

甜菜红苷对人结肠癌HT29细胞凋亡的影响

王晓宇*,王家琪(辽宁医学院附属第一医院肿瘤科,辽宁锦州 121000)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)16-2226-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.16.21

摘要 目的:研究甜菜红苷对人结肠癌HT29细胞凋亡的影响。方法:体外传代培养HT29细胞。以不同质量浓度[0(空白对照)、0.5、1、1.5、2、3 mg/ml]的甜菜红苷培养细胞24 h,以1.5 mg/ml甜菜红苷培养细胞不同时间[0(空白对照)、1、3、6、12、24 h]后,采用MTT法测定细胞活力并计算抑制率;以0(空白对照)、1、1.5、2 mg/ml甜菜红苷培养细胞24 h后,采用流式细胞仪测定细胞凋亡率,测定含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(Caspase-3)、Caspase-9的活性,采用实时荧光聚合酶链反应(RT-PCR)与Western blot法测定Bcl-2、Bax mRNA与蛋白的表达。结果:与空白对照比较,0.5、1、1.5、2、3 mg/ml甜菜红苷培养细胞24 h后,1.5 mg/ml甜菜红苷培养细胞1、3、6、12、24 h后,细胞抑制率升高($P<0.01$)。与空白对照比较,1、1.5、2 mg/ml甜菜红苷培养细胞24 h后,细胞凋亡率升高,Caspase-3、Caspase-9活性增强,Bcl-2 mRNA与蛋白表达减弱、Bax mRNA与蛋白表达增强($P<0.01$)。结论:甜菜红苷可诱导HT29细胞凋亡,其机制可能与上调Caspase-3、Caspase-9活性和Bax mRNA与蛋白表达,下调Bcl-2 mRNA与蛋白表达有关。

关键词 甜菜红苷;含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶;凋亡;人结肠HT29细胞

Effects of Betanin on Apoptosis in Human Colon Cancer HT29 Cells

WANG Xiao-yu, WANG Jia-qi (Dept. of Oncology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Liaoning Jinzhou 121000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of betanin on apoptosis in human colon cancer HT29 cells. METHODS: HT29 cells were subcultured *in vitro*. MTT assay was adopted to determine cell viability after the cells were cultured in the betanin solutions at different mass concentrations [0 mg/ml (blank control), 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 1.5 mg/ml, 2 mg/ml and 3 mg/ml] for 24 h and in 1.5 mg/ml betanin solution for different periods of time [0 h (blank control), 1 h, 3 h, 6 h, 12 h and 24 h], and the inhibition rates were calculated. After the cells were cultured in 0 mg/ml (blank control), 1 mg/ml, 1.5 mg/ml and 2 mg/ml betanin solutions for 24 h, the flow cytometry was applied to determine the apoptosis rate and the activities of cysteinyl aspartate specific proteinase (Caspase)-3 and Caspase-9; and real-time quantitative fluorescent polymerase chain reaction (RT-PCR) technology and Western blot technology were used to determine the expression of Bcl-2 and Bax mRNA and protein. RESULTS: Compared with blank control, the inhibition rates of the cells were increased after being cultured in 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 1.5 mg/ml, 2 mg/ml and 3 mg/ml betanin solutions for 24 h, the inhibition rates of the cells were increased after being cultured in 1.5 mg/ml betanin solution for 1 h, 3 h, 6 h, 12 h and 24 h ($P<0.01$). Compared with blank control, the apoptosis rates of the cells were increased after being cultured in 1 mg/ml, 1.5 mg/ml and 2 mg/ml for 24 h; the activities of Caspase-3 and Caspase-9 were increased; the expression of Bcl-2 mRNA and protein were decreased and the expression of Bax mRNA and protein was increased ($P<0.01$). CONCLUSIONS: Betanin can induce the apoptosis of HT29 cells by a mechanism that may be related to the increase in the activities of Caspase-3 and Caspase-9 and the expression of Bax mRNA and protein as well as the decrease in the expression of Bcl-2 mRNA and protein.

