

叶黄素和玉米黄素抑制口腔上皮细胞癌增殖的实验研究

孙 震, 奚海燕, 李 博, 姚惠源

(江南大学食品学院 食品科学与安全教育部重点实验室 江苏 无锡 214036)

摘 要: 为阐明玉米蛋白粉类胡萝卜素提取物叶黄素和玉米黄素对口腔上皮癌细胞株 KB 凋亡的诱导作用, 探讨其分子生物学机制。本文采用单细胞凝胶电泳、DNA 凝胶电泳、流式细胞术检测叶黄素和玉米黄素诱导口腔癌细胞凋亡的情况。结果发现: 单细胞凝胶电泳显示玉米蛋白粉叶黄素和玉米黄素能造成 KB 细胞 DNA 损伤、DNA 凝胶电泳显示能使 KB 细胞 DNA 发生明显的降解, DNA 周期分析主要阻断口腔癌细胞由 G1 向 S 期转变; 流式细胞仪检测明显抑制口腔癌细胞株 KB 中 bcl-2 基因的蛋白表达, 明显升高 p53、Bax 基因的蛋白表达; 说明玉米蛋白粉类胡萝卜素提取物叶黄素和玉米黄素具有明显抑制口腔上皮癌细胞增殖、并诱导其凋亡的作用。

关键词: 叶黄素; 玉米黄素; 抗肿瘤; 分子生物学

Molecular Biology Mechanism of Zeaxanthin and Lutein from Corn Gluten Meal to Inhibit Human Oral Cell Cancer Proliferation

SUN Zhen, XI Hai-yan, LI Bo, YAO Hui-yuan

(Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: This study was designed to assay whether the carotenoids-lutein and zeaxanthin extracts from corn gluten meal could induce the oral cavity cancer KB cell apoptosis and illustrate the possible molecular biology mechanism. This paper adopted single-cell gel electrophoresis (SCGE), DNA electrophoresis and flow cytometric (FCM) technique to observe the apoptosis of the cell line KB under the influence of lutein and zeaxanthin. After cells were treated with the medium containing 40 and 60 $\mu\text{mol/L}$ lutein or 30 and 40 $\mu\text{mol/L}$ zeaxanthin for 48 and 72h respectively, many cardinal apoptosis features were observed: single cell gel electrophoresis (SCGE) and DNA electrophoresis assay displayed that lutein and zeaxanthin could induce the breakage of DNA strand of KB cell; While cell cycle analysed by FCM revealed selectively the block cell cycle progression from G1 phase to S phase; and in comparison with the blank group, the expression of bcl-2 gene was low, while that of the p53 and bax genes was high. This paper suggested that the carotenoids-lutein and zeaxanthin existed corn gluten meal has the potential function of induce KB cells apoptosis.

Key words: lutein; zeaxanthin; anti-tumor; molecular biology

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)06-0207-05

叶黄素和玉米黄素对口腔上皮细胞癌的体外培养实验研究结果表明^[1], 叶黄素和玉米黄素对口腔上皮细胞癌有一定的抑制和预防作用, 但其作用机理尚不清楚, 了解叶黄素和玉米黄素抑制口腔上皮细胞癌的作用机制, 对寻求天然化学预防剂作用于膳食干预, 减少或延缓口腔上皮细胞癌的进展具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞株: 口腔上皮癌细胞株, 购自中科院上海细胞生物学研究所细胞库, 由江南大学生物工程学院细胞与分子药理学研究室保存并惠赠。

收稿日期: 2005-07-29

作者简介: 孙震(1966-), 女, 副教授, 在职博士, 主要从事食品微生物学 and 功能性食品研究。

玉米蛋白粉中叶黄素(lutein)和玉米黄素(zeaxanthin)的制备:

