

硒化麒麟菜多糖对肝癌细胞株生长和凋亡的影响

江振友¹, 刘 玥¹, 唐 渝², 岑颖洲², 王长军²

(暨南大学 1. 医学院微生物学与免疫学教研室; 2. 生命科学院化学系有机化学教研室, 广东 广州 510632)

摘 要:【目的】探讨硒化麒麟菜多糖在体外对肝癌 HepG2.2.15 细胞株生长和凋亡的作用及机制。【方法】处于生长期的人肝癌细胞 HepG2.2.15 分为 3 组, 对照组、硒化麒麟菜多糖组和顺氯铂组。用 MTT 法检测各组肿瘤细胞增殖的情况, 流式细胞仪检测细胞周期、细胞凋亡以及凋亡基因 Fas 的表达情况。【结果】硒化麒麟菜多糖在体外可抑制肿瘤细胞的增殖, 最高抑制率为 97.2%, 并且有时间依赖性。硒化麒麟菜多糖可阻滞肝癌 HepG2.2.15 细胞的生长使之停留在 S 和 G₂/M 期, 从而抑制了肿瘤细胞的增殖, 同时通过促进 Fas 表达 14.4% ± 0.11%, 明显高于对照组 1.5% ± 0.01% ($P < 0.05$), 从而诱导 HepG2.2.15 细胞凋亡。【结论】硒化麒麟菜多糖可能是通过阻滞肿瘤细胞的生长及诱导细胞凋亡等机制, 从而对肝癌细胞的增殖有一定的抑制作用。

关键词: 硒化麒麟菜多糖; 细胞周期; 细胞凋亡; Fas 基因

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2008)03-0270-04

Effect of Seleno-polysaccharide of Eucheuma on Growth and Apoptosis of Hepatoma Carcinoma Cell Strain

JIANG Zhen-you¹, LIU Yue¹, TANG Yu², CEN Ying-zhou², WANG Chang-jun²

(1. Department of Microbiology and Immunology, Medical College; 2. Department of Organic Chemistry, Life Science and Technology College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect of Seleno-polysaccharide on the growth and apoptosis of hepatoma carcinoma cell strain and its mechanism in vitro. 【Method】 Human hepatoma cells HepG2.2.15 in proliferative phase were divided into three groups: Control group, Seleno-polysaccharid group, and Cisplatin group. Proliferation of tumor cells in each group was tested by MTT method. Cell cycle, cell apoptosis, and expression of Fas gene of tumor cells in each group was detected by flow cytometer. 【Results】 seleno-polysaccharide inhibited the reduplication of hepatoma carcinoma cell displayed by dose-dependence and time-dependence. The inhibitive rate on proliferation of hepatoma cells by desacetylurvaricin reached up to 97.20%. Parts of the intrinsic mechanism might relate to the blockage of HepG2.2.15 cells at S and G₂/M period thus to inhibit tumour cell proliferation, and the induction of HepG2.2.15 apoptosis by promoting expression of Fas gene 14.4% ± 0.11% compared with control group 1.5% ± 0.01% ($P < 0.05$) obviously increased. 【Conclusion】 Seleno-polysaccharide of eucheuma can inhibit multiplication of hepatoma cell by slowing down cell and inducing cell apoptosis.

Key words: seleno-polysaccharide; cell cycle; cell apoptosis; fas gene

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(3):270-273, 277]

麒麟菜系红藻门、红翎菜科, 是一种热带红藻类海洋植物, 主要盛产于我国海南、广东、广西和东南亚沿海地区。麒麟菜除了含有蛋白质、脂肪、碳水化合物、维生素和矿物质等营养成分外, 更重要的是含调节人体生理作用的生物活性物质: 如海藻多糖、藻氨酸、高不饱和脂肪酸及多种微量元

素等, 据报道, 麒麟菜中的藻藻红素还具有抗肿瘤活性等功效^[1,2]。麒麟菜中锰(Mn)含量非常丰富, 而 Mn 是公认的抗癌元素, 可抑制肿瘤的生长, 这可能与麒麟菜抗肿瘤作用有关^[3]。硒是人体必需的微量元素, 是红细胞谷胱甘肽过氧化物酶的组成成分, 主要作用是参与了酶的合成, 保护细胞

收稿日期: 2007-07-13

基金项目: 广东省自然科学基金团队项目(039213); 广东省中医药局建设中医药强省科研课题(1060117)

