

恒定磁场与硫酸肝素对人肝癌细胞系增殖和凋亡的影响

王玉苹 张海伟 罗英儒 宋秀豹 叶仲毅

【摘 要】 目的 探讨恒定磁场与硫酸肝素对人肝癌细胞增殖和凋亡的影响及可能机制。方法 体外观察硫酸肝素作用于人肝癌细胞系(HepG2)后的细胞增殖、凋亡效应和细胞 ras 基因表达的变化,并探讨其在恒定磁场作用下的相互关系。结果 硫酸肝素能抑制细胞 HepG2 的增殖能力及其细胞 ras 基因蛋白的表达,并诱导其细胞凋亡率增加。同时,在恒定磁场作用下获得细胞增殖抑制与凋亡诱导的加强。结论 硫酸肝素对人肝癌细胞增殖、凋亡的影响与 ras 基因蛋白介导的信号传递作用有关;恒定磁场与硫酸肝素对人肝癌细胞增殖和凋亡具有协同作用。

【关键词】 恒定磁场; 硫酸肝素; 肝癌; 细胞增殖; 凋亡; ras 蛋白

Study on effects of heparan sulphate and constant magnetic fields on proliferation and apoptosis of human hepatoma cell line(HepG2) WANG Yuping*, ZHANG Haiwei, LUO Yingru, SONG Xiubao, YE Zhongyi. * Department of Physiotherapy, The First Affiliated Hospital, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China

【Abstract】 **Objective** To explore the effects of heparan sulphate in combination with constant magnetic fields on the proliferation and apoptosis of the human hepatoma cell line (HepG2). **Methods** Serial experimental observations, including the effects of heparan sulphate on the proliferation and apoptosis of HepG2 as well as the influences of constant magnetic fields on these effects, were carried out *in vitro*. **Results** Heparan sulphate could slow-down the progression of HepG2 proliferation (including the ras gene expression level, as well), and these effects were accelerated under the influences of constant magnetic fields. **Conclusion** The *in vitro* experimental results suggested that the effect of heparan sulphate on proliferation and apoptosis of HepG2 was correlated with the signalling transduction mediated by ras gene protein, and that a synergic action was present between heparan sulphate and constant magnetic fields on these changes.

【Key words】 Constant magnetic fields; Heparan sulphate; Hepatoma; Proliferation; Apoptosis; Ras protein

肝素是一类经典的抗凝血物质,与细胞外基质成份硫酸乙酰肝素即葡糖醛酸与 N-乙酰葡糖胺之间形成 $\beta 1 \sim 4$ 连接的多聚体同源。已知细胞外基质成份包括了 Laminin、fibronetin、胶原、硫酸肝素等,广泛参与细胞生命活动中的细胞生长、分化、衰老、癌变、增殖、细胞运动、粘连等过程^[1]。人们对于癌变过程中细胞外基质成份硫酸肝素的认识,以往主要集中于癌转移过程中硫酸肝素分子中 SO_4^{2-} 强阴离子粘附效应对癌细胞粘附过程中的影响^[1-3]。

最近的研究表明,人肝癌细胞系(HepG2)具有肝素酶(heparinase)的表达^[3],提示肝素很可能作为配体的信号传递物参与肿瘤的发生、发展甚至转移的整个过程。那么,硫酸肝素类物质是如何参与肝癌细胞的生命活动的?是否与恒定磁场具有协同作用?本文以

硫酸肝素体外作用于 HepG2,探讨其对细胞的增殖、凋亡效应和细胞 ras 基因表达的影响,并观察了磁场对它的影响。

资料与方法

一、肿瘤细胞及其培养

采用人肝癌细胞系(HepG2)^[4],由中山医科大学提供,用 RPMI-1640(GIBCO) + 20% 小牛血清(GIBCO)培养,3 d 后传代,本实验在传代数 20 代内进行。

二、硫酸肝素对人肝癌细胞增殖的影响

取指数生长的 HepG2 细胞,按每皿($\phi 3$ cm) 3×10^5 个/ml 的细胞接种,每皿内含培养液(RPMI-1640 + 20% 小牛血清)共 2 ml,培养 48 h 后收集细胞并计数。本研究以 RPMI-1640 + 20% 小牛血清作为对照组及其内含终浓度为 $10 U \cdot ml^{-1}$ 的硫酸肝素作为实验组。在观察恒定磁场的影响时,使用 5 片磁片以其 N 极直接贴附于培养皿平面、磁场强度为 0.2 T。实验磁片分布按以皿中心点所划的等边四边形与皿底圆周相交点分布进行。该实验按每组 6 皿同时接种,取其均数作为结果,实验重复 6 次。

