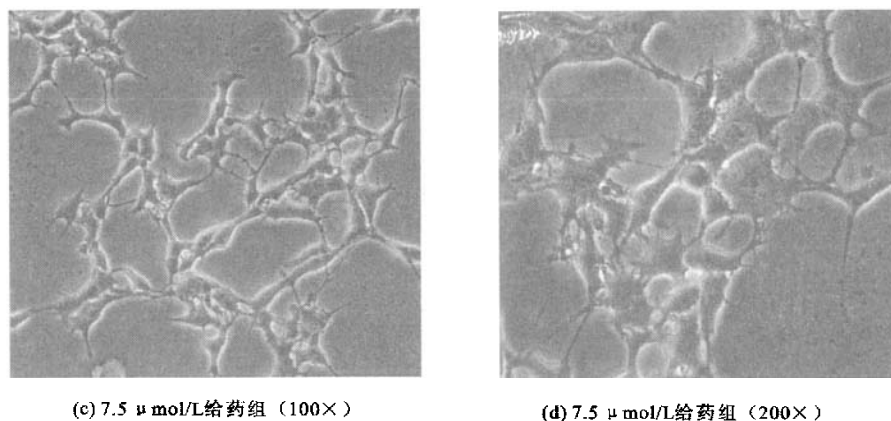


图1 6320对B16细胞形态的影响

Fig. 1 The effect on morphological changes of B16 cells treated with 6320

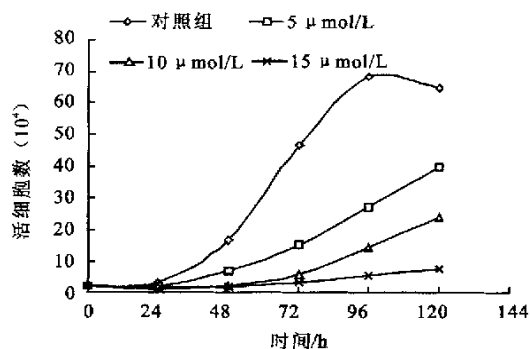


图2 提取物6320对细胞生长曲线的影响

Fig. 2 The effect of 6320 on cell growth curve

2.4 提取物6320对细胞周期的影响

B16细胞经2.5、5、7.5 $\mu\text{mol/L}$ 的提取物6320作用48h后,用流式细胞仪分析细胞周期,结果见图3,给药组的细胞均有不同程度的凋亡,凋亡率分别为3.4%、8.2%、11.9%,呈一定的量效关系。同时发现给药组的细胞相对聚集在S期,S期细胞所占细胞的比率由空白对照的18.5%升高到33.3%、43.0%、53.6%,G1期有所下降,分别为64.7%、60.4%、50.4%、33%。G2/M期基本变化则无规律,分别为16.8%、6.3%、6.6%、13.5%。

2.5 提取物6320对小鼠B16实体瘤生长的影响

由体外实验的结果可知,小鼠黑色素瘤细胞B16对提取物6320最为敏感,因此在体内建立小鼠B16移植瘤模型。结果见表2,提取物6320对小鼠B16实体瘤具有明显的抑制作用,给药组的平均瘤重与阴性对照组相比,具有显著性差异($P < 0.05$),其中提取物6320对小鼠B16实体瘤的抑制率最高达到57.61%,而阳性对照组(CTX)的抑制率达67.27%,两者之间无显著性差异($P > 0.05$)。

同时也发现提取物6320对小鼠有一定的毒性,高剂量给药组的体重的变化以及脾脏指数与阴性对照组相比,具有显著性差异($P < 0.05$),而对胸腺指数无显著性影响。阳性对照组(CTX)小鼠的体重变化、脾指数、胸腺指数与与阴性对照组相比,均具有显著性差异($P < 0.05$)。高剂量给药组与阳性对照组相比,体重变化无显著性差异,但是脾指数、胸腺指数具有显著性的差异($P < 0.05$)。可见,提取物6320与CTX相比,毒性可能有所减少,但是由于两者的给药途径以及给药剂量有所不同,因此很难确定两者之间的比较关系。

3 结 语

通过以上的实验结果可知,提取物6320对体外培养的不同肿瘤细胞株具有显著的增殖抑制作用, IC_{50} 为9~28 $\mu\text{mol/L}$,并且不同肿瘤细胞株对提取物6320的敏感性有所不同。提取物6320能引起细胞凋亡,对细胞周期有一定的影响,可能作用于细胞周期的S期,阻止细胞由S期向G2/M期的转变。同时也证实提取物6320对移植性的小鼠B16实体瘤也有明显的抑制作用,与CTX相比无显著性差异。据文献报道,异硫氰酸酯具有一定的基因毒性,过量的异硫氰酸酯可能引起哺乳动物细胞姐妹染色体交换和染色体失常,从而引起细胞突变和致癌^[6-7]。在本实验中也发现提取物6320对实验小鼠的免疫系统具有一定的毒性作用,此与文献报道的相一致。

但是必须指出的是异硫氰酸酯的抗肿瘤作用是明确的,因此需要今后进行长期的实验,以减少异硫氰酸酯的毒性,明确异硫氰酸酯的抗肿瘤作用

的机制等等。

表 2 提取物 6320 对移植性小鼠黑色素瘤 B16 的影响
Tab. 2 The effect of 6320 on transplanted mouse melanoma B16

组 别	鼠数/只	体重变化/g	平均瘤重/g	抑瘤率/%	脾指数	胸腺指数
阴性对照组	10	10.87±4.72	2.22±0.97	/	6.58±0.54	2.14±0.87
低剂量组	10	10.30±3.74	1.36±0.68	38.83	7.22±1.21	2.10±0.80
70 mg/kg/d			*			
高剂量组	106.19±2.94		0.94±0.38	57.61	8.17±1.94	2.07±0.66
120 mg/kg/d		*	**		*△	△△
阳性对照组	10	5.30±4.21	0.73±0.32	67.27	10.10±2.73	0.89±0.59
20 mg/kg/d		*	**		**	**

注: * 与阴性对照组相比, $P<0.05$ ** 与阴性对照组相比, $P<0.01$ △ 与阳性对照组相比, $P<0.05$ △△ 与阳性对照组相比, $P<0.01$ 。

参考文献:

[1] Genoveva Murillo , Rajendra G. Mehta. Cruciferous vegetables and cancer prevention[J]. **Nutrition and Cancer**, 2001, 41 (1/2): 17—28.

[2] Jennifer H Cohen, Alan R Kristal, Janet L. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk [J] . **Journal of the National Cancer Institute**, 2000, 92(1) : 61—68.

[3] Dominique S Michaud, Donna Spiegelman, Steven K Clinton, et al. Fruit and vegetable intake and incidence of bladder cancer in male prospective cohort [J]. **Journal of the National Cancer Institue**, 1999, 91(7) : 605—613.

[4] J A Deprce, T M Howard, G P Savage. Flavour and pharmaceutical properties of the volatie sulphur compounds of wasabi [J]. **Food Research International**, 1999, 31 (5) : 329—337.

[5] 徐叔云, 卞如涌, 陈修. 药理实验方法学(第三版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.

[6] Fekadu Kassie, Siegfried Knasmuller. Genotoxic effects of allyl isothiocyanate (AITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC) [J]. **Chemico-Biological Interactions**, 2000, 127: 163—180.

[7] Mariko Murata, Nauto Yamashita, Sumiko Inoue, et al. Mcchanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic allyl isothiocyanate[J]. **Free Radical Biology and Medicine**, 2000, 28(5) : 797—805.

(责任编辑: 杨 萌)