

刺五加多糖诱导人小细胞肺癌 H446 细胞凋亡

赵俊霞 闫永鑫 赵娟 王彦玲 闫蕴力*

(河北医科大学基础医学院细胞生物学教研室, 石家庄 050017)

摘要 研究刺五加多糖(*Acanthopanax senticosus polysaccharide*, ASPS) 诱导 H446 细胞凋亡及其可能的作用机制。采用 MTT 法检测 ASPS 对小细胞肺癌 H446 细胞增殖的抑制作用; Hoechst 33258 染色和流式细胞技术检测经 ASPS 处理后 H446 细胞凋亡的形态特征及凋亡率的变化; Western 印迹方法检测凋亡相关基因 *bax*、*bcl-2*、*p53* 表达的变化。MTT 分析表明, ASPS 作用 48 h 后可明显抑制 H446 细胞的增殖, 半数抑制浓度(IC₅₀ 值)为 476.36 μg/ml; Hoechst 染色结果: H446 细胞在 ASPS 诱导下出现典型的凋亡形态; 流式细胞术检测结果显示: 对照组及浓度为 240、480、960 μg/ml 药物处理组凋亡率分别是(5.02±0.4)%、(11.12±1.8)%、(19.89±2.5)%、(22.54±1.8)%; Western 印迹显示: 在 ASPS 的诱导下 *bax*、*p53* 的表达量提高, 而 *bcl-2* 的表达量下降。研究表明, ASPS 对 H446 细胞增殖有抑制作用, 并能促进其凋亡; ASPS 通过上调 *bax*、*p53* 表达, 下调 *bcl-2* 表达促进 H446 细胞凋亡。

关键词 刺五加多糖; 小细胞肺癌 H446 细胞株; *bax* 基因; *bcl-2* 基因; *p53* 基因

目前, 植物多糖广泛的生物活性已逐渐被人们认知, 其独特活性和来源的, 天然性在保障人体健康应用中具有很大潜力, 科学实验研究显示, 植物多糖具有许多生物活性功能, 包括免疫调节、抗肿瘤、降血糖、降血脂、抗辐射、抗菌抗病毒、保护肝脏等^[1]。因此对多糖的研究引起了国内外学者的广泛关注。刺五加多糖(*Acanthopanax senticosus polysaccharide*, ASPS) 是中药材刺五加主要药效活性成分之一, 是从中药刺五加的根皮中提取的多糖。近年来, 关于五加科植物及刺五加多糖抗肿瘤作用的研究已有报道, 吕晓英等^[2]发现, 红毛五加多糖能诱导人胃癌细胞凋亡。袁学千等^[3]报道, 刺五加多糖能使免疫器官的免疫细胞数目增加, 并能明显对抗环磷酰胺所致的免疫抑制作用。陈忠林等^[4]用刺五加多糖饲喂小鼠, 结果发现刺五加多糖对 S180 肉瘤小鼠抑瘤率达 30.42%~47.38%。但刺五加多糖对其他肿瘤的抑制作用尤其其抗肿瘤作用的机制尚未阐明。本文研究 ASPS 对人小细胞肺癌 H446 细胞株凋亡的诱导作用及可能的作用机制, 为开发利用中药资源提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 ASPS 粉剂 是由刺五加根皮经水提醇沉、

冷冻干燥方法得到的粗多糖, 纯度为 80%, 由河北师范大学生命科学学院生物化学与分子生物学系王立安教授惠赠。使用时用无血清培养基溶解后过滤除菌。

1.1.2 细胞株 人小细胞肺癌细胞系 H446 于 1982 年由美国国立肿瘤研究所建立, 本实验所用细胞购自中国协和医科大学细胞库。

1.1.3 试剂及仪器 RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司); 噻唑蓝(MTT) (北京华美公司); Hoechst 33258、一抗(*Bax*、*Bcl-2*、*P53* 小鼠抗人单克隆抗体, β -肌动蛋白兔抗人多克隆抗体)、二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠或抗兔 Ig) (美国 Santa Cruz 公司); 倒置显微镜, 荧光显微镜(日本 Olympus 公司); CO₂ 培养箱(日本 Hitachi 公司); DYY-III 7B 型电泳仪(北京六一仪器厂); 读胶仪 AlphaImager™1200 型(美国 ST 公司); PE480 型 DNA 扩增仪(美国 PE 公司); 酶标仪 ELX-800 (美国 Bio-Tek 公司); FACSTARCalibur 型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 H446 细胞采用含有 10% 血清、100 u/ml 青霉素、链霉素 100 μg/ml 的 RPMI 1640 培养基。置于 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度环境下培养。

