

螺旋藻多糖对肿瘤细胞生长及 HeLa 细胞早期凋亡作用的实验研究

于红¹, 吕锐¹, 张学成²

(1. 青岛大学医学院, 山东 青岛 266012; 2. 中国海洋大学生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要:采用 MTT 法(四甲基偶氮唑盐比色法)研究了钝顶螺旋藻多糖(PSP)对 HeLa 细胞及 Hep G2 细胞生长的抑制作用。结果表明,随 PSP 浓度及培养时间的增加,肿瘤细胞存活率逐渐降低,抑制率逐渐增加,以 PSP40 mg/L 作用 72 h 最为显著。应用 Annexin V/PI 双染色流式细胞仪检测了早期 HeLa 细胞凋亡,未经 PSP 处理的正常 HeLa 细胞凋亡细胞极少,经 PSP 处理的细胞,凋亡细胞的百分比明显高于正常对照组,其作用随着剂量的增加和时间的延长而增强,具有量效关系和时效关系。结果说明 PSP 的抗肿瘤机制,除了诱导肿瘤细胞凋亡,还存在细胞毒性等其他机制,是多种机制共同作用的结果。

关键词:钝顶螺旋藻多糖;抗肿瘤作用;细胞凋亡;Annexin V/PI

中图分类号:R979

文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2008)01-0038-03

钝顶螺旋藻多糖(polysaccharides from *Spirulina platensis*, PSP)是从螺旋藻中提取的一种水溶性多糖类化合物,近几年研究表明:螺旋藻多糖是螺旋藻中具有抗肿瘤、抗辐射、抗病毒和免疫调节作用的重要生物活性物质^[1,2]。由于它对细胞无毒,明显不同于常用细胞毒类抗癌药,在发展新型药物中具有十分重要的意义,也是合成药所不具有的优点^[3,4]。因此,有必要系统地研究其抗肿瘤作用及机制。作者研究了钝顶螺旋藻多糖体外抗肿瘤作用及其诱导的 HeLa 细胞早期凋亡,为深入研究 PSP 抗肿瘤作用的机制奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 钝顶螺旋藻多糖

钝顶螺旋藻多糖由中国海洋大学生命学院提供,纯度达 92% 以上。以双蒸水配成 10 g/L 母液,过滤除菌,分装保存于 4℃。

1.2 细胞株

肿瘤细胞 HeLa 细胞株购自山东省医学科学院药物研究所,人肝癌细胞 Hep G2 细胞与人二倍体成纤维细胞均购自中国科学院上海细胞生物研究所,于 RPMF1640 基础培养液中加入 10% 的新生牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素,置 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养,3~4 d 传代 1 次。

1.3 主要试剂与仪器

细胞培养所用的 RPMF1640 干粉培养基为美

国 GIBCO 公司产品,新生牛血清为杭州四季青公司产品;四甲基偶氮唑盐(MTT)为 Sigma 公司产品,配制质量浓度为 5 g/L;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒为 Counter 公司产品;酶联免疫检测仪为 BIO-RAD 公司产品;流式细胞仪(EPICS XL)为 Beckman 公司产品。

1.4 PSP 对肿瘤细胞的抑制试验^[5]

分别取对数生长期的 HeLa 细胞和 Hep G2 细胞(5×10^4 / mL),加入 96 孔培养板中,24~48 h 后加入不同稀释度的 PSP(2.5, 5, 10, 20, 40 mg/L),并以正常人二倍体成纤维细胞作对照,每个浓度设 6 个复孔,置 37℃、5% CO₂ 孵箱中连续培养 48~72 h,培养结束前 4 h,每孔加入 MTT 20 μL,37℃ 培养箱中培养 4 h,离心弃上清后每孔加二甲基亚砷 200 μL,微量振荡器振荡 5 min,自动酶标读数仪比色(波长 570 nm),以 MTT 比色法测吸光度并计算药物对肿瘤细胞的抑制率。细胞存活率(%) = 药物组吸光度值 / 细胞对照组吸光度值 × 100%,抑制率(%) = 100% - 存活率。

收稿日期:2005-12-20;修回日期:2006-02-10

作者简介:于红(1965-),山东青岛人,博士,教授,研究方向:分子生物学与分子病毒学,电话:0532-83780025, E-mail: yuhong0532@126.com

