

北京早园竹叶不同提取组分对 CHO 细胞 Akt 信号通路的影响

梅 晶, 祖桂芳, 赵晓红*, 何 颖, 孙 健
(北京联合大学应用文理学院, 北京 100191)

摘 要: 通过比较北京早园竹叶提取物中的主要活性组分黄酮苷类、酚酸类及总提取物 3 个组分对中国仓鼠卵巢细胞(CHO)的增殖、凋亡及 Akt 信号通路作用差别, 考察竹叶提取物对正常细胞可能产生有害作用的活性组分。采用 MTT 法检测细胞增殖作用、Annexin V-FITC/PI 双染流式法测细胞凋亡、In Cell Analyzer 1000 活细胞图像分析系统测定 Akt 信号通路的活化。结果显示: 1) 50~400 $\mu\text{g/mL}$ 范围内 3 种组分对细胞存活率的影响无明显变化, 当质量浓度 $\geq 800 \mu\text{g/mL}$ 时细胞增殖率明显下降($P < 0.05$), 细胞毒性作用明显, 且以酚酸类组分作用最强; 2) 不同组分的竹叶提取物在 200~800 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与空白组比较均可降低细胞凋亡率($P < 0.05$), 但总提取物和黄酮苷类在质量浓度为 1600 $\mu\text{g/mL}$ 时本身可诱导 CHO 细胞的凋亡增加, 差异显著($P < 0.05$), 且以黄酮苷类诱导的细胞凋亡率最高, 达 14.21%; 3) 与对照组比较, 黄酮苷类在 100~800 $\mu\text{g/mL}$ 剂量条件下, 对 Akt 的活性无明显影响, 总提取物在 400、800 $\mu\text{g/mL}$ 时 Akt 的激活率明显增加($P < 0.01$), 而酚酸类在 100~800 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 随剂量增加, 激活率增高, 呈明显的剂量-反应关系($r=0.996$, $P < 0.01$)。由此可见 3 种不同提取物组分对 CHO 细胞的作用是有差别的, 其中酚酸类可能是产生有害作用的主要组分。

关键词: 竹叶提取物; 黄酮苷类; 酚酸类; 细胞增殖; 细胞凋亡; Akt 通路; 中国仓鼠卵巢细胞

Effects of Different Components Extracted from *Phyllostachys praecox*. C.d. Chu et C.S. Chao Leaves Grown in Beijing on Akt Signaling Pathway in CHO Cells

MEI Jing, ZU Gui-fang, ZHAO Xiao-hong*, HE Ying, SUN Jian
(College of Applied Arts and Sciences, Beijing Union University, Beijing 100191, China)

Abstract: The effects of the crude ethanol extract of *Phyllostachys praecox*. C.d. Chu et C.S. Chao leaves grown in Beijing and its major active components, flavoneglycosides and phenolic acids, on the proliferation, apoptosis and Akt signaling pathway of Chinese hamster ovary (CHO) cells were compared to investigate whether the crude ethanol extract has the potential to produce active components harmful to normal cells. The proliferation, apoptosis and Akt signaling pathway activation of CHO cells were measured by MTT assay, Annexin V-FITC/PI double-staining flow cytometry and In cell Analyzer 1000, respectively. The results showed that: 1) the crude ethanol extract and its components had no obvious effect on the viability of CHO cells at doses ranging from 50 to 400 $\mu\text{g/mL}$. the proliferation rate significantly decreased at doses $\geq 800 \mu\text{g/mL}$ ($P < 0.05$) and distinct cytotoxicity was observed and the phenolic acid fraction revealed the strongest cytotoxicity; 2) all the tested samples significantly decreased apoptosis in CHO cells at doses between 200 and 800 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.05$). However, the crude ethanol extract and its flavoneglycoside fraction exhibited apoptosis-inducing effect at the dose of 1600 $\mu\text{g/mL}$ with a significant difference ($P < 0.05$) and the latter resulted in higher apoptosis rate, 14.21%; 3) the flavoneglycosides had little effect on Akt signaling pathway activation at doses ranging from 100 to 800 $\mu\text{g/mL}$ compared with the control, but Akt signaling pathway activation increased significantly in the presence of the crude extract at the doses of 400 $\mu\text{g/mL}$ and 800 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.01$). Akt signaling pathway activation increased in a significant dose-effect fashion along with the increasing dose of the phenolic acids ($P < 0.01$). From these results, it can be concluded that the crude ethanol extract and its two fractions have different effects on CHO cells and that the phenolic acid fraction may consist of major toxic components.

