

175-184.

[9] 马俪珍,南庆贤,戴瑞彤. 冷却猪肉中腐败菌的分离、初步鉴定与初始菌相分析[J]. 天津农学院学报, 2006, 12(3): 39-43.

[10] McEVOYA J M, SHERIDANA J J, BLAIRB I S, et al. Microbial contamination on beef in relation to hygiene assessment based on criteria used in EU Decision 2001/471/EC [J]. Int J Food Microbiol, 2004, 92 : 217-225.

论著

β-胡萝卜素对人膀胱癌 T24 细胞凋亡和细胞间隙连接蛋白 43 表达的影响

吴志平¹, 赵晓昆², 吕晨², 杨明根², 肖宁²

(1. 贵州省贵阳医学院附属医院泌尿外科, 贵州 贵阳 550004;
2. 湖南省长沙市中南大学湘雅二医院泌尿外科, 湖南 长沙 410011)

摘要:目的 探讨 β-胡萝卜素抑制人膀胱癌 T24 细胞的分子生物学机制。方法 不同浓度的 β-胡萝卜素作用于 T24 细胞, 利用 MTT 法检测细胞增殖, 流式细胞术检测其凋亡指数, 半定量 RT-PCR 检测 Cx43、Bcl-2、Bax mRNA 的变化, Western blot 检测 Cx43、Bcl-2、Bax 蛋白的表达。结果 10 和 20 μmol/L 组 β-胡萝卜素均能明显抑制 T24 细胞的生长和诱导细胞凋亡, 其抑制率分别为 28.83%、63.02%, 并且呈明显的剂量-效应关系 ($P < 0.05$), 凋亡率分别为 0.126 ± 0.022 和 0.190 ± 0.024 ($P \leq 0.01$), 随 β-胡萝卜素浓度增加, 细胞凋亡率增大, 呈剂量依赖性关系 ($P = 0.002$)。与对照组相比, 10 和 20 μmol/L 组 β-胡萝卜素上调 Cx43 mRNA 及其蛋白的表达, 增强细胞间的细胞间隙连接通讯 (GJIC) 功能 ($P < 0.05$), 并且呈剂量依赖关系 ($P \leq 0.01$); 下调 Bcl-2 mRNA 及其蛋白的表达, 并且呈剂量依赖关系 ($P \leq 0.01$); Bax mRNA 及其蛋白的表达有上调趋势, 但与对照组比较, 差异无显著性。结论 β-胡萝卜素 (10, 20 μmol/L) 能通过有效下调 Bcl-2 mRNA 及其蛋白在 T24 细胞的表达, 上调 T24 细胞 Cx43 转录水平的表达、增强细胞间隙连接所介导的 GJIC 功能, 从而诱导膀胱肿瘤细胞凋亡, 抑制其生长。

关键词: β-胡萝卜素; 人膀胱癌 T24 细胞; Cx43; Bcl-2; Bax

中图分类号: R151.43 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2011)04-0301-06

Effects of beta-carotene on the apoptosis of human bladder cancer cell line T24 and the expression of its connexin 43

Wu Zhiping, Zhao Xiaokun, Lü Chen, Yang Minggen, Xiao Ning

(Department of Urology, Guiyang Medical College Affiliated Hospital, Guiyang 550004, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of molecular biology of beta-carotene on inhibiting the growth of human bladder cancer cell line T24. **Methods** The effect of different concentrations of beta-carotene (0, 5, 10 and 20 μmol/L) treated for 72 h on human bladder cancer T24 cells was evaluated by MTT assay and flow cytometry. Both Semi-quantitative RT-PCR and Western Blot were used to detect the expression of connexin 43 (Cx43), Bcl-2 and Bax mRNA. **Results** In beta-carotene treated groups at the concentration of 10 and 20 μmol/L, the proliferation of T24 cells could be inhibited and the apoptosis could be induced (28.83%, 63.02%, $P < 0.05$) significantly. The apoptotic index (AI) was 0.126 ± 0.022 and 0.190 ± 0.024 in the treated group, which was increased significantly in comparison with the control group ($P \leq 0.01$) and in a dose-response relationship ($P = 0.002$). In comparison with the control group, the expression of Cx43 mRNA and its protein could be up-regulated and the gap junctional intercellular communication (GJIC) of T24 cells could be enhanced in a dose-response relationship ($P < 0.05$), but the expression of Bcl-2 mRNA and its protein was down-regulated and in a dose-response relationship significantly ($P \leq 0.01$) in the beta-carotene treated groups. There was no

