

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)09-0844-02

白藜芦醇抑制喉癌 Hep-2 细胞体外生长的初步研究

李云川, 季文越 (中国医科大学第一医院耳鼻喉科 辽宁 沈阳 110001)

Priliminary investigation on resveratrol in inhibiting growth of laryngeal carcinoma Hep-2 cells *in vitro*

Li Yun-Chuan, Ji Wen-Yue

Department of Otorhinolaryngology, First Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China

【Abstract】 AIM: To study the mechanism of the traditional Chinese medicine resveratrol in inhibiting laryngeal carcinoma Hep-2 cells. **METHODS:** The single cell gel electrophoresis (SCGE) was used to detect the DNA damage of Hep-2 cells by resveratrol. **RESULTS:** Resveratrol at the level of (5-10) mL/L caused DNA damage of Hep-2 cells in a dose-effect manner. In the experiment group, the rate of DNA tail (%) was 82.2 and 94.9, the tail DNA content (%) was 12.25 (9.10) and 23.40 (13.53), the tail length (μm) was 10.50 (9.48) and 18.45 (8.20), and the tail movement was 1.80 (1.60) and 3.80 (3.73), significantly higher than those in control group ($P < 0.01$). **CONCLUSION:** Resveratrol, a traditional Chinese medicinal herb, can cause DNA damage of Hep-2 cells.

【Keywords】 resveratrol; laryngeal carcinoma; DNA damage

【摘要】目的 研究中药白藜芦醇对喉癌 Hep-2 细胞的作用机制。方法 应用单细胞凝胶电泳法(SCGE),检测白藜芦醇引起 Hep-2 细胞的 DNA 损伤。结果 5 和 10 mL/L 白藜芦醇能引起 Hep-2 细胞 DNA 损伤并具有剂量反应关系。实验组细胞拖尾率(%)为 82.2, 94.9, 尾 DNA 含量(%)为 12.25 (9.10), 23.40(13.53), 尾长(μm)为 10.50(9.48), 18.45 (8.20), 尾动量(μm)为 1.80(1.60), 3.80(3.73)显著高于对照组($P < 0.01$)。结论:中药白藜芦醇具有致 Hep-2 细胞 DNA 损伤的作用。

【关键词】白藜芦醇 喉肿瘤 DNA 损伤

【中图分类号】R73-351 **【文献标识码】**A

0 引言

近年来抗癌中药由于既有抗癌作用,又有扶正,增效减毒及抗转移等特殊作用而得到人们的重视。

收稿日期 2004-10-13; 修回日期 2004-12-08

基金项目 黑龙江省自然科学基金(D2004-15)

通讯作者 李云川(1964-)男(汉族)黑龙江省安达市人。博士,副教授,副主任医师。Tel. (0451)88585198 Email. liujianlin999@sina.com

喉癌是头颈部常见肿瘤,近年来发病率有上升趋势,目前治疗以手术为主,化疗有较大的毒副作用。白藜芦醇(Resveratrol)在肿瘤发生发展各阶段具有较强的抑制作用,于良等^[1]报道其对肝癌细胞的影响,对喉癌的作用尚无报道。我们应用单细胞凝胶电泳技术(single cell gel electrophoresis, SCGE)研究白藜芦醇对喉癌 Hep-2 细胞的作用机制,为喉癌的综合治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 白藜芦醇(自行从新鲜葡萄中获得高纯度白藜芦醇);人喉鳞癌细胞株 Hep-2(哈尔滨医科大学微生物教研室); α -MEM 培养基(Gibco 公司);低熔点琼脂糖、正常熔点琼脂糖(Amresco 公司);溴化乙锭(Sigma 公司);KIAS 彗星图像分析系统。