Key words: bamboo leaf extract; flavoneglycosides; phenolic acids; cell proliferation; apoptosis; Akt signaling pathway; CHO cells

收稿日期: 2011-01-12

基金项目: 北京市自然科学基金项目(7092015); 北京联合大学学生课外科技学术作品项目

作者简介: 梅晶(1984—), 女, 硕士研究生, 主要从事生物活性物质的功能与毒理学研究。E-mail: jing_m2008@126.com

* 通信作者: 赵晓红(1961—), 女, 研究员, 博士, 主要从事生物活性物质的功能与毒理学研究。E-mail: xiaohong@ygi.edu.cn

中图分类号: Q946; R994.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)03-0248-04

我国竹子资源丰富,但绝大部分尚未得到充分的开发利用。早园竹作为主要的观赏竹类,在北京各处均有分布,具有一定的开发应用价值。竹叶黄酮是从竹叶中提取出来的具有生理活性的生物黄酮,包括黄酮类、内酯类和酚酸类化合物,是一组复杂而又具有相互协同增效作用的混合物^[1]。许多研究已证明竹叶提取物具有较强的抗自由基、抗氧化、抗衰老、抗菌、抗病毒及保护心脑血管、防治老年退行性疾病等生物学功效^[2-4]。植物提取物对健康具有有益和有害的双重作用,目前的研究更多关注的是其有益的生理作用,而对植物提取物可能的不良作用研究资料比较少见。我们的前期工作以北京早园竹为材料,初步提取和分离出竹叶中的主要活性组分为黄酮类和酚酸类化合物,并观察总提取物和这两个组分对细胞增殖的影响和抗 H₂O₂ 诱导的 DNA 损伤作用,研究发现不同组分在低剂量范围内都具有促进细胞增殖作用并具有抗 H₂O₂ 诱导的 DNA 损伤作用,也发现不同组分在较低剂量下呈现一定的 DNA 损伤作用,以黄酮类的作用效果最为明显^[5]。竹叶提取物中是哪些组分发挥主要的生物活性作用、其作用机制如何,有待于深入研究。

磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI-3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB),简称 PI3K/Akt。PI3K/Akt 信号通路是参与细胞生长、增殖、分化调节的信号转导通路。其中 Akt 是 PI3K 信号转导途径中一个重要的下游靶激酶。把 Akt 作为分子靶点筛选活性物质,可直接揭示化合物与靶点之间的作用机制^[6]。研究表明,PI3K/Akt 通路的异常激活是多种人类癌症的突出特征。Akt 在大多数肿瘤中表现为过度活化,因此被认为是一个极有意义的癌症治疗靶点^[7]。研究证明生物活性物质,如白藜芦醇可通过抑制 Akt 信号通路和下游靶分子抑制人类肿瘤细胞的增殖^[8],而活性物质对正常细胞的 Akt 信号通路是否也有影响尚未见报道。因此本课题选择竹叶提取物的 3 种不同组分分别作用于 CHO 细胞,观察其对细胞增殖、凋亡及 Akt 信号通路的影响并比较其作用差别,为进一步开展活性物质有益及有害作用的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

CHO-Akt-EGFP 细胞株,由美国 GE 公司提供。

竹叶提取物制备^[9]:采集新鲜竹叶(北京鹰山国家森林公园)经晾干、粉碎、过 80 目筛后,称取 400g 竹粉,用 80% 乙醇,温度 70℃,料液比为 1:15,提取时间为 120min,提取两次,合并提取液,旋转蒸发仪蒸至无乙醇味,冻干,得竹叶粗提取物 54.5g,作为总提取物

