

昆布多糖硫酸酯对非激素依赖型人前列腺癌 PC-3 细胞及 bcl-2、caspase-3 基因表达的影响

邹明畅,崔飞伦,盛玉清,邱 镇

(江苏大学附属人民医院,江苏 镇江 212002)

摘 要:目的 研究昆布多糖硫酸酯(LAMS)对体外培养的非激素依赖型人前列腺癌 PC-3 细胞株的作用,以及对 bcl-2 和 caspase-3 基因表达的影响,探讨其抗肿瘤的作用机制。方法 分别用 0、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LAMS 作用于 PC-3 细胞,用 WST-8 法检测细胞生长的抑制作用,利用流式细胞术(FCM)分析细胞周期和凋亡的变化,用荧光显微镜观察 PC-3 细胞形态,RT-PCR 和 Western blotting 检测细胞增殖、凋亡相关基因 bcl-2 和 caspase-3 mRNA 及蛋白的表达。结果 LAMS 能抑制 PC-3 细胞的增殖,呈时间-剂量效应;不同质量浓度 LAMS 诱导 PC-3 细胞出现剂量依赖性 S + G₂期阻滞;LAMS 作用于 PC-3 细胞后出现凋亡的形态学改变,LAMS 对 PC-3 细胞 bcl-2 mRNA 和蛋白表达均呈剂量依赖性减弱,对 PC-3 细胞 caspase-3 mRNA 和蛋白表达均呈剂量依赖性增强。结论 LAMS 能抑制体外 PC-3 细胞的生长,并促进其 S + G₂期阻滞和凋亡,LAMS 影响 PC-3 细胞相关基因蛋白的表达,可能是其抑制前列腺癌的作用机制之一。

关键词:昆布多糖硫酸酯;前列腺癌;PC-3 细胞;bcl-2;caspase-3;细胞凋亡

中图分类号:R286.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)01-0099-05

前列腺癌是欧美国家主要的男性肿瘤疾病,流行病学研究调查显示:前列腺癌的发生主要与年龄、种族、家族遗传背景、地理位置和饮食等因素有关^[1]。对于晚期前列腺癌,特别是转变为雄激素非依赖型前列腺癌后,泌尿外科医生往往束手无策。

昆布为海带科植物海带 *Laminaria japonica* Aresch. 或翅藻科植物昆布 *Ecklonia kurome* Okam. 的干燥叶状体,内含藻胶酸、氨基酸、多糖、甘露醇和多种维生素及丰富的碘,其中昆布多糖是昆布的主要活性成分。昆布多糖具有抗肿瘤、调节免疫、抗凝血等多种活性。昆布多糖经硫酸酯化后,构象发生了改变,生成的昆布多糖硫酸酯(laminarin sulphate, LAMS)具有多种生物活性,其能有效抑制肿瘤细胞增殖^[2],研究发现 LAMS 为良好的免疫激活剂,能抑制碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的附着及其依赖性细胞的增殖^[3]。LAMS 还具有抗血管生成及体内外抗肿瘤作用^[4]。本研究利用氯磺酸-吡啶法对昆布多糖进行硫酸酯化得到 LAMS,通过体外实验研究 LAMS 对非激素依赖型人前列腺癌 PC-3 细胞的作用,以及对 bcl-2 和 caspase-3 基因表达的影响,探讨 LAMS 抗肿瘤作用及其作用机制。

1 材料

非激素依赖型人前列腺癌 PC-3 细胞株,第二军医大学长海医院中心实验室提供。LAMS 为本实验室自制,质量分数为 96%,LAMS 的相对分子质量为 16 315。CCK-8 试剂盒(日本株式会社同仁化学研究所)、细胞周期检测试剂盒(美国 Becton Dickinson 公司)、Annexin V-FITC 凋亡试剂盒(晶美生物公司)、DMSO(二甲基亚砷)、胰蛋白酶、氯霉素、青霉素、EDTA(Amresco 公司);RPMI 1640(Gibco 公司);PI(Sigma 公司);小牛血清(FBS);TRIzol Reagent(invitroger);Reverse Transcriptase M-MLV、RNase Inhibitor、Oligod(T)18、dNTP Mixture(10 mmol/L)、SYBR Premix Ex Taq(TaKaRa);ECL(发光试剂盒)(上海普飞);引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

