

醌还原酶法进行芥蓝抗癌活性的快速检测

张海峰 向珣 王平 汪俏梅*

(浙江大学园艺系, 农业部园艺植物生长发育与生物技术重点开放实验室, 杭州 310029)

摘要 研究了不同提取方法, 不同细胞裂解剂和醌还原酶(QR)反应液的培育时间对 QR 法分析的影响。结果表明, 芥蓝组织用磷酸缓冲液(5 mmol/L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 , 1 mmol/L EDTA, pH 7.6)提取效果良好, 与常用的三元试剂提取法效果相当。这种方法简单而有效, 优于其他有机溶剂提取法。0.4% 乙基苯基聚乙二醇(NP40)可以替代细胞裂解剂——0.8% 毛地黄皂苷用于 QR 分析, 且效果良好, QR 反应中反应液的培育时间以 5~10 min 为宜。

关键词 醌还原酶法; 芥蓝; 抗癌活性

芥蓝是一种我国特产的十字花科芸薹属甘蓝类蔬菜, 以花薹为主要食用器官。对芥蓝食用器官的芥子油苷组分分析表明, 芥蓝中含多种芥子油苷组分, 特别是含丰富的萝卜硫苷(glucoraphanin)^[1,2]。萝卜硫苷的降解产物萝卜硫素(sulforaphane)具有很强的抗癌功效^[3]。醌还原酶(quinone reductase, QR)是致癌代谢中一种主要的阶段 2 诱导酶, 可使阶段 1 酶产生的活化中间产物解毒而形成解毒产物。各种抗癌化合物一般通过诱导 QR 等酶而发挥抗癌作用, 因此 QR 活性可作为衡量抗癌活性的指标之一。QR 法就是利用通常不产生 QR 活性的小鼠肝癌细胞 Hepa1c1c7 进行动物细胞培养, 再用各种植物提取液诱导培养在酶标板各孔中的肝癌细胞, 使其产生醌还原酶活性, 并通过一系列连续的氧化还原反应使染料物质四甲基偶氮唑蓝变为还原态而变色发生显色反应, 通过酶标仪测定酶标板各孔中的吸光度来计算 QR 活性。我们研究了植物提取方法、细胞裂解剂和 QR 反应时间等对 QR 法测定结果的影响, 发展了一种简便可行、经济快速的芥蓝抗癌活性分析方法。

1 材料与方 法

1.1 化学试剂

NADP、FAD、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、甲萘醌、6-磷酸葡萄糖、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、胎牛血清购于 Sigma 公司, 毛地黄皂苷(digitonin)购于 Roche 公司, 其他试剂为分析纯或细胞培养级别。

1.2 植物材料

将新鲜采收的芥蓝可食部分花薹(包括嫩茎叶)切成 1 cm 长大小, 混匀后称取 500 g 鲜重样品在液氮中冷冻后, 在 -70 °C 下制成冷冻干燥样品, 并研磨成粉末状贮藏于 4 °C 下聚乙烯封口袋中待用。样品在冷冻干燥前后分别称重以计算鲜 / 干重比。

1.3 提取方法

(1)取 20 mg 冻干粉用 1 ml 乙腈 4 °C 下浸提 24 h, 浸提液过滤后于低于 40 °C 的温度下在旋转蒸发器中蒸发干燥, 干燥产物溶于 50 μ l 乙腈后置于 -20 °C 待用。(2) 20 mg 冻干粉加 0.4 ml 水在 1.5 ml 离心管中用微型电动聚乙烯匀浆器匀浆后在室温中放置 1 h, 加入 0.6 ml 热的 70% 甲醇在 70 °C 下提取 15 min, 自然冷却至室温后 16 000 g 离心 10 min, 取上清液置于 -20 °C 待用。(3) 20 mg 冻干粉以 100 μ l 水在 1.5 ml 离心管中用微型电动聚乙烯匀浆器匀浆后, 定容至 1 ml, 16 000 g 离心 10 min, 取上清液置于 -20 °C 待用。(4) 20 mg 冻干粉以 100 μ l 磷酸浸提缓冲液(5 mmol/L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 , 1 mmol/L EDTA, pH 7.6)在 1.5 ml 离心管中用微型电动聚乙烯匀浆器匀浆后, 定容至 1 ml, 16 000 g 离心 10 min, 取上清液置于 -20 °C 待用。(5) 20 mg 冻干粉用 1 ml 有机三元提取液(二甲基亚砜、二甲基甲酰胺和乙腈等体积混合)匀浆后, 在 -50 °C 下浸提 1

