

# 软骨多糖抑制 H22 肝癌细胞生长的作用及机制研究

刘安军, 陈彦彦, 张国蓉, 车伟, 孟艳丽

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:** 探讨软骨多糖 (CA) 在体内抑制 H22 肝癌细胞生长的作用及其机制。以 H22 细胞腹水瘤模型为研究对象, 设对照组、CA 组两组, 分别考察 CA 对各组小鼠的生活状态的影响。并且应用苏木素伊红 (HE) 染色、原位末端脱氧核苷酸转移酶标记法 (TUNEL)、流式细胞术 (FCM) 及免疫荧光法对肿瘤细胞的生长和凋亡进行研究。CA 可以在一定程度上促进 H22 细胞的凋亡, 抑制肿瘤细胞的生长, 延长小鼠的生存时间。并且, 随着用药时间的延长, CA 组的 P21 表达增强, 而 Cyclin D1 表达水平降低。软骨多糖有促进肿瘤细胞凋亡的作用, 是一种新型的抗癌药物, 具有广泛的应用前景。

**关键词:** 软骨多糖; H22 肝癌细胞; 凋亡

中图分类号: TQ929; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)11-0001-04

## Effects and Mechanism of the Inhibition of H22 Hepatocarcinoma Cell Growth by Cartilage Polysaccharide

LIU An-jun, CHEN Yan-yan, ZHANG Guo-rong, CHE Wei, MENG Yan-li

(College of Food Engineering & Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The effect and mechanism of inhibition of H22 Hepatocarcinoma cell growth by cartilage polysaccharides (CA) were studied. Transplanted H22 hepatocarcinoma was used as the model and the mice were randomly divided into 2 group, the control group and CA group. The growth and apoptosis of the tumor cell were investigated by HE Staining, terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL), flow cytometry (FCM) and immunofluorescent staining. Results showed that CA could induce the apoptosis of the H22 cell, inhibit the growth of tumor and prolong the life span time of the examined mice. Besides, increasing the time after taking medicine could enhance the expression of P21 protein in the CA group and inhibit the expression of Cyclin D1. As a new anti-cancer agent, CA had wide application prospects.

**Key words:** cartilage polysaccharide; H22 hepatocarcinoma cell; apoptosis

随着分子生物学的发展, 人们逐渐发现多糖不仅作为结构物质和能量物质而存在, 而且具有多种多样的生物学功能和装载丰富生物信息的能力。目前对多糖类药物的药理活性研究很多, 国内外各种多糖类药物不断进入临床, 用于多种疾病治疗。这主要集中在抗感染、抗肿瘤、抗风湿、抗消化道溃疡和增进免疫功能等方面。关于多糖抗癌作用的研究有许多报道, 但大多数局限于植物及真菌多糖, 其中包括人参多糖、灵芝多糖、芦荟多糖等等, 动物多糖的报道仅限于鲨鱼软骨多糖。本研究以猪软骨为材料, 从中提取短链多糖, 并以小鼠 H22 腹水瘤为对象来研究软骨多糖 (CA) 诱导 H22 凋亡的作用及机制, 从而探讨其抗肿瘤

收稿日期: 2007-07-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20776113)

作者简介: 刘安军 (1963-), 男, 教授, 研究方向为食品功能因子与保健机理

瘤作用的机理, 为进一步开发新型的抗肿瘤药物提供参考。

### 1 材料和方法

#### 1.1 细胞株

鼠系肝癌 H22 细胞, 购自天津医科大学。

#### 1.2 药物

猪软骨多糖 (猪的肋软骨用 100 目胶体磨磨碎, 用 0.1 mol/L 的 HCl 脱钙 2 h, 蒸馏水洗至中性后, 加入 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 70 °C 加热 30 min, 用木瓜蛋白酶 (底物: 酶=500:1, m/m) 水解 3 h 后, DEAE 吸附, NaCl 洗脱, 得到大分子量的软骨多糖。用 OH 自由基降解 (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3 h, 得到小分子软骨多糖, 用乙醇沉淀, 干燥。

