

吕欢, 闻燕, 许晓风, 等. 石刁柏汁对结肠癌细胞株 SW620 增殖和凋亡的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 48-50.

石刁柏汁对结肠癌细胞株 SW620 增殖和凋亡的影响

吕欢¹, 闻燕¹, 许晓风^{1,2}, 王俊¹, 江明珠¹

(1. 江苏科技大学生物与化学工程学院, 江苏镇江 212003; 2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210046)

摘要: 初步探究石刁柏汁对结肠癌细胞株 SW620 增殖和凋亡的影响及可能的机制。通过 MTT 法, 对试验组与对照组的生长曲线进行对比, 验证了不同浓度石刁柏汁对结肠癌细胞株 SW620 增殖的影响; 同时对比观察石刁柏汁处理前后的细胞株 SW620 的细胞形态, 通过 *Bcl-2* 基因的荧光定量 PCR 来检测石刁柏汁对结肠癌细胞株 SW620 细胞凋亡的影响。通过 MTT 法检测不同浓度石刁柏汁对结肠癌细胞株 SW620 增殖情况的影响结果表明, 石刁柏汁对结肠癌细胞株 SW620 的抑制作用为剂量效应相关性, 其对结肠癌细胞株 SW620 的抑制作用随着浓度的增加而增强; 通过绘制对照组和试验组的结肠癌细胞株 SW620 的生长曲线并进行对比表明, 在石刁柏汁刺激下的试验组结肠癌细胞株 SW620 的生长受到明显抑制; 通过对比观察对照组和试验组结肠癌细胞株 SW620 的形态可以看出, 试验组的细胞体积变小、细胞变形, 出现了凋亡小体等细胞凋亡现象, 表明在石刁柏汁刺激下的结肠癌细胞株 SW620 发生凋亡; 通过荧光定量 PCR 法检测对照组及石刁柏汁刺激下的试验组中结肠癌细胞株 SW620 中凋亡相关的基因 *Bcl-2* 表明, *Bcl-2* 基因在试验组中的表达量为其在未受石刁柏汁刺激的对照组中表达量的一半。研究初步说明了不同浓度石刁柏汁对结肠癌细胞株 SW620 的生长有抑制作用, 并且随着浓度的增加, 抑制能力增强, 推测其抑制机制可能与细胞凋亡有关。

关键词: 石刁柏汁; 细胞凋亡; MTT; 生长曲线; *Bcl-2*; SW620

中图分类号: R735.3⁺5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0048-03

石刁柏(*Asparagus officinalis* L.), 俗称芦笋, 别名龙须菜, 是百合科天门冬属宿根性多年生草本植物。石刁柏含有大量抗癌物质, 如芸香苷、皂角苷、维生素 E、天门冬氨酸、叶酸以及多种甾体皂苷物质和微量元素硒、钼、铬、锰等^[1-2], 因此石刁柏具有较好的抗癌效果, 在日本最新公布的 20 种抗癌蔬菜排名中, 石刁柏排名第二^[3-4]。在我国石刁柏虽然是普遍种植的蔬菜, 但是目前除了将其作为直接食用的食品原料外, 尚有很多价值未被挖掘, 因此其市场空间是巨大的。目前对石刁柏功能作用的研究, 尤其是抗癌作用的研究较少, 而研究其抗癌功能及可能的作用机制符合当前人们对天然功能性食品的追求。本试验以市售石刁柏为材料, 通过多种检测手段探

究石刁柏汁对结肠癌细胞株 SW620 增殖和凋亡的影响, 以期作为石刁柏保健功能研究和产品开发提供有价值的数[5-6], 从而为石刁柏功能性食品的开发和深加工提供有益参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

石刁柏(市售); 结肠癌细胞株 SW620(购于上海市肿瘤研究所); DMEM 高糖培养基(Gibco); 胎牛血清(Gibco); 四甲基偶氮唑盐(BBI 公司); 反转录 PCR 试剂盒(TaKaRa)。

