

网络出版时间: 2015-11-18 10:12:34 网络出版地址: <http://www.cnki.net/KCMS/detail/34.1065.R.20151118.1012.002.html>

◇基础医学研究◇

苹果皮提取物及有效成分 C3G 对小鼠乳腺恶性肿瘤生长的影响

郭强¹, 汪心怡², 朱其莘¹, 范楚苓¹, 朱佩¹, 任海风¹, 李菲菲¹, 汪思应¹

摘要 目的 探讨苹果皮提取物及其有效成分矢车菊-3-葡萄糖苷(C3G)对乳腺恶性肿瘤生长的影响。方法 建立E0771小鼠乳腺癌移植瘤模型,观察饮用苹果皮汁对小鼠乳腺恶性肿瘤生长的影响。免疫组化法分析饮用苹果皮汁与饮用普通无菌水组小鼠恶性肿瘤组织中CD31表达差异。HPLC法分析苹果皮提取物中的化学成分。3D Matrigel胶血管形成实验探讨苹果皮成分C3G对小鼠乳腺恶性肿瘤血管形成的影响。MTT法和Transwell实验观察C3G对血管内皮细胞SVEC增殖和迁移能力的影响。结果 饮用含有1%和2%浓度的苹果皮汁无菌水对乳腺恶性肿瘤生长起到抑制作用。免疫组化法染色显示饮用苹果皮汁肿瘤中CD31表达低于未饮用苹果皮汁组。HPLC法分析显示C3G是苹果皮提取物的有效成分之一。3D Matrigel胶实验显示C3G抑制小鼠乳腺癌细胞E0771血管生成。C3G血管形成抑制小鼠内皮细胞SVEC的迁移能力。结论 苹果皮提取物及其有效成分C3G抑制小鼠乳腺癌生长,该作用可能通过抑制血管生成而实现。

关键词 乳腺癌; 苹果皮; 矢车菊-3-葡萄糖苷

中图分类号 R 363.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)12-1711-05

苹果含有丰富的植物纤维、维生素、蛋白质和多酚类物质。流行病学调查^[1]显示,多食用苹果可以降低一些慢性疾病的发生率,其中包括恶性肿瘤。对苹果皮成分进行分析显示,其含有多种强抗氧化的化学物质^[2],其抗氧化物质含量约占整个果实的1/2^[3]。体外实验^[4-5]表明,苹果皮可以抑制人前列腺癌细胞、乳腺癌细胞、肝癌细胞、结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭。矢车菊-3-葡萄糖苷(cyanidin-3-glucoside, C3G)是广泛存在于瓜果蔬菜中的花青素类,但在不同的水果中其含量也是千差万别^[6],

HPLC分析得出C3G是苹果皮中的重要成分,具有明显的抗氧化作用,当机体由于氧化应激引起多种疾病时,C3G可以在其中起到保护作用^[7],前期研究^[8]证实酒精刺激乳腺癌引起氧化应激,C3G可以抑制这一反应从而保护机体。另外,C3G还被报道^[9]可以抑制胰腺癌、肺癌细胞的生长,促进人胃癌细胞的凋亡。C3G还可以抑制小鼠血管平滑肌细胞的增殖^[10]。在乳腺癌中,C3G也可以抑制肿瘤生长,但其机制尚不清楚。推测C3G可能与乳腺肿瘤血管生成存在一定关系。肿瘤的血管生成与血管转移密切相关^[11]。CD31又称血小板-内皮细胞黏附因子,是内皮细胞的主要标志物,用于识别良恶性血管源性肿瘤及肿瘤间质中血管生成状况。肿瘤血管中血管内皮细胞是血管生成的关键步骤,该研究主要观察苹果皮汁与乳腺恶性肿瘤之间的关系及其提取物C3G在乳腺癌中发挥作用的机制,为乳腺癌治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料 市售成熟红富士苹果30 kg。小鼠髓样乳腺癌细胞E0771(简称为E0771)由C57BL/6小鼠自发乳腺癌取肿瘤组织原代培养所得。小鼠血管内皮细胞SVEC细胞购自ATCC。雌性C57BL/6小鼠21只,5周龄,SPF级,平均体重18 g,随机分成3组,分别购置饲养于安徽医科大学实验动物中心。

