

· 研究论文 ·

藻红蛋白诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞衰老研究

季宇彬^{1,2}, 刘日嘉^{1,2}, 高世勇^{1,2}

1 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心 药物研究所博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150076

2 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要 **目的:** 研究藻红蛋白对人乳腺癌 MCF-7 细胞的诱导衰老作用。**方法:** 采用 MTT 法检测藻红蛋白对 MCF-7 细胞的生长抑制作用, 采用倒置显微镜观察形态学变化, 酸性 β -半乳糖苷酶染色法和衰老相关异染色质聚集检测藻红蛋白诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞衰老作用。**结果:** MTT 法结果显示, 藻红蛋白对体外培养的人乳腺癌细胞 MCF-7 具有明显的生长抑制作用, IC_{50} 为 $134.87 \mu\text{g/mL}$ 。结果发现藻红蛋白作用 72 h 后, 细胞呈现变大变扁平, 细胞内形成空泡、颗粒增多等明显衰老形态。在倒置显微镜下观察, 酸性 β -半乳糖苷酶染色呈阳性; 在荧光显微镜下观察, DAPI 染色出现衰老相关异染色质聚集现象。**结论:** 藻红蛋白可通过诱导 MCF-7 细胞衰老达到抗肿瘤作用。

关键词 藻红蛋白; 细胞衰老; 酸性 β -半乳糖苷酶染色; 衰老相关异染色质聚集

中图分类号: R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2009) 01-0013-06

Study on the senescence induced by phycoerythrin in human breast cancer MCF-7

JI Yu-bin^{1,2}, LIU Ri-jia^{1,2}, GAO Shi-yong^{1,2}

1 Postdoctoral Programme of Institute of Materia Medica, Center of Research and Development on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2 Engineering Research Center of Natural Anticancer Drugs, Ministry of Education, Harbin 150076, China

Abstract **Objective:** To investigate the effects of phycoerythrin (PE) on the induction of cell senescence in human breast cancer MCF-7 cells. **Methods:** The inhibitory rate of MCF-7 cells growth was measured by MTT assay and morphological changes of MCF-7 cells was observed through the inverted microscope. Acidic β -galactosidase dying (SA- β -Gal dying) and senescence-associated heterochromatin aggregation were used to detect the cell senescence caused by PE in MCF-7 cells. **Results:** The results of MTT assay indicates that PE could inhibit the growth of human breast cancer MCF-7 cells significantly and the IC_{50} was $134.87 \mu\text{g/mL}$. After 72 h, MCF-7 cells which were treated by PE had become bigger and flatter meanwhile the appearance of vacuolization and particles which are the specific patterns of the cell senescence were also observed. The staining of acidic β -galactosidase was positive, which observed by inverted microscope, and, the emergence of senescence-associated heterochromatin aggregation (SAHF) in staining of DAPI was found under

收稿日期: 2009-06-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (300672595); 教育部科学技术研究重点项目 (207030); 教育部博士点基金项目 (20070240081); 黑龙江省自然科学基金重大项目 (ZJY0504)

作者简介: 季宇彬 (1956-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤药理学。

the fluorescence microscope. **Conclusion:** The results demonstrate that PE has the antitumor effect by inducing the cell senescence of MCF-7 cells.

Key words acidic β -galactosidase dying; cell senescence; phycoerythrin; senescence-associated heterochromatin aggregation (SAHF)

细胞衰老 (cellular senescence or cell aging) 是指细胞在信号转导作用下不可逆地脱离细胞周期并丧失增殖能力后进入的一种相对稳定的状态, 表现为永久性细胞周期停滞^[1,2]。细胞衰老行为并非是细胞生命周期的简单终结, 而是同其他的细胞死亡方式 (如细胞凋亡) 一样, 是多细胞生物赖以维持自身稳定的重要生理功能之一。细胞衰老可能促进生物衰老, 并且与肿瘤发生受抑密切相关, 对肿瘤的治疗具有一定的指导意义。