组。将总提取物重新溶水、SP825 大孔树脂过柱,依次用 10%、30%、60% 的乙醇水溶液洗脱,干燥,用高效液相色谱(HPLC)分析并获得黄酮苷类组分和酚酸类组分样品。在 10% 乙醇洗脱液中主要为酚酸类,含量约 0.31%,作为酚酸类组;30% 乙醇洗脱液中主要为 C- 黄酮苷类,含量约 5%,作为黄酮苷类组;60% 乙醇洗脱液中未检测到明显活性成分,不再进一步使用。所得到的竹叶总提取物和不同组分分别用去离子水配成质量浓度为 5000mg/L 的母液(加样前稀释)。

F-12 培养基、新生小牛血清(NBS) 美国 Gibco 公司;青链霉素(PS)、胰蛋白酶(0.25% Trypsin) 美国 Invitrogen 公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT) 美国 Amresco 公司;细胞凋亡检测试剂盒 北京宝赛公司;胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、渥曼青霉素(Wortmannin) 美国 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

超净工作台 北京百剑空气净化设备厂;Forma 3110 系列 CO₂ 培养箱 美国 Thermo Electron 公司;TE2000-M 倒置显微镜 日本 Nikon 公司;MLS-3750 型高温蒸汽灭菌器 日本 Sanyo 公司;5840R 冷冻离心机 德国 Eppendorf 公司;MQX200 微板分光光度计 美国 Bio-Tek 公司;FACSCalibur 流式细胞仪 美国 BD 公司;IN Cell Analyzer 1000 活细胞成像系统 美国 GE 公司。

1.3 方法

1.3.1 MTT 法检测细胞增殖

将 CHO 细胞以 5×10^4 个/mL 接种于 24 孔培养板,培养 24h 后用 D-Hanks 液洗 3 次,加入 0、50、100、200、400、800、1600 μ g/mL 竹叶提取物组分,每个质量浓度设 3 个平行样,培养 20h,弃上清,每孔加入 0.9mL 无血清培养液和 0.1mL MTT(5mg/mL),继续培养 4h,离心 10min,弃上清,每孔加入 DMSO 1mL,振荡待其充分溶解后,于 96 孔培养板中每孔加入 100 μ L,每孔设 3 个平行,测 OD_{570nm} 值,按公式(1)计算细胞增殖率,其中零加药组为溶剂对照组,空白组为不加细胞的溶剂对照组。

$$\text{细胞增殖率} / \% = \frac{\text{OD}_{\text{加药}} - \text{OD}_{\text{空白}}}{\text{OD}_{\text{零加药}} - \text{OD}_{\text{空白}}} \times 100$$

1.3.2 流式细胞仪检测细胞凋亡

将 CHO 细胞以 5×10^4 个/mL 接种于 6 孔培养板,培养 24h 后加入 0、200、400、800、1600 μ g/mL 的竹叶提取物的总提取物、酚酸类及黄酮苷类组分,继续培养 18h,胰酶消化收集细胞,4℃ 预冷 PBS 洗两次,重悬于 300 μ L Binding Buffer 中,参照宝赛公司试剂盒操作方

法进行 Annexin V-Cy5 与碘化丙啶(PI)双染,用 FACS Calibur 流式细胞仪对进行凋亡检测,计算细胞凋亡率。

1.3.3 IN Cell Analyzer 1000 检测 Akt 通路

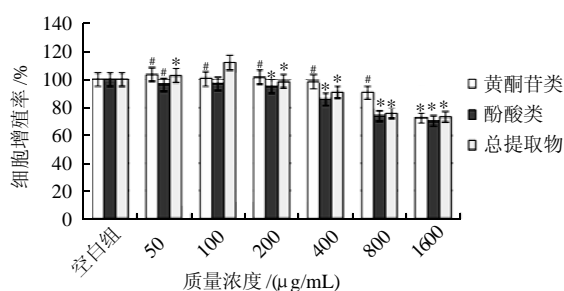
将处于对数生长期的稳定转染了 GFP-Akt 的 CHO 细胞接种到 96 孔板上,每孔 200 μL ,细胞浓度为 5×10^4 个/mL,先室温培养 1h,再置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱 24h,弃去上清,用检测培养基洗涤,于 150 μL 检测培养基室温培养 1h,每孔加入 50 μL 的待测样品,同时设空白对照组(加不含血清培养基)对绿色荧光细胞进行实时拍照,拍照间隔为 30min,连续取像 24h。选用 Plasma Membrane Spot Analysis Module 分析模板对图像进行分析,以荧光细胞占有所有细胞的百分比值,即激活率(%)来反映 Akt 通路激活的情况。