1.2 试剂与仪器 C3G由导师汪思应教授从合作实验室美国肯塔基大学医学部引进;CD31抗体、DMSO(美国Sigma公司,货号131M-9);Matrigel胶(美国BD公司);MTT试剂盒(南京凯基生物技术有限公司);倒置显微镜TMT2-21(美国奥林巴斯公司)、120C(日本尼康公司);高速营养机(Philips HR1861,日本菲利普公司);HPLC仪(Hypersil BDS,美国Thermo公司);CO₂细胞培养箱(371型,美国Thermo公司)。

1.3 细胞培养

1.3.1 E0771细胞和SVEC细胞培养 E0771细胞

2015-09-08 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81302319);安徽省自然科学基金(编号:1308085MH121);安徽省留学回国人员科研项目(编号:2009-2011)

作者单位: 安徽医科大学¹基础医学院病理生理学教研室、²临床医学院,合肥 230032

作者简介: 郭强,女,硕士研究生;

汪思应,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: sywang@ahmu.edu.cn

和 SVEC 细胞均为 DMEM 培养基与胎牛血清 FBS 按照 9 : 1 配成 DMEM 完全培养基, 加入青霉素 - 链霉素合剂, 抗生素终浓度为: 青霉素 1×10^5 U/L, 链霉素 0.1 g/L, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞 80% 融合时, 传代培养行后续实验。

1.3.2 C3G 处理组 E0771 细胞的建立 取对数生长期的细胞 E0771 接种于 60 mm 细胞皿中, 细胞贴壁后分别用 10、20 nmol/L 的 C3G 处理细胞 26 h, 对照组加入 C3G 同一溶剂, 全程需避光培养。

1.4 含 1%、2% 苹果皮汁无菌水制取 普通红富士苹果削皮后, 弃果肉, 取果皮, 使用高速营养榨汁机榨汁, 收集苹果皮汁, 用纱布过滤后, 再使用 0.2 μm 滤器过滤成无菌无渣苹果皮汁。1%、2% 苹果皮汁浓度分别为 100 ml 无菌水中加 1 g、2 g 无菌无渣苹果皮汁。

1.5 小鼠乳腺癌模型建立 取指数生长期的 E0771 细胞, 常规消化计数, 用 PBS 重悬所需细胞, 将细胞接种于 C57BL/6 小鼠第二对右侧乳腺处, 接种量为每只 3.5×10^5 个细胞 (100 μl), 整个操作过程中 E0771 细胞置于冰上保存。

1.6 HPLC 法分析苹果皮汁成分 收集苹果皮汁 1 kg/L 为样品, 样品溶解于含有甲酸的乙腈水中。标准品为 50 mmol/L C3G, 同样溶解于含有甲酸的乙腈水中。检测条件如下: 色谱柱: Thermo Hypersil BDS C18 (100 mm × 3 mm i. d. 3 μm); 流动相: 乙腈 - 0.2% 磷酸溶液 (14 : 86); 流速: 0.5 ml/min; 检测波长: 250 nm; 时间: 20.5 min。

1.7 3D Matrigel 胶血管形成实验 将 Matrigel 基质胶置于 4 °C 冰箱过夜融化, 将实验所需 EP 管和移液枪头 24 孔板均提前置于 4 °C 预冷, 取生长对数期的 E0771 细胞和 C3G 处理后 E0771 细胞, PBS 清洗, 胰酶消化, 计数, 保证 10 μl DMEM 培养基中含有 3 000 个细胞。取 10 μl 培养基与 200 μl Matrigel 胶混合, 将混合液接种于 24 孔板中, 置于 37 °C 孵箱 20 min, Matrigel 胶凝固后, 上层加 500 μl DMEM 培养基防止干燥。约 10 d 后显微镜下观察细胞形态, 计数统计。