KEYWORDS Betanin; Cysteinyl aspartate specific proteinase; Apoptosis; Human colon cancer HT29 cells

一直以来,结肠癌居于各种恶性肿瘤发病率的第2位和病死率的第4位^[1]。目前,以氟尿嘧啶为基础的治疗方案仍是结肠癌的国际标准化疗方案,但由于化疗药物的耐药性和药物毒性,该类治疗方案的总体有效率仍不足40%^[2],因此需要开发新药物来提高治疗有效率,同时降低不良反应。

中药半枝莲又名太阳花,是马齿苋科马齿苋属一年生肉质草本植物,在我国各地广泛栽培,是典型的合成甜菜素类植物^[3]。半枝莲在传统医学中长期被用于治疗结、直肠癌,但其抗癌主要成分及机制至今仍不明确。有报道,半枝莲通过正交设计法优化提取物制备出的红色素,经溶解性观察、薄层色谱法和紫外可见光谱扫描分析证实,该红色素即为甜菜红

素。而甜菜红素主要以甜菜红苷形式存在,提取率为7.44%^[4]。甜菜红苷作为半枝莲的主要提取物,具有较强的清除氧自由基、羟自由基、二苯代苦味酰基自由基的能力,具有较强的抗氧化、抗肿瘤功效^[5]。笔者拟探讨甜菜红苷的抗癌作用及机制,以期为后续研究提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

PX-150B型生化培养箱(美国BD公司);RZ-9802型酶标仪(天津瑞泽分析仪器有限公司);CR21型高速冷冻离心机(日本Hitachi公司);MCO-175型细胞培养箱(日本Sanyo公司);6HT2L型流式细胞仪(美国Guava Easy Cyte公司);RE-2000型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);DLSB-5/20型低温冷却循环泵(郑州长城科工贸有限公司);B-290型实验室

* 医师,助教。研究方向:消化道肿瘤综合治疗。E-mail: wxy198709@163.com

小型喷雾干燥机(瑞士Buchi公司); GST-1型聚合酶链反应(PCR)仪(英国Gstorm公司); Gel DOC 2000型凝胶成像分析系统、APC 300型电泳仪(美国Bio-Rad公司); DU-650型蛋白核酸分析仪(美国Beckman公司)。

1.2 药品与试剂

甜菜红苷(郑州郑亚化工产品有限公司,批号:TC326540,纯度:99%);青霉素-链霉素溶液(批号:TBB002)、胎牛血清均购自上海尚善生物科技有限公司; Bcl-2和Bax抗体(美国CST公司); RPMI 1640培养液、0.5%二甲基亚砷(DMSO,德国WAK公司); MTT(美国Sigma公司); E-ELN-M0044酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司); Annexin V凋亡试剂盒(武汉艾美捷科技有限公司); 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(Caspase-3)、Caspase-9试剂盒(美国Invitrogen公司); 实时荧光(RT)试剂盒、Trizol洗细胞溶液、PCR试剂盒(北京Promega公司); Taq聚合酶、RNase抑制剂(大连宝生物工程有限公司)。

1.3 细胞

人结肠癌HT29细胞(广州行知生物科技有限公司,批号:AA-CELL-103)。

2 方法

2.1 细胞培养

HT29细胞置于含10%胎牛血清、100 u/ml青霉素、100 μg/ml链霉素的培养液中,在37℃、5%CO₂条件下常规培养。

2.2 细胞抑制率的测定

取对数生长期的HT29细胞,用RPMI 1640培养液调整细胞密度至 $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$,接种于96孔培养板中,每孔0.1 ml,移入培养箱中培养24 h使细胞贴壁。以0(空白对照)、0.5、1、1.5、2、3 mg/ml甜菜红苷培养细胞24 h;以1.5 mg/ml甜菜红苷分别培养细胞0(空白对照)、1、3、6、12、24 h。药物培养结束后吸弃各孔中培养液,每孔加入0.1 ml MTT[含5%磷酸盐缓冲液(PBS)],在37℃下继续培养4 h。再吸弃各孔中培养液,加入0.5% DMSO 0.1 ml,振荡摇匀,室温放置10 min。以上试验每个质量浓度均设12个复孔。在0.1 ml DMSO中发现蓝紫色的MTT甲臞沉淀物,使用ELISA法以酶标仪于570 nm波长处测定光密度(OD),计算细胞抑制率(%)=(空白对照OD-试验OD)/空白对照OD $\times 100\%$ 。