作者简介: 江振友(1963-), 男, 安徽舒城人, 通讯作者, 副教授, 硕士生导师, E-mail: tjzhy@jnu.edu.cn

膜的结构和功能免受过度氧化损伤^[4,5];而且硒和维生素 E 相互作用可以起到抗癌的作用^[6]。

麒麟菜中提取出多糖成分、NaSeO₃ 以及坏血酸进行化学合成后,形成一种新的化合物称为硒化麒麟菜多糖。试验中采用 MTT 法,免疫荧光染色结合流式细胞仪来观察这种新合成的硒化麒麟菜多糖在体外对肝癌细胞株的影响,并探讨其可能的作用机制,并为海洋药物合成和开发提供可行性的资料和研究数据。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 硒化麒麟菜多糖用 PBS 配制成 4 mg/mL 的原液,用 0.1 mol/L 的 NaOH 调 pH 为 7.2,高压蒸汽灭菌,置 4 °C 冰箱备用,使用前用 RPMI 1640 液稀释;顺氯铂(DDP),齐鲁制药厂生产,批号(91)861-82,用 PBS 配置成 40 μg/mL 的浓度置冰箱备用;二甲基亚砜(DMSO,国产分析纯);甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium,MTT)、溴化乙锭(ethidium bromide,EB)、碘化丙锭(propidium iodide,PI)(Sigma 公司);异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate,FITC)标记鼠 IgG1、鼠抗人 Fas 单抗(美国 Caltag 实验室)。

1.1.2 仪器 水平离心机(上海医用分析仪器厂);恒温水浴箱(上海医用恒温设备厂);普通离心机(上海荣泰生化工程有限公司);电子天平(上海第二天平仪器厂),倒置相差显微镜(Olympus,日本);CO₂ 培养箱(Napco 5400,日本);SW-CJ-1B 型超净工作台(苏州苏净集团安泰公司);流式细胞仪(FACS);酶联免疫检测仪(Becton Dickinson 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 液氮冻存的肝癌 HepG2.2.15 细胞株(暨南大学微生物免疫教研室冻存)经复苏后培养于含 100 mL/L 新生牛血清、青霉素、链霉素各 100 U/mL 的 RPMI 1640 培养液中,在 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,每 3 d 用胰酶(质量分数为 0.25%)消化传代一次。

1.2.2 MTT 比色分析法测定硒化麒麟菜多糖对细胞增殖的影响 对数生长期细胞经胰酶消化 1 min 左右后,取 150 μL 接种于 96 孔板内,细胞终浓度为 1 × 10⁵/mL,CO₂ 培养箱中孵育一段时间后;实

验组将硒化多糖稀释成相应浓度梯度后,各孔中分别加入 50 μL,阴性对照组用等体积的培养液,另设不加细胞的空白对照组,每组设 8 个复孔。待细胞贴壁后,与受试物于 CO₂ 培养箱中分别培养 24 h,48 h 和 72 h,分别于培养结束前 4 h 每孔加 MTT 溶液(5 g/L)10 μL,继续培养 4 h 后弃上清,每孔加入 DMSO 150 μL,振荡器上充分混匀 10 min 待甲臜完全溶解后,在酶联免疫检测仪上以 570 nm 波长测定各孔光吸收值(OD 值)。计算不同药物对 HepG2.2.15 细胞的生长抑制率。计算生长率的公式:细胞生长抑制率=(对照组 OD 值-实验组 OD 值)/对照组 OD 值 × 100%^[7]。

1.2.3 流式细胞仪法检测硒化麒麟菜多糖对细胞周期和凋亡的影响 对数生长期的细胞,胰酶消化后,以 5 × 10⁴/mL 的密度传代、接种,贴壁后加入 RPMI 1640 培养基培养 24 h,分别加入硒化麒麟菜多糖、10 μg/mL 顺铂,设加等体积的培养液作为对照组;继续培养 48 h,胰酶消化成单细胞悬液,冰 PBS 洗涤 2 次,100 g 离心 5 min,弃上清,分别缓慢加入 -20 °C 预冷的乙醇和 PBS,4 °C 过夜。取细胞悬液,PBS 洗涤离心后流式细胞仪测定细胞周期、DNA 和 Fas 蛋白。

1.2.4 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS13.0 软件进行统计处理。采用单因素方差分析比较各试验组之间差异显著性。