收稿日期: 2010-09-09

作者简介: 吴志平 男 博士/副教授

通信作者: 赵晓昆 男 教授/博士生导师 研究方向为泌尿系肿瘤

correlation was found between the expression of Bax mRNA and beta-carotene. **Conclusion** Through the effective down-regulation of the expression of Bcl-2, the up-regulation of the expression of Cx43, and the enhancement of the GJIC of T24 cells, the apoptosis of bladder tumor cells was induced by beta-carotene (10, 20 μmol/L), thereby the growth of bladder tumor cells could be inhibited. The experiment provided an evidence for the mechanism of beta-carotene on chemical prevention and treatment of bladder tumor.

Key words: Beta-carotene; human bladder cancer T24 cells; Cx43; Bcl-2; Bax

近年来的研究表明肿瘤的发生、发展与细胞凋亡失调,以及细胞间隙连接通讯(GJIC)异常有关^[1]。β-胡萝卜素的防癌抗癌作用已经被证实,其中包括膀胱移行细胞癌(BTCC)。本研究通过体外观察β-胡萝卜素对人膀胱癌细胞株T24细胞的生长、凋亡及间隙连接蛋白(Cx43)的表达和GJIC的影响,为BTCC的化学治疗提供新方案。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

人膀胱癌细胞株T24购自上海细胞典藏物中心。β-胡萝卜素购自Merck公司,纯度≥97%。四唑盐(MTT)购自Fluda公司,Annexin V/PI双染法试剂盒购自凯基生物制剂公司,兔抗人Bcl-2、Bax、Cx43单克隆抗体均购自Santa Cruz公司,人肌动蛋白(β-lactin)引物由上海生工生物工程公司合成,RT-PCR试剂盒(两步法)购自Promega公司,Western印迹、免疫印迹发光试剂盒购自Pierce公司。

1.2 细胞培养和处理

T24细胞置入含10%胎牛血清的DMEM培养液中,在37℃、5%的CO₂细胞培养箱内培养,取对数生长期的贴壁细胞用于实验,在培养液中加入终浓度分别为0.5、10、20 μmol/L的β-胡萝卜素,干预细胞72h后进行后续操作。

1.3 MTT分析法

取对数生长期T24细胞接种于96孔板,加入不同浓度的β-胡萝卜素(0.5、10、20 μmol/L)培养基,200 μl/孔,每组6复孔。加药后72h,吸去各孔中的培养液,加入DMEM培养基和0.5% MTT 20 μl,孵育4h。用酶标仪在490 nm波长下检测各孔的光密度。利用公式计算:生长抑制率(IR) = [1 - (实验组OD值/对照组OD值)] × 100%^[2]。

1.4 流式细胞术(Annexin V/PI双染法)检测细胞凋亡

培养细胞中分别加入不同浓度的β-胡萝卜素(0.5、10、20 μmol/L),72h后,胰蛋白酶消化细胞,冷PBS洗涤,离心后收集细胞。用1 × Annexin-binding buffer重悬细胞,调整细胞浓度为5 × 10⁵,加入5 μl Annexin V-FITC和1 μl 100 μg/ml PI,室温下孵育细胞15 min,加入400 μl × Annexin-binding

buffer,在冰面上混匀,上流式细胞仪检测肿瘤细胞凋亡指数。

1.5 半定量 RT-PCR 检测 Bcl-2、Bax、Cx43 基因的 mRNA 表达

1.5.1 引物设计

根据 Bcl-2、Bax、Cx43、β-lactin 的 mRNA 序列(genebank 序列号 NM_000633、NM_138764、NM_138712、NM_000165、NM_001101),应用在线引物设计软件 Primer 3 设计相关引物(见表 1)。

