

紫甘蓝提取液对人乳腺癌细胞生长和迁移的抑制作用

徐颖倩 曾 雪 唐 倩

(重庆医药高等专科学校药学院,重庆,401331)

摘要 目的:探讨紫甘蓝提取液对乳腺癌细胞 MCF7 生长和迁移的抑制作用。方法:应用 MTT 法检测不同浓度紫甘蓝提取液对 MCF7 增殖的抑制作用,并用倒置相差显微镜观察细胞形态,Annexin V-FITC/PI 染色细胞后用流式细胞术检测不同浓度紫甘蓝提取液对 MCF7 凋亡的影响,采用 Transwell 法检测不同浓度紫甘蓝提取液对 MCF7 迁移的影响。采用 SPSS 16.0 软件对实验结果进行统计学处理。结果:紫甘蓝提取液可抑制 MCF7 的增殖,并呈浓度依赖性和时间依赖性($P < 0.05$),也使 MCF7 形态发生了异常变化,紫甘蓝提取液可诱导 MCF7 凋亡、抑制其迁移,且呈浓度-效应关系($P < 0.05$)。结论:紫甘蓝提取液可抑制乳腺癌细胞 MCF7 生长和迁移。

关键词 紫甘蓝;乳腺癌;细胞增殖;细胞凋亡;细胞迁移

Purple Cabbage Extract in Inhibition of Breast Cancer Cell Growth and Migration

Xu Yingqian, Zeng Xue, Tang Qian

(College of Pharmacy, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of purple cabbage extract (PCE) on breast cancer cell MCF7 growth and migration. **Methods:** The inhibition rate of MCF7 cells was assessed by MTT method, and the inverted phase contrast microscope was used to observe the cellular shape. Flow cytometry was utilized for measuring cell apoptosis after Annexin V-FITC/PI stained the cell. The transwell chamber was used to investigate cell migration. **Results:** PCE inhibited MCF7 cell proliferation in a concentration- and time-dependent manner ($P < 0.05$). After incubated with PCE, the cells became shrinkage and turned round, arranged loosely and adhered not favorable gradually. PCE induced MCF7 cell apoptosis and inhibited cell migration in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusion:** PCE inhibits breast cancer cell MCF7 growth and migration.

Key Words Purple cabbage; Breast cancer; Cell proliferation; Cell apoptosis; Cell migration

中图分类号: R151.1 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2017.11.054

紫甘蓝又称红甘蓝、赤甘蓝,俗称紫包菜,十字花科、芸苔属甘蓝种中的一个变种,是结球甘蓝中的一个类型,由于它的外叶和叶球都呈紫红色,故名^[1]。紫甘蓝营养丰富,含有丰富的维生素和胡萝卜素,无机盐含量也很高,是膳食纤维的良好来源,其抗氧化活性多酚类和黄酮类物质的含量也比其他蔬菜高^[2-3]。国内外大部分关于紫甘蓝的研究都关注于其抗氧化作用^[4-5],但是对紫甘蓝抗癌活性作用的相关研究鲜有报道。本研究旨在探讨紫甘蓝提取液对乳腺癌细胞生长和迁移的抑制作用,为人们在膳食方面预防癌症提供指导意见,对防癌保健食品的开发提供部分实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人乳腺癌细胞 MCF7 购于南京科佰生物科技有限公司。

1.1.2 药物 新鲜紫甘蓝购于重庆市重百超市建议鉴定基原,无机械损伤,无虫害,无腐烂。

1.1.3 试剂与仪器 细胞培养液 RPMI1640、胎牛血清、胰蛋白酶 (Hyclone 公司);青霉素、链霉素 (Gibco 公司);MTT (Sigma 公司);Staurosporine (MCE 公司);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒 (上海贝博生物有限公司);Transwell 小室 (Millipore 公司);6、24、96 孔板 (ThermoFisher 公司);酶联免疫检测仪 (Bio-Rad 公司);倒置显微镜 IX71 (Olympus 公司);流式细胞仪 (碧迪医疗器械有限公司);离心机 (长沙湘仪离心仪器有限公司);冷冻干燥机 (Thermo 公司);其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 称取 500 g 新鲜紫甘蓝,洗净,晾干,用榨汁机榨取,收集汁液,将该汁液以 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,25 ℃ 恒温箱内

基金项目:重庆医药高等专科学校科研计划项目(ygz2015107)

