玉米黄色素对人卵巢透明癌细胞 ES-2 侵袭、迁移、凋亡及周期的影响

李晓玲[1,2]，王世清[2]，徐同成[1]，王文亮[1]，宋莎莎[1]
（1. 山东省农业科学院农产品研究所，山东济南 250100）
（2. 青岛农业大学食品科学与工程学院，山东青岛 266109）

摘要：从玉米蛋白粉中提取、纯化得到玉米黄色素，研究其对人卵巢透明癌细胞 ES-2 的侵袭、迁移、凋亡及周期的影响。MTT 法检测玉米黄色素作用于 MDA-MB-231、PC-3、ES-2 和 A549 细胞后的细胞活性；分别通过 transwell 体外侵袭试验、transwell 体外迁移试验、流式细胞术检测玉米黄色素干扰对人卵巢透明癌细胞 ES-2 的侵袭能力、迁移能力、细胞凋亡和细胞周期的影响。结果显示，玉米黄色素对上述几种肿瘤细胞的生长均有抑制作用，其中对 ES-2 影响最为显著。当给药浓度达到 100 μg/mL 时，对细胞的侵袭和迁移抑制率分别为 52.59%和 55.76%；流式细胞术检测结果表明，玉米黄色素浓度增加至 100 μg/mL 时，G1 期、S 期和 G2 期细胞分别为 85.33%、11.64%、3.21%，更多的 ES-2 细胞被阻断在 G1 期，且细胞凋亡率增加到 13.85%。综上所述，玉米黄色素能够诱导 ES-2 细胞发生凋亡，阻断细胞周期，并抑制细胞的侵袭和迁移。

关键词：玉米黄色素；侵袭；迁移；凋亡；周期
文章篇号：1673-9078(2014)2-1-5

Effect of Maize Yellow Pigment on Invasion, Migration, Proliferation and Cell Cycle of Ovarian Carcinoma Cell Line ES-2

LI Xiao-ling[1,2], WANG Shi-qing[2], XU Tong-cheng[1], WANG Wen-liang[1], SONG Sha-sha[1]
(1.Institute of Agro-Food Science and Technology, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100, China)
(2.Food Science and Engineering College, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: Maize yellow pigment was extracted from corn protein powder, and the possible effects on the proliferation of MDA-MB-231, PC-3, ES-2 and A549 cell lines were investigated by MTT assays, the effects on cell invasion and migration were studied by transwell assay, and its influences on cell cycle and cell apoptosis were observed by flow cytometry. Results showed that maize yellow pigment specifically inhibited the viability of MDA-MB-231, PC-3, ES-2 and A549 cell lines, especially on ES-2. The invasion and migration abilities were decreased to 52.59% and 55.76%, respectively, when the concentration of maize yellow pigment reached 100 μg/mL. The cells of G1 phase, S phase and G2 phase decreased to 85.33%,11.64% and 3.21%, respectively, with the increase of maize yellow pigment concentration. The cell cycle of more ES-2 were arrested at G1phase. In summary, maize yellow pigment can induce apoptosis, arrest cell cycle and inhibit cell proliferation and migration of ES-2 cells.

Key words: maize yellow pigment; invasion; migration; cell cycle; proliferation

玉米黄色素是几种类胡萝卜素的含氧衍生物的混合物，主要由玉米黄素（Zeaxanthin, 3-3'-二羟基-β-胡萝卜素）、黄体素（Lutein, 3-3'-二羟基-α-胡萝卜素）、隐黄素（Cryptoxanthin, 3-羟基-β-胡萝卜素）和 β-胡萝卜素组成[1~3]。国内外研究显示，玉米黄色素有抗癌作用，且对多种癌症如乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胃癌等均有抑制作用[4~5]。其中卵巢癌是严重危害女性健康的恶性肿瘤之一，而抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡在卵巢癌的预防和治疗方面有着广阔的应用前景。

玉米蛋白粉是工业上湿法生产玉米淀粉的副产物，因玉米籽粒蜡质外皮已被破坏而更加有利于玉米黄色素的溶出。工业上玉米黄色素主要为粗制品，提取加工后添加到畜禽饲料中以改善畜禽产品的外观和营养价值，或作为初加工品出口。因玉米蛋白粉原料

收稿日期：2013-09-29
基金项目：国家自然科学基金（31271963）；山东省农业重大应用技术创新课题（鲁财农指[2011]39）
作者简介：李晓玲（1988-），女，硕士在读，研究方向：食品安全保藏
通讯作者：王文亮（1980—），男，副研究员，研究方向：果蔬加工

