

蜂胶黄酮 Pinobanksin-3-acetate 对结肠癌 HCT-116 细胞增殖及凋亡的影响

木塔力甫·艾买提^{1,2}, 盛磊¹, Abulizi Abudula¹, 买热艳木·艾尔肯², 祖丽比亚·司马义², 依米提·热合曼²

1. 新疆医科大学地方病分子生物学重点实验室, 乌鲁木齐 830011
2. 新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046

摘要 为探讨蜂胶黄酮(Pinobanksin-3-acetate, PB3A)对结肠癌 HCT-116 细胞增殖及细胞凋亡的影响, 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法, 检测不同浓度、不同时间 PB3A、5-氟尿嘧啶(5-FU)及两种药物联合作用对 HCT-116 细胞生长所产生的影响, 倒置显微镜观察细胞的形态学变化特点, Annexin V-FITC/PI 双染色、流式细胞仪检测药物作用 24 h 后的细胞凋亡率。结果显示, PB3A 对 HCT-116 细胞增殖有明显的抑制作用, 并呈浓度和时间依赖性。其抑制活性与 5-FU 几乎没有显著性差异, 联合用药具有协同效应; 在一定剂量范围内, 可见凋亡细胞明显增多。流式细胞仪分析结果表明, 细胞凋亡率明显上升, 呈剂量依赖性。PB3A 对 HCT-116 细胞具有明显的增殖抑制和诱导细胞凋亡作用。

关键词 Pinobanksin-3-acetate; HCT-116 细胞株; MTT 比色法; 细胞凋亡

中图分类号 R737.33

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2015.09.012

Effects of propolis flavonoid Pinobanksin-3-acetate on cell proliferation and apoptosis of human colon cancer cell line HCT116

AMET Mutallip^{1,2}, SHENG Lei¹, ABUDULA Abulizi¹, AIERKEN Maireyanmu², SIMAYI Zulibiyi², RAHMAN Yimit²

1. Xinjiang Key Laboratory of Molecular Biology and Endemic Diseases, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

Abstract The Pinobanksin-3-acetate (PB3A) is a natural flavonoid commonly present in propolis, honey, and many plants. The purpose of this study is to evaluate the anticancer activity of the PB3A on the human colon cancer *in vitro*. The effect of different concentrations of PB3A, 5-fluorouracil (5-FU) and a combination of PB3A and 5-FU for different durations on the proliferation of the cell line HCT-116 is analyzed by the MTT assay. The morphological changes of HCT-116 cells are observed by the inverted photo microscopy after treatment with different concentrations of PB3A for 24 h. The 24 h apoptotic rates of the HCT-116 cells induced with PB3A and 5-FU are determined by the FCM with Annexin V-FITC/PI double labeling. The results show that the PB3A has a significant inhibitory effect on the HCT-116 cell proliferation and in a time- and dose-dependent manner, and an additive or synergistic effect is shown with the common chemotherapy drug 5-FU. The PB3A could induce the typical changes of cell morphology in a dose-dependent manner. The FCM analysis shows that the PB3A could significantly increase the apoptosis rate in a dose-dependent manner. The findings in this study suggest that the PB3A can play a potential anticancer role for the colon cancer *in vitro*, and it could induce the apoptosis.

Keywords Pinobanksin-3-acetate(PB3A); cell line HCT-116; MTT assay; apoptosis

收稿日期:2014-09-22;修回日期:2015-03-26

基金项目:国家自然科学基金项目(31260280)

作者简介:木塔力甫·艾买提,硕士研究生,研究方向为抗肿瘤药物的作用机制,电子邮箱:mutelib@126.com;依米提·热合曼(通信作者),副教授,研究方向为天然抗肿瘤药物的开发及其作用机制,电子邮箱:rahmanyimit@163.com

引用格式:木塔力甫·艾买提, 盛磊, 阿布力孜·阿布杜拉, 等. 蜂胶黄酮 Pinobanksin-3-acetate 对结肠癌 HCT-116 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 科技导报, 2015, 33(9): 69-73.

