

红花多糖对肝癌细胞增殖阻滞的机制探讨

孙阳, 杨婧, 张琪琪, 王雪, 徐放, 李明珠, 王亚贤*

(黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:**通过研究红花多糖(safflower polysaccharide, SPS)对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的影响,探讨 SPS 抗肿瘤作用的分子机制。**方法:**体外培养人肝癌 SMMC-7721 细胞,加入含不同质量浓度 SPS(0, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28 g·L⁻¹)的培养液,分别培养 24, 48 h,用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT法)检测 SPS 对细胞增殖的影响;用免疫组化法检测 0.16, 0.32, 0.64 g·L⁻¹ SPS 作用肝癌细胞 48 h,细胞的细胞周期素 B₁(cyclin B₁)蛋白表达;采用实时荧光定量 PCR 技术(realtime PCR, RT-PCR)和蛋白免疫印迹(Western blot)法检测细胞分裂周期 25B(Cdc25B)基因的表达。**结果:**肝癌细胞的生存率随 SPS 浓度和作用时间的增加而降低,而 1.28 g·L⁻¹ SPS 组除外。SPS 作用 48 h 后 SMMC-7721 细胞的 cyclin B₁ 蛋白、Cdc25B 蛋白和 mRNA 表达降低,并具有剂量依赖性。**结论:**SPS 可能通过抑制细胞周期相关基因的表达,诱导肝癌细胞增殖阻滞,进而起到抗肿瘤作用。

[关键词] 红花多糖; 肝癌细胞; 细胞增殖

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)13-0156-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014130156

Mechanism Investigation of Cell Cycle Arrest in Hepatic Cancer Cell Induced by Safflower Polysaccharide

SUN Yang, YANG Jing, ZHANG Qi-qi, WANG Xue, XU Fang, LI Ming-zhu, WANG Ya-xian*

(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To detect how safflower polysaccharide (SPS) affects cell proliferation of human hepatic cancer cell line SMMC-7721. **Method:** SMMC-7721 cells were treated with different concentrations (0, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28 g·L⁻¹) of SPS for 24, 48 hours. The cell proliferation was assessed by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The proteins of cyclin B₁ were compared by IHC. The expression of mRNA and protein of Cdc25B was compared by RT-PCR and Western blot. **Result:** The cell survival rate of SMMC-7721 cells was significantly inhibited by SPS in a dose-dependent and time-dependent manner, except 1.28

[收稿日期] 20140113(011)

[基金项目] 黑龙江中医药大学优秀青年教师支持计划(051234);黑龙江省科技厅自然科学基金课题(D201050)

[第一作者] 孙阳,医学博士,副教授,从事中医药抗肿瘤分子机制的研究, Tel:0451-82193641, E-mail: yangsun66@sina.com

[通讯作者] *王亚贤,教授,博士生导师,从事中医药现代化多学科免疫学研究, Tel:0451-82193649, E-mail: wangyxmail@yahoo.com.cn

[5] 施慧,龙子江,王靓,等.白二丸对氢醌诱导的实验性白癜风豚鼠治疗作用的实验研究[J].中国中医药科技,2010,17(1):28.

[6] 龙子江,吕晓英,樊彦,等.消白灵片对白癜风模型动物血液中酪氨酸酶含量和血液流变学的影响[J].中国中医药科技,2001,8(1):40.

[7] 朱兰镇,李伟.稀莪草胶囊对大鼠血液流变学及凝血

功能影响的研究[J].黑龙江医药,2010,23(2):191.

[8] 宋艳华,孙晖,张爱华,等.紫草的研究进展[J].中医药学报,2013,41(4):123.

[9] 高婵,蔡宝昌,李伟东,等.中药自然铜现代研究进展[J].南京中医药大学学报,2009,25(1):75.

[责任编辑 聂淑琴]

$g \cdot L^{-1}$ SPS group. The protein expression of cyclin B₁ and Cdc25B was down-regulated compared with the control group at 48 hour. The mRNA of Cdc25B also decreased and had good dose-dependent. **Conclusion:** SPS can inhibit proliferation of SMMC-7721 cell by affecting expression of cycle regulation genes.

