

# 蓝靛果花色苷诱导人结肠癌细胞 HT29 凋亡的实验研究

李文星, 包怡红, 王振宇

(东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040)

**【摘要】目的** 研究蓝靛果花色苷诱导人结肠癌细胞 HT29 凋亡的形态学特征。**方法** 采用单四唑(MTT)法检测蓝靛果花色苷对 HT29 细胞生长的抑制作用;采用倒置显微镜、荧光倒置显微镜、单细胞电泳、扫描电镜、透射电镜观察不同浓度(0.5, 1.0 和 2.0mg/ml)蓝靛果花色苷处理 HT29 细胞凋亡形态学特征的变化。**结果** 蓝靛果花色苷可抑制 HT29 细胞生长,抑制率呈时间剂量依赖性。蓝靛果花色苷作用于结肠癌 HT29 细胞,使结肠癌细胞分别出现了细胞数量明显减少,体积缩小,皱缩变形,细胞表面有许多的球状突起,进一步有凋亡小体产生,细胞间连接逐渐断裂,细胞浆出现较多空泡,胞浆浓缩,核物质致密,呈斑块状,或呈新月形边集于核膜,核形不规整等典型的凋亡细胞形态特征。随着花色苷浓度的增加,现象更加显著。**结论** 蓝靛果花色苷可诱导结肠癌 HT29 细胞凋亡,显著抑制结肠癌 HT29 细胞的增殖。**【营养学报, 2011, 33(6): 575 - 579】**

关键词: 蓝靛果; 花色苷; 细胞凋亡; 细胞形态

中图分类号: R151.41

文献标识码: A

文章编号: 0512-7955(2011)06-0575-05

## MORPHOLOGICAL OBSERVATION OF APOPTOTIC HUMAN COLON CANCER CELLS HT29 INDUCED BY ANTHOCYANINS FROM LONICERA EDULIS

LI Wen-xing, BAO Yi-hong, WANG Zhen-yu

(Institute of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin, 150040, China)

**【Abstract】Objective** To study the apoptotic morphology of HT29 human colon cancer cells induced by anthocyanins from *Lonicera edulis*. **Method** Monotetrazolium (MTT) was used to determine the effect of anthocyanins on inhibiting proliferation of human colon cancer cells HT29. Reversed microscopy, fluorescence reversed microscopy, single cell gel electrophoresis, scanning and transmission electron microscopy were used to observe the morphology of HT29 cells under the effect of anthocyanins (0.5, 1.0 and 2.0 mg/ml). **Results** Anthocyanins from *Lonicera edulis* inhibited the proliferation of HT29 cells in dose- and time-dependent manner. Many typical apoptotic cell morphology were observed, such as: the number of cells decreased, the volume shrunk, many spherules heaved out cells surface, apoptotic bodies appeared, connections between cells gradually broken, the vacuole inside cytoplasm obviously increased, cytoplasm condensed, dense nuclear matter patchy or crescent-shaped on boundary of the nuclear membrane, nuclear shape irregular. With the increase of the concentration of anthocyanins, these phenomena were more significant. **Conclusion** Anthocyanins from *Lonicera edulis* significantly inhibited the proliferation of colon cancer HT29 cells and typical apoptotic morphological appeared. **[ACTA NUTRIMENTA SINICA, 2011, 33(6): 575-579]**

**Key words:** *Lonicera edulis*; anthocyanins; apoptosis; cellular morphology

恶性肿瘤细胞凋亡研究不仅对认识肿瘤发病机制有积极意义,而且在肿瘤治疗及预后评价方面有重要意义,所以调节细胞凋亡是抗肿瘤机制、药物筛选和治疗应用等研究领域最有潜力的

发展方向之一<sup>[1]</sup>。蓝靛果(*Lonicera edulis*),学名蓝靛果忍冬,又名羊奶子、黑瞎子果、山茄子果、蓝果等,是忍冬科(Caprifoliaceae)忍冬属(*Lonicera*)植物,多年生落叶灌木。果实为浆果,

