

红花多糖对人肝癌 SMMC-7721 细胞 Bcl-2 与 Bax 基因转录及蛋白表达的影响

张晓莉,程翔,刘洋,石学魁

(牡丹江医学院病原生物学教研室,黑龙江 牡丹江 157011)

[摘要] 目的:研究红花多糖(SPS)体外抑制人肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖、诱导凋亡及对凋亡调控基因 Bax, Bcl-2 基因转录和蛋白表达的影响,探讨 SPS 诱导 SMMC-7721 细胞凋亡的机制。方法:不同剂量的 SPS (0, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28 g·L⁻¹) 分别作用于体外培养的 SMMC-7721 细胞,采用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)检测细胞的抑制率;用 Ca²⁺ 依赖性磷脂结合蛋白(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶(PI) 双染法观察细胞凋亡的形态学改变;通过罗丹明 123(Rho123) 荧光显微镜检测线粒体膜电位($\Delta\psi_m$);以实时荧光定量 PCR 技术(real-time PCR) 和蛋白免疫印迹(Western blotting) 法检测细胞凋亡相关因子 Bcl-2 及 Bax mRNA 水平和蛋白水平的表达情况。结果:SPS 对体外培养的人肝癌 SMMC-7721 细胞具有抑制增殖作用,且具有明显的时间和剂量相关性;荧光显微镜下 SPS 作用的细胞呈现典型的凋亡细胞形态;肝癌细胞内 Rho123 荧光强度明显减弱。SPS 作用后细胞内 Bcl-2 蛋白和 mRNA 表达水平均降低,Bax 蛋白和 mRNA 的表达水平均升高,二者的变化趋势均呈一定的时间依赖关系;而且,Bcl-2/Bax 比值随 SPS 时间的延长显著降低且变化趋势均呈一定的时间依赖关系。结论:SPS 能够显著抑制人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖,诱导 SMMC-7721 细胞凋亡,其作用机制可能与上调 Bax 的表达及下调 Bcl-2 的表达和降低线粒体膜电位有关。

[关键词] SMMC-7721 细胞;红花多糖;细胞凋亡;线粒体;Bax;Bcl-2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0239-06

Effects of Safflower Polysaccharide on Gene Transcription and Protein Expression of Bcl-2 and Bax in Human Hepatocarcinoma Cell Line SMMC-7721

[收稿日期] 20120106 (011)

[基金项目] 黑龙江省研究生创新科研项目(YJSCX2011-291HLJ)

[第一作者] 张晓莉,博士,教授,硕士生导师,从事中药免疫药理学作用研究,Tel:0453-6984078, E-mail:zhangxiaoli59@126.com

时间、凝血时间,前列爽颗粒 1.13, 2.25, 4.50 g·kg⁻¹ 组能明显延长小鼠凝血酶原时间。说明前列爽颗粒具有明显的抗凝作用。前列爽颗粒连续给药 7 d,各给药组小鼠血管口径和毛细血管网交点数明显增加。以上结果与其临床应用和功能主治相吻合,为前列爽颗粒治疗慢性前列腺炎提供了充分的治疗依据。

[参考文献]

[1] 王衡奇,秦民坚,余国奠. 黄柏化学成分及药理学研究进展[J]. 中国野生植物资源,2001,20(1):6.
[2] 李帆,梁敬钰. 王不留行的研究进展[J]. 海峡药学,2007,19(3):1.
[3] 唐世银,陈秋红,韩永芬,等. 前列宝抗前列腺增生及前列腺炎的药效学实验研究[J]. 中国民族民间医药,2010,16:36.

[4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000.
[5] 乔彦,吕晓川. 抗凝血药物研究进展[J]. 中国心血管病研究杂志,2005,3(8):631.
[6] 王淑如,王丁刚. 茶叶多糖的抗凝血及抗血栓作用[J]. 中草药,1992,23(5):254.
[7] 汪新亮,吴基良,郑敏. 大蒜多糖对凝血系统及血小板聚集的影响[J]. 江苏中医药,2008,40(6):80.
[8] 毛平,夏卉莉,袁秀荣,等. 怀牛膝多糖抗凝血作用实验研究[J]. 时珍国医国药,2000,11(12):1075.
[9] 白树平. 四物对小鼠耳廓、肠系膜微循环的影响[J]. 微循环杂志,1997,7(4):37.
[10] 陈凡. 抗血小板凝集机理研究进展[J]. 健康必读杂志,2010,7(7):24.
[11] 赵燕燕,李挥,张秋燕. 复胰糖瘀消胶囊对小鼠微循环作用的研究[J]. 2006,10(1):35.