收稿日期: 2005-07-21 接受日期: 2005-09-15

国家自然科学基金(No. 30320974)、人事部留学回国择优资助课题、浙江省自然科学基金(No. R304103)和浙江省科技计划项目(No. 2004C32014, No. 2005C30012)资助

* 通讯作者。0571-85909333, Fax: 0571-87420554, E-mail: qiaomeiw@zju.edu.cn

h, 再以 16 000 g 离心 10 min, 取上清液置于 -20 °C 待用。

1.4 小鼠肝癌细胞的诱导

小鼠肝癌细胞 Hepa1c1c7 培养在一个恒温的 CO₂ (CO₂ 浓度 5%) 培养箱中, 箱内温度 37 °C, 培养基为加了 10% 胎牛血清(FCS)的基本培养基。为测定植物提取液的 QR 诱导潜能, 将小鼠肝癌细胞培养在 96 孔板上, 每个孔中培养 10 000 个细胞, 待生长 24 h 后, 加入含有连续稀释的待测提取液的新鲜培养基进行诱导, 再培养 24 h。通常将 20 μl 的各种提取液以培养基稀释至 4 ml, 并配制成系列两倍稀释液。最终注入到每个孔中的培养基为 200 μl, 其中提取液溶剂的浓度是 0.5%。对于三元提取液, 我们还在每个孔中加入了终浓度为 0.5 mmol/L 的抗坏血酸和 0.003 个单位的葡萄糖硫苷酶(Sigma)以使芥子油苷水解完全。

1.5 醌还原酶活性的检测

小鼠肝癌细胞在含有植物提取液的培养基中培养 24 h 后, 可进行醌还原酶活性分析。首先将细胞培养基轻轻倒出, 然后在每个孔中加入 50 ml 的细胞溶解液, 分别为(1) 0.8% 毛地黄皂苷, 2 mmol/L EDTA, pH 7.8, 或(2) 0.4% 的乙基苯基聚乙二醇进行细胞裂解。细胞在 37 °C 下裂解 10 min 后, 在室温下将 96 孔板置摇床中 100 r/min 震荡 10 min, 然后在每个孔中加入 200 μl QR 分析试剂进行检测 QR 活性分析。QR 分析试剂的配方为: 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 1 mmol/L 6-磷酸葡萄糖, 50 mmol/L 甲萘醌, 30 mmol/L NADP, 5 mmol/L FAD, 0.07% 胎牛血清, 0.03% MTT, 0.01% 吐温 20 和每毫升 2 单位的酵母葡萄糖 6 磷酸脱氢酶。反应混合物分别在室温下培育 5、10、15 min 后加入 50 μl 0.1 mol/L HCl 终止反应。每一个 96 孔微量滴定板设一排(8 孔)零时间对照, 在加入 QR 分析试剂前加入反应终止液。在酶标仪(Thermo MK3 型)中测定 96 孔板反应液在 595 nm 时的吸光度。各处理组 8 个孔的吸光度的平均值需扣除零时间对照组 8 个孔吸光度的平均值。细胞密度测定采用龙胆紫染色法, 在 490 nm 确定吸光度^[4]。植物提取物诱导 QR 的潜能分别以处理组在 595 nm 吸光度与未处理组的相应吸光度的比值(QR 活性); 或以每克鲜重或干重的 QR 活性诱导单位数表示, 其中特异 QR 活性为 QR 活性与该浓度下的细胞密度的比值。一个 QR 诱导活性单位定义为在一个含有 200 μl 细胞培养基

的微量滴定板孔中能够使特异 QR 活性加倍所需的植物材料的量。

2 结果与讨论

芥蓝中含一些种类的甲基亚磺酰烷基芥子油苷, 特别是含丰富的萝卜硫苷, 这些芥子油苷的降解产物甲基亚磺酰烷基异硫代氰酸盐是哺乳动物阶段 2 解毒酶(如 QR 和谷胱甘肽硫转移酶)的有效诱导剂。在本实验中我们采用常规的三元提取法, 根据我们原来在拟南芥中发展的 QR 法^[4,5], 检测了芥蓝提取液在培养的小鼠肝癌细胞中诱导 QR 活性的潜能, QR 比色分析表明芥蓝花茎中含可检测的阶段 2 酶诱导剂的水平(图 1)。在诱导浓度为 4 mg/ml 培养基的浓度下, QR 活性达到最高值(4.65), 随着诱导浓度的增加, 特别是大于 2 mg/ml 之后, 细胞密度逐渐降低, 表现出一定的细胞毒性。在诱导浓度为 8 mg/ml 时, QR 特异活性达到最高值(5.36)(图 1)。