收稿日期 2011-05-20

基金项目 哈尔滨市科技局科技攻关计划项目(No. 2008AA6AN087)

作者简介 李文星(1985-),女,硕士研究生, E-mail: liwenxing0910@163.com

味酸甜, 含 7 种氨基酸和维生素 C, 果汁为鲜艳的深玫瑰色<sup>[2-3]</sup>。蓝靛果不仅含有丰富的维生素、矿物质和氨基酸, 还含有大量的花色苷物质, 具有较高的营养价值、药用价值和保健价值<sup>[4]</sup>。流行病学研究表明, 摄入花色苷可以降低心血管疾病、糖尿病、关节炎和癌症的发病风险<sup>[5-8]</sup>。花色苷可通过内在的(线粒体)和外在的(FAS)途径诱导细胞凋亡, 对体外多种癌细胞的增殖具有抑制作用<sup>[9]</sup>。本研究观察了蓝靛果花色苷对人结肠癌细胞 HT29 增殖与凋亡的影响, 为进一步阐明花色苷抗肿瘤作用的机制, 深入开发利用蓝靛果提供理论依据。

## 1 材料与 方法

### 1.1 材料

人结肠癌细胞株 HT29 由哈尔滨工业大学细胞实验室提供。胰蛋白酶(天津市灏洋生物制品公司), 胚胎牛血清(杭州四季青生物工程材料公司), RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基(Gibco 公司), 二甲基亚砜(DMSO)、琼脂糖、溴化乙锭(EB)(Amresco 公司), 其它试剂均为生化试剂或分析纯, 水为双蒸水。倒置显微镜、荧光显微镜 OLYMPUS IX70(Japan)。

### 1.2 方法

1.2.1 蓝靛果花色苷的制备: 取蓝靛果冻果适量, 粉碎, 按照料液比 1:15(W:V)加入 pH2.0 的 70% 乙醇, 提取 3 次, 合并提取液, 旋转蒸发除去提取溶剂, 经 X-5 大孔树脂纯化, 减压浓缩, 真空冷冻干燥得到蓝靛果花色苷粉末, 用培养基稀释到一定浓度, 过 0.22  $\mu\text{m}$  滤孔膜后用于细胞试验。

1.2.2 细胞培养: 将人结肠癌细胞株 HT29 用 RPMI 1640 完全培养液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中贴壁培养。

1.2.3 肿瘤细胞形态观察: 取对数期生长的 HT29 肿瘤细胞, 以 5 $\times 10^4$ /ml 的密度接种于 6 孔培养板中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养 24h 后, 加入蓝靛果花色苷溶液培养 48h, 对照组用不含花色苷的培养液培养, 每天更换培养液, 在倒置显微镜下观察细胞形态的变化。

1.2.4 MTT 法测定蓝靛果花色苷对结肠癌 HT29 增殖的影响: 取对数生长的 HT29 肿瘤细胞, 以 1 $\times 10^5$ /ml $\times 100 \mu\text{l}$ /孔的接种量, 接种于 96 孔培养

板中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后, 加入不同浓度的蓝靛果花色苷, 各设 6 个平行孔, 分别培养 24、48 和 72h。加 20  $\mu\text{l}$  MTT(5mg/ml), 培养 4 h, 然后加入 150ml DMSO 溶液, 振荡 10min, 溶解结晶, 用酶标仪测定 OD 值<sup>[10-11]</sup>。抑制率计算公式:

$$\text{细胞生长抑制率}(\%) = (1 - \frac{\text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}}) \times 100$$

