

壳寡糖对体内外肝癌细胞生长的抑制作用及其机制探讨

210046 南京 南京中医药大学第一临床医学院

季红, 陈洪¹, 张治国², 华海清³

【摘要】 目的 探讨壳寡糖对体内外肝癌细胞生长的抑制作用及其相关机制。方法 体外实验采用噻唑蓝 (MTT) 法检测壳寡糖对肝癌 SMMC-7721 细胞生长的影响, 流式细胞术检测肝癌细胞凋亡率, RT-PCR 方法检测 Bcl-2 mRNA 的表达。体内实验观察壳寡糖对肝癌 H22 移植瘤生长的影响, 免疫组化检测肿瘤组织 Bcl-2 蛋白的表达。结果 体外实验表明, 壳寡糖能抑制肝癌细胞增殖和诱导肝癌细胞凋亡, 其作用随剂量增加而增强; 壳寡糖 4mg/ml 的细胞增殖抑制率为 23.82%, 壳寡糖 2mg/ml 的凋亡率为 15.28%, 与对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 壳寡糖能下调肝癌细胞中 Bcl-2 mRNA 的表达。体内实验显示, 壳寡糖能抑制小鼠肝癌 H22 移植瘤的生长, 高剂量组 300mg/(kg·d) 的抑瘤率为 33.13%, 并可明显下调肿瘤组织中 Bcl-2 蛋白的表达。结论 壳寡糖在体内外均具有抑制肝癌细胞增殖及诱导肝癌细胞凋亡的作用, 其促凋亡的机制可能与下调 Bcl-2 的表达有关。

【关键词】 壳寡糖; 肝癌; SMMC-7721 细胞; 小鼠 H22 细胞; 凋亡; Bcl-2

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1009-0460(2011)04-0310-05

Inhibitory effects of oligochitosan on hepatocellular carcinoma cells *in vivo* and *in vitro*

Ji Hong, CHEN Hong, ZHANG Zhi-guo, HUA Hai-qing. The First Clinical Medical School, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

【Abstract】 Objective To investigate the inhibitory function of oligochitosan on hepatocellular carcinoma cells *in vivo* and *in vitro*. **Methods** In experiment *in vitro*, MTT assay was applied for evaluation of proliferation of SMMC-7721 cells treated by oligochitosan. Apoptotic cells were detected by flow cytometry and RT-PCR was used for the expression of Bcl-2. In experiment *in vivo*, we observed the effect of oligochitosan on the growth of H22 cell subcutaneous transplanting tumor in mice. Immunocytochemistry was utilized to measure the expression of Bcl-2 in the tumor tissues. **Results** Experiment *in vitro* showed oligochitosan inhibited SMMC-7721 cell proliferation and induced the apoptosis of them. This effect increased with the increasing dosage. The tumor inhibiting rate was 23.82% after treated with 4mg/ml of oligochitosan and the apoptosis rate was 15.28% with 2mg/ml of oligochitosan. Compared with those of the control group, the inhibitory effect was significant ($P < 0.01$). The expression of Bcl-2 mRNA in SMMC-7721 cells was markedly suppressed by oligochitosan. In experiment *in vivo*, oligochitosan inhibited the growth of H22 tumor cells, the tumor inhibiting rate of high doses of oligochitosan (300mg/kg) was 33.13% and the expression of Bcl-2 was markedly suppressed in the tumor tissues by oligochitosan. **Conclusion** Oligochitosan both *in vivo* and *in vitro* inhibits the proliferation and induces the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. The mechanism is possibly that oligochitosan down-regulates the expression of Bcl-2.