1.2 方法 喉癌 Hep-2 细胞以 α -MEM 为基本培养基,添加 100 mL/L 小牛血清,1 g/L 青链霉素,50 g/L 庆大霉素,10 g/L 谷氨酰胺制成完全培养基,按常规传代培养。当细胞处于对数生长期时,分别加入浓度为 5 和 10 mL/L 的白藜芦醇作为实验组,同时设空白对照组,作用 48 h 后用 2.5 g/L 胰蛋白酶和 0.2 g/L EDTA 消化并收集细胞。将细胞悬液的浓度调整为 $(1 \sim 5) \times 10^9/\text{L}$ 。载玻片上滴加 PBS 液配制的 6 g/L 正常熔点琼脂糖 100 μL ,盖上盖玻片 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固化 5 min,去除盖玻片制成第 1 层胶。将对照组和浓度为 5, 10 mL/L 白藜芦醇作用 48 h 的 Hep-2 细胞悬液 10 μL 与 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 6 g/L 低熔点琼脂糖 90 μL 充分混匀,滴加在第 1 层胶上,盖上盖玻片 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固化 10 min,去除盖玻片铺成第 2 层胶。将 6 g/L 低熔点琼脂糖滴加在第 2 层胶上,加盖玻片 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固化 10 min,即铺成第 3 层胶。取下盖玻片,将凝胶载玻片浸于新鲜配制的裂解液中,裂解持续时间 1 h。从裂解液中取出载玻片,用蒸馏水洗去过量的盐,移入电泳槽中,将新配制的电泳缓冲液倒入电泳槽,静止 40 min。选择电压 25 V,电流 300 mA,低温、避光,电泳 40 min。取出载玻片,用 0.4 mmol/L Tris (pH=7.5)漂洗 3 次,每次 5 min,晾干并滴加 15 mg/L 溴化乙锭 50 μL 染色,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下保存。将载玻片编为盲片,置于荧光显微镜下(放大倍数为 10 \times 10),每张玻片观察 10 个视野,计算出拖尾细胞比率。然后选择接近于视野中

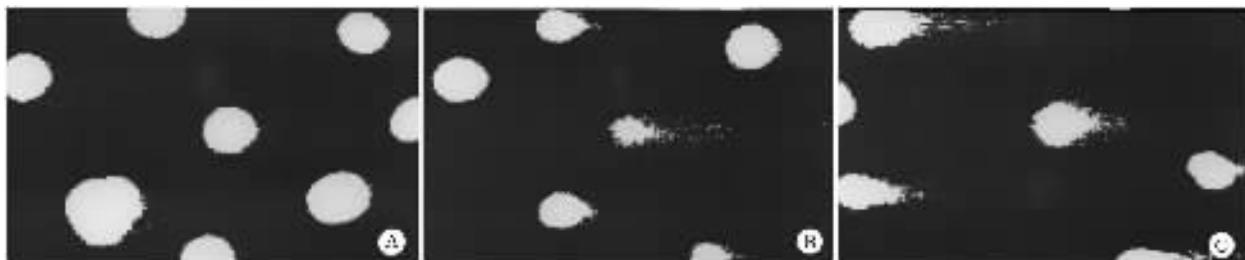
心、染色清晰、拖尾形态在目标样品中占优势的 20 个拖尾细胞,通过 KIAS 系统测量尾 DNA 含量(tail DNA%),尾长(tail length)及尾动量(tail moment).尾动量为尾 DNA 含量与尾长的乘积.

统计学处理:用 SPSS 统计学软件,以 χ^2 检验判断各组间拖尾率差异有无显著性;以 Kruskal-Wallis 检验比较各组间尾 DNA 含量、尾长及尾动量的差异,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异,在各组间比较基础上,用 Mann-Whitney u 检验进行各组间两两比较,此时

检验水准 α 调整为 0.025.

2 结果

2.1 Hep-2 细胞拖尾情况 拖尾率随浓度的增大而增加,各组间细胞拖尾率差别有显著性($P < 0.01$),其中 5 mL/L 实验组与对照组细胞拖尾率(6.3% vs 82.2%)差别显著($P < 0.01$),10 mL/L 实验组(94.9%)与对照组细胞拖尾率差别更显著($P < 0.01$, Fig 1).



A : There are no cell tails in control group ; B : The group of 5 mL/L , cell tails can be observed ; C : The group of 10 mL/L , cell tails are obvious.

