

羊栖菜多糖体外抗肿瘤作用及其作用机制的研究

季宇彬,高世勇*

(哈尔滨商业大学药物研究所 博士后科研工作站,黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 通过体外抗肿瘤实验观察羊栖菜多糖 (SFPS) 对 6 种不同组织肿瘤的抑制作用及其对肿瘤治疗的组织特异性,并揭示其作用机制。方法 采用 MTT 法和集落形成实验法观察 SFPS 体外抗肿瘤作用;采用流式细胞仪观察 SFPS 对肿瘤细胞周期及细胞凋亡的影响;采用 Fluo-3/AM 探针标记,激光共聚焦技术观测细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 。结果 SFPS 对人胃癌细胞 SGC-7901 和人直肠癌 COLO-205 有较好的疗效。可阻滞 SGC-7901 人胃癌细胞由 G_0/G_1 期进入 S 期,升高细胞凋亡指数 (APO) 可使 SGC-7901 细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 先升高后下降,给 $CaCl_2$ 后 $[Ca^{2+}]_i$ 又升高。结论 SFPS 对人胃癌细胞和直肠癌细胞效果较好,这一作用是通过诱导肿瘤细胞凋亡达到的。SFPS 诱导肿瘤细胞凋亡是通过升高肿瘤细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 达到的, $[Ca^{2+}]_i$ 升高时 Ca^{2+} 来源于细胞内钙库释放。
关键词: 羊栖菜多糖; SGC-7901; 细胞凋亡; $[Ca^{2+}]_i$

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)12-1111-04

Studies on antitumor activities of *Sargassum fusiforme* polysaccharide *in vitro* and its mechanism

JI Yu-bin, GAO Shi-yong

(Postdoctoral Research Station, Institute of Materia Medica, Harbin Commercial University, Harbin 150076, China)

Abstract Object To study the inhibitory effect of *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch. polysaccharide (SFPS) on six different kinds of tissue tumor by antitumor experiments *in vitro*, and to observe tissue speciality of tumor treatment and reveal antitumor effect mechanism. **Methods** MTT and colony-forming methods were adopted to study the antitumor activity of SFPS *in vitro*. Influences of SFPS on cell cycle and apoptosis were observed. LCM was adopted to measure $[Ca^{2+}]_i$ of the cells marked by Fluo-3/AM probe. **Results** SFPS had content antitumor activities to SGC-7901 and COLO-205. It prevented the transforming of SGC-7901 from G_0/G_1 period to S period. And it increased the apoptosis index (APO%). Applying SFPS, $[Ca^{2+}]_i$ increased first and then decreased. Further, after giving $CaCl_2$, $[Ca^{2+}]_i$ increased again. **Conclusion** By inducing the apoptosis of tumor cells, SFPS shows content antitumor activities to SGC-7901 and COLO-205. SFPS could increase the $[Ca^{2+}]_i$ in SGC-7901. And the Ca^{2+} are from cellular storage.

Key words *Sargassum fusiforme* polysaccharide (SFPS); SGC-7901; apoptosis; $[Ca^{2+}]_i$

羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch. 俗名为海大麦、海苣菜、大麦菜、破网、胡须泡、海菜芽、鹿角尖等,为褐藻门马尾藻科植物,在我国辽东半岛、山东、浙江、福建、广东浅海域均有生长,日本和韩国也有生长^[1]。羊栖菜已作为中药“海藻”长期应用,能够软坚散结,用于瘰疬瘰癧、痰饮水肿等的治疗^[2],民间也有用其治疗肿瘤的报道,疗效较明显。由于传统中药剂型以水煎剂为主,而羊栖菜水提物中有效成分以羊栖菜多糖 (sargassum fusiforme polysaccharide, SFPS) 为主,因此本实验主要研究 SFPS 的抗肿瘤作用并进一步观察其对肿瘤细胞凋

亡的诱导作用,及对人胃癌细胞 SGC-7901 细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响,以揭示其抗肿瘤作用机制

1 材料

1.1 药品: SFPS,纯度 98%,由哈尔滨商业大学药物研究所提供;羊栖菜购自哈尔滨市药材公司,并经哈尔滨师范大学生物系鉴定;5-Fu,上海制药十二厂,批号 990601

1.2 试剂: RPMI 1640 培养基、小牛血清, Gibco 产品; MTT 为 Sigma 产品, Fluo-3/AM 荧光探针,美国 Molecular Probe 公司。