【Key Words】 Oligochitosan; Hepatocellular carcinoma; SMMC-7721 cell; H22 cell; Apoptosis; Bcl-2

壳寡糖 (Oligochitosan) 是壳聚糖的降解产物, 其分子量小、毒性低、水溶性好。有研究表明, 壳寡糖具有抗菌^[1-2]、抗氧化^[3-4]、抗肿瘤^[5-6]、降胆固醇^[7]及免疫增强^[8]等活性。本实验研究了壳寡糖

在体内外对肝癌细胞的作用, 并通过分子生物学的方法研究了其相关机制, 现将结果报告如下。

1 210009 东南大学附属中大医院消化科

2 210095 南京农业大学生化研究所

3 210002 解放军八一医院全军肿瘤中心内科

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 壳寡糖(南京农业大学免疫生化研究所分离制备);RPMI-1640(Gibco 公司);小牛血清(杭州四季青生物公司);MTT 和碘化吡啶(PI)(Sigma 公司);兔抗鼠 Bcl-2 抗体及 HRP 标记的第二抗体(Cell Signaling);酶标仪(国营华东电子管厂);流式细胞仪 FACS Calibur(Becton Dickinson 公司);Trizol Reagent(Invitrogen 公司)。引物由上海生物工程公司合成。

1.2 细胞株 SMMC-7721 人肝癌细胞株购自中国科学院上海细胞生物学研究所;鼠 H22 肝癌细胞由东南大学医学影像学系分子影像实验室提供。

1.3 实验动物 昆明种小鼠,雌雄各半,体重 18 ~ 22g,由上海动物中心提供。

1.4 体外实验

1.4.1 细胞培养 取适量冻存 SMMC-7721 细胞复苏,放于细胞培养瓶中,加入含 10% 小牛血清的 PRMI-1640 培养基(含青霉素 100U/ml、链霉素 100U/ml),于 37℃、5% CO₂ 饱和浓度的培养箱中培养,定期观察细胞生长情况,实验时取对数生长期细胞进行。

1.4.2 MTT 法检测细胞抑制率 消化、收集对数生长期的 SMMC-7721 细胞,并调整浓度为 2.5×10^5 个/ml 的单细胞悬液,接种于 96 孔培养板,每孔 200 μ l,培养 24h 后,对照组只加入培养基,其余组加入不同浓度的壳寡糖,每组设 5 个复孔,培养 72h 后,每孔加 MTT(5mg/ml) 20 μ l,继续培养 4h,弃上清,每孔加入二甲基亚砷(DMSO) 150 μ l,振荡 10min,然后在酶标仪 570nm 下测光吸收值(A),重复 3 次,计算抑制率。抑制率(%) = (1 - 加药组 A 值/对照组 A 值) \times 100%。

1.4.3 流式细胞仪检测 SMMC-7721 细胞凋亡 取对数生长期的 SMMC-7721 细胞,用不同浓度壳寡糖处理细胞 48h,对照组加入等体积的 RPMI-1640,培养 48h,胰酶消化细胞,1500r/min 离心 10min,收集样本,弃上清,加入 1ml 冷 PBS,轻轻振荡使细胞悬浮,1500r/min 离心 10min,弃上清,重复用冷 PBS 洗 2 次。将细胞重悬于 200 μ l 结合缓冲液,加入 10 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI,轻轻混匀,避光室温反应 15min,加入 300 μ l 结合缓冲液,在 1h 内流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.4.4 RT-PCR 检测 SMMC-7721 细胞 Bcl-2 mRNA

的表达 细胞经过不同浓度壳寡糖处理 48h 后,提取细胞总 RNA,琼脂糖凝胶电泳提示 RNA 完整。Bcl-2 的引物序列:上游引物:5'-CATGTGTGTGGA-GAGCGTCAA-3';下游引物:5'-GCCGGTTCAGGT-ACTCAGTCA-3'。 β -actin 的引物序列:上游引物:5'-GGGTCAGAAGGATTCCTATG;下游引物:5'-GTCTCAAACATGATCTGGG。逆转录(RT)条件为 42℃ 反应 30min,99℃ 反应 5min 灭活酶。PCR 反应条件为 94℃ 变性 5min,然后 94℃ 变性 1min,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 45s,扩增 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5min,PCR 扩增产物取 10 μ l,1.5% 琼脂糖凝胶电泳。紫外分析仪观察和扫描,Image J 软件分析,以目的基因的扫描灰度与 β -actin 基因的灰度比值,进行目的基因表达的半定量分析。