玉米蛋白粉+工业酒精 以料液比 1:10 进行混合磁力搅拌 6h 过滤 滤饼用工业酒精重复提取 3~4 次(至滤液无色为止) 收集滤液 旋转蒸发至干(水浴温度为 37℃) 用丙酮溶解,即为类胡萝卜素提取液 无水硫酸钠过滤 选用氧化镁薄层板,以石油醚:丙酮=65:35(V:V)为展开剂,对黄体素和玉米黄素进行薄层层析制备 刮取相应的斑块,用无水乙醇溶解,过滤,并用 N₂ 浓缩(以上操作均应在避光条件下进行) 避光保存于 -18℃,2w 内使用。经 HPLC 分析其纯度:叶黄素为 90%,玉米黄素为 68%。

叶黄素和玉米黄素含量测定及试验样品配制:用适量无水乙醇(AR 级)溶解样品,以分光光度法以及下列公式测定含量:叶黄素含量(μg)=(光密度值 $A_{447} \times 10.87 - 1.787$) \times 总体积(ml) \times 稀释倍数,玉米黄素含量(μg)=光密度值 $A_{452} \times$ 总体积(ml) \times 稀释倍数 $\times 10000/2348$,再将叶黄素和玉米黄素的含量(μg)以分子量 568 为换算单位换算成摩尔浓度。将样品溶解于无水乙醇中,配制成 $2 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 的储备液于 -18℃ 冰箱中保存,2w 内使用。

1.2 主要试剂及仪器

RPMI-1640 GIBCO 公司;胰蛋白酶 Amresco 分装;DNA 提取试剂盒 上海申能博彩公司;鼠抗人单克隆抗体 北京中杉公司;山羊抗小鼠 IgG-FITC、小牛血清 上海华美生化试剂公司;细胞培养板 美国 Costar 公司;超净工作台 苏净集团安泰公司;CO₂ 细胞培养箱 Thermo Forma 公司;荧光倒置显微镜 OLYMPUS CX40;全自动酶标分析仪 MuLtiiskan MK3Thermo Labsystems;流式细胞仪 美国 Becton Dickinson FACStar DYY-III12型三恒电泳仪 北京六一仪器厂;水平电泳槽 Bio-rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将人口腔上皮癌细胞株 KB 用 RPMI 1640 完全培养液,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中贴壁培养。RPMI 1640 完全培养液中加入了体积分数为 10% 胎生牛血清、100U/ml 青霉素、100U/ml 链霉素、200mg/L 谷氨酰胺、1g/L NaHCO₃,滤膜过滤备用。将对数生长期的 KB 细胞接种于 50ml 培养瓶中,24h 后分别按玉米黄素 30、40 $\mu\text{mol/L}$ 和叶黄素 40、60 $\mu\text{mol/L}$ 的终浓度加入到培养瓶中,作用一定时间后,胰蛋白酶消化收集细胞,PBS 洗涤 2 次,进行以下各实验,对照组含有体积分数 1% 的无水乙醇。

1.3.2 单细胞凝胶电泳 实验参照 Singh 等^[2]的方法,简述如下:(1)收集用 30、40 $\mu\text{mol/L}$ 玉米黄素和 40、60 $\mu\text{mol/L}$ 叶黄素终浓度处理 48h、72h 后的 KB 细胞,

PBS 洗涤 2 次后,用 PBS 制成 $3 \times 10^6/\text{ml}$ 细胞悬液;(2)7g/L 正常熔点琼脂 100 μL 均匀铺在磨砂载玻片上,取细胞悬液 5 μL 与 75 μL 37℃ 的 7g/L 的低熔点的琼脂糖凝胶 LMA 混合均匀后,铺在底层胶之上,再于其上铺一层低熔点琼脂凝胶;将玻片浸入新配的碱性细胞裂解液(2.5mol/L NaCl,100mmol/L EDTA,1% 肌氨酸钠,10mmol/L Tris,用前加 1% Triton X-100 和 10%DMSO,pH 为 10)中裂解 1.5h;(3)取出玻片置于碱性电泳液中展开 20min 后,在 25V、300mA 电泳条件下电泳 20min;(4)用 Tris-HCl 缓冲液(pH7.5)中和 3 次后加 100 μL 溴乙锭(2 $\mu\text{g/ml}$)染色,盖上盖玻片在荧光显微镜下测量 DNA 迁移长度(length of migration, μm),每份样品随机观测 40 个细胞。