1.3 肿瘤细胞系: 人肝癌 Bel-7405 人宫颈癌克隆

* 收稿日期: 2003-04-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271598); 黑龙江省普通高等学校骨干教师创新能力资助计划项目 (2001015)

作者简介: 季宇彬 (1956-),男,博士,教授,博士生导师,多年来一直致力于中药药理、肿瘤药理、分子药理学研究。

cc-801 人乳腺癌 MCF-7 人直肠癌 COLO-205 人胃癌 SGC-7901 人食管癌 Eca-109均由中国医学科学院药物研究所提供。

1.4 主要仪器: OPTIMAXL-100K 超速离心机, 贝克曼公司; Form 3121 二氧化碳培养箱, 美国生命科学集团; EL311 酶标仪, 美国 BIO-TEK 公司; FACSCalibur 流式细胞仪, 美国 BD 公司; CO₂ 恒温培养箱, 日本三洋公司; SW- CJ-2FD 超净工作台, 苏州安泰; 激光共聚焦系统, 德国 Leica 公司。

2 方法

2.1 MTT 实验: 按文献^[3]方法操作。

2.2 集落形成实验: 按文献^[3]方法操作。

2.3 对细胞周期及细胞凋亡的影响: 按文献^[3]方法操作。

2.4 肿瘤细胞内 [Ca²⁺]_i 的测定

2.4.1 肿瘤细胞培养: 人胃癌细胞系 SGC-7901 常规复苏后, 培养于质量分数为 0.1 的小牛血清 RPMI 1640 培养液中, 在 37℃, 5% CO₂ 及 95% 湿度的 CO₂ 培养箱中培养, 2~3 天传代 1 次。

2.4.2 SGC-7901 细胞株的处理^[4]: 用 RPMI 1640 培养液调细胞至 3×10⁶ /mL, 接种于培养皿中, 培养 48 h 后, 弃去培养皿内旧培养液, 用 PBS 及无钙台氏液洗两次, 然后加入 1 mL 无钙台氏液, 加入 100 μL 含 Flu-3/AM (1 mg/mL) 荧光探针, 37℃ 避光孵育 1 h, 弃去上清液, 再用无钙台氏液洗一次, 然后加入 1 mL 无钙台氏液, 以备上机检测。

2.4.3 激光共聚焦检测 SFPS 对 SGC-7901 细胞内 [Ca²⁺]_i 的影响: 实验条件: 激发激光 488 nm, Pinhole 500 μm, 扫描激光强度 30%, PM TI 30%, 物镜 40X。空白对照组 [Ca²⁺]_i 的测定: 将负载 Flu-3/AM 的 SGC-7901 细胞置于载物台上, 选定观察目标, 观察未给药细胞内荧光强度, 即 [Ca²⁺]_i 水平, 时间 600 s。给药后 [Ca²⁺]_i 的测定: 弃上清液, 加入 100 μL (50 μg/mL) SFPS, 置 CO₂ 培养箱 (37℃, 5% CO₂) 1 min, 上机观察 SGC-7901 细胞内 [Ca²⁺]_i 变化, 观察时间 500 s。加入 CaCl₂ 后细胞内 [Ca²⁺]_i 的变化: 弃上清液, 加入 100 μL (10 mmol) CaCl₂, 观察 SGC-7901 细胞内 [Ca²⁺]_i 的变化, 观察时间 500 s。

2.5 数据处理: 结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据统计分析进行组间 *t* 检验。

3 结果

3.1 SFPS 对肿瘤细胞株的杀伤作用: 结果见表 1。

3.2 SFPS 对肿瘤细胞株集落形成的影响: 结果见

表 2

3.3 SFPS 对人胃癌 SGC-7901 细胞周期及细胞凋亡的影响: 结果见表 3。

表 1 SFPS 对 6 种肿瘤细胞株的抑制作用

Table 1 Inhibitory effect of SFPS on six different kinds of tissue tumor						
组别	IC ₅₀ / (μg · mL ⁻¹)					
	Bel-7405 克隆	cc-801	MCF-7	COLO-205	SGC-7901	Eca-109
SFPS	71.71	23.41	44.32	16.95	10.14	29.71
5-Fu	0.8	0.2	1.1	0.4	0.6	0.5

表 2 SFPS 对肿瘤细胞株集落形成的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 10)

