

桑葚花色苷提取物对乳腺癌细胞凋亡及线粒体膜电位的影响*

常 徽¹ 王 湛¹ 袁丽佳¹ 付钰洁^{1,2} 糜漫天^{1△}

(1 第三军医大学营养与食品安全研究中心 重庆市营养与食品安全重点实验室 重庆 400038 ;

2 重庆理工大学药学与生物工程学院 重庆 400050)

摘要 目的 观察桑葚花色苷提取物对人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453、MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞凋亡及线粒体膜电位的影响。方法 :利用超声辅助乙醇萃取法提取桑葚花色苷 ,pH 示差法测定提取物花色苷总含量 ,以 50、100 和 150 mg/mL 桑葚花色苷提取物作用三种乳腺癌细胞 MDA-MB-231、MDA-MB-453 和 MCF-7 24 h ,采用 Annexin V/PI 双染流式细胞分析法检测细胞凋亡水平变化 ,JC-1 探针染色激光共聚焦扫描显微镜观察 MDA-MB-453 细胞线粒体膜电位水平变化。结果 :凋亡分析结果表明 桑葚花色苷提取物作用后三种乳腺癌细胞凋亡率均升高 ,显示出促凋亡效应 ,且具有剂量 - 效应关系 ,100 和 150 mg/mL 组凋亡率显著升高($P<0.05$)。激光共聚焦扫描显微镜检测结果显示 ,桑葚花色苷提取物作用 24 h ,可使 MDA-MB-453 细胞线粒体膜电位显著下降 ,表现为红色 / 绿色荧光的比值显著降低($P<0.05$)。结论 :桑葚花色苷提取物可显著降低乳腺癌细胞线粒体膜电位 ,并促发细胞凋亡。

关键词 桑葚花色苷 ;乳腺癌细胞 ;凋亡 ;线粒体膜电位

中图分类号 R737.9 R285.5 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273(2012)22-4236-05

Effect of Anthocyanin Extract of Mulberry Fruit on the Apoptosis and the Mitochondrial Membrane Potential of Breast Cancer Cells*

CHANG Hui¹, WANG Zhan¹, YUAN Li-jia¹, FU Yu-jie^{1,2}, MI Man-tian^{1△}

(1 Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, the Third Military University, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, Chongqing, 400038, China;

2 School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400050, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of anthocyanin extract of mulberry fruit on the apoptosis and the mitochondrial membrane potential of breast cancer cells MDA-MB-453, MDA-MB-231 and MCF-7. **Methods:** Preparation of anthocyanin-rich extract from mulberry fruits was carried out by ultrasonic extraction with acidified-ethanol. The breast cancer cells MDA-MB-453, MDA-MB-231 and MCF-7 were treated with 50, 100 or 150 mg/mL of the anthocyanin-rich extract for 24h; the cells apoptosis were analyzed by Annexin V/PI dyeing and flow cytometric assay. To characterize the upstream factors involved in the intrinsic apoptosis pathway, the mitochondrial permeability of MDA-MB-453 cells were measured by JC-1 staining and the laser confocal scanning microscopy. **Results:** The apoptosis analysis results indicated that the anthocyanin-rich mulberry fruit extract treated for 24 h, the apoptosis rate of these three breast cells in 100 and 150 mg/mL treated groups markedly increased ($P<0.05$), exhibiting a dose-effect relationship. The observation by laser confocal scanning microscopy suggested that the anthocyanin-rich extract significantly decreased the mitochondrial membrane potential of breast cancer MDA-MB-453 cell; the ratio of JC-1 red/green fluorescence was significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** The anthocyanin-rich extract significantly decreased the mitochondrial membrane potential of breast cancer cells and induced apoptosis.