1.5 体内实验 鼠 H22 肝癌细胞复苏后接种于小鼠腹腔内,传代 1 次后,7 ~ 10 天的小鼠颈椎脱臼处死。固定于蜡板上,消毒腹部皮肤,剪开腹部皮肤,用无菌空针抽吸腹水,放入试管内,用 Hanks 工作液稀释瘤细胞悬液至活细胞数为 1×10^8 个/ml,备用。30 只小鼠随机分为壳寡糖低剂量组 150mg/(kg·d)、壳寡糖高剂量组 300mg/(kg·d) 和模型组(生理盐水)共 3 组,每组 10 只。抽取 H22 肝癌细胞 0.2ml 接种于每只小鼠后肢皮下,24h 后记录各组小鼠体重。以后每日向各组小鼠分别灌胃 0.2ml 药物或生理盐水,连续给药 20 天。停药后次日颈椎脱臼处死小鼠,剥离瘤块,称重,计算抑瘤率:抑瘤率(%) = (阴性对照组平均瘤重 - 治疗组平均瘤重)/阴性对照组平均瘤重 \times 100%,并行免疫组化 SP 法检测小鼠移植瘤组织中 Bcl-2 蛋白的表达。实验步骤按试剂盒说明书进行。结果判断:Bcl-2 阳性表达为细胞质呈现浅黄、棕黄或棕褐色。Bcl-2 染色切片在 40 倍目镜下观察具有代表性的 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞,共计 500 个细胞,计算阳性细胞百分率。

1.6 统计学分析 用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行处理。两样本均数比较采用成组 *t* 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 壳寡糖对 SMMC-7721 细胞的抑制作用 壳寡糖处理 SMMC-7721 细胞 72h 后,MTT 法的结果显示,随着壳寡糖浓度升高,其对肿瘤细胞增殖的抑

制率也增高。壳寡糖浓度达到 4mg/ml 时,抑制率为 23.82%。将各组结果与对照组进行比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1。

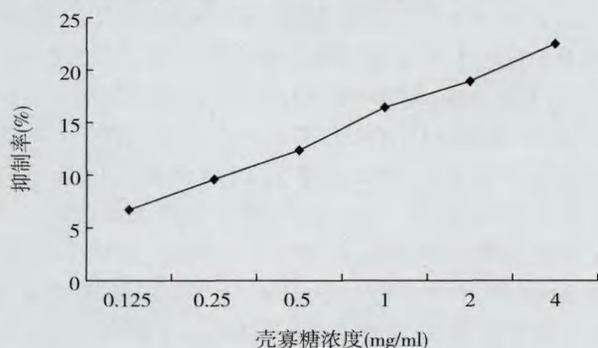
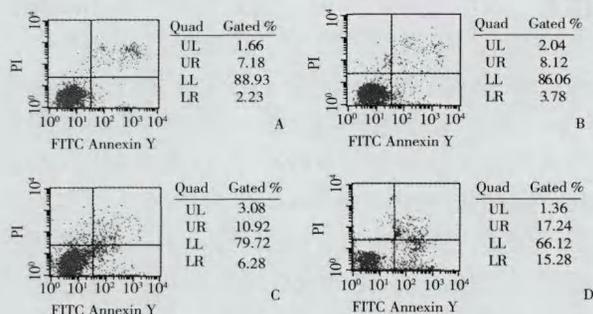