#### 1.3 主要试剂

苏木精染料, 伊红染料, TUNEL 试剂盒, RNase A、碘化丙啶 (PI)、anti-P21、anti-Cyclin D1、FITC

标记山羊抗鼠。

### 1.4 动物

昆明种小鼠，清洁级动物，体重26~28 g，雌雄各半，由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供，合格证号：SCXK-(军)2002-001。

### 1.5 小鼠腹水瘤模型的建立及治疗方案

无菌条件下抽取接种7 d的荷瘤小鼠的腹水，用生理盐水稀释成细胞浓度为 $10^7$ /mL的细胞悬液，分别腹腔接种20只小鼠(0.2 mL/只)。24 h后随机平均分成模型组(不予治疗)和CA组(30 mg/d)，每组10只小鼠，每天腹腔给药1次。

### 1.6 动物试验评价指标

(1)每天记录小鼠体重，观察腹水生长情况。(2)观察小鼠的生存期和生命延长率。计算公式：生命延长率(Increase in life span, ILS) % =  $(T/C-1) \times 100\%$

其中T代表模型组的存活天数，C代表CA组的存活天数。

### 1.7 腹水细胞形态学的检测

腹水长起来后，在用CA进行治疗的第0 d、1 d、3 d、5 d抽取新鲜的H22腹水，制成涂片，苏木素-伊红染色(HE)染色，在油镜下观察细胞形态。

### 1.8 流式细胞术(FCM)检测CA对细胞周期及凋亡率的影响

抽取CA作用0 d、1 d、3 d和5 d后的腹水细胞，PBS溶液洗涤2次，调整细胞悬液中的细胞浓度为 $2 \times 10^6$ /mL，1000 r/min离心5 min。冷乙醇固定，PI染色，应用流式细胞仪进行分析。

### 1.9 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)测凋亡率

按TUNEL试剂盒说明书(Promega)操作。采用倒置荧光显微镜，随机选取5个视野1000个细胞进行观察，计算细胞凋亡率。

### 1.10 CA对P21和Cyclin D1蛋白表达水平的影响

取CA作用0 d、1 d、3 d和5 d后的腹水细胞悬液制成细胞涂片，然后0.1% Triton100作用，接着1% BSA-PBS液封闭，加I抗、II抗孵育，在荧光显微镜下观察表达结果。随机选取5个视野1000个细胞计算阳性表达率。以PBS代替I抗的片子作为阴性对照。

### 1.11 统计学处理

采用EXCEL统计软件，组间数据采用t检验。

## 2 结果

### 2.1 CA对小鼠体重的影响

从图1可以看出，两组小鼠大约在接种7 d后体重

均呈现明显增长，即从这天起小鼠出现了明显的腹水。CA组的小鼠体重较对照组随着用药时间的延长有所降低。从表1可以看出，与对照组相比，CA组的小鼠其生命延长率明显高于对照组的小鼠，从而可知CA对H22的生长有良好抑制作用。

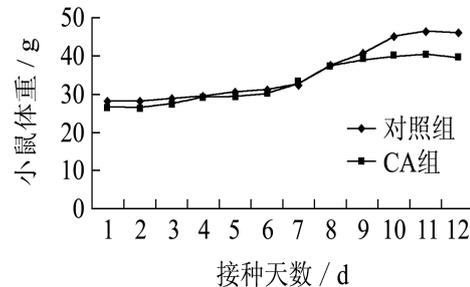


图1 CA对小鼠体重的影响

表1 CA对H22腹水瘤小鼠生存时间及生存率的影响

组别	剂量/(mg/d)	动物数/只	存活天数/d	生命延长率/%
对照组	0	10	12.13±0.23	—
CA组	30	10	16.80±0.81*	38.56

