

褐藻多糖硫酸酯诱导肝癌细胞凋亡中氧化应激作用

杨丽丽 王培胜 滕洪明 刘志超 李巧梅 杨晓丹 邹向阳*

(大连医科大学生物技术系, 大连 116044)

摘要 探讨褐藻多糖硫酸酯(Fuoidan)在诱导肝癌SMMC-7721细胞凋亡中氧化应激的作用。采用MTT法检测细胞活性; 透射电镜观察细胞超微结构的变化; 采用流式细胞仪检测细胞凋亡率(AnnexinV/PI法); 采用分光光度法测定细胞内丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)的含量以及超氧化物歧化酶(SOD)的活性; 蛋白印迹法检测细胞中Bcl-2、Bax表达含量的变化。结果显示, Fuoidan抑制SMMC-7721细胞生长, 细胞表面连接减少, 染色质凝集, 细胞核固缩, 线粒体肿胀及数目减少, 呈现典型的凋亡形态; Fuoidan(1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作用48 h后, 细胞凋亡率达到40.7%; 细胞中超氧化物歧化酶(SOD)活性降低($P<0.05$), GSH含量显著降低($P<0.01$), MDA含量显著增加($P<0.01$); 细胞中Bcl-2蛋白减少, 而Bax蛋白水平呈增加趋势。提示Fuoidan诱导SMMC-7721细胞凋亡, 可能与细胞中还原型GSH耗竭, ROS过度积累致线粒体损伤, 从而启动内源性凋亡途径有关。

关键词 褐藻多糖硫酸酯; SMMC-7721细胞; 细胞凋亡; 氧化损伤

Oxidative Stress in Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma SMMC-7721 Cells Induced by Fuoidan

Yang Lili, Wang Peisheng, Teng Hongming, Liu Zhichao, Li Qiaomei, Yang Xiaodan, Zou Xiangyang*

(Department of Biotechnology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

Abstract To investigate the effect of fuoidan induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells and the possible mechanism, the cellular viability of fuoidan on the cells was assessed by MTT assays *in vitro*. The change of the cell ultrastructure was detected by using transmission electron microscopy. Cellular apoptosis was measured by flow cytometry. The levels of GSH, MDA and the activity of SOD in the cells for 24 h treated with fuoidan were detected by spectro photometric assays. Western blot was used to analyze the expression of Bcl-2 and Bax proteins. The results showed that, fuoidan could inhibit the cells growth. The cells exhibit typical apoptotic features, including chromatin condensation and marginalization, nuclear fragmentation, decrease in number, swelling and vacuolization of mitochondrion. After 48 h with treatment 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fuoidan, the apoptotic ratio was significantly higher in the cells as compared with the control, the levels of cytosolic GSH and MDA increased and the activity of SOD decreased significantly ($P<0.05$). The expression of Bcl-2 was lower, and that of Bax was higher compared with the control. Our results indicated that intracellular GSH depletion, ROS accumulation, mitochondria oxidative damage and Bcl-2 protein down-expression, maybe closely correlated with the cells apoptosis induced by fuoidan.

Key words fuoidan; human hepatocellular carcinoma cell SMMC-7721; cell apoptosis; oxidative damage

收稿日期: 2012-11-16 接受日期: 2013-01-05

辽宁省教育厅科技基金(批准号: 2009A199)和辽宁省科技厅计划项目基金(批准号: 2011225013)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0411-86110350, E-mail: zouxiangyang@126.com

Received: November 16, 2012 Received: January 5, 2013

This work was supported by Research Fund from Education Department of Liaoning Province of the People's Republic of China(Grant No.2009A199) and the Science and Technology Department Program of Liaoning Province of the People's Republic of China(Grant No.2011225013)

*Corresponding author. Tel: +86-411-86110350, E-mail: zouxiangyang@126.com

网络出版时间: 2013-03-25 14:57 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130325.1457.003.html>