蜂胶是由蜜蜂从植物幼芽、树皮与树干裂缝上采集的树脂,并混入它的上颚腺分泌物和蜂蜡等加工而成的具有芳香气味的胶状固体物^[1]。蜂胶的组成非常复杂,已知成分达300多种,主要生物活性物质有黄酮类、萜烯类和咖啡酸类化合物等,是一种具有抗肿瘤、抗病原微生物、抗氧化、抗炎和减轻神经功能障碍等生理活性的天然物质^[2-8]。蜂胶中的很多活性成分诸如黄酮,咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester, CAPE)等均具有较强的抑制肿瘤的生物活性。其中,CAPE有特定的肿瘤细胞杀伤力和靶细胞杀伤效应^[9],CAPE作为蜂胶抗肿瘤作用的主要活性成分,对白血病^[10]、结肠癌^[11]、乳腺癌^[12]、宫颈癌^[13]等细胞均有抑制增殖和诱导凋亡作用。本研究组前期研究发现,新疆蜂胶挥发油对HCT-116细胞具有明显的增殖抑制作用,其机制与其阻滞细胞周期和诱导凋亡有关^[17]。黄酮类物质是植物体内存在的多酚类物质,对人体正常细胞和组织没有副作用^[18]。Fang等^[19-22]对此有首次报道,称之为蜂胶黄酮(Pinobanksin-3-acetate, PB3A),是多种抗肿瘤药用植物、蜂蜜和蜂胶的主要活性成分,具有一定的抗氧化活性,蜂胶中含量较丰富。

本研究根据从蜂胶中分离的二氢黄酮PB3A是多种抗肿瘤药用植物、蜂蜜和蜂胶的主要活性成分的实验依据^[20],初步研究PB3A、5-氟尿嘧啶(5-FU)和联合给药对体外培养的结肠癌HCT-116细胞的增殖抑制作用及其对细胞凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

蜂胶黄酮(PB3A,质量分数≥99%)由Yasuyuki T和依米提·热合曼提供,PB3A属于二氢黄酮。结肠癌细胞株HCT-116购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑盐(MTT)为Sigma公司产品,胎牛血清由Gibco公司提供,McCoy's 5A培养基,Annexin V-FITC/PI双染色凋亡试剂盒为BestBio生物公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HCT-116细胞置孵箱(37℃,5% CO₂)内培养,给予含10%胎牛血清的McCoy's 5A完全培养基,其内另加100 U/mL青霉素和链霉素,调pH值至7.2。根据细胞生长状况,2~3 d换液,当细胞生长进入对数生长期时,进行传代、冻存,继续传3代,当细胞继续生长进入对数生长期时可以用于实验;分别给予PB3A、5-FU和这两种药物联合药,临用前以DMSO溶解配成浓度分别为500、100 μg/mL的母液,用McCoy's 5A培养液稀释成不同浓度药物(McCoy's 5A培养液中DMSO浓度≤0.5%)。

1.2.2 PB3A对结肠癌HCT-116细胞增殖抑制作用的检测

取对数生长期的HCT-116细胞,用2.5 g/L胰蛋白酶消化培养细胞,用McCoy's 5A完全培养液配成单个细胞悬液,以每孔5×10³个细胞接种于96孔培养板培养,将培养板移入CO₂

孵箱中,在37℃、5% CO₂及饱和湿度条件下常规培养。24 h后吸除原培养液,加入含上述药物分别为150、100、50、25和5 μg/mL的McCoy's 5A完全培养液200 μL,并设对照组(同浓度DMSO的培养基),另设只加培养液,不加细胞和药物的空白组。此外,再设含50和25 μg/mL 5-FU的McCoy's 5A培养液为阳性对照和这两种药物的合并培养液为协同效应实验组,以上各组均设3个复孔。分别将各组细胞继续培养24、48和72 h后,每孔加入MTT溶液(5 g/L)20 μL,继续培养4 h后,终止培养,弃上清液,每孔加入150 μL DMSO,轻轻振荡10 min,使结晶充分溶解,用酶联免疫标记分析仪在570 nm波长处测定各孔的吸光度A值(A₅₇₀),计算细胞存活率(R_v)和细胞生长抑制率(R_i):