2 结果

2.1 硒化麒麟菜多糖抑制 HepG2.2.15 细胞增殖

硒化麒麟菜多糖作用 HepG2.2.15 细胞 24、48 和 72 h 后,细胞的最高抑制率 97.20%,且增殖率显示出时间依赖性(表 1)。

2.2 硒化麒麟菜多糖对 HepG2.2.15 细胞周期的影响

FCM 检测结果显示:用硒化麒麟菜多糖作用 HepG2.2.15 细胞 48 h 后,细胞周期图中 G₁ 期细胞明显减少,S 期和 G₂/M 期的细胞有明显增加($P < 0.05$)。其作用结果与 DDP 组差异明显(图 1,表 2)。

2.3 硒化麒麟菜多糖诱导 HepG2.2.15 细胞凋亡

用硒化麒麟菜多糖作用 HepG2.2.15 细胞 48 h 后,细胞的凋亡数明显增加($P < 0.05$,表 3,图 2)。

2.4 硒化麒麟菜多糖诱导 HepG2.2.15 细胞 Fas 表达

表 1 各组 HepG2.2.15 细胞的 OD 值

Table 1 OD value of HepG2.2.15 cells in each group

(n=8, $\bar{x} \pm s$)

Group	24 h	48 h	72 h
Control group	0.2544 ± 0.0306	0.3755 ± 0.0030	0.5565 ± 0.0020
DDP group	0.1073 ± 0.0050 ¹⁾	0.0172 ± 0.0005 ¹⁾	0.0119 ± 0.0009 ¹⁾
Seleno-polysaccharide group(1 mg/mL)	0.0962 ± 0.0014 ¹⁾	0.0240 ± 0.0036 ¹⁾	0.0156 ± 0.0019 ¹⁾
Seleno-polysaccharide group(0.25 mg/mL)	0.1677 ± 0.0077 ¹⁾	0.0677 ± 0.0061 ¹⁾	0.0638 ± 0.0018 ¹⁾
Seleno-polysaccharide group(0.0625 mg/mL)	0.3035 ± 0.0061	0.1567 ± 0.0070 ¹⁾	0.1490 ± 0.0531 ¹⁾

1) P < 0.01 vs control group

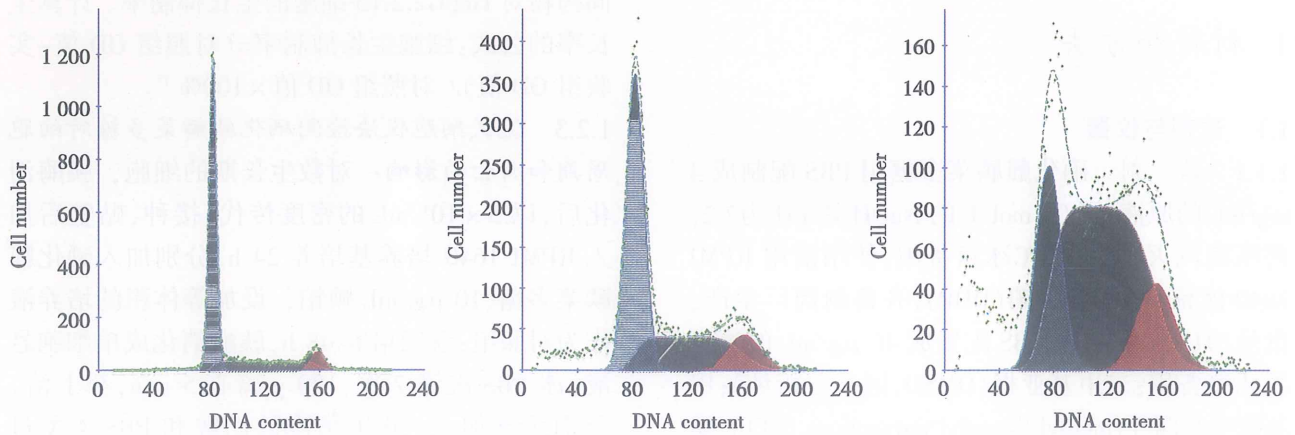


图 1 硒化麒麟菜多糖对 HepG2.2.15 细胞周期的影响

Fig.1 Effect of Seleno-polysaccharide on cell cycle of HepG2.2.15

表 2 硒化麒麟菜多糖对 HepG2.2.15 细胞周期的影响

Table 2 Effect of Seleno-polysaccharide on cell cycle of HepG2.2.15

Group	HepG2.2.15 (n=8, $\bar{x} \pm s$)		
	G ₁	S	G ₂ /M
Control	71.3 ± 0.7	21.4 ± 1.7	7.3 ± 0.5
DDP	57.3 ± 1.6 ¹⁾	50.7 ± 2.6 ¹⁾	12.1 ± 0.8 ¹⁾
Seleno-polysaccharide	23.0 ± 1.7 ¹⁾	62.7 ± 0.4 ¹⁾	14.3 ± 0.7 ¹⁾

