

爪哇伪枝藻胞外多糖诱导皮肤癌细胞 (A431) 凋亡的研究

张宏 马红樱 张德禄 吕莹 王高鸿

陈坤 刘永定 胡春香

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 为探讨爪哇伪枝藻胞外多糖 (Extracellular polymeric substances of *Scytonema javanicum*, EPS) 诱导人表皮癌 A431 细胞凋亡及其对凋亡相关基因 *caspase-3*, *bcl-2* 和 *bax* 表达的影响, 本实验利用 MTT 法检测细胞生长抑制情况; HE 染色法及透射电镜进行形态学观察; 单细胞凝胶电泳法 (SCGE/彗星电泳) 分析 DNA 受损情况; 免疫组织化学法检测细胞内 *caspase-3*, *bcl-2* 和 *bax* 表达水平。结果显示 EPS 能显著抑制 A431 细胞增殖, 并呈时间和剂量依赖性, 作用 96h 的半数抑制浓度 IC_{50} 为 4.25 mg/mL , 并出现细胞凋亡的形态学改变; 彗星电泳结果与对照相比 6 mg/mL EPS 作用 48h 能引起 A431 细胞 DNA 严重损伤; 免疫组织化学检测发现 6 mg/mL EPS 作用 72h 能显著上调 A431 细胞内凋亡相关基因 *caspase-3* 和 *bax* 的表达, 而下调 *bcl-2* 的表达。

关键词: 爪哇伪枝藻; 胞外多糖; A431; 细胞凋亡

中图分类号: Q354 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)06-0874-07

近年来, 活性多糖由于其明显的生物学功效和低毒副作用而备受人们的关注和厚爱^[1]。但目前研究较多的主要是高等药用植物和菌类植物的多糖, 藻类多糖的活性很少被注意^[2,3], 尤其是荒漠藻多糖。虽然荒漠藻因其在受损土壤生态系统修复中的作用而被关注^[4,5], 但对其胞外多糖的研究还仅限于抗干旱、抗辐射、抗盐碱、抗捕食等环境功能方面, 而在抗肿瘤等生物学活性方面还尚未见报道^[6-9]。爪哇伪枝藻 (*Scytonema javanicum*) 是荒漠地区生物结皮组成中的优势种类, 它直接暴露于土壤表面^[10], 常通过胞内合成的类菌胞素氨基酸 (Mycosporine-like amino acids, MAAs)、胞外分泌的伪枝藻素 (scytonemin) 和胞外多糖来适应高强辐射^[11], 而高强辐射是荒漠地区诱导人类皮肤癌的主要因素之一^[12,13], 我们推测该种类的胞外多糖也具有抗肿瘤活性。因此, 本研究以人表皮癌细胞 (A431) 为试验对象, 探究爪哇伪枝藻胞外多糖的抗肿瘤活性及其可能的机制, 以进一步揭示荒漠藻适应环境胁迫的机理, 并为可能的资源开发利用提供

参考依据。

1 材料与方法

1.1 人表皮癌细胞株及其培养 人表皮癌细胞株 A431 购自中国典型物保藏中心 (CCTCC), 于 MEM 基础培养基 (含 10% 胎牛血清 (Gibco), 2% 的丙酮酸钠, 青霉素 100 U/mL , 硫酸链霉素 100 μg/mL 中, 置于二氧化碳培养箱 (MCO-15AC, Japan) 中 37°C 、饱和湿度、5% CO_2 条件下培养。待细胞进入对数生长期后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 调节成相应的浓度传代培养。本实验均采用对数生长期细胞。

1.2 爪哇伪枝藻胞外多糖 (EPS) 的制备 爪哇伪枝藻 (*S. javanicum*) 取自中国科学院水生生物研究所藻种库。EPS 的制备方法参照文献 [4] 的方法, 将藻接种于 BG110 培养基, 25°C 连续培养 90d, 收集培养液于旋转蒸发仪 (R-210, Buchi, Switzerland) 中 40°C , 100 r/min 旋转蒸发至最小体积, 将浓缩得到的液体用阴离子交换柱 DEAE Sepharose Fast

收稿日期: 2006-11-15 修订日期: 2007-10-12

基金项目: 国家自然科学基金 (30770395, 30370112); 国家载人航天工程计划; 内蒙古发改委与武汉市科技局重大攻关计划; 中国科学院水生所领域前沿项目资助