Table 2 Effect of SFPS on colony-forming of different kinds of tumor cell ($\bar{x} \pm s$, <i>n</i> = 10)			
组别	剂量 /(mg · mL ⁻¹)	集落形成率 %	
		SGC-7901	COLO-205
对照	-	97.73 ± 6.27	98.97 ± 5.45
5-Fu	0.05	82.66 ± 4.74 *	80.36 ± 5.32 *
SFPS	0.10	84.45 ± 5.61 *	83.36 ± 7.78 *
	0.05	89.88 ± 5.81	90.79 ± 7.97
	0.025	92.75 ± 5.97	93.66 ± 5.39

与对照组比较: * *P* < 0.05 ** *P* < 0.01

* *P* < 0.05 ** *P* < 0.01 vs control group

表 3 SFPS 对人胃癌 SGC-7901 细胞周期及细胞凋亡的影响

Table 3 Effect of SFPS on cell cycle and apoptosis of SGC-7901					
组别	<i>t</i> / h	细胞周期 %			APO %
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ + M	
对照	4	56.34	42.16	1.50	1.16 ± 0.46
	8	44.85	50.87	4.28	1.75 ± 0.27
	12	42.23	56.67	1.10	1.43 ± 0.32
	24	58.72	40.21	1.07	1.56 ± 0.67
SFPS	48	67.47	31.13	1.42	1.55 ± 0.46
	4	64.17	34.56	1.27	1.23 ± 0.78
	8	78.19	20.04	1.73	1.65 ± 0.76
	12	87.76	10.32	1.92	12.17 ± 0.88 *
	24	83.77	13.97	2.26	20.33 ± 0.69 *
	48	82.23	18.46	1.31	18.77 ± 0.68 *

与对照组比较: ** *P* < 0.01

** *P* < 0.01 vs control group

3.4 SFPS 对 SGC-7901 细胞内 [Ca²⁺]_i 的影响: 结果表明给药前 SGC-7901 细胞内 [Ca²⁺]_i 处于一个相对恒定的浓度, 见图 1。给药后 [Ca²⁺]_i 迅速升高然后又降低, 加入 CaCl₂ 后 [Ca²⁺]_i 又升高, 见表 4 及图 2。

4 讨论

笔者曾对羊栖菜的体内抗肿瘤作用及对免疫功能的影响作了一些研究^[5,6], 发现其对 S₁₈₀A, EAC 及白血病 L₆₁₅ 小鼠肿瘤有较好的抑制作用, 为了进一步观察其对肿瘤的组织特异性, 本研究采用了 MTT 法和集落形成实验两种体外方法分别观察了

表 4 SFPS对人胃癌 SGC-7901细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

Table 4 Effect of SFPS on $[Ca^{2+}]_i$ of SGC-7901 cell ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

测定时间	$[Ca^{2+}]_i / fI$									
	50 s	100 s	150 s	200 s	250 s	300 s	350 s	400 s	450 s	500 s
给药前	600 ± 10	609 ± 11	602 ± 12	598 ± 12	612 ± 8	590 ± 14	589 ± 10	60 ± 7	596 ± 12	604 ± 8
给药后	614 ± 14 *	618 ± 10 *	644 ± 17 **	674 ± 8 ***	710 ± 15 ***	750 ± 12 ***	704 ± 9 ***	670 ± 5 ***	62 ± 11 ***	580 ± 12 ***
加入 $CaCl_2$ 后	570 ± 14	572 ± 10	568 ± 19	579 ± 11	597 ± 12 $\triangle\triangle\triangle$	615 ± 8 $\triangle\triangle\triangle$	634 ± 9 $\triangle\triangle\triangle$	655 ± 11 $\triangle\triangle\triangle$	697 ± 12 $\triangle\triangle\triangle$	710 ± 9 $\triangle\triangle\triangle$

与给药前比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与加入 $CaCl_2$ 时比较: $\triangle\triangle\triangle P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs pre-administration; $\triangle\triangle\triangle P < 0.001$ vs point after added in $CaCl_2$

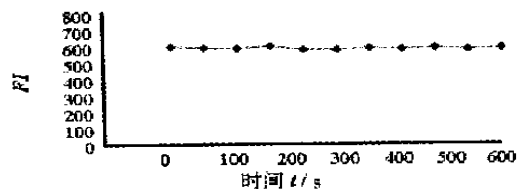


图 1 给药前 SGC-7901 细胞内 $[Ca^{2+}]_i$

Fig. 1 $[Ca^{2+}]_i$ of SGC-7901 cells pre-administration

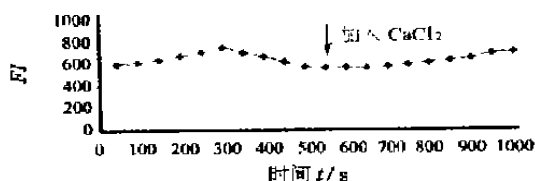


图 2 给药后及加入 $CaCl_2$ 后 SGC-7901 细胞内 $[Ca^{2+}]_i$

Fig. 2 $[Ca^{2+}]_i$ of SGC-7901 cells post-administration and after added in $CaCl_2$

