

威灵仙多糖对人卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡的影响※

● 杨旭东* 张 杰 王桂云 申梅淑

摘 要 目的:探讨威灵仙多糖对人卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡的影响及其分子机制。方法:不同浓度威灵仙多糖作用于 SKOV3 细胞 48h 后,荧光显微镜观察人卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡情况,RT-PCR 法检测 Bcl-2、Fas 基因表达量的变化。结果:威灵仙多糖能诱导 SKOV3 细胞凋亡,40mg/L 时凋亡率为 14.09%,实验组与对照组比较有显著性差异;并且上调 Fas 和降低 Bcl-2 表达。结论:威灵仙多糖能促进其细胞凋亡,其机制可能与激活 Fas、抑制 Bcl-2 的基因表达有关。

关键词 威灵仙多糖 卵巢癌 细胞凋亡 Fas Bcl-2

卵巢癌是女性生殖系统常见恶性肿瘤,化学治疗在卵巢癌治疗中占有重要位置,但存在一定的不良反应和耐药性。而中药不仅对肿瘤具有抑制作用,不易产生耐药性,而且对机体的损伤和副作用也较小,因而研究中药抗肿瘤作用及其单体的筛选是我国科学工作者的重要课题之一。威灵仙(Radix Clematidis)是毛茛科铁线莲属植物,现代药理研究证实,威灵仙有解痉、抗肿瘤等多方面的药理作用^[1,2]。本研究的目的,在于观察威灵仙多糖是否有诱导人卵巢癌细胞凋亡作用,并且探讨其作用机制,为威灵仙中抗肿瘤单体的筛选提供一些新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人卵巢癌 SKOV3 细胞,由武汉中美科技术有限公司提供。

1.2 药物、试剂与仪器 Trizol、荧光染料 Hoechst33258, Sigma 公司;引物核苷酸片段,上海生工生

物技术有限公司。荧光显微镜(德国 Leica 公司)。

1.3 细胞培养与分组 人卵巢癌 SKOV3 培养于 10% 胎牛血清,1% 青霉素、链霉素的 RPMI-1640 培养液中,37℃、5% CO₂。实验组:用培养液倍比稀释的 10、20、40mg/L 的威灵仙多糖。对照组:用含 SKOV3 细胞的 RPMI-1640 培养液。

1.4 细胞凋亡检测 取指数生长期的癌细胞,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 3×10^5 /mL 的细胞悬液,于 6 孔板中每孔接种 1mL。将普通洁净盖玻片置于 37℃、5% CO₂ 培养箱。24h 后加入不同质量浓度的威灵仙多糖;对照组加同体积培养液。48h 后细胞用胰酶消化,冷 PBS(pH7.2)洗 3 遍,固定液甲醇-冰醋酸(3:1),4℃ 固定 10min,弃固定液,蒸馏水洗 3 遍,室温干燥,用 5mg/L Hoechst33258 染色,37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 15min,将孔中盖玻片取出,盖在已滴好甘油的载玻片上,置于荧光倒置显微镜上,观察细胞形态并拍照。

1.5 RT-PCR 测定 Bcl-2、Fas 表达 设计引物如下: Fas 引物,上游 5'-CGCCTATGTTGTTGTTGACC-3';下游: 5'-CCTCTGTTACGACCTC-3', 扩增片段 477bp。Bcl-2 引物,上游: 5'-GACTTCTCGTCGCTACCGTC-3';下游: 5'-ACATGCACCTACCCAGCCTCCGTTATC-3', 扩增片段 296bp。β-actin 上游引物: 5'-GAGACCTTCAACACCCCAGCCCAGCC-3', 下游: 5'-GCCAAATCGT-

※基金项目 黑龙江省卫生厅科学课题(No:2009-413)

* 作者简介 杨旭东,男,讲师,药学硕士。研究方向:中药的药理与毒理研究。荣获 2007 年黑龙江省高校科学技术进步奖二等奖一项,三等奖一项。发表了《水蛭注射液的 HPLC 指纹图谱》、《复方水蛭注射液的 HPLC 指纹图谱研究》、《姬松茸多糖对糖尿病大鼠肾脏氧化应激的影响》等论文。著作:《色谱技术在医药研究中的应用》。

• 作者单位 黑龙江省牡丹江医学院(157011)

GCGTGACATC-3', 扩增片段 265bp。反应条件:94℃ 预变性 5min;变性 5min(94℃),退火 50s(54℃),延伸 90s(72℃),共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 10min。经凝胶成像系统分析,分别计算 Bcl-2、Fas 与内参扩增带荧光强度 × 面积的比值,得出 Bcl-2、Fas mRNA 的相对表达量。