褐藻多糖硫酸酯(fucoidan)是源于海洋褐藻的多糖类成分,为富含L-岩藻糖和硫酸基团的酸性杂多糖,具有抗肿瘤、抗病毒、提高机体免疫力等多种生物学功能。天然多糖能选择性地诱导肿瘤细胞凋亡,保护正常组织细胞,减少化疗引起的并发症,具有潜在应用前景。细胞凋亡异常与细胞过度增殖和分化受阻一样,在恶性肿瘤的发生与发展中占有同等重要地位。研究发现,在诱导肿瘤细胞凋亡过程中有还原性谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)耗竭现象,导致细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)在细胞中积蓄,过量的ROS作为细胞信号分子,通过多种途径传递凋亡信息,诱导细胞凋亡^[1-3]。本课题组已探讨了Fucoidan抗肿瘤血管新生作用,对肿瘤细胞直接杀伤以及提高荷瘤小鼠免疫力^[4-5]。本文研究Fucoidan对人肝癌SMMC-7721细胞内GSH、丙二醛(MDA)含量,活性氧自由基(ROS)以及超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响,探讨其诱导SMMC-7721细胞凋亡的机制。

1 材料与方 法

1.1 药品与主要试剂

RPMI-1640培养基(HyClone公司)、0.25%胰蛋白酶-EDTA(Gibco公司)、MTT(Sigma公司); 优级胎牛血清(天津灏洋生物制品科技有限公司)、GSH、MDA和SOD试剂盒(南京建成生物公司)、Annexin V/PI试剂盒和活性氧检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)。Fucoidan为本实验室提取^[4],纯度大于90%,总糖含量68.37%,硫酸根含量21%,糖醛酸10.895%,分子量104.356 kDa,比旋光度0.99°(20 °C)。实验时,以含10% FBS RPMI-1640培养基配制,0.22 μm微孔滤膜过滤,4 °C保存备用,2周内用完。

主要仪器:流式细胞仪(FACScan型,美国BD公司)、酶标仪(美国Thermo公司)、透射电子显微镜。

1.2 细胞系与细胞培养

肝癌SMMC-7721细胞(中国科学院上海生化细胞所),本室保存。细胞复苏后,置于含10%胎牛血清RPMI-1640培养基(青霉素和链霉素各100 U/mL),5% CO₂,37 °C培养。取对数生长期细胞用于实验(活细胞数大于90%),0.25%胰蛋白酶-EDTA消化,收集细胞,实验起始接种细胞浓度为1×10⁵/mL。

1.3 MTT法检测细胞活性

对数生长期的细胞接种于96孔板,每孔100 μL,

待细胞贴壁后,加入Fucoidan。实验组终浓度分别为250,500,1 000 μg/mL,设对照组。每组均设4个平行孔,继续培养至24,48,72 h。每孔加MTT(5 mg/mL)20 μL,混匀,继续培养4 h,离心弃上清,每孔加150 μL DMSO,震荡10 min,酶标仪测吸光度值(*D*₄₉₀)。

相对抑制率(%)=(1-实验组*D*值/对照组*D*值)×100%。

1.4 凋亡细胞形态学观察

对照组和实验组细胞经以上处理,24 h后倒置显微镜下观察细胞生长和形态学变化;细胞经戊二醛和锇酸双重固定,包埋,聚合,超薄切片机切片,醋酸枸橼酸染色,透射电镜观察细胞核、线粒体等超微结构形态学变化,随机照相记录。Hoechst33258染色后,荧光显微镜下观察细胞核的变化。

1.5 Annexin V/PI双染法检测细胞凋亡

采用Annexin V/PI双荧光标记、流式细胞术检测细胞凋亡变化。各组细胞处理24 h后,用0.25%胰蛋白酶消化,4 °C低速离心收集细胞,按照凋亡检测试剂盒说明书操作,Annexin V/PI双标记法,上机检测细胞凋亡,重复3次。CellQuest软件分析结果。