作者简介:徐颖倩(1989.04—),女,硕士,讲师,研究方向:药物化学,E-mail:alicexu0410@126.com

通信作者:唐倩(1979.02—),女,硕士,副教授,副院长,研究方向:药物分析,E-mail:15981934@qq.com

静置过夜后,将该上清液经滤纸反复过滤,再用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,所滤过的澄清液体即为紫甘蓝原液。将紫甘蓝原液冷冻干燥 24 h,冻干粉末溶解于蒸馏水中,制备成紫甘蓝提取液(Purple Cabbage Extract, PCE)。实验分组:空白对照组(MTT 试验)、正常对照组、阳性药物 Staurosporine (STS) (浓度 250 nmol/L) 对照组(MTT 试验、细胞凋亡试验)、PCE 处理组(PCE 终浓度分别为 50、100、150、200、250、300 $\mu\text{g/L}$)。

1.2.2 干预方法 PCE 和阳性药物 STS 直接干预 MCF7 细胞。

1.2.3 检测指标与方法 采用形态学观察法和 MTT 法检测 PCE 对 MCF7 的抑制作用,应用流式细胞术检测 PCE 对 MCF7 凋亡的影响,Transwell 法检测 PCE 对 MCF7 迁移的影响。

用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 细胞培养液常规培养 MCF7 细胞,当细胞生长至 80%~90% 致密单层时,消化细胞并制备细胞悬液,将 1×10^5 个/mL 浓度的细胞悬液接种于 96 孔培养板中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中预培养 24 h 后,分别加入不同浓度的 PCE,使最终每组含 PCE 浓度分别为 50、100、150、200、250、300 $\mu\text{g/L}$,并设空白对照组、正常对照组和 STS (浓度 250 nmol/L) 对照组,继续培养 24 h,于倒置相差显微镜下观察细胞形态。分别于 12、24、36 h 3 个时相进行 MTT 比色:弃旧培养液,洗涤细胞后,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL ,继续培养 4 h,弃上清液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO),振荡 10 min 使蓝紫色的结晶物充分溶解,在酶联免疫检测仪上选择 490 nm 波长,以空白对照孔调零,测定各个孔的吸光度(A)值。按公式“(1 - 药物组 A 值/正常对照组 A 值) $\times$ 100%”计算细胞抑制率,每组设置 6 个复孔,进行 3 次重复实验,求其平均值,以剂量和生长抑制率做直线相关分析。

将 MCF7 细胞以 1×10^5 个/mL 浓度接种于 6 孔板中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,分别加入终浓度为 150、200、250、300 $\mu\text{g/L}$ 的 PCE,并设正常对照组和 STS (浓度 250 nmol/L) 对照组。继续培养 24 h 后,消化细胞并制备细胞悬液,1000 r/min,25 $^{\circ}\text{C}$,离心 5 min,弃上清液,收集 MCF7 细胞。向 MCF7 细胞加入 Annexin V 结合液重悬细胞,调节细胞浓度为 1×10^6 个/mL,按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒说明书操作,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

将预先饥饿处理了 12 h 的 MCF7 细胞以

1×10^6 个/mL 浓度种植于 Transwell (膜孔径 8 μm , 膜直径 6.5 mm) 上室,下室分别加入 1 mL 终浓度为 150、200、250、300 $\mu\text{g/L}$ 的 PCE,并设正常对照组,继续培养 24 h。将迁移到 Transwell 小室膜外侧的 MCF7 细胞用 95% 乙醇固定 10 min,然后用 0.1% 结晶紫染色 15 min。在倒置显微镜($\times 200$)下,随机观察 12 个高倍视野,计数迁移细胞数,每 2 个视野取均数得 6 个取均后的细胞数。每组实验重复 3 次。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析,实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示,处理组与对照组之间采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

不同质量浓度的 PCE 作用于 MCF7 细胞后,对细胞的生长具有不同程度的抑制作用。当 PCE 作用细胞 12 h 时,随着其浓度的提高,其对 MCF7 细胞的抑制作用逐渐增强,随后通过延长 PCE 的作用时间发现,相同浓度的 PCE 随作用时间延长,其抑制 MCF7 细胞的能力也随着增强(图 1)。当 PCE 浓度大于 250 $\mu\text{g/L}$,并且作用 24 h 以上时,其对 MCF7 细胞的抑制率能达到 50% 以上。检测到 STS 作用于 MCF7 细胞 24 h 和 36 h 后,其抑制率分别为 $(52.37 \pm 1.46)\%$ 和 $(65.14 \pm 1.58)\%$ 。