[责任编辑 何伟]

ZHANG Xiao-li, CHENG Xiang, LIU Yang, SHI Xue-kui

(Department of Pathogen Biology, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China)

[Abstract] Objective: To explore how safflower polysaccharide (SPS) induce apoptosis of human liver cancer cell line SMMC-7721 through observing the influence of SPS on proliferation, apoptosis and expression of apoptosis gene and protein Bax and Bcl-2 of 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. The cells growth inhibitory rate was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The morphological changes of apoptosis were observed by Annexin V-FITC/PI staining. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) was assayed by fluorescent microscopy using Rhodamine 123 (Rho123). Quantitative real-time RT-PCR and Western blot analysis were used to detect the mRNA and protein expressions of Bcl-2 and Bax. **Result:** SPS could inhibit the proliferation of SMMC-7721 cells in a dose and time dependent manner. After treated with SPS, SMMC-7721 cells presented typical apoptosis under fluorescence microscope. Fluorescence intensity of Rho123 were significantly decreased in SMMC-7721 cells. The mRNA and protein expression of Bcl-2 expression were down-regulated while those of Bax were up-regulated and both changes had good time-dependent tendency. The ratio of Bcl-2/Bax decreased significantly in a time-dependent manner. **Conclusion:** SPS could inhibit the proliferation of SMMC-7721 and enhance apoptosis of SMMC-7721 and its mechanism maybe relate with its up-regulation of Bax expression as well as down-regulation of Bcl-2 expression and decline of $\Delta\psi_m$.

[Key words] SMMC-7721; safflower polysaccharide; cell apoptosis; mitochondria; Bax; Bcl-2

红花是菊科红花属 1~2 年生草本植物,是常用的活血化瘀中药之一,化学成分复杂,生物活性广泛。红花多糖(SPS)是从红花中提取的一种有效成分之一,具有调节机体免疫功能、抗肿瘤作用^[1-5]。但是,目前对 SPS 的抗肿瘤作用机制缺乏深入的认识。本试验在前期研究的基础上,研究 SPS 对人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的影响,观察细胞线粒体膜电位的变化以及 Bcl-2 和 Bax 表达的变化,探讨 SPS 的抗肿瘤机制,为其临床应用及其深入研究提供理论基础和实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌 SMMC-7721 细胞株,由牡丹江医学院金在顺教授惠赠。

1.2 药品 生药红花购于哈尔滨益寿堂药店,经牡丹江医学院药学院赵德芳教授鉴定为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥管状花。红花多糖的提取、纯化^[6-8]由牡丹江医学院药学院生药研究室完成:将 60℃ 恒温干燥的红花充分浸渍,沸水煮提 4 次,每次 1 h。合并滤液并浓缩,浓缩前后体积比为 4:1。加入 4~5 倍体积的 95% 乙醇 4℃ 静置过夜。对醇沉的多糖沉淀进行离心,沉淀用去离子水溶解,反复用乙醇沉淀 2 次。将粗多糖干燥后即得精制多糖,硫酸-苯酚法测定多糖含量为 76.05%,得率为 0.38% (批号 20100214)。用 RPMI 1640 培养

液配制质量浓度为 10 g·L⁻¹ 的储备液,过滤除菌,置 4℃ 冰箱储存,临用前加培养液稀释至所需质量浓度。

1.3 试剂 RPMI 1640 培养基干粉, GIBCO (Invitrogen 公司),批号 728712,胰蛋白酶,Invitrogen 公司,批号 20100415,四甲基偶氮唑蓝 (MTT), Amresco 公司,批号 09052345,二甲基亚砜 (DMSO), Sigma 公司,批号 20100103658,罗丹明 123 染色试剂盒,南京凯基生物公司,批号 101201。GAPDH, Homo Bax, Homo Bcl-2 引物由上海艾博思生物科技有限公司合成, Trizol Reagent, 批号 20101216, Real-Time PCR Kit, SYBR Green, 批号 20110304, 总 RNA 提取试剂盒, 批号 20110309, 上海艾博思生物科技有限公司, Bcl-2 Antibody (Cat. No. 2876), Bax Antibody (Cat. No. 2772), Cell Signaling Technology, 抗人 β -actin 多克隆抗体, 北京中衫金桥生物公司, HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2 000), 晶美生物 (进口分装)。