2.3 细胞凋亡率的测定^[6]

取对数生长期的HT29细胞,用RPMI 1640培养液调整细胞密度至 $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$,接种于96孔培养板中,每孔0.1 ml,移入培养箱中培养24 h使细胞贴壁。以0(空白对照)、1、1.5、2 mg/ml甜菜红苷培养细胞24 h后,每孔悬浮细胞(贴壁细胞先用0.25%胰酶消化)用PBS洗2次,加入100 μl Binding Buffer和FITC标记的Annexin V(20 μg/ml)10 μl,室温避光30 min,再加入碘化丙啶(PI, 50 μg/ml)5 μl,避光反应5 min后,加入400 μl Binding Buffer,采用流式细胞仪定量检测,计算凋亡率。

2.4 Caspase活性的测定

细胞培养与给药同“2.3”项下方法。用裂解液在冰上放置30 min,裂解细胞,以离心半径14 cm、16 000 r/min离心10 min。取上清液进行蛋白浓缩测定,然后取100 μg蛋白置于50 μl溶液[含比色四肽, Asp-Glu-Val-Asp(DEV D)-pNA(Caspase-3特异底物)或Leu-Glu-His-Asp(LEHD)-pNA(Caspase-9特异底物)]中,于37℃、避光培养2 h,以酶标仪于535 nm波长

处测定OD。以药物OD与空白对照OD之比代表Caspase活性水平。

2.5 Bcl-2、Bax mRNA表达的测定

取对数生长期的HT29细胞,用RPMI 1640培养液调整细胞密度至 $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$,接种于6孔培养板中,每孔2 ml,移入培养箱中培养24 h使细胞贴壁。以0(空白对照)、1、1.5、2 mg/ml甜菜红苷培养细胞24 h后,常规分离出细胞RNA。用Super-Script II转录酶对活化的重复寡核苷酸RNA(1 μg)进行逆转录。PCR反应体系(20 μl): cDNA 1 μl, $10 \times \text{Taq Buffer}$ 2 μl, 25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μl, 10 mmol/L dNTP 0.4 μl, 1 U/μl Taq酶 0.8 μl,上下游引物各1 μl,加DEPC水至20 μl,震荡混匀,高速离心10 s后,置PCR仪扩增。扩增条件:95℃预变性4 min;94℃变性30 s,55/58℃(Bcl-2/Bax)退火40 s,72℃延伸40 s,持续35个循环;72℃延伸10 min。PCR产物经在1.5%琼脂糖凝胶上电泳后进行光密度扫描,以GAPDH基因为内参,各基因的扩增条带的OD值与各自内参的OD值之比作为衡量参数,以Quantity one软件进行分析。Bcl-2上游引物:5'-CAGCTGCACCTGACGCCCTT-3',下游引物:5'-GCCTCCGTTATCCTGGATCC-3',引物长度:362 bp(55℃);Bax上游引物:5'-TGCTTCAGGGTTTCATCCAGG-3',下游引物:5'-TGGCAAAGTAGAAAAGGGCGA-3',引物长度:253 bp(55℃);GAPDH上游引物:5'-GTCATCCATGACAACCTTGG-3',下游引物:5'-GAGCTTGACAAAGTGGTCGT-3',引物长度:450 bp(55℃)。

2.6 Bcl-2、Bax蛋白表达的测定

细胞处理与给药同“2.5”项下方法。含有等量蛋白的细胞裂解液用样品缓冲液溶解后,将细胞的蛋白样品定量,变性;进行聚丙烯酰胺凝胶电泳;转膜;脱脂牛奶封闭2 h;洗膜,加入Bcl-2和Bax(稀释倍数1:1 000)的一抗以及β-actin(稀释倍数1:1 000)作为阳性对照,在4℃震荡过夜;加入辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释倍数1:25 000)后,室温孵育1 h,然后用含0.25%聚山梨酯20的TBS洗膜;加入1:1的增强化学发光法(ECL)溶液,在25℃温育5 min,立即曝光,等条带清晰后将胶片取出,用凝胶成像系统扫描并进行数据分析。