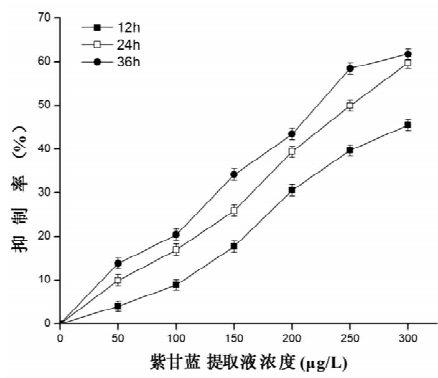


图1 PCE 对 MCF7 细胞的抑制作用

正常条件下培养的 MCF7 细胞生长状态良好,细胞排列紧密,细胞呈扁平、多角形或梭形,边界清楚,大小均匀;STS 阳性药物处理过的细胞出现收缩、变圆、体积变小,细胞间隙增宽,细胞排列紊乱;50 $\mu\text{g/L}$ 的 PCE 作用于细胞后,与正常对照组比较,细胞的形态无明显变化;100 $\mu\text{g/L}$ 的 PCE 作用于细胞后,细胞数量与正常对照组比较有所减少,但是细胞形态正常,无损伤迹象;当 PCE 的浓度达到 150 $\mu\text{g/L}$ 时,细胞的形态与正常对照组比较出现了明显的变化,细胞开始收缩、变圆、变小,其形态和阳性药物 STS 组相似,并且随着 PCE 浓度的增加,细胞的数量和密度逐渐变少(图 2)。

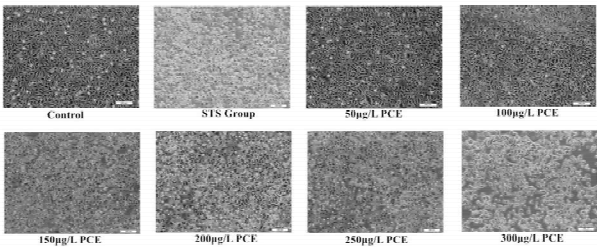


图2 PCE对MCF7形态的影响(×100)

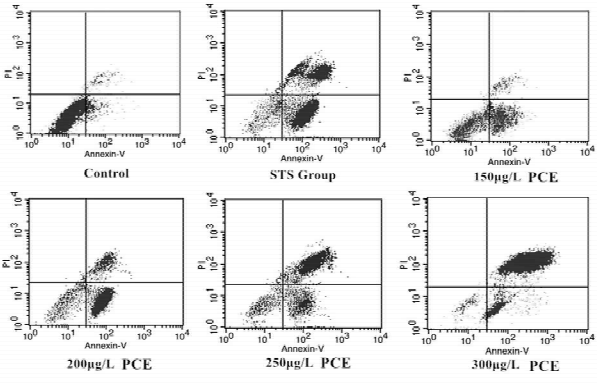


图3 PCE对MCF7细胞凋亡的影响

表1 PCE对MCF7细胞凋亡率的影响

组别	凋亡率(%)
正常对照组	5.31 ± 0.24
STS 对照组(250 nmol/L)	42.53 ± 0.27
PCE 处理组(150 µg/L)	23.49 ± 0.30
PCE 处理组(200 µg/L)	34.72 ± 0.31
PCE 处理组(250 µg/L)	41.48 ± 0.26
PCE 处理组(300 µg/L)	62.93 ± 0.35

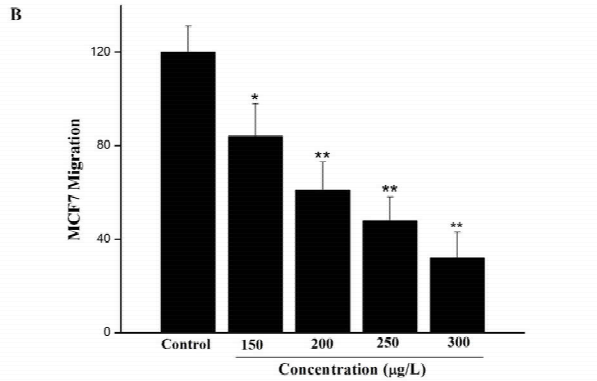
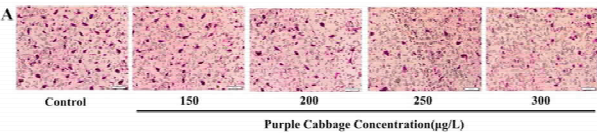


