

白藜芦醇抗肿瘤作用的体外实验研究^{*}

田雪梅, 张展霞

(中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 选用呼吸、消化、循环系统来源的4种癌细胞株: 人肺癌 PG 细胞、人大肠上皮癌 lovo 细胞、人肝癌细胞 HepG2、人白血病 HL-60 细胞以及小鼠成纤维细胞 3T3 作为研究对象, 检测 Res 的体外抗癌活性。采用 MTT 法检测细胞的生长增殖活性。结果显示, Res 不影响正常细胞(3T3)的生长增殖活性、对 PG、lovo 细胞的生长增殖也不发生作用; 但明显抑制 HepG2、HL-60 细胞的生长增殖。表明 Res 对癌细胞的作用因细胞的类型不同而异, 并且只对部分癌细胞生长有抑制作用, 即 Res 的抗癌作用具有癌种类的选择性。此外, Res 发挥作用的时间、浓度也因不同细胞类型而不同。

关键词: 白藜芦醇; 抗癌作用; 体外实验

中图分类号: R961 **文献标识码:** A

白藜芦醇(resveratrol, Res)是普遍存在于葡萄属植物中的一种物质。据目前报道, 已在72种植物中被发现^[1]。对 Res 药理作用的认识源自“french paradox”(即高脂饮食与冠心病发生率呈负相关)现象, 其重要原因在于法国人饮用较多红葡萄酒, 而红葡萄酒含有多酚类化合物, 具有抗脂质过氧化作用。脂质过氧化在动脉粥样硬化等心血管疾病的发生中起着非常重要的作用。而 Res 即是这些多酚类化合物之一^[2~4]。Pezzuto 等^[5]的研究结果指出, Res 能够直接抑制环氧化物酶(cox)的活性, 而 cox 却能通过不同途径诱发细胞癌变。Res 的抗癌、抑癌作用的发现开辟了 Res 生物活性研究的新领域。但此方面的研究工作才刚刚开始, 国内有关的成果也鲜有报道, 即便是对 Res 抑制心血管疾病的报道也不多。

采用体外培养细胞能直接进行药物活性的检测及相关作用机制的研究, 是进行药物筛选最基本、最常用的方法。其中 MTT 法是最普遍采用的一种简便、快速的方法。且是美国国立肿瘤研究中心所采用的抗癌药物筛选方法。MTT 法通过测定其光吸收值(A 值), 可间接反应活细胞的数量。因此, 药物对细胞活力的影响可以通过显色来定量^[6]。

1 材料和方法

本实验采用 MTT 法, 以4种癌细胞作为研究对象, 并以小鼠成纤维细胞 3T3 作正常对照细胞, 检测了 Res 的体外抗癌活性。

1.1 材料和仪器

1.1.1 细胞 人肺癌细胞株(PG), 人大肠上皮癌细胞株(lovo), 人肝癌细胞株

^{*} 基金项目: 广东省博士后基金资助项目

收稿日期: 1999-12-13; 作者简介: 田雪梅(1969~), 女, 讲师。

(HepG2), 人白血病细胞株 (HL-60), 小鼠成纤维细胞株 3T3. 均培养于含有 $\varphi=10\%$ 血清的 RPMI1640 培养液中, 置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, CO_2 培养箱中, 密闭培养.

1.1.2 试剂及仪器 RPMI1640 培养基为 Gibco 公司出品, 新生牛血清为杭州四季青生物工程公司产品, 白藜芦醇 (Res)、四氮唑溴盐 (MTT) 购自美国 Sigma 公司. 白藜芦醇 (Res) 用乙醇溶解, 使用时以培养液稀释. 超净工作台: 苏州净化设备厂生产, CO_2 培养箱: 德国 Heraeus 公司产品, 倒置显微镜: 日本 Olympus 产品, 自动酶标分析仪: 日本 Meter Tech 公司产品.

1.2 方法

将细胞按 $2\times 10^4\sim 1\times 10^5$ 个/孔 (不同种类细胞接种密度不同) 接种于 96 孔板. 设对照组和实验组, 对照组包括乙醇对照、空白对照; 实验组分 6 个不同浓度组, 分别加 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.12 及 0.16 mmol/L 的 Res. 细胞培养 24 h 后, 将培养液换成含不同浓度 Res 的培养液, 继续培养 24 或 48 h, 并将正常 3T3 细胞作同样处理, 以作对照. 倒置显微镜观察细胞生长状态. 按常规方法经酶标分析仪检测光吸收度 (A 值).