1.2 石刁柏汁的制备

石刁柏汁的制备过程为: (1) 取新鲜石刁柏, 切块后置于榨汁机中榨汁; (2) 用 8 层纱布过滤, 取过滤液, 再用 0.22 μm 滤膜过膜除菌, 得石刁柏原汁, 置于 4℃ 冰箱中备用; (3) 分别制备不同浓度梯度的石刁柏汁: G₁, 未稀释的; G₂, 稀释 10 倍的; G₃, 稀释 100 倍的; G₄, 稀释 1 000 倍的。

1.3 MTT 法检测石刁柏汁对结肠癌细胞株 SW620 增殖的影响

将 SW620 细胞以 4 × 10³ 个/mL 的量接种于 96 孔板中,

收稿日期: 2013-01-09

基金项目: 江苏省科技支撑计划(农业)(编号: BE2010419); 江苏科技大学引进人才科研启动项目(编号: 35211002)。

作者简介: 吕欢(1990—), 女, 河北霸州人, 研究方向为食品生物技术。Tel: (0511) 85606939

通信作者: 闻燕, 讲师, 研究方向为肿瘤分子生物学。E-mail: wander_999@163.com。

[3] 李韶山, 朱延彬, 刘颂豪. 生物超微弱发光研究[J]. 激光生物学报, 1998, 7(3): 223-225.

[4] 杨海莲, 王红梅, 于家峰, 等. 温度胁迫对叶片超弱发光的影响[J]. 四川师范大学学报, 2008, 31(4): 468-470.

[5] 王维江. 生物样品超弱发光图像的探测与分析[J]. 生物物理学报, 1997, 13(4): 677-682.

[6] Christen G, Steffen R, Renger G. Delayed fluorescence emitted from light harvesting complex and photosystem of higher plants in the 100 ns ~ 5 s time domain[J]. FEBS Letters, 2000, 47(5): 103-106.

[7] 毛伟海. 磁场对小麦的生物学效应及应用研究进展[J]. 麦类作物学报, 1997, 17(1): 51-53.

[8] 越鹏李, 彩凤陈, 业婷, 等. 氮素水平对甜菜功能叶片光合特性的影响[J]. 核农学报, 2010, 24(5): 1080-1085.

[9] 徐安起, 丁学后, 姜滢. 磁场处理种子对作物生长的影响[J]. 山东大学学报: 自然科学版, 1998, 33(1): 58-62.

[10] 依艳丽, 张大庚, 谢修鸿. 磁场处理种子对小麦生物学性状的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2001, 32(5): 333-338.

每孔 100 μL 。试验组分别加入 100 μL G_1 、 G_2 、 G_3 、 G_4 浓度的石刁柏汁,以 100 μL pH 值 7.4 的 PBS 缓冲液作为空白对照,每组设 3 个平行孔。于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 细胞培养箱中培养 16 h,弃上清液;每孔加入 20 μL 5 mg/mL MTT 溶液,于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 细胞培养箱中继续培养 4 h,弃上清液;终止培养后,每孔加 150 μL DMSO,摇床缓慢振荡 10 min,放置于酶联免疫检测仪上,于波长 570 nm 处测定吸光度 D 值并计算细胞抑制率:细胞抑制率 = $(1 - \text{试验组 } D_{570 \text{ nm}} / \text{对照组 } D_{570 \text{ nm}}) \times 100\%$ 。

1.4 石刁柏汁刺激后结肠癌细胞株 SW620 生长曲线的绘制
将 SW620 细胞以 1.6×10^5 个/mL 的量接种于 24 孔板中,每孔 400 μL 。设 5 个加药孔,5 个对照孔,次日上午在 5 个加药孔中加入 80 μL 石刁柏汁,5 个对照孔中加入等量的 PBS 缓冲液(pH 值 7.4)。12 h 后,用胰蛋白酶分别对 1 个加药孔和 1 个对照孔中的细胞进行消化,离心后弃上清;加入 20 μL 细胞培养液,用移液枪吹打均匀;用 Count Star 细胞计数仪计算活细胞的数量。每隔 12 h 按上述方法计数 1 次。以单位细胞数为纵坐标,以时间为横坐标,绘制结肠癌细胞株 SW620 的生长曲线图,比较石刁柏汁刺激对结肠癌细胞株 SW620 生长曲线的影响。