1) P < 0.05 vs control group

表 3 硒化麒麟菜多糖诱导 HepG2.2.15 细胞凋亡

Table 3 Apoptosis of HepG2.2.15 cells induced by Seleno-polysaccharide

Group	Seleno-polysaccharide (n=8, $\bar{x} \pm s$)		
	Apoptosis cells	Total cells	Apoptosis rate(%)
Control	175 ± 11	12 000	1.5 ± 0.01
DDP	1331 ± 75	12 000	11.1 ± 0.08 ¹⁾
Seleno-polysaccharide	1723 ± 108	12 000	14.4 ± 0.11 ¹⁾

1) P < 0.05 vs control group

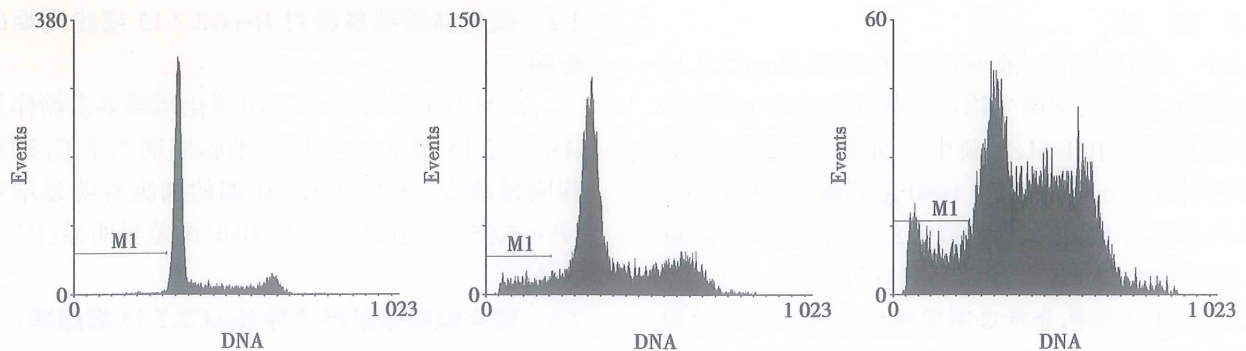


图 2 硒化麒麟菜多糖诱导 HepG2.2.15 细胞凋亡

Fig.2 Apoptosis of HepG2.2.15 cells induced by Seleno-polysaccharide

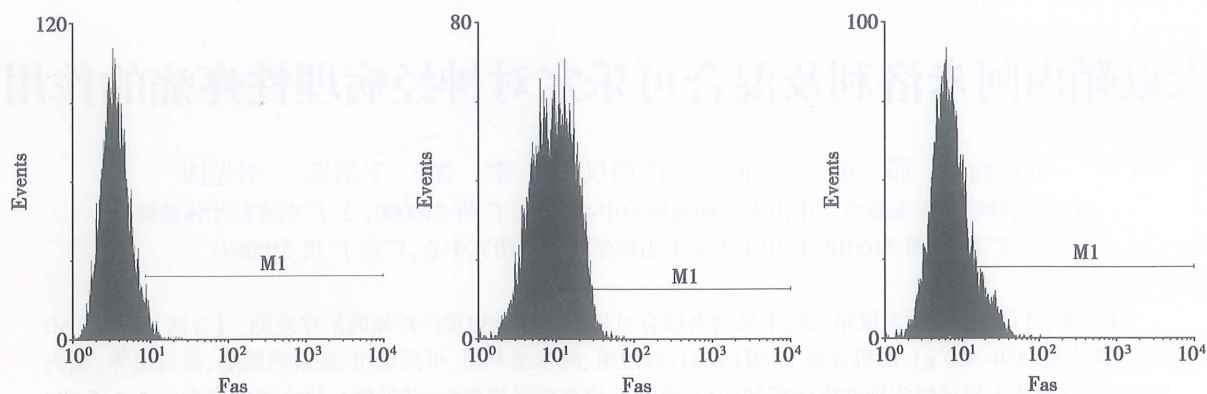


图3 硒化麒麟菜多糖诱导 HepG2.2.15 细胞 Fas 表达

Fig.3 Expression of Fas in HepG2.2.15 cells induced by Seleno-polysaccharide

表4 硒化麒麟菜多糖诱导 HepG2.2.15 细胞 Fas 表达
Table 4 Expression of Fas in HepG2.2.15 cells induced by Seleno-polysaccharide (n=8, $\bar{x} \pm s$)