来源广泛，且廉价易得，近年来对其高附加值产品的研究越来越广泛，主要以玉米醇溶蛋白和玉米黄色素为主。玉米黄色素的获取主要以溶剂浸提为主，如乙醇、丙酮等。基于溶剂的安全性考虑，玉米黄色素的提取以乙醇提取为主并辅以其它辅助浸提手段，如超声波、微波以及超声-微波联用等。辅助方法可以大大缩短提取时间并可使提取更加充分。本研究以玉米蛋白粉为原料，借助超微粉碎设备将原料粉碎至过 500 目筛，以 95%乙醇为浸提溶剂，于超声-微波组合反应系统中浸提得到提取液，并经过浓缩、去杂并进一步纯化后冷冻干燥得到的玉米黄色素作用于体外培养的人卵巢透明癌细胞 ES-2，就其对 ES-2 细胞侵袭、迁移以及其对细胞周期和凋亡的影响进行了探究，以期进一步探讨玉米黄色素的功能及抗卵巢癌的可能机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 细胞株及试剂

玉米蛋白粉（西王集团提供）；人卵巢透明癌细胞株 ES-2、人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、前列腺癌细胞株 PC-3 及人肺癌细胞株 A549（山东省科学院分析测试中心惠赠）；RPMI-1640 培养液、胎牛血清、胰酶、二甲基亚砜（DMSO）、四甲基偶氮唑蓝（MTT）均购自 Gibco；Transwell 板购自 Corning；其他试剂均为分析纯，购自天津市科密欧化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器

Ti 荧光倒置显微镜购自日本 NIKON 公司；超低温冰箱、细胞培养箱（Forma3111 水套 CO2 培养箱）、低温大容量离心机（XR1）购自美国 Thermo 公司；多功能酶标仪购自美国 PE 公司 EnSpire；Multimode Plate Readers、流式细胞仪为 BD FASC AriaⅢ；蛋白电泳系统以及转印系统购自美国 GE 公司；超净工作台购自上海苏净实业有限公司；XO-SM100 超声-微波组合反应系统购自南京先欧仪器制造有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 样品制备

以玉米蛋白粉为原料，95%乙醇为溶剂于超声-微波组合反应系统中浸提，提取液经过去杂处理去除大分子蛋白后用大孔树脂纯化，经浓缩、冷冻干燥处理，得到玉米黄色素粉末，干燥保存，备用。

1.2.2 细胞培养

ES-2、MDA-MB-231、PC-3、A549 细胞株在含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中生长，并置于 37 ℃、5% CO_2 及相对饱和湿度的培养箱中孵育箱中培养，细胞呈贴壁生长，取对数生长期的细胞进行试验。

1.2.3 MTT 法测定玉米黄色素抑制肿瘤细胞增殖活性

将上述细胞细胞以每孔 1×10^4 个接种到 96 孔板中，等细胞贴壁后，加入不同浓度梯度的化合物，37 ℃培养 48 h 后，每孔加入 0.5%的 MTT 溶液至 MTT 浓度为 0.5 mg/mL，继续培养 4 h，弃去孔中的培养液，每孔加 DMSO 150 μL，振荡溶解，在 490 nm 处测定吸光度，采用 origin7.5 软件处理数据，计算抑制细胞增殖活性 IC_{50}。

1.2.4 细胞侵袭试验

将无血清的 RPMI-1640 培养基按 1:10 稀释 Matrigel，取 50 μL 铺于 Transwell 小室的上室，1 h 后加入 50 μL 无血清 RPMI-1640 培养基水化 30 min。然后各个小室加入 1×10^5 个 ES-2 细胞，每个小室分别加入 50 μg/mL、100 μg/mL 的药物处理，下室也加入含相同药物浓度的并含 10%血清的 RPMI-1640 培养基 500 μL。20 h 后，取出小室，膜下表面的细胞用 PBS 洗涤一次，晾一会后用甲醇固定 10 min，结晶紫染色 10 min。染色后的小室用 PBS 洗三遍，然后用棉球擦掉上室内未侵袭的细胞及基质胶，显微镜下观察膜下表面的细胞并拍照，然后用 33 %醋酸脱色，将结晶紫完全洗脱下来，洗脱液在酶标仪上 570 nm 测其光密度值，观察分析其侵袭情况及侵袭比率。