藻红蛋白 (Phycoerythrin, PE) 是从成熟的深红色海藻内分离提取出来的, 是藻胆色素蛋白中的一种。研究表明, PE 对人宫颈癌 HeLa 细胞的生长有显著的抑制作用, 这种作用具有明显的剂量依赖性。藻红蛋白能将 HeLa 细胞周期阻滞在 G2/M 期, 抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡^[3]。藻红蛋白在体外能将光能传递给周围环境中的氧分子, 产生单线态氧等活性氧组分, 它介导的光动力反应能够有效的抑制肿瘤细胞合成并杀伤癌细胞。随着藻红蛋白浓度的增加, 合成下降, 肿瘤细胞存活率降低^[4]。采用 MTT 法筛选藻红蛋白对不同肿瘤细胞的细胞毒作用, 发现藻红蛋白对 MCF-7 细胞具有较强的细胞毒作用。本实验采用倒置显微镜观察法、酸性 β -半乳糖苷酶染色法和衰老相关异染色质聚集检测藻红蛋白诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞的衰老作用。

1 材料

1.1 细胞与药物

MCF-7 人乳腺癌细胞株 (哈尔滨商业大学药物研究所提供); 阿霉素 (意大利 Pharmacia Italia S.P.A 公司); 藻红蛋白 (磐安县鸿瑞生物科技有限公司, 质量分数 $\geq 99\%$)

1.2 试剂与仪器

溴化四氮唑蓝 (MTT, 美国 Molecular Prob 公司), 二甲基亚砜 (DMSO, 北京博大泰克生物基因技术有限公司), RPMI 1640 培养基 (美国 Gibco 公司), 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司), 胰酶 (Gibco 公司); 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒 (碧云天生物技术研究), DAPI 染色液 (碧云天生物技术研究); CO_2 培养箱, CO-150 (美国 NBS 公司); 倒置显微镜, CKX-41-32 (日本 Olympus 公司); 超净工作台, SW-CJ-2F (苏州苏净集团净化设备厂); 荧光显微镜 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

实验所用人乳腺癌 MCF-7 细胞在体积分数为 $5\% \text{CO}_2$, 37°C 培养箱中培养传代, 含 15% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养, 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 每 2~3 d 传代 1 次。

2.2 MTT 比色法检测藻红蛋白对 MCF-7 细胞生长抑制作用

将对数生长期的细胞用胰酶消化后配制成浓度为 $1 \times 10^4 / \text{mL}$ 的细胞悬液, 按 1 000 个 / 孔接种于 96 孔板, 每孔加 $100 \mu\text{L}$ 。次日加入藻红蛋白 (终质量浓度分别为 400、200、100、50、 $25 \mu\text{g} / \text{mL}$)、阿霉素 (终质量浓度分别为 10、1、 $0.1 \mu\text{g} / \text{mL}$)、阴性对照组加入 RPMI 1640 培养液, 每孔加 $100 \mu\text{L}$, 每组设 6 个平行孔, 给药后于 37°C 继续培养 72 h, 弃上清液, 每孔加 $100 \mu\text{L}$ 新鲜配制的含 $0.15 \text{mg} / \text{mL}$ MTT 的无血清培养基, 继续培养 4 h, 弃上清液, 每孔加 $200 \mu\text{L}$ DMSO 溶解, 用微型振荡器振荡混匀, 用 MK 3 型酶标仪在参考波长 490nm , 检测波长 570nm 条件下测定吸光度 (A) 值, 以溶剂对照处理的肿瘤细胞为对照组, 计

算药物对肿瘤细胞的抑制率,并按中效方程计算 $IC_{50}^{[5]}$ 。实验重复 3 次。

$$\text{抑制率} = (1 - \text{给药组 } A \text{ 值} / \text{对照组 } A \text{ 值}) \times 100\%$$