1.5 Annexin V-FITC 标记检测早期细胞凋亡^[6,7]

培养细胞经胰酶消化、离心, PBS 洗涤, 制成单细胞悬液, 细胞数约 1×10^6 个 / mL, 每 100 μ L 细胞悬液加入 2.5 μ L 碘化丙啶(PI)和 5 μ L Annexin V-FITC, 轻轻混匀, 避光染色 10 min, 加入 150 μ L Binding buffer, 将样品加入流式细胞仪的样品室, 进行分析检测。实验分为不加 PSP 的正常 HeLa 细胞对照组和不同质量浓度 PSP(5, 10, 20, 40 mg/L)作用的实验组。

1.6 统计学处理

所有数据用 SPSS 11.0 统计软件处理, 多组数据比较采用方差分析, 两组间比较采用 *q* 检验。

2 结果

2.1 PSP 对 HeLa 细胞和 Hep G2 细胞生长的抑制作用

以质量浓度分别为 2.5, 5, 10, 20, 40 mg/L 的 PSP 作用 48 h 及 72 h。随药物浓度及培养时间的增加, 细胞存活率逐渐降低, 抑制率逐渐增加, 以 PSP 40 mg/L 作用 72 h 最为显著。而上述各浓度组 PSP 对人二倍体成纤维细胞无明显作用, 结果见图 1。

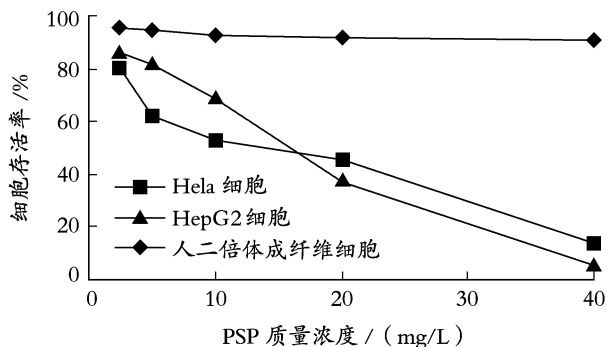


图 1 PSP 对 HeLa 细胞和 Hep G2 细胞生长的抑制作用 (72 h)
Fig. 1 Effects of PSP on the growth of HeLa cells and Hep G2 cells(72 h)

2.2 PSP 诱导 HeLa 细胞早期凋亡的量效关系

如图 2 所示, 细胞经 Annexin V / PI 双染色流式细胞仪检测, 在双变量 FCM 的散点图上, 左下象限 (D3) 显示正常活细胞, 为 FITC⁻ / PI⁻; 右下象限 (D4) 为晚期凋亡或坏死细胞, 为 FITC⁻ / PI⁺; 右上象限 (D2) 为细胞膜破损细胞, 渗入 PI, 为 FITC⁺ / PI⁺; 而左上象限 (D1) 为凋亡细胞, 为 FITC⁺ / PI⁻。未经过 PSP 处理的正常 HeLa 细胞多位于左下象限 (90.7%), 凋亡细胞极少 (1.39%), 经过 PSP 处理 12 h 的细胞多位于左上象限, 凋亡细胞的百分比分别为 30.3%、32.6%、34.8% 和 38.8%, 明显高于正常细胞对照组 (表 1), 差异有显著性 ($P < 0.05$)。