1.8 免疫组化实验 解剖小鼠, 取肿瘤固定后, 脱水, 制成蜡块, 标本蜡块连续切片, 确保切片厚度 ≤ 2 μm, 常规二甲苯脱蜡, 使用 H₂O₂ 去离子水消除内源性过氧化物酶活性, PBS 冲洗 2 次, 一抗 4 °C 孵育过夜, 孵育结束后使用 PBS 清洗 3 次, 室温使用一抗对应二抗孵育 15 ~ 20 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min,

辣根酶标记链霉素卵白素工作液滴加至标本, 室温孵育 15 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, DAB 显色, 使用苏木精染色, 然后盐酸乙醇分化, 乙醇溶液按梯度脱水, 二甲苯透明后封片, 至显微镜下拍照观察。

1.9 MTT 实验 取对数生长期细胞 E0771、SVEC 消化, 计数, 分 3 组 (对照组和 10、20 nmol/L C3G 处理组), 每组设立 6 个复孔, 每孔接种相同数目细胞, 接种于 96 孔板。待细胞贴壁后, 取 0 h 96 孔板, 避光加入 MTT, 37 °C 孵育, 随后取出 96 孔板, 弃上清液, 每孔加入 DMSO 溶解结晶, 混匀, 490 nm 酶标仪检测光密度值 (optical density, OD) 值。同上收取 24 h 及 48 h 的细胞培养板。

1.10 Transwell 迁移实验 将 Transwell 小室置于 24 孔板中, 在其小室的上下均加入适量的纯 DMEM 培养基水化小室, 水化后, 在小室下层加入含 6% 血清的 DMEM 完全培养基。处理细胞, 取对数生长期细胞 SVEC 消化、离心, 取含血清 2% 的 DMEM 完全培养基重悬细胞, 计数加入小室上层。置 37 °C 细胞培养箱中培养, 约 6 h 后细胞可由上层小室穿过。随后收板弃小室上下层培养基, 棉签擦拭上层小室细胞, 并用 PBS 清洗 2 次, 将小室置于固定液中固定已迁移过的细胞, 随后 0.1% 结晶紫染色。染色结束后, 清洗多余染色液, 室温干燥, 显微镜拍照。每孔随机取 5 个视野, 计数细胞数目, 取平均值。

1.11 动物实验 建立 E0771 小鼠乳腺癌移植瘤模型后, 平均分为 3 组, 饮用水分别为普通无菌水、浓度为 1% 的苹果皮汁无菌水、浓度为 2% 的苹果皮汁无菌水, 隔天记录肿瘤体积, 计算公式为: 肿瘤体积 (mm³) = 1/2 × a × b² (a 为肿瘤最长径 mm, b 为肿瘤最短径 mm), 绘制肿瘤生长曲线, 3 周后 3 组小鼠经颈椎脱臼处死, 解剖取肿瘤组织、肺组织。

1.12 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析, 所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各实验均重复 3 次, 进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 饮用苹果皮汁对小鼠乳腺肿瘤生长的影响 按动物实验方法, 将实验分为 3 组, 绘制肿瘤生长曲线显示, 饮用 1% 苹果皮汁小鼠肿瘤体积低于饮用普通无菌水组, 饮用 2% 苹果皮汁小鼠肿瘤体积也明显低于饮用普通无菌水组 ($P < 0.05$)。说明饮用苹果皮汁可以抑制小鼠乳腺恶性肿瘤的生长。见图 1。

2.2 免疫组化 CD31 染色结果 通过免疫组化法

染色 400 倍镜下观察显示,饮用含有 1% 苹果皮汁无菌水小鼠肿瘤中其 CD31 表达明显低于饮用普通无菌水组小鼠。说明苹果皮汁有可能通过抑制肿瘤血管形成来发挥作用。见图 2。