1.4 仪器 BD FACS Canto II 流式细胞仪 (BD 公司), MCO-15AC 恒温 CO₂ 培养箱 (日本 SANYO 公司), Nikon ECLIPSE 80i 荧光显微镜、DXM 1 200 C 数码相机 (尼康公司), Multiskan Mk3 酶标仪 (Thermo 公司), IQ5 Real-time PCR Instrument (美国伯乐实时荧光定量 PCR 仪), Bio-rad (US)

PowerPac™ HC 电泳仪, Bio-rad (US) VE-180 垂直电泳槽(上海天能)。

2 方法

2.1 人肝癌细胞株 SMMC-7721 培养 取 1×10^5 /mL 的人肝癌 SMMC-7721 细胞接种到完全 RPMI 1640 培养基(含 10% 灭活新生牛血清),置于在 37 ℃, 5% CO₂, 完全饱和湿度条件下常规培养,每 2~3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

2.2 SPS 对 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用 取对数生长期细胞,经胰酶消化制成密度为 1×10^4 /mL 细胞悬液,接种于 96 孔培养板,每孔 200 μL,于 37 ℃, 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 24 h,分别给予不同质量浓度的 SPS 处理,使其终质量浓度为 0, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28 g·L⁻¹,每个质量浓度设 6 个复孔。另设空白对照(单纯培养基、无细胞)、单纯 SPS(单纯 SPS、无细胞)组,排除培养基和药物颜色的对实验结果的干扰。分别培养 24, 48, 72 h,每孔吸弃上清液 20 μL,分别加入 20 μL MTT 溶液(5 g·L⁻¹);继续孵育 4 h,然后小心吸弃培养液,每孔加入 150 μL DMSO,避光震荡 10 min,使结晶物充分溶解,用酶标仪于 490 nm 波长检测各孔 A(吸光度),实验重复 3 次。根据公式计算细胞的生长抑制率(inhibition rate, IR):

$$IR = (1 - \text{实验组 } A / \text{对照组 } A) \times 100\%$$

根据各组药物对细胞的抑制率,采用改良寇式法计算药物半数抑制浓度(IC₅₀)^[9],基本公式如下:

$$IC_{50} = \text{Log}^{-1} [X_m - I(P - (3 - P_m - P_n)/4)]$$

X_m: Log 最大剂量; I: Log(最大剂量/相临剂量); P: 阳性反应率之和; P_m: 最大阳性反应率; P_n: 最小阳性反应率。

2.3 细胞凋亡形态学变化 取对数生长期 SMMC-7721 细胞接种于培养瓶培养 24 h 后,加入终质量浓度 0.64 g·L⁻¹ 的 SPS,分别继续培养 24, 48, 72 h,并设 0 g·L⁻¹ 为阴性对照组。胰蛋白酶消化后用 PBS 洗涤细胞 2 次收集 $1 \sim 5 \times 10^5$ 细胞;加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞;加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μL Propidium Iodide,混匀;避光、室温反应 5~15 min。于荧光显微镜下观察细胞形态并摄片,Annexin V-FITC 荧光信号呈绿色,PI 荧光信号呈红色。

2.4 线粒体膜电位测定 收集 SPS(终质量浓度 0, 0.64 g·L⁻¹)处理 24, 48, 72 h 的 SMMC-7721 细胞重悬于培养基中,调整细胞密度 1×10^6 /mL;加入罗丹明 123 染液 0.5 mg·L⁻¹;于 CO₂ 培养箱培养 10

min;以培养基洗细胞 2 次;弃上清,细胞重悬于培养基中,培养箱中培养 60 min;取 100 μL 细胞悬液滴于载玻片上,荧光显微镜观察并摄片。激发波长 488 nm,发射波长 515 nm。