1.2.5 凋亡细胞的荧光倒置显微镜形态观察: 取对数生长期 HT29 肿瘤细胞, 以 5 $\times 10^4$ /ml 的密度接种于 6 孔培养板中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养 24 h 后, 加入蓝靛果花色苷溶液(2.0 mg/ml)培养 48 h, 对照组用不含花色苷的培养液培养, 每天更换培养液。上述用不含 EDTA 的胰酶消化收集。用 PBS 洗涤细胞二次(2000 r/min 离心 5 min)收集 1 $\sim 5 \times 10^5$  细胞; 加入 500  $\mu\text{l}$  的 Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 混匀后, 加 5  $\mu\text{l}$  propidium iodide, 混匀, 室温、避光、反应 5 $\sim 15$ min, 滴 1 滴上述染色后的细胞悬液于载玻片上, 并用盖玻片盖上细胞, 于荧光显微镜下, 双色滤光片(FITC 和罗丹明)观察, Annexin V-FITC 荧光信号呈绿色, PI 荧光信号呈红色。

1.2.6 单细胞凝胶电泳检测 HT29 肿瘤细胞 DNA 损伤: 细胞培养和给药(蓝靛果花色苷浓度为 0.5、1.0 和 2.0 mg/ml), 单细胞悬浮液制备过程同 1.2.5。制片、电泳后, 取出玻片置于 pH 7.5, 0.4 mol/L Tris 溶液中洗涤 3 次, 每次 5 min。再以 25 mg/ml 的溴化乙锭(EB)进行染色, 加上盖片, 尽快观察结果。以上步骤均在暗室中进行。

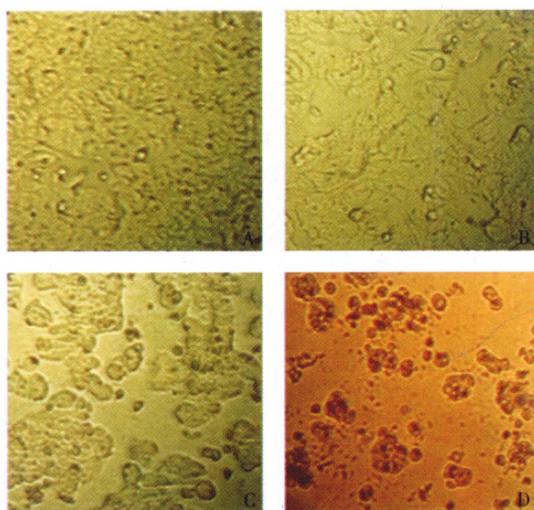
1.2.7 凋亡细胞的扫描电镜观察: 取对数生长期的 HT29 肿瘤细胞, 以 2 $\times 10^4$ /ml 的密度接种于 6 孔培养板中, 事先将灭完菌的盖玻片置于 6 孔培养板中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养 24 h 后, 加蓝靛果花色苷溶液(1.0 和 2.0 mg/ml)培养 48h, 对照组用不含花色苷的培养液培养, 每天更换培养液。停止培养时, 用 PBS 缓冲液漂洗, 再加入 2.5%戊二醛固定液中固定 1 $\sim 2$  h, 乙醇梯度脱水到 100%, CO<sub>2</sub> 临界点干燥, 降至室温, 取出样品装于样品台上, 金属镀膜后置于扫描电子显微镜观察<sup>[12]</sup>。

1.2.8 凋亡细胞的透射电镜观察: 细胞培养和给

药（蓝靛果花色苷浓度为 2.0 mg/ml），单细胞悬浮液制备过程同 1.2.5。再用 2.5%戊二醛 4℃进行前固定 2h，经缓冲液多次清洗，再用 1%饿酸 4℃固定 2h，缓冲液漂洗。梯度酒精脱水（50%、70%、80%、90%各 1 次，100%2 次），每次 15 min，100%丙酮脱水 2 次，每次 15min，包埋剂浸透 30 min，包埋（环氧树脂 618、Epon 812 及低粘度包埋剂 Spurr），然后 60℃聚合，修块，超薄切片，染色（醋酸铀、枸橼酸铅），透射电镜观察。

## 2 结果

### 2.1 肿瘤细胞形态观察（图 1）



A: Normal control; B: 0.5mg/ml anthocyanins-treated group; C: 1.0mg/ml anthocyanins-treated group; D: 2.0mg/ml anthocyanins-treated group