作者简介: 张宏 (1978—), 男, 安徽金寨人; 在读硕士研究生; 主要研究方向环境毒理学。E-mail: zh_elix@126.com

通讯作者: 胡春香, E-mail: cxhu@ihb.ac.cn

Flw (Pharmacia Switzerland) 进行分离, 分别用蒸馏水、1mol/L 和 2mol/L NaCl 溶液洗脱, 洗脱液进行透析, 然后再浓缩至最小体积, 于冷冻干燥器 (Thermo Savant England) 中干燥得 EPS。本实验选用蒸馏水洗脱成分。

1.3 A431 细胞生存率检测 将细胞以 1×10^5 个/mL 密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L 细胞悬液, 24h 后重新加入含 EPS 终浓度分别为 0.5、1、2、4、6mg/mL 的培养基, 以加入等量 PBS 为对照, 分别于 0、24、48、72、96h 后, 加入 20 μ L MTT 使其终浓度达 0.5g/L, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 4h 后小心吸弃上清液, 每孔加入二甲基亚砷 (DM SO) 200 μ L, 恒温振荡 10—30min 混匀, 酶标仪 (Sunrise Remote) 上测定 560nm 的吸光度值 (A_{560})。细胞增殖抑制率计算公式为: 抑制率 = (1 - 实验组 A_{560}) / 对照组 A_{560} $\times$ 100%。每个浓度设三个平行孔, 并独立重复检测三次。

1.4 HE 染色和透射电镜检测细胞形态学变化 取无菌六孔板, 放入 18mm $\times$ 18mm 洁净的已灭菌盖玻片。每孔加入细胞悬液 3mL (约 1×10^5 个/mL), 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养至长满盖玻片面积 70%—80% (约 2—3d) 后, 6mg/mL EPS 作用 72h 后取出, PBS 清洗 2—3 次, 进行苏木精-伊红染色 (HE 染色), 于光学显微镜下观察并拍照。常规收集 PBS 对照组和 EPS 6mg/mL 处理 72h 的细胞, 用 1% 锇酸固定 60min 按常规电镜样品制备程序脱水、渗透、包埋、超薄切片、染色透射电镜观察并拍照。

1.5 单细胞凝胶电泳法对 DNA 损伤的检测 主要根据文献 [14] 的方法, 稍作改动。制备处理 48h 后的细胞悬液, 并镜检其存活率应大于 90%。在载玻片上涂上一层 0.5% 常熔点琼脂糖 (Normal melting agarose NMA) 并盖上盖玻片置于 4 $^{\circ}$ C 中使其凝固, 取出去盖玻片, 将 25 μ L 细胞悬液和 50 μ L 1% 低熔点琼脂糖 (Low melting agarose LMA) 在 37 $^{\circ}$ C 混合均匀, 滴在载玻片上, 置于 4 $^{\circ}$ C 中使其凝固。取出去掉盖玻片, 再加一层 LMA 并加盖玻片, 待其凝固。取出去盖玻片后将载玻片放入水平容器中并小心加入细胞裂解液 4 $^{\circ}$ C 避光裂解 2h 以上。从裂解液中取出载玻片用蒸馏水洗去多余的盐, 移入水平电泳槽里电泳缓冲液中避光解旋 40min, 低温避光电泳 30min, 0.4mol/L Tris-HCl 漂洗, 溴化乙锭染色, 荧光显微镜 (Nikon Japan) 下观察拍照。

1.6 免疫组织化学染色法检测凋亡相关基因的表达 取放有盖玻片的六孔板, 每孔接种大约 $1 \times$

10^5 个/mL 细胞悬液 3mL 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养至长满盖玻片面积 70%—80% (约 2—3d) 后, 6mg/mL EPS 作用 72h 后取出, 进行免疫组织化学 SP 法染色, 小鼠 Caspase-3 单克隆抗体按 1:150 稀释, Bcl2 和 Bax 单克隆抗体按 1:100 稀释, 以上三种单克隆抗体均购于北京中杉生物技术有限公司。阴性对照以 PBS 代替第一抗体。随机选择 5 个视野, 计数 200 个细胞, 棕黄色为阳性, 计算阳性细胞率。尼康光学显微镜下观察并拍照。

1.7 统计学分析 应用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计学分析。每次实验设 3 个平行, 每个实验重复三次。EPS 对 A431 细胞增殖的影响采用单因素方差分析, 用 *t* 检验进行组间显著性检验。