2.7 统计学方法

采用SPSS 19.0软件处理试验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同质量浓度与作用时间下细胞抑制率的测定结果

与空白对照比较,0.5、1、1.5、2、3 mg/ml甜菜红苷培养细胞24 h与1.5 mg/ml甜菜红苷培养细胞1、3、6、12、24 h后对细胞生长具有明显的抑制作用($P < 0.01$),且呈明显的剂量、时间依赖关系。不同质量浓度与作用时间下细胞抑制率的测定结果见表1、表2。

3.2 细胞凋亡率的测定结果

1、1.5、2 mg/ml甜菜红苷培养细胞24 h后,细胞出现明显凋亡,凋亡率分别为(9.42 ± 0.50)%、(13.59 ± 0.96)%、(26.63 ± 1.49)% ,与空白对照[(0.72 ± 0.07)%]比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。细胞凋亡率的测定结果见图1[Annexin V-/PI-(左下)为存活细胞;Annexin V+/PI-(右下)和Annexin V+/PI+(右上)分别代表早期凋亡和晚期凋亡细胞;Annexin

V-/PI+(左上)表示死亡细胞。

表1 不同质量浓度下细胞抑制率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab 1 Determination results of apoptosis rates under different concentration($\bar{x} \pm s, n=12$)

质量浓度,mg/ml	抑制率,%
0(空白对照)	0
0.5	14.77 ± 1.90*
1	39.08 ± 2.93*
1.5	49.17 ± 1.48*
2	76.17 ± 2.45*
3	81.53 ± 1.73*

注:与空白对照比较,* $P<0.01$

Note:vs.blank control,* $P<0.01$

表2 不同作用时间下细胞抑制率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab 2 Determination results of apoptosis rates under different acting time($\bar{x} \pm s, n=12$)

不同时间,h	抑制率,%
0(空白对照)	0
1	8.43 ± 0.43*
3	18.80 ± 1.29*
6	28.57 ± 2.16*
12	43.53 ± 2.50*
24	51.44 ± 1.74*

注:与空白对照比较,* $P<0.01$

Note:vs.blank control,* $P<0.01$

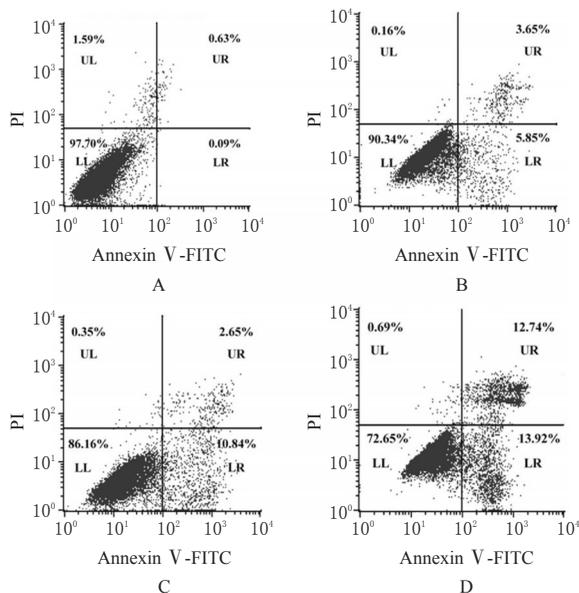


图1 细胞凋亡率的测定结果

A. 0 mg/ml; B. 1 mg/ml; C. 1.5 mg/ml; D. 2 mg/ml

Fig 1 Determination results of apoptosis rate

A. 0 mg/ml; B. 1 mg/ml; C. 1.5 mg/ml; D. 2 mg/ml

3.3 Caspase 活性的测定结果

与空白对照比较,1、1.5、2 mg/ml 甜菜红苜培养细胞 24 h 后 Caspase-3、Caspase-9 活性增强,差异有统计学意义($P<0.01$)。Caspase 活性的测定结果见表 3。

3.4 Bcl-2、Bax mRNA、蛋白表达的测定结果

与空白对照比较,1、1.5、2 mg/ml 甜菜红苜培养细胞 24 h 后 Bcl-2 mRNA、蛋白表达减弱,Bax mRNA、蛋白表达增强,差

异有统计学意义($P<0.01$)。这提示甜菜红苜是通过调节 Bcl-2 家族蛋白的表达来引起线粒体介导凋亡。Bcl-2、Bax mRNA 和蛋白表达的测定结果见图 2。