1.6 细胞内GSH、SOD、MDA和ROS检测

分别收集对照组与实验组细胞,制备细胞匀浆,按试剂盒说明书操作,检测细胞内GSH、MDA含量,以及SOD活性及细胞内ROS水平。

1.7 Western blot检测Bcl-2和Bax蛋白水平变化

Western blot法检测细胞内Bax和Bcl-2蛋白表达量,取对数生长期的人肝癌SMMC-7721细胞,调整细胞浓度至5×10⁴/mL,Fucoidan作用细胞24 h后,蛋白裂解液裂解各组细胞,取上清液,BCA法测量样品中总蛋白浓度。Gel-Pro凝胶分析软件进行条带吸光度分析,以目的蛋白与内参β-肌动蛋白条带吸光度的比值作为蛋白表达的相对含量。提取细胞总蛋白,Western印迹检测Bax和Bcl-2的表达情况。

1.8 统计学方法

采用SPSS 15.0软件对实验数据进行统计学处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用*t*检验,*P*<0.05为有统计学意义。

2 结果

2.1 Fucoidan对SMMC-7721细胞活性的影响

与对照组相比,Fucoidan对SMMC-7721细胞增殖有抑制作用,呈浓度和时间依赖关系(表1)。

2.2 Fucoidan对SMMC-7721细胞形态学的影响

Fucoidan处理细胞24 h后, 与对照组相比, 实验组细胞形态发生明显改变, 生长受阻, 细胞轮廓模糊, 胞体变圆, 细胞皱缩, 胞浆浓缩, 胞浆颗粒增多、增粗。细胞间隙变大, 与周围细胞失去结合并脱落, 可见细胞碎片及脱落细胞悬浮于培养液中。

细胞超微结构的变化: 对照组细胞圆形, 细胞表面有较多微绒毛样突起, 细胞核内染色质分布均匀, 常染色质丰富, 异染色质相对较少, 细胞质内线粒体丰富, 有少量核糖体和内质网。Fucoidan作用细胞 24 h后, 细胞体积相对缩小, 微绒毛样突起减少, 细胞核形状不规则, 固缩, 分散成若干部分, 染色质凝集、边聚, 线粒体丰富数量明显减少, 且呈现肿胀, 内质网断裂, 呈现典型的凋亡形态。Hoechst33258

染色也显示细胞核染色质浓缩(图1)。

2.3 Fucoidan对SMMC-7721细胞凋亡的影响

不同浓度Fucoidan作用肝癌细胞48 h后, 采用AnnexinV/PI双标记法, 流式细胞仪检测凋亡率(表2)。结果显示, 早期凋亡率较对照组明显增高($P<0.05$), 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组早期凋亡率较对照组明显增高($P<0.01$), 且百分率随Fucoidan浓度的升高而升高, 呈明显的剂量依赖性($P<0.05$)。

2.4 GSH、MDA水平和SOD活性变化

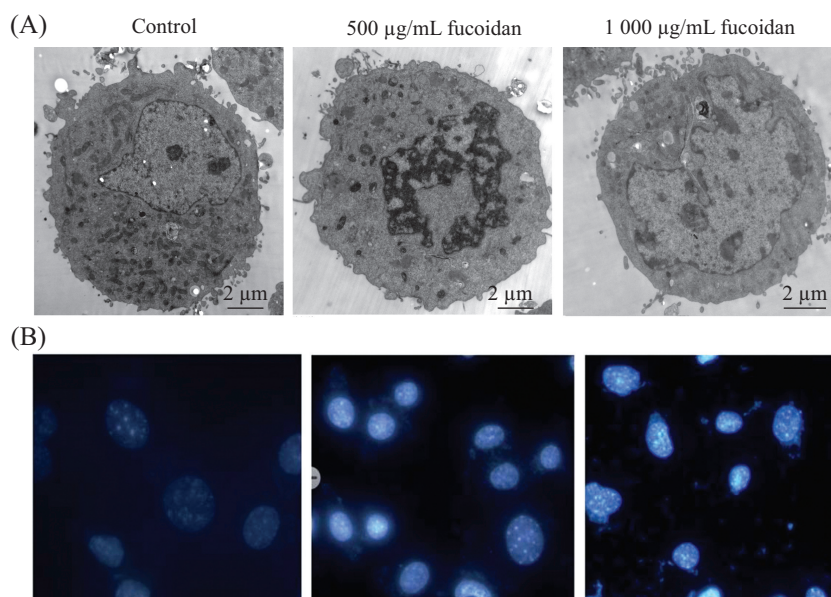
不同浓度Fucoidan作用肝癌细胞24 h后, 化学显色法检测SMMC-7721细胞内SOD活性和GSH、MDA含量变化(表3): 与对照组比较, 各实验组细胞内的SOD活性和GSH含量随Fucoidan浓度增加而明显下降($P<0.05$), 而脂质氧化产物MDA含量均明显