2.3 HPLC 分析结果 HPLC 分析显示 C3G 是苹果皮提取物的有效成分。见图 3。

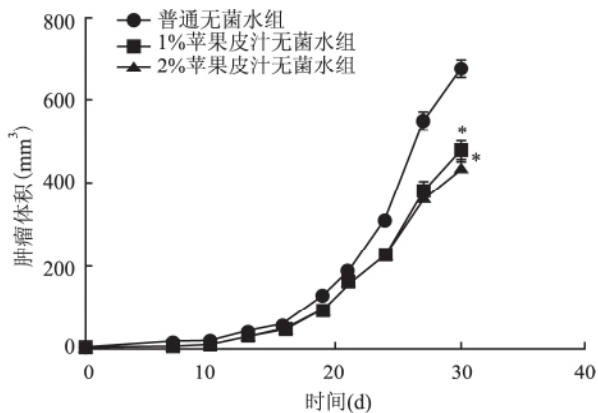


图 1 饮用含有 1% 和 2% 苹果皮汁无菌水对小鼠乳腺恶性肿瘤体积的影响
与普通无菌水组比较: * $P < 0.05$

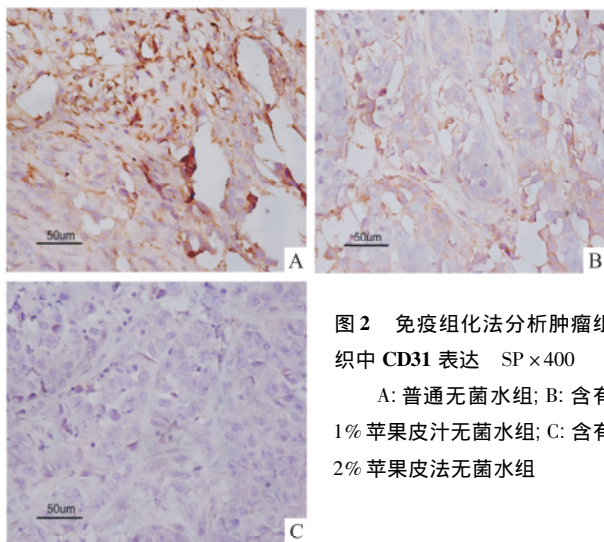
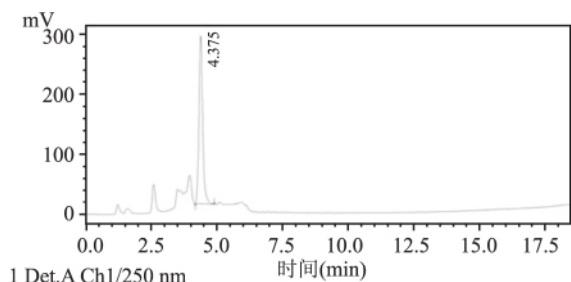


图 2 免疫组化法分析肿瘤组织中 CD31 表达 SP × 400
A: 普通无菌水组; B: 含有 1% 苹果皮汁无菌水组; C: 含有 2% 苹果皮汁无菌水组



1 Det.A Ch1/250 nm

Detector Ach1 250 nm		PeakTable			
Peak#	Ret.Time	Area	Height	Area%	Height%
1	4.375	2751777	272935	100.000	100.000
Total		2751777	272935	100.000	100.000

图 3 HPLC 法分析苹果皮中的有效成分

2.4 3D Matrigel 胶血管形成实验结果 使用不同浓度 C3G (0、10、20 nmol/L) 处理小鼠乳腺癌细胞, MTT 实验显示经 10、20 nmol/L C3G 处理后 随时间增加 与对照组比较差异无统计学意义,说明 C3G 对 E0771 细胞增殖无明显影响,见图 4。当使用 C3G 后, E0771 细胞其血管生成个数明显低于对照组,说明 C3G 可能通过抑制血管生成影响乳腺肿瘤的生长,见图 5。