表 1 Real - Time PCR 的引物序列

基因	引物	扩增长度	GenBank 登录号
<i>Bcl - 2</i>	上游:5' - GGAGGATTGTGGCCTTCTTTGAG - 3'; 下游:5' - TCACTTGTGGCTCAGATAGGCAC - 3'	287 bp	M13994.1
β - <i>actin</i>	上游:5' - GGAGGATTGTGGCCTTCTTTGAG - 3'; 下游:5' - TCACTTGTGGCTCAGATAGGCAC - 3'	275 bp	AK225414.1

在荧光定量 PCR 仪上按照下述程序进行反应:94 $^\circ\text{C}$, 5 s;58 $^\circ\text{C}$,30 s;72 $^\circ\text{C}$,20 s;循环 35 次。反应结束后,记录 C_t 值。

2 结果与分析

2.1 石刁柏汁抑癌作用的 MTT 检测

通过 MTT 法检测不同浓度石刁柏汁对结肠癌细胞株 SW620 的抑制作用,结果见图 1。由图 1 可以看出,石刁柏汁对结肠癌细胞株 SW620 的抑制作用具有剂量效应相关性,即随着石刁柏汁的浓度不断增加,其对结肠癌细胞株 SW620 的抑制作用也不断加强。

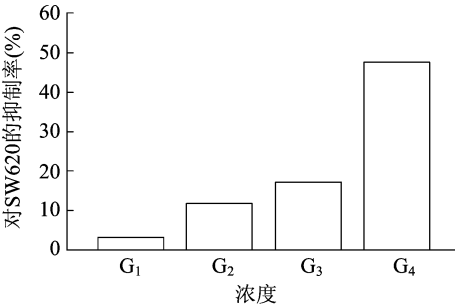


图 1 不同浓度石刁柏汁对结肠癌细胞株 SW620 的抑制作用

2.2 石刁柏汁刺激后结肠癌细胞株 SW620 生长曲线的绘制

在试验组中加入石刁柏原汁,对照组中加入等量 PBS 缓冲液(pH 值 7.4),每隔 12 h 用细胞计数仪检测 1 次活细胞数量,绘制对照组与试验组的结肠癌细胞株 SW620 的生长曲

1.5 细胞的形态学观察

取 2 组正常生长的细胞,向第 1 组中加入 1.2 mL 石刁柏汁,第 2 组加入等体积的 PBS 缓冲液(pH 值 7.4)。反应 24 h 后,置于电子显微镜下观察,拍照并记录结果。

1.6 石刁柏汁刺激后结肠癌细胞株 SW620 总 DNA、总 RAN 的提取

本研究采用 DNA、RNA 提取试剂盒,从同一个样品中同时提取该样本的总 DNA、总 RNA。

1.7 琼脂糖凝胶电泳

同时提取对照组和试验组细胞株 SW620 的基因组,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.8 反转录 PCR

用 TaKaRa 公司的反转录 PCR 试剂盒,将提取到的 RNA 合成 cDNA。在 PCR 仪上按照下述程序进行反转录:37 $^\circ\text{C}$, 15 min;85 $^\circ\text{C}$,5 s;保存温度 4 $^\circ\text{C}$ 。扩增完毕后,置于 -20 $^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。

1.9 荧光定量 PCR 检测 *Bcl - 2* 的相对表达情况

根据 GenBank 登录的 *Bcl - 2* 序列,用 DNASTar 软件设计引物,由上海捷瑞生物公司合成。内参基因是人类的 β - *actin* (GenBank 登录号 AK225414.1),引物序列见表 1。

线,用生物统计软件分析的结果见图 2。由图 2 可以看出,在一定时间范围内,对照组和试验组的活细胞的数量都随着时间的增加而增加,对照组在 24 h 时细胞数量达到最大值,之后随着时间的增加,活细胞数量反而减少,符合细胞生长规律。与对照组相比,试验组在任何时间点的细胞浓度均低于对照组,表明石刁柏汁对结肠癌细胞株 SW620 的生长有明显的抑制作用。