表1 Fucoidan对SMMC-7721细胞活性的影响
Table 1 Effect of fucoidan on cell viability in SMMC-7721 cells

褐藻多糖硫酸酯 Fucoidan($\mu\text{g/mL}$)	24 h		48 h		72 h	
	<i>D</i>	抑制率(%) Inhibitory rate(%)	<i>D</i>	抑制率(%) Inhibitory rate(%)	<i>D</i>	抑制率(%) Inhibitory rate(%)
0	0.198 \pm 0.015	—	0.135 \pm 0.025	—	0.155 \pm 0.012	—
250	0.175 \pm 0.044	10.12	0.109 \pm 0.144*	19.25	0.089 \pm 0.016*	42.58
500	0.163 \pm 0.005*	16.28	0.098 \pm 0.131*	29.85	0.066 \pm 0.011*	57.42
1 000	0.152 \pm 0.003*	21.93	0.056 \pm 0.004*	58.30	0.057 \pm 0.005*	63.23

* $P<0.05$, 与对照组相比。

* $P<0.05$ vs control group.



A: 细胞超微结构变化; B: Hoechst33258染色。

A: the changes of cell ultrastructure; B: Hoechst33258 staining.

图1 Fucoidan对SMMC-7721细胞形态变化的影响

Fig.1 Effect of fucoidan on SMMC-7721 cells morphological character

表2 Fucoidan对SMMC-7721细胞凋亡的影响

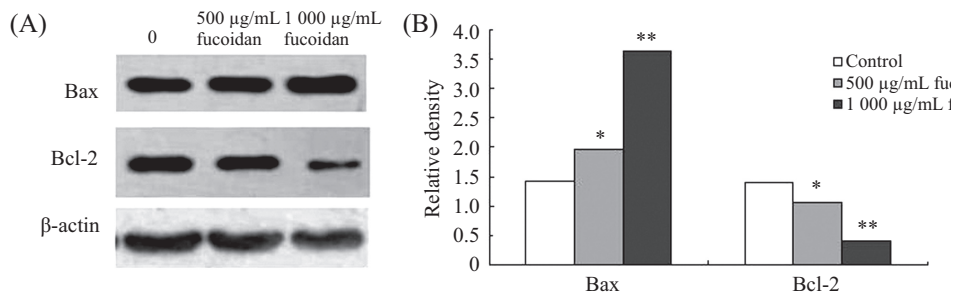
Table 2 Influence of apoptosis on SMMC-7721 cells by fucoidan

褐藻多糖硫酸酯 Fucoidan($\mu\text{g/mL}$)	早期凋亡率(%) Early apoptosis(%)	晚期凋亡率(%) Late apoptosis(%)	总凋亡率(%) Total apoptosis(%)
0	15.1	0.1	15.2
500	18.2	0.1	18.3
1 000	40.3	0.4	40.7

表3 Fucoidan引起细胞内GSH、MDA和ROS含量以及SOD活性的变化($\bar{x}\pm s$)

Table 3 The change of GSH, MDA, ROS levels and SOD activity in SMMC-7721 cells by fucoidan

褐藻多糖硫酸酯 Fucoidan($\mu\text{g/mL}$)	谷胱甘肽 GSH(mg/g prot)	超氧化物歧化酶 SOD(U/mg prot)	丙二醛 MDA(nmol/mg prot)	活性氧自由基 ROS(RFI)
0	190.34 \pm 3.89	49.37 \pm 4.83	8.34 \pm 0.64	100.00
500	140.59 \pm 2.93**	40.44 \pm 5.37*	10.37 \pm 4.97*	142.5 \pm 2.11*
1 000	128.57 \pm 3.65**	14.27 \pm 1.82**	14.93 \pm 5.82*	150.79 \pm 16.90*



A: Western blot结果; B: Gel-Pro分析灰度相对比值。

A: the results of Western blot; B: the relative rate of analysis of Gel-Pro gray.

