

香蕉皮多糖对人乳腺癌细胞增殖、克隆形成与核因子- κ B 蛋白表达的影响

朱开梅, 杨海云, 顾生玖*

(桂林医学院药学院, 广西 桂林 541004)

[摘要] 目的: 观察香蕉皮多糖对体外培养的人乳腺癌细胞增殖、克隆形成及其核因子- κ B (nuclear- κ B, NF- κ B) p65 蛋白表达的影响。方法: 采用溴化四甲基偶氮[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]法, 取对数生长期人乳腺癌细胞(MCF-7), 随机分为药物组与对照组, 用质量浓度为 0.5, 1.5, 2.5, 3.5 g·L⁻¹ 香蕉皮多糖作用于 MCF-7 细胞, 分别干预 24, 48, 72 h。通过克隆形成试验, Western blot 试验, 观察香蕉皮多糖对 MCF-7 细胞克隆形成及对 MCF-7 细胞 NF- κ B(p65) 蛋白表达的影响, 试验中设置药物组与对照组, 药物组 MCF-7 细胞加入质量浓度为 0.5, 1.5, 2.5 g·L⁻¹ 香蕉皮多糖干预 48 h。结果: 香蕉皮多糖对 MCF-7 细胞的增殖有抑制作用, 诱导肿瘤细胞凋亡作用与药物浓度和药物作用时间成正相关。MCF-7 细胞的克隆形成率, NF- κ B(p65) 蛋白的表达随香蕉皮多糖浓度升高而显著下降。结论: 香蕉皮多糖对 MCF-7 细胞增殖, 克隆形成有抑制作用, ($P < 0.05$)。香蕉皮多糖干预后, MCF-7 细胞表达 NF- κ B(p65) 明显减弱。其诱导 MCF-7 细胞凋亡作用机制可能下调 NF- κ B 表达水平有关。

[关键词] 香蕉皮多糖; 乳腺肿瘤; 增殖; 克隆形成; 核因子- κ B

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)06-0188-04

Influence of Polysaccharides of Banana Peel on Proliferation, Colony Formation and Expression of Nuclear Factor- κ B in Human Breast Cancer Cells

ZHU Kai-mei, YANG Hai-yun, GU Sheng-jiu*

(School of Pharmacy, Guilin Medical College, Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Polysaccharides of Banana Peel on proliferation, colony formation and expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65 in human breast cancer cells. **Method:** The MTT assay was used, and the human breast cancer cells (MCF-7) in logarithmic phase of growth were randomly divided into drug group and control group, with the concentration of 0.5, 1.5, 2.5, 3.5 g·L⁻¹ Banana Peel polysaccharides in MCF-7 cells, Intervention durations were 24, 48, 72 h accordingly. The colony formation assay and the western blot technique were used to observe the effects of Polysaccharides on human breast cancer cell colony formation and expression of NF- κ B(p65) in breast cancer cells. Test set of drug group and control group, drug group MCF-7 cell with the concentration of 0.5, 1.5, 2.5 g·L⁻¹ Banana Peel polysaccharides intervention 48 h. **Result:** Banana Peel polysaccharides inhibited cell proliferation and induced apoptosis of tumor cells within the drug concentration and drug effects duration of studies. MCF-7 cell colony formation rate, NF- κ B (p65) protein expression decreased significantly with a dose-response manner **Conclusion:** Banana peel polysaccharides inhibited the MCF-7 cells

[收稿日期] 20100928(005)

[基金项目] 广西科技攻关项目(科技攻关 0815005-1-17); 广西自然科学基金(桂科攻 0992003A-25; 0728229); 桂林市科技攻关项目(科技攻关 20090106-6, 09321052)

[第一作者] 朱开梅, 硕导, 教授, 从事抗肿瘤药物的研究, Tel: 13977375180, E-mail: glzkm@163.com

[通讯作者] * 顾生玖, 硕导, 博士, 教授, 从事药物化学与医用高分子材料及医药智能释放系统方面的研究, Tel: 13607733816, E-mail: gushengjiu@163.com

proliferation and colony formation ($P < 0.05$). Polysaccharide banana peel down-regulated the expression levels of NF- κ B(p65) protein in MCF-7 cells. The mechanism of MCF-7 apoptosis may be related to down-regulation of the expression levels of NF- κ B(p65).

