

牛蒡子苷元对体外 C6 胶质瘤细胞的抑制效果和凋亡机制

郝彬 赵红果

(郑州市中医院神经外科, 郑州, 450007)

摘要 目的:探讨牛蒡子苷元对体外 C6 胶质瘤细胞的抑制效果和凋亡机制。方法:将牛蒡子苷元作用于 C6 胶质瘤细胞,采用 CCK-8 法测定各组细胞的生长抑制率;流式细胞术检测细胞凋亡情况;酶联免疫吸附试验检测 TNF- α 、IL-2 的水平;Western blot 检测 Bax、Bcl-2、NF- κ B 蛋白表达水平。结果:与空白组比较,牛蒡子苷元组(2.5~40 μ mol/L)显著抑制 C6 胶质瘤细胞生长,诱导肿瘤细胞凋亡,其诱导效应具有浓度依赖性;牛蒡子苷元处理后,细胞中 TNF- α 、IL-2 水平增加;牛蒡子苷元可以显著上调 Bax 蛋白表达,下调 Bcl-2、NF- κ B 蛋白表达。结论:牛蒡子苷元可以促进 C6 胶质瘤细胞凋亡,可能是通过增强 TNF- α 、IL-2 水平及上调 Bax 蛋白、下调 Bcl-2、NF- κ B 蛋白水平而诱导肿瘤细胞凋亡。

关键词 牛蒡子苷元;C6 胶质瘤细胞;细胞增殖;细胞凋亡

Research on Arctigenin in Proliferation and Apoptosis of C6 Glioma Cells

Hao Bin, Zhao Hongguo

(Department of Neurosurgery, Traditional Chinese Medicine Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450007, China)

Abstract Objective: To investigate the inhibitory effect and apoptosis mechanism of arctigenin on C6 glioma cells. **Methods:** Arctigenin acted on C6 glioma cells. CCK-8 was used to detect the growth inhibition rate of each group; flow cytometry was used to detect apoptosis rate of different group; the levels of TNF- α and IL-2 were detected by ELISA; the expressions of Bax, Bcl-2 and NF- κ B proteins were analyzed by Western blot. **Results:** Compared with the blank group, arctigenin (2.5~40 μ mol/L) significantly inhibited the growth of C6 glioma cells and induced apoptosis of tumor cells in concentration-dependent; after treatment with arctigenin, the levels of TNF- α and IL-2 in the cells were increased; arctigenin could up-regulate the expression of Bax protein and down-regulate the expression of Bcl-2 and NF- κ B Proteins. **Conclusion:** Arctigenin can promote the apoptosis of C6 glioma cells, which maybe through enhance the levels of TNF- α , IL-2 and up-regulated Bax protein, down-regulate Bcl-2 and NF- κ B proteins levels.

Key Words Arctigenin; C6 glioma cell; Cell proliferation; Cell apoptosis

中图分类号:R284 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.09.053

胶质瘤(Glioma)是最常见的原发性中枢神经系统肿瘤,约占颅内肿瘤的50%,其复发率和病死率极高^[1]。胶质瘤呈浸润性生长,手术难以完全根除,临床上常用手术切除加以药物化疗,虽提高了治愈率,但肿瘤细胞对化疗药物易产生耐药性导致化疗失败,寻找新的治疗方法是目前有效治疗胶质瘤亟需解决的问题^[2]。近年来中药抗肿瘤成为国内外研究的热点。牛蒡子为菊科植物牛蒡(Arctium lappa L)的干燥成熟果实,牛蒡子苷元(Arctigenin, ARG)是牛蒡子中主要药理活性成分,研究表明其具有抗炎^[3]、抗免疫调节^[4]、抗病毒^[5]、抗肿瘤活性^[6]。目前对于牛蒡子苷元体外抗胶质瘤的研究较少,本实验探讨牛蒡子苷元对体外 C6 胶质瘤细胞的增殖和凋亡影响及机制,为临床治疗脑胶质瘤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 C6 胶质瘤细胞购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.1.2 试验药物 牛蒡子苷元(ARG, Sigma 公司);牛蒡子苷元溶液:取牛蒡子苷元用含 0.1% DM-SO 培养基溶解,稀释制得 40.00 μ mol/L、20.00 μ mol/L、10.00 μ mol/L、5.00 μ mol/L、2.50 μ mol/L、1.25 μ mol/L 的溶液,储存备用。