2 结 果

2.1 MTT 法检测 EPS 作用于 A431 细胞后对其增殖的影响

EPS 作用于 A431 细胞后, 随着 EPS 浓度增大, 人表皮癌细胞 A431 吸光度值 A_{560} 值逐渐减小, 随着其作用时间延长 A_{560} 值亦随之逐渐降低, 与对照组相比, 差异显著 ($p < 0.05$) (图 1)。A431 细胞凋亡率与 EPS 作用之间呈显著的时间和剂量效应关系 (图 2), 其中 96h 各浓度 EPS 组细胞凋亡率分别为 (13.08 $\pm$ 5.44)%、(58.38 $\pm$ 6.26)%、(76.44 $\pm$ 5.26)%、(92.72 $\pm$ 1.66)% 和 (96.07 $\pm$ 3.14)%。利用 Bliss 法计算 EPS 作用于 A431 细胞 96h 半抑制浓度 IC_{50} 为 4.25mg/mL。试验结果提示爪哇伪枝藻胞外多糖具有对人表皮癌细胞生长有抑制作用, 并且呈时间和剂量效应关系。

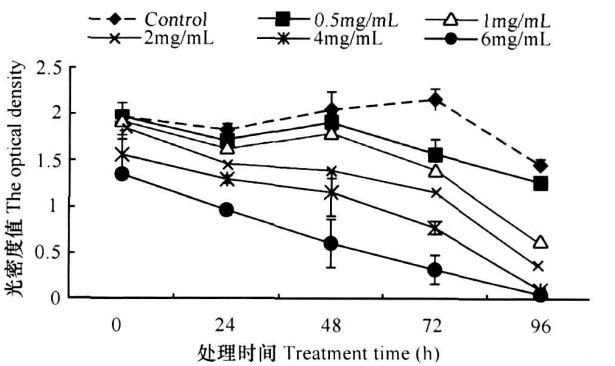


图 1 EPS 对 A431 细胞抑制作用的时间剂量效应 (* 表示差异显著, $p < 0.05$)

Fig. 1 The effect of EPS on the proliferation of A431 cells (* $p < 0.05$)

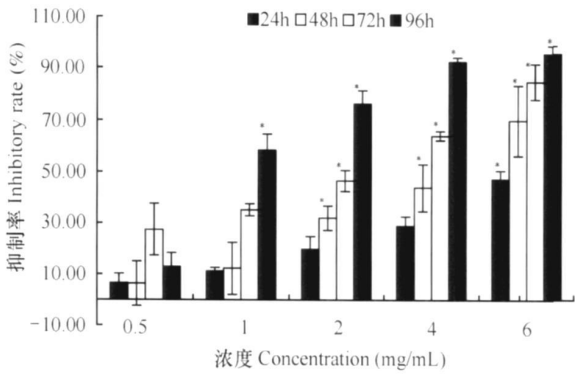


图 2 EPS对 A431细胞抑制率的时间剂量效应 (* 表示差异显著, $p < 0.05$)

Fig. 2 The effect of times and concentrations of EPS on the rates of apoptosis of A431 cells (* $p < 0.05$)

2.2 HE染色法和透射电镜检测 EPS作用于 A431细胞后其形态学的变化

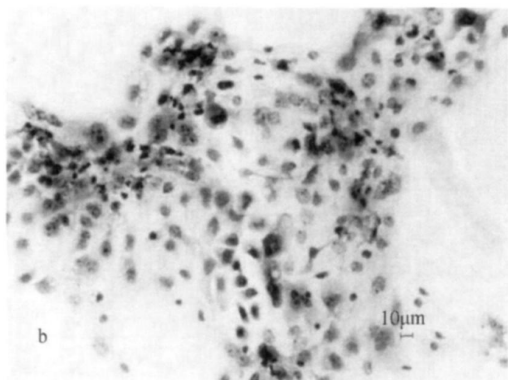
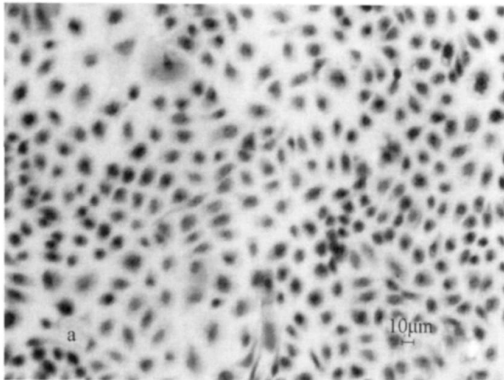


图 3 HE染色法检测 EPS作用于 A431细胞 72h后其形态学变化 (a为对照, b为实验组)