应用 CASP-Comet Assay Software Project 1.0 软件进行图象分析处理,检测彗星拖尾的尾长,尾 DNA 所占百分比(拖尾 DNA%),以及尾矩(拖尾长度与拖尾 DNA% 的乘积)等指标。

1.3.3 DNA 电泳 收集用 30、40 $\mu\text{mol/L}$ 玉米黄素和 40、60 $\mu\text{mol/L}$ 叶黄素终浓度处理 24、48、72h 后的 KB 细胞,PBS 洗涤 2 次,弃上清;按试剂盒说明书操作提取 DNA。取制备的 DNA 样品,1.2% 琼脂糖凝胶 100mV 电压电泳 1.5h,电泳缓冲液为 TBE。紫外检测仪下观察并摄影。

1.3.4 DNA 倍体分析 细胞周期及细胞凋亡分析:收集用 30、40 $\mu\text{mol/L}$ 玉米黄素处理 24、48、72h 后和 40、60 $\mu\text{mol/L}$ 叶黄素终浓度处理 72h 后的 KB 细胞,PBS 洗涤 2 次,70% 乙醇 4℃ 固定过夜,RNA 酶消化处理,碘化丙啶(PI)染色,用 FACS 流式细胞仪进行检测。每份样品检测 1×10^4 个细胞,进行细胞周期分析。

1.3.5 流式细胞仪测定 p53、bcl-2、bax 基因蛋白的表达。(1)收集用 30、40 $\mu\text{mol/L}$ 玉米黄素和 40、60 $\mu\text{mol/L}$ 叶黄素终浓度处理 48h 后的 KB 细胞,PBS 洗涤 2 次,弃上清;(2)4%(质量分数)多聚甲醛 2ml 室温固定 15min;1000r/min 离心 5min;(3)2ml PBS 重悬细胞,1000r/min 离心 5min,用 1ml 含 0.2%(体积分数)Triton 的 PBS 重悬细胞,4℃ 放置 20min,1000r/min 离心 5min;(4)取 1×10^5 细胞分别加入 100 μL 工作浓度的 P53、Bcl-2、Bax 或 Fas 等小鼠抗人 IgG 单克隆抗体混匀,37℃,30min;PBS 洗 2 次,细胞分别用与 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 100 μL 悬浮,37℃,避光,30min;(5)上机前用 PBS 洗 2 次,经 300 目尼龙网过滤,上机测荧光强度,用空白细胞调零,用没有加鼠抗人单克隆抗体的细胞作阴性对照。以结合 FITC 的荧光强度的高低表示基因产物的表达量。

1.4 数据分析

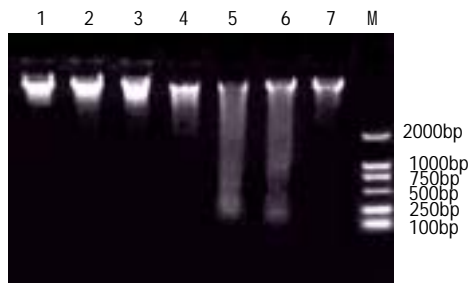
实验数据以均数 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示, 采用 t 检验, 用 Microsoft Excel 处理。

2 结果与分析

2.1 叶黄素和玉米黄素对 DNA 的损伤

表 1、2 列出了 KB 细胞系在受到不同剂量叶黄素和玉米黄素作用后 DNA 单链的初始断裂情况, 结果用 DNA 迁移距离 (μm) 表示。实验表明, DNA 迁移距离都随着叶黄素和玉米黄素作用剂量和作用时间的增加而增大, 呈良好的剂量效应和时间效应关系。而且 $40\mu\text{mol/L}$ 的玉米黄素处理 72h 后 KB 细胞中 DNA 的迁移长度, 比 $40\mu\text{mol/L}$ 的叶黄素处理 72h 后 KB 细胞中 DNA 的迁移长度长, 玉米黄素的作用性较强。