$$R_v = [(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$$

$$R_i = [1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$$

1.2.3 用倒置显微镜动态观察细胞形态学变化

取对数生长期的HCT-116细胞,用2.5 g/L胰蛋白酶消化后,以每孔5×10³个细胞接种于96孔培养板培养,24 h后吸除原培养液,加入含PB3A分别为50、100和150 μg/mL的培养液200 μL,继续培养24 h后,用倒置显微镜观察细胞形态学变化。

1.2.4 PB3A对结肠癌HCT-116细胞凋亡的影响

取对数生长期的HCT-116细胞经2.5 g/L胰蛋白酶消化后,以每孔1×10⁵个细胞接种于6孔培养板培养,24 h后吸除原培养液,分别加入50、100 μg/mL的PB3A和50 μg/mL的5-FU McCoy's 5A培养液2 mL,并设对照组(同浓度DMSO的培养基),继续培养24 h,收集细胞,离心(1000 r/min,4℃)5 min,弃上清液,用磷酸盐缓冲液(PBS)重悬细胞并计数,取含有2×10⁵个细胞的缓冲液,离心(1000 r/min,4℃),弃上清液,再次重悬离心后弃上清液,加入400 μL的1×Binding Buffer,再加入5 μL Annexin V-FITC和10 μL PI,轻轻混匀。在室温下,避光反应5~15 min,在1 h内进行流式细胞仪检测,检测时激发波长E=488 nm,发射波长E_m=530 nm,FITC的绿色荧光FITC通道为FL1,PI红色荧光PI通道为FL2。

1.2.5 统计学方法

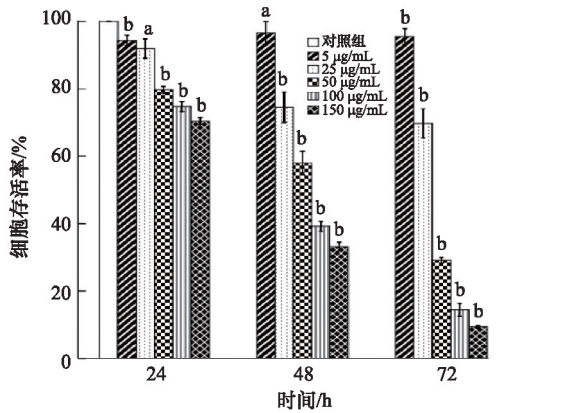
实验数据以平均值±s表示,以SPSS 17.0版专用统计分析软件对各组数据进行一般线性模型单变量方差分析,并进行回归分析计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

2 结果与分析

2.1 PB3A对结肠癌HCT-116细胞增殖的抑制作用

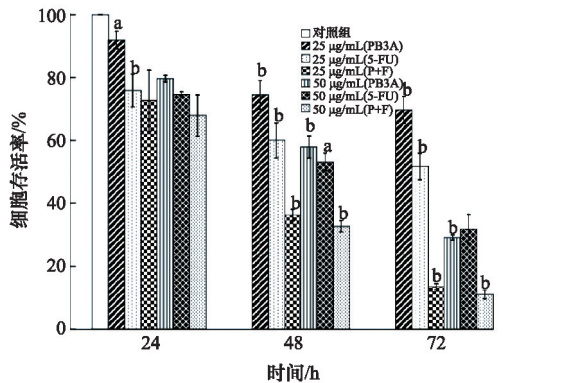
PB3A分别作用于结肠癌HCT-116细胞24、48和72 h后,其生长明显受到抑制(图1),随着PB3A浓度的增加和作用时间的延长,HCT-116细胞的增殖抑制率逐渐升高,抑制作用表现剂量依赖性和时间依赖性。PB3A作用结肠癌HCT-116细胞24 h后的IC₅₀值较大,本实验计算24 h的IC₅₀无意义,48和72 h后的IC₅₀分别为70.04和37.29 μg/mL,