图 1 不同浓度壳寡糖对 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用

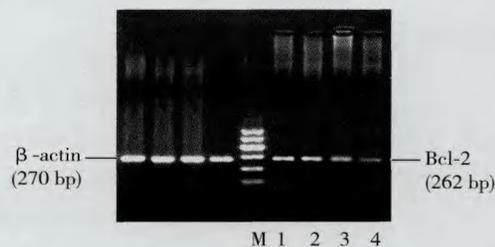
2.2 壳寡糖诱导 SMMC-7721 细胞凋亡的作用 壳寡糖处理 SMMC-7721 细胞 48h 后,收集细胞,经流式细胞仪检测细胞凋亡率,结果表明,不同剂量的壳寡糖对肝癌细胞均有诱导凋亡的作用,0.125、0.5、2mg/ml 壳寡糖组的凋亡率分别为 3.78%、6.28% 和 15.28%,与对照组凋亡率 2.26% 比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。见图 2。



A: 对照组; B: 0.125mg/ml 壳寡糖; C: 0.5mg/ml 壳寡糖; D: 2mg/ml 壳寡糖

图 2 壳寡糖诱导 SMMC-7721 细胞的凋亡作用

2.3 壳寡糖对 SMMC-7721 细胞 Bcl-2 mRNA 表达的影响 RT-PCR 检测结果表明,与对照组相比, SMMC-7721 细胞经过壳寡糖 0.5、1、2mg/ml 处理 48h 后, Bcl-2 mRNA 的表达明显下调,对照组和各处理组 Bcl-2 mRNA 相对值分别为 0.665 ± 0.61 、 0.544 ± 0.10 、 0.404 ± 0.05 和 0.307 ± 0.12 ,且这种作用随着壳寡糖浓度的增加而作用增强。见图 3。



M: Marker; 1: 空白对照组; 2: 0.5mg/ml 壳寡糖; 3: 1mg/ml 壳寡糖; 4: 2mg/ml 壳寡糖

图 3 壳寡糖对 Bcl-2 mRNA 表达的影响

2.4 壳寡糖对小鼠肝癌 H22 移植瘤生长的影响

壳寡糖高、低剂量组的瘤重分别为 (1.6022 ± 0.2375) g 和 (1.9876 ± 0.3619) g,均低于模型组的 (2.4014 ± 0.3846) g,差异有统计学意义($P < 0.05$);高剂量组的抑瘤率为 33.13%,与低剂量组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验过程中观察到小鼠活动自如,皮毛光滑,食量正常。见表 1。

表 1 壳寡糖对 H22 小鼠移植瘤的抑瘤作用

组别	n	平均瘤重(g)	抑瘤率(%)
模型组	10	2.4014 ± 0.3846	-
低剂量组	10	$1.9876 \pm 0.3619^*$	17.13
高剂量组	10	$1.6022 \pm 0.2375^\Delta$	33.13

注:与模型组比较, * $P < 0.05$; 与低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$

2.5 壳寡糖对 H22 小鼠移植瘤组织 Bcl-2 蛋白表达的影响

Bcl-2 阳性表达定位于细胞膜或者胞浆,呈黄色或棕黄色染色。模型组肿瘤组织中 Bcl-2 蛋白表达增强,阳性率 69.78%;壳寡糖高、低剂量组肿瘤组织中 Bcl-2 蛋白表达均减弱,阳性率分别为 40.86% 和 50.66%,与模型组比较,差异均有统计学差异($P < 0.01$)。见表 2、图 4。

表 2 壳寡糖对小鼠 H22 瘤组织中 Bcl-2 蛋白表达的影响

组别	n	阳性细胞(个)	阳性率(%)
模型组	10	348 ± 10.94	69.78
低剂量组	10	$253 \pm 14.99^*$	50.66
高剂量组	10	$204 \pm 8.39^\Delta$	40.86