2 方法

2.1 细胞处理:取对数生长期 PC-3 细胞,用 0.05% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 消化后制成单细胞悬液;将细胞浓度调整为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于培养皿(10 mm 直径),每皿加 6 mL 细胞悬液;24 h 后更换培养液,将细胞分为 4 组,每组 3 个培养皿。4 组分别为:对照组、LAMS(50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组。

2.2 LAMS 对体外培养 PC-3 细胞生长的影响:将

① 收稿日期:2009-04-10
基金项目:镇江市科学技术局资助项目(SH2007027)
作者简介:邹明畅(1971—),男,江苏金坛人,副主任中药师,硕士,研究方向为中药学。
Tel: (0511) 88915959 E-mail: zou.mc@126.com

处理的 PC-3 细胞接种于 96 孔板,每孔加 100 μL 细胞悬液,每组 6 个复孔和一个调零孔(只加培养液不加细胞)。应用 WST-8 法测定细胞第 1~3 天的吸光度(A)值(每天取出一块 96 孔板检测)。检测时,每孔内加 10 μL 的 CCK-8 试剂,继续培养 4 h,酶联免疫测定仪在 450 nm 波长处测 A 值,参比波长为 600 nm。

2.3 LAMS 对 PC-3 细胞周期的影响:第 3 天,弃培养液,PBS 洗涤细胞 3 次,0.05% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 消化,1 000 r/min 离心 5 min,弃上层液体;加入 1 mL 缓冲液,轻轻摇动试管使细胞分散悬浮;室温下 1 000 r/min 离心 5 min,弃上层液体;重复以上两步骤 2 次;加入 250 μL Solution A,轻轻摇动试管,室温下静置 10 min;加入 200 μL Solution B,轻轻摇动试管,室温下静置 10 min;加入 200 μL Solution C,轻轻摇动试管,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光静置 10 min;流式细胞仪检测。

2.4 LAMS 对 PC-3 细胞凋亡的影响:培养 24、48、72 h,分别弃培养液,PBS 洗涤细胞 3 次,不含 EDTA 的 0.05% 胰蛋白酶消化,1 000 r/min 离心 5 min,弃上层液体;PBS 洗涤细胞 2 次;用 500 μL 结合缓冲液悬浮细胞;加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μL PI,混匀;室温、避光反应 5 min;流式细胞仪检测。

2.5 荧光显微镜观察 PC-3 细胞形态:第 3 天,取出盖玻片,PBS 洗涤细胞 2 次;在 500 μL 的结合缓冲液中加入 5 μL Annexin V-FITC,5 μL PI 混匀;将上述溶液滴加于盖玻片表面,使长有细胞的盖玻片表面均匀覆盖;室温、避光反应 5 min;将盖玻片倒置于载玻片上,于荧光显微镜下、双色滤光片(FITC 和罗丹明)观察。Annexin V-FITC 荧光信号呈绿色,PI 荧光信号呈红色。

2.6 RT-PCR 检测 bcl-2 和 caspase-3 mRNA 的表达:采用 Genamics Expression 软件设计引物,bcl-2 mRNA 扩增引物序列:上游 5'-GGGA GACAGGGTACGATAA-3',下游 5'-CA TTTGGGGAACCGTCTGAA-3';caspase-3 mRNA 扩增引物序列:上游 5'-ACTGGAATGTCA TCTCGCTCTGCCA-3',下游 5'-CCACGACCCGTCCTTTGA-3'; β -actin 作为内参照:上游 5'-AGAGC-TACGA GCTGCCTGAG-3',下游 5'-ACA TCTGCTGGAAGGTGGAG-3',扩增产物 211 bp。Trizol 提取液提取总 RNA,用逆转录酶 Reverse Transcriptase M-MLV 进行逆转录合成 cDNA,进

行 RT-PCR,扩增条件为:变性 95 $^{\circ}\text{C}$,10 s,退火 60 $^{\circ}\text{C}$,20 s,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$,20 s,共进行 40 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。最后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