PB3A、5-FU 和这两种药物联合组(图2)比较,PB3A 和5-FU 联合组的抑制作用均大于单药组,并在大部分比较组中有显著性或极显著性差异,表明PB3A 和5-FU 之间对结肠癌细胞存在一定的协同抑制效应。



^a $P < 0.05$ vs 对照组或相邻的前一组, ^b $P < 0.01$ vs 对照组或相邻的前一组, 实验重复3次

图1 不同浓度PB3A对HCT-116细胞增殖的抑制作用
Fig. 1 Effect of PB3A on the growth of colon cancer cells *in vitro*



^a $P < 0.05$ vs 对照组或相邻的前一组, ^b $P < 0.01$ vs 对照组或相邻的前一组, 实验重复3次

图2 不同浓度PB3A和5-FU对HCT-116细胞增殖的协同抑制作用
Fig. 2 Synergistic inhibition effects of the PB3A co-treated with 5-FU on the HCT-116 cell proliferation

2.2 PB3A对结肠癌HCT-116细胞作用的形态学变化

不同浓度的PB3A作用HCT-116细胞24 h后,在倒置显微镜下均可见悬浮细胞增多,细胞质混浊,细胞胞体缩小、变圆、皱缩,核固缩碎裂,细胞折光性减弱,细胞内出现颗粒物质,培养液中有较多的细胞碎片。随着药物浓度的增加细胞发生的凋亡和坏死现象越明显,呈剂量依赖性。结果提示,PB3A对HCT-116细胞的生长具有明显的增殖抑制作用(图3)。

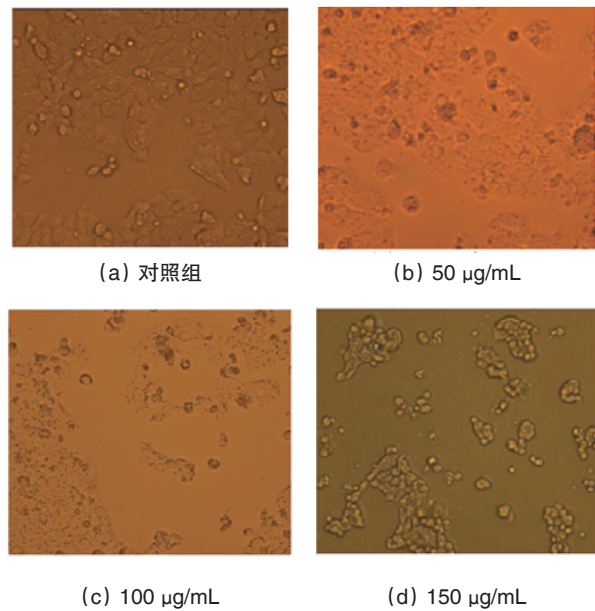


图3 不同浓度PB3A作用24 h后HCT-116细胞形态学变化(200×)

Fig. 3 Morphological changes of HCT-116 cells after the treatment with different concentrations of the PB3A for 24 h (200×)

2.3 PB3A和5-FU对HCT-116细胞凋亡的影响

对照组HCT-116细胞自然发生的早期凋亡和晚期凋亡率分别为(8.95±0.64)%和(2.85±0.92)%,实验组50 µg/mL的PB3A作用24 h后发生的早期凋亡和晚期凋亡率分别为(14.65±0.35)%和(8.45±2.75)%,100 µg/mL的PB3A作用24h后发生的早期、晚期凋亡率分别为(50.25±1.48)%和(37.50±1.70)%,阳性对照组50 µg/mL的5-FU作用24 h后发生的早期凋亡和晚期凋亡率分别为(24.15±0.07)%和(7.35±3.04)%,早期凋亡率均显著高于对照组($P < 0.01$)。随着PB3A剂量的增加,凋亡率逐渐增加(图4、图5)。