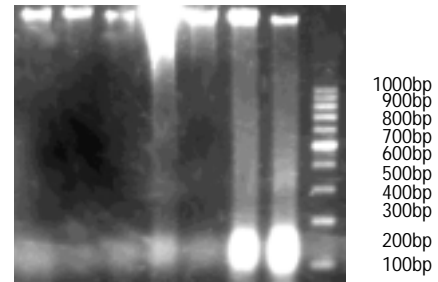
2.2 DNA 凝胶电泳



1、3、5: $30\mu\text{mol/L}$ 分别作用 24、48、72h; 2、4、6: $40\mu\text{mol/L}$ 分别作用 24、48、72h; 7: Control; 8: Marker。

图 1 玉米黄素对 KB 细胞的 DNA 凝胶电泳图

Fig.1 Chart of different concentrations of zeaxanthin on DNA gel electrophoresis



1: Control 8: DNA Marker DL-1000; 2、5、6: $40\mu\text{mol/L}$ 的叶黄素分别作用 24、48、72h; 3、4、7: $60\mu\text{mol/L}$ 的叶黄素分别作用 24、48、72h。

图 2 叶黄素对 KB 细胞的 DNA 凝胶电泳图

Fig.2 Chart of different concentrations of lutein on DNA gel electrophoresis

由图 1、2 可以看出, $60\mu\text{mol/L}$ 叶黄素在作用 KB 细胞 48h 后, 玉米黄素在作用 KB 细胞 72h 后, 开始发生 DNA 断裂, 并形成以 200bp 左右为最小单位的 DNA 梯形电泳图, 处理 72h 后形成的 DNA ladder 明显, $40\mu\text{mol/L}$ 玉米黄素处理 48h 后 DNA 略有断裂, 但形成的 DNA 片段较大。而叶黄素和玉米黄素处理 24h 和实验对照均无 DNA ladder。图 2 显示出随着玉米黄素作用时间的增加 KB 细胞 DNA 断裂明显。但在 72h 处理后, DNA 电泳显示并不与剂量呈正相关。

2.3 细胞周期的影响

KB 细胞经 30 、 $40\mu\text{mol/L}$ 的玉米黄素作用 24、48、72h 和 40 、 $60\mu\text{mol/L}$ 叶黄素作用 72h 后流式细胞仪分析细胞周期见表 3。KB 经玉米黄素和叶黄素处理后, 随

表 1 玉米黄素对人口腔癌细胞 KB 的 DNA 损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=25$)

Table1 Zeaxanthin induced DNA single strand fo break KB cells ($\bar{x} \pm s$, $n=25$)