1.4 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS12.0 进行数据分析,不同处理与对照组比较采用单因素方差分析(ANOVA)中的 Dunnett 检验,多组均数比较采用单因素方差分析及多重比较 LDS 方法。

2 结果与分析

2.1 竹叶提取物不同组分对 CHO 细胞增殖的影响



#.与相同质量浓度总提取物比较,有显著性差异($P < 0.05$);

*.与空白组比较,有显著性差异($P < 0.05$)。下同。

图1 不同竹叶提取物作用24h对CHO细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.1 Effects of bamboo leaf extracts on CHO cell proliferation ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

由图1可知,作用时间为24h时低质量浓度的总提取物组分的细胞增殖率略高于黄酮苷类和酚酸类,而在较高质量浓度时,黄酮苷类组分的细胞增殖率均高于总提取物组分和酚酸类组分。在各质量浓度下,均以酚酸类组分的细胞增殖率最低,说明不同竹叶提取物组分对细胞增殖的影响作用不同,以酚酸类组分的细胞毒性作用最强。观察受试物不同剂量对细胞增殖的影响,结果可见在50~400 $\mu\text{g/mL}$ 范围内对细胞存活的影响不明显,当质量浓度 $\geq 800 \mu\text{g/mL}$ 时细胞增殖率明显下降($P < 0.05$),显示明显的细胞毒性作用,说明竹叶提取物的细胞毒性作用较低。

2.2 不同提取物对细胞凋亡的影响

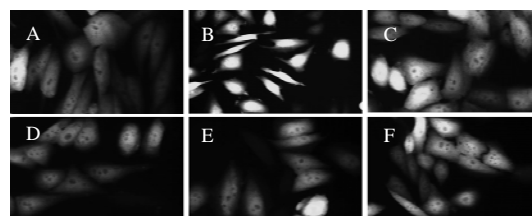
表1 竹叶提取物不同成分对CHO细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 1 Effect of bamboo leaf extracts on CHO cell apoptosis($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

质量浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	凋亡率/%		
	总提取物	黄酮苷类	酚酸类
空白组	6.59 ± 0.12	6.59 ± 0.06	6.59 ± 0.05
200	$1.72 \pm 0.15^*$	$2.30 \pm 0.10^{*#}$	$1.46 \pm 0.10^*$
400	$1.67 \pm 0.02^*$	$3.64 \pm 0.04^{*#}$	$3.63 \pm 0.13^{*#}$
800	$5.55 \pm 0.1^*$	$3.48 \pm 0.21^{*#}$	$4.98 \pm 0.69^*$
1600	$9.73 \pm 0.02^*$	$14.21 \pm 0.25^{*#}$	$5.29 \pm 0.07^{*#}$

由表1可见,不同组分的竹叶提取物在200~800 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与空白组比较均可降低细胞凋亡率($P < 0.05$),总提取物和黄酮苷类在质量浓度为1600 $\mu\text{g/mL}$ 时可诱导CHO细胞的凋亡明显增加,与空白组比较有显著差异($P < 0.05$)。3种不同组分诱导细胞凋亡的作用不同,高剂量组以黄酮苷类诱导的细胞凋亡率最高,达14.21%。由此可见,竹叶提取物不同组分在低质量浓度下能抑制CHO细胞凋亡,但在毒性剂量下可诱导细胞凋亡率增加。

2.3 竹叶提取物对CHO细胞Akt激活影响

CHO细胞以 5×10^4 个/mL铺板,培养24h后加入不同质量浓度的提取物,培养24h,同时设Akt激活剂IGF-1(2 $\mu\text{g/mL}$)、抑制剂Wortmannin(500ng/mL)作为对照,Akt激活的细胞图像见图2。分析不同质量浓度竹叶提取物组分荧光细胞占有所有细胞的百分比值。所得激活率见图3。