表 1 mRNA 序列引物设计
Table 1 Primer design of mRNA sequence

目的基因	片段长度 (bp)	引物序列
Bcl-2	335	上游:5'-AGGATTGTGGCCTTCTTTGACT-3'
		下游:5'-ACTGCTTTAGTGAACCTTTTGCAT-3'
Bax	318	上游:5'-catggagctcagaggatga-3'
		下游:5'-ctcccggaggaaagtcacat-3'
Cx43	309	上游:5'-CTATGTGATGCGAAAGGA-3'
		下游:5'-AGGAAACAGTCCACCTGA-3'
β-lactin	550	上游:5'-cgcgagaagatgacccagat-3'
		下游:5'-gcactgtgtggcgctacagg-3'

1.5.2 半定量 RT-PCR 检测

细胞总 RNA 的提取参照 Trizol 试剂的说明书进行。RT-PCR 按照 TaKaRa 两步法试剂盒的操作,以 Oligo-dT 为引物逆转录 cDNA 模板后,进行 PCR 反应。PCR 反应条件为 95℃ 预变性 5 min,之后 95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 60 s,循环 30 次,再 72℃ 10 min。PCR 结束后,分别取 5 ml 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,凝胶成像系统扫描,重复 3 次并计算 Bcl-2、Bax 及 Cx43 与 β-lactin 的比值来判断 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA 及 Cx43 mRNA 的相对表达水平。

1.6 Western blot 检测

收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,加入 5 倍细胞悬液体积的组织蛋白裂解液,13 000 r/min 离心 20 min。取上清液(细胞蛋白提取液)10 μl 加入等体积的 2 × 上样缓冲液混匀,煮沸 10 min,离心取上清。将变性后的总蛋白 100 μg 经电泳、转膜后,封闭液封闭 2 h,分别加入 1:500 稀释的兔抗人 Bcl-2、Bax、Cx43 单克隆抗体和 HRP 标记的羊抗兔

IgG, 室温孵育 1 h, 免疫印迹化学发光剂于暗室中胶片曝光和显影, 并通过凝胶成像系统分析处理目的基因 (Bcl-2、Bax、Cx43) 与 β-lactin 的光密度比值来衡量表达情况。重复 3 次。

1.7 数据分析

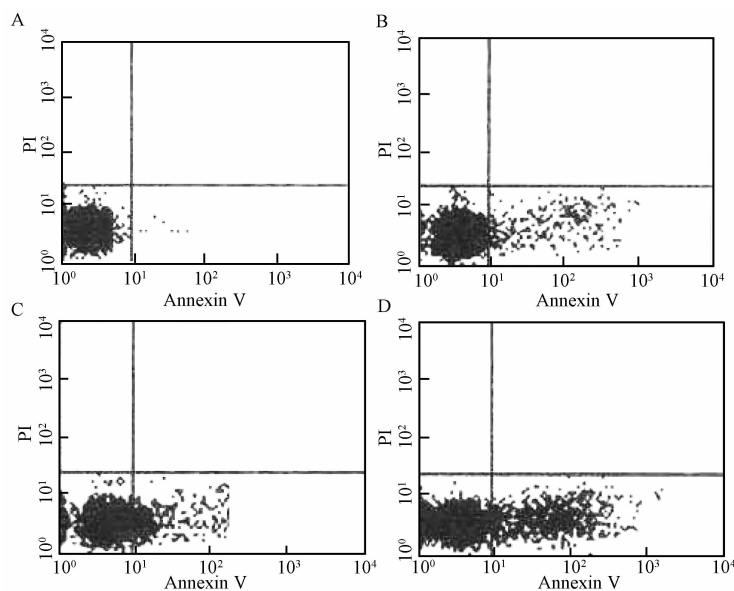
数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用 SPSS 13.0 统计软件包处理数据, 各组间比较应用单因素方差分析, *t* 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 β-胡萝卜素对人膀胱癌 T24 细胞生长抑制及凋亡的影响