注：与对照组比较，\* $p < 0.01$ 。

### 2.2 HE染色

通过染色发现，在CA作用下，H22细胞出现了细胞凋亡的典型形态改变如胞质的固缩，染色质浓缩成半月形或帽状附于核膜，核的碎裂和凋亡小体形成，大量细胞坏死后的残留物的出现等。

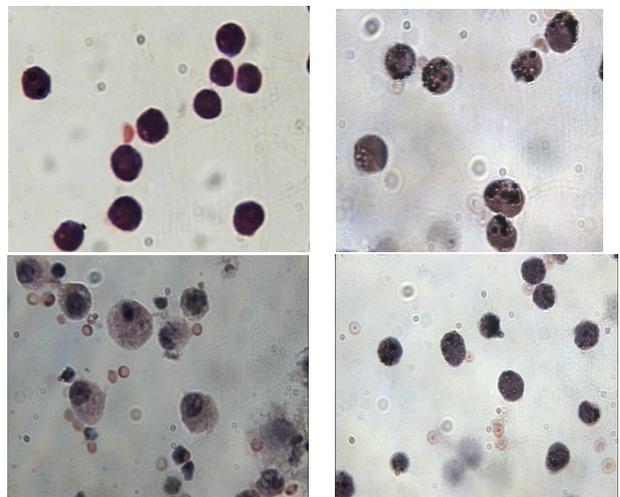


图2 CA作用后的H22细胞HE染色结果

注：CA作用H22后第0、1、3和5 d后的HE染色结果。

### 2.3 FCM测细胞周期及凋亡率

表2 FCM测CA诱导H22细胞凋亡的作用 单位：%

治疗时间	G0/G1	G2/M	S	凋亡率
0 d	33.33	9.99	56.56	1.12
1 d	12.99	15.86	70.30	0.85
3 d	15.47	28.47	55.25	0.81
5 d	16.82	35.57	39.52	8.09