2.3 倒置显微镜观察藻红蛋白诱导 MCF-7 细胞衰老形态变化

取指数生长期的 MCF-7 细胞,加入适量 0.25 % 胰蛋白酶液消化细胞,使贴壁细胞脱落。用含 10 % 胎牛血清的培养基制备成浓度为 $6 \times 10^5 / \text{mL}$ 的单细胞悬液,于 24 孔板中每孔接种 0.5 mL,共接种 12 个孔。将平板置于 37 ℃、5 % CO_2 培养箱。24 h 后加入不同浓度的藻红蛋白 0.125 mL,每组两个平行孔,终浓度分别为 37.5、75、150、300、600 $\mu\text{g/mL}$,阳性对照组加入阿霉素,终浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$,阴性对照组加入相同体积的培养液。分别于加药后第 1、2、3、4 天,在 2 mL PBS 洗 2 遍后,用固定液(甲醇-冰醋酸=3:1)固定 5~10 min,2 mL PBS 清洗 3 遍,直接于倒置显微镜下观察并拍照。

2.4 衰老相关酸性 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色

经上述固定处理的样品每孔加 0.25 mL 新配制的 β -半乳糖苷酶染料(配制方法按试剂盒说明书操作),37 ℃ 孵育过夜,用保鲜膜封住 24 孔板防止蒸发。然后,用 1 mL PBS 清洗 3 遍,于普通光学显微镜观察并照相。

2.5 衰老相关异染色质聚集(SAHF)的观察

按“2.3”项下方法进行细胞培养及给药。培养 48 h,吸除细胞培养液,用 PBS 洗涤 2~3 次,用固定液(甲醇-冰醋酸=3:1)在 4 ℃ 下固定 15 min。适当洗涤去除固定剂,每孔加入 0.125 mL DAPI 染色液,避光室温孵育 5 min。吸除 DAPI 染色液,用 PBS 洗涤 2~3 次,每次 3~5 min。直接在荧光显微镜下观察并拍照。

3 结果

3.1 藻红蛋白对 MCF-7 细胞的生长抑制作用

实验结果显示,藻红蛋白对体外培养的人乳腺癌细胞 MCF-7 具有明显的生长抑制作用,并呈一定的剂量依赖性。实验组与对照组相比有显著性差异($P < 0.01$)。处理 72 h 的 IC_{50} 值为 134.87 $\mu\text{g/mL}$,见表1。

表1 藻红蛋白对 MCF-7 细胞的生长抑制作用($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Inhibition of PE on growth of MCF-7 cells

($\bar{x} \pm s, n=6$)	
分组	$IC_{50} / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
藻红蛋白	134.87
阿霉素	0.42

3.2 倒置显微镜观察细胞衰老形态

在倒置显微镜下观察,藻红蛋白作用 24、48、72、96 h 后的细胞形态,发现药物作用 24 h 时,细胞没有显现出明显的衰老形态学特征。在药物作用 48、72 h 后,观察到细胞呈现变大变扁平,细胞内形成空泡、颗粒增多等明显衰老形态,显现一定的时间剂量效应(如图 1 的各藻红蛋白组)。阳性对照组细胞形态也呈上述形态学改变(如图 1-B)。阴性对照组未见明显形态学改变,表现为细胞贴壁生长良好,细胞轮廓清晰、饱满,形态规则,生长致密、旺盛(如图 1-A)。

3.3 衰老相关酸性 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色

采用酸性 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色法,通过倒置显微镜观察并拍照,衰老细胞分泌的酸性 β -半乳糖苷酶的含量较正常细胞会增加,在衰老特异性的 β -半乳糖苷酶催化下会生成蓝色产物。从而在光学显微镜下很容易观察到生成蓝色产物的衰老细胞。而正常细胞生成蓝色产物的量会很少。

实验结果显示,不同质量浓度藻红蛋白作用 72 h 后,经 β -半乳糖苷酶染色,部分细胞生成蓝色产物,为典型的细胞衰老特征(如图 2 的各藻红蛋白组)。阳性对照组也出现明显的衰老特征(如图 2-B)。阴性对照组的 MCF-7 细胞,未见衰老特征的细胞出现(如图 2-A)。