2.5 Bcl-2 及 Bax mRNA 表达 取对数生长期的 SMMC-7721 细胞制成单细胞悬液,接种于灭菌的细胞培养瓶中,培养 24 h,经含 0.4% 小牛血清的 1640 培养液同步化 24 h 后,给予 SPS(终质量浓度 0.64 g·L⁻¹)分别处理 0(培养液对照组), 24, 48, 72 h。在不同时间点收集各组细胞,按 Trizol 试剂盒说明书操作步骤提取细胞总 RNA。加无 RNA 酶水, -70 ℃ 保存。琼脂糖凝胶电泳检查抽提 RNA 的完整性,紫外分光光度法检查 RNA 浓度和纯度。用 MMLV 反转录酶将 RNA 样品反转录成 cDNA, -20 ℃ 保存备用。以 cDNA 为模板,分别用 Bcl-2, Bax 和 GAPDH 引物进行 PCR 反应。引物序列见表 1。结果判定: $\Delta C_T = C_T$ 目的基因 - C_T GAPDH, $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ 待检样品 - ΔC_T 对照样品, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 表示待检样品中待检基因相对于对照样品中相应的基因表达程度。

表 1 PCR 引物及产物大小

基因名称	引物名称	序列(5' > 3')
GAPDH	F primer	CATGAGAAGTATGACAACAGCCT
	R primer	AGTCCTTCACGATACCAAAAGT
Homo Bax	F primer	CCCTTTTCTACTTTGCCAGCA
	R primer	GGAGTCTCACCCAACCACCC
Homo Bcl-2	F primer	CATGTGTGTGGAGAGCGTCAAC
	R primer	CTTCAGAGACAGCCAGGAGAAATC

2.6 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达 收集细胞并用冷 PBS 清洗 3 次,加入 100~200 μL 裂解液悬浮,超声裂解细胞,Bradford 法测定蛋白质浓度。各组取等量蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳,将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上。膜在 4 ℃ 封闭 1 h,加入一抗(1:100),4 ℃ 过夜。加入二抗(1:10 000),室温杂交 1 h, TBST 洗涤 3 次,每次 5 min。将 ECL 化学发光底物 A、B 液等体积混合,均匀加在 PVDF 膜上,显色 5 min;X 射线片曝光 30 s~5 min 后,将 X 射线片依次进行显影和定影。将 X 射线胶片进行扫描或拍照,用凝胶图像处理系统进行蛋白条带的灰度测定,以目的蛋白条带的灰度值与内参 β-actin 的灰度值之比对所加入的蛋白质总量进行校正,以校正后的对照组的蛋白质表达量作为 100%,计算各个样品相对于对照组蛋白含量的百分率,比较各组蛋白质表达水平^[10]。每个实验组重复 3 次。

2.7 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件进行

统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数差异性比较采用单因素方差分析及 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 SMMC-7721 细胞增殖的影响 不同剂量 SPS 对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的影响见图 1。SPS 可以抑制肝癌细胞的增殖,呈现一定程度的时间、剂量依赖性。0.04 ~ 1.28 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SPS 作用 24 h, 0.02 ~ 1.28 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SPS 作用 48, 72 h, 均可明显抑制肝癌细胞增殖, 各组 A 与对照组比较差异有统计学意义 ($P_1 = 0.001, P_2 = 0.000$)。各时间点均以 0.64 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SPS 抑制率最高, 分别为 39.45%、58.85% 和 90.26%; 剂量升高至 1.28 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时抑制作用反而下降, 抑制率分别为 30.94%、56.21% 和 86.87%。经计算, SPS 对 SMMC-7721 细胞的 IC_{50} 在 24, 48, 72 h 分别为 0.642, 0.249, 0.077 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。故在进一步研究中部分试验采用 0.64 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2 对细胞凋亡形态的影响 经 Annexin V-FITC/PI 双染色, SPS 作用于 SMMC-7721 细胞 24, 48, 72 h 后, 在荧光显微镜下观察, 对照组细胞 Annexin-V, PI 均低染, 无明显着色; 0.64 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SPS 作用 24 h, 出现