1.6 统计学分析 统计学处理采用 SPSS 11.5 软件,实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 荧光显微镜检测细胞凋亡情况 荧光显微镜观察不同浓度威灵仙多糖作用 48h 后,可见蓝色深染的凋亡细胞,并可见细胞核碎裂,细胞体积缩小。10mg/L 威灵仙多糖组细胞凋亡率为 6.15%;20mg/L 威灵仙多糖组细胞凋亡率为 11.08%;40mg/L 威灵仙多糖组细胞凋亡率为 14.09%;对照组细胞凋亡率为 3.01%。实验组与对照组比较有显著性差异(*P* < 0.01)。(见图 1、2)。

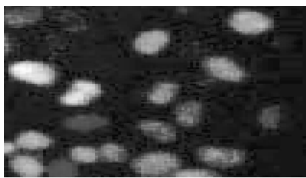


图 1 对照组

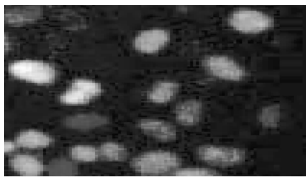


图 2 40mg/L 威灵仙多糖组

2.2 各组 Bcl-2 和 Fas 基因表达情况 与对照组相比,不同浓度威灵仙多糖作用 48h 后,肿瘤细胞中原癌基因 Bcl-2 基因表达逐渐降低,抑癌基因 Fas 基因表达逐渐增加,40mg/L 组最明显。(见表 1)

表 1 各组 Bcl-2 和 Fas 表达情况

组别	剂量 (mg/L)	Bcl-2/ β-Actin	Fas/ β-Actin
对照组		0.75 ± 0.02	0.23 ± 0.01
实验组	10	0.62 ± 0.04	0.41 ± 0.02
	20	0.41 ± 0.02**	0.61 ± 0.05**
	40	0.29 ± 0.01**	0.72 ± 0.06**

注:与对照组比较, ** *P* < 0.01, * *P* < 0.05。

3 讨论

卵巢癌是女性生殖道常见恶性肿瘤,化疗是卵巢癌最重要的辅助治疗手段。目前,治疗肿瘤的多种放化疗药物主要是通过影响肿瘤细胞周期和诱导细胞凋亡来达到抑制肿瘤细胞的增殖目的,但化疗药物对肿瘤细胞选择性较差,在杀死肿瘤细胞的同时也杀死正常细胞,且其毒副作用大。因此,从天然产物中寻找高效低毒的抗肿瘤药物,已成为抗肿瘤药物研究的重要组成部分。

细胞凋亡抑制是肿瘤发生机制之一,抗凋亡基因及凋亡基因在这一过程中发挥着重要的作用,因此成为了卵巢癌治疗中的一个潜在的靶点。Bcl-2 基因位于 18q21,其功能失调是卵巢癌形成的一个重要机制。60%~80% 卵巢癌都有 Bcl-2 的表达。Bcl-2 与调节蛋白 Bax 形成二聚体,Bcl-2/Bax 比率高时,Bcl-2 抑制细胞凋亡^[3]。Bcl-2 基因其主要功能是促进细胞生存,延长细胞寿命,抗凋亡作用。Fas 属 TNFR/NGFR 家族,定位于人染色体 10q24.1,其产物是分子量 45kd 的跨膜蛋白,它与其天然配体膜蛋白 Fas-L(分布于 T 效应细胞)结合,从而细胞内传递“分子信号”,诱导细胞走向凋亡^[4-5]。

本研究结果显示:威灵仙多糖可明显诱导卵巢癌细胞凋亡,实验组与对照组比较有显著性差异(*P* < 0.01);威灵仙多糖上调 Fas 基因表达,下调 Bcl-2 基因表达,40mg/L 组最明显差异,具有统计学意义。综上所述,威灵仙多糖可能通过调控 Bcl-2 及 Fas 基因的表达,从而诱导卵巢癌细胞的凋亡。然而,威灵仙中的其它抗癌有效成分及其抗癌机制有待进一步的实验研究。

参考文献

[1] 典灵辉. 中药材威灵仙的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2004, 19(5): 231-234.
[2] 徐晓云, 王云霞, 李志勇. 威灵仙化学成分和药理学研究进展[J]. 现代中医药, 2003, 4: 67.
[3] Lalier L, Cartron PF, Juin P, et al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis[J]. Apoptosis, 2007, 12(5): 887-896.
[4] Zakeri Z, Lockshin R A. Cell death: history and future [J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 615: 1-11.
[5] Lockshin R A. Programmed cell death: history and future of a concept [J]. J Soc Biol, 2005, 199(3): 169-173.