Key words: Mulberry fruit anthocyanin extract; Breast cancer; Apoptosis; Mitochondrial membrane potential

Chinese Library Classification(CLC): R737.9, R285.5 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)22-4236-05

前言

桑葚又称桑果、桑枣,为桑科落叶乔木桑树的成熟果穗,味甘性寒,酸甜汁多,是人们常食的水果之一。桑葚花色苷是天然存在于桑葚中的一类花色苷类物质,成熟桑葚含有丰富的花色苷化合物。花色苷是一类广泛存在于蔬菜、水果等食物中的天然色素,属植物黄酮化合物。流行病学调查和实验研究证实,膳

食花色苷化合物具有抗氧化、抗炎症、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化等广泛、优良的生物学效应,特别是其抗肿瘤活性,以其天然、低毒、高效而备受关注^[1-3]。乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,极大的威胁着女性的生命健康,探讨通过膳食途径防治乳腺癌是一项有意义的课题。我们前期研究^[4]表明,桑葚花色苷提取物无论体外和体内均能显著抑制乳腺癌细胞的增殖,具有显著的抗乳腺癌效应。本研究进一步探讨桑葚花色苷提取物对乳

* 基金项目 国家自然科学基金(30901194)、第三军医大学青年创新基金(2009XQN14)

作者简介:常徽(1980-)男,博士,讲师,主要研究方向:植物黄酮与肿瘤

△通讯作者:糜漫天,电话:023-68752291, E-mail: mmt2007@126.com

(收稿日期:2012-02-03 接受日期:2012-02-26)

腺癌细胞的凋亡诱导作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

桑葚来自重庆产 8632 果桑品种。乳腺癌 MCF-7 细胞(雌激素受体阳性 ER⁺、人类表皮生长因子受体-2 阴性 HER2/neu⁻)、乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 (ER⁻, HER2/neu⁻) 和乳腺癌 MDA-MB-453 (ER⁻, HER2/neu⁺) 细胞株均来自于中国科学院生物化学与细胞生物研究所。MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞培养于含 10% 标准胎牛血清的 DMEM/F12 高糖培养液中, MDA-MB-453 细胞培养于含 10% 标准胎牛血清的 RPMI1640 培养液中, 以上细胞均于 37 °C、5%CO₂ 条件下常规培养传代。DMEM/F12 高糖培养液、改良型 RPMI1640 培养基购自美国 Hyclone 公司, 标准胎牛血清购自天津 TBD 公司, Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购于上海炎彬化工科技有限公司, JC-1 线粒体膜电位探针购自江苏碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 提取与纯化 将桑葚干粉溶于 70% 酸化乙醇中, 超声提取 1 h 后 5 000 r/min × 10 min 离心, 取上清液(果渣存留于下一次超声提取, 可反复提取 3 次), 真空抽滤后用旋转蒸发器旋蒸去乙醇, 再用石油醚萃取 3 次去脂类, 最后再真空抽滤保证提取液无颗粒杂质。最终得到桑葚花色苷粗提物。将经过酸化的花色苷提取物导入 Amberlite™ XAD7HP 型大孔吸附树脂柱中, 流速 1 mL/min, 树脂完全吸附后用 50 倍体积的酸化水冲洗, 流速 2 mL/min, 再用 80% 酸化乙醇洗脱, 流速 1 mL/min, 当柱中流出液体不透光时用烧杯接入, 直至液体开始透光后停止。将此溶液旋转蒸发后装入培养皿中, 冷藏于 -80 °C 冰箱冷

冻 2 h 后放入冷冻干燥机冻成干粉。

1.2.2 pH 示差法检测花色苷总含量 称取 0.1 g 桑葚花色苷提取物, 分别用 pH 1.0 和 pH 4.5 的缓冲液配制成 0.01 g/mL 溶液, 4 °C 冷冻离心, 取上清液。设置空白对照组(蒸馏水) pH 1.0 溶液组, pH 4.5 溶液组, 检测各组 520、700 nm 波长下的光密度值, 花色苷含量 (% w/w) = $(A/\epsilon L) \times MW \times DF \times V/W \times 100$ 。式中 A 为光密度值, $A = (A_{520} - A_{700})_{pH 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH 4.5}$, ϵ 为消光系数, DF 为稀释因子, MW 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的分子量(449.2), V 为最终体积(1.0 mL), W 为产品质量(0.01 g), L 为光程(1.0 cm)。

