

山茱萸多糖诱导宫颈癌细胞凋亡及 Bax 蛋白表达的变化

王恩军^{1*}, 靳祎¹, 王哲², 杨欢欢¹, 周艳芬¹, 刘斌³

(1. 河北大学, 河北保定 071000; 2. 保定市第二医院, 河北保定 071051;
3. 保定市急救中心医院, 河北保定 071000)

[摘要] 目的:探讨山茱萸多糖诱导人宫颈癌 Hela 细胞的凋亡作用及 Bax 蛋白表达的变化。方法:用 12.5, 25, 50 g·L⁻¹ 的山茱萸多糖作用 Hela 细胞 24 h, 倒置显微镜下观察细胞凋亡的形态, 免疫组化 SP 法检测凋亡相关蛋白 Bax 表达的变化。结果:Hela 细胞经 3 个不同浓度的山茱萸多糖作用后, 出现典型的细胞凋亡的形态学变化, 其程度与浓度相关; 而且 Bax 蛋白的表达量随浓度升高而增加, 免疫组化评分(IHS)分别为 0.18, 0.44, 1.35。结论:山茱萸多糖能够促进 Bax 的表达, 诱导 Hela 细胞凋亡。

[关键词] 山茱萸多糖; 宫颈癌; Hela 细胞; Bax; 凋亡; 免疫组化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0260-03

The Expression of Bax Protein of Fructus Corni Polysaccharides in Human Cervical Cancer Cells

WANG En-jun^{1*}, JIN Yi¹, WANG Zhe², YANG Huan-huan¹, ZHOU Yan-fen¹, LIU Bin³

(1. Hebei University, Baoding 071000, China; 2. The Number Two Hospital, Baoding 071051, China;
3. Baoding Medical Emergency Center, Baoding 071000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the apoptosis effect of fructus corni polysaccharides on expression of Bax in Hela cells. **Method:** Hela cells were treated with various concentration of fructus corni polysaccharides for 24 h, the change of cells' apoptosis shape was observed by upside-down microscope, and expression of Bax was detected by immunohistochemistry streptavidin peroxidase. **Result:** Morphological observation appeared representative cell apoptosis and Bax expression up after fructus corni polysaccharides on Hela cells. Its degree was correlated with concentration. **Conclusion:** Fructus corni polysaccharides can promote Bax expression and induce cell apoptosis.

[Key words] Fructus corni polysaccharides; cervical cancer; Hela cells; Bax; apoptosis; immunohistochemistry

山茱萸是山茱萸科植物山茱萸的干燥果肉, 别名山萸肉、肉枣、药枣等^[1-3]。以除去种子的成熟果实入药, 在临床上应用较广。山茱萸多糖是山茱萸生物学活性物质的重要成分^[4]。关于山茱萸多糖的药理活性, 目前报道较多的有增强免疫及抗衰老

作用, 而其他方面的研究很少。多糖一般具有抗肿瘤、抗病毒、抗辐射、降血糖血脂、抗凝、抗溃疡等功能^[5-6]。本文就山茱萸多糖对宫颈癌细胞的凋亡作用及 Bax 蛋白表达进行了研究, 为山茱萸多糖的抗癌活性成分研发提供参考依据。

1 材料

1.1 药物 山茱萸购自河北安国昌达中药材饮片有限公司, 经河北大学中医学院梁先茂副教授鉴定为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc 的干燥成熟果肉。

1.2 细胞株 人宫颈癌 Hela 细胞, 由河北大学生

[收稿日期] 20111230(008)

[基金项目] 河北省人口和计划生育委员会科研计划项目(2009-B18), 保定市科技局科学技术研究与发展指导计划项目(09ZF011)

[通讯作者] * 王恩军, 硕士, 讲师, Tel: 13833061977, E-mail: wangenjun2009@163.com

命科学院提供。

1.3 试剂 DMEM 培养基和胰蛋白酶(GIBCO 公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),一抗 BAX(SANTA CRUZ 公司),兔二抗、鼠二抗及 DAB 显色剂(Invitrogen 公司)。

1.4 仪器 CO₂ 培养箱(美国 SHELDON 公司),净化工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司),倒置显微镜(日本奥林巴斯公司),Image-Pro Plus 多功能真彩色细胞图像分析管理系统(美国 Media Cybernetics 公司),DSHZ-300 型恒温水浴箱(江苏太仓医用仪器厂)。

2 方法

2.1 山茱萸多糖的制备 采用热水浸提法提取,经苯酚-硫酸法测定多糖含量为 68.95%,试验前制成 500 g·L⁻¹ 的溶液,高压灭菌 4 ℃ 保存备用。

2.2 细胞培养 预先将细胞爬片(4%多聚赖氨酸处理)置于 6 孔培养板底部,Hela 细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化后调整细胞密度为 2 × 10⁵ 个/mL,接种在 6 孔培养板上,每孔 2 mL,置于 37 ℃ 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h。