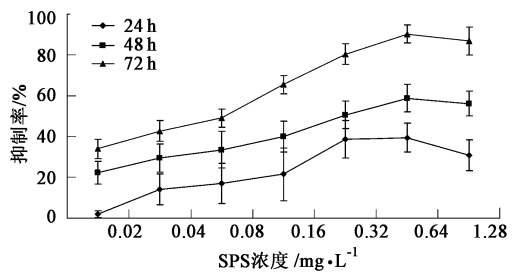
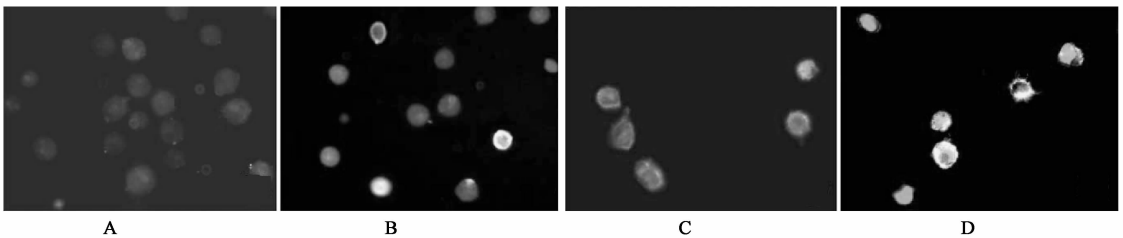


图 1 SPS 对 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

早期凋亡细胞, 细胞呈 Annexin-V 高染和 PI 低染, 可见细胞膜被染成绿色, 细胞核无明显着色; 48 h, 出现中晚期凋亡细胞, 细胞呈 Annexin-V 和 PI 均高染, 可见细胞膜被染成绿色, 细胞核被染成红色; 72 h, 除了晚期凋亡细胞, 甚至有坏死细胞, 坏死细胞呈 Annexin-V 低染和 PI 高染, 可见细胞核被染成红色, 细胞膜无明显着色。见图 2。

3.3 对线粒体膜电位的影响 对照组 SMMC-7721 细胞内罗丹明 123 呈强黄绿色荧光; 0.64 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SPS 作用 24 h 后 SMMC-7721 细胞内荧光强度减弱; 作用 48, 72 h 后, SMMC-7721 细胞内荧光强度明显减弱, 镜下几乎观测不到荧光。见图 3。



A. 0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; B. 0.64 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SPS 作用 24 h; C. 0.64 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SPS 作用 48 h; D. 0.64 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SPS 作用 72 h (图 3 同)

图 2 SPS 对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响 (荧光染色, $\times 400$)

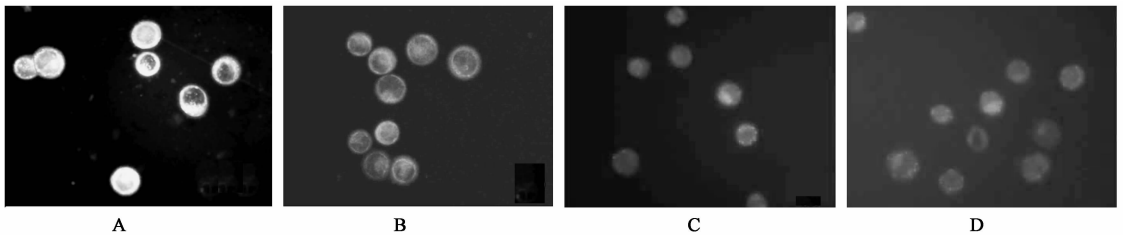


图 3 SPS 对 SMMC-7721 线粒体膜电位的影响 (荧光染色, $\times 400$)

3.4 对 SMMC-7721 细胞 Bcl-2 及 Bax mRNA 表达的影响 实时荧光定量 PCR 检测各组细胞的 C_T 值, 以 GAPDH 为内参, 运用比较 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析 Bcl-2 和 Bax mRNA 相对表达水平。结果表明, 随着 SPS (0.64 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用时间的延长 (0, 24, 48, 72 h), Bax

mRNA 的表达水平增加, 而 Bcl-2 mRNA 的表达水平却降低; 与对照组比较, SPS 处理细胞 24 h Bax 表达上调 16%, 48 h 和 72 h 组 Bax 表达明显升高, 分别上调 189% 和 258%; ΔC_T 值比较, 48 h 和 72 h 组与对照组比较差异有统计学意义。而 Bcl-2 的表达水