1.2.5 细胞迁移试验

将数量为 2×10^5 的 ES-2 细胞加入 Transwell 小室，上层培养液采用加入 0.1% BSA 的无血清培养基 200 uL，分别加入 50 μg/mL、100 μg/mL 的玉米黄色素。下层用含 10% FBS 的培养基 500 uL。24 h 后，取出小室，膜下表面的细胞用 PBS 洗一遍，然后甲醇固定 10 min，0.1%结晶紫染色 10 min 后用 PBS 洗三遍，再用棉球擦掉上室内未迁移的细胞及基质胶。处理完毕后用显微镜观察、拍照，然后用 33%醋酸脱色，将结晶紫完全洗脱下来，洗脱液在酶标仪上 570 nm 测其光密度值，观察分析其迁移情况及迁移率。

1.2.6 细胞周期试验

将 ES-2 细胞以每孔 4×10^5 个接种 0 到 6 孔板中培养过夜，分别加入浓度为 25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 的玉米黄色素，加药 48 h 后，胰酶消化，收集细胞。PBS 洗两次后，70%乙醇中 4 ℃固定 2 h。PBS 洗两次，2000 r/min，离心 5 min，弃上清，重悬于 100 μl PBS 中，加 Rnase A 使终浓度为 50 μg/mL，37 ℃

孵育 30 min。然后加 PI 染液至终浓度为 10 μg/mL，避光孵育 15 min 后用流式细胞仪检测，结果用 FlowJo 7.6.1 软件分析。

1.2.7 细胞凋亡试验

将 ES-2 细胞以每孔 4×10^5 个接种到 6 孔板中培养过夜，分别加入浓度为 50 μg/mL 及 100 μg/mL 的玉米黄色素 24 h 后，胰酶消化，收集细胞。PBS 洗两次后，按照说明书方法，用 400 μL binding buffer （0.01 M HEPES, pH 7.4；0.14 M NaCl；2.5 mM $CaCl_2$）重悬。然后加入 5 μL Annexin V-FITC 染液，4 ℃避光孵育 15 min，再加入 10 μL PI 染液，于 4 ℃避光孵育 15 min 后用流式细胞仪检测，统计数据用 FlowJo 7.6.1 软件分析，得到细胞凋亡图谱。

2 结果与分析

2.1 玉米黄色素抑制肿瘤细胞的 MTT 检测

用 MTT 比色法检测玉米黄色素对人卵巢透明癌细胞 ES-2、人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、前列腺癌细胞 PC-3 及人肺癌细胞 A549 几种肿瘤细胞生长的影响，结果显示：玉米黄色素对几种肿瘤细胞的生长均具有抑制作用，玉米黄色素干扰的状态下培养 48 h 后，其对几种肿瘤细胞的半数抑制量情况如图 1 所示。ES-2、PC-3、MDA-MB-231 及 A549 的半数抑制量 IC_{50} 分别为 53.21 μg/mL、61.93 μg/mL、62.21 μg/mL、98.6 μg/mL。可以看出玉米黄色素对 ES-2 的半数抑制量最小，即玉米黄色素对 ES-2 细胞的生长抑制作用最为明显。

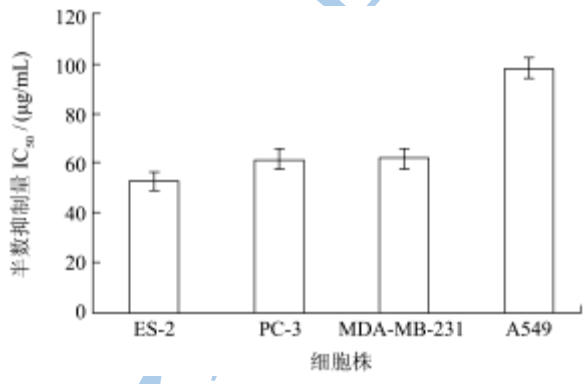


图 1 玉米黄色素对几种肿瘤细胞生长的抑制作用

Fig.1 Inhibition effect of maize yellow pigment on several tumor cells

2.2 ES-2 细胞侵袭迁移试验[5~6]

通过 Transwell 体外侵袭试验发现，ES-2 细胞具有较强的侵袭能力，经过玉米黄色素处理 20 h 后，其侵袭能力明显减弱，空白对照组、玉米黄色素浓度为 5 μg/mL 组与玉米黄色素浓度为 100 μg/mL 组的侵袭细胞比率（空白组按 100%计算）分别为 100%、63.51%和 47.41%（图 2）。由图 2 可以直观的看出，玉米黄色素对 ES-2 的侵袭能力有明显抑制作用，且抑制作用可能有一定浓度依赖性。