MTT 法检测发现, 不同浓度组 (5、10、20 μmol/L) β-胡萝卜素作用于 T24 细胞 72 h 后, β-胡萝卜素对 T24 细胞的抑制率分别为 6.32%、28.83%、63.02%, 其中 10 和 20 μmol/L 组与对照组比较差异有统计学意义, 并且呈剂量-效应关系 ($r = 0.454, P < 0.05$), 提示 β-胡萝卜素对人膀胱癌 T24 细胞的生长有抑制作用。

流式细胞学检测发现, β-胡萝卜素各浓度组 (5、10、20 μmol/L) T24 细胞凋亡率高于对照组 ($P \leq 0.01$), 且呈剂量-效应关系 ($r = 0.651, P = 0.002$), 提示 β-胡萝卜素可诱导人膀胱癌 T24 细胞凋亡。见图 1, 表 2。



A: 对照组; B: 5 μmol/L; C: 10 μmol/L; D: 20 μmol/L

图 1 Annexin V/PI 双染法检测 β-胡萝卜素对 T24 细胞凋亡的诱导作用

Figure 1 Effects of beta-carotene on the apoptosis of T24 cells detected by Annexin V/PI double staining

表 2 不同浓度的 β-胡萝卜素对 T24 细胞生长抑制及凋亡的影响

Table 2 Effects of beta-carotene on the proliferation and apoptosis of T24 cells

组别	β-胡萝卜素 (μmol/L)	OD 值	抑制率 (%)	凋亡指数 (AI)
对照组	0	0.822 ± 0.033	0	0.013 ± 0.006
低剂量组	5	0.770 ± 0.021	6.32	0.065 ± 0.018 ^b
中剂量组	10	0.585 ± 0.057 ^a	28.83	0.126 ± 0.022 ^b
高剂量组	20	0.256 ± 0.045 ^a	63.02	0.190 ± 0.024 ^b

注: ^a与对照组比较, $P < 0.05$; ^b与对照组比较, $P \leq 0.01$ 。

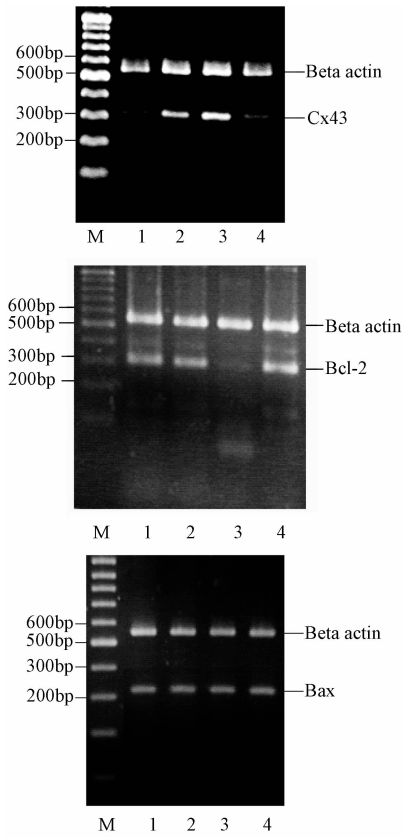
2.2 半定量 RT-PCR 检测 T24 细胞中 Cx43、Bcl-2 及 Bax 基因的表达

RT-PCR 扩增 3 组细胞中的 Cx43、Bcl-2、Bax 基因, 扩增产物经凝胶图像分析仪分析电泳结果 (图 2), 并分析其表达比值 (OD 比值) (表 3)。与对照组比较, 低剂量组 (5 μmol/L) β-胡萝卜素处理 T24 细胞后, Cx43 基因表达未上调, 中高剂量组 (10, 20

μmol/L) Cx43 基因的表达明显上调, 并且呈剂量效应关系 ($P < 0.01$)。Bcl-2 基因在中高剂量组 (10, 20 μmol/L) 表达下调, 并且呈剂量效应关系 ($P < 0.01$), 低剂量组 (5 μmol/L) 则无 Bcl-2 基因表达的下调。不同浓度组 Bax mRNA 的表达有上调趋势, 但与对照组比较, 差异无显著性。