平却随着时间的延长而下降,24,48,72 h 各时间点 Bcl-2 的表达水平分别下调 15%、23% 和 51%; ΔC_T

值比较,72 h 组与对照组比较差异有统计学意义。见表 2,3。

表 2 SPS 对 SMMC-7721 细胞 Bax mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

t/h	GAPDH C_T	Bax C_T	ΔC_T	$\Delta \Delta C_T$	$2^{-\Delta \Delta C_T}$	IR/%
0	15.17 ± 0.35	29.76 ± 0.28	14.59 ± 0.45	0.00 ± 0.64	1.00 (0.64 ~ 1.56)	-
24	19.04 ± 0.09	33.42 ± 0.26	14.38 ± 0.27	-0.21 ± 0.53	1.16 (0.80 ~ 1.67)	-16
48	12.71 ± 0.30	25.77 ± 0.10	13.06 ± 0.31 ³⁾	-1.53 ± 0.55	2.89 (1.97 ~ 4.23)	-189
72	12.74 ± 0.11	25.49 ± 0.15	12.75 ± 0.19 ³⁾	-1.84 ± 0.49	3.58 (2.55 ~ 5.03)	-258

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.001$ (表 3 同)。

表 3 SPS 对 SMMC-7721 细胞 Bcl-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

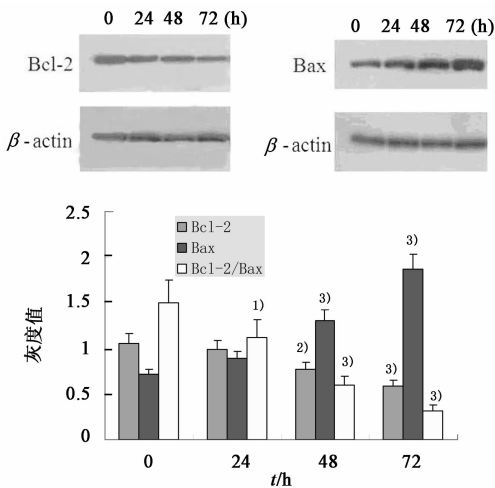
t/h	GAPDH C_T	Bcl-2 C_T	ΔC_T	$\Delta \Delta C_T$	$2^{-\Delta \Delta C_T}$	IR/%
0	16.54 ± 0.20	29.62 ± 0.04	13.09 ± 0.21	0.00 ± 0.29	1.00 (0.82 ~ 1.22)	-
24	14.33 ± 0.16	27.65 ± 0.26	13.32 ± 0.31	0.23 ± 0.37	0.85 (0.66 ~ 1.10)	15
48	16.45 ± 0.29	29.92 ± 0.20	13.46 ± 0.36	0.38 ± 0.41	0.77 (0.58 ~ 1.02)	23
72	15.95 ± 0.06	30.08 ± 0.20	14.12 ± 0.21 ¹⁾	1.04 ± 0.29	0.49 (0.40 ~ 0.59)	51

3.5 对 SMMC-7721 细胞 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响 Western blotting 结果显示,SPS($0.64 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)作用于 SMMC-7721 细胞 0,24,48,72 h 后,Bcl-2 蛋白表达量逐渐降低,72 h 时降低最明显;Bax 蛋白的表达水平随着时间的延长而逐渐上升,以 48,72 h 时上升明显;二者的变化趋势均呈一定的时间依赖关系;而且,Bcl-2/Bax 比值随着时间的延长显著降低(图 2)。

性程度高,预后不良。研究表明,中药或中西医结合治疗肝细胞癌比单纯手术、放疗、化疗的疗效高、毒副作用小。

研究表明,SPS 可以抑制多种肿瘤细胞的生长,影响肿瘤相关因子的表达水平,具有广阔的应用价值和发展前景。本研究在前期工作的基础上,针对 SPS 体外抑制肝癌细胞增殖和诱导凋亡的作用机制进行探讨,发现 SPS 对 SMMC-7721 细胞有抑制增殖和诱导凋亡作用,并呈现出一定的量效关系。观察到随着药物质量浓度的增加肝癌细胞的增殖逐渐受到抑制,然而,并非质量浓度越高效果越好,本研究表明质量浓度为 $1.28 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的抑制作用低于 $0.64 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组。同时,SPS 抑制效率与药物处理时间的延长呈正相关。因此,SPS 对人肝癌细胞的生长增殖具有一定的抑制作用,这种抑制作用在一定程度上随着药物剂量的提高和作用时间的延长而增强。

线粒体在细胞凋亡的过程中发挥重要作用,多种促凋亡蛋白转移至线粒体,破坏线粒体膜的通透性和完整性,导致线粒体跨膜电位($\Delta \Psi_m$)消失;因此, $\Delta \Psi_m$ 是反映线粒体内膜完整性状态的指标, $\Delta \Psi_m$ 下降也是细胞凋亡的早期特异性指标之一。本研究观察到,SPS 干预 SMMC-7721 细胞 24 h 细胞内荧光强度开始减弱,且随着 SPS 时间的延长,荧光强度减弱越明显,48,72 h 几乎观测不到荧光,提示 SPS 可使 $\Delta \Psi_m$ 下降。由此推测,SPS 可能通过线粒