基金项目:广东省卫生厅及其“五个一”兴教工程基金资助(粤卫[1998]241 号 A1998294)

作者单位:510632 广州,暨南大学医学院第一附属医院康复理疗科(王玉苹、宋秀豹),检验科(叶仲毅),病理教研室、广东省“五个一”兴教实验肿瘤重点实验室(张海伟),药理教研室(罗英儒)

三、硫酸肝素对人肝癌细胞 ras 基因表达的影响

取指数生长的 HepG2 细胞,按每皿($\phi 3$ cm) 3×10^5 个/ml 的细胞接种,每皿内含培养液(RPMI-1640 + 20% 小牛血清)共 2 ml 进行盖玻片培养 48 h,然后用免疫细胞酶标法(LSAB 法)进行测定。使用试剂均为 DAKO 公司产品,一抗按 1:100 稀释度进行实验。本研究设立 PBS 取代一抗的空白对照以及 RPMI-1640 + 20% 小牛血清作为对照组及其内含终浓度为 $10 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的硫酸肝素作为实验组。

四、细胞凋亡的检测

取指数生长的人肝癌细胞 HepG2 单细胞悬液按 3×10^5 个/ml 接种于 $\phi 3$ cm 培养皿,每皿内含培养液(RPMI-1640 + 20% 小牛血清)共 2 ml,置 37°C ,5% CO_2 培养箱内培养 48 h 的方法。实验设立了 RPMI-1640 + 20% 小牛血清作为对照组及其内含终浓度为 $10 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ 硫酸肝素,以及 N 极直接贴附于培养皿平面、磁场强度为 0.2 T 的 5 片磁片(实验磁片分布方法同前)作为实验组。

测定细胞凋亡时,调整细胞浓度为 10^8 个 $\cdot \text{L}^{-1}$ 的细胞悬液。细胞悬液以 4°C 70% 乙醇固定,用磷酸盐缓冲液(PBS)进行离心沉淀去除固定液,加 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ RNAaseA $50 \mu\text{L}$, $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的碘化丙啶(PI)染色液 $450 \mu\text{L}$,PBS $450 \mu\text{L}$ 。置于 4°C 冰箱 30 min 后,在流式细胞仪上进行分析。实验重复 6 次,取均值及标准差作为结果(流式细胞仪分析时,采用了小牛胸腺细胞作为 DNA 二倍体的对照,利用 HepG2 细胞与不同作用条件的配对资料进行比较研究。使用的流式细胞仪型号是 FACSCAN/ST(美国)所制的散点及直方图且 CV 值均小于 4%)。

结 果

与对照组比较,无论在恒定磁场或无磁场作用时,硫酸肝素均能抑制 HepG2 增殖(表 1, $P < 0.01$)且促进其细胞凋亡(表 1, $P < 0.01$;图 1、2)。而与无磁场作用组比较,在恒定磁场作用时,尽管恒定磁场对 HepG2 细胞增殖及凋亡的影响差异无显著性(表 1, $P > 0.05$;图 1、3),硫酸肝素与恒定磁场的作用仍能明

表 1 恒定磁场及硫酸肝素对 HepG2 增殖、凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	加恒定磁场		不加磁场	
	细胞增殖 ($\times 10^5$ 个)	细胞凋亡 (%)	细胞增殖 ($\times 10^5$ 个)	细胞凋亡 (%)
对照组	$18.7 \pm 1.9^{\Delta}$	4.6 ± 1.2	19.8 ± 1.6	3.5 ± 0.9
硫酸肝素组	$12.9 \pm 1.1^*$	$10.8 \pm 1.5^*$	15.5 ± 1.2	8.3 ± 1.1

注: t 检验。恒定磁场或不加磁场作用中,硫酸肝素组与对照组比较, $P < 0.01$;恒定磁场作用时, $^* P < 0.05$;与不加磁场组比较, $^{\Delta} P > 0.05$

显抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖,也能诱导其细胞的凋亡增加(表 1, $P > 0.05$;图 1~4),并且此作用与恒定磁场作用具有协同性(图 3、4);此外,硫酸肝素能抑制人肝癌细胞 HepG2 ras 基因蛋白的表达(图 5)。