表3 Caspase 活性的测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Determination results of the activities of Caspase ($\bar{x} \pm s, n=10$)

质量浓度,mg/ml	Caspase-3 活性	Caspase-9 活性
0(空白对照)	1	1
1	2.47 ± 0.21*	1.57 ± 0.26*
1.5	3.64 ± 0.19*	2.54 ± 0.20*
2	4.55 ± 0.28*	3.13 ± 0.33*

注:与空白对照比较,* $P<0.01$

Note:vs.blank control,* $P<0.01$

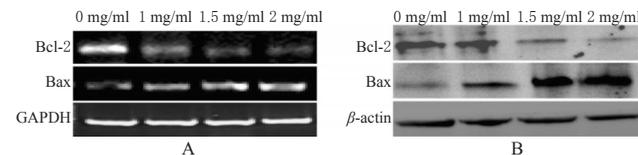


图2 Bcl-2、Bax mRNA 和蛋白表达的测定结果

A.mRNA;B.蛋白

Fig 2 Determination results of expression of Bcl-2 and Bax mRNA and protein

A. mRNA;B.protein

4 讨论

笔者采用 MTT 法证明甜菜红苜能抑制 HT29 细胞的生长,且抑制作用随时间与剂量的增加而增强。在培养过程中出现大量细胞凋亡,而在凋亡的细胞中,膜磷脂酰丝氨酸(PS)从膜内转移到膜外^[7],从而使其暴露在细胞外环境中。膜联蛋白 V 是一种磷脂结合蛋白,和 PS 有着密切的关系,可将细胞与暴露的 PS 结合在一起^[6,8]。因此,决定甜菜红苜的细胞生长抑制作用的是凋亡。通过流式细胞仪检测 Annexin V-PI 染色的 HT29 细胞凋亡情况,结果表明,甜菜红苜促细胞凋亡具有剂量依赖性。

Caspase 作为半胱氨酸激酶家族的代表,是调节凋亡的关键蛋白。Caspase-3 是凋亡执行者^[9],在线粒体介导凋亡反应中可以被 Caspase-9 等上游 Caspase 激活^[10]。通过特异性的发色团对 Caspase-3 和 Caspase-9 的激活进行比色检验,结果证实了甜菜红苜是通过线粒体相关通路来促进 HT29 细胞发生凋亡。

线粒体介导的凋亡主要是由 Bcl-2 家族蛋白调节的。主要外膜蛋白被认为是发生在线粒体孔结构上,是有促凋亡 Bax 类似蛋白组成的,并且可以被 Bcl-2 类似蛋白所抑制^[11]。因此,Bax 与 Bcl-2 的比例是决定细胞存活的关键。Bcl-2 过度表达或 Bax 的低表达导致 Bcl/Bax 高比值,常见于各种癌症,这可能对放疗产生抵抗^[12]。笔者通过 RT-PCR 和 Western-blot 检测 Bcl-2 和 Bax 在 HT29 细胞中 mRNA 和蛋白的表达,结果表明,甜菜红苜是通过调节 Bcl-2 家族蛋白的表达来引起线粒体介导的凋亡。

研究结果表明,甜菜红苜可以引起 HT29 结肠癌细胞的凋亡,伴随着 Caspase-9 与 Caspase-3 的激活以及 Bax/Bcl 比值的升高,证明了甜菜红苜能通过 Caspase-9 与 Caspase-3 的激活引起细胞凋亡,这很可能是甜菜红苜及半枝莲的抗癌机制。这些结果证实,甜菜红苜可能对结肠癌和其他恶性肿瘤有一定的治疗作用。

参考文献

JCI标准下PIVAS的质量管理实践

李广辉*, 李晓华, 赖耀文, 杨亚鹏, 彭昊帅, 刘长缨[#](郑州人民医院药学部, 郑州 450003)

中图分类号 R95 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)16-2229-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.16.22