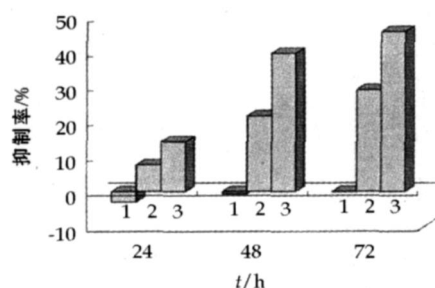
2.7 Western blotting 检测 Bcl-2 和 caspase-3 蛋白表达:将细胞裂解制片,离心取上清液,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。灌胶后将其放入电泳槽中,取出上样样品至 200 μL 的 EP 管中,加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液至终浓度。将样品于沸水中煮 5~10 min 使蛋白变性,冰上冷却,用微量进样器取 15 μL 蛋白样品上样,缓慢加入。电泳:80 V 恒压,样品跑至分离胶;改 120 V 恒压样品跑到底。终止电泳,进行转膜。400 mA 转膜 60 min。立春红染色,用 ddH₂O 冲洗。PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉溶解在 TBST,常温封闭 2 h,摇床缓慢混匀。将封闭的膜用 TBST 冲洗两遍,5 min $\times$ 2 次。加入一抗(用 TBST 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。(MMP-2 稀释成 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,MMP-9 稀释成 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$);TBST 洗膜:10 min,3 次,加入二抗(1:5 000 用 TBST 稀释),室温,反应 1 h。(MMP-2 二抗为 anti-mouse,MMP-9 二抗为 anti-rabbit);TBST 洗膜:10 min,3 次,化学发光试剂检测。

2.8 统计学分析:所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件中的 ANOVA 对多组数据进行统计学分析,两组数据间比较采用 Student-t 检验。

3 结果

3.1 LAMS 对 PC-3 细胞生长的抑制作用:不同质量浓度 LAMS 作用后,采用 WST-8 法进行细胞增殖的检测。LAMS 质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对非激素依赖型人前列腺癌 PC-3 细胞无明显的生长抑制作用,24、48、72 h 生长抑制率均为负值;LAMS 质量浓度为 100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 PC-3 细胞有明显的生长抑制作用,LAMS 质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 且作用 72 h 的抑制率为 45.91%,随着 LAMS 质量浓度的增加和作用时间的延长,对 PC-3 细胞的生长抑制率逐渐增高,呈时间-剂量效应,其中对照组(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组间无显著性差异,100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)比较均有显著性差异($P < 0.05$),结果见图 1。

3.2 LAMS 对 PC-3 细胞周期的影响:不同质量浓度 LAMS 作用于 PC-3 细胞 72 h 后,用流式细胞仪分析细胞周期。随着 LAMS 质量浓度增加,G₁ 期细胞比例逐渐减少,S + G₂ 期细胞比例呈剂量依赖



1~3 50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LAMS

图 1 不同质量浓度的 LAMS 作用不同时间对 PC-3 细胞的生长抑制作用 ($n=6$)

Fig. 1 Inhibition of LAMS at different concentration on growth of PC-3 cells treated for different times ($n=6$)

性增加,表明存在 S + G₂ 期阻滞。其中对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与 LAMS 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组间无显著性差异, LAMS 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 比较均有显著性差异 ($P < 0.01$), LAMS 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 比较均有显著性差异 ($P < 0.05$), 结果见表 1。

3.3 LAMS 对 PC-3 细胞凋亡的影响: 不同质量浓度 LAMS 作用后, 第 3 天进行流式细胞仪分析, LAMS 质量浓度为 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时促进 PC-3 细胞的凋亡, LAMS 质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 且作用 72 h 的凋亡率为 7.75%, 随着 LAMS 质量浓度

表 1 不同质量浓度 LAMS 对 PC-3 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effect of LAMS at different concentration on cycle distribution of PC-3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	G ₁	S + G ₂
对照	0	67.45 $\pm$ 0.25	32.55 $\pm$ 0.25
LAMS	50	66.07 $\pm$ 0.39	33.93 $\pm$ 0.39
	100	58.06 $\pm$ 0.34 **	41.94 $\pm$ 0.34 **
	200	53.26 $\pm$ 2.21 *	46.74 $\pm$ 2.21 *

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

的增加, PC-3 细胞凋亡率逐渐增高; 但 PC-3 细胞的凋亡率与作用时间的延长无明显关系。荧光显微镜观察, 随着 LAMS 质量浓度的增加, PC-3 细胞凋亡小体逐渐增多, 甚至出现细胞死亡。结果见图 2。