[**Key words**] safflower polysacchande; hepatic cancer cell; proliferation

肿瘤是一类细胞周期疾病,多数属于增殖失控性疾病,可由许多外部因素(如生长因子、营养物质、药物等)调节,进而影响细胞周期进程,诱导细胞增殖、细胞周期停滞或凋亡。细胞周期调控因子包括有:细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)、细胞周期蛋白(cyclin)和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(CDI)。通过大量的研究发现,这些因素与肿瘤的发生和发展密切相关,故而对细胞周期调控的研究是肿瘤研究的热点之一。红花是一种常见的活血化瘀药,还具有提高免疫力和抗肿瘤的药理学功效。本课题组前期实验发现,SPS作用SMMC-7721肝癌细胞后,细胞比例在G₂期明显增加^[1],但关于红花多糖诱导肝癌细胞增殖阻滞机理的研究鲜见报道。本实验研究以G₂/M期相关基因为研究靶点,探讨红花多糖对该肝癌细胞株体外作用的分子机制,为今后该药的体内实验和临床应用奠定实验基础。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌细胞株SMMC-7721购于武汉博士德公司(编号CX0296),在改良型RPMI-1640培养基(含10%胎牛血清,100 U·mL⁻¹的青霉素、100 U·mL⁻¹的链霉素,批号NXC0584),温度37℃,体积分数为5% CO₂,完全饱和湿度条件下培养。

1.2 药品 红花购于哈尔滨益寿堂药店,经黑龙江中医药大学王锐老师鉴定为菊科植物红花*Carthamus tinctorius* L.的干燥管状花。水提醇沉淀法对红花多糖(SPS)进行提取及纯化^[2],由黑龙江中医药大学药学院协助完成,红花多糖批号20120928。

1.3 试剂与仪器 兔抗多克隆一抗细胞周期素B₂(Cyclin B₁,博士德公司,编号BA0766),二抗(PV6001,北京中山),BAB显色剂(北京中山),Homo Cdc25B引物(上海艾博思生物科技有限公司),Cdc25B抗体(Epitomics,编号3680-1),TRIzol Reagent(Invitrogen公司,批号15596-026)。TC2323型CO₂培养箱(SHELDON公司,美国),XDS-1B型倒置显微镜(博鑫,中国),IQ5型实时荧光定量PCR仪(伯乐,美国),Bio-rad PowerPac™ HC型电泳仪(伯乐,美国),VE-180型垂直电泳槽(上海天能),Odyssey扫描仪(Licor公司,美国),DY-B1脱色摇床

(上海沪西仪器)。

2 方法

2.1 对SMMC-7721细胞增殖的影响 取对数生长期的SMMC-7721细胞 1×10^4 个/mL接种于96孔板,每孔体积200 μL,在CO₂培养箱中常规培养。24 h后细胞贴壁,吸弃培养液,加入含不同质量浓度SPS(0, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28 g·L⁻¹)的培养液,分别培养24, 48 h,每个浓度设6个复孔。吸弃上清液20 μL,加入相同体积的5 g·L⁻¹ MTT溶液,继续孵育4 h。小心吸弃培养液上清,每孔加入150 μL DMSO,避光振荡摇匀10 min,用酶标仪于490 nm波长检测各孔吸光度(A),实验重复3次。按公式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{实验组 } A}{\text{对照组 } A} \times 100\%$$