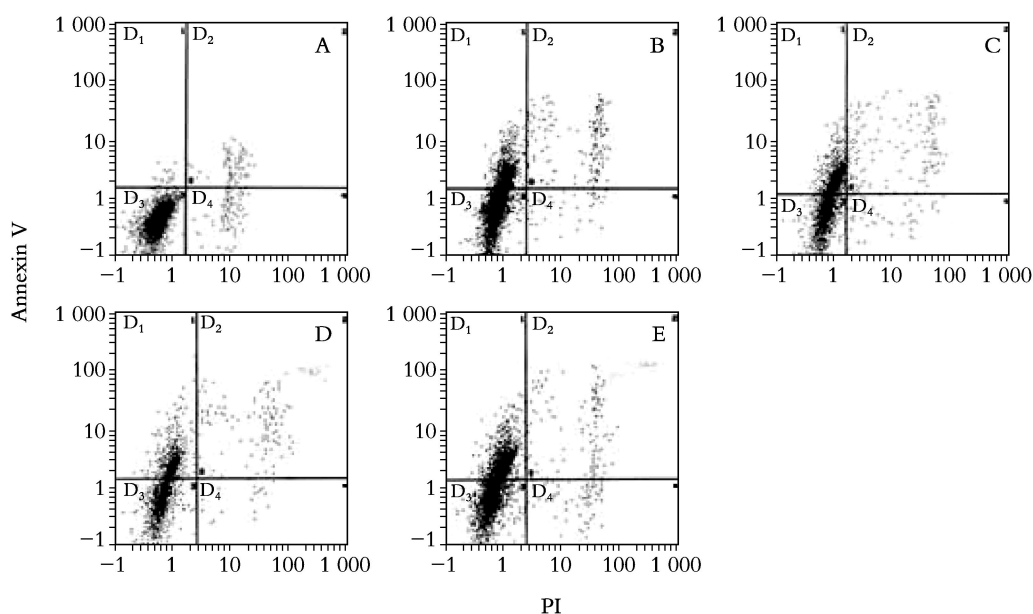


图 2 Annexin V / PI 检测细胞凋亡的 FCM 散点图

Fig. 2 Apoptosis of HeLa cells detected by Annexin V / PI

A: 正常 HeLa 细胞对照; B: 5 mg/L PSP 处理细胞; C: 10 mg/L PSP 处理细胞; D: 20 mg/L PSP 处理细胞; E: 40 mg/L PSP 处理细胞
A: Normal HeLa cells; B: HeLa cells treated by 5 mg/L PSP; C: HeLa cells treated by 10 mg/L PSP; D: HeLa cells treated by 20 mg/L PSP; E: HeLa cells treated by 40 mg/L PSP

表1 Annexin V/PI检测细胞凋亡的结果

Tab.1 Apoptosis of HeLa cells detected by Annexin V/PI

组别	各象限细胞百分比(%)			
	D1	D2	D3	D4
正常 HeLa 细胞	1.39	3.52	90.7	4.40
5 mg/L PSP	30.3	10.3	57.1	2.29
10 mg/L PSP	32.6	12.3	52.0	3.18
20 mg/L PSP	34.8	9.62	53.5	2.8
40 mg/L PSP	38.8	7.01	50.5	3.68

2.3 PSP 诱导 HeLa 细胞早期凋亡的时效关系

40 mg/L PSP 分别处理 HeLa 细胞 6, 12 h, 经 Annexin V/PI 双染色检测细胞凋亡, 结果表明, 40 mg/L PSP 处理 HeLa 细胞 6 h 后即发生早期细胞凋亡, 凋亡率为 12.6%, 而 12 h 凋亡率为 38.8%, 表明随作用时间延长, 凋亡率明显增加。

3 讨论

近年来研究表明细胞凋亡与肿瘤发生、发展与消退有密切关系, 大多数抗肿瘤药物能诱导肿瘤细胞凋亡, 而且其抗肿瘤作用的强弱与它们诱导肿瘤细胞凋亡的活性呈正比^[8,9]。因此, 诱导肿瘤细胞凋亡已成为寻找抗肿瘤药物的新靶点, 以及评价药物疗效的一项新指标。目前关于 PSP 对肿瘤细胞周期与凋亡的实验研究, 国内外尚未见文献报道。

作者曾对 PSP 的体内抗肿瘤作用及对免疫功能的影响作了一些研究, 发现其对 S180 小鼠肿瘤有较好的抑制作用, 对小鼠的免疫功能亦有一定的调节作用^[10]。本研究首先应用 MTT 法研究了 PSP 对 HeLa 细胞及 Hep G2 细胞生长的影响, 结果表明 PSP 对这两种人癌细胞株均有明显的抑制作用, 进一步证明 PSP 具有良好的抗肿瘤活性。