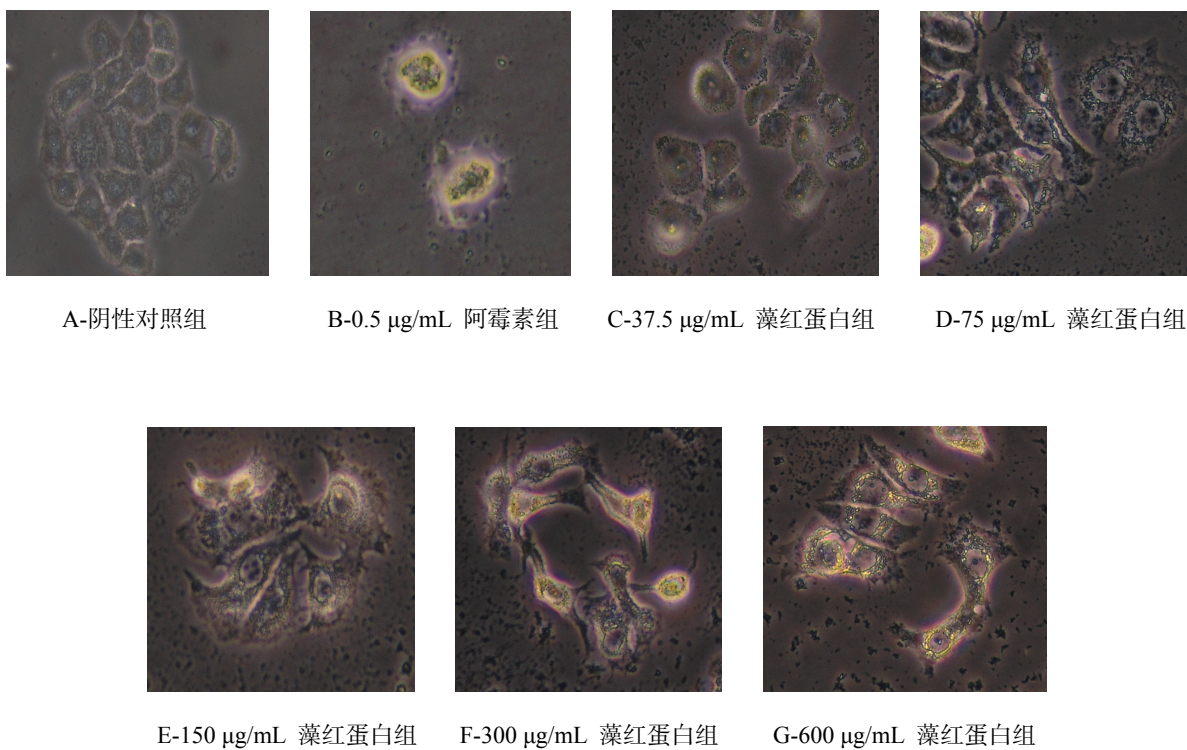


图 1 藻红蛋白作用 MCF-7 细胞 72 h 后形态学变化

Fig. 1 Morphological changes of MCF-7 cells treated with R-PE for 72 h

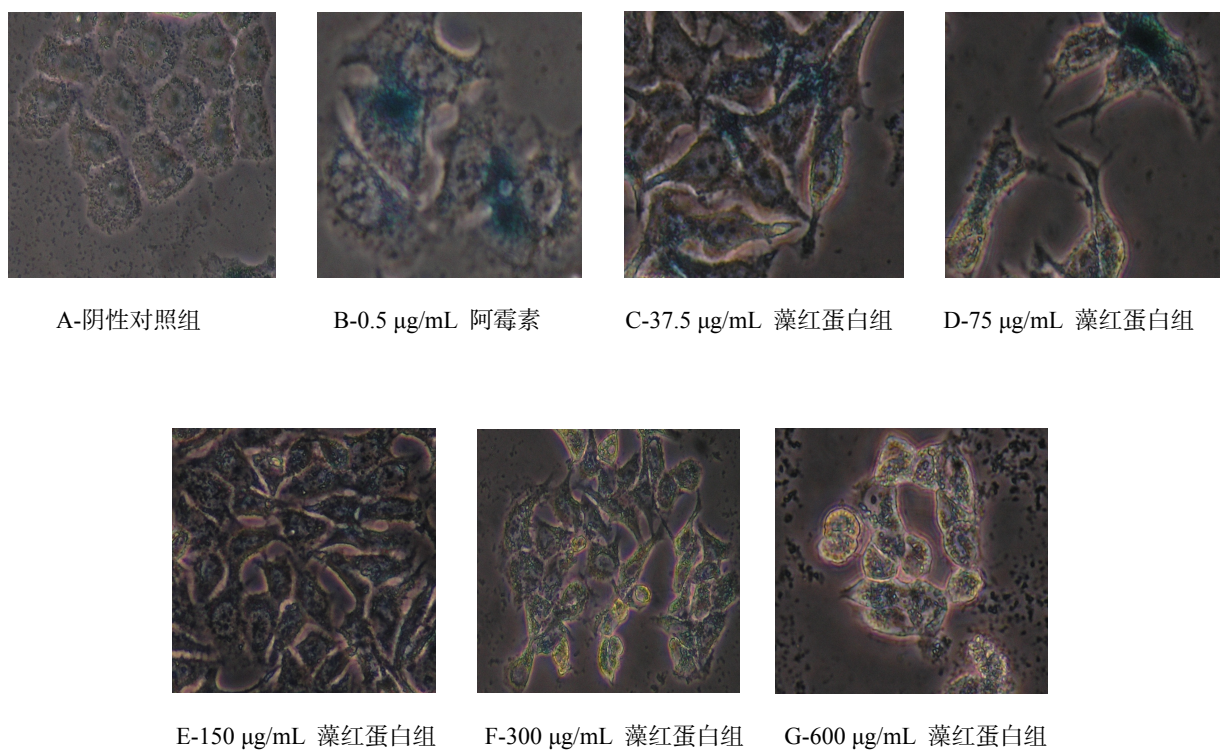


图 2 藻红蛋白作用 MCF-7 细胞 72 h 后 β -半乳糖苷酶染色图片

Fig. 2 Pictures of MCF-7 cells treated with R-PE for 72 h staining with SA- β -Gal

3.4 荧光显微镜观察衰老相关异染色质聚集 (SAHF)

DAPI 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料, 和双链 DNA 结合后可以产生比 DAPI 强 20 多倍的荧光。阳性着色的衰老细胞的细胞核显现十分明显的 DNA 点状聚集现象。而正常细胞核中 DNA 呈均一分布。实验结果可见: 不同质量浓度

藻红蛋白作用 72 h 后, 经 DAPI 染色, 部分细胞核中的 DNA 呈现点状聚集现象, 为典型的衰老特征 (如图 3 的各藻红蛋白组)。阳性对照组也出现明显的衰老特征 (如图 3-B)。阴性对照组的 MCF-7 细胞, 未见衰老特征的细胞出现 (如图 3-A)。