3 讨论

大肠癌(结肠癌和直肠癌统称为大肠癌)是严重威胁人民生命健康的消化道恶性肿瘤,目前其发病呈上升趋势^[1]。大肠癌的发病机制较复杂,为多因素、多基因参与多阶段的过程,现有研究主要针对癌基因的激活和抑癌基因的失活、DNA修饰功能缺失和机体免疫功能降低等机制进行阐述大肠癌整个生物学演变过程。大肠癌的发生是由正常黏膜上皮形成早期腺瘤、中期腺瘤和晚期腺瘤,然后转变为浸润性癌,再发生转移的循序渐进的过程,在多阶段的发展过程中涉及到许多癌基因,抑癌基因和信号通路的改变^[2]。积极探索更为有效、安全的治疗方法具有重要的临床意义。

本研究分别将不同浓度的PB3A和5-FU单独和联合给药结肠癌HCT-116细胞24、48和72 h,发现PB3A能明显抑制细胞增生,其抑制作用与5-FU进行比较,差异不大,表现

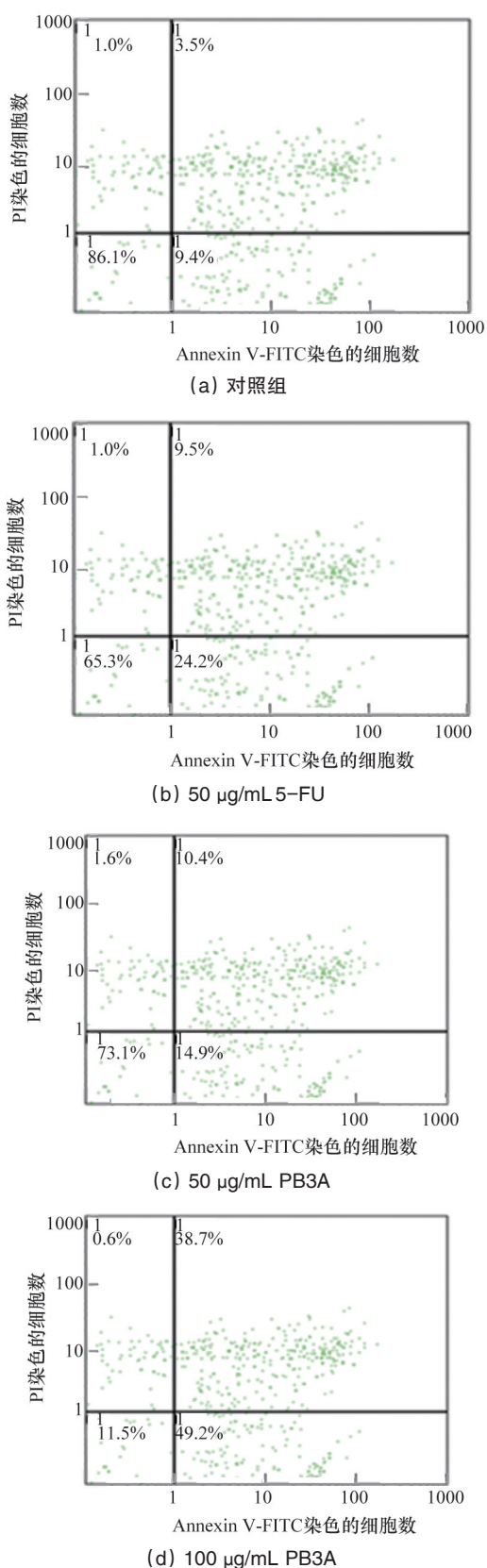
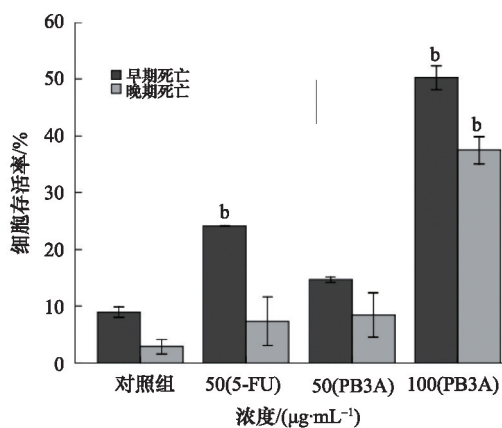