2.3 Western blot 检测 T24 细胞内的 Cx43、Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达

T24 细胞内的 Cx43、Bcl-2 及 Bax 蛋白凝胶电泳分析结果见图 3。Cx43 基因在蛋白表达水平上随 β-胡萝卜素浓度的增高而增高, 并且呈剂量-效应关系, 10、20 μmol/L 组与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$), 10 及 20 μmol/L 组间比较差异有显著性 ($P = 0.01$)。Bcl-2 基因在蛋白表达水平上随 β-胡萝卜素浓度的增高表达逐渐下降, 并且呈剂量-效应关系, 10 及 20 μmol/L 组低于对照组 ($P < 0.01$), 10 及 20 μmol/L 组间比较差异有显著性 ($P = 0.01$)。



1:5 $\mu\text{mol/L}$; 2:10 $\mu\text{mol/L}$;
3:20 $\mu\text{mol/L}$; 4:对照组; M:标记
图 2 各组细胞 Cx43、Bcl-2、
Bax mRNA 表达的 RT-PCR 凝胶电泳图

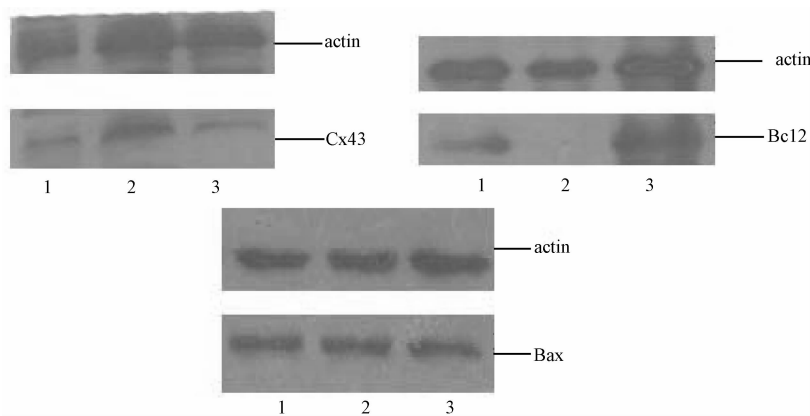
Figure 2 RT-PCR electrophoresis for the expression of Cx43, Bcl-2 and Bax mRNA

表 3 各组细胞 Cx43、Bcl-2、Bax mRNA 的表达(OD 比值)

Table 3 Expression of Cx43, Bcl-2 and Bax mRNA (OD ratio)

组别	β -胡萝卜素 ($\mu\text{mol/L}$)	Cx43 mRNA	Bcl-2 mRNA	Bax mRNA
对照组	0	0.243 \pm 0.025	0.670 \pm 0.050	0.647 \pm 0.085
低剂量组	5	0.290 \pm 0.050	0.623 \pm 0.045	0.642 \pm 0.081 ^b
中剂量组	10	0.443 \pm 0.050 ^a	0.443 \pm 0.045 ^a	0.661 \pm 0.115 ^b
高剂量组	20	0.647 \pm 0.055 ^a	0.193 \pm 0.031 ^a	0.704 \pm 0.053 ^b

注:^a与对照组比较, $P < 0.01$; ^b与对照组比较, $P > 0.05$ 。



1:10 $\mu\text{mol/L}$; 2:20 $\mu\text{mol/L}$; 3:对照组

图 3 各组细胞 Cx43、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的 Western blot 条带图

Figure 3 Western blot electrophoresis for the expression of Cx43, Bcl-2 and Bax protein