2.2 对SMMC-7721细胞cyclin B₁表达的影响

2.2.1 免疫细胞化学染色 选择对数生长期细胞,经胰酶消化、吹打成为细胞悬液,计数 2×10^4 个/mL,混匀后滴至盖玻片中央,待细胞在盖玻片上长满80%以上,加入含不同质量浓度SPS(0.16, 0.32, 0.64 g·L⁻¹)的培养液,48 h后,用Hank's液和PBS液冲洗,将玻片放入10%甲醛溶液中固定1 h, PBS冲洗后,放入4℃冰箱中保存。将制作好的爬片放入烤箱中,烤片12 h;标本固定,采用梯度乙醇脱水处理;3% H₂O₂处理10 min; PBS清洗标本;将玻片放入枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),热修复后,自然冷却至室温;滴加封闭血清,放置室温20 min,弃除多余血清后不需冲洗再滴加一抗。一抗孵育(PBS配置, cyclin B₁浓度1:60), 4℃冰箱过夜;阴性对照用一抗来源血清;二抗工作液孵育37℃ 30 min; DAB显色(避光,镜下观察至棕色),约5~10 min,蒸馏水洗后,苏木素复染,树胶封片,镜下观察。

2.2.2 结果分析 阴性细胞呈蓝色,阳性细胞的胞浆和细胞核被染成黄色或棕黄色。在400倍的放大倍数下,随机选取6个视野,应用病理图像分析软件(Image-proplus6.0)定量分析,用平均吸光度(A)代表阳性表达的相对量,统计结果。

2.3 对SMMC-7721细胞Cdc25B mRNA表达的影响

2.3.1 引物合成 通过Genbank数据库,查找

Cdc25B mRNA 和 GAPDH mRNA 的全基因序列。根据全基因序列,应用 premier primer 5.0 软件进行引物设计,由上海艾博思生物科技有限公司合成。Cdc25B 及 GAPDH 引物分别为:5'-TTCATCAGGG AACGAGACCGTG-3', 5'-TTCACAGAAGTTCGGGTG CTGAG-3'; 5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3', 5'-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3'。所扩增的目的基因片段分别为:117 bp 和 113 bp。

2.3.2 提取 RNA 应用 TRIzol 试剂盒提取总 RNA,琼脂糖电泳检查 RNA 的完整性。电泳图谱上可见到清晰的 3 条带,分别是 18 S,28 S,5 S rRNA,28 S rRNA 的亮度为 18 S rRNA 的 2 倍,说明 RNA 分子完整,未发生降解。

2.3.3 逆转录实验 在无菌 EP 管中配制如下体系:总 RNA (total RNA) 2 μ L, 2 \times Real-time PCR Master Mix (0.05 U *Taq* DNA Polymerase/ μ L), Reverse Primers(GAPDH & Cdc25B Gene 1 μ mol \cdot L⁻¹ each), dNTPs (10 mmol \cdot L⁻¹ each)、加入无核酸酶的水 Dd H₂O,终体积 20 μ L。反应条件 95 $^{\circ}$ C, 3 min 变性;95 $^{\circ}$ C, 30 s, 62 $^{\circ}$ C, 40 s, 共 40 个循环。

2.3.4 统计分析 收集荧光信号,用 Sequence Detection software version 1.2.3 软件 (Applied Biosystems 公司) 分析 PCR 过程各组 C_t (Cycle threshold) 值。相对定量法 ($\Delta\Delta C_t$) 定量分析,通过比较 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 值的变化,分析基因表达的变化,即相对 mRNA 表达 = 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 。每组做 3 个样本,取均数。

2.4 对 SMMC-7721 细胞 Cdc25B 蛋白表达的影响

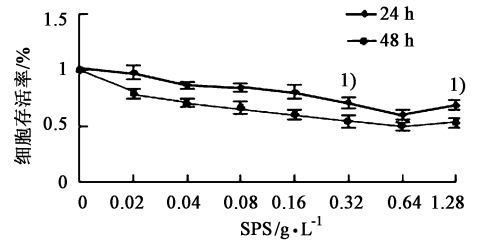
SPS 处理细胞 48 h 后,用预冷 PBS 洗涤细胞 3 次,胰酶消化,离心去上清,加入细胞裂解液,在冰盒上静置 30 min,收集少量上清液用 Bradford 法测定总蛋白质的浓度,其余上清液放置 -80 $^{\circ}$ C 低温冰箱内保存备用。各组样本蛋白经 10% SDS-PAGE 胶电泳后,将蛋白转到 PVDF 膜上,用 TBST 配置的 5% 脱脂牛奶封闭 1 ~ 2 h,加入一抗杂交过夜;TBST 洗