[**Key words**] polysaccharides of Banana Peel; breast cancer; proliferation; colony formation; nuclear factor- κ B

乳腺癌是妇女中最常见的恶性肿瘤,并且其发病率呈逐年递增趋势^[1],严重危害女性健康。由于手术、放射治疗及联合化疗的治疗手段的使用,乳腺癌患者的5年存活率明显升高,但传统的化疗药物毒、副作用大,患者难以耐受。因而寻求不良反应较小并能有效地抑制肿瘤细胞的增殖的药物是近年的研究热点。植物多糖因毒副作用小,具有很大的开发前景,目前已有多种植物多糖类化合物作为抗肿瘤免疫药物应用于临床^[2-5]。但香蕉皮多糖对乳腺癌细胞的生物学作用及其作用机制鲜有文献报道。本实验检测了香蕉皮多糖对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖活性、克隆形成的作用以及 NF- κ B(p65)蛋白表达的影响,以进一步深入探讨其抗肿瘤作用的机制。

1 材料

1.1 细胞 人乳腺癌细胞株 MCF-7 购自 ATCC 公司。

1.2 药物 香蕉皮(Banana Peel)为芭蕉科(Musaceae)芭蕉属(*Musa*)的单子叶植物,香蕉皮多糖为实验室自制,采用微波法提取,经 DEAE-Sepharose Fast Flow 和 SephadexG200 凝胶柱分离纯化,收集合并主要峰部分,用苯酚硫酸法检测多糖含量达 92.3%,呈粉末状,用 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)培养液溶解,配成 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液,经 $0.2 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.3 试剂与仪器 鼠抗人 NF- κ B(p65)单克隆抗体(批号 201005)购自 Santa Cruz 公司。纯化人类 β -actin 单克隆抗体(批号 201006),增强型 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 201006)购自碧云天公司。辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠二抗(批号 20100615),PVDF 膜均购自 Millipore 公司。增强型 ECL 化学发光试剂盒(批号 201005)购自博奥森公司。MTT(批号 201003),高糖型 DMEM 培养基(批号 201003)购自 Gibco 公司。胰蛋白酶(批号 200912)购自 AMRESCO 公司。姬姆萨色素(批号 201008)购自 Sigma 公司。优级胎牛血清(批号 201006)购自四季青公司。DEAE-Sepharose Fast

Flow(批号 200602)和 SephadexG200(批号 201004)购自 Pharmacia 公司。微波萃取仪为祥鹤公司产品,冷冻干燥机为 Christ 公司产品,电泳转膜仪为 Bio-RAD 公司产品。

2 方法

2.1 香蕉皮多糖提取^[6-8] 将市购新鲜香蕉皮洗净,经甲醇脱脂后,粉碎、干燥,采用蒸馏水作溶剂微波抽提,抽滤取上清,滤液经乙醇 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 沉淀过夜后收集沉淀物,经采用三氯乙酸法除蛋白,活性炭脱色处理,再经乙醇反复沉淀,收集不同组分沉淀物经 DEAE-Sepharose Fast Flow 和 SephadexG200 凝胶柱分离纯化,收集主要峰部分,经透析、冷冻干燥得香蕉皮多糖。

2.2 细胞培养 培养条件为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$, 饱和湿度。细胞单层贴壁生长于含 10% 胎牛血清、 $100 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素及 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素的 DMEM 培养液中,培养箱孵育,用 0.25% 胰蛋白酶消化,常规传代,取对数生长期细胞进行试验。

2.3 MTT 法检测香蕉皮多糖对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用 取对数生长期细胞经胰酶消化、吸管吹散成单个细胞,于每孔 5×10^3 个细胞密度接种于 96 孔板中,每孔体积为 $200 \mu\text{L}$ 。每浓度组设 5 个平行孔,置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中,培养 24 h,将香蕉皮多糖用 DMEM 培养液溶解,每孔中加入设定浓度香蕉皮多糖溶液,稀释至需要的工作浓度,对照组则加入等量不含香蕉皮多糖溶液的 DMEM 培养液,分别于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵箱中培养 24, 48, 72 h, MTT 用 PBS 配制成质量浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液,每孔加 $10 \mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育 4 h,吸弃上清,加二甲亚砜 $100 \mu\text{L}$ /孔,酶标仪上振动 10 min,选择测定波长为 595 nm,测定每孔吸光度(A)值,并取 5 复孔均值。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (\text{对照组 A} - \text{实验组 A}) / (\text{对照组 A} - \text{空白组 A}) \times 100\%$$

2.4 克隆形成试验 取对数生长期细胞,用 0.25% 胰酶消化并用吸管吹打成单个细胞,分别接种于含完全培养液的 6 孔板中,200 个细胞/孔。轻轻摇动,使细胞分散均匀,24 h 细胞贴壁后吸弃培养基,

设置药物组和对照组,药物组各孔分别加质量浓度为 0.5,1.5,2.5 g·L⁻¹ 含药培养基,每孔 4 mL,对照组加等体积培养基。中途加药孔换新鲜含药培养液,对照组换新鲜培养液于培养箱中继续培养,以对照组为参照标准,当对照组镜下可见的细胞团达到 50 个细胞时,弃去原培养液,用 PBS 漂洗,用纯甲醇固定细胞,加适量姬姆萨色素染细胞核 5 min,然后用清水缓慢洗去染色液,干燥。将 6 孔板底部贴一张带网格的透明胶片,倒置显微镜下计数克隆,含 50 个细胞以上形成的细胞集落为 1 个克隆,并计算克隆形成率。