3.4 LAMS 对 PC-3 细胞 bcl-2 mRNA 表达的影响: 对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) PC-3 细胞有 bcl-2 mRNA 阳性, 显示为 185 bp 条带, 随着 LAMS 质量浓度的增加, bcl-2 mRNA 的表达明显减弱, 分别是对照组的 92.55%、32.69%、14.15%, 呈剂量依赖性。其中对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与 LAMS 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组间无显著性差异, LAMS 100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 比较均有显著性差异 ($P < 0.01$), 结果见图 3。

3.5 LAMS 对 PC-3 细胞 caspase-3 mRNA 表达

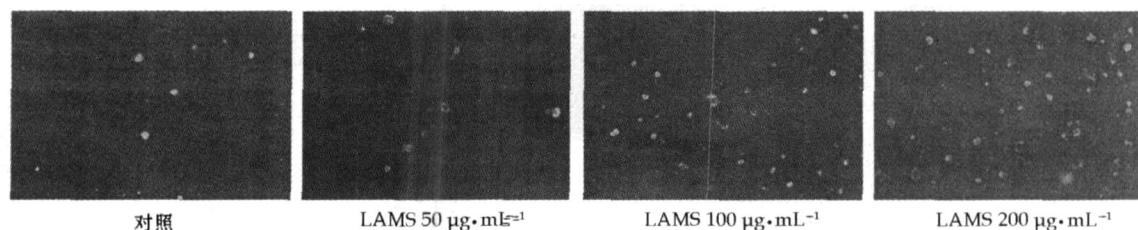
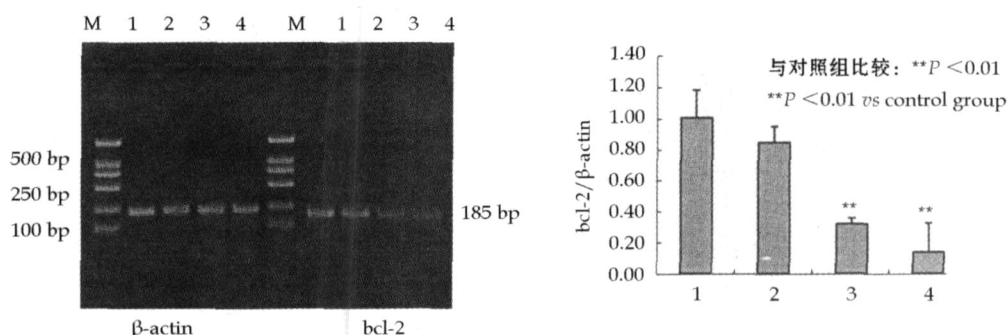


图 2 荧光显微镜观察 PC-3 细胞形态

Fig. 2 Morphology of PC-3 cells observed by fluorescence microscope



M-Marker 1~4-0、50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LAMS

图 3 LAMS 对 PC-3 细胞 bcl-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Effect of LAMS on bcl-2 mRNA expression of PC-3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

的影响:对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) PC-3 细胞 caspase-3 mRNA 阳性,显示为 151 bp 条带,随着 LAMS 质量浓度的增加,caspase-3 mRNA 的表达明显增加,分别是对照组的 142.42%、430.30%、912.12%,呈剂量依赖性。其中对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与 LAMS 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组间无显著性差异,LAMS 100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 比较均有显著性差异 ($P < 0.01$),结果见图 4。

3.6 LAMS 对 PC-3 细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响:不同质量浓度 LAMS 作用后,Western blotting 检测 Bcl-2 的结果为 23 000 条带。对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) PC-3 细胞 Bcl-2 蛋白表达与 GAPDH 的比值为 0.51 ± 0.01 ;LAMS 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组为 0.48 ± 0.01 ,LAMS 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组为 0.18 ± 0.04 ,LAMS 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组为 0.04 ± 0.02 。与对照组比较,随着 LAMS 质量浓度的升高,Bcl-2 蛋白表达明显减弱,呈剂量依赖性。其中对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与 LAMS

50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组间无显著性差异,LAMS 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 比较均有显著性差异 ($P < 0.05$),LAMS 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 比较均有显著性差异 ($P < 0.01$),结果见图 5。