图4 PCE对MCF7细胞迁移的影响

STS 对照组细胞早期凋亡区域和晚期凋亡区域的细胞数量明显多于正常对照组(图3),150 µg/L 的 PCE 作用于 MCF7 细胞后,早期凋亡的细胞数量明显多于正常对照组,并且随着 PCE 的浓度增加,

凋亡的细胞数逐渐增多。当不同浓度的 PCE 作用于 MCF7 细胞后,细胞凋亡率明显高于正常对照组,随着剂量的增加,细胞凋亡率明显增加。见表1。

与正常对照组比较,150、200、250、300 µg/L 的 PCE 作用后显著抑制了 MCF7 细胞的迁移能力,且呈浓度依赖性(图4),当 PCE 的浓度到达 200 µg/L 时,MCF7 细胞的迁移能力下降了 50% 左右。

3 讨论

癌症是以细胞异常增殖及转移为特点的疾病,是导致人类死亡的主要疾病之一,乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤,严重危害了妇女的生命健康,通过摄入有抗癌活性的食物防治乳腺癌是一种简单经济、效果明显的方法^[6-7]。天然食物是化学预防药物的最好来源之一,这些来源于食物的天然成分生理作用比较缓和,几乎无毒,可以较长期服用^[8-9]。紫甘蓝富含多种营养成分和植物色素,但对其抗癌作用的研究鲜有报道,本研究分别考察了紫甘蓝浓缩汁液对乳腺癌细胞 MCF7 的增殖、形态、凋亡和迁移的影响。紫甘蓝对 MCF7 细胞的体外抑制试验采用的是 MTT 法,MTT 结晶形成的量与细胞数成正比,可间接反映活细胞数量,并且灵敏度较高^[10],MTT 试验结果表明,PCE 能够有效抑制 MCF7 细胞增殖,细胞抑制率呈浓度、时间依赖性,对细胞形态的观察也进一步的表明 PCE 对 MCF7 细胞有损伤和抑制作用。细胞凋亡是由基因控制的细胞自主的有序的死亡,其意义在于能消除在形成过程中发生异常的细胞,然而在抑癌基因 p53 出现问题时,就不会诱导凋亡发生,从而导致癌细胞的不断增长,采用 Annexin V-FITC/PI 法可以区分凋亡早期、凋亡晚期和死亡细胞,灵敏度高^[11]。细胞凋亡试验结果表明,PCE 能诱导 MCF7 细胞凋亡,这很有可能是导致 MCF7 细胞形态发生改变以及抑制 MCF7 细胞增殖的原因。癌细胞转移是恶性肿瘤致死的主要原因,肿瘤细胞的转移是多因素、多步骤的过程,其中肿瘤细胞的迁移能力被认为是肿瘤转移的限速环节,肿瘤细胞的迁移能力与其转移潜能呈正相关性^[12]。在本研究中,用 Transwell 法观察了 PCE 对 MCF7 细胞迁移的影响,Transwell 小室置于培养板中,Transwell 小室内称上室,培养板内称下室,上室盛装细胞培养液,下室盛装细胞诱导液,上下层液体以 PET 膜相隔,将 MCF7 细胞种在上室内,由于 PET 膜的通透性,下层迁移液的成分可以影响到上室内的细胞,从而可以研究下层培养液中的成分对 MCF7 细胞迁移的影响^[13]。Transwell 实验结果显示,PCE 对 MCF7