Fig. 3 The morphological changes of A431 cells detected by hematoxylin and eosin staining after EPS treatment for 72 hours (a control, b 6mg/mL EPS treated)

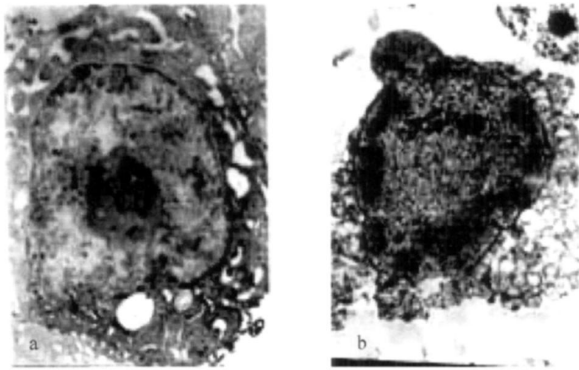


图 4 EPS处理 A431细胞后的超微结构变化 (图中标尺为 0.5 μm, a为对照组, b为实验组)

Fig. 4 The change of ultrastructure of A431 cells induced by EPS for 72 hours (Scale bar= 0.5 μm; a control, b 6mg/mL treated)

EPS作用于人表皮癌细胞 A431 72h后, 苏木精-伊红染色显示对照组和实验组在形态学上变化明显 (图 3)。对照组细胞呈均匀分布, 细胞形状相近, 核着色较深且很均匀。实验组细胞呈现贴壁数目明显减少, 分布较为稀疏, 细胞皱缩, 细胞核着色加深, 细胞大小不均等现象。而在透射电镜下 (图 4), 对照组细胞及细胞核明显可见, 核仁完整居中, 染色质均匀, 细胞器丰富细胞膜与核膜完整, 细胞膜表面有大量的微绒毛。实验组细胞皱缩, 细胞膜表面微绒毛消失, 细胞表面凹凸不平, 出现圆球突起的泡状结构, 细胞质空泡化, 核膜也发生皱缩或破裂, 染色质固缩、边缘化, 形成不同形状核大小的块状等典型的细胞凋亡形态。这说明 EPS作用使细胞生长明显受到抑制, 并能诱导 A431细胞的凋亡。

2.3 单细胞凝胶电泳法检测 EPS作用 A431细胞 72h后其 DNA受损情况

6mg/mL EPS 作用于 A431 细胞 48h后, 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞进行单细胞凝胶电泳。结果显示, 对照组细胞核完整且着色均匀, 而实验组细胞 DNA 明显受到损伤, DNA 出现片断化, 出现明显彗尾 (图 5)。这说明 EPS作用后, 细胞 DNA 受到损伤, 产生片断化, 是细胞凋亡的典型特征之一。