2.3 试验分组 实验组加入不同浓度的山茱萸多糖(终质量浓度分别为 12.5,25,50 g·L⁻¹),阴性对照组加入相同剂量的生理盐水。置于培养箱中继续培养 24 h。

2.4 细胞凋亡形态的观察 培养 24 h 后,取出培养板在倒置显微镜下观察细胞的形态变化并摄片。

2.5 Bax 表达的检测 采用免疫组化过氧化酶标记的链霉卵白素(streptavidin peroxidase, SP)法,培养 24 h 后吸弃培养基,细胞爬片用冰的纯丙酮固定

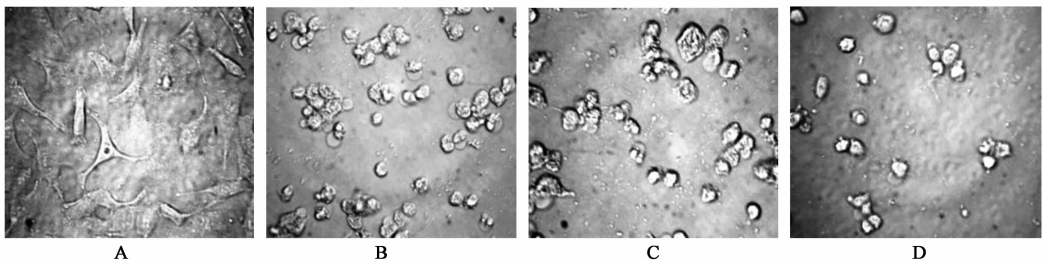
20 min,滴加正常山羊血清封闭非特异性蛋白,滴加一抗 Bax 工作液孵育,生物素标记的二抗工作液孵育,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,DAB 显色,苏木素染液复染,50%,70%,80%,90%,95%,100%乙醇梯度脱水,二甲苯溶液透明,中性树胶封片。

2.6 结果判定 Bax 阳性产物主要在细胞质中表达,呈棕黄色颗粒。采用双盲法随机选择 5 个高倍镜视野(400 ×),参照文献[7],染色结果用免疫组化评分(IHS)表示,IHS = A × B。A 为阳性细胞数(%),分级 0 ~ 1% 为 0 分,1% ~ 10% 为 1 分,10% ~ 50% 为 2 分,50% ~ 80% 为 3 分,80% ~ 100% 为 4 分;B 为阳性细胞显色强度,分级 0 分(不着色为阴性),1 分(浅黄色为弱阳性),2 分(棕黄色为阳性),3 分(棕褐色为强阳性)。

2.7 统计学方法 采用 The SAS system 6.12 统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 山茱萸多糖诱导 Hela 细胞凋亡的形态学变化 3 种不同质量浓度的山茱萸多糖作用于 Hela 后,显微镜下观察可见正常对照组宫颈癌 Hela 细胞为不规则长梭形或多角形,核圆形,排列无规律,细胞密度较大,常簇状生长,细胞边缘清晰;实验组山茱萸多糖作用 Hela 细胞后,数量明显减少,胞膜起皱,细胞呈圆形,体积缩小,部分细胞脱落,悬浮于培养基内,显示典型的细胞凋亡的形态学变化,这一变化趋势随着浓度的升高表现的越明显(图 1)。说明 Hela 细胞凋亡的程度与山茱萸多糖的浓度呈相关性。



A. 对照组;B. 山茱萸多糖 12.5 g·L⁻¹组;C. 山茱萸多糖 25 g·L⁻¹组;D. 山茱萸多糖 50 g·L⁻¹组

图 1 山茱萸多糖作用 24 h 人宫颈癌 Hela 细胞形态学变化(倒置显微镜, ×400)

3.2 山茱萸多糖对 Hela 细胞 Bax 蛋白表达的影响 Hela 细胞经 12.5,25,50 g·L⁻¹ 的山茱萸多糖作用后,实验组阳性细胞明显增多,说明 Bax 蛋白表达升高。免疫组化评分结果见表 1。随着山茱萸多糖浓度的增加,免疫组化评分增加,与阴性对照组比较

有显著差异($P < 0.05$)。可见,Hela 细胞的凋亡与 Bax 表达呈正相关,而且与浓度相关。

4 讨论

宫颈癌是一种严重危害妇女健康和生命的生殖系统恶性肿瘤,在全球妇女恶性肿瘤中仅次于乳腺

表 1 山茱萸多糖对 HeLa 细胞 Bax 蛋白表达的影响

组别	剂量 /g·L ⁻¹	Bax		
		阳性细胞 /%	显色强度 /分	免疫组化 评分
阴性对照	-	9	1	0.09
山茱萸多糖	12.5	18	1	0.18 ¹⁾
	25.0	22	2	0.44 ¹⁾
	50.0	45	3	1.35 ²⁾