1.2.3 Annexin V/PI 双染流式细胞凋亡分析 将对数生长期的乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-453 常规传代, 细胞计数, 以 10⁵ /mL 细胞浓度接种于 6 孔细胞培养板内, 每孔 5 mL 培养过夜, 待细胞贴壁且生长良好。实验分 5 组, 每组作 3 个平行孔, 分别加入不同剂量的桑葚花色苷提取物, 使其终浓度分别为 150、100、50 mg/mL, 对照组加等量蒸馏水, 培养 24 h, 弃掉培养液, 用 4 °C 预冷的 PBS (pH 7.2) 洗细胞 3 次, 常规胰酶消化, 制作单细胞悬液, 离心, 用 250 μ L 稀释的 binding 缓冲液重新悬浮细胞, 并使其浓度为 1 × 10⁶ /mL, 取 100 μ L 的细胞悬液于 5 mL 流式管中, 加 5 μ L Annexin V/FITC 溶液, 静置 5 min, 加入 20 μ g/mL 的 PI 溶液 10 μ L, 混匀后于室温避光放置 10 min, 在反应管中加 400 μ L PBS, 利用流式细胞仪上机检测各组荧光状况。

1.2.4 线粒体膜电位测定 将对数生长期的乳腺癌细胞 MDA-MB-453 常规传代, 细胞计数, 以 10⁵ /mL 细胞浓度接种于 6 孔细胞培养板内, 每孔 5 mL 培养过夜, 待细胞贴壁且生长良好。实验分 5 组, 每组作 3 个平行孔, 分别加入不同剂量的桑葚

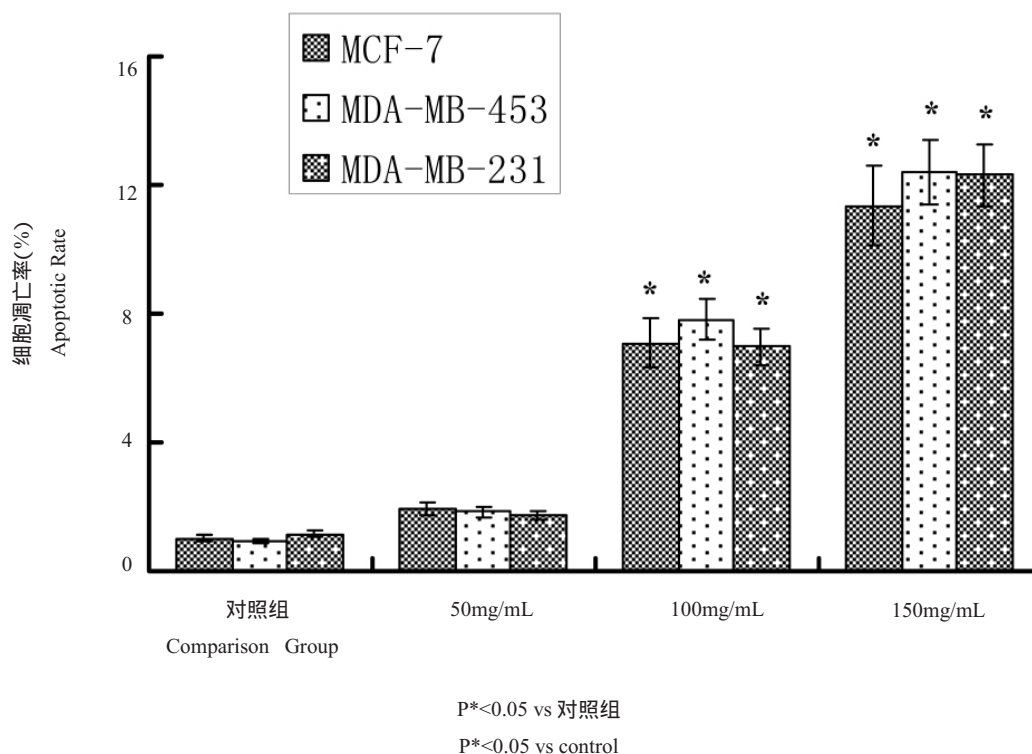


图1 桑葚花色苷提取物对三种乳腺癌细胞凋亡的影响

Fig.1 Effects of anthocyanin extract of mulberry fruit on the apoptosis in three breast cancer cells