SFPS对人肝癌 Bel-7405 人宫颈癌克隆 cc-801 人乳腺癌 MCF-7 人直肠癌 COLO-205 人胃癌 SGC-7901 人食管癌 Eca-109 等 6 种人癌细胞株的细胞毒作用,结果发现 SFPS 对 6 种人癌细胞株均有一定的抑制作用,而尤以对人胃癌 SGC-7901 和直肠癌 COLO-205 效果最为明显。

本研究还观察了 SFPS 对人胃癌细胞 SGC-7901 细胞周期及细胞凋亡的影响,试图阐明其抗肿瘤作用机制。通过对给药后 4, 8, 12, 24, 48 h 细胞凋亡的观察,发现 SFPS 组各时间段 G_0/G_1 期细胞都多于对照组,即 SFPS 能够阻滞肿瘤细胞由 G_0/G_1 期进入 S 期,诱导细胞凋亡;实验测得细胞凋亡指数也反映出这一特点, SFPS 给药 12 h 后,凋亡指数较相应时间段空白对照组明显升高 ($P < 0.01$)。

新的观点认为肿瘤的发生不仅是因为细胞分裂失控所导致细胞过度增生,还可能是细胞凋亡通路受阻所致,凋亡的诱导和抑制与信号转导通路有关。而 Ca^{2+} 作为第二信使其功能与细胞信号转导密切相关,因此 Ca^{2+} 与凋亡密切相关。

本实验表明 SFPS 通过诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡而达到抗胃癌作用,为进一步阐明 SFPS

诱导细胞凋亡的分子机制,本实验还观察了 SFPS 对人胃癌 SGC-7901 细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响。

本实验采用激光共聚焦技术,在其 Time series 程序下对给药前后人胃癌 SGC-7901 细胞每隔 50 s 进行一次扫描,观测细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化,结果发现给药前 SGC-7901 细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 处于一个相对恒定的水平,给药后 $[Ca^{2+}]_i$ 迅速升高然后又降低,这表明 SFPS 作用于 SGC-7901 细胞后,可引起肿瘤细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,细胞内 Ca^{2+} 具有两个来源:细胞外钙内流和细胞内钙库释放。由于 SGC-7901 细胞处理过程中已用无钙台氏液处理,细胞外无 Ca^{2+} ,因此细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高只能来源于细胞内钙的释放。而 $[Ca^{2+}]_i$ 在升高后又降低,则可认为 $[Ca^{2+}]_i$ 升高后,激活了细胞凋亡机制,随着凋亡的发生,生物膜的一些生物学特性发生一些改变,而引起细胞内 Ca^{2+} 外流,从而使 $[Ca^{2+}]_i$ 在升高到一定程度后又降低。这一结论也可从加入 $CaCl_2$ 后 $[Ca^{2+}]_i$ 的改变得以验证, $CaCl_2$ 加入后,细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 又升高,表明加入 $CaCl_2$ 后,细胞外有 Ca^{2+} ,而抑制了加 $CaCl_2$ 前细胞内 Ca^{2+} 的顺浓度梯度转运,此时细胞外 $[Ca^{2+}]$ 大于细胞内 $[Ca^{2+}]_i$,而使 Ca^{2+} 由细胞外流入细胞内,进而细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 再一次升高。因此通过本实验结果我们推断: SFPS 能通过引起肿瘤细胞内钙库 Ca^{2+} 的释放而升高肿瘤细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度,从而达到诱导肿瘤细胞凋亡而抗肿瘤的作用。

References

- [1] Jiang F W, Zhang Y S. *China Ocean Medicine Glossary* (中国海洋药物辞典) [M]. Beijing: Ocean Press, 1993.
- [2] Chen S Y, Huang W M, Pan Y H, et al. Study on marine medicine (III) Polysaccharide of *Sargassum fusiforme* [J]. *J Lanzhou Univ-Nat Sci* (兰州大学学报·自然科学版), 1998, 34(4): 110.
- [3] Ji Y B, Gao S Y. Studies on antitumor activities and apoptosis induction of *Sargassum fusiforme* polysaccharide in vitro [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(7): 638-639.
- [4] Kao J P Y, Harothuhia A T, Tsien R T, et al. Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by

Fluo-3 [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264 8179-8184.