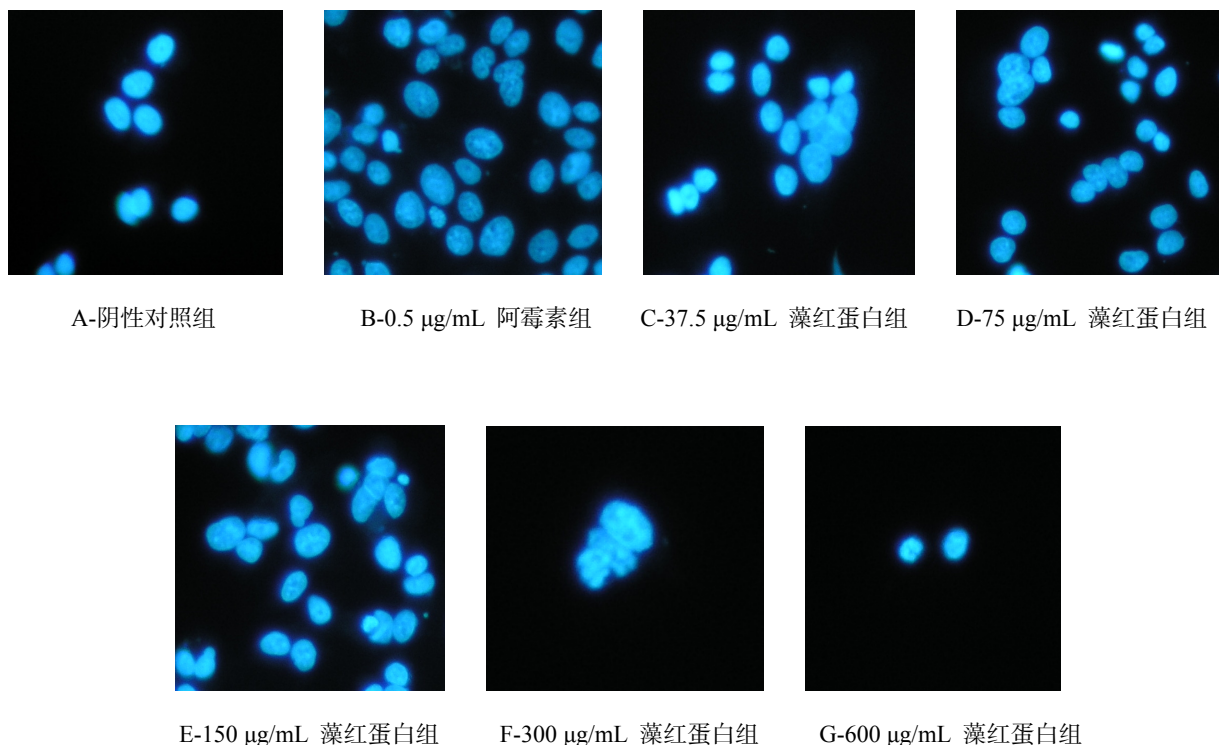


图 3 藻红蛋白作用 MCF-7 细胞 72 h 后 DAPI 染色图片

Fig. 3 Pictures of MCF-7 cells treated with R-PE for 72 h staining with DAPI

4 讨论

近年来, 越来越多的证据表明细胞毒性药物在低于诱导凋亡的剂量可诱导加速细胞衰老, 最终经细胞坏死和有丝分裂期死亡途径清除^[6]。1998 年, Wang X 等首先证实鼻咽癌肿瘤细胞株在 DNA 损伤药物顺铂的作用下, 不是经细胞凋亡方式而是经细胞衰老方式死亡^[7,8]。1999 年, Chang B D 等的研究进一步证实, 在低剂量下多种抗肿瘤药物均可诱导细胞衰老, 其中 DNA 损伤药物阿霉素、阿非迪霉素和顺铂的效应最明显; 其次是电离辐射、阿糖

胞苷和依托泊苷; 抗微管类药物紫杉醇和长春新碱的效应最弱^[9]。此后, 相继的研究报道证实, 羟基脲、环磷酰胺、溴脱氧尿嘧啶、喜树碱和 SN-38 等均可诱导肿瘤细胞发生衰老, 分化诱导剂 (如视黄醇类, 包括全反式维甲酸、9-顺式维甲酸) 及化学预防药物 (如他莫昔芬等) 也可诱导细胞发生衰老。

形态学观察是鉴定细胞衰老最可靠的方法, 有其特定的价值, 其他检查方法必须与形态学检测相结合才具有实际意义。细胞衰老时有其典型的形态学改变: 细胞变大变扁平, 细胞内形成空泡、颗粒