花色苷提取物,使其终浓度分别为 150、100、50 mg/mL,对照组加等量蒸馏水,培养 24 h,弃掉培养液,用 4℃ 预冷的 PBS (pH 7.2)洗细胞 3 次,加入 1.0 mL PBS,加入 10 μ L 2.5 mmol/L 的 JC-1,使其终浓度为 25 μ mol/L,在 37℃、5% CO₂ 培养箱内避光孵育 20 min,用 PBS 洗涤 3 次,激光共聚焦扫描显微镜检测分析。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析,两组间差异比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 桑葚花色苷提取物中花色苷的总含量

按照上述提取和纯化工艺流程,以优化的各项参数对桑葚花色苷进行提取和纯化,最终得到花色苷提取物含量检测结果显示,其花色苷总含量为(41.8 $\pm$ 4.8)%,产品获得率为(2.6 $\pm$ 0.7)%。

2.2 桑葚花色苷提取物对乳腺癌细胞凋亡的影响

利用 Annexin V/PI 双染流式细胞分析技术检测桑葚花色苷提取物对乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-453 凋亡的影响,凋亡分析结果显示,桑葚花色苷提取物作用 24 h 可使三种乳腺癌细胞的凋亡率均升高,显示出促凋亡效应,且具有剂量-效应关系,100 和 150 mg/mL 组与对照组相比具有显著差异($P<0.05$)(见图 1),表明桑葚花色苷提取物可显著诱导乳腺癌细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用。

2.3 桑葚花色苷提取物对乳腺癌细胞线粒体膜电位的影响

为探讨桑葚花色苷提取物对乳腺癌细胞促凋亡效应的早期事件,我们利用 JC-1 探针和激光共聚焦扫描显微镜检测桑葚花色苷提取物对乳腺癌细胞 MDA-MB-453 线粒体膜电位的影响,检测结果显示,桑葚花色苷提取物作用 24 h 可使 MDA-MB-453 细胞线粒体膜电位下降,表现为红色/绿色荧光的比值降低(见图 3),且具有剂量-效应关系,100 和 150 mg/mL 组与对照组相比具有显著差异($P<0.05$, $P<0.01$)(见图 2),表明桑葚花色苷提取物可显著降低乳腺癌 MDA-MB-453 细胞线粒体膜电位,促发凋亡。