2.4 免疫组织化学染色法检测凋亡相关基因 caspase-3 bcl-2和 bax 的表达变化

免疫组化的结果显示, 6mg/mL EPS 作用于 A431细胞 72h后, 利用免疫组织化学 SP 染色法检

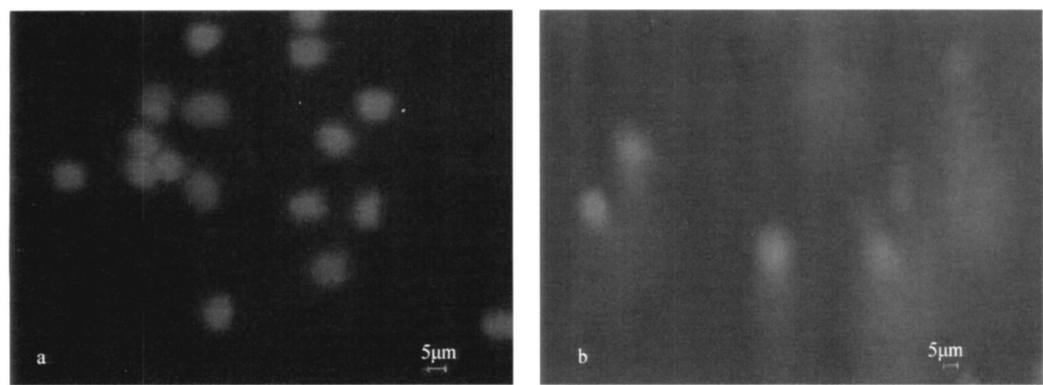
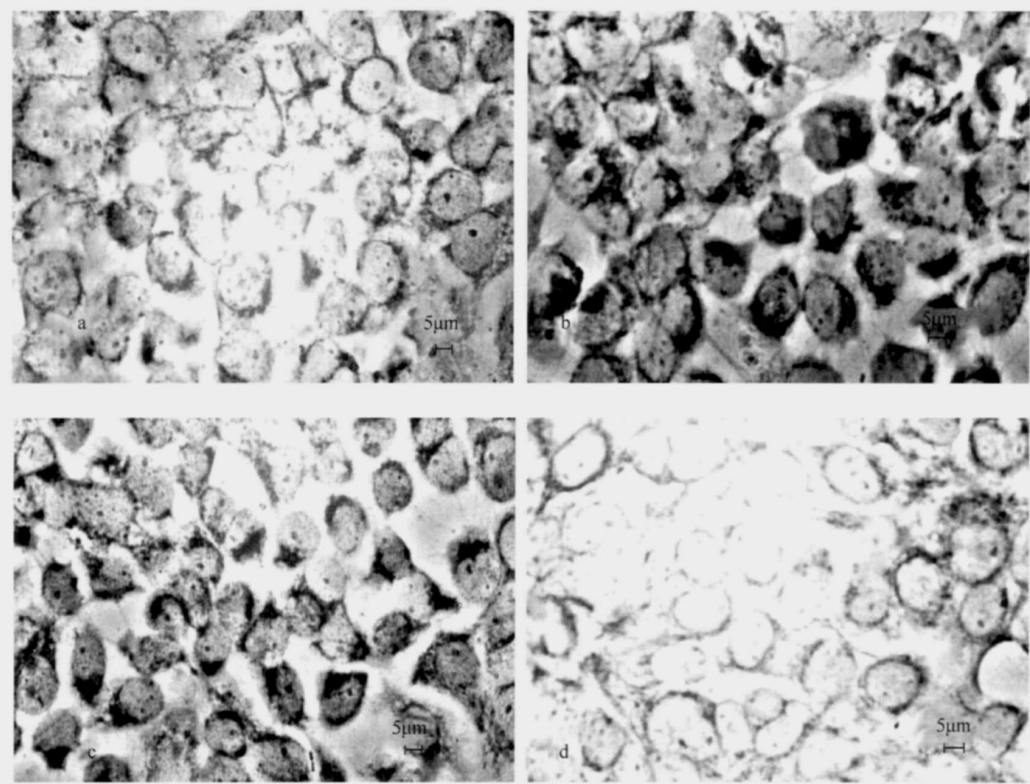


图 5 单细胞凝胶电泳法检测 6mg/mL EPS作用 A431细胞 72h后 DNA 受损 (a为对照, b为实验组)

Fig 5 Comet assays ofDNA damage in EPS treated A431 cells (a control b 6mg/mL EPS treated)

测凋亡相关基因 *cas*pase-3、*bcl*-2、*bax* 表达, *cas*pase-3和 *bax*实验组细胞膜和细胞质显深灰色呈强阳性而对照组则为阴性, 而 *bcl*-2对照组细胞膜显示深灰色呈强阳性, 实验组则阳性率不高 (图 6)。显微镜下计数后计算阳性率的结果显示, 与对照组相比, EPS实验组 *cas*pase-3和 *bax*表达的阳性率显著升高, 对照组的阳性率分别为 (8. 21 ±

0. 91)% 和 (11. 27 ±1. 48)% , 实验组阳性率分别为 (69. 32 ±7. 55)% 和 (86. 47 ±13. 05)% , 差异显著 ($p < 0. 05$); 而 *bcl*-2基因的阳性率则显著降低, 对照组为 (72. 58 ±6. 45)% 实验组为 (6. 49 ±1. 67)% , 差异显著 ($p < 0. 05$) (表 1)。这说明 EPS作用于 A431细胞上调 *cas*pase-3和 *bax* 的表达, 而下调 *bcl*-2的表达。