克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数 × 100%

2.5 Western blot 取对数生长期细胞,用 0.25% 胰酶消化后接种于 50 mL 培养瓶中,24 h 细胞贴壁后换培养基,分药物组和对照组,药物组加入质量浓度为 0.5,1.5,2.5 g·L⁻¹ 含药培养基,对照组加等体积培养基。培养箱中静置培养 48 h 后,提取各组细胞总蛋白,经 BCA 法测定各组蛋白浓度。PAGE 分离胶浓度为 13%,每孔上样量为 45 μL,电泳,转膜。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h,用 NF-κB (p65) 及 β-actin 抗体标记,室温孵育 1 h,TBST 洗涤后加入 HRP 标记的二抗,室温平摇 1 h,TBST 充分漂洗膜后,暗室中化学发光液发光,X 片显影曝光。

2.6 统计学方法 试验所得数据采用 SPSS 17.0 统计软件包处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 ANOVA 单因素方差分析及两两比较的 LSD 法, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 香蕉皮多糖对 MCF-7 细胞增殖活性的影响

不同浓度的香蕉皮多糖对 MCF-7 细胞的增殖均有抑制作用,24,48,72 h 时,各浓度组与对照组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);且不同浓度组均随香蕉皮多糖浓度的增加、作用时间的延长,诱导肿瘤细胞凋亡作用越明显(表 1)。

3.2 香蕉皮多糖对 MCF-7 细胞克隆形成的影响

不同质量浓度(0.5,1.5,2.5 g·L⁻¹)的香蕉皮多糖对 MCF-7 细胞克隆形成均有抑制作用,MCF-7 细胞克隆形成率随香蕉皮多糖浓度升高而下降,见表 2。

3.3 香蕉皮多糖抑制 NF-κB 表达 Western blot 结果显示,以 β-actin 作为内参照,MCF-7 细胞经香蕉皮多糖干预 48 h 后,随着药物剂量的增加,NF-κB (p65) 蛋白的表达进行性降低。(图 1)

表 1 香蕉皮多糖对 MCF-7 细胞增殖活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	终质量浓度 /g·L ⁻¹	细胞增殖活性/A		
		24 h	48 h	72 h
对照	-	0.685 ± 0.037	0.887 ± 0.025	1.409 ± 0.134
空白	-	0.054 ± 0.002	0.053 ± 0.003	0.058 ± 0.006
香蕉皮多糖	0.5	0.578 ± 0.020 ¹⁾	0.627 ± 0.022 ¹⁾	0.846 ± 0.030 ¹⁾
	1.5	0.529 ± 0.027 ¹⁾	0.554 ± 0.015 ¹⁾	0.361 ± 0.013 ¹⁾
	2.5	0.473 ± 0.025 ¹⁾	0.425 ± 0.024 ¹⁾	0.230 ± 0.024 ¹⁾
	3.5	0.274 ± 0.025 ¹⁾	0.224 ± 0.022 ¹⁾	0.077 ± 0.026 ¹⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

表 2 不同浓度香蕉皮多糖对 MCF-7 细胞克隆形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	终质量浓度/g·L ⁻¹	克隆形成率/%
对照	-	76.0 ± 4.8
香蕉皮多糖	0.5	56.5 ± 4.0 ¹⁾
	1.5	29.0 ± 3.0 ¹⁾
	2.5	17.0 ± 3.1 ¹⁾

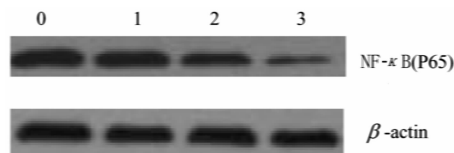


图 1 不同浓度香蕉皮多糖对 MCF-7 细胞 NF-κB (p65) 表达的影响

0. 对照组;1. 香蕉皮多糖 0.5 g·L⁻¹ 组;

2. 香蕉多糖 1.5 g·L⁻¹ 组;3. 香蕉皮多糖 2.5 g·L⁻¹ 组

4 讨论

细胞信号传导通路在肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭,抵抗化疗和放疗等方面起着重要作用。NF-κB 是一类广泛存在于肿瘤细胞内的重要转录因子,是多信号转导途径的汇聚点,参与介导了细胞凋亡和增殖的多种基因的表达调控,通过与多种基因的启动子或增强子区域的固定核苷酸序列结合而启动基因转录^[9-11]。其通常其存在的形式是由 p50 和 p65 组成的异源二聚体,p65 亚基具有转录活性。在绝大多数静止期的细胞中,NF-κB 与其阻抑物 IκB 蛋白相结合,以无活性形式存在于细胞质中。在受到刺激作用时,IκB 解离,NF-κB 释放进入细胞核启动靶基因转录,上调与细胞增殖相关的基因表达或激活凋亡抑制因子以及阻断凋亡途径中的某个信号分子的表达而发挥抗凋亡作用。因此抑制 NF-κB 的