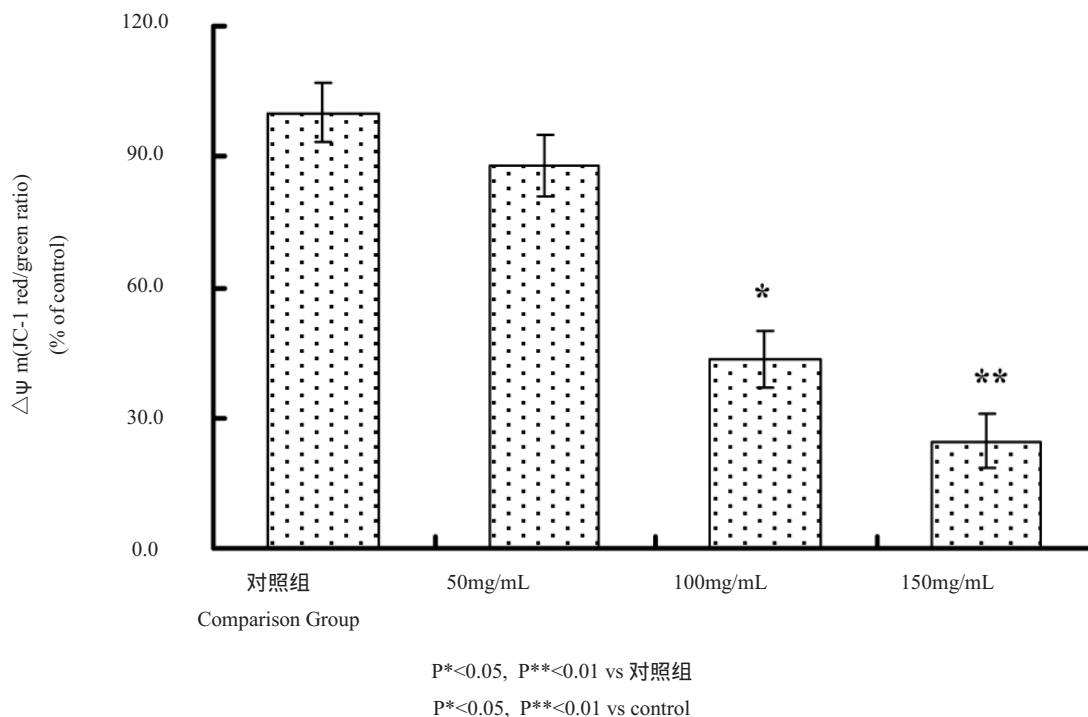


图 2 桑葚花色苷提取物作用对乳腺癌细胞 MDA-MB-453 线粒体膜电位的影响

Fig.2 Effects of anthocyanin extract of mulberry fruit on the mitochondrial membrane potential in breast cancer MDA-MB-453 cell

3 讨论

恶性肿瘤已成为当今全球死亡率最高的疾病,成为人类健康的头号杀手,而且其发病率还在不断上升,因此如何预防和治疗肿瘤,成为世界科研领域最大的研究课题^[5,6]。膳食、营养与肿瘤关系密切,据估计,40%的肿瘤是由膳食因素造成的,积极通过膳食、营养途径防治肿瘤发生、发展,是一项极有研究意义和价值的课题^[7,8]。从食物中提取天然化合物进而寻找有效的抗肿瘤活性物质,一直是国内外研究的一个热点。现代医学研究

表明^[9,10],桑葚具有增强免疫功能,促进造血细胞的生长,预防动脉粥样硬化,促进新陈代谢等作用,具有一定的药理学价值。成熟桑葚含有丰富的花色苷物质,花色苷类化合物对肿瘤具有较强的防治作用,其机制涉及抗氧化、抑制癌细胞生长、诱导肿瘤细胞凋亡以及抗血管生成等诸多方面。桑葚花色苷抗肿瘤作用研究尚较缺乏,本实验在提取获得桑葚花色苷的基础上,进一步观察了其对乳腺癌细胞的凋亡诱导作用,为进一步研究桑葚的药理学活性提供了一定参考。