为了进一步简化实验程序, 减低检测成本, 我们对 QR 法进行了改进。目前关于 QR 法中植物提取液的制备有各种方法, 最常见的是有机溶剂提取法, 既有采用单一一种有机溶剂(如乙腈或甲醇)提取的^[6,7], 也有采用几种有机溶剂(如三元试剂)提取的方法^[8], 这些有机溶剂大部分有毒, 并且提取时需要高温(如甲醇 70 °C)或低温条件(如三元试剂 -50 °C)。由于三元试剂可以使葡萄糖硫苷酶失活, 使用这一试剂提取, 并人为补充葡萄糖硫苷酶进行 QR 分析, 可以精确分析来源于芸薹属植物的芥子油苷的 QR 诱导活性^[8]。由于芥子油苷有很好的水溶性, 因此在本实验中, 我们设计了直接用水或 pH 7.6 的磷酸缓冲液进行提取。因为在组织匀浆过程中, 葡萄糖硫苷酶催化的芥子油苷的降解过程在中性条件下有利于异硫代氰酸盐的生成, 在酸性条件下则有利于乙腈的生成。通过比较几种不同的提取方法的效果, 我们发现用磷酸缓冲液提取法测定的 QR 诱导活性与三元试剂法提取测定的结果相当(表 1), 因此, 磷酸缓冲液提取法是一个非常理想的方法, 简便安全、快速有效。

QR 法测定的成本较高, 主要在于使用的细胞裂解剂毛地黄皂苷非常昂贵, 所以我们尝试用较为廉价的 NP40 进行替代, 结果表明是可行的, 两种方法测定的 QR 诱导活性没有显著差异(表 2)。此外, 我们还实验了不同的 QR 反应液培育时间对测

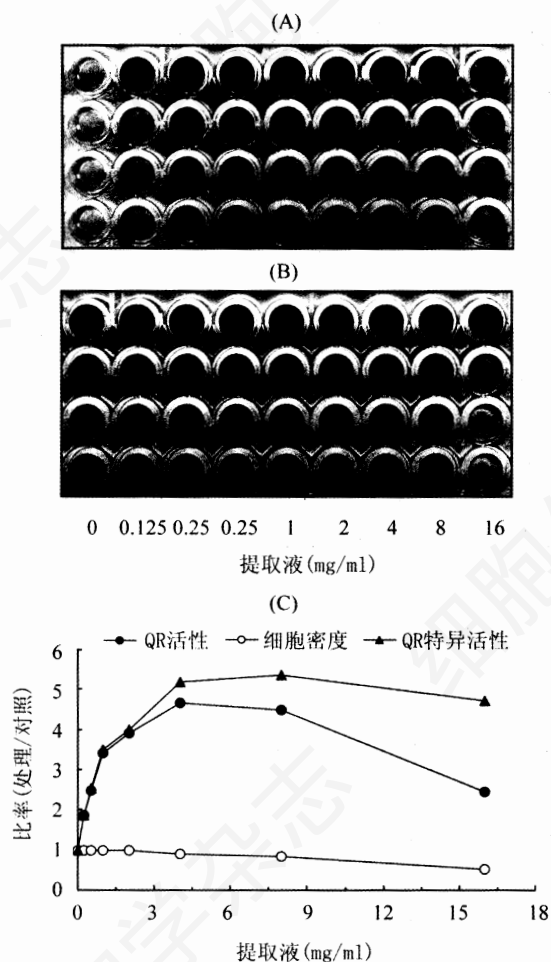


图1 芥蓝提取液对Hepa1c1c7小鼠肝癌细胞QR活性的诱导 (A)QR活性的诱导; (B)细胞密度; (C)不同稀释倍数下QR活性, QR特异活性和细胞密度的变化。Hepa1c1c7小鼠肝癌细胞培养在酶标板的每一个孔上,用连续2倍稀释的芥蓝三元提取液诱导后进行QR反应测定(以0.8%毛地黄皂苷为细胞裂解剂,QR反应时间为10 min)。(C)中QR活性是不同浓度的提取液经QR反应后在595 nm的吸光度与对照的吸光度的比值,细胞密度是不同浓度的提取液经龙胆紫反应后在490 nm的吸光度与对照的吸光度的比值,QR特异活性是QR活性和细胞密度的比值。