| 组别 | 浓度 ($\mu\text{mol/L}$) | 时间 (h) | 头长 (μm) | 尾长 (μm) | 全长 (μm) | 头部 DNA (%) | 拖尾 DNA (%) | 尾部 DNA/ 头部 DNA | 尾矩 | Olive 尾矩 |
|-----|-----------------------------|-----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| 对照组 | 0 | 48 | 153 ± 37 | 3.33 ± 0.58 | 156 ± 37 | 99 ± 0.037 | 0.15 ± 0.04 | 0 | 0 | 0.11 ± 0.03 |
| 对照组 | 0 | 72 | 157 ± 59 | 7.8 ± 3.6 | 164 ± 56 | 94.94 ± 2.06 | 5.06 ± 2.06 | 0.05 ± 0.23 | 0.46 ± 0.30 | 3.18 ± 1.43 |
| 1 | 30 | 48 | $85 \pm 15^*$ | $148 \pm 44^*$ | $234 \pm 48^*$ | $62.13 \pm 11.18^*$ | $37 \pm 11^*$ | $0.67 \pm 0.35^*$ | $61 \pm 34^*$ | $34 \pm 18^*$ |
| 2 | 40 | 48 | $88 \pm 17^*$ | $187 \pm 76^*$ | $276 \pm 85^*$ | $62.13 \pm 15.10^*$ | $37 \pm 15^*$ | $0.78 \pm 0.77^*$ | $80 \pm 67^*$ | $41 \pm 35^*$ |
| 3 | 30 | 72 | $82 \pm 13^*$ | $202 \pm 44^*$ | $284 \pm 41^*$ | $60.80 \pm 15.02^*$ | $39 \pm 15^*$ | $0.78 \pm 0.57^*$ | $84 \pm 47^*$ | $43 \pm 26^*$ |
| 4 | 40 | 72 | $103 \pm 25^*$ | $270 \pm 33^*$ | $373 \pm 39^*$ | $53.84 \pm 11.08^*$ | $46 \pm 11^*$ | $0.93 \pm 0.34^*$ | $128 \pm 40^*$ | $65 \pm 19^*$ |

注: $*p < 0.01$, 实验组与对照组相比。

表 2 叶黄素对人口腔癌细胞 KB 的 DNA 损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=25$)

Table 2 Lutein induced DNA single strand fo break KB cells ($\bar{x} \pm s$, $n=25$)

| 组别 | 浓度 ($\mu\text{mol/L}$) | 时间 (h) | 头长 (μm) | 尾长 (μm) | 全长 (μm) | 头部 DNA (%) | 拖尾 DNA (%) | 尾部 DNA/ 头部 DNA | 尾矩 | Olive 尾矩 |
|-----|-----------------------------|-----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| 对照组 | 0 | 48 | 153 ± 37 | 3.33 ± 0.58 | 156 ± 37 | 100 ± 0 | 0.15 ± 0.04 | 0 | 0 | 0.11 ± 0.03 |
| 对照组 | 0 | 72 | 157 ± 59 | 8 ± 4 | 165 ± 56 | 100 ± 2 | 5.06 ± 2.06 | 0.05 ± 0.23 | 0.46 ± 0.30 | 3.18 ± 1.43 |
| 1 | 40 | 48 | $82 \pm 23^*$ | $145 \pm 63^*$ | $228 \pm 69^*$ | $61 \pm 19^*$ | $39 \pm 19^*$ | $0.83 \pm 0.61^*$ | $68 \pm 51^*$ | $36 \pm 26^*$ |
| 2 | 60 | 48 | $86 \pm 2^*$ | $209 \pm 20^*$ | $295 \pm 17^*$ | $45 \pm 15^*$ | $55 \pm 15^*$ | $1.45 \pm 0.69^*$ | $114 \pm 30^*$ | $62 \pm 19^*$ |
| 3 | 40 | 72 | $99 \pm 33^*$ | $209 \pm 49^*$ | $308 \pm 66^*$ | $62 \pm 12^*$ | $38 \pm 12^*$ | $0.67 \pm 0.37^*$ | $83 \pm 41^*$ | $46 \pm 25^*$ |
| 4 | 60 | 72 | $109 \pm 56^*$ | $217 \pm 96^*$ | $326 \pm 107^*$ | $50 \pm 21^*$ | $50 \pm 21^*$ | $1.57 \pm 1.45^*$ | $127 \pm 92^*$ | $77 \pm 54^*$ |