Bax 基因在蛋白表达水平上在 β -胡萝卜素各浓度组有上调趋势,但差异无统计学意义。

3 讨论

β -胡萝卜素的抗癌作用已被广泛承认,但其作用机制或分子生物学机制尚未完全阐明。许多体外实验已证实 β -胡萝卜素具有抑制肿瘤细胞生长及诱导肿瘤细胞凋亡的作用。张亚楼等^[3]采用体外细胞培养技术发现 β -胡萝卜素对人肝癌细胞、宫颈癌细胞及肾癌细胞均有抑制生长作用。本研究通过 MTT 法发现不同浓度的 β -胡萝卜素均可抑制人膀胱癌细胞株 T24 细胞的生长,而且存在剂量-效应关系。细胞处理 72 h 后,低浓度组无显著性,但高浓度组有明显的抑制作用,细胞生长密度抑制率 6.32% ~ 63.02% ($P < 0.05$)。通过流式细胞技术,发现不同剂量的 β -胡萝卜素均可显著抑制 T24 细胞的生长并诱导其凋亡,并且其作用均随 β -胡萝卜素浓度的增加而增强,表现出剂量依赖性,高浓度组 T24 细胞的凋亡率达 19.0%, β -胡萝卜素浓度越高,凋亡细胞越多。

实验证明^[4],如将能抑制 Bcl-2 基因的另一基因转录入肿瘤细胞内,肿瘤细胞则发生凋亡。在各种原因诱导的凋亡通路中,Bcl-2 的作用处于核心地位^[5,6],而多种化疗药物能下调 Bcl-2 水平,诱导凋亡的发生^[7]。Bax 基因是促凋亡基因,具有对抗 Bcl-2 蛋白抑制细胞凋亡的作用和直接促进细胞凋

表 4 Western blot 检测各组细胞 Cx43、Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达(OD 比值)
Table 4 Expression of Cx43, Bcl-2 and Bax protein detected by Western blot (OD ratio)

组别	β-胡萝卜素 (μmol/L)	Cx43	Bcl-2	Bax
对照组	0	0.133 ± 0.032	0.982 ± 0.157	0.786 ± 0.052
中剂量组	10	0.217 ± 0.026 ^a	0.441 ± 0.038 ^a	0.796 ± 0.035
高剂量组	20	0.416 ± 0.048 ^a	0.152 ± 0.037 ^a	0.826 ± 0.032

注:^a与对照组比较, $P < 0.05$ 。

亡的功能。体内的 Bax 通常是与 Bcl-2 以二聚体形式发挥作用。Korkolopoulou 等^[8]通过对 BTCC 的研究发现 Bax 在正常膀胱组织与癌组织都表达,而且与肿瘤的分级分期无关。因此 Bcl-2 或 Bcl-2/Bax 比值可能在膀胱癌的恶性进展中起重要作用。本实验采用 RT-PCR 技术及 Western blot 技术研究 β-胡萝卜素对人膀胱癌细胞株 T24 细胞中 Bcl-2、Bax 基因表达的影响。结果显示经 β-胡萝卜素处理后, T24 细胞中 Bcl-2 mRNA 的表达减少, Bax 的表达有增高,但无明显差异,说明 Bcl-2 基因的下调或 Bcl-2/Bax 表达比值的下调可能是 β-胡萝卜素对 T24 细胞增殖抑制,诱导细胞凋亡的一个重要环节。

细胞凋亡的发生需要凋亡信号在细胞间传递或转导,凋亡信号的传递或转导涉及一系列基因表达的级联反应。GJIC 是细胞间近距离信号传递的主要方式,调控着细胞的新陈代谢、增殖、分化等生理过程,对机体的代谢平衡及生长发育有重要意义。近年来,国内外对 GJIC 与癌变的关系进行了大量研究,认为 GJIC 异常可能是癌症发生的重要机制之一^[1]。GJIC 的功能调节主要依赖间隙连接蛋白(connexin, Cx)的表达, Cx 是组成间隙连接的基本单位,其异常表达导致的细胞间功能缺陷与多种肿瘤的恶性增殖和转化密切相关^[9,10],其中 Cx43 则是间隙连接蛋白家族中分布最广、研究最多的成员,在正常乳腺、膀胱等组织中均有表达,其异常表达与多种肿瘤的发生有关^[11,12],其中包括膀胱移行细胞癌。Laird 等^[13]在对乳腺癌的研究中发现 GJIC 功能的恢复能够抑制肿瘤细胞的生长及增殖,而达到抑癌目的。Bertram 等^[14]研究发现 β-胡萝卜素、番茄红素等可以抑制 3-甲基胆蒎(MCA)诱导的 C3H10T1/2 细胞转化,及 β-胡萝卜素可使转化细胞与未转化的正常细胞之间的细胞间隙连接通讯功能得到恢复,从而降低转化细胞的恶性增殖,阻止转化型的表达,并进一步发现经类胡萝卜素处理的细胞其编码间隙连接蛋白的控制基因 Cx43 mRNA 明显升高,膜上 Cx43 蛋白形成的细胞间隙连接数量明显增加,荧光探针检测发现细胞的 GJIC 功能恢复。朱俊东等^[15]通过 β-胡萝卜素对促癌剂抑制细胞间隙连接通讯的研究发现,不同浓度的 β-胡萝卜素处理 NIH/3T3 细胞,其间隙连接通讯功能表现为增强趋势,细胞间隙连接通讯功能得到一定程度的