图2 SMMC-7721细胞中Bax和Bcl-2蛋白表达的变化

Fig.2 The change of Bax and Bcl-2 expressions in SMMC-7721 cells effected by fucoidan

增加($P<0.05$), 呈剂量依赖性。其中GSH含量变化与对照组相比, 差异显著($P<0.01$)。各实验组ROS以相对荧光强度(relative fluorescent intensity, RFI)表示, 与对照组相比, 差异显著($P<0.05$)。

2.5 Bax和Bcl-2蛋白水平变化

用免疫印迹法检测SMMC-7721细胞内Bax和Bcl-2蛋白水平的变化(图2), 经Gel-Pro凝胶分析软件分析样品与内参蛋白灰度比值, 结果显示, Bcl-2降低, 而Bax蛋白的水平增加。浓度为1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的Fucoidan组与对照组相比差异极其显著。

3 讨论

原发性肝癌是临床最常见恶性肿瘤之一, 在肿瘤致死率中仅次于肺癌和胃癌, 严重威胁着人类生命健康^[6]。肝癌早期诊断困难, 肝癌细胞耐药性强和治疗选择性低等, 使临床治疗面临严峻挑战。近年

来研究表明, 一些抗肿瘤药物能够靶向不同途径促进细胞凋亡。肿瘤细胞中癌基因的过表达和异常激活可阻止凋亡以及降低对化疗药的敏感性^[7]。近年来研究发现在诱导肿瘤细胞凋亡中具有还原型GSH耗竭的现象, GSH水平与细胞凋亡密切相关。生长迅速的肿瘤细胞对GSH的需求量增加, 在肺癌、肝癌、乳腺癌、胰腺癌等肿瘤组织中显著高于正常组织, 这种升高仅能维持细胞生长的基本需求, 而正常细胞中的GSH水平远远高于代谢需求。一些肿瘤细胞中GSH下降10%, 可诱导细胞凋亡, 而正常细胞几乎不受影响, 即肿瘤细胞对GSH水平变化的敏感性显著大于正常细胞^[8-9]。

SOD是体内主要的对抗氧自由基的酶促防御系统, 如果SOD活性不足, 不能及时发挥抗氧化作用, 细胞就会受到活性氧(reactive oxygen species, ROS)的攻击, ROS在启动细胞凋亡过程中充当启动

子的角色。MDA作为ROS与生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的代谢产物,可间接反映组织中氧自由基含量以及细胞损伤的程度。本研究结果显示, Fucoidan诱导SMMC-7721细胞24 h后, 肝癌细胞内SOD活性和GSH水平明显下降, ROS和MDA含量均明显升高, 表明Fucoidan对于SMMC-7721细胞而言, 是较强的氧化应激诱导物, 具有耗竭GSH, 降低细胞内SOD活性, 促进ROS产生, 这种变化与细胞凋亡同步发生。