细胞迁移有明显的抑制作用,并且呈浓度依赖性。这些实验结果提示紫甘蓝具有潜在的抗癌价值。

紫甘蓝属于十字花科甘蓝类植物,在 200 多项流行病学研究资料中,有 80% 的结果表明食用植物性食物特别是十字花科蔬菜能够降低多种癌症的患病风险,其中甘蓝类植物对癌症的预防作用更是强于其他蔬菜和水果^[14-15]。十字花科植物所含有的硫代葡萄糖苷(硫苷)的水解产物是其抗癌特性的主要成分,硫苷自身性质比较稳定,不具备生物活性,但是它可以被内源性黑芥子酶或人肠道内微生物产生的水解酶水解,生成硫氰酸盐、异硫氰酸盐、腈类等一系列活性物质,异硫氰酸盐对哺乳动物的肝癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌有明显的抑制作用^[16-18]。研究表明,紫甘蓝含有脂肪族硫苷、吲哚族硫苷、芳香族硫苷等,除了含有硫苷外,还富含花青素,花青素是一种天然色素,可以清楚自由基,有很强的抗氧化功能,其降解产物在减轻疼痛和预防癌症方面也有一定的功效^[19-20]。因此,我们推测紫甘蓝的抗癌活性与其富含的硫苷和花青素有关,但是具体是哪些物质发挥了抗癌活性,以及紫甘蓝的抗癌机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 刘英,王超. 简述甘蓝类植物的起源及分类[J]. 北方园艺,2006,1(4):57.
- [2] Fortea MI, Pellicer JA, Serranomartínez A, et al. Red cabbage(*Brassica oleracea*) as a new source of high-thermostable peroxidase[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(42):10641-10648.
- [3] 张彬,路阳,尹美强,等. 紫甘蓝 COP1 基因的克隆及表达模式分析[J]. 山西农业大学学报:自然科学版,2014,34(5):385-390.
- [4] 王忠博,张志斐,姚妍妍,等. 紫甘蓝食用色素抑制细胞脂质过氧化活性研究[J]. 食品研究与开发,2016,37(24):38-42.
- [5] 朱振宝,王艳斐,易建华. 紫甘蓝花色苷对动脉粥样硬化兔血脂的调节作用[J]. 现代食品科技,2016,32(2):7-11.
- [6] 张国锋,马晋平. 乳腺肿瘤简史[J]. 世界科学,2016,1(2):14-15.
- [7] 何钰卿. 日常传统饮食对乳腺癌风险影响的研究现状[J]. 护理

研究,2016,30(33):4107-4109.

- [8] 夏循礼. 黄宫绣《本草求真》食物基原本草药物研究[J]. 中医研究,2014,27(2):64-68.
- [9] 赵树进,陈念,韩丽萍. 药用植物来源的新药研发进展[J]. 时珍国医国药,2008,19(6):1309-1310.
- [10] 张航,魏曼琳,王思珍. CCK-8 法与 MTT 法检测乳腺上皮细胞活性的条件比较研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2017,59(2):117-119.
- [11] Pietkiewicz S, Schmidt JH, Lavrik IN. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining[J]. J Immunol Methods, 2015, 423:99-103.
- [12] Polacheck WJ, Zervantonakis IK, Kamm RD. Tumor cell migration in complex microenvironments[J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(8):1335-1356.
- [13] 周云飞,张爱华,刘文虎. Transwell 模拟生物屏障[J]. 北京生物医学工程,2009,28(6):657-660.
- [14] Higdon JV, Delage B, Williams DE, et al. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis[J]. Pharmacol Res, 2007, 55(3):224-236.
- [15] 许婷,吴秋云,毛舒香,等. 十字花科蔬菜功能成分多样性研究进展[J]. 湖南农业科学,2016,45(6):119-122.
- [16] Wittstock U, Halkier BA. Glucosinolate research in the Arabidopsis era[J]. Trends Plant Sci, 2002, 7(6):263-270.
- [17] Hayes JD, Kelleher MO, Eggleston IM. The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates[J]. Eur J Nutr, 2008, 47 Suppl 2:73-88.
- [18] Campas-Baypoli ON, Bueno-Solano C, Martínez-Ibarra DM, et al. Sulforaphane(1-isothiocyanato-4-(methylsulfinyl)-butane) content in cruciferous vegetables[J]. Arch Latinoam Nutr, 2009, 59(1):95-100.
- [19] 王倩,汪云,宦卫青,等. 紫甘蓝色素的提取及组分的研究[J]. 天然产物研究与开发,2010,22(6):1057-1060.
- [20] Gonzales GB, Raes K, Vanhoutte H, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry coupled with multivariate analysis for the characterization and discrimination of extractable and nonextractable polyphenols and glucosinolates from red cabbage and Brussels sprout waste streams[J]. J Chromatogr A, 2015, 1402:60-70.

(2016-12-29 收稿 责任编辑:杨觉雄)