1.1.3 试剂与仪器 1)试剂:细胞增殖毒性检测试剂盒 CCK-8(广州浩玛生物科技有限公司);膜联蛋白 V (Annexin-V)异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙锭(PI)凋亡试剂盒(碧云天生物公司);兔抗鼠 NF- κ B 多克隆一抗、兔抗鼠 Bax 多克隆一抗、兔抗鼠 Bcl-2 多克隆一抗、兔抗鼠 β -actin 多克隆一抗,辣根过氧

化物酶标记的羊抗兔二抗(北京博奥森生物技术有限公司)。2)仪器:多功能酶标仪(美国铂金埃尔默公司);ALTRA 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司);ChemiDoc MP 全能型凝胶成像分析系统(美国 ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组 共分空白组(0.1% DMSO 培养基)、牛蒡子苷元不同浓度组(1.25、2.50、5.00、10.00、20.00、40.00 $\mu\text{mol/L}$),顺铂组(20 $\mu\text{mol/L}$),每组设 5 个复孔。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率 各组加入相应浓度的药液 100 μL ,分别于给药 48 h 后弃去药液,加入含 10% CCK-8 的培养基 100 μL ,置于培养箱中孵育 2 h 后,于 450 nm 波长处测定其 A 值,计算药物对肿瘤细胞生长抑制率($\%$) = (1 - 实验组 A 值/对照组 A 值) \times 100%。

1.2.3 细胞周期分布与凋亡率检测 用流式细胞仪检测。取对数生长期的细胞,消化计数,调整细胞密度 $5 \times 10^4/\text{mL}$,每孔 2 mL 接种于 6 孔板,培养箱中常规培养 48 h 弃去原培养液。按分组予以不同处理因素:空白组、牛蒡子苷元组(1.25 $\mu\text{mol/L}$)、牛蒡子苷元组(10 $\mu\text{mol/L}$)、牛蒡子苷元组(40 $\mu\text{mol/L}$)、顺铂组(20 $\mu\text{mol/L}$),每组 5 个复孔,每孔药液 2 mL 药物作用 48 h 后,用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,然后加入完全培养液终止消化,收集细胞,2 000 r/min \times 5 min 离心,PBS 洗两遍,离心后弃上清液,按照凋亡检测试剂盒说明书处理细胞,即每孔加入 500 μL Binding Buffer 重悬细胞,约为 1×10^5 细胞,加入 5 μL 的 AnnexinV/FITC,混匀后加入 5 μL 的 PI 染料,摇匀后避光孵育 10 min,流式细胞仪检测,用 Flowjo 软件进行数据分析。

1.2.4 TNF- α 、IL-2 水平检测 用酶联免疫吸附试验检测。分组给药处理后,收集细胞,-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存,反复冻融 3 次使细胞完全破碎,3 000 r/min \times 10 min 离心取上清液,按照 TNF- α 、IL-2 检测试剂盒说明书操作,每组 5 个复孔,450 nm 波长处测定其 A 值,计算 TNF- α 、IL-2 水平。

1.2.5 Bax、Bcl-2、NF- κB 蛋白表达检测 用 Western blot 检测。分组给药处理后,每孔加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷 PBS 液 1 mL 冲洗 2 次,加入 0.1 mL RIPA 裂解液冰浴中充分裂解提取细胞总蛋白,-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。按照 BCA 蛋白定量试剂盒对各组样品进行定量,每孔上样 80 μg 蛋白质样品进行 10% SDS-PAGE,转移至硝酸纤维素膜上,TBST 清洗,封闭 1 h、分别加

入 Bax、Bcl-2、NF- κB 、 β -actin 一抗(1:2 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,室温孵育二抗(1:10 000)2 h,ECL 化学发光,X 线曝光显影。

1.3 统计学方法 所有实验均重复 3 次以上,数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牛蒡子苷元抑制 C6 胶质瘤细胞的量效和时效关系 牛蒡子苷元(1.25 ~ 40 $\mu\text{mol/L}$)作用于 C6 胶质瘤细胞后抑制率随浓度增加而逐渐增强,呈现明显的量-效关系,经计算牛蒡子苷元对 C6 胶质瘤细胞的半数抑制浓度 IC₅₀ 为 18.23 $\mu\text{mol/L}$ 。见表 1。