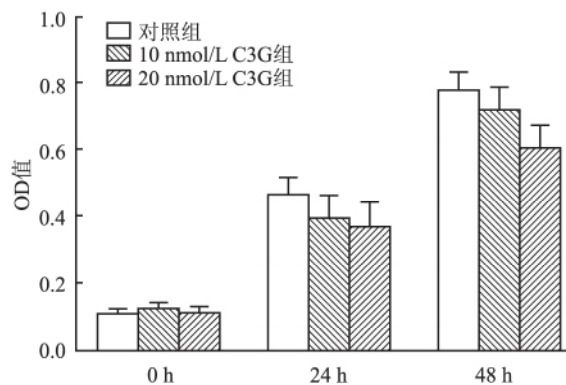


图 4 小剂量 C3G 对小鼠乳腺癌细胞 E0771 存活能力的影响

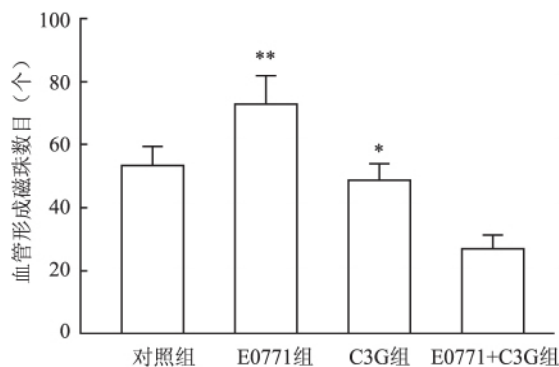


图 5 3D Matrigel 胶血管形成实验观察 C3G 对小鼠乳腺癌细胞 E0771 血管形成的影响
与 E0771 + C3G 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 Transwell 实验结果 为了更进一步验证 C3G 与血管生长之间的关系,用 C3G 处理小鼠血管内皮细胞与对照组进行 MTT 实验,经 C3G 处理后的细胞增殖能力与对照组并无明显差别。见图 6。随后进行体外 Transwell 试验,在小室中同样接种 1×10^5 个细胞 6 h 后显微镜下观察,使用 C3G 处理后的小鼠内皮细胞其穿过细胞数明显低于对照组,迁移能力下降,说明 C3G 可以抑制其迁移能力。见图 7。

3 讨论

苹果是生活经常食用水果之一,众所周知对健

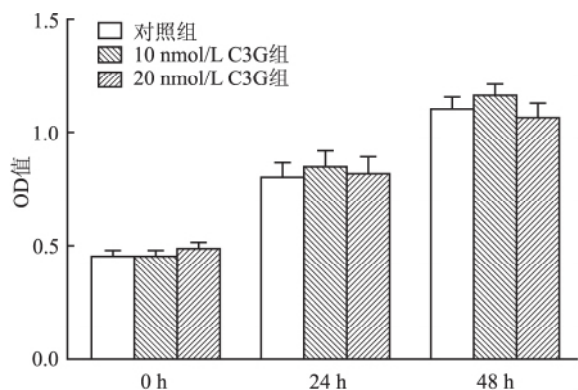


图6 小剂量 C3G 对小鼠血管内皮细胞 SVEC 存活能力的影响

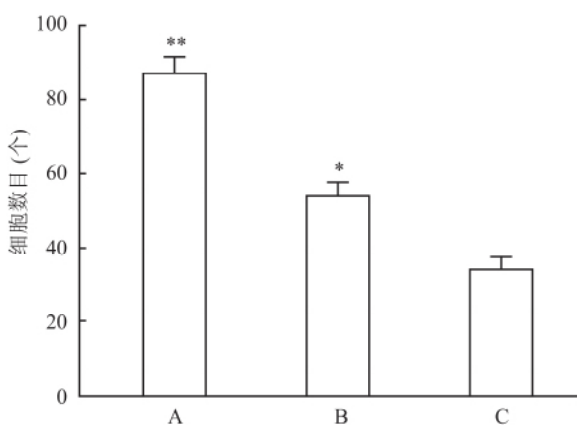
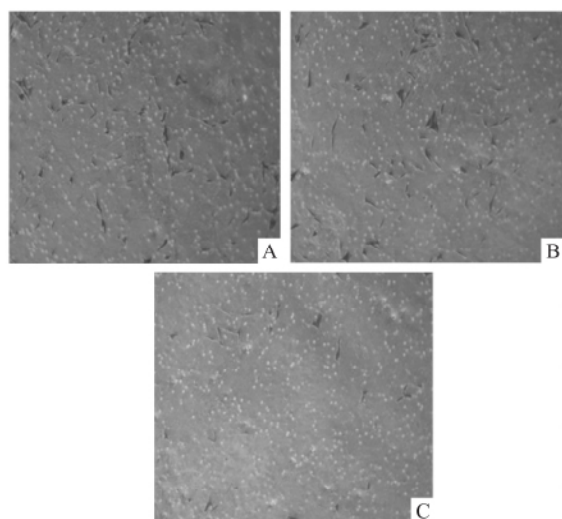