清开灵对 AD 小鼠学习记忆及脑组织 β -淀粉样蛋白水平的影响

王永丽^{1*}, 魏芳², 韩璇³, 李玉巧³, 问慧娟³, 周雅静³

(1. 河北大学药学院, 河北省药物质量分析控制重点实验室, 河北保定 071000;

2. 河北大学公共卫生学院, 河北保定 071000; 3. 河北大学基础医学院, 河北保定 071000)

[摘要] 目的: 研究清开灵对阿尔茨海默病(AD)模型小鼠脑组织 β -淀粉样蛋白($A\beta$)水平的影响。方法: 选用雄性 KM 小鼠 60 只, 随机分成 6 组: 正常对照组、模型对照组、清开灵低、中、高剂量(20, 40, 80 $g \cdot kg^{-1}$)组和阳性对照药尼莫地平 0.3 $g \cdot kg^{-1}$ 组, 每组 10 只。ig 给予等体积药物或生理盐水, 每日给药 1 次, 连续给药 30 d。末次给药 30 min 后, 东莨菪碱造模, 用 Morris 水迷宫测试行为学指标, 采用双抗体夹心法测定脑组织 β -淀粉样蛋白水平。结果: Morris 水迷宫测试表明, 清开灵能明显缩短模型小鼠游泳时间及游泳路程; 脑组织 $A\beta$ 含量测定显示清开灵能显著降低脑组织 $A\beta$ 水平。结论: 清开灵能改善造模小鼠的学习记忆功能, 其机制可能与降低脑组织 $A\beta$ 水平有关。

[关键词] 清开灵; 学习记忆; β -淀粉样蛋白($A\beta$)

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)06-0191-03

Effect of Qinkailing on Learning and Memory Ability and Expression of β -amyloid Protein of Brain Tissue in Alzheimer's Disease Model Induced by Scopolamine in Mice

[收稿日期] 20100926(007)

[基金项目] 河北省科学技术研究与发展计划项目(10276105D-89)

[通讯作者] *王永丽, 硕士学位, 副教授, 从事中药药理学研究, Tel: 13930296611, E-mail: wangyongli_2000@163.com

表达或激活, 可促进肿瘤细胞的凋亡, 抑制其生长和转移, 从而干预肿瘤演变的整个过程。本研究发
现, 香蕉皮多糖作用 MCF-7 细胞 48 h 后, 明显抑制
NF- κ B(p65)的表达, 从而发挥对人乳腺癌细胞的
增殖抑制作用, 但确切机制仍有待进一步探讨。

[参考文献]

[1] 徐光炜, 胡永昇, 阚秀. 中国 10 万妇女乳腺癌筛查初探[J]. 中国肿瘤, 2010, 19(9): 565.
[2] 王爱云, 陈群, 李成付, 等. 茯苓多糖修饰物抗肿瘤作用及其机制研究[J]. 中草药, 2009, 40(2): 268.
[3] 李世刚, 张永琦. 红芪多糖诱导人肝癌 HEP-G2 细胞凋亡的作用机制研究[J]. 中药材, 2009, 32(8): 1249.
[4] 吴晓忠, 罗素琴, 刘乐乐, 等. 中药多糖抗肿瘤作用的研究进展[J]. 内蒙古医学院学报, 2009, 31(1): 81.
[5] 王君, 胡霞敏. 海藻提取物 Fucoidan 抗肿瘤作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(7): 1757.

[6] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2 版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 317.
[7] 沈建林, 余龙江, 金文闻, 等. 香蕉多糖的分离纯化及其性质研究[J]. 食品科学, 2004, 25(8): 73.
[8] 李俊, 黄锡山, 张艳军, 等. 超声波法提取罗汉果多糖的工艺研究[J]. 中药材, 2007, 30(4): 475.
[9] 秦瑾, 刘正湘. FRANK 抑制人乳腺癌细胞体外增殖及机制研究[J]. 肿瘤, 2007, 27(1): 34.
[10] Reif S, Lang A, Lindquist J N, et al. The role of focal adhesion kinase-phosphatidylinositol 3-kinase-akt signaling in hepatic stellate cell proliferation and type I collagen expression [J]. J Biol Chem, 2003, 278(10): 8083.
[11] See V, Rajala N K, Spiller D G, et al. Calcium-dependent regulation of the cell cycle via a novel MAPK-NF-kappaB pathway in Swiss 3 T3 cells [J]. J Cell Biol, 2004, 166(5): 661.

[责任编辑 聂淑琴]