恢复。王强等^[16]研究发现 β-胡萝卜素能显著上调细胞间隙连接通讯功能、抑制恶性细胞生长。本实验采用 RT-PCR 技术及 Western blot 技术研究发现, β-胡萝卜素明显上调 T24 细胞 Cx43 的表达,而且表现为剂量-效应相关,对细胞间隙连接通讯具有较强的促进作用,而抑制 T24 细胞的生长。这些研究说明 β-胡萝卜素上调细胞间隙连接通讯功能可能是抑制肿瘤细胞增殖的途径之一。

本研究结果表明 β-胡萝卜素能通过有效促进 T24 细胞 Cx43 的表达和间隙连接形成、恢复细胞 GJIC 功能、下调 Bcl-2 以及 Bcl-2/Bax 的表达,促进细胞凋亡和向正常细胞转化,从而抑制膀胱肿瘤细胞的生长,为进一步阐明 β-胡萝卜素防治膀胱肿瘤的作用机制提供了实验依据,但其影响 Cx43 表达的分子机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] MESNIL M, CRESPIAN S, AVANZO J L, et al. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1719: 125-145.
- [2] LIANG Y C, LIN-SHIAU S Y, CHEN C F, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as induction of Cdk inhibitors P21 and P27 during growth arrest of human breast carcinoma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate [J]. *J Cell Biochem*, 1999, 75(1): 1-12.
- [3] 张亚楼, 张月明, 刘命宝, 等. β-胡萝卜素与番茄红素体外抗肿瘤作用研究[J]. *新疆医科大学学报*, 2002, 25(1): 32-34.
- [4] KEITH F J, BRADBURY D A, ZHU Y M, et al. Inhibition of bcl-2 with antisense oligonucleotides induces apoptosis and increases the sensitivity of AML blasts to Ara-C [J]. *Leukemia*, 1995, 9: 131-138.
- [5] NIEVES-NEIRA W, POMMIER Y. Apoptotic response to camptothecin and 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in the 8 human breast cancer cell lines with topoisomerase I, protein kinase C, Bcl-2, p53, MDM-2 and caspase pathways [J]. *Int J Cancer*, 1999, 82: 396-404.
- [6] OLTVAL Z N, MILLIMAN C, KORSMEYER S J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death [J]. *Cell*, 1997, 74: 609-619.
- [7] KRAJEWSKIS, KRAJEWSKA M, SHABAIK A. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2 [J]. *Am J Pathol*, 1994, 145: 1323-1336.
- [8] KORKOLOPOULOU P, LAZARIS A C, KONSTANTINIDOU A E, et al. Differential expression of bcl-2 family proteins in bladder carcinomas relationship with apoptotic rate and survival [J]. *Eur*

Urol,2002,41:274-283.

[9] ANDRADE-ROZENTAL A F, ROZENTAL R, Hopperstad M G, et al. Gap junctions: the “kiss of death” and the “kiss of life” [J]. Brain Res Rev, 2000, 32:308.