1.2.2 MTT 法检测 ASPS 对 H446 细胞增殖的抑制

收稿日期: 2007-11-06 接受日期: 2007-12-26

通讯作者: Tel: 0311-86265558, E-mail: yanyl@hebm.edu.cn

作用 取对数生长期的细胞,以 1×10^5 个/ml细胞浓度接种于96孔培养板中,每孔加入100 μ l。24 h后加入100 μ l用无血清的RPMI1640培养基稀释的多糖,终浓度为25、50、100、200、400、800 μ g/ml。对照组加100 μ l无血清培养基。每组均做8个复孔。在药物作用48 h后,每孔加20 μ l 5 mg/ml MTT,继续培养4 h,2 000 r/min离心10 min,弃去上清液,每孔加150 μ l二甲基亚砜,震荡仪上震荡10 min,用酶标仪测490 nm的A值。根据下列公式计算抑制率:抑制率%=[(对照组A-实验组A)/对照组A]×100%,并根据以上结果用82798-IC50软件计算出ASPS作用的半数抑制浓度(IC₅₀)。实验重复3次。

1.2.3 Hoechst 33258 荧光染色观察细胞凋亡 取对数生长期的细胞,以 1×10^5 个/ml细胞浓度接种于24孔板中,每孔加入1 ml。24 h后加入1 ml用无血清的RPMI 1640培养基稀释的ASPS,终浓度为240、480、960 μ g/ml。对照组加1 ml无血清培养基。每组均做3个复孔,置培养箱中继续培养,48 h后,用PBS (pH 7.2)漂洗2次,多聚甲醛室温固定30 min,蒸馏水洗3次。Hoechst 33258 (5 mg/L)染色。30 min后蒸馏水漂洗除去染液,PBS、甘油(1:1)封片,荧光显微镜观察照相。

1.2.4 流式细胞技术(FCM)检测细胞凋亡率 取对数生长期的细胞,以 1×10^5 个/ml细胞浓度接种于培养瓶中,每瓶加入5 ml。24 h后加入5 ml用无血清的RPMI 1640培养基稀释的ASPS,终浓度为240、480、960 μ g/ml。对照组加5 ml无血清培养基。每组均做3个复瓶,置培养箱中继续培养48 h后,0.02% EDTA消化、离心,用冷PBS洗两次,70%乙醇固定细胞24 h。上机测定前离心去乙醇,用PBS洗两次,加100 μ g/ml RNase 37 °C消化30 min。50 μ g/ml碘化丙锭(propidium iodide, PI)染色30 min,经尼龙网过滤后,用FACSTARCalibur型流式细胞仪测定。实验结果经计算机软件ModFit LT2.0处理,计算凋亡率。

1.2.5 Western 印迹分析 细胞培养及处理同FCM检测法,48 h后,PBS洗涤2次,加入200 μ l预冷的细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, 1%NP-40, 0.5%脱氧胆酸钠, 0.1%SDS, 1 mmol/L

EDTA, 2 μ g/ml leptin, 1 mmol/L PMSF), 4 °C裂解60 min。测定蛋白质浓度。取50 μ g蛋白质样品加入等量上样缓冲液,经10% SDS-PAGE后,用水浴式电转移仪转至硝酸纤维素膜上(3 h)。经5% BSA 37 °C封闭1 h,分别加入(1:200)鼠抗人Bax、Bcl-2、P53一抗, β -肌动蛋白兔抗人一抗,4 °C温育过夜;TBS漂洗3次后,采用二抗(1:800羊抗鼠或抗兔HRP)标记,37 °C温育1 h。TBS漂洗3次后,ECL发光检测。X光胶片扫描后,采用UVP lab work 4.60软件测定条带光密度值,并分析结果。以目标基因与 β -肌动蛋白基因产物的吸光度比值计算表达水平。