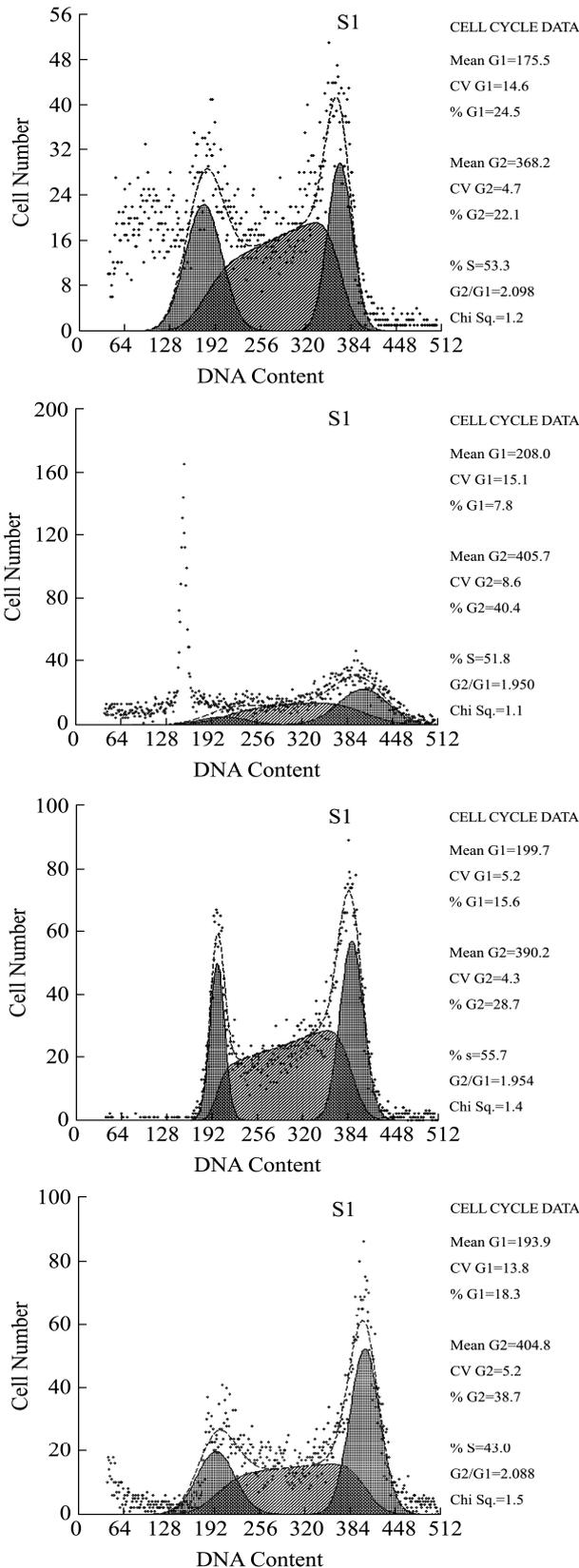


图3 FCM测CA对H22细胞周期的影响

注: 以上依次为CA组第0、1、3和5d细胞凋亡周期图

FCM结果显示, CA组的CA促进H22的细胞的

凋亡, 使H22细胞的生长被阻遏于G2/M期。

### 2.4 TUNEL 法测 CA 对 H22 细胞凋亡率的影响

表3 TUNEL 法测 CA 对 H22 细胞凋亡率的影响/%

	0	1 d	3 d	5 d
CA 组	47.42±0.69	50.35±2.64	61.67±1.00*	70.35±5.74*

注: 与对照组比较, \**p*<0.01。

表3表明, 随着CA用药时间的延长, 细胞的凋亡率逐渐上升, 并且绿色荧光越来越亮, 越来越多。说明随着CA作用时间的增加, CA诱导H22的凋亡率增加。

### 2.5 腹水中 P21 和 Cyclin D1 蛋白的表达

以30 μg/mL CA对H22荷瘤小鼠作用0 d、1 d、3 d和5 d后, 抽取新鲜腹水处理, 然后应用免疫荧光方法检测细胞P21和Cyclin D1蛋白表达的情况(见表4)。从该表可见CA可以显著降低H22细胞Cyclin D1蛋白表达水平, 同时提高P21蛋白的表达水平。

表4 CA组CyclinD1和p21的蛋白表达水平/%

	0	1 d	3 d	5 d
P21	30.25±2.21	39.88±4.58	68.55±3.54*	72.98±1.87*
Cyclin D1	67.86±4.86	53.87±6.11	48.75±2.15*	43.46±2.46*

注: 与对照组比较, \**p*<0.01。

## 3 讨论

肝癌为我国常见恶性肿瘤之一, 肝癌死亡率在恶性肿瘤中位居第三位, 仅次于胃癌和食管癌。肿瘤的发生、发展不仅与癌细胞的增殖有关, 亦与其凋亡有关。近年来, 诱导细胞凋亡被视为抗癌药物研究和开发的新靶点, 通过调控细胞信号传导系统诱导细胞凋亡来治疗癌症正成为目前肿瘤学领域的研究热点之一。

细胞凋亡是一种主动的由基因决定的细胞自我死亡的过程。肿瘤过多过快的增长是由于肿瘤细胞死亡过少及增殖过多的共同结果。许多抗癌药物通过干扰肿瘤的增殖, 生长等过程, 最终导致肿瘤细胞凋亡而起作用。本实验室提取的CA能够显著抑制S180腹水瘤、MCF-7乳腺癌细胞的生长并诱导其凋亡, 因此我们采用H22来继续研究其对H22肝癌细胞的凋亡作用。

本实验用不同浓度的CA来治疗荷H22腹水瘤小鼠, 通过记录小鼠体重、观察其生存时间, 结果显示CA能有效地抑制腹水生长, 提高小鼠生命延长率。接下来的HE染色、FCM、TUNEL等实验, 都证明在CA的作用下, H22细胞发生了显著的凋亡, 并且H22细胞的生长被阻遏于G2/M期。

(下接第18页)