Fig 1 Condition of Hep-2 cell tails

图 1 Hep-2 细胞拖尾情况

2.2 KIAS 彗星图像分析 该系统自动计算出反映单个 Hep-2 细胞 DNA 损伤程度的指标,各指标数值随着药物浓度的增大而增加,各组间尾 DNA 含量、尾长及尾动量秩和检验差异有显著性($P < 0.025$);两组实验组与对照组间各指标比较差异也具有显著性($P < 0.025$, Tab 1).

表 1 白藜芦醇作用 48 h 的 Hep-2 细胞尾 DNA 变化

Tab 1 Changes of DNA of Hep-2 tails , 48h after applied resveratrol [$n = 20$, median(Q-range)]

Tesveratrol	Tail DNA (%)	Tail length (μm)	Tail moment (μm)
Control	4.85(4.05)	0.90(0.55)	0.35(0.76)
5 mL/L	12.25(9.10) ^a	10.50(9.48) ^a	1.80(1.60) ^a
10 mL/L	23.40(13.53) ^a	18.45(8.20) ^a	3.80(3.73) ^a

^a $P < 0.05$ vs control.

3 讨论

白藜芦醇有抗菌、抗癌、抗诱变和抗氧化作用,其抑癌机制可能是通过抗氧化和抗突变作用而发挥起始作用,通过抑制环加氧酶和脂氧合酶以及传递抗炎作用来抑制癌的促进作用,通过引起粒细胞和巨噬细胞减少来抑制癌的发展阶段^[2].另外,白藜芦醇极可能是蛋白质底物的一种竞争性抑制剂,不论其顺式还是反式白藜芦醇,都具有明显的抑制酪氨酸蛋白激酶(PTK)活性的作用^[3],同时它对蛋白激酶 α (PKC)也具有抑制作用^[4],其机制有待于进一步阐明.我们利用新鲜葡萄提取物白藜芦醇为研究对象,以单细胞凝胶电泳技术来定量检测白藜芦醇对喉癌 Hep-2 细胞

的 DNA 损伤.通过实验表明,白藜芦醇对喉癌 Hep-2 细胞具有 DNA 损伤作用,并且随着浓度的增大而增强.细胞拖尾表示药物对细胞 DNA 具有损伤和破坏作用.各组间及实验组与对照组间细胞拖尾率差别有显著性($P < 0.01$),即说明了白藜芦醇对 Hep-2 细胞的杀伤作用.尾 DNA 含量、尾长及尾动量反映了细胞 DNA 损伤程度. KIAS 彗星图像分析系统测得各组间三个指标差异具有显著性($P < 0.0125$),且实验组与对照组差异显著($P < 0.0125$),以量化形式具体说明了白藜芦醇对喉癌 Hep-2 细胞的 DNA 损伤作用大小.因此,白藜芦醇具有致喉癌 Hep-2 细胞 DNA 损伤的作用,这为该药应用于喉癌的化疗提供了实验依据.

【参考文献】

- [1] 于良,孙中杰,吴胜利,等.白藜芦醇对小鼠移植性肝癌组织中细胞周期蛋白的影响[J].第四军医大学学报,2002,23(23):2172-2174.
Yu L, Sun ZJ, Wu SL, et al. Effect of resveratrol on cell cycle proteins in murine transplantable liver cancer[J]. J Fourth Mil Med Univ, 2002, 23(23): 2172-2174.
- [2] Asou H, Koshizuka K, Kyo T, et al. Resveratrol, a natural product derived from grapes, is a new inducer of differentiation in human myeloid leukemia cells[J]. Int J Hematol, 2002, 75(5): 528-533.
- [3] Atten MJ, Attar BM, Milson T, et al. Resveratrol-induced inactivation of human gastric adenocarcinoma cells through a protein kinase C-mediated mechanism[J]. Biochem Pharmacol, 2001, 62(10): 1423-1432.
- [4] Fabbro D, Parkinson D, Matter A. Protein tyrosine kinase inhibitors: New treatment modalities[J]. Curr Opin Pharmacol, 2002, 2(4): 374-381.

编辑 袁天峰