注: $*p < 0.01$, 实验组与对照组相比。

表4 叶黄素和玉米黄素对 bcl-2,bax 和 p53 基因蛋白表达的影响
Table 4 Effect of zeaxanthin and lutein on the gene expression of the KB cell

| 调节基因 | 对照 | 样品 | | | | | | | |
|--------------|-------|-------------|-------|--------------|-------|----------------|------|-----------------|-------|
| | | 叶黄素(μmol/L) | | 玉米黄素(μmol/L) | | 叶黄素:上调(下调)率(%) | | 玉米黄素:上调(下调)率(%) | |
| | | 40 | 60 | 30 | 40 | 40 | 60 | 30 | 40 |
| bcl-2(Mn IX) | 120.5 | 99.9 | 93.2 | 110 | 106.1 | 17.1 | 22.6 | 8.71 | 12.0 |
| p53(Mn IX) | 39.3 | 47.7 | 48.9 | 64.5 | 112.5 | 21.4 | 24.4 | 64.1 | 186.2 |
| bax(Mn IX) | 79.4 | 103.2 | 125.1 | 119.7 | 126.4 | 30.0 | 57.6 | 50.6 | 59.2 |
| bax/Bcl-2 | 0.66 | 1.04 | 1.34 | 1.08 | 1.19 | | | | |

表3 玉米黄素和叶黄素对 KB 细胞细胞周期的影响
Table 3 Effect of different concentrations of zeaxanthin and lutein on cell cycle distribution

| | 时间 (h) | 浓度 (μmol/L) | 细胞周期 | | | PI (%) |
|------|-----------|----------------|--------------------------------|------|-------------------|-----------|
| | | | G ₀ +G ₁ | S | G ₂ +M | |
| 对照 | | 0 | 42.6 | 34.5 | 22.9 | 87.6 |
| | 24 | 30 | 50.8 | 27.4 | 21.8 | 67.8 |
| | | 40 | 57.6 | 27.6 | 14.9 | 58.6 |
| 玉米黄素 | 48 | 30 | 58.2 | 22.5 | 19.3 | 53.9 |
| | | 40 | 57.9 | 22.5 | 19.6 | 54.5 |
| | 72 | 30 | 62.8 | 22.8 | 14.4 | 48.2 |
| 叶黄素 | | 40 | 65.1 | 20.8 | 14.1 | 44.1 |
| | 72 | 40 | 51.4 | 27.4 | 22.0 | 63.2 |
| | | 60 | 57.6 | 26.6 | 16.7 | 51.4 |

时间作用的延长,剂量的增加,和对对照组相比,G₀+G₁期细胞的百分率明显增加,由对照组的S期细胞百分率明显降低,细胞增殖指数(PI)也显著下降,但在DNA组直方图上并没有出现典型的凋亡细胞峰(亚G₁峰)。上述结果表明玉米黄素和叶黄素对KB细胞周期均有明显的影响,阻止细胞由G₁期向S期的转变,并存在时间和剂量的依赖性。S期是细胞DNA的复制期,S期细胞百分率明显降低,意味着细胞DNA的复制受到阻滞使之不能大量的繁殖。说明玉米黄素和叶黄素对KB细胞增殖的抑制,是通过影响细胞DNA的合成,使其向正常细胞转化而实现的。

2.4 叶黄素和玉米黄素对 KB 细胞 bcl-2, bax 和 p53 基因表达产物含量的影响

由表4数据分析可见,叶黄素和玉米黄素组与空白对照组相比,bcl-2的基因表达产物含量显著降低,p53、bax基因表达产物含量明显升高,bax/bcl-2比值明显升高。

3 讨论

类胡萝卜素广泛存在于蔬菜、水果、植物和海洋生物中,日常饮食摄入的类胡萝卜素可使血清类胡萝卜素含量达到1~3μg/ml,其中15%~30%为β-胡萝卜素,其余为α-胡萝卜素、番茄红素、叶黄素、β-隐黄质和玉米黄素。流行病学调查发现,血清类胡萝卜素水平在健康男性和女性中分别比癌症患者高出14%和