图4 PB3A和5-FU对HCT-116细胞作用24 h的Annexin V-FITC和PI双染FCM检测

Fig. 4 Annexin V-FITC and PI double-staining FCM of HCT-116 cells following 24 h incubation with PB3A and 5-FU



^b $P < 0.01$ vs 对照组, 实验重复2次

图5 PB3A和5-FU对HCT-116细胞凋亡的影响
Fig. 5 Effect of PB3A and 5-FU on HCT-116 cell apoptosis rates

为剂量依赖性和时间依赖性。不同浓度的PB3A、5-FU单药干预和这两种药物联合干预比较,PB3A和5-FU联合干预的抑制作用均大于单药干预的抑制作用,并在大部分比较组之内存在显著性和极显著性差异,表明PB3A和5-FU在抑制肿瘤细胞增殖方面表现一定的协同效应。有研究报道,抗肿瘤药物对肿瘤细胞的作用使肿瘤细胞产生获得性药物耐药性,这就是肿瘤化疗失败的原因之一^[24]。找出新的抗肿瘤药物,并把它和传统的化疗药物联用是比较有效的方法。本研究结果显示,在临床上应用PB3A可能增强化疗药物5-FU对大肠癌的治疗效果。

从形态学观察不同浓度的PB3A作用HCT116细胞24 h后细胞形态的变化,发现细胞出现核固缩、核碎裂、产生凋亡小体等典型的凋亡形态学特征,随着PB3A浓度的增加,这种形态学特征表现为更明显。

本研究应用Annexin V-FITC/PI双染色法检测PB3A对HCT116细胞凋亡的影响,该方法是目前检测凋亡的最敏感的方法之一,能检测出早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞,并能区分出坏死细胞。结果显示,PB3A作用HCT116细胞24 h后,细胞凋亡率明显升高,呈剂量依赖性特点。与同样浓度5-FU给药组进行比较,PB3A的诱导凋亡率高,有极显著性差异。根据现有的研究结果认为,PB3A在体外对肿瘤具有较强的诱导凋亡作用,对结肠癌的抑制作用可能与诱导细胞凋亡有关,但诱导细胞凋亡的分子机制尚不清楚,需要进一步深入研究。

4 结论

蜂胶黄酮PB3A对大肠癌细胞HCT-116具有明显的增殖抑制和诱导细胞凋亡作用。PB3A和化疗药物5-FU在抑制大肠癌细胞增殖方面表现了一定的协同效应,在临床上

PB3A 和 5-FU 联合应用很可能增强化疗药物 5-FU 对大肠癌的治疗效果。

参考文献 (References)