2 结 果

酶联免疫仪上于 570 nm 波长处测得各样品的 A 值, A 值的大小反映细胞的生长活性. 绘制 $A-c$ 相关曲线, 以显示细胞生长活性与 Res 浓度之间的关系 (图 1). 结果显示, 不同浓度的 Res, 作用 24 或 48 h 均不影响正常细胞 (3T3) 的生长增殖活性; Res 对 PG 和 lovo 细胞的生长增殖活性也不发生作用, 但能降低 HepG2 和 HL-60 细胞的生长活性.

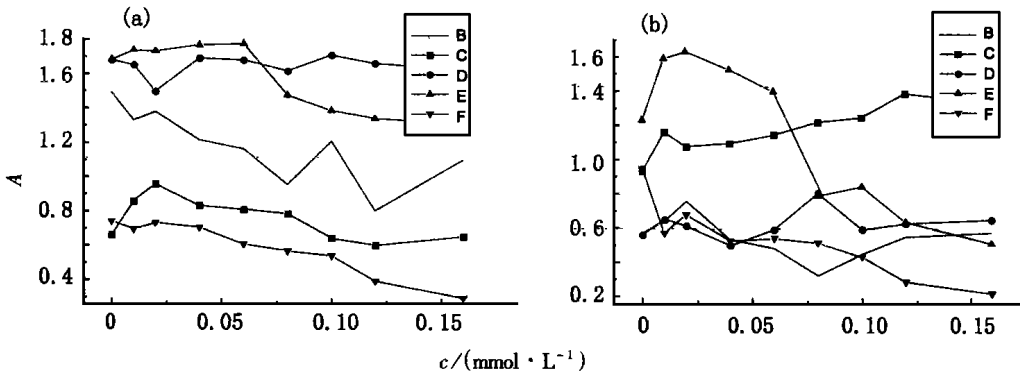


图 1 Res 对细胞生长增殖活性的影响

Fig. 1 Influence of Res on proliferation of cells

a Res 作用 24 h; b Res 作用 48 h

B 3T3 细胞; C lovo 细胞; D PG 细胞; E HL-60 细胞; F HepG2 细胞

如表 1, 0.08 mmol/L 浓度的 Res 作用 24 或 48 h 即对 HL-60 细胞的生长具有明显的抑制效果, 抑制率分别为 23.7%, 41.8%. 当作用 24 h 时, 仅 0.12、0.16 mmol/L 浓度的 Res 抑制 HepG2 细胞的生长; 48 h 作用条件下, 0.04、0.08、0.16 mmol/L Res 均可显著抑制 HepG2 细胞的生长. 抑制率分别为 9.9%, 11.2%, 18.1%. 倒置显微镜下细胞形态观察如图 2, 无论 24 h 还是 48 h 实验组, 细胞生长状态较对照组差.

表 1 Res 对 HL-60 细胞和 HepG2 细胞增殖活性 (A) 的影响 (作用 24 h)¹⁾

Tab 1 Effect of Res on the proliferation of HL-60 and HepG2 cell (treated for 24 h)

细胞	c/ (mmol·L ⁻¹)						酒精
	0.01	0.02	0.04	0.08	0.12	0.16	
HL-60	1.733±0.080	1.768±0.070	1.777±0.078	1.476±0.081 **	1.387±0.056 **	1.340±0.051 **	1.683±0.027
HepG2	0.562±0.131	0.554±0.039	0.493±0.052	0.442±0.031	0.259±0.143 *	0.180±0.040 **	0.546±0.114

1) HL-60 对照组 A 为 1.701±0.084, HepG2 为 0.573±0.143; n=6, $\bar{x}\pm SD$, * $P<0.05$,
* * $P<0.01$ vs 对照组