注:与阴性对照组相比¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01。

癌。临床上宫颈癌主要采取手术、放疗等综合治疗。但它们所带来的并发症也很多,而且化疗药物本身费用昂贵,久易耐药,毒性较大。目前,从天然动植物中寻找高效低毒的抗癌活性成分已成为近年来国内外学者研究的热点之一。天然中草药不但对正常细胞不产生或仅产生轻微影响,而且毒副作用小。

山茱萸是来源于双子叶植物药山茱萸的干燥果肉。味酸、性微温。临床上是一种平补阴阳的中药,具有补肝肾,涩精气,固虚脱的功效。常用于肝肾不足之腰酸遗精、头晕目眩、月经过多以及尿频、自汗等症。山茱萸的药理作用很多,本文仅就其抗肿瘤活性进行了探讨。有报道证实山茱萸体外能杀死腹水癌细胞。以山茱萸煎剂做实验,并用正常唾液腺细胞和精巢细胞作对照。结果显示:山茱萸体外能杀死全部小鼠腹水癌细胞,而且对精巢细胞也有同样作用,仅小部分杀死唾液腺细胞。对于肿瘤患者因化疗及放疗引起的白细胞下降,有升高的作用^[2]。另外有实验证实,山茱萸总多糖对 HL-60 细胞体外增殖具有一定的抑制作用,并呈现剂量相关性^[8]。

山茱萸果肉中含糖类、有机酸类及其酯类、鞣质类等成分。近年来多糖的抗肿瘤作用倍受关注。多糖可以通过抑制肿瘤细胞增殖、抑制细胞周期、诱导细胞凋亡及对凋亡相关基因的影响等多方面发挥抗肿瘤作用。诱导肿瘤细胞凋亡是多糖抑制肿瘤生长的重要机制^[10],细胞凋亡是由基因控制的细胞自主的有序的死亡,在肿瘤的发生发展中起负调控作用,它涉及一系列的基因调控作用。本文采用 3 个浓度的山茱萸多糖(12.5, 25, 50 g·L⁻¹)处理 HeLa 细胞,在倒置显微镜下观察细胞凋亡的形态学改变及凋亡相关蛋白 Bax 表达的变化,来进一步探讨山茱萸多糖的抗肿瘤作用及机制。试验结果表明 HeLa 细胞经三个不同浓度的山茱萸多糖作用后,细胞密度明

显减小,细胞形态显示典型的细胞凋亡的特征,细胞由不规则长梭形或多角形变为圆形,体积缩小,部分细胞脱落后悬浮于培养基内,而且其变化程度与浓度相关,结果说明山茱萸多糖能够诱导细胞凋亡,从而抑制细胞增殖。

细胞凋亡是受多基因严格控制的过程,bax 是极重要的促细胞凋亡基因之一,属于 Bcl-2 基因家族。其编码的 Bax 蛋白可与 Bcl-2 形成异二聚体,对 Bcl-2 产生阻抑作用。Bax 能加速细胞凋亡。Bax 的表达更为广泛,它可出现在肝细胞、肾小管上皮细胞、呼吸系统上皮细胞和支气管平滑肌、血管平滑肌细胞中。Bax 高表达时,则凋亡指数高,Bax 低表达或不表达时凋亡指数低^[11]。本试验通过免疫组化法检测了促进细胞凋亡的 Bax 蛋白在山茱萸多糖作用前后表达量的变化。结果表明细胞经山茱萸多糖作用后,Bax 蛋白的表达水平明显升高,而且 IHS 随着山茱萸浓度的增加明显升高,说明凋亡指数增高。表明山茱萸多糖可以通过上调 Bax 蛋白的表达来诱导 HeLa 细胞凋亡。

[参考文献]

[1] 龚卫红,赵希贤. 双波长高效液相色谱法测定山茱萸中多种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(14):58.

[2] 许冬谨,刘再强,陈华师. 盐制山茱萸炮制工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13):46.

[3] 刘洪,许惠琴. 山茱萸及其主要成分的药理学研究进展[J]. 南京中医药大学学报,2003,19(4):254.

[4] 李小蓉,赵鹏,张丽华. 山茱萸多糖的研究进展[J]. 亚太传统医药,2008,4(9):135.

[5] 张媛,刘健. 植物多糖生物活性的研究进展[J]. 天津药学,2010,22(2):62.

[6] 王俊霞,武晓红,李昌勤,等. 山茱萸提取物对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):74.

[7] Soslow R A, Dannenberg A J, Rush D, et al. Cox-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors[J]. Cancer,2000,89:2637.

[8] 张聪,金德庄. 山茱萸的研究进展[J]. 上海医药,2008,29(10):464.

[9] 陈艳. 中药多糖抗肿瘤机制研究进展[J]. 药学与临床研究,2010,18(2):123.

[10] 王玉芝,蒲斌. 中药诱导肿瘤细胞凋亡研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志,2004,10(4):331.

[11] 迟万好,曹明富,朱睦元. 细胞凋亡的基因调控研究进展[J]. 杭州师范学院学报,2001,18(5):45.

[责任编辑 聂淑琴]