A.空白组; B.IGF-1(对照组); C.Wortmannin(对照组); D.总提取物(200 $\mu\text{g/mL}$); E.黄酮苷类(200 $\mu\text{g/mL}$); F.酚酸类(200 $\mu\text{g/mL}$)。

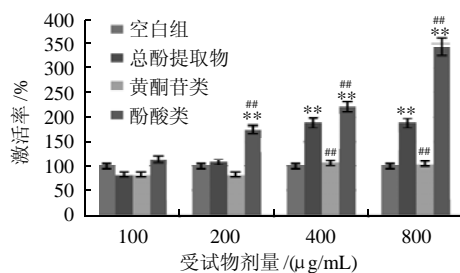
图2 不同竹叶提取物组分对CHO细胞Akt的激活作用

Fig.2 Akt signaling pathway activation in CHO cells by different concentrations of bamboo leaf extracts

由图2可见,当加入激活剂IGF-1后,细胞形态没有变化,但边缘明显变亮,Akt蛋白被激活,从胞质聚集到细胞膜上,而抑制剂Wortmannin作用后细胞没有明显变化,说明实验方法可行。与空白组比较,加入不同提取物组分后CHO细胞边缘略有变亮,以酚酸类最明显,但对细胞形态无明显影响。通过统计荧光颗粒的数量及面积用激活率表征Akt的活化水平。

由图3可见,与空白组比较,在受试剂量下,黄酮苷类对Akt的活性无明显影响,总提取物在400、800 $\mu\text{g/mL}$ 时Akt的激活率明显增加($P < 0.01$),而酚酸类在100~800 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,随剂量增加,激活率增高,呈明

显的剂量-反应关系($r=0.996$, $P<0.01$)。比较3种不同提取物组分对加Akt激活的影响,可见酚酸类的作用最明显,总提取物的增高与其含酚酸类物质相关,由此说明,不同竹叶提取物组分对CHO细胞Akt活性的影响不同。



**与空白组比较,差异极显著($P<0.01$);

##与总提取物比较,差异极显著($P<0.01$)。

图3 不同竹叶提取物组分对CHO细胞Akt激活的影响

Fig.3 Activation rates of different concentrations of bamboo leaf extracts on Akt signaling pathway in CHO cells

3 讨 论

细胞凋亡是机体生长、分化、发育和病理过程中由基因编码调控的细胞主动自杀过程,正常的细胞凋亡在维持生物机体细胞增殖与死亡的平衡过程中起重要作用,但异常的细胞凋亡是某些重要疾病发病的重要原因,因此细胞凋亡是当前生命科学研究中最热门的领域之一^[10]。本研究结果表明竹叶提取物的3种组分对正常细胞的凋亡没有明显影响。

高通量筛选评价系统是目前新兴的细胞组学研究的一个重要技术手段,可应用于细胞内目标分子核转移、靶蛋白表达、报告基因表达、受体激活等方面的研究^[11-12]。IN Cell Analyzer 1000活细胞图像分析系统将荧光共聚焦细胞成像系统和全自动图像分析系统整合,实时检测受试物对细胞的作用,且可得到整个细胞群和单个细胞的具体数据。由于绿色荧光蛋白(GFP)容易被荧光显微镜跟踪检测的特性,在信号转导通路研究和细胞筛选中适合作为报告标记因子。当筛选化合物作用于不同的稳定表达GFP融合蛋白的细胞时,不同的GFP融合蛋白呈现出与活性反应相关的转运,因此可用于评价与确认活性物质对细胞内相应信号通路的影响与作用^[13]。

PI3K/Akt是一条重要的维持细胞生存的信号通路,能刺激细胞增殖并抑制细胞凋亡。生理状态下,Akt蛋白以低活性(失活状态)存在于细胞浆。当其暴露于各种刺激因素如生长因子缺乏、紫外线照射或DNA损伤等时,Akt蛋白从细胞质转移至细胞膜并获得催化活性。CHO-AKT-EGFP中的Akt-EGFP在未受到刺激时,绿色荧光呈弥散分布,受刺激后Akt蛋白活化,Akt-EGFP