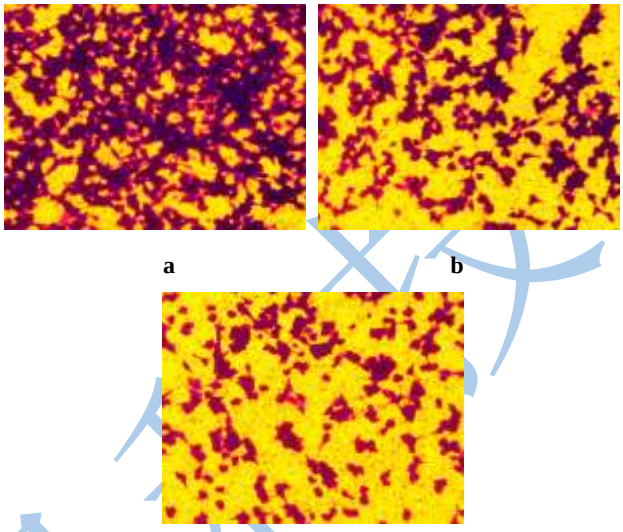


图 2 玉米黄色素对 ES-2 侵袭能力的影响

Fig.2 Effect of maize yellow pigment on invasion ability of ES-2 cells

注：a：对照组，b：50 μg/mL 组，c：100 μg/mL 组。

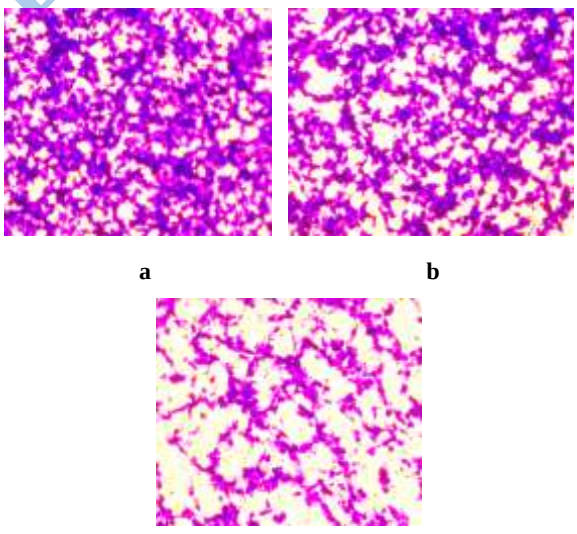


图 3 玉米黄色素对 ES-2 迁移能力的影响

Fig.3 Effect of maize yellow pigment on migration ability of ES-2 cells

注：a：对照组，b：50 μg/mL 组，c：100 μg/mL 组。

Transwell 体外迁移试验显示，玉米黄色素处理 24 h 后，空白对照组、玉米黄色素浓度为 50 μg/mL 组与玉米黄色素浓度为 100 μg/mL 组的迁移细胞比率（空白组按 100%计算）分别为 100%、78.76%和 44.24%

（图 3）。图 3 表明，玉米黄色素对 ES-2 的迁移能力有显著降低作用，且这种降低作用可能有一定浓度依赖性，随着玉米黄色素浓度的增加，ES-2 的迁移能力降低。

2.3 ES-2 细胞周期试验[7~8]

通过对 ES-2 细胞周期的分析发现，培养 48 h 后，空白对照组细胞的 G1 期、S 期、G2 期细胞百分比分别为：55.16%、39.23%、5.61%；玉米黄色素浓度 25 μg/mL 组分别为：61.26%、12.35%、26.39%；50μg/mL 组分别为：69.93%、23.56%、6.51%；100 μg/mL 组为：85.33%、11.64%、3.21%（图 4）。由图 4 不难发现，随着玉米黄色素浓度的升高，G1 期细胞比率逐渐上升，而 S 期和 G2 期细胞比率逐渐降低。G1 期是细胞合成 tRNA、mRNA、rRNA 及核糖体的过程，玉米黄色素将大部分 ES-2 细胞的细胞周期阻滞在 G1 期，进而阻止了各种结构蛋白和酶蛋白的合成，即玉米黄色素可以通过抑制蛋白的合成来抑制 ES-2 的增殖。