注:与模型组比较, * $P < 0.01$; 与低剂量组比较, $\Delta P < 0.01$

3 讨论

肝癌是临床最常见的恶性肿瘤之一,治疗十分

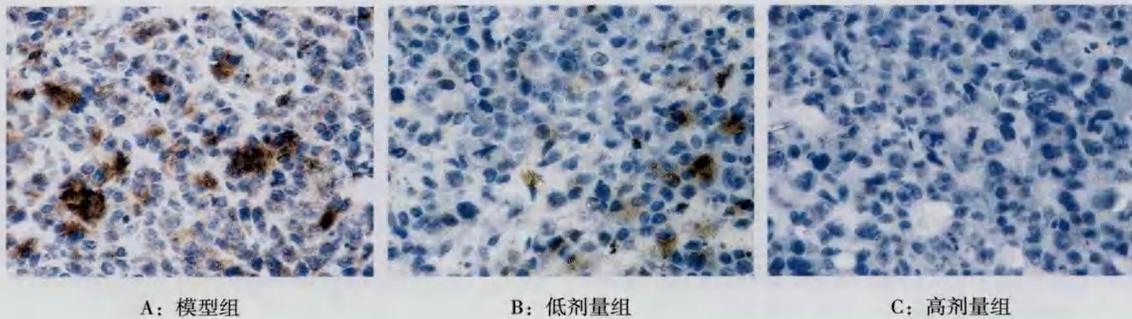


图 4 壳寡糖对小鼠 H22 移植瘤组织中 Bcl-2 蛋白表达的影响(SP × 200)

棘手,目前除个别药物如索拉非尼有生存获益外,多数疗效不佳,且副作用大,寻找具有抗癌作用强、抗癌谱广、副作用小的天然活性化合物是抗癌药物研究的重要途径。壳寡糖是天然碱性多糖,是海洋甲壳素降解的产物,具有良好的生物相容性和生物可降解性,具有易溶、易吸收和无毒副作用的特点^[9]。近年来,国内外研究证实壳寡糖及其衍生物具有抑制癌细胞及肿瘤生长等作用^[10-11]。

本实验采用体外与体内实验相结合的方法,探讨了壳寡糖抗肝癌的作用。结果表明,壳寡糖在体外对肝癌细胞株 SMMC-7721 的生长具有明显抑制作用,且呈剂量依赖性,即剂量越高,抑瘤作用越强。动物体内实验显示,壳寡糖能显著抑制 H22 小鼠移植瘤的生长,同样具有剂量依赖性,高剂量组抑瘤率达到 33.13%,与细胞实验的结果一致,其抑瘤作用虽不如细胞毒类药物,但明显高于非细胞毒类药物。动物实验过程中还观察到,荷瘤小鼠在治疗过程活动自如,皮毛光滑,食量正常,生活质量良好,未见明显的毒性反应,说明壳寡糖是一个既可抑制肿瘤生长而副作用又少的药物,具有较大的开发研究价值。

肿瘤的发生不仅与肿瘤细胞增殖加快有关,也与肿瘤细胞凋亡受到抑制密切相关。诱导肿瘤细胞凋亡是一条有效的肿瘤治疗途径。Huang 等^[5]的研究表明,壳寡糖及其衍生物的抗肿瘤作用主要是通过诱导肿瘤细胞凋亡来实现的。本实验利用流式细胞术观察不同浓度壳寡糖对肝癌细胞凋亡的影响,结果显示壳寡糖浓度达到 2mg/ml 时,体外肝癌细胞的凋亡率为 15.28%,表明壳寡糖抗肝癌的作用有可能是通过诱导肝癌细胞凋亡来实现的。