- [5] Evans D L, Dive C. Effects of cisplatin on the induction of apoptosis in proliferating hepatoma cells and nonproliferating immature thymocytes [J]. *Cancer Res*, 1993, 53 2133.

- [6] Ji Y B, Zhang H B, Liu Z H. Influence of *Sargassum fusiforme* polysaccharide on RBC immunity function of tumor-burdened mice [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物杂志), 1995, 54(2): 10-14.

白藜芦醇和抗坏血酸对预防非典型肺炎方剂I 和VI所致小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的保护作用

金顺姬¹, 段 链¹, 黄 梅¹, 杨静玉¹, 于 海¹, 赵余庆², 吴春福^{1*}

(1. 沈阳药科大学 药理教研室, 辽宁 沈阳 110016; 2. 辽宁中医学院新药研究中心, 辽宁 沈阳 110000)

摘要: 目的 研究白藜芦醇和抗坏血酸对预防非典型肺炎方剂I 和VI致小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的保护作用。方法 采用单细胞凝胶电泳方法研究白藜芦醇和抗坏血酸对预防非典型肺炎方剂I 和VI致小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的保护作用。结果 白藜芦醇 (50, 100, 200 mg/kg× 3 d) 和抗坏血酸 (50, 100, 200 mg/kg× 3 d) 对方剂I 和VI (临床等效量× 3 d) 所致的小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤呈剂量依赖性的保护作用 ($P < 0.05$)。结论 白藜芦醇和抗坏血酸能够保护预防非典型肺炎方剂I 和VI对小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 的损伤。关键词: 白藜芦醇; 抗坏血酸; 预防非典型肺炎方剂; DNA 损伤; 单细胞凝胶电泳

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)12-1114-04

Protective effect of resveratrol and ascorbic acid on lymphocyte DNA damage in mice induced by prescriptions I and VI of Chinese materia medica against SARS

JIN Shun-ji¹, DUAN Lian¹, HUANG Mei¹, YANG Jing-yu¹, YU Hai¹, ZHAO Yu-qing², WU Chun-fu¹

(1. Department of Pharmacology, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Research Center of New Drug, Liaoning College of TCM, Shenyang 110000, China)

Abstract **Object** To evaluate the protective effect of resveratrol and ascorbic acid on lymphocyte DNA damage in mice induced by prescriptions I and VI of Chinese materia medica against SARS. **Methods** Resveratrol, ascorbic acid and two prescriptions against SARS were orally administered to the mice for three days. The effect on DNA damage was measured in mice lymphocytes by means of single cell gel electrophoresis assay (SCGE, or Comet assay). **Results** Resveratrol (50, 100, 200 mg/kg× 3 d) or ascorbic acid (50, 100, 200 mg/kg× 3 d) could dose-dependently restore the DNA damage induced by prescription I and VI (equivalent clinical dose× 3 d). **Conclusion** Resveratrol and ascorbic acid could protect the lymphocyte DNA damage in mice induced by prescriptions I and VI of Chinese materia medica against SARS.

Key words resveratrol; ascorbic acid; prescriptions against SARS; DNA damage; single-cell gel electrophoresis

为预防非典型肺炎在社会上进一步流行,经国家卫生部非典型肺炎防治领导小组审定,国家中医药管理局向社会推荐了 6 个预防非典型肺炎的中药方剂。这些方剂在社会上得到了较广泛的应用。前期研究发现上述方剂中方剂I、V、VI对小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 具有明显的损伤作用^[1],提示健康人服用某些中药来预防非典型肺炎应慎重

多种因素可以引起 DNA 的损伤,其中脱氧核糖核酸的氧化是造成 DNA 损伤的重要因素之一。白藜芦醇和抗坏血酸具有显著的抗氧化活性。有文献报道,白藜芦醇和抗坏血酸对氧化造成的 DNA 损伤具有一定的保护作用^[2,3]。为此,本实验应用国际公认的单细胞凝胶电泳技术 (single cell gel electrophoresis assay, SCGE),又称慧星试验 (Comet

* 收稿日期: 2003-07-17

作者简介: 金顺姬 (1975-),女,吉林省通化市人,药理学硕士,主要从事中药药理研究。

* 通讯作者: Tel, Fax: (024) 23843567 E-mail: wuc@sypu.edu.cn