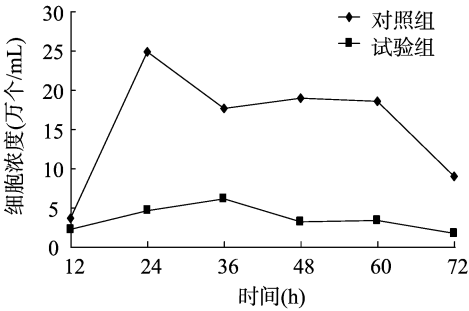
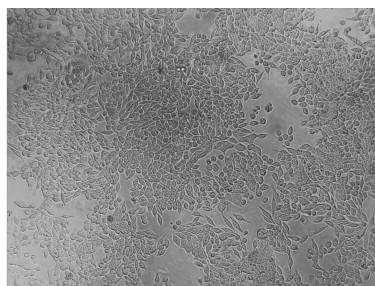


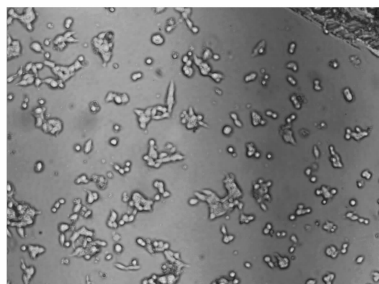
图 2 对照组与试验组结肠癌细胞株 SW620 的生长曲线

2.3 石刁柏汁抑癌作用的形态学观察

为了进一步研究石刁柏汁对结肠癌细胞 SW620 的影响,在显微镜下分别观察用石刁柏汁处理 24 h 和未用石刁柏汁处理的结肠癌细胞株 SW620。由图 3 可以看出,对照组细胞贴壁紧密,细胞呈梭形或椭圆形。与对照组相比,石刁柏汁刺激后的结肠癌细胞株 SW620 发生脱落,体积变小,细胞变形,出现凋亡小体,部分已经出现裂解现象,说明石刁柏汁对结肠癌细胞株 SW620 的生长有明显的抑制作用,并且能促进其



A. 对照组



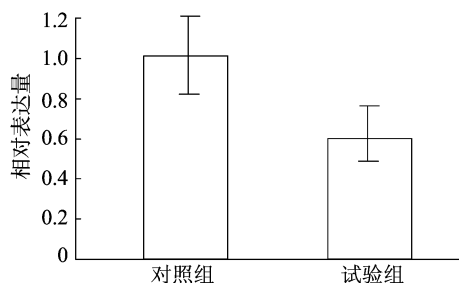
B. 试验组

图3 不同处理结肠癌细胞株SW620的形态观察

凋亡。

2.4 荧光定量 PCR 检测 *Bcl-2* 基因

本试验通过实时荧光定量 PCR 技术分别检测了石刁柏汁处理组和对照组的结肠癌细胞株 SW620 中凋亡相关基因——*Bcl-2* 的表达情况,结果如图 4 所示。由图 4 可以看出,与对照组相比,*Bcl-2* 基因在试验组中的表达量约为其在对照组中表达量的 50%。*Bcl-2* 处于细胞凋亡的共同路径上,为抑制凋亡基因,是细胞凋亡的关键执行者之一,其表达量降低说明细胞发生了凋亡。

图4 不同处理结肠癌细胞株SW620中*Bcl-2*基因的表达状况

3 结论

随着当代医药学研究的进展,科学家们发现石刁柏中含有大量能有效控制癌细胞生长、促进细胞生长正常化的物质^[7]。中医学临床试验证明:石刁柏是新一代防癌肿瘤、治癌肿瘤的保健药品,也具有提神解暑等药效功用,在国内外享有很高的声誉。山东省医学科学院药物研究所通过试验证明,石刁柏提取物对癌肿瘤细胞具有抑制“拓扑异构酶”的活性、促使癌肿瘤细胞 DNA 双链断裂的作用,但由于明显的剂量效应相关性,对于“拓扑异构酶”浓度较低的人体正常细胞则不能发生作用,这就使石刁柏在抗癌抗肿瘤方面具有了科学家最重视的选择性:既可以直接抑制杀灭癌肿瘤细胞,又对正常细胞没有毒副作用。美国生物化学家卡尔·卢茨以及理查