表 1 牛蒡子苷元对 C6 胶质瘤细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度($\mu\text{mol/L}$)	抑制率($\%$)
空白组	0.00	0.00 \pm 3.24
牛蒡子苷元	1.25	8.16 \pm 1.42
牛蒡子苷元	2.50	23.75 \pm 3.21*
牛蒡子苷元	5.00	35.02 \pm 4.59*
牛蒡子苷元	10.00	44.72 \pm 5.45*
牛蒡子苷元	20.00	52.36 \pm 6.63*
牛蒡子苷元	40.00	65.27 \pm 8.55*
顺铂组	20.00	72.75 \pm 6.14*

注:与空白组比较,* $P < 0.05$

2.2 牛蒡子苷元对 C6 胶质瘤细胞的凋亡率与周期分布的影响 各组细胞加药培养 48 h 后,牛蒡子苷元处理组, G_1/G_0 期所占细胞比例增多,除低浓度组(1.25 $\mu\text{mol/L}$)外,中浓度组(10 $\mu\text{mol/L}$)和高浓度组(40 $\mu\text{mol/L}$)与空白组比较显著增多,且差异有统计学意义($P < 0.05$);空白组 C6 胶质瘤细胞自然凋亡率较低,经牛蒡子苷元加药处理后,凋亡率呈明显上升趋势,且呈浓度依赖趋势。见表 2。

2.3 牛蒡子苷元对 C6 胶质瘤细胞 TNF- α 、IL-2 水平的影响 与空白组比较,牛蒡子苷元处理组(10.00、40.00 $\mu\text{mol/L}$)均能显著提高细胞中 TNF- α 、IL-2 的水平;牛蒡子苷元低剂量组(1.25 $\mu\text{mol/L}$)中 TNF- α 、IL-2 水平与空白组比较虽有增高趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

2.4 牛蒡子苷元对 C6 胶质瘤细胞 Bax、Bcl-2、NF- κB 蛋白表达水平的影响 与空白组比较,10、40 $\mu\text{mol/L}$ 牛蒡子苷元组 C6 胶质瘤细胞中 Bax 蛋白表达显著增多,10.00、40.00 $\mu\text{mol/L}$ 牛蒡子苷元组 C6 胶质瘤细胞中 Bcl-2、NF- κB 蛋白表达下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

表2 牛蒡子苷元对 C6 胶质瘤细胞周期和细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	细胞周期 (%)			细胞凋亡率 (%)
		G ₁ /G ₀	S	G ₂ /M	
空白组	0.00	32.23 ± 4.36	36.78 ± 2.78	30.99 ± 3.23	1.03 ± 0.12
低浓度组	1.25	36.38 ± 3.16	33.44 ± 2.89	30.18 ± 4.21	3.09 ± 0.17
中浓度组	10.00	55.25 ± 5.39*	27.21 ± 3.34*	17.54 ± 1.42*	15.59 ± 2.13*
高浓度组	40.00	66.38 ± 7.24*	22.57 ± 2.87*	11.05 ± 0.87*	27.74 ± 2.52*
顺铂组	20.00	75.53 ± 6.11*	16.61 ± 1.56*	7.86 ± 1.24*	32.89 ± 3.31*

注:与空白组比较, * $P < 0.05$

表3 牛蒡子苷元对 C6 胶质瘤细胞 TNF- α 、IL-2 及水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	TNF- α (ng/mL)	IL-2 (ng/mL)
空白组	0.00	123.34 ± 8.54	42.52 ± 3.21
低浓度组	1.25	130.56 ± 7.36	48.74 ± 4.17
中浓度组	10.00	157.74 ± 12.12*	65.35 ± 5.15*
高浓度组	40.00	178.51 ± 15.71*	78.87 ± 6.17*
顺铂组	20.00	190.36 ± 15.86*	87.22 ± 5.82*

注:与空白组比较, * $P < 0.05$

表4 牛蒡子苷元对 C6 胶质瘤细胞 NF- κ B、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	NF- κ B/ β -actin
空白组	0.00	0.88 ± 0.13	1.18 ± 0.11	1.12 ± 0.14
低浓度组	1.25	0.91 ± 0.11	1.14 ± 0.12	1.07 ± 0.14
中浓度组	10.00	1.02 ± 0.08*	0.98 ± 0.09*	0.89 ± 0.12*
高浓度组	40.00	1.16 ± 0.07*	0.86 ± 0.07*	0.76 ± 0.08*
顺铂组	20.00	1.22 ± 0.06*	0.81 ± 0.05*	0.72 ± 0.06*