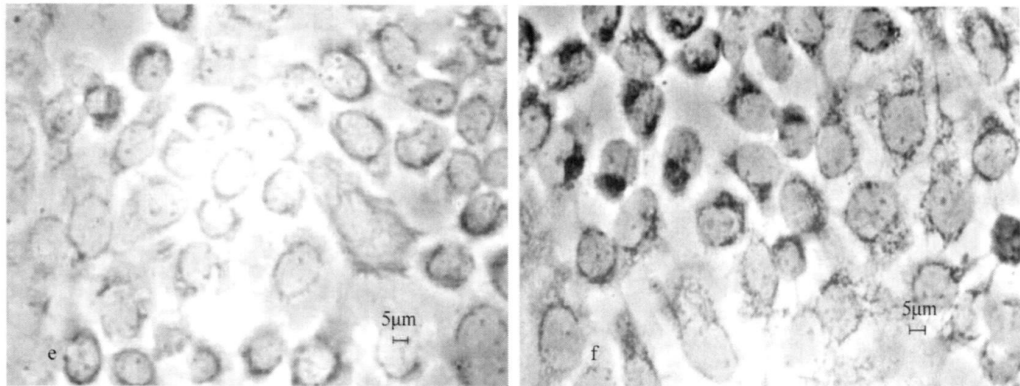


图 6 免疫组织化学法检测 EPS 作用于 A 431 细胞 72h 后 *caspase-3*、*bcl-2* 和 *bax* 基因表达变化

Fig 6 The expression level of *caspase-3*, *bcl-2* and *bax* in A431 cells induced by 6mg/mL EPS for 72 hours assayed by immunohistochemical staining

a, c, e 分别为 *caspase-3*、*bcl-2* 和 *bax* 对照; b, d, f 分别为 *caspase-3*、*bcl-2* 和 *bax* 实验组

a, c and e means control group of *caspase-3*, *bcl-2* and *bax*; b, d and f means treatment group of *caspase-3*, *bcl-2* and *bax* respectively

表 1 免疫组织化学法检测 6mg/mL EPS 作用 A431 细胞 72h *caspase-3*、*bcl-2* 和 *bax* 表达差异

分组 Groups	相关基因表达的阳性率 The ratio of positive expression of related genes ($\bar{x} \pm s\%$)		
	<i>caspase-3</i>	<i>bcl-2</i>	<i>bax</i>
对照组 (PBS) Control groups	8.21 $\pm$ 0.91	72.58 $\pm$ 6.45	11.27 $\pm$ 1.48
实验组 Treated groups (EPS 6mg/mL)	69.32 $\pm$ 7.55*	6.49 $\pm$ 1.67	86.47 $\pm$ 13.05*

* 实验组与对照组有显著差异 $p < 0.05$

* $p < 0.05$ vs. control group

3 讨论

爪哇伪枝藻生活在高强辐射的荒漠地带,并能通过自身分泌次生代谢产物-胞外多糖为自身营造适应高强辐射的微环境^[11-15],这种多糖是一种分子构想处于自由卷曲和刚性杆状之间的、复杂的蛋白糖^[4-5]。近年来有关海藻多糖抗肿瘤方面的研究越来越深入^[16],但关于荒漠藻胞外多糖的深入研究在国内外尚未见报道。本文以探索 EPS 在药理学上是否具有特殊作用,用 MTT 法检测细胞的生长情况结果表明适宜浓度的 EPS 对 A431 细胞增殖有显著抑制作用,并呈现时间和剂量依赖性,作用 96h 的 IC_{50} 为 4.25mg/mL,比文献报道的裙带菜多糖对肝癌细胞 HepG-2 的 IC_{50} 为 20mg/mL 左右^[17]要低,表明 EPS 在体外具有很强的抑瘤活性。HE 染色和透射电镜的显示在 6mg/mL EPS 作用下,细胞生长受到明显抑制,并出现典型细胞凋亡形态。单细胞凝

胶电泳是近年来发展起来的一种检测单个哺乳动物细胞 DNA 链断裂的方法,这种方法所用细胞少(从几个到上千个),灵敏度高,操作简便而得到广泛应用^[18]。本研究利用该方法的结果表明,6mg/mL EPS 作用能明显导致 A431 细胞 DNA 损伤,在电泳作用下出现明显彗尾。以上形态学和 DNA 损伤方面研究结果说明 EPS 能诱导 A431 细胞凋亡,具有抗肿瘤活性。

为进一步说明 EPS 的抗肿瘤活性及其作用机理,我们研究了细胞凋亡相关基因 *caspase-3* 的表达。采用免疫组织化学 SP 染色法检测 6mg/mL EPS 作用于 A431 细胞 72h 后 *caspase-3* 表达水平显著增强,这一结果与 cisplatin 诱导 A431 细胞凋亡时 *caspase-3* 表达上调的结果相一致^[20]。这说明 EPS 诱导 A431 细胞凋亡与 *caspase-3* 表达上调有关,并且可能是激活了细胞凋亡的线粒体途径。为进一步探索 A431 细胞凋亡时 *caspase-3* 表达上调是否与