Group	Fas positive cells	Total cells	Positive rate(%)
Control	276 ± 12	10 000	2.76 ± 0.12
DDP	5474 ± 25	10 000	54.71 ± 0.25 ¹⁾²⁾
Seleno-polysaccharide	2138 ± 13	10 000	21.38 ± 0.13 ¹⁾

1) $P < 0.01$ vs control group; 2) $P < 0.01$ vs control group

用硒化麒麟菜多糖作用 HepG2.2.15 细胞 48 h 后, 细胞 Fas 蛋白表达率明显增加 ($P < 0.05$, 图 3, 表 4)。

3 讨论

海藻多糖是海藻的重要组成部分, 主要是高分子碳水化合物。近年来研究表明, 海藻多糖具有多种生物活性和药用功能, 如增强免疫、细胞诱导分化, 以及抗肿瘤和抗病毒的作用等, 而且更多的实验证明海藻多糖能够提高机体免疫力, 这可能是海藻多糖抗肿瘤的主要原因。我们从海洋植物麒麟菜中用水提法提取出多糖, 乙醇沉淀后利用亚硒酸对多糖进行分子修饰合成后得到硒化麒麟菜多糖, 其中麒麟菜多糖可以高效地富集无机硒, 并通过生物转化作用使之成为有机硒, 得到的化合物称为硒化麒麟菜多糖。

根据报道硒化麒麟菜多糖中的麒麟菜多糖和硒都有抗肿瘤和促进细胞凋亡的作用^[8], 所以本研究我们以 HepG2.2.15 细胞株作为研究对象, 从肿瘤发生抑制和凋亡入手, 探讨硒化麒麟菜多糖在体外对肝癌细胞株生长及凋亡的影响。

肝癌 HepG2.2.15 细胞增殖情况的试验结果显示, 硒化麒麟菜多糖对 HepG2.2.15 细胞的增殖具有明显抑制作用, 并且随着时间的增加, 抑制率也增加。为进一步阐明硒化麒麟菜多糖抑制 HepG2.2.15 细胞增殖的机制, 我们从细胞周期角度进行深入研究。流式细胞仪检测细胞周期结果显示硒化麒麟菜多糖可减少 G₁ 期细胞数, 而 G₂/M 期及 S 期细胞数的细胞数明显增加, 表明改变了肿瘤细胞的增殖生长周期, 具有 S 和 G₂/M 期阻滞作用, 从而抑制了肿瘤细胞增殖。近年研究认为, 凋亡 (apoptosis) 是受基因调控的细胞固有的主动消亡过程, 在维持组织稳态中起着极其重要的作用, 细胞凋亡受阻是导致肿瘤发病和耐药的主要病理学基础之一^[9,10], 可能是肿瘤发生和发展的重要因素^[11], 肿瘤细胞的周期的改变通常和肿瘤细胞的凋亡有关。而检测细胞凋亡的结果显示硒化麒麟菜多糖可增加肿瘤细胞的凋亡率, 显示出硒化麒麟菜多糖良好的诱导凋亡作用。为进一步探讨硒化麒麟菜多糖诱导凋亡的机制, 我们选取了经典促凋亡基因 Fas^[12-13], Fas 受体的激活可以活化细胞内一系列的蛋白水解酶, 这些酶可破坏细胞内许多成分的结构和功能, 使得降解染色体 DNA 的核酸内切酶激活, 从而导致细胞凋亡。研究硒化麒麟菜多糖对 Fas 表达的影响。免疫荧光染色结合流式细胞仪检测 Fas 阳性细胞结果显示, 硒化麒麟菜多糖组较对照组 Fas 阳性细胞数增多, 表明硒化麒麟菜多糖可能通过激活 Fas 基因诱导肿瘤细胞凋亡, 重新恢复肿瘤细胞群体内存活与死亡的平衡。

本研究结果显示硒化麒麟菜多糖可阻滞肝癌

(下转 277 页 to page 277)