注:与空白组比较, * $P < 0.05$

3 讨论

牛蒡子苷元作为牛蒡子中主要的药理活性成分之一,研究表明牛蒡子苷元对胶质瘤生长具有抑制作用^[7],此外还具有多种药理活性,如抗糖尿病、抗白血病活性、心脏病调节等。本实验研究结果表明,牛蒡子苷元(2.5 ~ 40.00 $\mu\text{mol/L}$)对 C6 胶质瘤细胞具有明显的增殖抑制作用。与空白组比较,经牛蒡子苷元处理后,使细胞大部分阻滞在 G₁/G₀ 期, S 期和 G₂/M 期肿瘤细胞明显减少,细胞凋亡率显著增高,且呈浓度依赖关系。抑制率与凋亡实验结果说明,牛蒡子苷元可以抑制 C6 胶质瘤细胞增殖,促进凋亡。TNF- α 、IL-2 是机体内重要的细胞因子。TNF- α 可以直接杀死肿瘤细胞,抑制肿瘤细胞增殖并可以促进凋亡^[8]。IL-2 可以增强 T 细胞的杀伤活性,发挥免疫功能^[9]。牛蒡子苷元诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡,可能与增加细胞内 TNF- α 、IL-2 的水平有关,发挥其调节免疫功能。NF- κ B 是参与细胞凋亡的重要调控因子,其高表达是肿瘤产生耐药性的重要原因^[10]。Western blot 结果显示,牛蒡子苷元处理后,C6 胶质瘤细胞中 NF- κ B 蛋白显著降低,促

凋亡蛋白 Bax 表达显著增加,抗凋亡蛋白 Bcl 显著降低,可能是牛蒡子苷元诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡的机制之一^[11]。

本研究显示,牛蒡子苷元能够抑制 C6 胶质瘤细胞增殖,诱导其凋亡。实验结果显示牛蒡子苷元可以提高 C6 胶质瘤细胞中 TNF- α 、IL-2 水平,降低 NF- κ B、Bcl-2 蛋白水平,提高 Bax 蛋白表达,抑制 C6 胶质瘤细胞增殖,促进细胞凋亡。

参考文献

- [1] 陈正和,陈忠平. 胶质瘤治疗的现状与思考[J]. 广东医学,2017,38(1):1-2.
- [2] Chowdhary MM, Ene CI, Silbergeld DL. Treatment of Gliomas; How did we get here? [J]. Surg Neurol Int, 2015, 6(Suppl 1):S85-88.
- [3] Hyam SR, Lee IA, Gu W, et al. Arctigenin ameliorates inflammation in vitro and in vivo by inhibiting the PI3K/AKT pathway and polarizing M1 macrophages to M2-like macrophages [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 708(1-3):21-9.
- [4] 薛芳喜,姚景春,刘奋. 牛蒡子苷元对小鼠免疫功能的影响[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(2):350-352.
- [5] 符林春,徐培平,刘妮,等. 牛蒡子苷元复方抗流感病毒的实验研究[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(4):266-269.
- [6] 王静泓,姜孝新,曾乐平,等. 牛蒡子苷元通过抑制 PI3-K/Akt 信号通路诱导肝癌细胞凋亡[J]. 肿瘤药学, 2015, 5(6):430-435.
- [7] 苏勤勇,李晓梅,姚景春,等. 牛蒡子苷元对大鼠脑胶质瘤的作用及初步作用机制探讨[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(6):805-809.
- [8] 王欢,关大朋,李伟,等. 熟桔梗对 H₂(22) 荷瘤小鼠的抑瘤作用及皂苷类成分分析[J]. 毒理学杂志, 2015, 29(1):49-53.
- [9] 张秀娟,李其成,白雪莹,等. 大豆多糖联合环磷酰胺对 S180 荷瘤小鼠抗肿瘤增效作用研究[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(5):521-523, 527.
- [10] Lwin T, Hazlehurst LA, Li Z, et al. Bone marrow stromal cells prevent apoptosis of lymphoma cells by upregulation of anti-apoptotic proteins associated with activation of NF- κ B (RelB/p52) in non-Hodgkin's lymphoma cells [J]. Leukemia, 2007, 21(7):1521-31.
- [11] Tsai WJ, Chang CT, Wang GJ, et al. Arctigenin from Arctium lappa inhibits interleukin-2 and interferon gene expression in primary human T lymphocytes [J]. Chin Med, 2011, 6(1):12-15.