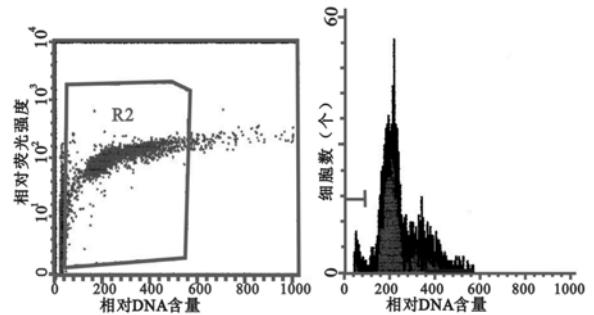


图 1 HepG2 的细胞凋亡(RPMI-1640 + 20% FCS 作用的对照组)

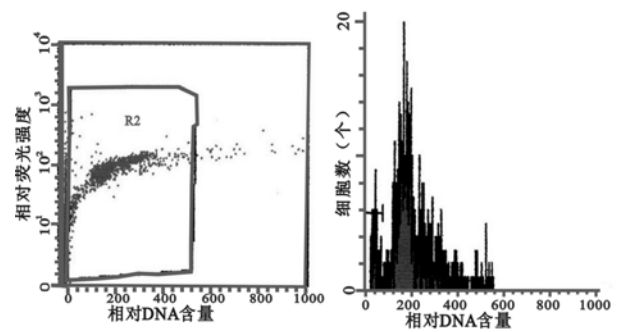


图 2 HepG2 的细胞凋亡(RPMI-1640 + 20% FCS 的硫酸肝素作用组)

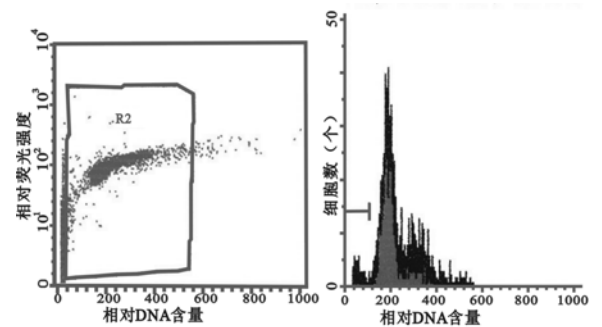


图 3 HepG2 的细胞凋亡(附加磁场作用的 RPMI-1640 + 20% FCS 对照组)

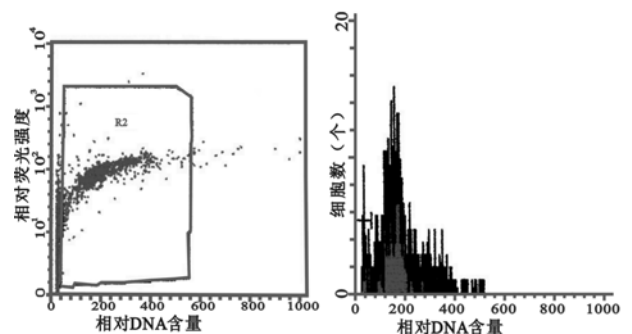


图 4 HepG2 的细胞凋亡(附加磁场的 RPMI-1640 + 20% FCS 加硫酸肝素作用组)

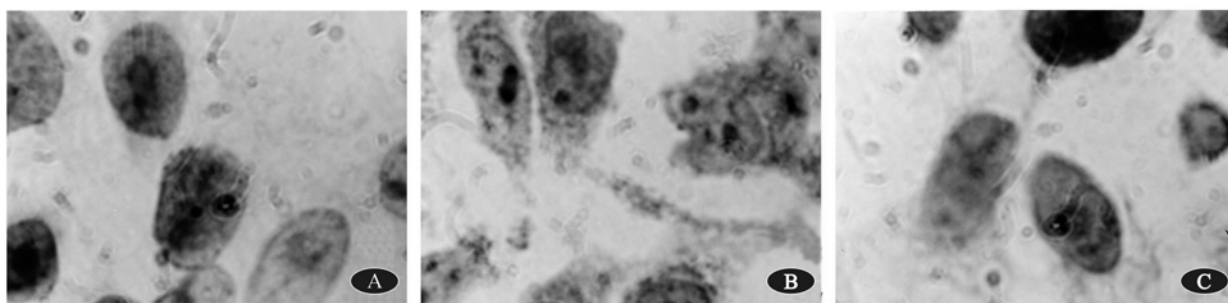


图 5 肿瘤细胞 HepG2 ras 基因蛋白表达(图 5-A、空白对照;图 5-B、对照组;图 5-C、硫酸肝素组,苏木素复染, $\times 1000$;LSAB 法)