- [1] Awale S, Shrestha S P, Tezuka Y, et al. Neoflavonoids and related constituents from Nepalese propolis and their nitric oxide production inhibitory activity[J]. *Journal of Natural Products*, 2005, 68: 858-864.
- [2] Ramanauskienė K, Inkenienė A M, Savickas A, et al. Analysis of the antimicrobial activity of propolis and lysozyme in semisolid emulsion system[J]. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 2009, 66:681-688.
- [3] 王玉芬. 蜂胶的研究进展[J]. *河北医药*, 2002, 24(3): 227-228.
Wang Yufen. *Research Progress in Propolis*[J]. *Hebei Medical Journal*, 2002, 24(3): 227-228.
- [4] Fischer G, Cleff M B, Dummer L A, et al. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2007, 116(1-2): 79-84.
- [5] Bankova V. Recent trends and important developments in propolis research[J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2005, 2(1): 29-32.
- [6] Inokuchi Y, Shimazawa M, Nakajima Y, et al. Brazilian green propolis protects against retinal damage *in vitro* and *in vivo*[J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2006, 3(1): 71-77.
- [7] Onlen Y, Tamer C, Oksuz H, et al. Comparative trial of different anti-bacterial combinations with propolis and ciprofloxacin on *Pseudomonas keratitis* in rabbits[J]. *Microbiological Research*, 2007, 162(1): 62-68.
- [8] Chen J, Long Y, Han M, et al. Water-soluble derivative of propolis mitigates scopolamine-induced learning and memory impairment in mice[J]. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2008, 90(3): 441-446.
- [9] 玄红专, 胡福良, 顾美儿. 蜂胶中咖啡酸苯乙酯的研究进展[J]. *食物研究与开发* 2006, 27(5): 14-15.
Xuan Hongzhan, Hu Fuliang, Gu Meier. *Advance in the research of caffeic acid phenethyl ester in propolis*[J]. *Food Research and Development*, 2006, 27(5): 14-15.
- [10] Chen Y J, Shiao M S, Hsu M L, et al. Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(11): 5615-5619.
- [11] Wang D, Xiang D B, He Y J, et al. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells *in vitro* [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2005, 11(26): 4008-4012.
- [12] Watabe M, Hishikawa K, Takayanagi A, et al. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NFκB and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(7): 6017-6026.
- [13] Hung M W, Shiao M S, Tsai L C, et al. Apoptotic effect of caffeic acid phenethyl ester and its ester and amide analogues in human cervical cancer ME180 cells[J]. *Anticancer research*, 2003, 23(6C): 4773-4780.
- [14] Awale S, Li F, Onozuka H, et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 16(1): 181-189.
- [15] Seda V H, Sorkun K, Gurhan S, et al. Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines[J]. *Acta Histochemica*, 2010, 112(6): 546-556.
- [16] Valente M J, Baltazar A F, Henrique R, et al. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth *in vitro*[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49(1): 86-92.
- [17] 阿布力克木·吾甫尔, 依米提·热合曼, 吐尔逊娜依·阿布都热依木, 等. 新疆蜂胶挥发油对结直肠癌 HCT-116 细胞增生、周期及凋亡的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(14): 1469-1475.
Upur Ablikim, Rahman Yimit, Abdureyim Tursunay, et al. Effects of essential oils extracted from Xinjiang propolis on cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis in human colorectal cancer cell line HCT-116[J]. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*, 2011, 19(14): 1469-1475.
- [18] Tiakavkina N A, Rulenko I A, Kolesnik I U A. Natural flavonoids as dietary antioxidants and biologically active additives[J]. *Veprosy Pitania*, 1996(2): 3338.
- [19] Fang J M, Su W C, Cheng Y S. Flavonoids and stilbenes from armand pine[J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(5): 1395-1397.
- [20] Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins[J]. *Food Chemistry*, 2004, 84(3): 329-339.
- [21] Rapta P, Misik V, Stasko A, et al. Redox intermediates of flavonoids and caffeic acid esters from propolis: An EPR spectrometry and cyclic voltammetry study[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 1995, 18(5): 901-908.
- [22] Valencia D, Alday E, Robles-Zepeda R, et al. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis[J]. *Food Chemistry*, 2012, 131(2): 645-651.
- [23] 戴益琛, 宋于刚, 谢军培. 采用基因芯片技术筛选黑斑息肉综合征相关基因[J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16(19): 2191-2194.
Dai Yishen, Song Yugang, Xie Junpei, et al. Screening and annotation of genes associated with Peutz-Jeghers syndrome using gene chip technique[J]. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*, 2008, 16(19): 2191-2194.
- [24] Guo X, Xu B, Pandey S, et al. Disulfiram/copper complex inhibiting NFκB activity and potentiating cytotoxic effect of gemcitabine on colon and breast cancer cell lines[J]. *Cancer Letters*, 2010, 290(1): 104-113.

(责任编辑 吴晓丽)

《科技导报》征集“封面文章”

为快速反映中国最新科技研究成果,《科技导报》拟利用刊物最显著位置——封面将最新科研成果第一时间予以突出报道。来稿要求:研究成果具创新性或新颖性;反映该领域中国乃至世界前沿研究水平;可以图片形式予以反映,图片美观、清晰、分辨率超过 300dpi;文章篇幅不限,要说明研究的背景、方法、取得的结果,以及结论。在线投稿:www.kjdb.org。