细胞凋亡又名细胞程序性死亡,是细胞生命活动中的一种

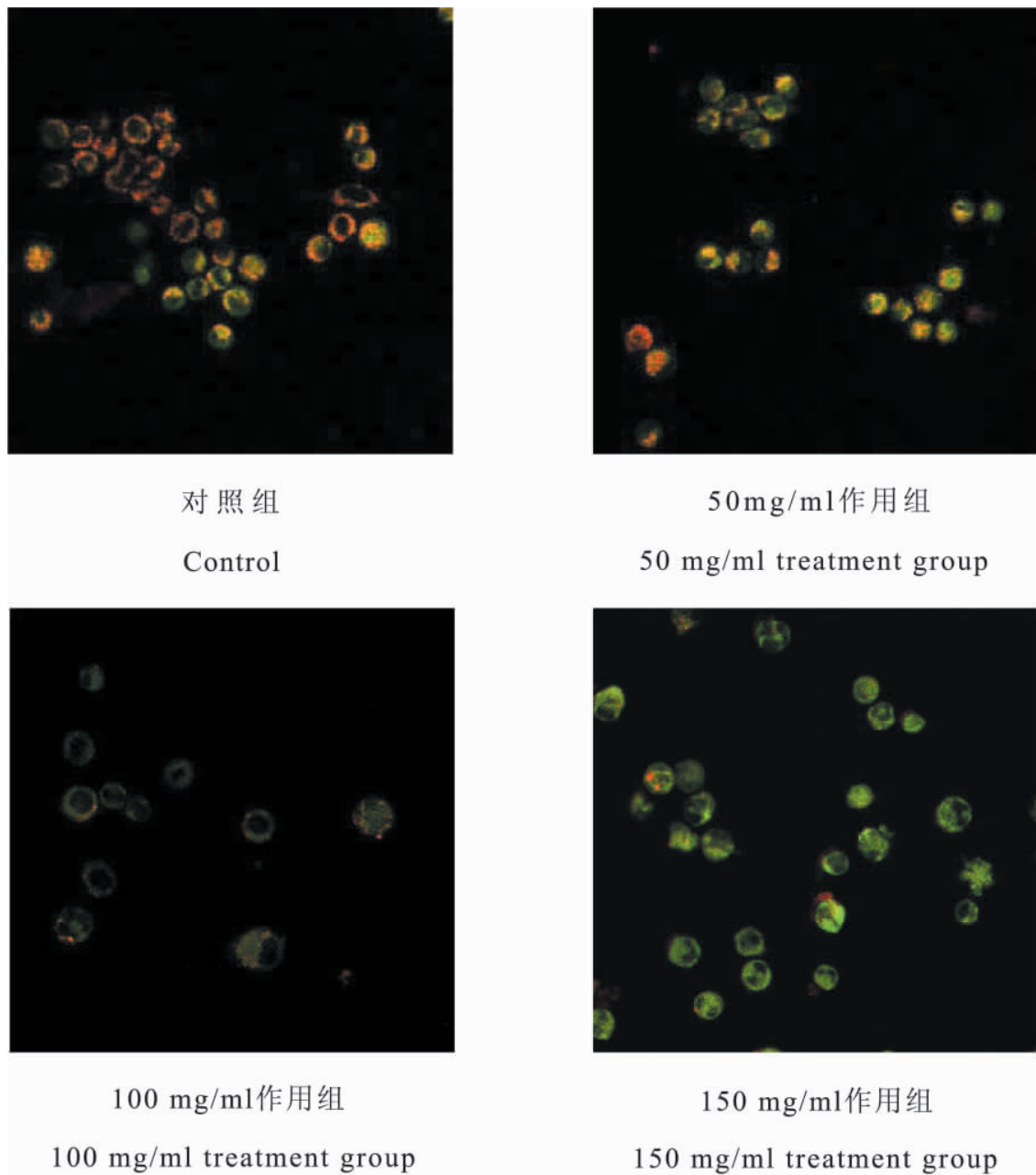


图3 线粒体膜电位的激光共聚焦扫描显微镜检测结果

Fig.3 Results of the mitochondrial membrane potential detection by the laser confocal scanning microscopy

基本生物学现象,在生命活动中扮演极为重要的角色,在生物体的进化、内环境的稳定以及多个系统的发育中起着重要的作用。细胞凋亡与肿瘤的发生发展密切相关,通过诱导肿瘤化细胞启动凋亡程序,进而清除肿瘤细胞,是机体抑制肿瘤发生、发展的重要机制,而癌症的发生一般都伴随着细胞凋亡信号转导和调控的紊乱。诱导和启动肿瘤细胞凋亡,是抗肿瘤药物发挥抗肿瘤效应的极为重要的作用机制^[11,12]。在本研究中,我们发现,桑葚花色苷提取物作用可现在提高三种乳腺癌细胞的凋亡率,诱导乳腺癌细胞启动凋亡程序,进而发挥抗乳腺癌作用。桑葚花色苷提取物是如何诱导乳腺癌细胞启动凋亡程序的,是通过内源性途径还是外源性信号途径,其具体机制值得进一步研究。

细胞凋亡信号的转导一般分为两种:内源性途径,即线粒

体依赖性途径,外源性途径,即非线粒体依赖性途径。线粒体是一层双层膜围成的囊状结构,外膜与内膜间的空腔称为外室,由内膜围成的腔称为内室或线粒体基质。线粒体是细胞内ATP的主要生产中心,是细胞的能量加工工厂,同时线粒体还是细胞凋亡的启动者^[13,14]。线粒体内含有一些凋亡启动分子如细胞色素C(cytC),正常情况下由于线粒体内膜的封闭无法释放,当细胞受到凋亡诱导信号的影响,如药物作用等情况,线粒体膜电位降低,内膜通透性增强, cytC 释放入细胞胞浆中,然后与凋亡活化因子-1 (Apaf-1) 结合,活化后激活 caspase-9,导致 caspases 级联反应,最后激活 caspase-3,而 caspase-3 是主要的凋亡效应蛋白,执行凋亡程序。在本研究中,为了探讨桑葚花色苷提取物在诱导乳腺癌凋亡中的早期事件,我们观察了桑葚花色苷提取物对乳腺癌细胞 MDA-MB-453 线粒体膜电位的影