增多,其重要生理标记是酸性 β -半乳糖苷酶染色呈阳性,以及衰老相关异染色质聚集。酸性 β -半乳糖苷酶 (SA- β -gal) 染色是一种快速简便的检测细胞衰老的手段,当细胞发生衰老时,其 β -半乳糖苷酶的含量会上升,这可能是衰老细胞内溶酶体含量增加所致^[10]。Narita 等^[11]在 IMR 90 和 WI 38 细胞中观察到,衰老细胞的核仁变大, DNA 呈点状聚集分布 (DNA foci), 且此 DNA foci 现象几乎与细胞衰老表型同时出现。这是年轻细胞和可逆性周期阻滞的细胞所没有的现象。进一步研究发现,这些 DNA foci 所在区域是转录无活性区域,而且 K9M-H3 和 HP1 所在部位恰好与衰老细胞的 DNA foci 区一致,但在年轻及可逆性周期阻滞的细胞中, K9M-H3、HP1及染色质的分布较为均一,不呈点状聚集。这就表明衰老细胞中的染色质结构发生了特征性变化,这一现象由此被命名为 SAHF。由于衰老细胞中 K9M-H3、HP1 和 SAHF 定位的一致性,因此,它们成为标示 SAHF 的标志蛋白。这就为我们提供了一个判断细胞是否已进入衰老的方法,即采用免疫荧光的方法同时观察 HP1 (或 K9M-H3) 和染色质在核中的分布,若呈点状聚集而不是均一分布,则标志细胞已进入了衰老状态。

本实验表明藻红蛋白对体外培养的人乳腺癌细胞 MCF-7 具有明显的生长抑制作用,且随着剂量的增加,抑制作用增强。实验采用不同剂量藻红蛋白作用于 MCF-7 细胞,从形态学的角度可以直观地显示,细胞变大变扁平,细胞内形成空泡、颗粒增多等细胞衰老的典型形态特征 (如图 1-C、D、E、F、G)。采用 β -半乳糖苷酶 (SA- β -gal) 染色法,倒置显微镜观察,发现给药组细胞分泌衰老特征性 β -半乳糖苷酶含量增加,经染料染色,生成蓝色物质,且随着药物剂量的升高蓝色物质的含量增加 (如图 2-C、D、E、F、G)。DAPI 染色法荧光显微镜观察,给药组细胞核中 DNA 显示点状聚集分布,且随着给药剂量的升高, DNA 点状聚集更为明显 (如图 3-C、D、E、F、G)。综上所述,藻红蛋白能够诱导 MCF-7 细胞衰老,进而达到抗

肿瘤的作用。本研究提示藻红蛋白的抗肿瘤作用及作用机制值得进一步探讨。

参考文献:

- [1] Ben-Porath I, Weinberg R A. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005, 37 (5) : 961-976
- [2] Narita M, Lowe S W. Executing cell senescence. *Cell Cycle.* 2004, 3 (3) : 244-246
- [3] 陈美珍, 葛安山, 崔鹏举, 等. 龙须菜藻红蛋白对 HeLa 细胞增殖抑制及其机制的研究[J]. 食品科学, 2007, 28 (9) : 549-552
- [4] 葛安山. 龙须菜藻红蛋白抗肿瘤活性研究[A]. 汕头大学硕士学位论文. 汕头: 汕头大学, 2007
- [5] 刘 薇, 林文翰, 季宇彬. 青龙衣毒性作用及体外抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29 (9) : 887-890
- [6] Borst P, Borst J, Smets L A. Does resistance to apoptosis affect clinical response to antitumor drugs[J]. *Drug Resist Updat*, 2001, 4 (2) : 129-131
- [7] Wang X, Wong S C, Pan J, et al. Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 1998, 58 (22) : 5019-5022.
- [8] Wang X, Tsao S W, Wong Y C, et al. Induction of senescent-like growth arrest as a new target in anticancer treatment[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2003, 3 (2) : 153-159.
- [9] Chang B D, Broude E V, Dokmanovic M, et al. A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents[J]. *Cancer Res.* 1999, 59 (15) : 3761-3767.
- [10] Dimri G P, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92 (20) : 9363-9367.
- [11] Narita M, Sabrina N, Heard E, et al. Rb-Mediated heterochromatin formation and silencing of E2F Target genes during cellular senescence. *Cell*, 2003, 113 (6) : 703-716.