

羊栖菜多糖体外抗肿瘤作用及其诱导肿瘤细胞凋亡的研究

季宇彬,高世勇,张秀娟*

(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,同时揭示其作用机制。方法 采用 MTT 法和集落形成实验法观察 SFPS 的体外抗肿瘤作用;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。结果 SFPS 对人胃癌细胞 SGC-7901 和人直肠癌 COLO-205 有较好的疗效。SFPS 可阻滞 SGC-7901 人胃癌细胞由 G₀/G₁ 期进入 S 期,升高细胞凋亡指数 (APO)。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。

关键词: 羊栖菜多糖; SGC-7901; 细胞凋亡; 抗肿瘤

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)07-0638-03

Studies on anti-tumor activities and apoptosis inducement of sargassum fusiforme polysaccharide *in vitro*

Ji Yu-bin, GAO Shi-yong, ZHANG Xiu-juan

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

Key words sargassum fusiforme polysaccharide (SFPS); SGC-7901; apoptosis; anti-tumor

羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch. 俗名为海大麦、海茜菜、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,能软坚散结,用于癭瘤瘰癧、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,而羊栖菜水提取物有效成分中以羊栖菜多糖 (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,上海制药十二厂提供,批号 990601。

1.2 试剂: RPMI 1640 培养基、小牛血清, Gibco 产品; MTT, Sigma 产品。

1.3 肿瘤细胞系: 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 均由中国医学

科学院药物所提供。

1.4 主要仪器: 超速离心机 OPTIMA XL-100K, 贝克曼公司;二氧化碳培养箱 Form 3121, 美国生命科学集团;酶标仪 EL311, 美国 BIO-TEK 公司;流式细胞仪 FACSCalibur, 美国 BD 公司; CO₂ 恒温培养箱, 日本三洋公司。

2 方法

2.1 MTT 实验^[3]: 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液将待测细胞株配成单个细胞悬液,以每孔 1 200 个细胞接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μ L。同时设溶剂对照,每个剂量设 3 个平行孔,常规培养 24 h 后,加入受试药物,置 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 4 d,向每孔加入 MTT 储液 10 μ L (5 mg/mL),震荡混匀后,继续培养 4 h,加入 10% 酸化的十二烷基磺酸钠 (SDS) 100 μ L (pH 4.7),过夜用 EL311 型酶标仪测定吸光度 (A) 值,测定波长 570 nm,参考波长 630 nm,计算 IC₅₀ 值。

2.2 集落形成实验^[4]: 将待测细胞株以 100 个细胞/皿分别接种于 10 mL 37℃ 预温培养液的培养皿中,常规培养,24 h 后加入受试药物,37℃, 5% CO₂ 及饱和湿度环境下,培养 10 d,弃去培养液,用 PBS (0.01 mol/L, pH7.4) 小心浸洗 3 遍,10% 甲

* 收稿日期: 2002-12-04

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,1999 年进入哈尔滨医科大学博士后科研流动站工作。

醇固定,15 min后弃去固定液,0.25% 龙胆紫染色,显微镜计数大于 50个细胞的克隆数,对照组以培养液代替受试药物,结果以克隆形成率 (%) 表示 (克隆形成率= 克隆数 /接种细胞数× 100%)

2.3 对细胞周期及细胞凋亡的影响^[5]:选择对数生长长期的人胃癌 SGC-7901细胞,常规消化后,37℃,5% CO₂湿化培养箱内孵育 24 h,随机分为空白对照组和给药组,给药组药物终浓度为 50μ L/mL,对照组加入等量的培养液,给药后 4,8,12,24和 48 h 各组分别取样,1体积细胞悬液加 9体积 70% 乙醇于 -20℃ 固定 12 h,离心,PBS液洗涤除尽乙醇,离心后悬于 PI染液中室温染色 30 min,流式细胞仪测定,以凋亡指数 (APO) 表示细胞凋亡情况 (APO= 凋亡细胞数 /所测细胞数× 100%)

3 结果

3.1 SFPS对肿瘤细胞株的杀伤作用:结果见表 1

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 / (μ g° 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

3.2 SFPS对肿瘤细胞株集落形成的影响:见表 2
表 1 SFPS对肿瘤细胞株集落形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of SFPS on colony-forming of different kinds of tissue tumor ($\bar{x} \pm s, n=10$)

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

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

4 讨论

羊栖菜在中药中以“海藻”入药,有多年的应用历史,其方剂对肝癌、宫颈癌、乳腺癌、胃癌、肠癌等有较好疗效^[6],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^[7],发现其对 S₈₀A 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入肿瘤的组织特异性,本研究采用了 MTT法和集落形成实验两种体外方法分

表 3 SFPS对 SGC-7901人胃癌细胞周期及细胞凋亡的影响

Table 3 Influence of SFPS on cell cycle and apoptosis of SGC-7901

组别	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
	48	67.47	31.13	1.42	1.55± 0.46
SFPS	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

别观察了 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,之所以选取这 6种人癌细胞株,是因为目前文献报道了含羊栖菜的几首方剂分别对这几种肿瘤有较好的治疗作用^[6]。本研究结果显示 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。目前认为许多肿瘤的发生是由于肿瘤细胞凋亡通路受阻而引起的,因此诱导肿瘤细胞凋亡是一条抗肿瘤的有效途径,各种抗癌药物通过激活一个固有基因介导的细胞程序死亡而实现抗肿瘤作用^[7,8]。本研究通过对给药后 4,8,12,24,48 h 细胞凋亡的观察,发现 SFPS组各时间段 G₀/G₁期细胞都多于对照组,即 SFPS能够阻滞肿瘤细胞由 G₀/G₁期进入 S期,诱导细胞凋亡;实验所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。

综上所述, SFPS对胃癌疗效较为突出,通过诱导 SGC-7901人胃癌细胞凋亡而达到抗胃癌的作用,同时对肝癌、宫颈癌、乳腺癌、直肠癌亦有一定疗效,但效果不显著。

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]. Lanzhou Univ-Natural Sciences (兰州大学学报·自然科学版), 1998, 34(4): 110.