Bcl-2 家族蛋白是细胞凋亡过程中发挥主要调控作用的一类因子,根据其功能可分为两类:一类促

进细胞凋亡,以 Bax、Bad、Bak、Bid 为代表;另一类抑制细胞凋亡,以 Bcl-2 为代表。Bcl-2 是 Bcl-2 基因蛋白家族中重要的抗凋亡蛋白,含有 4 个 Bcl-2 同源结构域(BH),并可通过 BH 引导其他 Bcl-2 家族蛋白(如 Bax)定位于细胞器外膜,在 BH1、BH2、BH3 和 BH4 这 4 个结构域中,Bcl-2 可以通过 BH1、BH2、BH3 形成疏水口袋,与促凋亡蛋白 Bax 和 Bak 的 BH3 区域相互作用,形成异源二聚体,屏蔽了 BH3 区域的促凋亡活性,从而阻止 Bax 和 Bak 寡聚,抑制线粒体释放细胞色素 C 及 Caspases 的活化等,达到抑制凋亡的目的^[12-14]。Bcl-2 的异常表达与肿瘤的发生、发展、转移及预后密切相关。在本研究中,我们采用 RT-PCR 技术观察了壳寡糖对 Bcl-2 mRNA 表达的影响,结果显示,壳寡糖能够明显下调 Bcl-2 mRNA 的表达,且随着壳寡糖浓度的增加而作用增强;在动物实验中,我们采用免疫组织化学技术检测了壳寡糖对 Bcl-2 蛋白表达的影响,结果亦表明壳寡糖能抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,与体外细胞实验结果一致。因此我们推断,抑制 Bcl-2 的表达可能是壳寡糖诱导肝癌细胞凋亡的重要机制之一,但是否存在其他机制还需要进一步深入研究。

综上所述,壳寡糖在体外及实验动物体内均能抑制肝癌细胞的生长,诱导肝癌细胞凋亡,其机制可能与抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达有关。本研究结果为壳寡糖抗肝癌的作用提供了实验依据,但肝癌发生发展的机制十分复杂,壳寡糖抗肝癌的作用是否存在着其他机制还需要进一步探讨。

参考文献

- [1] Jeon YJ, Park PJ, Kim SK. Antimicrobial effect of chitoooligosaccharides produced by bioreactor[J]. Carbohydr Polym, 2001, 44 (1): 71 - 76.

- [2] Lillo L, Alarcón J, Cabello G, et al. Antibacterial activity of chitooligosaccharides[J]. *Z Naturforsch C*, 2008, 63(9-10): 644-648.
- [3] Yuan WP, Liu B, Liu CH, et al. Antioxidant activity of chitooligosaccharides on pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetes in rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(11): 1339-1345.
- [4] Ngo DN, Lee SH, Kim MM, et al. Production of chitin oligosaccharides with different molecular weights and their antioxidant effect in RAW 264.7 cells[J]. *J Funct Food*, 2009, 1(2): 188-198.
- [5] Huang R, Mendis E, Rajapakse N, et al. Strong electronic charge as an important factor for anticancer activity of chitooligosaccharides (COS) [J]. *Life Sci*, 2006, 78(20): 2399-2408.
- [6] Liang TW, Chen YJ, Yen YH, et al. The antitumor activity of the hydrolysates of chitinous materials hydrolyzed by crude enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* V656 [J]. *Process Biochem*, 2007, 42(4): 527-534.
- [7] 陈凡, 陈剑锋, 郭养洁, 等. 不同特性粘数壳聚糖降血浆胆固醇、甘油三酯及抗氧化活性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2006, 18(6): 23-25.
- [8] Feng J, Zhao L, Yu Q. Receptor mediated stimulatory effect of oligochitosan in macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 317(2): 414-420.
- [9] Sunil AA, Nadagouda NM, Tejjraj MA. Recent advances on chitosan based micro-and nanoparticles in drug delivery[J]. *J Control Release*, 2004, 100(1): 5-28.
- [10] Maeda Y, Kimura Y. Antitumor effects of various low-molecular-weight chitosans are due to increased natural killer activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in sarcoma 180-bearing mice [J]. *J Nutr*, 2004, 134(4): 945-950.
- [11] 许青松, 魏鹏, 窦江丽, 等. 壳寡糖抑制肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖及其机制探讨[J]. *天然产物研究与开发*, 2009, 21: 152-154.
- [12] Coultas L, Strasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2003, 13(2): 115-123.
- [13] Kirkin V, Joos S, Zörnig M. The role of Bcl-2 family members in tumor genesis[J]. *BBA-Mol Cell Res*, 2004, 1644(2-3): 229-249.
- [14] Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family[J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(4): 437-441.

收稿日期:2011-01-07; 修回日期:2011-02-25