1.2.6 统计学分析 数据处理运用SAS6.12统计学软件,采用t检验方法。实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 MTT 法检测药物对 H446 细胞增殖的抑制作用

由表1可见,随ASPS浓度的增加,ASPS对H446细胞增殖抑制作用增加,各药物处理组对H446细胞增殖的抑制率与对照组相比, $P < 0.01$,差异有统计学意义。

通过MTT实验结果(48 h的A值),计算ASPS作用的半数抑制浓度(IC₅₀值)为476.36 μ g/ml。

2.2 Hoechst 33258 荧光染色观察细胞凋亡的形态特征

图1(A)所示:对照组细胞的细胞核界限清晰,圆形或椭圆形,呈均匀蓝色荧光,染色质分布均匀。ASPS处理后的细胞,染色质分布不均匀,部分细胞细胞核缩小,染色质凝集,呈颗粒团状分布,有的核碎裂形成多个球形颗粒,图1(B)箭头所示。

2.3 FCM 检测细胞凋亡率

图2可见,对照组凋亡峰很低,随着ASPS处理浓度的加大,凋亡峰越来越明显。通过计算得出,对照组及240、480、960 μ g/ml ASPS处理组凋亡率分别是:(5.02±0.4)%,(11.12±1.8)%,(19.89±2.5)%,(22.54±1.8)%,各浓度药物处理组与对照组相比细胞凋亡率差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 ASPS 对细胞凋亡相关基因表达的影响

图3显示, β -肌动蛋白基因呈稳定表达,表达

表1 ASPS对H446细胞增殖抑制作用的量效关系($\bar{x} \pm s$, n=8)

浓度(μ g/ml)	对照	25	50	100	200	400	800
抑制率(%)	0	10.34±2.89*	15.03±2.49*	21.68±3.52*	35.06±4.36*	48.78±8.29*	58.71±4.59*

与对照组相比, * $P < 0.01$ 。

量不随药物处理变化, *bax*、*p53* 基因的表达产物随着 ASPS 处理浓度的增大, 条带明显变宽、变深。而 *bcl-2* 基因则呈现相反的结果。

采用凝胶图像分析法比较它们的荧光强度, 以目标基因与 β -肌动蛋白基因产物的吸光度比值计算表

达水平, 结果见表 2。由表 2 可见, *p53* 基因的表达对 ASPS 最敏感, 在 240 $\mu\text{g/ml}$ ASPS 处理时, 表达与对照组相比明显提高($P<0.01$), 但表达量与浓度依赖关系不明显; *bcl-2* 基因的表达 240 $\mu\text{g/ml}$ 药物处理组与对照组相比表达量下降($P<0.05$), 480、960 $\mu\text{g/ml}$ ASPS 处理组表达量明显降低($P<0.01$)。 *bax* 基因的表达 240 $\mu\text{g/ml}$ 药物处理组与对照组相比表达量上升($P<0.05$), 480、960 $\mu\text{g/ml}$ ASPS 处理组表达量明显增高($P<0.01$)。

3 讨论

小细胞肺癌是肺癌中的一种特殊类型, 肿瘤分化程度很低, 较早发生血行转移, 恶性程度较高, 手术治疗效果差, 虽然对化疗药物敏感, 但很快会产生抗药现象, 导致化疗的失败。目前临床上正在寻找其有效的化疗药物。

肿瘤的发生是细胞增殖与细胞凋亡相互拮抗的最终结果, 由于细胞凋亡的存在, 拮抗了细胞的加速增生, 维持自身稳定。临床上通过各种方法和手段来诱发肿瘤细胞发生凋亡, 从而达到治疗肿瘤目的。大量的研究表明, 多糖的抗肿瘤、免疫调节等多种活性均与细胞凋亡密切相关^[5]。本研究通过 MTT 法、FCM、Hoechst 33258 染色方法证实了 ASPS 能抑制人小细胞肺癌 H446 的增殖, 并使其呈现典型的凋亡特征, 随着处理多糖浓度的增大凋亡率呈上升趋势。据此推断诱导肿瘤细胞凋亡可能是 ASPS 抗