5.5%,调查表明,类胡萝卜素对肺癌、宫颈癌、食管癌,喉癌、口腔癌和鼻咽癌有一定的预防作用。

本文从不同的角度研究了玉米蛋白粉中叶黄素和玉米黄素诱导口腔上皮癌细胞KB凋亡的机理。单细胞凝胶电泳(SCGE)技术是一种检测细胞DNA损伤的快速、灵敏的方法。通过测定彗星图像中DNA的迁移长度就可以定量测定DNA的损伤程度,从而确立作用剂量与DNA损伤效应之间的关系。本实验研究表明玉米蛋白粉中叶黄素和玉米黄素能诱导口腔癌KB细胞DNA的损伤,且随着浓度增大对KB细胞DNA的损伤作用愈明显。

细胞凋亡的主要生化标志是内源性核酸内切酶被激活,导致细胞的DNA断裂形成180~200bp的整数倍的DNA片段,本实验中DNA的凝胶电泳显示玉米蛋白粉中叶黄素和玉米黄素作用于KB细胞可引起细胞DNA的断裂,并且这种现象在作用72h时最明显。

流式细胞仪技术分析作用于KB细胞可使G₁期细胞数量明显增多,S期细胞数量明显减少,表明玉米蛋白粉中叶黄素和玉米黄素可诱导S期细胞凋亡。

细胞凋亡是一种主动的受基因调控的细胞自杀过程。大量实验提示:在细胞凋亡中,许多人体基因如bcl-2、p53、C-myc及相关基因bcl2x、bax、bad等参与凋亡的调控^[3~6]bcl-2基因是目前最受关注的一种抑制细胞凋亡的基因,它被看作是细胞凋亡调控的最后共同通路之一^[3],并且这种作用与细胞存在的周期无关。本次实验结果显示KB细胞经叶黄素和玉米黄素处理后,其bcl-2基因的蛋白表达受到明显抑制。其表达率与叶黄素和玉米黄素的浓度呈明显负相关。因此玉米蛋白粉中的叶黄素和玉米黄素抑制了bcl-2基因的蛋白表达而促进了细胞凋亡。

bcl-2能抑制许多抗肿瘤药物诱导细胞凋亡,降低其细胞毒性^[4]。同属一个家族的bax基因功能与bcl-2基因相反。最近的资料提示bcl-2能与几种bcl-2相关蛋白,尤其是Bax形成异二聚体,bcl-2的效应有赖于和bax的相互作用,二者的比值决定细胞接受刺激信号是凋亡还是存活。bax过量表达,细胞凋亡;bcl-2过量表达,细胞存活^[9]。本文的结果表明,用玉米蛋白粉中的叶黄素和玉

米黄素处理 KB 细胞 48h 均可使 bcl-2 基因表达下降;可使 bax 基因的表达明显升高。这些结果表明 bcl-2 基因表达下降和 bax 基因表达升高与细胞凋亡有密切关系,可以推测 bcl-2 的活性可能是由 bax 基因来调节的, bax 基因蛋白通过与 bcl-2 基因蛋白形成 bcl-2、bax 二聚体或与其竞争作用靶位点而拮抗 bcl-2 的作用,导致凋亡的发生^[5]。但在化合物诱导细胞凋亡过程中,还可能其它基因参与了调控,这有待于今后进一步研究。

野生型 p53 基因作为一个抑癌基因广泛存在于正常组织细胞中,在对 DNA 损伤的应答反应中,损伤因子通过诱导 p53,阻断细胞周期,使受损 DNA 得以修复^[6]。p53 蛋白可延长细胞周期,使其停滞在 DNA 复制启动之前或复制之时。如果遭受了不能恢复的损伤,细胞便进入程序化的死亡途径^[7]。本研究发现叶黄素和玉米黄素使 p53 基因表达增高从而诱导口腔癌细胞凋亡。

bax 与抑癌基因 p53 的作用密切相关。选择性诱导 p53 可导致 bax 的表达。大约有一半的 p53 依赖的细胞死亡需要 p53 的参与。本研究发现叶黄素和玉米黄素均能使 p53 基因表达增高的同时也使 bax 基因蛋白表达增高,提示此凋亡途径可能为 bax 参与的 p53 依赖途径。