**Fig. 1 The cell morphology of anthocyanins group (10×20)**

HT29 结肠癌细胞经不同浓度的蓝靛果花色苷作用 48 h 后，倒置显微镜下观察细胞，对照组（图 1A）细胞生长旺盛，贴壁良好，细胞之间排列密集，呈不规则多角形；加药组（图 1B、图 1C、图 1D）细胞数量明显减少，细胞间隙增加，细胞皱缩变形、细胞缩小，周围有数个圆形小体（凋亡小体）围绕，部分细胞失去贴壁生长的特性，随着药物浓度的增加，现象更加明显。

### 2.2 蓝靛果花色苷对人结肠癌 HT29 肿瘤细胞增殖的影响

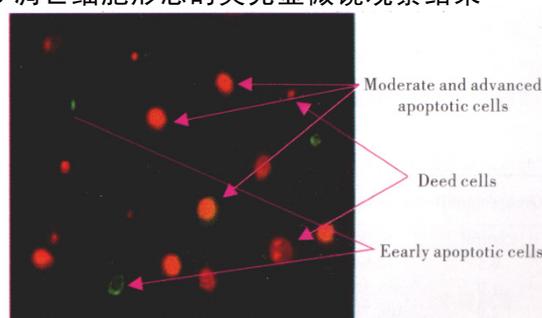
经 0.05~2.0mg/ml 蓝靛果花色苷分别作用人结肠癌 HT29 肿瘤细胞后，随着花色苷浓度的升高，随着作用时间的延长，对肿瘤细胞增殖的抑制作用都逐渐增强，表现出明显的剂量效应和

时间效应。浓度为 2.0 mg/ml 蓝靛果花色苷处理 24、48 和 72 h 后，抑制率分别为 61.86%、72.23% 和 75.28%（表 1）。在同一浓度各时间点之间，同一时间点各浓度之间蓝靛果花色苷对肿瘤细胞的抑制率均有显著差异（ $P < 0.01$ ）。

**Table 1 Inhibition rate of anthocyanins from *Lonicera edulis* on the growth of HT29 cancer cell**

Dose(mg/ml)	24h	48h	72h
0.05	2.43±0.22	5.16±2.20	11.25±3.21
0.25	8.86±2.01	13.68± 3.25	22.29±2.14
0.5	20.32±3.17	27.68±3.52	42.21±4.23
1.0	40.36±2.82	51.93±1.05	60.28±3.67
1.5	52.27±3.52	62.14±4.20	70.42±4.18
2.0	61.86±5.21	72.23±3.20	75.28±4.36

### 2.3 凋亡细胞形态的荧光显微镜观察结果

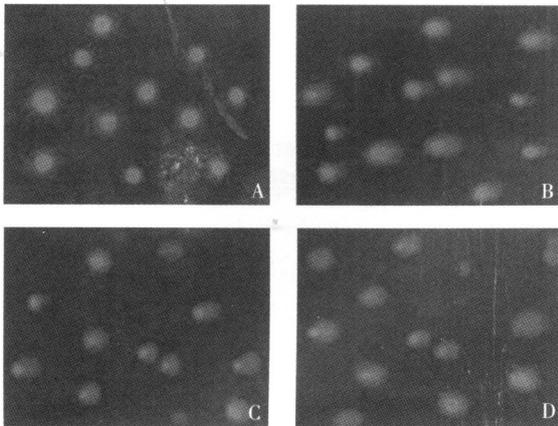


**Fig. 2 Annexin V-FITC/PI fluorescent staining of anthocyanins-treated colon cancer cells HT29**

正常细胞中，磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine, PS）只分布在细胞膜脂质的内侧，而在细胞凋亡早期，细胞膜中的磷脂酰丝氨酸由脂膜内侧翻向外侧，用荧光素（FITC）标记的 Annexin V 极易与细胞外膜的磷脂酰丝氨酸结合从而使其染色。因此 Annexin V 被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。凋亡早期细胞仍保持膜的完整性，碘化丙啶（propidium iodide, PI）因不能透过完整的细胞膜故不能进入细胞内，但能通过通过凋亡中晚期细胞和死细胞的细胞膜，而使细胞核染成红色。