响,以探讨其凋亡启动信号的本质。结果表明,桑葚花色苷提取物作用可显著降低乳腺癌细胞线粒体膜电位的水平,表现为JC-1 探针存在下红/绿荧光比显著下降。线粒体膜电位的下降是凋亡启动的早期事件,是 cytC 释放的前提,因此我们推测,桑葚花色苷提取物可能是通过内源性途径诱导乳腺癌细胞凋亡的,但其详细机制尚需进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Faria A, Pestana D, Teixeira D, et al. Blueberry anthocyanins and pyruvic acid adducts: anticancer properties in breast cancer cell lines[J]. *Phytother Res*, 2010, 24(12):1862-1869
- [2] 常徽, 糜漫天, 顾艳艳, 等. 3,6-二羟基黄酮对多种肿瘤细胞的增殖抑制及凋亡诱导作用[J]. *第三军医大学学报*, 2009, 31(16): 1566-1568
- Chang H, Mi MT, Gu YY, et al. Antiproliferative and proapoptotic effects of 3,6-dihydroxyflavone on different cancer cells[J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2009, 31(16): 1566-1568
- [3] Lee Y K, Lee W S, Kim G S, et al. Anthocyanins are novel AMPK α 1 stimulators that suppress tumor growth by inhibiting mTOR phosphorylation[J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(6):1471-1477
- [4] 王湛, 付钰洁, 常徽, 等. 桑葚花色苷的提取及对人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453 生长的抑制[J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(10): 988-990
- Wang Zhan, Fu Yu-jie, Chang Hui, et al. Effects of anthocyanin extract of mulberry fruit on the growth of transplanted tumor of breast cancer MDA-MB-453 cells[J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2011, 33(10): 988-990
- [5] Solsona E, Iborra I, Collado A, et al. Feasibility of radical transurethral resection as monotherapy for selected patients with muscle invasive bladder cancer[J]. *J Urol*, 2010, 184(2): 475-480
- [6] Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, et al. Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34 [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(14): 5923-5930
- [7] Davis CD, Ross SA. Evidence for dietary regulation of microRNA expression in cancer cells[J]. *Nutr Rev*, 2008, 66(8): 477-482
- [8] Hakami R, Mohtadinia J, Etemadi A, et al. Dietary intake of benzo(a)pyrene and risk of esophageal cancer in north of Iran [J]. *Nutr Cancer*, 2008, 60(2): 216-221
- [9] 李冬香, 陈清西. 桑葚功能成份及其开发利用研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2009, 25(24): 293-297
- Li Dong-xiang, Chen Qing-xi. Study Progress of Functional Ingredient and Development in Mulberry [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25(24): 293-297
- [10] 王晓杨, 张媛, 张志琴, 等. 桑葚提取物对实验性高脂血症预防作用的研究[J]. *心血管康复医学杂志*, 2009, 8(5): 494-497
- Wang Xiao-yang, Zhang Yuan, Zhang Zhi-qin, et al. Preventive action of extract from mulberry sarcocarp on experimental hyperlipidemia[J]. *Chinese Journal of Cardiovascular Rehabilitation Medicine*, 2009, 8(5): 494-497
- [11] 刘小红, 沈阳. 艰难梭菌毒素 A 对胆管癌细胞株 FRH-0201 增殖和凋亡的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(1): 60-62
- Liu Xiao-hong, Shen Yang. Effect of Clostridium Difficile Toxin A on Proliferation and Apoptosis of FRH-0201 Cholangiocarcinoma Cell Line[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2011, 11(1): 60-62
- [12] Hu X, Zhang X, Qiu S, et al. Salidroside induces cell-cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398(1): 62-67
- [13] Moon HS, Lim H, Moon S, Oh HL, Kim YT. Benzylidihydroxyoctenone, a novel anticancer agent, induces apoptosis via mitochondrial-mediated pathway in androgen-sensitive LNCaP prostate cancer cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(3): 742-744
- [14] 李文海, 胡运生, 周勇安, 等. 水飞蓟宾诱导肺腺癌 Anip973 细胞凋亡的分子机制研究[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(9): 1670-1672
- Li Wen-hai, Hu Yun-sheng, Zhou Yong-an, et al. Molecular Mechanism of Silybinin-induced Apoptosis of Lung Cancer Cell Anip973 [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2011, 11(9): 1670-1672