迅速转移到细胞膜上形成高亮度的荧光颗粒,通过统计这种荧光颗粒的数量及面积就可以表征Akt的活化水平^[6-14]。本实验采用IN Cell Analyzer 1000系统中的稳定细胞株CHO-Akt-EGFP作为细胞模型,以竹叶总提取物,经过分离的黄酮苷类以及酚酸类为实验材料研究了竹叶提取物对CHO细胞的细胞毒性作用、凋亡诱导作用和刺激Akt蛋白活化的作用,结果显示,3种不同组分对细胞的影响不同,由于酚酸类组分的细胞毒性作用比较强,因此导致其激活Akt蛋白的作用也最强。而对细胞增殖的影响在 $<1600\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下没有明显差异。

植物化学物质毒性作用评价及其机制研究是保健食品风险评估与安全性保障的基础,而目前更多关注的是其有益的生物活性作用,大多数研究报道主要是针对植物总提取物和不同组分的研究,但单体物质毒性作用特点与提取物间可能存在较大差异,因此需要对这些组分中的主要单体物质进行进一步的研究,用活细胞成像系统进行动态观察,以明确其作用时间及特点,为竹叶活性物质的开发与应用提供基础数据。

参考文献:

- [1] 张英.天然功能性竹叶提取物:竹叶黄酮[J].中国食品添加剂,2002(3):54-58.
- [2] 郭雪峰,岳永德,孟志芬,等.用清除羟自由基法评价竹叶提取物抗氧化能力[J].光谱学与光谱分析,2010,30(2):508-511.
- [3] 刘璇,米生权,张宇轩,等.北京早园竹叶提取物的抗氧化活性研究[J].环境与健康杂志,2009,26(3):239-241.
- [4] 付晓春,李少鹏,王希,等.竹叶提取物对缺氧/复氧心肌细胞的保护作用[J].现代食品与药品杂志,2006,16(1):18-21.
- [5] 单梁,肖乐乐,赵晓红,等.北京早园竹叶有机提取物对细胞DNA断裂损伤的保护与修复作用[J].环境与健康杂志,2011,28(2):118-121.
- [6] 王维,张珊.PI3K/Akt信号转导通路的研究进展[J].现代医药卫生,2010,26(7):1051-1052.
- [7] LINDSLEY C W. The Akt/PKB family of protein kinases: a review of small molecule inhibitors and progress towards target validation: a 2009 update[J]. Curr Top Med Chem, 2010, 10(4): 458-477.
- [8] SHAKIBAEI M, HARIKUMAR K B, AGGARWAL B B. Resveratrol addiction: to die or not to die[J]. Mol Nutr Food Res, 2009, 53(1): 115-28.
- [9] 祖桂芳,彭辉,赵晓红.北京早园竹叶活性成分的分离与鉴定[J].食品工业科技,2009,30(12):123-125;129.
- [10] DAGHER Z, GARÇON C, BILLET S, et al. Role of nuclear factor-kappa B activation in the adverse effects induced by air pollution particulate matter (PM2.5) in human epithelial lung cells (L132) in culture[J]. Appl Toxicol, 2007, 27(3): 284-290.
- [11] WOLFF M, WIEDENMANN J, NIENHAUS G U, et al. Novel fluorescent protein for highcontent screening[J]. Drug Discov Today, 2006, 11(23/24): 1054-1060.
- [12] GOUGH A H, JOHNSTON P A. Requirements, features, and performance of high contentscreening platforms[J]. Methods Mol Biol, 2007, 356: 41-61.
- [13] 李韶菁,杜冠华.细胞水平的高通量药物筛选技术研究进展[J].中国药学杂志,2008,43(2):84-87.
- [14] HENSHALL D C, ARAKI T, SCHINDLER C K, et al. Activation of bcl-2 associated death protein and counter-response of Akt within cell populations during seizure-induced neuronal death[J]. Neurosci, 2002, 22(19): 8458-8465.