图7 Transwell 实验检测 C3G 对小鼠血管内皮细胞 SVEC 迁移能力的影响 ×40

A: 对照组; B: 10 nmol/L C3G 组; C: 20 nmol/L C3G 组; 与 20 nmol/L C3G 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

康有益, 苹果多酚中的黄酮醇被认为在抑制癌症中发挥着关键作用^[5]。研究^[6, 12]表明, 苹果皮多酚含量是果肉的 3~4 倍, 比例约占整个果实的一半。体外实验^[3-4]显示, 苹果皮可以抑制人前列腺癌细胞、乳腺癌细胞、肝癌细胞、结肠癌细胞的增殖、迁移和

侵袭。本研究结果显示, 当患有乳腺癌的小鼠日常无菌水更换为含有 1% 和 2% 浓度的苹果皮汁无菌水后, 随着时间的增加, 其肿瘤体积以及生长速度均低于饮用普通无菌水组。说明日常饮用苹果皮汁可以减缓乳腺癌的发展。

研究^[3-4]显示苹果皮抑制肿瘤生长机制主要是苹果皮成分可以抑制肿瘤的增殖并且促进凋亡。氧化应激与肿瘤有着密切的关系, 研究^[13]表明肿瘤患者体内氧化应激失调, 处于低抗氧化状态, 氧化应激水平增高, 苹果皮中含有大量的黄酮醇, 黄酮醇具有强大的抗氧化功能, 但因为血管生成是肿瘤发生发展的重要步骤之一, 所以该研究探讨饮用苹果皮汁对其肿瘤血管形成是否有一定影响, 免疫组化结果显示, 饮用苹果皮汁其 CD31 表达明显低于对照组。

与此同时, HPLC 法分析苹果皮成分, 结果显示 C3G 是苹果皮有效成分之一。C3G 可以抑制胃癌、肺癌、胰腺癌^[14] 等肿瘤细胞的增殖。另有研究^[15]表明, C3G 与糖尿病小鼠中血管形成也有密切关系。本课题组前期实验^[10]显示, C3G 同样具有潜在强大抗氧化功能, 并且可以抑制酒精诱导乳腺癌导致的迁移和侵袭^[16]。3D Matrigel 胶血管形成实验探讨 C3G 对乳腺癌细胞是否有一定作用, 高浓度的 3D Matrigel 胶适用于体内血管生成和肿瘤细胞迁移及肿瘤模型的建立。3D Matrigel 胶血管形成实验是模拟肿瘤细胞在三维基质内生长, 以观察肿瘤细胞血管形成能力。本研究显示, 经过 C3G 处理的肿瘤细胞血管形成能力明显低于对照组, 说明 C3G 不但具有抗氧化作用, 还可以抑制肿瘤血管的形成。

通过体内外实验表明低浓度的苹果皮汁对乳腺癌生长起到抑制作用, 其机制可能是通过抑制血管生成来实现。提取苹果皮中的 C3G, 抑制肿瘤细胞增殖及血管形成, 为乳腺癌的治疗可能提供新的研究方向。

参考文献

[1] Gallus S, Talamini R, Giacosa A, et al. Does an apple a day keep the oncologist away? [J]. Ann Oncol, 2005, 16(11): 1841-4.