资料表明, DNA 断裂可引起 p53 蛋白转译水平的提高, p53 蛋白表达暂时性地升高,同时引发 GADD45、MDM2 和 p21WAF/CIP1 等基因地转录增强,所有这些都促使细胞阻滞在 G1 期。本文中用玉米蛋白粉中的叶黄素和玉米黄素处理 KB 细胞,通过单细胞凝胶电泳确定 DNA 受到不同程度的损伤, DNA 断裂的程度呈时间和剂量效应;通过流式细胞仪检测 DNA 周期分布, DNA 左向移行, G1 期数量增多,同时采用流式细胞仪测定基因产物的表达量发现,通过叶黄素和玉米黄素处理 KB 细胞 p53 蛋白转译水平显著增加,因此,可以证明玉米蛋白粉中的叶黄素和玉米黄素能够诱导 KB 细胞凋亡。

玉米是我国传统的农作物,其种植面积已超过 2000 万 hm²,产量超过 1000 亿 kg,占粮食产量的 22.4%,在国民经济的发展中具有举足轻重的地位^[8]。黄玉米中含有丰富的类胡萝卜素主要包括叶黄素、玉米黄素、-隐黄素、-胡萝卜素、-胡萝卜素、新黄素和金莲花黄素等成分。在玉米淀粉的生产中,类胡萝卜素与蛋白质一起被分离,富集于副产物玉米蛋白粉中,用于饲料工业和发酵行业,其中所富含的类胡萝卜素尤其是黄体素和玉米黄素未能得到充分合理的利用。因此,本研究结果不仅有力地证明了叶黄素和玉米黄素是玉米蛋白粉中重要的抗肿瘤的物质基础,也为深度开发利用玉米黄水浆,减少环境污染奠定了基础。

参考文献:

- [1] 孙震,姚惠源. 玉米蛋白粉中玉米黄素抑制口腔鳞癌细胞株 KB 增殖的研究[J]. 食品与生物技术, 2005, 24(6): 34-37.
- [2] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. Simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells[J]. *Exptl Cell Res*, 1988, 175: (1): 184-189.
- [3] Shinichi T, Takaaki S, Stanislaw K, et al. Cloning and functional analysis of BAG-1: A novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity[J]. *Cell*, 1995, 80(2): 279-284.
- [4] Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line[J]. *Blood*, 1993, 81(1): 151-157.
- [5] 李勇,潘立峰,赵群,等. 化疗药物诱导人胃癌细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 基因蛋白表达变化的研究[J]. 河北医科大学学报, 2001, 22(3): 163-165.
- [6] Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingam S, et al. Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression[J]. *Science*, 1992, 256: 827-830.
- [7] Canman CE, Gilmer TM, Coutts SB, et al. Growth factor modulation of p53-mediated growth arrest versus apoptosis[J]. *Genes Dev*, 1995, 9(5): 600-611.
- [8] 蔡同一,赵文娟. 玉米深加工及其综合利用[J]. 食品科学, 2000, 21(1): 6-8.

信息

英国推出可完全生物降解的矿泉水瓶

英国矿泉水厂商 Belu 日前推出首款由可完全生物降解的塑料制成的饮料瓶,并称这种新产品对保护地球环境意义重大。

据西班牙《世界报》5月30日援引英国媒体的报道说,这种环保饮料瓶以玉米为原料,能在12个月内完全降解,并可回收用来生产肥料。Belu 是一家由致力于环境保护的英国企业和名人新成立的公司,其全部收入归英国慈善组织“水援助”所有,用于发展中国家打水井。该公司发言人马伊·西蒙森日前表示,之所以研发这种新产品,是为了响应联合国关于企业界应增加对环保投入的号召。他认为,这种新型饮料瓶的研发成功,将刺激市场对生物降解材料制品的需求,对保护地球环境意义重大。