3.7 LAMS 对 PC-3 细胞 Caspase-3 蛋白表达的影响:不同质量浓度 LAMS 作用后,Western blotting 检测 Caspase-3 的结果为 32 000 条带。对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) PC-3 细胞 Caspase-3 蛋白表达与 GAPDH 的比值为 0.52 ± 0.06 ;LAMS 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组为 0.52 ± 0.03 ,LAMS 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组为 0.91 ± 0.04 ,LAMS 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组为 1.19 ± 0.03 。与对照组比较,随着 LAMS 质量浓度的升高,Caspase-3 蛋白表达明显增加,呈剂量依赖性。其中对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与 LAMS 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组间无显著性差异,LAMS 100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 比较均有显著性差异 ($P < 0.01$),结果见图 6。

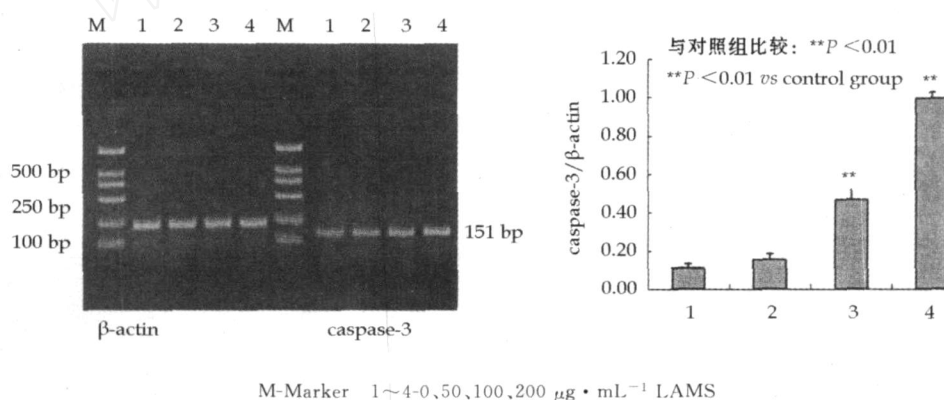


图4 LAMS 对 PC-3 细胞 caspase-3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Effect of LAMS on caspase-3 mRNA expression of PC-3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

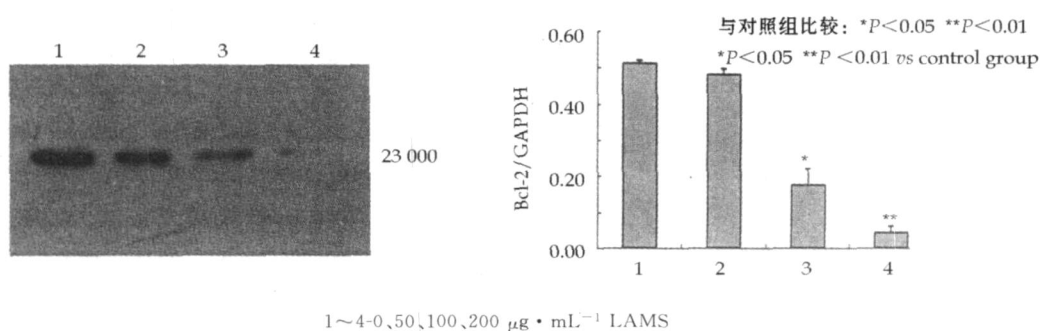


图5 LAMS 对 PC-3 细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effect of LAMS on Bcl-2 protein expression of PC-3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

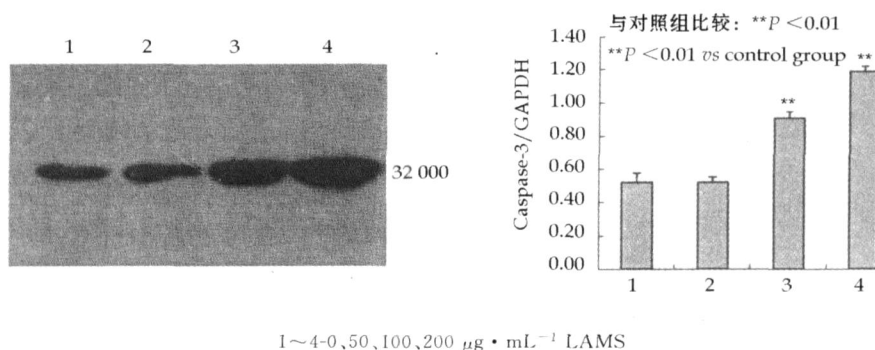


图 6 LAMS 对 PC-3 细胞 Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Effect of LAMS on Caspase-3 protein expression of PC-3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