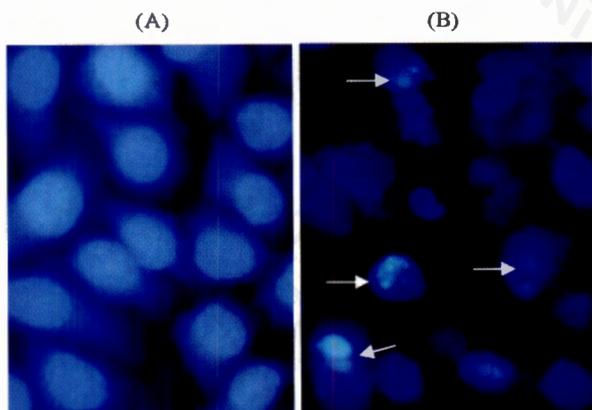


图 1 ASPS 诱导部分 H446 细胞发生凋亡 (400 \times)

A: 正常细胞核(对照); B: ASPS 处理后部分细胞出现凋亡现象(箭头所示)。

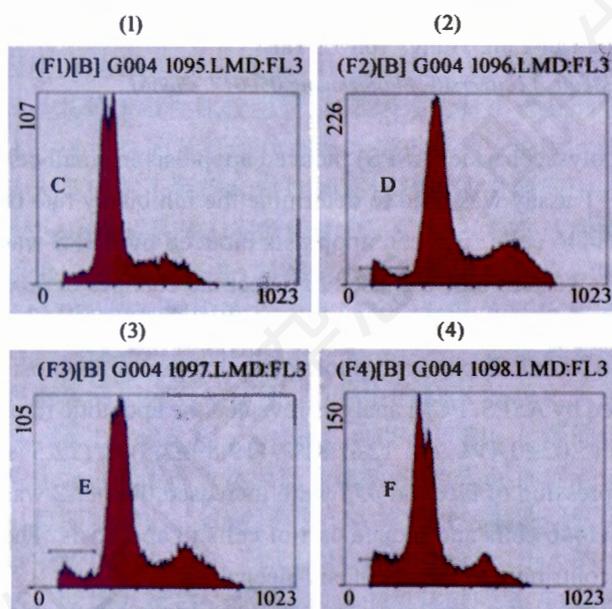


图 2 FCM 检测细胞凋亡率

1: 对照; 2: 240 $\mu\text{g/ml}$; 3: 480 $\mu\text{g/ml}$; 4: 960 $\mu\text{g/ml}$ 。

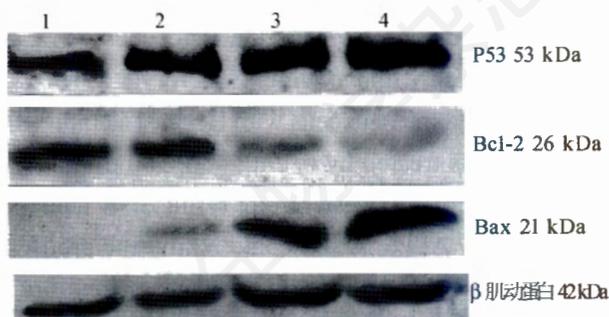


图 3 ASPS 对 H446 细胞 *p53*、*bcl-2*、*bax* 基因表达的影响

1: 对照; 2: 240 $\mu\text{g/ml}$; 3: 480 $\mu\text{g/ml}$; 4: 960 $\mu\text{g/ml}$ 。

表 2 Western 印迹测定 *p53*、*bcl-2*、*bax* 基因表达($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

基因	对照	240 $\mu\text{g/ml}$	480 $\mu\text{g/ml}$	960 $\mu\text{g/ml}$
<i>p53</i>	1.07 \pm 0.35	2.92 \pm 0.44**	2.52 \pm 0.39**	3.44 \pm 0.51**
<i>bcl-2</i>	1.27 \pm 0.22	1.06 \pm 0.32*	0.39 \pm 0.15**	0.38 \pm 0.13**
<i>bax</i>	0.45 \pm 0.15	0.66 \pm 0.16*	0.94 \pm 0.34**	2.13 \pm 0.43**
<i>bcl-2/bax</i>	2.82 \pm 0.41	2.30 \pm 0.37**	0.41 \pm 0.08**	0.18 \pm 0.05**