在此基础上, 本研究又观察了 PSP 诱导的 HeLa 细胞凋亡, 试图从凋亡角度阐明其抗肿瘤作用机制。之所以采用 Annexin V/PI 双染色法检测, 是因为 Annexin V/PI 双染色法较 PI 单染色法及 DNA 电泳法可更好地区分早期凋亡、晚期凋亡及坏死细胞, 是目前判断早期凋亡的常用方法^[11,12]。而且该法在本实验中显示出良好的正确性和重复性, 不失为一种快速、定量检测凋亡的手段。实验结果表明 PSP 可诱导 HeLa 细胞的早期凋亡, 并具有良好的量效关系和时效关系。另一方面, PSP 对 HeLa 细胞抑制率与凋亡率之间的差异, 说明 PSP 的抗肿瘤机制, 除了诱导肿瘤细胞凋亡, 还存在细胞毒性等其他机制, 是

多种机制共同作用的结果。至于 PSP 诱导细胞凋亡在抗肿瘤机制中所占的比重, 有待进一步研究。

鉴于 PSP 在具有良好抑瘤效果的同时, 不伴有明显的毒副作用, 还能治疗或预防肿瘤病人化疗和放疗过程中对正常细胞的损伤^[10,13]。因此, PSP 作为一种新型的抗肿瘤药物, 值得进一步研究和开发, 具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Vonshak A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology, Cell-biology and Biotechnology[M]. Taylor & Francis Ltd, 1997. 205-212.
- [2] Hirahashi T, Matsumoto M, Hazeki K, et al. Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: Augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis* [J]. *International Immunopharmacology*, 2002, 2: 423-434.
- [3] 涂芳, 杨芳, 郑文杰, 等. 螺旋藻多糖的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(1): 115-119.
- [4] 于红, 张学成. 螺旋藻多糖对 HeLa 细胞生长的影响[J]. 中国海洋药物, 2003, 22(1): 26-29.
- [5] Hansen M B, Nielsen S E, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill[J]. *J Immunol Methods*, 1989, 119(2): 203-210.
- [6] 黄培堂. 细胞实验指南[M]. 第1版. 北京: 科学出版社, 2001. 102-105.
- [7] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V [J]. *J Immunol Methods*, 1995, 184(1): 39-51.
- [8] Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death [J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1317-1322.
- [9] 廖泉, 赵玉沛. 细胞凋亡与肿瘤化疗[J]. 中华肝胆外科杂志, 1999, 5(5): 356-358.
- [10] 于红, 张学成. 螺旋藻多糖对小鼠 S-180 肉瘤的免疫抑制作用[J]. 海洋科学, 2003, 5: 58-61.
- [11] Pepper C, Thomas A, Tucker H, et al. Flow cytometric assessment of three different methods for the measurement of in vitro apoptosis [J]. *Leuk Res*, 1998, 22(5): 439-444.
- [12] Aubry J P, Blaecke A, Lecoanet-Henchoz S, et al. Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity [J]. *Cytometry*, 1999, 37(3): 197-204.
- [13] 张洪泉, 尹鸿萍, 王砢, 等. 螺旋藻多糖抗肿瘤作用研究[J]. 新药与临床药理, 2002, 13(5): 284-286.

(下转第 87 页)

(上接第 40 页)

Experimental studies on antiproliferation activities and early apoptosis inducement of polysaccharides from *Spirulina platensis*

YU Hong¹, L ÜRui¹, ZHANG Xue-cheng²

(1. College of Medicine, Qingdao University, Qingdao 266021, China; 2. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Dec. ,20,2005

Key words: polysaccharides from *Spirulina platensis* (PSP); antitumor effect; apoptosis; annexin V/ PI

Abstract: In vitro experiments the antiproliferation activities of polysaccharides from *Spirulina platensis* (PSP) were evaluated on Hela cells and Hep G2 cells by MTT assay, the results showed that PSP (2.5 ~ 40 mg/L, 48 ~ 72 h) exhibited dose and time inhibition effects on the cell growth. The early apoptosis of Hela cells was detected by flow cytometry analysis with a combination of Annexin V-FITC and PI double staining, the apoptosis rates induced by PSP (5, 10, 20, 40 mg/L) were 30.3%, 32.6%, 34.8% and 38.8% respectively, which were higher than those of the normal control group ($P < 0.05$). Meanwhile, the apoptosis rate treated by PSP (40 mg/L) also increased in time-dependent manner. These results suggested that one of the anti-tumor mechanisms of PSP may be related to inhibition on cell proliferation and induction of notable apoptosis.

(本文编辑:张培新)