上:蛋白印迹结果,下:相对定量分析结果;与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.001$

图 4 SPS 对 SMMC-7721 细胞内 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

肝细胞癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,其恶

体途径诱导肝癌细胞凋亡。

在线粒体凋亡途径中 Bcl-2 家族起重要作用, 该家族成员中 Bcl-2 和 Bax 是最有代表性抗凋亡基因和促凋亡基因, 通过形成同源或异源二聚体来调节细胞凋亡^[11]。Bcl-2 位于线粒体外膜、核膜和滑面内质网上, 能够抑制多种因素诱导的线粒体跨膜电位和 CytC 的释放, 阻止凋亡的发生; 而 Bax 散布在线粒体基质中, 能改变线粒体膜的通透性, 促进 CytC 的释放, 通过 caspase 途径激活 caspase-3, 促进细胞凋亡, 两者表达水平高低与直接调控凋亡有关^[12]。当 Bax 蛋白高表达时, Bax/Bax 同源二聚体的形成增多, 抑制 Bcl-2 的作用, 则促进细胞凋亡; 当 Bcl-2 蛋白高表达时 Bcl-2/Bax 异源二聚体增多, 则抑制细胞凋亡^[13-14]。本研究应用 Real time-PCR 和 Western blotting 分析 Bcl-2 和 Bax mRNA 及其蛋白的表达情况, 结果显示, SPS 处理的 SMMC-7721 细胞 Bax 的 mRNA 和蛋白表达均上调, 而 Bcl-2 的表达下调, 且 Bcl-2/Bax 比值随着时间的延长显著降低。

综上所述, SPS 可能通过下调 Bcl-2 的表达、促进 Bax 表达和降低线粒体膜电位来诱导或促进细胞凋亡, 从而发挥抗肿瘤作用。

[参考文献]

[1] 何素芳, 王志刚, 任爱农, 等. 红花多糖对 H22 荷瘤小鼠的抑瘤作用及瘤细胞 VEGF, Ki67 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(6): 795.
[2] 周明瑶, 阮殿清, 陈德欣, 等. 红花多糖对人 PBMC 增殖活性及 NK、LAK 细胞杀伤活性的影响[J]. 中医药信息, 2010, 27(1): 47.
[3] 石学魁, 阮殿清, 王亚贤, 等. 红花多糖抗肿瘤活性及

对 T739 肺癌鼠 CTL, NK 细胞杀伤活性的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(2): 215.
[4] 梁颖, 张晓莉, 陶冀, 等. 红花多糖对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用[J]. 中医药学报, 2011, 39(5): 32.
[5] 陶冀, 裴峪, 石学魁, 等. 红花多糖对人 PBMC 和 CD8⁺T 细胞增殖作用的影响[J]. 实用肿瘤学杂志, 2011, 25(2): 111.
[6] 冯承恩, 田素英. 金樱根多糖的制备及其体内抗肿瘤作用初探[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 209.
[7] 张晓莉, 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.
[8] 张璐, 翁立冬, 刘莉, 等. 苯酚-硫酸法测定乌梅多糖的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 107.
[9] 赵斌, 葛金芳, 朱娟娟, 等. 小议在 MTT 法测细胞增殖抑制率中 IC₅₀ 的计算方法[J]. 安徽医药, 2007, 11(9): 834.
[10] 彭文, 李琦, 付文成, 等. 姜黄素及 ox-LDL 对系膜细胞凋亡及 FAP-1 和 bag-1 表达的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2007, 21(4): 54.
[11] 谢广茹, 吴雄志. 中药诱导肝癌细胞凋亡的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2007, 12(3): 225.
[12] Youle R J, Strasser A. The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(1): 47.
[13] Rawat S, Gray C, Johnson T S, et al. Apoptosis and expression of BCL-2 and BAX in cyclosporine-induced experimental renal fibrosis[J]. Transplant Proc, 2003, 35(1): 187.
[14] 王卫东, 陈正堂. Bcl-2/Bax 比率与细胞“命运”[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007, 14(4): 393.

[责任编辑 何伟]