讨 论

人肝癌细胞 HepG2 具有肝素酶表达的特性,提示肝素很可能作为配体的信号传递物参与了肿瘤的发生、发展甚至转移的整个过程。此发现对肝癌研究可能是一创新,它超越了人们传统认为在癌转移过程中硫酸肝素分子的作用是 SO_4^{2-} 强阴离子效应的机制这常识^[3]。的确,人类已经发现肝癌组织中确实存在硫酸肝素多聚糖蛋白分子的表达^[5],并且已揭示硫酸肝素很可能作为配体的细胞信号传递,如钙离子参与的细胞信号传递途径调节着细胞功能^[6]。此外,已有报道^[7]细胞外基质参与的细胞信号传递与肝细胞生长因子作用的信号传递途径存在着关联点。本研究揭示硫酸肝素能抑制具有肝素酶表达的 HepG2 细胞的增殖并上调其细胞的凋亡水平,说明很可能是肝素在肝素酶的作用下的结果之一,同时也提示了肝素分子及肝素酶在抗癌研究中的应用具有一定的前景。另一方面,属 G 蛋白家族的信号传递小分子 ras 基因蛋白,现已证明是参与细胞生命活动当中重要的信号传递物,它的表达与细胞的癌变及其发展密切相关^[8]。本文利用硫酸肝素的作用能抑制人肝癌细胞 HepG2 ras 基因蛋白的表达,这一结果进一步说明硫酸肝素对人肝癌细胞增殖、凋亡的影响与 ras 基因蛋白介导的信号传递作用有关,这对抗癌的信号传导治疗也是重要的启示。此外,在前人已证明磁场作用对肿瘤细胞生长有影响的基础上^[9,10],本研究利用恒定磁场作用于人肝癌 HepG2 细胞也显示了类同的结果;特别是,本研究中利用恒定磁场与硫酸肝素的共同作用能抑制人肝癌 HepG2 细胞的增殖而诱导其细胞凋亡的加强,这一结

果能否以 SO_4^{2-} 的磁场效应或肝素酶以硫酸肝素作为配体的信号传递效应来解释,值得进一步的深入研究。

参 考 文 献

- 1 Bendicht U, Pauli DVM, Warren K. Tumor Invasion: a consequence of destructive and compositional matrix alterations. *Human Pathol*, 1988, 19:628-638.
- 2 Le Bail B, Faouzi S, Boussarie L, et al. Extracellular matrix composition and integrin expression in early hepatocarcinogenesis in human cirrhotic liver. *J Pathol*, 1997, 181:330-337.
- 3 Pikas DS, Li JP, Vlodavsky I, et al. Substrate specificity of heparanases from human hepatoma and platelets. *J Biol Chem*, 1998, 273:18770-18777.
- 4 Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*. 1980, 209:497-499.
- 5 Roskams T, De Vos R, David G, et al. Heparan sulphate proteoglycan expression in human primary liver tumours. *J Pathol*, 1998, 185:290-297.
- 6 Burgess JW, Gould DR, Marcel YL, et al. The HepG2 extracellular matrix contains separate heparinase-and lipid-releasable pools of ApoE. Implications for hepatic lipoprotein metabolism. *J Biol Chem*, 1998, 273:5645-5654.
- 7 Kawakami-Kimura-N, Narita T, Ohmori K, et al. Involvement of hepatocyte growth factor in increased integrin expression on HepG2 cells triggered by adhesion to endothelial cells. *Br J Cancer*, 1997, 75:47-53.
- 8 孙大业. 细胞信号转导. 第 2 版. 北京:科学出版社, 1998. 42-202.
- 9 Helper MH, Greene AE. Effects of magnetic fields on growth of HeLa cells in tissue culture. *Nature*, 1964, 202:717.
- 10 张小云, 张晓鄂. 恒定强磁场对 HeLa 细胞生长分裂的影响. *科学通报*, 1989, 34:1901-1904.

(收稿日期:2001-12-25)

(本文编辑:熊芝兰)

本刊办刊方向:

立足现实 关注前沿 贴近读者 追求卓越