定结果的影响,表明QR反应时间在5~10 min比较适宜,如果反应时间太长,反而会使测定结果偏低(表3)。

用这种小鼠肝癌细胞培养的QR法可快速、大

表1 不同提取方法对芥蓝提取液QR诱导潜能的影响。QR诱导潜能以每克鲜重诱导的单位数表示,3次重复(n=3)

提取方法	诱导潜能(units/g)
乙腈	4364±386 ^c
甲醇	8392±572 ^b
水	5600±490 ^c
磷酸缓冲液	9979±757 ^a
三元提取液	11189±806 ^a

以0.8%毛地黄皂苷为细胞裂解剂,QR反应时间为10 min。第二列不同字母(a、b、c、d)表示两者差异显著($P<0.05$),相同字母表示差异不显著。

表2 不同细胞裂解剂对芥蓝提取液QR诱导潜能的影响。QR诱导潜能以每克鲜重诱导的单位数表示,3次重复(n=3)

裂解剂	诱导潜能(units/g)
0.8%毛地黄皂苷	10478±772 ^a
0.4%NP40	10278±758 ^a

磷酸缓冲液提取法,第二列中a表示两者差异不显著($P<0.05$)

表3 不同QR反应时间对芥蓝提取液QR诱导潜能的影响。QR诱导潜能以每克鲜重诱导的单位数表示,3次重复(n=3)

QR反应时间(min)	诱导潜能(units/g)
5	10098±746 ^b
10	10226±777 ^b
15	10069±769 ^a

磷酸缓冲液提取法,0.4%NP40为细胞裂解剂。第二列不同字母(a、b)表示两者差异显著($P<0.05$),相同字母表示差异不显著。

量地测定芥蓝组织中的天然抗癌化合物的抗癌活性,可用于比较芥蓝不同品种之间抗癌活性的差异,筛选出抗癌活性特别强的品种,也可用于其他作物抗癌活性的快速检测。

参考文献 (References)

- [1] 何洪巨等. 中国农业科学, 2002, 35: 192
- [2] 何洪巨等. 现代仪器, 2002, (5): 10
- [3] 汪俏梅等. 细胞生物学杂志, 2002, 24: 171
- [4] Gross HB et al. Plant Sci, 2000, 159: 265
- [5] Wang Q et al. Phytochem Anal, 2002, 13: 152
- [6] Prochaksa HJ et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 2394
- [7] Faulkner K et al. Carcinogenesis, 1998, 19: 605
- [8] Fahey JW et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 10367

Rapid Detection of Anticancer Activity of Chinese Kale by Quinone Reductase Bioassay

Hai-Feng Zhang, Xun Xiang, Ping Wang, Qiao-Mei Wang*

(Department of Horticulture, The State Agriculture Ministry Laboratory of Horticultural Plant Growth, Development & Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract Effect of different extract methods, lysing solutions, and the incubation time of quinone reductase (QR) reaction mixtures on bioassay was studied, and the results showed that the QR inducer potency of Chinese kale phosphate buffer (5 mmol/L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 , 1 mmol/L EDTA, pH 7.6) extracts was comparable to the potency of common triple solvent extracts. Extraction with phosphate buffer was better than other methods extraction with organic solvents because of its simplicity and effectiveness. 0.4% Nonidet P-40 could be substituted for 0.8% digitonin during cell lysis in QR assay. The suitable incubation time of QR reaction mixtures in QR assay was 5 to 10 minutes.

Key words quinone reductase bioassay; Chinese kale; anticancer activity

Received: July 21, 2005 Accepted: September 15, 2005

This work was supported by the National Science Foundation of China (No.30320974), the Project for the Outstanding Returned Overseas Chinese Scholars, State Personnel Ministry, the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.R304103), the Science and Technology Project of Zhejiang Province (No.2004C32014, No.2005C30012)

*Corresponding author. Tel: 86-571-85909333, Fax: 86-571-87420554, E-mail: qiaomeiw@zju.edu.cn