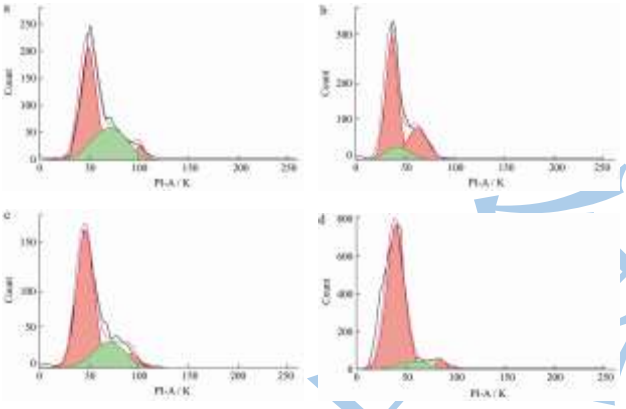


图 4 玉米黄色素对 ES-2 细胞周期的影响

Fig.4 Effect of maize yellow pigment on cell cycle of ES-2

注：a：空白对照组，b：25 μg/mL 组，c：50 μg/mL 组，d：100μg/mL 组。

2.4 ES-2 细胞凋亡试验[9]

将 ES-2 细胞按 1.2.7 所述方法培养 24 h 后，得到的细胞凋亡结果如图 7 所示。空白对照组细胞凋亡早期凋亡率为 0.012%，凋亡晚期凋亡率为 1.82%；玉米黄色素浓度为 50 μg/mL 时，凋亡早期凋亡率为 0.19%，凋亡晚期凋亡率为 4.01%；玉米黄色素浓度达到 100 μg/mL 时，凋亡早期凋亡率为 0.69%，凋亡晚期凋亡率为 12.40%。上述结果说明玉米黄色素对诱导 ES-2 细胞的凋亡有一定作用，且这种诱导作用具有浓度依赖性，即随着玉米黄色素浓度的增加，ES-2 细胞的凋亡率也增加。

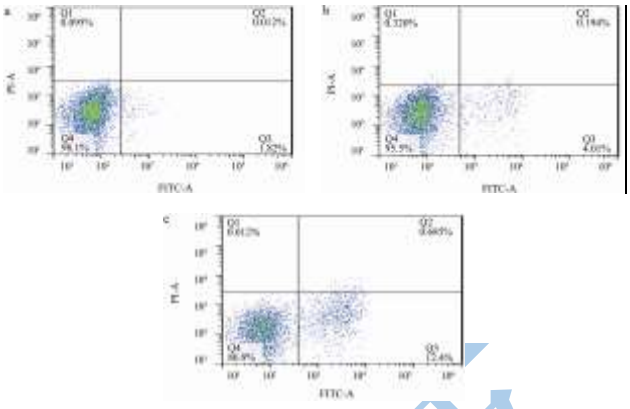


图 5 玉米黄色素对 ES-2 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of maize yellow pigment on proliferation of ES-2

注：a：空白对照组，b：50 μg/mL 组，c：100 μg/mL 组。

3 结论

3.1 卵巢癌是一种恶性卵巢肿瘤，90~95%以上属于卵巢原发性癌，由于早期不易被发现，晚期治疗效果又不佳，因此卵巢癌死亡率超过宫颈癌和子宫内膜癌之和，高居妇科癌症首位。尽管以手术为主的综合治疗方法有一定的进展，但肿瘤细胞耐药、易转移、易复发的特点常常导致临床治疗的失败。因此寻求有效的辅助治疗方法是抗肿瘤研究面临的重要课题之一。

3.2 玉米黄色素是一类类胡萝卜素衍生物的混合物，来源广泛，廉价易得，能抑制多种肿瘤细胞的侵袭、迁移、细胞周期，并且可以诱导细胞凋亡。本研究表明，在以玉米黄色素为干扰物质，体外培养的 ES-2 细胞中，细胞的侵袭能力、迁移能力受到明显的抑制。有研究表明，玉米黄色素可以抑制前列腺癌细胞、乳腺癌细胞等多种肿瘤细胞的侵袭和迁移。付蕾[10]等人的研究发现，玉米黄色素诱导胃癌细胞凋亡的过程是基于活性氧机制，其对胃癌细胞 SGC-7901 显著的增殖抑制效应可能是通过诱导其凋亡和降低细胞内的活性氧（ROS）的活性所介导的。