GSH耗竭造成肿瘤细胞中ROS的蓄积, 使细胞处于氧化应激状态。ROS对线粒体膜的氧化损伤, 特别是心磷脂的过氧化反应, 导致线粒体膜渗透性转运孔(permeability transition pore, PTP)开放^[10], 线粒体中的凋亡相关分子, 如细胞色素C、AIF、End G释放。细胞色素C与Apaf-1及procaspase-9结合形成复合物, 激活procaspase-9形成caspase-9, 进一步激活caspase-3; AIF和End G直接进入细胞核, 剪切DNA, 诱导细胞凋亡^[11]。因此, 细胞中ROS积蓄在抗肿瘤药物(如博来霉素、顺铂及蒽环类, 吡啶锰配合物等)诱导肿瘤细胞凋亡中发挥重要作用^[12-14]。500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Fucoidan处理细胞24 h后, 细胞生长明显受到抑制, 线粒体肿胀, 数目明显减少, 出现凋亡小体, 呈现典型的凋亡特征。AnnexinV/PI双标记流式细胞检测, 凋亡率为18.3%, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 凋亡率显著增高至40.7%。Fucoidan致SMMC-7721细胞中凋亡抑制蛋白Bcl-2显著降低同时促凋亡蛋白Bax水平显著增高。本研究首次对Fucoidan诱导SMMC-7721肝癌细胞凋亡中氧化应激的作用进行探究。经典的化疗药物大多通过DNA合成阻滞、影响细胞分裂时纺锤体微管的组建抑制细胞增殖, Fucoidan通过GSH耗竭, 以ROS为介导或直接启动细胞凋亡, 绕过了线粒体凋亡途径的上游阶段, 可单独与其他抗肿瘤药物协同使用, 逆转信号传导障碍引起的多药耐药, 提高对化疗药物敏感性, 有望成为一个新颖的抗肿瘤多糖药物。

参考文献 (References)

- 1 Wen J, You KR, Lee SY, Song CH, Kim DG. Oxidative stress-mediated apoptosis. *Biol Chem* 2002; 277(41): 38954-64.
- 2 Schnelldorfer T, Gansauge S, Gansauge F, Sophia S, Beger HG, Nussler AK. Glutathione depletion causes cell growth inhibition and enhanced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer* 2000; 89(7): 1440-7.
- 3 Huang ZZ, Chen CJ, Zeng ZH, Yang HP, Oh J, Chen LX, *et al.* Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration. *FASEB J* 2001; 15(1): 19-21.
- 4 Liu F, Wang J, Chang AK, Liu B, Yang L, Li Q, Wang P, Zou X. Fucoidan extract derived from *Undaria pinnatifida* inhibits angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells. *Phyto-medicine* 2012; 19(8/9): 797-803.
- 5 刘宪丽, 刘东颖, 汪艳秋, 杨丽丽, 杨晓丹, 吴荣杰, 等. 褐藻多糖硫酸酯免疫调节和抗肿瘤活性研究. *中国微生态学杂志*(Liu Xianli, Liu Dongying, Wang Yanqiu, Yang Lili, Yang Xiaodan, Wu Rongjie, *et al.* Immunoregulation and anti-tumor activity of fucoidan from *Undaria pinnatifida* *in vitro*. *Chinese Journal of Microecology*) 2010; 22(12): 1074-6.
- 6 Ye SL. Present status and evaluation of interventional therapy for primaryhepatocellular carcin. *Chin J Hepatology* 2002; 10(3): 165-6.
- 7 Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 1998; 281(5381): 1305-8.
- 8 Kasibhatla S, Tseng B. Why target apoptosis in cancer treatment? *Mol Cancer Ther* 2003; 2(6): 573-80.
- 9 Simizu S, Takada M, Umezawa K, Imoto M. Requirement of caspase-3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anti-cancer drugs. *J Biol Chem* 1998; 273(41): 26900-7.
- 10 Asumendi A, Morales MC, Alvarez A, Arechaga J, Yarza GP. Implication of mitochondria-derived ROS and cardiolipin peroxidation in N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis. *Br J Cancer* 2002; 86(12): 1951-6.
- 11 Davis W, Ronai Z, Tew KD. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *J Pharm Exper Ther* 2001; 296(1): 1-6.
- 12 Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 2004; 7(2): 97-110.
- 13 Kang D, Hamasaki N. Mitochondrial oxidative stress and mitochondrial DNA. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(10): 1281-8.
- 14 赵凯迪, 高静, 李香, 李瓚, 陈秋云. 吡啶锰配合物诱导肿瘤细胞死亡的作用及对线粒体功能的影响. *中国细胞生物学学报*(Zhao Kaidi, Gao Jing, Li Xiang, Li Zan, Chen Qiuyun. The activity of inducing cancer cell death and affecting mitochondrial function of a novel manganese-pyridine compound. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2012; 34(6): 544-54.