Bcl蛋白家族有关, 为此我们检测 *bcl-2* 和 *bax* 的表达。Bcl家族是重要的凋亡相关因子, 按其功能分为两类: 一类为促凋亡, 另一类为抑凋亡。Bcl-2属于抑制凋亡因子, Bax属于促凋亡因子。Bax是 Bcl-2蛋白的一种同源蛋白, Bax既可以形成同聚体, 又可与 Bcl-2形成异二聚体, Bax蛋白与 Bcl-2蛋白的比值影响着细胞受到刺激后发生凋亡的比率。Bcl-2位于线粒体外膜, 可提高线粒体膜的稳定性, 阻止PT的开放, 阻止凋亡蛋白释放, 对正常的细胞功能起保护作用^[19 21]。本实验免疫组织化学结果表明, EPS上调 *bax* 表达的同时下调 *bcl-2* 表达, 使 Bcl-2/Bax比值显著提高, 这一结果与夏明钰等报道厚朴酚诱导人宫颈癌 HeLa细胞凋亡时改变 *bcl-2* 和 *bax* 表达的结果相似^[22], 证实线粒体途径是 EPS 诱导 A431细胞凋亡的途径之一。

总之, 本研究通过对细胞生存率检测、形态学观察和 DNA 损伤检测, 充分说明 EPS 诱导细胞凋亡是其抗肿瘤的重要作用形式。EPS的作用显著提高 *capase-3* 和 *bax* 表达水平, 降低 *bcl-2* 表达水平, 提示线粒体途径是 EPS 诱导细胞凋亡可能途径之一, 此结果在国内外尚未见报道。通过研究说明 EPS 有效成分具有研发新型荒漠藻类抗肿瘤药物的前景, 有关 EPS活性成分的分离鉴定和抗肿瘤机理等实验正在深入研究之中。

参考文献:

[1] Xu N J, Fan X, Yan X J, *et al*. Screening marine algae from China for their antitumor activities [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2004, **16**: 451—456

[2] Yu H, Zhang X C. Experimental studies on antitumor effects of polysaccharides from *Spirulina platensis* [J]. *High Technology Letters*, 2003, **13**(7): 83—86 [于红, 张学成. 螺旋藻多糖抗肿瘤作用的实验研究. 高技术通讯, 2003, **13**(7): 83—86]

[3] Wang M, Zhu JH, Ma Y X, *et al*. Preparation of Se-PSP and effect of Se-PSP on growth of *in vitro* and *in vivo* tumors [J]. *Marine Sciences*, 2006, **30**(1): 23—27 [王敏, 朱劲华, 马宇翔, 等. 含硒紫球藻胞外多糖的制备及对体内外肿瘤细胞生长的影响. 海洋科学, 2006, **30**(1): 23—27]

[4] Hu C X, Paulsen B S, Petersen D, *et al*. Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grains [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2003, **54**(1): 33—42

[5] Hokputsa S, Hu C X, Paulsen B S, *et al*. A Physicochemical comparative study on extracellular carbohydrate polymers from five desert algae [J]. *Carbohydrate polymers*, 2003, **54**(1): 27—32

[6] Hu C X, Zhang D L, Huang Z B, *et al*. The vertical microdistrib-

ution of cyanobacteria and green algae with in desert crusts and the development of the algal crusts [J]. *Plant Soil*, 2003, **257**: 97—111

[7] Moore B G, Tischer R G. Extracellular polysaccharides of algae effects on life-support system [J]. *Science*, 1964, **145**: 856—887

[8] Chen L Z, Li D H, Liu Y D. Salt tolerance of *Microcoleus vaginatus* Gam., a cyanobacterium isolated from desert algal crust was enhanced by exogenous carbohydrates [J]. *J. Arid Environ.*, 2003, **55b**: 645—656

[9] Stal L J. Cyanobacterial mats and stromatolites [A]. In *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space* [M]. Whitton and Pons (Eds.). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000: 62

[10] Hu C X, Liu Y D, Song L R. Species composition and distribution of algae in shapotou area, Ningxia Hui Autonomous Region, China [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, **23**(5): 443—448 [胡春香, 刘永定, 宋立荣. 宁夏沙坡头地区藻类及分布. 水生生物学报, 1999, **23**(5): 443—448]