- [3] Li J, Liu Y Q, Sun G Z, *et al.* The experimental studies on adriamycin induced human hepatoma cells apoptosis [J]. *Chin J Clin Oncology Rehabilitation* (中国肿瘤临床与康复), 1999, 6(6): 14.
- [4] Han R. *Research and Development of Anticancer Drugs and Experimental Techniques* (抗癌药物研究与实验技术) [M]. Beijing: Beijing University of Medical Science and Peking Union Medical College United Press, 1997.
- [5] Zhuo L F, Qi G Y, Zhang X H, *et al.* *Flow Cytometry and Biomedicine* (流式细胞术与生物医学) [M]. Shenyang: Liaoning Science Press, 1996.
- [6] Ji Y B. *Pharmacological Action and Application of Marine Medicine and Limnology Medicine* (海洋湖沼药物药理与应用) [M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press, 2003.
- [7] Ji Y B, Yang S L, Gu C S. Effects of SFPS on content of LPO and activities of GSH-PX, CAT, SOD in L615 Tumor-burdened mice [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物杂志), 1994, (2): 20-30.
- [8] Skladanowski A, Konopa J. Adriamycin and adanomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumor cells [J]. *Biochemical Pharmacol*, 1993, 469: 375.

射干中异黄酮成分清除自由基的作用

秦民坚, 吉文亮, 刘峻, 赵俊, 余国奠*

(中国药科大学中药学院, 江苏南京 210038)

摘要:目的 研究射干 *Belamcanda chinensis* 中分离的 4 种异黄酮类成分清除 $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ 和 H_2O_2 自由基的能力。方法 采用生物化学发光法测定。结果 射干根茎中分离得到的异黄酮成分野鸢尾苷元 (irgenin, I), 鸢尾苷元 (tectorigenin, II), 鸢尾苷 (tectoridin, III), 5, 6, 7, 4'-四羟基-8-甲氧基异黄酮 (5, 6, 7, 4'-tetrahydroxy-8-methoxyisoflavone, IV) 均具有清除自由基的作用, 其中鸢尾苷元对 $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ 和 H_2O_2 氧自由基清除作用的能力最强。结论 射干根茎中的 4 种异黄酮类成分具有清除自由基的作用。

关键词: 射干; 异黄酮; 自由基; 生物化学发光法

中图分类号: R286.75

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)07-0640-02

Scavenging effects on radicals of isoflavones from rhizome of *Belamcandae chinensis*

QIN Min-jian, JI Wen-liang, LIU Jun, ZHAO Jun, YU Guo-dian

(College of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

Key words rhizome of *Belamcandae chinensis* (L.) DC.; isoflavones, radical; biochemiluminescence

近年研究发现, 中草药中某些有效成分具有清除自由基的作用。例如甘草中甘草酸和甘草次酸具有不同程度的抑制 $O_2^{\cdot-}$ 的作用^[1], 云芝糖肽和灵芝多糖具有清除活性氧的作用, 与其提高机体免疫能力和防癌抗癌机制有关^[2]。不同的天然产物对不同类型的自由基清除效果各异, 机制各不相同, 所以应建立不同的自由基模型来评价药物的抗氧化自由基活性。本实验采用邻苯三酚-鲁米诺 (luminol)-碳酸缓冲液 (pH 10.2), 邻菲罗啉- Cu^{2+} -抗坏血酸- H_2O_2 , H_2O_2 -鲁米诺 (luminol)-碳酸缓冲液 (pH 9.5) 3 个产生活性氧和化学发光体系, 检测射干 *Belamcanda chinensis* (L.) DC. 中 4 种异黄酮单体成分清除 $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ 和 H_2O_2 的作用, 为射干类中药筛选自由基清除剂提供一条有效的途径。

1 仪器与试剂

1.1 仪器: SHG-C 生物化学发光测量仪 (上海上立检测仪器厂), 分析天平 (上海天平仪器厂), PHS-25 型酸度计 (上海雷磁仪器厂), 旋涡混合器 (上海环宇仪器厂)。

1.2 试剂: 无水碳酸钠 (天津化学试剂厂, 优级纯), 碳酸氢钠 (上海虹光化工厂, 分析纯), 乙二醇四乙酸二钠 (EDTA) (上海化学试剂总厂, 标准纯), 焦性没食子酸 (邻苯三酚) (遵义第二化工厂, 分析纯), 3-氨基邻苯二甲酰肼 (鲁米诺, luminol, Sigma 公司), $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (南京化学试剂厂, 分析纯), $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (上海试剂二厂, 分析纯), 四硼酸钠 (硼砂) (太仓化工二厂, 分析纯), 1, 10-菲罗啉 (邻菲罗啉) (上海试剂三厂, 分析纯), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (合肥工大化学试剂厂, 分析纯), 30% 过氧化氢 (上海桃浦化工厂, 分析纯)。

* 收稿日期: 2002-09-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170103); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK97085)