德·文赛尔经过多年研究证明,用石刁柏治疗淋巴腺癌肿瘤、膀胱癌肿瘤、肺癌肿瘤和皮肤癌肿瘤有极好的疗效^[2,4]。目前国内关于石刁柏抗癌作用的研究报道较少,本试验以结肠癌细胞株 SW620 为研究对象,初步探讨了石刁柏汁对其增殖和凋亡的影响。

通过细胞形态学观察,发现加入石刁柏汁刺激后,结肠癌细胞株 SW620 出现细胞脱落、变形、贴壁性下降等凋亡现象^[8]。通过 MTT 法检测不同浓度的石刁柏汁对结肠癌细胞株 SW620 的抑制作用发现,不同浓度的石刁柏汁对结肠癌细胞株 SW620 均有抑制作用,并且其抑制作用随着石刁柏汁浓度的升高而增强。通过对比石刁柏处理组和对照组的结肠癌细胞株 SW620 的生长曲线,发现在加入石刁柏汁后,结肠癌细胞株 SW620 的生长受到抑制。近年来,有学者认为细胞凋亡在肿瘤细胞发生和发展过程中起重要的作用,本试验通过实时荧光定量 PCR 检测石刁柏汁处理后结肠癌细胞株 SW620 中的凋亡抑制基因 *Bcl-2* 发现,该基因在试验组中的表达量约为其在对照组中表达量的 50%。*Bcl-2* 基因(即 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因)是一种原癌基因,它具有抑制凋亡的作用,其表达量降低说明石刁柏汁刺激后的结肠癌细胞株 SW620 发生了凋亡。

综上所述,石刁柏汁对结肠癌细胞株 SW620 的增殖有一定抑制作用,其作用机制可能与细胞凋亡有关。当今,在日常生活中人们越来越青睐具有药理作用的天然食物成分,因此多食用具有抗癌作用的石刁柏对于抑制肿瘤的发生和发展、保持机体健康等均具有良好的效果。

参考文献:

- [1] 孙雪雁,何昌生. 芦笋汁的开发与研究[J]. 中国食品学报, 1999, 3(1): 60-63, 17.
- [2] Stirpe F, Gasperi - Campani A, Barbieri L, et al. Ribosome - in - activating proteins from the seeds of *Sapornia officinalis* L. (soapwort), of *Agrostemma githago* L. (com cockle) and of *Asparagus officinalis* L. (asparagus), and from the latex of *Hura crepitans* L. (sandboxtree) [J]. Biochem J 1983, 216(3): 617.
- [3] 季宇彬,陈学军,汲晨峰,等. 芦笋多糖提取、单糖组分分析及定量测定[J]. 中草药, 2006, 37(8): 1159-1161.
- [4] Shao Y, Chin C K, Ho C T, et al. Anti - tumor activity of the crude saponins obtained from asparagus [J]. Cancer Letters, 1996, 104(1): 31-36.
- [5] 汪淑洁,王志良,陈茜,等. 芦笋治疗对恶性肿瘤患者 T 细胞亚群的影响[J]. 河南医科大学学报, 1994, 29(3): 261-263.
- [6] 张新明,黄少华. 芦笋研究开发现状 & 展望[J]. 山东食品发酵, 2008(2): 16-18.
- [7] 夏俊,陈治文,胡守芬,等. 芦笋提取液抑制恶性黑色素瘤 A375 细胞增殖的研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2004, 29(2): 95-97.
- [8] 田晓环,王睿,艾华,等. 大黄廑虫丸诱导肿瘤细胞凋亡的形态学研究[J]. 吉林中医药, 2011, 31(3): 266-267.
- [9] Wang X Z, Zhang S J, Chen Y X, et al. Effects of platelet - derived growth factor and interleukin - 10 on Fas/Fas - ligand and *Bcl-2/Bax* mRNA expression in rat hepatic stellate cells *in vitro* [J]. World Journal of Gastroenterology, 2004, 10(18): 2706-2710.