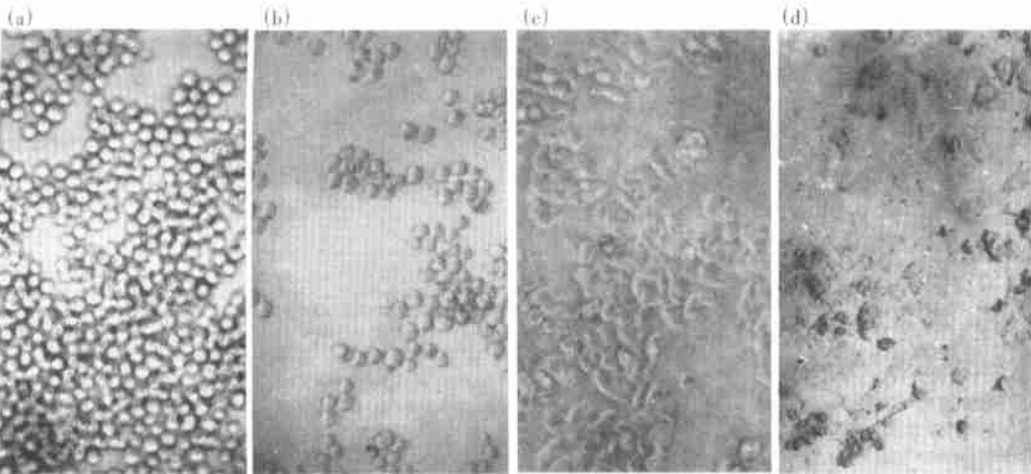


图 2 Res 作用下 HL-60 细胞和 HepG2 细胞的形态观察 × 100

Fig 2 Observations of HL-60 and HepG2 cells after treatment with Res for 24 hours

(a) HL-60 细胞对照; (b) 0.12% Res 作用 24 h 后的 HL-60 细胞(处理组细胞的密度小于对照组)
(c) HepG2 细胞对照; (d) 0.12% Res 作用 24 h 后的 HepG2 细胞(处理组中出现较多的死亡细胞)

3 讨 论

Res 能通过降低血液中胆固醇、抑制脂质过氧化而减少动脉粥样硬化、高血脂症的发生, 能抑制血小板聚集从而阻止血栓形成, 还有抑制自由基生成等作用^[3,4]. Res 抑制心血管疾病广泛作用已经有不少研究. 新近实验证明, Res 能抑制乳腺上皮癌细胞的恶性生长、小鼠肝癌细胞恶变^[5]; 具有抗炎作用^[7]. 并且, 动物实验也发现 Res 降低小鼠皮肤癌瘤的发生率高达 98%^[4,5]. 这些实验结果引起广泛关注. 本实验得出, Res 能抑制白血病细胞株 HL-60 细胞、肝癌细胞株 HepG2 的生长增殖活性, 对正常细胞及大肠上皮癌 Lovo 细胞、肺癌 PG 细胞没有作用. 提示, Res 的作用因细胞的类型不同而异, 并且它只对一部分癌细胞的生长具有抑制作用, 即 Res 的抗癌作用具有癌种类的选择性. Res 发挥作用的时间、浓度也因不同细胞类型而不同, 也就是说, 不同类型的癌细胞对 Res 的敏感性各不相同. 这可能与不同类型细胞的信号传递方式、细胞周期的分布差异有关. 其中机制尚待进一步研究.

参考文献:

- [1] TYLER V E. Grape expectations (compound in grapes may fight cancer; includes related article on grape-seed extract and on echinacea) [J] . Prevention, 1997, 49 (6): 80.
- [2] RENAUD S, de LONGERIL M. Wine, alcohol, platelet and the French paradox for coronary heart disease [J] . Lancet, 1992, 329: 1523.
- [3] ASCIAK C R, ROUNOVA O, HAHN S E, et al. Wine and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects [J] . Clin Chem Acta, 1996, 246: 163.
- [4] BELGUENDOZ L, FREMONT L, LINARD A. Reseratrrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins [J] . Biochem Pharmacol, 1997, 53 (9): 1347.
- [5] JANG M, CAI L, UDEANI G O, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes [J] . Science, 1997, 275: 218.
- [6] MASMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay [J] . J Immunol Meth, 1983, 65: 55.
- [7] 李怡棠, 钟森, 邓永江, 等. IV型变态反应中白细胞介素 6 的表达及白藜芦醇的抑制作用 [J] . 药学报, 1999, 34: 189.

Studies of Anti-Cancer Effect of Resveratrol *in vitro*

TIAN Xue-mei^{*}, ZHANG Zhan-xia

Abstract: To study the anti-cancer effect of resveratrol *in vitro*, five kinds of tumor cells (lovo, PG, HL-60, HepG2 and 3T3) were chosen and MTT assay was used to detect the influence of resveratrol on the growth and proliferation of the tumor cells. The results show that resveratrol significantly inhibits the proliferation of HL-60 and HepG2 cells, but has no influence on normal 3T3 cells and PG cells, indicating that the anti-cancer effect of resveratrol has selectivity. On the other hand, the effective period and concentration of resveratrol are different for different kinds of cells.

Keywords: resveratrol; anti-cancer effect; *in vitro* study

^{*} School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China