与对照组相比, ** $P<0.01$, * $P<0.05$ 。

肿瘤作用的重要机制。

bcl-2、*bax*、*p53* 是目前公认的参与细胞凋亡调控作用的重要基因。*bcl-2* 为凋亡抑制基因, 编码 Bcl-2, 可稳定细胞内质膜系统、抑制线粒体内离子及细胞色素 *c* 的释放从而抑制凋亡的发生; Bax 则具有对抗 Bcl-2 抑制细胞凋亡的作用, 可促进线粒体内细胞色素 *c* 的释放, 促进细胞凋亡产生。*bax* 过量表达, 细胞凋亡; *bcl-2* 过量表达, 细胞存活^[6,7]; *p53* 为抑癌基因, 在细胞生长过程中作为一种分子感受器, 当细胞内 DNA 受损时, P53 水平增高, 以终止增殖, 使受损细胞获得修复 DNA 的时间, 如无法修复, 则 P53 持续增高。*p53* 的过度表达, 既可以通过 *p21^{waf1}* 途径影响细胞周期, 也可以通过改变 *bax/bcl-2* 的表达, 引起 DNA 损伤和凋亡^[8]。

本研究发现, 经 ASPS 处理后的 H446 细胞与对

照组比较, 细胞内 *p53* 的表达明显增高, *bax* 表达也明显升高, 而 *bcl-2* 表达明显降低, Bcl-2/Bax 比值明显降低, 提示 ASPS 可能通过上调凋亡相关基因 *p53* 表达, 进一步引起 *bax* 的表达上调, *bcl-2* 表达下调, Bcl-2/Bax 比值明显降低从而诱导细胞凋亡。但 ASPS 对细胞凋亡其他方面的作用机制还有待进一步研究。

参考文献(Reference)

- [1] 徐晓飞等. 中国食物与营养, 2007, (1): 48
- [2] Lu X *et al.* Chin Med J (Engl), 2002, 115: 716
- [3] 袁学千等. 中医药学报, 2004, 32: 48
- [4] 陈忠林等. 中华实用中西医杂志, 2005, 18: 578
- [5] 周 怡等. 中草药, 2007, 38: 623
- [6] 朱国萍等. 细胞生物学杂志, 2001, 23: 20
- [7] Tsujimoto Y *et al.* FEBS Lett, 2000, 466: 6
- [8] Yu J *et al.* Biochem Biophys Res Comm, 2005, 331: 851

Induces Apoptosis of *Acanthopanax senticosus* Polysaccharides on H446 Cells

Jun-Xia Zhao, Yong-Xin Yan, Juan Zhao, Yan-Ling Wang, Yun-Li Yan*

(Cell Biology Department, Basic Medical College, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract To investigate *Acanthopanax senticosus* polysaccharide (ASPS) induced apoptosis in small cell lung cancer cell lines H446 and its potential mechanism. MTT assay was used to determine the inhibitory rate of ASPS with different concentrations on the proliferation of H446 cells. The cell apoptosis induced by ASPS was detected with Hoechst 33258 dye and flow cytometry (FCM). Western blot was used to detect the changes of *bax*, *bcl-2* and *p53* in protein levels in H446 cells. MTT assay showed that the proliferation of H446 cells were markedly inhibited after treatment with ASPS for 48 h; IC₅₀ was 476.36 μg/ml; Typical morphological changes of apoptosis were observed in H446 cells with Hoechst staining after induced by ASPS. FCM analysis revealed the apoptotic rates of H446 cells treated by 0, 240, 480, 960 μg/ml ASPS were (5.02±0.4)%, (11.12±1.8)%, (19.89±2.5)%, (22.54±1.8)% respectively. Western blot results indicated that the expression of *bax* and *p53* were increased but *bcl-2* was decreased by ASPS. ASPS could inhibit the proliferation of H446 cells and induce part of cells to apoptosis. The activation of *bax* and *p53* and the suppression of *bcl-2* may contribute to the apoptosis mechanism.

Key words *Acanthopanax senticosus* polysaccharide; small cell lung cancer cell lines (H446); *bax*; *p53*; *bcl-2*

Received: November 6, 2007 Accepted: December 26, 2007

*Corresponding author. Tel: 86-311-86265558, E-mail: yanyl@hebm.edu.cn