3 次,每次 5 min,加入相应的二抗(用封闭液稀释)室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,每次 5 min;检测不同样品中 Cdc25B 蛋白和 GAPDH 蛋白表达情况,用 ODYSSEY 直接进行荧光扫描成像,把 X-射线胶片图像灰度扫描,采用凝胶图像处理系统来进一步分析,ImageJ 软件测定蛋白条带的灰度,目的蛋白条带的值与其内参值之比作为该蛋白的相对表达。

2.5 统计分析 结果采用 $\bar{x} \pm s$,应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,组间均数差异性比较采用单因素方差分析及 LSD 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 SMMC-7721 细胞增殖的影响 MTT 实验表明,相同时间点不同浓度的 SPS 作用 SMMC-7721 细胞,细胞存活率随 SPS 浓度的升高而降低,但 SPS 浓度高于 0.64 g \cdot L⁻¹ 时,细胞存活率却有所提高,因此后续实验最高质量浓度为 0.64 g \cdot L⁻¹;同质量浓度的 SPS 在不同时间点对细胞的生长抑制作用随着时间的延长而增强,SPS 作用后细胞的存活率 24 h 高于 48 h,如图 1 所示。



与 48 h 组比较¹⁾ P < 0.01

图 1 红花多糖对肝癌细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 对 SMMC-7721 细胞 cyclin B₁ 蛋白表达的影响

在光学显微镜下观察 cyclin B₁ 蛋白,阳性信号定位于细胞核和细胞质中。蛋白阳性表达为淡黄色 ~ 棕黄色颗粒状。结果显示,对照组 A 平均值最高,SPS 各组与对照组相比差异显著 (P < 0.01); 随 SPS 质量浓度增高,A 递减,见表 1。

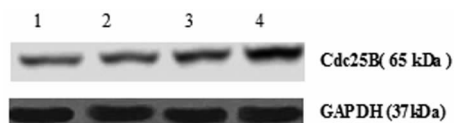
表 1 红花多糖对 SMMC-7721 细胞 cyclin B₁ 蛋白及 Cdc25B mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	cyclin B ₁		Cdc25B mRNA			
		A	GAPDH C _t	C _t	ΔC_t	$\Delta\Delta C_t$	2 ^{-$\Delta\Delta C_t$}
对照	-	0.222 \pm 0.011	25.06 \pm 0.09	18.31 \pm 0.12	-7.36 \pm 0.15	0.00 \pm 0.21	1.00(0.86 - 1.16)
SPS	0.16	0.203 \pm 0.012 ¹⁾	26.28 \pm 0.11	19.35 \pm 0.04	-6.93 \pm 0.11	0.43 \pm 0.19	0.74(0.65 - 0.85)
	0.32	0.195 \pm 0.007 ²⁾	24.74 \pm 0.20	18.02 \pm 0.09	-6.72 \pm 0.22	0.63 \pm 0.27	0.65(0.54 - 0.78)
	0.64	0.189 \pm 0.011 ²⁾	24.97 \pm 0.07	18.63 \pm 0.14	-6.33 \pm 0.15	1.03 \pm 0.21	0.49(0.42 - 0.57)

注:与对照组比较¹⁾ P < 0.01, ²⁾ P < 0.001。

3.3 对 SMMC-7721 细胞 Cdc25B mRNA 表达的影响 结果说明,SPS 各质量浓度组作用 SMMC-7721 肝癌细胞,Cdc25B 基因 mRNA 表达呈浓度依赖性下调;相对于对照组 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$), $0.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ SPS 组表达下调至对照组的 74%, $0.32,0.64 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ SPS 组分别为对照组的 65%,49%。见表 1。

3.4 对 SMMC-7721 细胞 Cdc25B 蛋白表达的影响 通过应用 Western blot 免疫印迹分析 $0.64,0.32,0.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ SPS 作用 SMMC-7721 细胞 48 h 后 Cdc25B 蛋白条带灰度值与各自内参的灰度值之比分别为 28.54%,42.65%,51.06%,对照组为 59.68%。该比值作为 Cdc25B 蛋白的相对表达量,结果显示随 SPS 浓度增加该蛋白表达逐渐降低,分别为对照组的 86%,71%,48%。见图 2。