[2] Chinnici F, Gaiani A, Natali N, et al. Improved HPLC determination of phenolic compounds in cv. golden delicious apples using a monolithic column[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(1): 3-7.

[3] Lata B, Trampeczynska A, Paczesna J. Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition[J]. Sci Hortic(Amster-

- dam), 2009, 121(2): 176–81.
- [4] He X, Liu R H. Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(11): 4366–70.
- [5] Reagan-Shaw S, Eggert D, Mukhtar H, et al. Antiproliferative effects of apple peel extract against cancer cells [J]. *Nutr Cancer*, 2010, 62(4): 517–24.
- [6] Ding M, Feng R, Wang S Y, et al. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(25): 17359–68.
- [7] Wang L S, Stoner G D. Anthocyanins and their role in cancer prevention [J]. *Cancer Lett*, 2008, 269(2): 281–90.
- [8] Xu M, Bower K A, Wang S, et al. Cyanidin-3-glucoside inhibits ethanol-induced invasion of breast cancer cells overexpressing ErbB2 [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 285.
- [9] Yang Y, Shi Z, Reheman A, et al. Plant food delphinidin-3-glucoside significantly inhibits platelet activation and thrombosis: novel protective roles against cardiovascular diseases [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37323.
- [10] Luo X, Fang S, Xiao Y, et al. Cyanidin-3-glucoside suppresses TNF- α -induced cell proliferation through the repression of Nox activator 1 in mouse vascular smooth muscle cells: involvement of the STAT3 signaling [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 362(1–2): 211–8.
- [11] Kerbel R S. Tumor angiogenesis: past, present and the near future [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(3): 505–15.
- [12] Pastene E, Troncoso M, Figueroa G, et al. Association between polymerization degree of apple peel polyphenols and inhibition of helicobacter pylori urease [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(2): 416–24.
- [13] Fuchs-Tarlovsky V. Role of antioxidants in cancer therapy [J]. *Nutrition*, 2013, 29(1): 15–21.
- [14] Zhang Y, Seeram N P, Lee R, et al. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(3): 670–5.
- [15] Nasri S, Roghani M, Baluchnejadmojarad T, et al. Vascular mechanisms of cyanidin-3-glucoside response in streptozotocin-diabetic rats [J]. *Pathophysiology*, 2011, 18(4): 273–8.
- [16] Murthy K N, Jayaprakasha G K, Patil B S. Cytotoxicity of obacunone and obacunone glucoside in human prostate cancer cells involves Akt-mediated programmed cell death [J]. *Toxicology*, 2015, 329: 88–97.

Effect of apple peel extract and its active components C3G on mouse's malignant breast tumour growth

Guo Qiang¹, Wang Xinyi², Zhu Qiping¹, et al

(¹Dept of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences; ²Dept of Clinical Medicine Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of the apple peel extract and its active ingredients cyanidin-3-glucoside (C3G) on malignant breast tumour growth *in vivo*. **Methods** C57BL/6 mouse breast cancer model was built to observe the effect of drinking apple peel juice on mouse breast tumour growth. IHC was used to analyze the differential expression of CD31 in the apple peel extract treated group and the control group. HPLC was used to analyze the chemical composition of apple peels extract. The effect of apple peel component C3G on blood vessels formation of mouse breast cancer cell line E0771 was investigated through 3D Matrigel. The effect of C3G on proliferation and migration of SVEC were determined *via* MTT and Transwell. **Results** 1% and 2% concentration of apple peel juice inhibited the tumour growth in mouse breast cancer model. The expression of CD31 in apple peel extract treated group was lower than that of control group indicated by IHC staining. C3G was one of the effective components of the apple peel extract through HPLC analysis. C3G inhibited the blood vessels formation of mouse breast cancer cell line E0771 indicated by 3D Matrigel. The migration of SVEC cells was inhibited by C3G. **Conclusion** The apple peel extract and its effective component C3G inhibit the tumour growth of mouse breast cancer, which is possibly achieved by inhibiting its angiogenesis.

Key words breast cancer; apple peel; cyanidin-3-glucoside