[10] WILSON M R, CLOSE T W, TROSKO J E. Cell Population dynamics(apoptosis, mitosis, and cell-cell communication) during disruption of homeostasis[J]. Exp Cell Res, 2000, 254:257-268.

[11] GROSSMAN H B, LIEBERT M, LEE I W, et al. Decreased connexin expression and intercellular communication in human bladder cancer cells[J]. Cancer Res, 1994, 54, 3062-3065.

[12] SUI G P, ROTHERY S, DUPONT E, et al. Gap junctions and connexin expression in human suburothelial interstitial cells[J]. BJU Int, 2002, 90:118-129.

[13] LAIRD D W, FISTOURIS P, BATIST G, et al. Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors[J]. Cancer Res, 1999, 59:4104-4110.

[14] BERTRAM J S, PUNG A, CHURLEY M. Divers carotenoids protect from chemically- induced neoplastic transformation in IOTH2 Cells[J]. Carcinogenesis, 1991, 12:671-677.

[15] 朱俊东, 陈升, 糜漫天, 等. β-胡萝卜素对促癌剂抑制细胞间隙连接通讯的影响[J]. 第三军医大学学报, 1996, 4:324-326.

[16] 王强, 吕飞杰, 张涛, 等. 天然类胡萝卜素抑制细胞恶性转化机理的初步研究[J]. 食品科学, 2000, 12:46-47.

论著

欧洲越橘类保健食品中花色苷含量测定方法的研究

段玮, 唐荣华, 田青青, 吴青, 陈波

(湖南师范大学化学生物学及中药分析教育部重点实验室, 湖南 长沙 410081)

摘要:目的 建立一种快速、简单测定欧洲越橘类保健食品中花色苷的方法。方法 将样品回流水解,使花色苷水解成花色苷元,用高效液相色谱法对苷元矢车菊素进行定性及定量分析,以矢车菊素含量表征花色苷含量。采用 Xtimate C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm),流动相 A:0.4% 三氟乙酸(TFA)水溶液,流动相 B:0.4% TFA 乙腈,梯度洗脱,流速 1 ml/min,检测波长 190 ~ 800 nm,柱温 35 °C。结果 矢车菊素在 2 ~ 100 μg/ml 范围内线性良好, r = 0.999 9,平均加标回收率为 95.1% ~ 97.2%,检出限为 0.005 μg/ml。结论 该法简便、准确、灵敏度高,是快速测定欧洲越橘类保健食品中花色苷含量较合适的方法。

关键词:保健食品;花色苷;矢车菊素;高效液相色谱;欧洲越橘类(蓝莓)

中图分类号:O657.72 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)04-0306-05

Determination of anthocyanins in fuction food containing European bilberry

Duan Wei, Tang Ronghua, Tian Qingqing, Wu Qing, Chen Bo

(Key Laboratory of Ministry of Education on Chemical Biology and Traditional Chinese Medicine Research, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: Objective To establish a rapid and simple method for the determination of anthocyanins in fuction foods. **Methods** Samples, after being hydrolyzed, were separated on a Xtimate C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm × 5 μm) with gradient elution. The mobile phases were A, 0.4% trifluoroacetic acid (TFA) in water, and B, 0.4% TFA in acetonitrile. Other chromatographic conditions were as follows: flow rate 1ml/min; column temperate 35 °C; and detection wavelength 190 – 800 nm. **Results** The concentration of cyanidin over a range of 2 – 100 μg/ml was in a good linearity. The correlation coefficient of the calibration curve was 0.999 9. The average recovery was 95.1% – 97.2%; the lowest detection limit of cyanidin was 0.005 μg/ml. **Conclusion** The method was simple, fast, sensitive and could be used to determine the contents of anthocyanins in fuction food containing bilberry.

Key words: Fuction food; anthocyanins; cyanidin; high performance liquid chromatography(HPLC); European bilberry

收稿日期: 2010-01-10

基金项目: 国家自然科学基金 (20927005); 国家“863”课题 (2010AA023001)

作者简介: 段玮 女 硕士生 研究方向为色谱与药物分析

通信作者: 陈波 男 教授 E-mail: dr-chenpo@vip. sina. com