前列腺癌是欧美国家主要的男性肿瘤疾病,目前普遍的观点认为,从正常前列腺组织发展到前列腺癌要经历 4 个主要的过程:前列腺上皮细胞内瘤、局部前列腺癌、侵袭性前列腺癌和转移性前列腺癌等几个阶段,其间每一步都伴随着遗传的改变和各种基因的异常^[5]。

本实验结果证实 LAMS 体外能抑制 PC-3 细胞的生长,并促进其 S + G₂ 期阻滞和凋亡,抑制 bcl-2 mRNA 表达及其蛋白表达,并促进 caspase-3 mRNA 表达及其蛋白表达。

本研究结果初步证实 LAMS 具有体外抗前列

腺癌作用。

参考文献:

- [1] Bratt O. Hereditary prostate cancer [J]. *BJU Int*, 2000, 85 (5): 588-598.
- [2] 董浦江,姚榛祥,涂刚. LAMS 对肝癌细胞株的 Bcl-2、Bax 基因蛋白影响 [J]. *重庆医科大学学报*, 2002, 27 (1): 26-31.
- [3] Holffman R, Paper D H, Donaldson J, et al. Characterisation of a laminarin sulphate which inhibits basic fibroblast growth factor binding and endothelia cell proliferation [J]. *J Cell Sci*, 1995, 108 (11): 3591-3598.
- [4] 徐中平,李福川,王海仁. 昆布多糖硫酸酯的抑制血管生成和抗肿瘤作用 [J]. *中草药*, 1999, 30 (7): 551-553.
- [5] Harrington K J, Spitzweg C, Bateman A R, et al. Gene therapy for pro-state cancer: current status and future prospects [J]. *J Urol*, 2001, 166: 1220-1233.

徐长卿多糖的分离纯化及其抗辐射和升高白细胞的作用

朱世权^{1,2},蔡文秀¹,薛玲¹,许云禄¹

(1. 福建医科大学蛇毒研究所,福建 福州 350004; 2. 福建省肿瘤医院 药剂科,福建 福州 350014)

摘要:目的 从徐长卿中提取多糖组分并观察其对辐射和环磷酰胺 (CTX) 所致小鼠骨髓抑制的影响。方法 水提醇沉法从徐长卿根茎粉末中提取徐长卿多糖粗品 (CPB),粗品经 DEAE-Sephrose FF 柱纯化,组分作 IR 分析。以 7.5 Gy ⁶⁰Co 射线正面及背面照射小鼠,观察徐长卿多糖对模型小鼠外周白细胞总数、骨髓 DNA 系数、胸腺系数及脾系数的影响。以 CTX 100 mg/kg ip 1 次致小鼠骨髓抑制后,观察徐长卿多糖对模型小鼠外周血白细胞总数的影响。结果 CPB 经 DEAE-Sephrose FF 柱色谱分离获得两个多糖组分峰 (CPBA 和 CPBB),提取率分别 16.57%、7.80%。小鼠接受 ⁶⁰Co 辐射后,CPBB 高剂量[100 mg/(kg·d)]组小鼠外周血白细胞数、骨髓 DNA 系数与模型组相应指标比较均明显增高 ($P<0.05$);CPBB 低剂量[50 mg/(kg·d)]组胸腺系数及脾系数 (0.92 ± 0.32) 与模型组相应指标比较均明显增高 ($P<0.01$)。小鼠 ip CTX 后,CPBB 高、中剂量组小鼠外周血白细胞数与模型组比较均有明显提高 ($P<0.05$)。结论 徐长卿多糖 CPBB 有明显对抗⁶⁰Co 辐射引起的小鼠胸腺、脾缩小和骨髓 DNA 降低的作用,同时也有对抗⁶⁰Co 辐射或 CTX 引起的白细胞降低的作用。

关键词:徐长卿;多糖;⁶⁰Co;环磷酰胺;抗辐射

中图分类号:R286.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)01-0103-04

① 收稿日期:2009-03-12

作者简介:朱世权(1972—),男,福建省闽清县人,主管药师,硕士,研究方向为医院药学。

Tel: (0591) 87688691 E-mail: zsqxq@126.com

*通讯作者 许云禄 Tel: (0591) 83569646 E-mail: snake@mail.fjmu.edu.cn