3.3 本研究中，ES-2 细胞的细胞周期被阻滞在 G1 期向 S 期转化的过程中。G1 期是细胞周期中合成各种 RNA 的过程，G1 期被阻滞意味着信号 RNA、转运 RNA 以及核糖体 RNA 合成的受阻[11]，因此细胞周期的下一个阶段就不能进行，因此合成相应的结构蛋白和酶蛋白[12~14]。本研究还发现，玉米黄色素能够诱导人卵巢透明癌细胞 ES-2 发生凋亡，且玉米黄色素对 ES-2 细胞的侵袭能力、迁移能力的抑制，对细胞周期的阻滞以及对细胞凋亡的诱导作用具有浓度依赖性，随着玉米黄色素浓度的增大，抑制作用和诱导作用增强。而我们的另一项研究表明，玉米黄色素对人乳腺

癌细胞 MDA-MB-231 细胞周期的阻滞则使更多的细胞被阻断在 G2 期。由此推断，抑制肿瘤细胞的侵袭和迁移、阻断细胞周期和诱导肿瘤细胞凋亡可能是玉米黄色素抗肿瘤作用的重要机制，但其具体信号通路还需进一步研究。

参考文献

[1] 卢艳杰,姚惠源.黄体素、玉米黄素及其生理功能研究现状[J].食品与发酵工业,2003,29(2):81-85
Lu Yan jie, Yao hui yuan. Study on the extraction and its stability process of maize yellow pigment from corn gluten [D]. Wuxi: Wuxi University of light industry, 2003, 29(2): 81- 85

[2] Ribaya-Mercado JB. Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention [J]. J. Am. Coll. Nutr., 2004, 23(6): 567

[3] Roberts RL, Green J, Lewis B. Lutein and zeaxanthin in eye and skin heath [J]. Clin Dermatol, 2009, 27(2): 195

[4] 孙震,姚惠源.叶黄素、玉米黄素分子结构修饰对抑制肿瘤细胞增殖活性的影响[J].食品科学,2007,28(4):296-301
SUN Zhen, YAO Hui yuan. Effect of maize yellow pigment molecular structure modification on proliferation activity of tumor cells [J]. Food Science, 2007, 28(4): 296-301

[5] Mares Perlman JA, Fisher AI, Palta M, et al. Lutein and zeaxanthin in the diet and serum and their relation to age-related maculopathy in the third national health and nutrition examination survey [J]. Am. J. Epidemiol., 2001, 153: 424-432

[6] Dwyer J H, Navab M, Dwyer K M, et al. Oxygenated carotenoids lutein and progression of early atherosclerosis: The Los Angels Atherosclerosis [J]. Study Circulation, 2001, 103: 2911-2917

[7] Subagio A, Morita N. Pro-oxidant activity of lutein and its dimyristant esters in corn triacylglyceride [J]. Food Chem., 2003, 81:97-102

[8] 孙震,奚海燕,李博,等.叶黄素和玉米黄素抑制口腔上皮细胞癌增殖的实验研究[J].食品科学,2006,6:207-212
SUN Zhen, XI Haiyan, LI Bo, et al.Molecular or biology mechanism of zeaxanthin and lutein from corn gluten meal to inhibit human oral cell cancer proliferation [J]. Food science, 2006, 6: 207-212

[9] 裴迎新,衡正昌,段广才,等.叶黄素对食管癌细胞凋亡的影响及其作用机制研究[J].中国中药杂志,2007,32(4):332-354
PEI Yingxin, HENG Zhengchang, DUAN Guangcai, et al. Effect and mechanism of maize yellow pigment on the apoptosis of esophageal carcinoma cell [J]. Journal of Chinese materia medica, 2007, 32(4):332-354

[10] 付蕾,刘蕾,张楠,等.叶黄素对 SGC-7901 细胞增殖抑制及凋亡诱导作用[J].中国药理学通报, 2009, 25(7): 976-977
FU Lei, LIU Lei, ZHANG Nan, et al. Effect of maize yellow pigment on proliferation inhibition and apoptosis inducement of SGC-7901 [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2009, 25(7): 976-977

[11] Zhang Q, Zhao X H, Wang Z J. Cytotoxicity of flavones and fla-vonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line(KYSE-510) by induction of G2/M arrest and apoptosis [J]. ToxicolIn Vitro, 2009; 23(5): 797-807

[12] Mazumder S, Plesca D, Alnasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis [J]. Method Mol. Biol., 2008,414:13-21

[13] Chien S Y, Wu Y C, Chung J G, et al.Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells [J]. Hum. Exp. Toxicol., 2009; 28(8): 493-503

[14] Fujii T, Saito M. Inhibitory effect of quercetin isolated from rosehip (Rosa canina L.) against melanogenesis by mouse melanoma cells [J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2009; 73(9): 1989-93