[11] Squier A H, Hodgson D A, Keely B J. A critical assessment of the analysis and distributions of scytonemin and related UV screening pigments in sediments [J]. *Organic Geochemistry*, 2004, **35**: 1221—1228

[12] Kin A L, Athar M, Bickers D R, *et al*. Stage specific alterations of cyclin expression during UVB induced murine skin tumor development [J]. *Photochem Photobiol.*, 2002, (75): 58—67

[13] Villard P H, Sampol E, Elkaim J L, *et al*. Increase of *CYP1B1* Transcription in Human Keratinocytes and HaCat Cells after UV-B Exposure [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2002, **178**(3): 137—143

[14] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, *et al*. A simple technique for quantization of low levels of DNA damage in individual cells [J]. *Experimental Cell Research*, 1988, **175**(1): 184—191

[15] De Philippis R, Vincenzini M. Extracellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications [J]. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1998, **22**: 151—175

[16] Marinho soriano E, Bouret E. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariaceae, Rhodophyta) [J]. *Biore-source Technol.*, 2005, **96**(3): 380—382

[17] Wang X, Zou X Y, Guo L Y, *et al*. Studies antitumor activities of *Undaria Pinnatifida* polysaccharides (UPPS) [J]. *Journal of Dalian Medical University*, 2006, **28**(2): 98—100 [王雪, 邹向阳, 郭莲英, 等. 裙带菜多糖抗肿瘤作用的研究. 大连医科大学学报, 2006, **28**(2): 98—100]

[18] Li Y, Xie M. The introduction of the technology of single cell gel electrophoresis [J]. *Bulletin of Biology*, 2005, **40**(7): 52—53 [李彦, 谢明. 单细胞凝胶电泳技术操作方法介绍. 生物学通报, 2005, **40**(7): 52—53]

[19] Jiang X J, Wang X D. Cytochrome c-mediated apoptosis [J]. *Annu. Rev. Biochem.*, 2004, **73**: 87—106

[20] Mese H, Sasaki A, Alcaldre S N R E, *et al*. The role of caspase family protease, caspase-3 on cisplatin-induced apoptosis in cis-

platin-resistant A431 cell line [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2000, **46**: 241—245

[21] Yu T, Wang X, Puring Koch C, *et al*. A mutational pitope for cytochrome c binding to the apoptosis protease activation factor-1 [J]. *J Biol Chem.*, 2001, **276**: 13034—13038

[22] Xia M Y, Wang M W, Tashiro S I *et al*. Magnobl induces ap-

optosis via alteration of Bax /Bcl-2X_L ratio and activation of caspases [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2005, **21**(3): 318—322 [夏明钰, 王敏伟, 田代真一, 等. 厚朴酚通过改变 Bax/Bcl-2X_L表达和激活 caspase诱导人宫颈癌 Hela细胞凋亡. 中国药理学通报, 2005 **21**(3): 318—322]

ON APOPTOSIS OF HUMAN EPIDERMOID CARCINOMA A431 CELLS INDUCED BY THE EXTRACELLULAR POLYMERIC SUBSTANCES OF *SCYTONEMA JAVANICUM*

ZHANG Hong MA Hong-Ying ZHANG De-Lu LÜYing WANG Gao-Hong CHEN Kun
LIU Yong-Ding and HU Chun-Xiang
(Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract To investigate the effect of extracellular polymeric substances of *Scytonema javanicum* (EPS) on apoptosis of A431 cells and the expression level of relative genes, cell viability was measured by MTT method, morphologic changes were observed by hematoxylin and eosin staining and transmission electron microscopy, DNA damage was detected by single cell gel electrophoresis (SCGE/comet assay), the expression level of *caspase-3*, *bcl-2* and *bax* were detected by immunohistochemical staining. EPS significantly inhibited the proliferation of the A431 cells and the inhibitory effect was dose- and time-dependent, which was accompanied by the appearance of morphologic characteristics of apoptosis. The IC₅₀ of A431 cells is 4.25 mg/mL after the treatment of EPS for 96 h. After 6 mg/mL EPS treatment for 48 h, the DNA damaged seriously in A431 cells when compared with the untreated controls. The expression level of *caspase-3* and *bax* were up-regulation while *bcl-2* was down-regulation after 6 mg/mL EPS treatment for 72 h when compared with the untreated controls respectively. It concluded that EPS may inhibit the proliferation and induce apoptosis of A431 cells, in which *caspase-3*, *bcl-2* and *bax* were involved.

Key words *Scytonema javanicum*; Extracellular polymeric substances; A431; Apoptosis