用 Annexin V-FITC / PI 染色后，正常的活细胞不被染色；早期凋亡细胞仅被 Annexin V-FITC 染色，呈现绿色荧光；坏死细胞和凋亡晚期的细胞可以同时被 Annexin V-FITC 和 PI 染色，细胞核呈现红色荧光，坏死细胞细胞膜破损严重，绿色荧光较弱（图 2）。Annexin V-FITC / PI 双标记染色可以将凋亡细胞与继发坏死的细胞区分开，检测到蓝靛果花色苷对结肠癌 HT29 细胞的诱导凋亡作用。

## 2.4 单细胞凝胶电泳检测 HT29 肿瘤细胞 DNA 损伤 (图 3, 表 2)



A: Normal control; B: 0.5mg/ml anthocyanins-treated group;  
C: 1.0mg/ml anthocyanins-treated group; D: 2.0mg/ml anthocyanins-treated group

**Fig. 3 SCGE analysis of anthocyanins-treated colon cancer cells HT29**

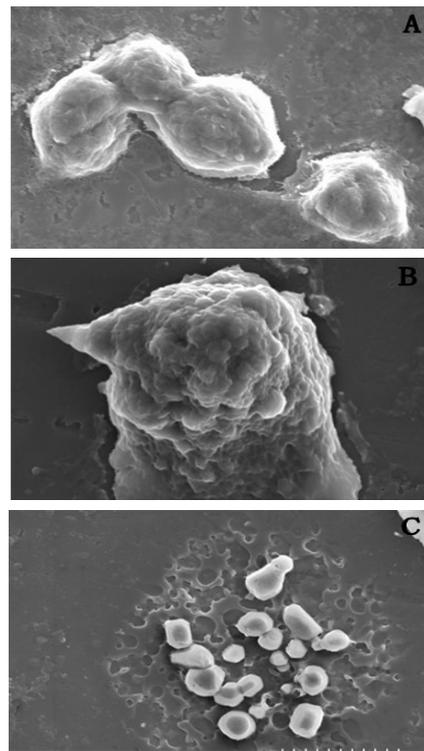
**Table 2 The result of SCGE assay**

Group(mg/ml)	Tail length( $\mu\text{m}$ )	DNA content of tail(%)	DNA content of head(%)
Control	8.2 $\pm$ 1.8	7.30 $\pm$ 2.19	92.7
0.5	32.6 $\pm$ 3.4	23.98 $\pm$ 4.12	76.02
1.0	68.3 $\pm$ 6.7	56.21 $\pm$ 6.04	43.79
2.0	108.7 $\pm$ 10.1	74.98 $\pm$ 8.95	25.02

对照组 (图 3A) 细胞未受损伤, 电泳中核 DNA 因其分子量大停留在核基质中, 经荧光染色后呈现圆形的荧光团, 无拖尾现象。各加药组 (图 3B、图 3C、图 3D) 出现明显的彗星状拖尾, 且尾部荧光强度逐渐增强。拖尾长度的结果 (表 2) 可以看出, 蓝靛果花色苷对细胞的 DNA 损伤随着药物浓度的升高, 表现为细胞拖尾长度增长, 且差异显著 ( $P < 0.01$ )。2.0 mg/ml 蓝靛果花色苷作用肝癌 HT29 细胞 48h 后, 彗尾长度达 108.7  $\mu\text{m}$ , 彗尾 DNA 含量为 74.98%。说明细胞的 DNA 损伤随着花色苷浓度的增加, 损伤程度增加。