摘要 目的:加强静脉用药配置中心(PIVAS)的管理,提升其服务水平,确保成品输液质量。方法:基于国际医院联合委员会认证标准(JCI标准),从规范药品管理、差错管理以及手卫生3个方面探索PIVAS管理新方法。结果:我院PIVAS在JCI标准指导下通过运用目视管理、编码定位管理、溯源管理等方法,有效提升了PIVAS的质量管理水平,提高了医疗服务质量,2014年差错发生率由1月份的0.068%下降到了12月份的0.029%。结论:JCI标准指导下的质量管理可有效促进患者静脉用药安全。

关键词 静脉用药配置中心;JCI标准;质量管理;差错

Quality Management Practice of PIVAS under JCI Standards

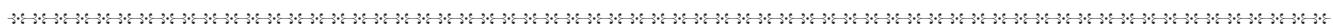
LI Guang-hui, LI Xiao-hua, LAI Yao-wen, YANG Ya-peng, PENG Hao-shuai, LIU Chang-ying (Dept. of Pharmacy, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450003, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To strengthen the management of the Pharmacy intravenous admixture service (PIVAS), improve the service levels and ensure the quality of finished product infusion. **METHODS:** Based on the Joint Commission International (JCI) standards, new management methods for PIVAS were explored from such three aspects as standardized drug management, error management and hand hygiene. **RESULTS:** By performing visual management, coding location management, traceability management, etc. under the JCI standards, the PIVAS in our hospital had effectively improved the qualities of management and medical services. The error rate was decreased from 0.068% in Jan. to 0.029% in Dec. of 2014. **CONCLUSIONS:** The quality management under the JCI standards can effectively promote the safety of intravenous drug use.

KEYWORDS Pharmacy intravenous admixture service; JCI standards; Quality management; Error

国际医疗卫生机构认证联合委员会(Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations, JCAHO)的附属机

构,即国际医院认证联合委员会(Joint Commission International, JCI)是专门对美国以外的国际医疗机构进行认证的一个机



[1] Nüsgen N, Goering W, Dauksa A, et al. Inter-locus as well as intra-locus heterogeneity in LINE-1 promoter methylation in common human cancers suggests selective demethylation pressure at specific CpGs[J]. *Clin Epigenetics*, 2015, 7(1):17.

[2] 赵建国, 王建芳, 吴东平, 等. 改良FOLFOX方案一线治疗老年晚期胃癌的临床研究[J]. *中国药房*, 2015, 26(2):245.

[3] 刘磊磊, 陈娟, 师彦平. 清热解毒中药抗肿瘤作用研究进展[J]. *中草药*, 2012, 43(6):1203.

[4] 毕见州. 半枝莲甜菜红素提取物抗氧化及调血脂作用的研究[D]. 济南: 山东大学, 2009.

[5] Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(3):485.

[6] 姚金成, 刘颖, 胡领, 等. 雷公藤甲素对Caspase诱导人肝细胞L-02凋亡机制的研究[J]. *中国药房*, 2012, 23(43):4036.

[7] 李卫华, 杨佳欣. 硬脂酰辅酶A去饱和酶1与恶性肿瘤的

研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2014, 41(17):1131.

[8] 蔡炯, 李方, 牛娜, 等. 钙滴定法测定99mTc定点标记膜联蛋白V的亲和力[J]. *基础医学与临床*, 2010, 30(5):534.

[9] Ho YT, Lu CC, Yang JS, et al. Berberine induced apoptosis via promoting the expression of caspase-8, -9 and -3, apoptosis-inducing factor and endonuclease G in SCC-4 human tongue squamous carcinoma cancer cells[J]. *Anti-cancer Res*, 2009, 29(10):4063.

[10] Scatena R. Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 942(2):287.

[11] Youle RJ, Strasser A. The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death[J]. *Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(5):47.

[12] Du HD, Fu Q, Wang QW, et al. Traditional chinese medicine *prunella vulgaris* can accelerate the apoptosis of human thyroid cancer cell line SW579 in vitro[J]. *J Modern Oncol*, 2009, 17(7):212.

*主管药师。研究方向:临床药学。电话:0371-67077751

[#]通信作者:副主任药师。研究方向:医院药学。电话:0371-67077751

(收稿日期:2015-03-12 修回日期:2015-05-08)

(编辑:张静)