1. $0.64 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ SPS 组;2. $0.32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ SPS 组;
3. $0.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ SPS 组;4. 对照组

图 2 红花多糖对 SMMC-7721 细胞 Cdc25B 蛋白表达的影响 (GAPDH 作为内参照)

4 讨论

本实验发现,红花多糖抑制 SMMC-7721 肝癌细胞的增殖,可能通过影响细胞周期相关基因表达有关。cyclin B₁ 在很多肿瘤细胞中异常表达,如胃癌、肝癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、宫颈鳞癌、食管癌、膀胱癌等均发现其过表达^[3-4]。cyclin B₁ 是调节 G₂/M 转位及有丝分裂的一种重要细胞周期素,它和细胞周期依赖蛋白激酶 1 (CDK1) 形成复合物成熟促进因子 (MPF),该复合物磷酸化的残基协调一致地去磷酸化,细胞即通过 G₂/M 限制点,进入 M 期。本实验结果显示,SPS 可能通过抑制 cyclin B₁ 基因表达,MPF 复合物合成减少,致使细胞增殖受阻于 G₂/M 限制点。另外,MPF 的激活还受 Cdc25 磷酸酶调控。Cdc25 磷酸酶可催化 CDK1 去磷酸化致使 MPF 激活,故而 Cdc25 磷酸酶对细胞进入 M 期也起到重要作用^[5]。哺乳动物中 Cdc25 磷酸酶有 3 种同工

酶:Cdc25A,Cdc25B,Cdc25C。Cdc25B 是 G₂/M 转换中 MPF 的初始活化因子,另外还参与细胞周期 G₂/M 期阻滞的恢复,Cdc25A 在 G₁/S 转变时起作用,Cdc25C 主要在有丝分裂期有活性^[6-9],而近期研究成果表明三者均参与 G₂/M 过渡,因此 Cdc25 磷酸酶可作为抗癌靶点。红花多糖可以抑制 Cdc25B 基因表达,这也可能是诱导细胞增殖阻滞于 G₂ 期的主要原因。总之,红花多糖对细胞周期相关基因调控,抑制细胞增殖,从而起到抗肿瘤作用。而在此过程中还有哪些基因及信号途径参与,在后续的实验应深入研究和探讨。

[参考文献]

- [1] 孙阳,张琪琪,石学魁,等.红花多糖诱导 SMMC-7721 细胞增殖阻滞的实验研究[J].中国免疫学杂志,2013,29(12):1269.
- [2] 张晓丽,李玉婷,王亚贤,等.红花多糖的提取与含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(7):19.
- [3] 易火春,黄如欣,张忠英.原发性肝癌组织 cyclinB1 表达水平及其临床诊断意义[J].中华检验医学杂志,2005,28(12):1253.
- [4] 文亚洲,刘宝华.Survivin、CyclinB1 基因在胃癌组织中的表达及其相互关系[J].世界华人消化杂志,2004,12:55.
- [5] Vincent T DeVita,Cancer,李桂源,等.癌症[M].北京:科学出版社,2012:97.
- [6] 马云,彤齐浩.CDC25 在细胞周期运行和细胞周期检验点应答中的作用和调控机制[J].西安文理学院学报:自然科学版,2006,9(4):11.
- [7] VAN VUGT M. Polo-like kinase-1 controls recovery from a G₂ DNA damage induced arrest in mammalian cells[J]. Mol Cell,2004,15:799.
- [8] Nilsson I, Hoffmann I. Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family [J]. Prog Cell Cycle Res, 2000 (4):107.
- [9] Hoffmann, Draetta G, Karsenti. Activation of the phosphatase activity of human Cdc25A by a Cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G₁/S transition [J]. EMBO J,1994,13:4302.

[责任编辑 聂淑琴]