## 2.5 凋亡细胞形态的扫描电镜观察结果 (图 4)

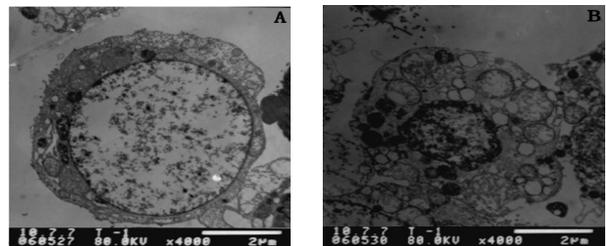
对照组 (图 4A) 细胞表面有丰富的微绒毛, 细胞间镶嵌连接, 细胞膜完整, 且细胞体积较大。加药组 (图 4B) 细胞微绒毛消失, 细胞体积缩小, 细胞表面有许多球状突起, 进一步有凋亡小体产生, 细胞间连接逐渐断裂, 细胞间隙增宽。最后细胞胞体固缩, 细胞裂解成许多胞膜完整、大小不一的凋亡小体状结构 (图 4C)。扫描电镜下观察其超微结构特点符合细胞凋亡的形态学改变, 说明蓝靛果花色苷诱导结肠癌细胞 HT29 凋亡。



A: Normal control; B: 1.0mg/ml anthocyanins-treated group; C: 2.0mg/ml anthocyanins-treated group (Bar=10 $\mu\text{m}$ )

**Fig. 4 Cells for scanning electron microscopy**

## 2.6 凋亡细胞形态的透射电镜观察结果 (图 5)



A: Normal control; B: 2.0mg/ml anthocyanins-treated group

**Fig. 5 Cells for transmission electron microscopy**

对照组 (图 5A) 癌细胞呈圆形, 细胞浆均匀, 体积较大, 细胞核异染色质呈斑点状均匀分布; 加药组 (图 5B) 细胞体积变小, 各细胞器膜均完整, 细胞浆出现较多空泡, 胞浆浓缩, 核物质致密, 呈斑块状, 或呈新月形边集于核膜, 核形不规则等典型凋亡特征。此现象进一步说明了蓝靛果花色苷对结肠癌细胞 HT29 具有诱导凋亡作用。

## 3 讨论

至今为止癌症一直是让人类难以攻克疾病之一, 也是人类最主要的死亡病因之一。目前常用来治疗恶性肿瘤的方法是外科手术、化学疗法和放射疗法。但是存在毒副作用, 治疗不彻底,

复发率高等弊端,此外还会出现耐药性<sup>[13-14]</sup>。因此从天然产物中寻找毒副作用小、作用显著的具有抗肿瘤作用的生物活性成分或者抗肿瘤辅助药物,成为现在抗肿瘤药物的发展战略和方向之一。细胞凋亡机制复杂,细胞凋亡过程中往往伴随特有的细胞形态变化,细胞凋亡的检测方法有多种,细胞形态学观察具有形象直观,操作过程相对快速简便等特点,从而成为细胞分子生物学最有效的、不可替代的重要实验方法之一<sup>[15-16]</sup>。

本研究应用可见光显微镜、荧光显微镜、扫描电镜和透射电镜等多种技术手段多视角观察经蓝靛果花色苷培养的肿瘤细胞 HT29 细胞形态的变化,结果看到蓝靛果花色苷处理的肿瘤细胞数量明显减少,细胞间隙增加,细胞皱缩变形、细胞体积缩小,部分细胞失去贴壁生长的特性,细胞表面有许多的球状突起,周围有数个圆形小体(凋亡小体)围绕,细胞浆出现较多空泡,胞浆浓缩,细胞核染色体发生固缩等典型的凋亡细胞形态特征。提示蓝靛果花色苷可通过诱导癌细胞发生细胞凋亡发挥抑制结肠癌细胞增殖的作用。本研究结果为花色苷应用于新型抗肿瘤药物提供了理论依据,也为进一步开发利用蓝靛果资源奠定了重要基础。

#### [参 考 文 献]

- [1] 任丹丹,彭光华,王海滨,等. 苜蓿类胡萝卜素诱导 Hela 细胞凋亡的细胞学观察[J]. 食品科学, 2006, 27: 240-244.
- [2] 聂绍荃,袁晓颖,杨逢建,等. 黑龙江植物资源志[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2003: 636-637.
- [3] 杨恩月. 蓝靛果乙酸乙酯提取物对 S180 和 H22 荷瘤小鼠的抑瘤作用的实验研究. 延边大学, 2003, 硕士研究生论文.
- \* \* \* \* \*
- (上接 574 页)
- [4] Gregus Z, Perjesi P, Gyurasics A. Enhancement of selenium excretion in bile by sulfobromophthalein: elucidation of the mechanism [J]. *Biochem Pharmacol*, 1998, 56: 1391-1402.
- [5] 郭利, 恽榴红. 含硒化合物研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2000, 9: 155-158.
- [6] Burk RF. Selenium: recent clinical advances[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2001, 17: 162-166.
- [7] Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, et al. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 23847-23850.
- [4] 兰士波, 罗旭, 李谔. 蓝靛果忍冬研究进展及开发应用前景[J]. 中国林副特产, 2008, 1: 87-89.
- [5] 小幡真珠子. 花色苷的抑癌效果—bilberry-花色苷的诱导癌细胞凋亡作用[J]. 日本医学介绍, 2004, 25: 60-62.
- [6] Konga JM, Chiaa LS, Goh NK, et al. Analysis and biological activities of anthocyanins [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64: 923-933.
- [7] 李阳, 毕勇毅. 花色苷研究进展[J]. 公共卫生与预防医学, 2009, 20: 53-55.
- [8] 姜伟伟, 任国峰. 花色苷的抗肿瘤效应研究进展[J]. 食品科学, 2009, 30: 281-283.
- [9] Wang LS, Stoner GD. Anthocyanins and their role in cancer prevention [J]. *Cancer Lett*. 2008, 269: 281-290.
- [10] 钱松, 金丽琴. 矢车菊素-3-葡萄糖苷诱导 Hela 细胞凋亡及其机制的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29: 369-373.
- [11] Du Q, Zheng J, Xu Y. Cancer cell antiproliferation activity and metabolism of black carrot anthocyanins [J]. *Innovative Food Sci Emerg Technol*, 2007, 8: 365-372.
- [12] Choi Y, Shinl D, Kim S, et al. Inhibition of invasion and induction of apoptosis by anthocyanins isolated from *Vitis coignetiae* Pulliat in HCT116 colon cancer cells[J]. *Poster Session*, 2008, 7: 127.
- [13] 梁蓓蓓. 天然药物抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国肿瘤, 2007, 16: 705-708.
- [14] 田甜. 肿瘤细胞凋亡及植物药活性成分的干预效应研究进展[J]. 湖南中医学院学报, 2005, 25: 62-64.
- [15] 王海滨, 黄进, 张民, 等. 苜蓿类胡萝卜素提取物诱导人肝癌细胞 QGY-7703 凋亡的细胞学观察[J]. 食品科学, 2005, 26: 211-215.
- [16] 陈伟光. 天然药物活性成分诱导肿瘤细胞凋亡的研究[J]. 中国中医药科技, 2002, 9: 255-256.
- [8] Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, et al. A cell-killing monoclonal antibody(anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor[J]. *J Exp Med*, 1989, 169: 1747.
- [9] 吴昊, 王伏生. 人参皂甙 Rg3 对凋亡调节蛋白 FasL/Fas 在乳腺癌 MCF-7 细胞表达的影响[J]. 中国医疗前沿, 2011, 6: 18-19.
- [10] O' Brien DI, Nally K, Kelly RG, et al. Targeting the Fas/Fas ligand pathway in cancer[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2005, 9: 1031-1044.
- [11] 虞燕霞, 顾振纶, 殷江临, 等. 熊果酸诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞株凋亡机制的研究[J]. 中成药, 2010, 32: 2041-2044.

(续完)