

# 低分子量肝素对肺癌细胞 A549 增殖、周期与凋亡的影响

宋大巍<sup>1</sup>, 李良玉<sup>2</sup>, 张丽萍<sup>1\*</sup><sup>1</sup>黑龙江八一农垦大学食品学院; <sup>2</sup>黑龙江八一农垦大学 国家杂粮工程技术研究中心, 大庆 163319

**摘要:** 探究低分子量肝素对肺癌细胞 A549 增殖、周期和凋亡的影响, 研究不同浓度低分子量肝素的作用效果, 分别采用 MTT、PI 染色法、流式细胞仪、倒置显微镜检测细胞增殖、细胞周期分布, 细胞凋亡和细胞的形态变化。结果显示, 低分子量肝素可以抑制肺癌细胞 A549 的生长, 细胞阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期 ( $P < 0.05$ ), 凋亡增加 ( $P < 0.05$ ), 其抑制作用呈时间和浓度依赖性。

**关键词:** 低分子量肝素; 肺癌细胞 A549; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R914

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.S.009

## Inhibitory Effect of Low Molecular Weight Heparin on Proliferation, Cell-cycle and Apoptosis of Lung Adenocarcinoma A549 Cell

SONG Da-wei<sup>1</sup>, LI Liang-yu<sup>2</sup>, ZHANG Li-ping<sup>1\*</sup><sup>1</sup>College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University; <sup>2</sup>National Coarse

Cereals Engineering Research Center, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China

**Abstract:** To explore the effect of LMWH on proliferation, the cycle and apoptosis of lung adenocarcinoma A549 cell. Respectively by MTT, PI staining, flow cytometry, inverted microscope detection of cell proliferation, cell cycle distribution, morphological changes of apoptosis and cell. The results showed, low molecular weight heparin can inhibit the growth of A549 lung carcinoma cell, cell cycle arrest in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase ( $P < 0.05$ ), apoptosis ( $P < 0.05$ ), the effect of inhibition was time and concentration dependent.

**Key words:** low molecular weight heparin; lung adenocarcinoma A549 cell; cell proliferation; cell apoptosis

肝素 (UFH) 是一种功能性多糖物质其具有广泛的抗血栓、抗炎、调整血脂等多种生物学功能<sup>[1,2]</sup>。低分子量肝素 (LMWH) 是精品肝素经过物理或者化学降解后得到的分子量在 3000 ~ 8000 Da 的糖氨基聚糖片段。国内外学者很早即开始关注肝素 (UFH) 在肿瘤患者中的应用, 但是主要集中在对晚期恶性肿瘤患者深静脉血栓的预防作用<sup>[3,4]</sup>。与 UFH 相比 LMWH 具有生物活性利用度高、抗血栓作用强、不良反应少等优点。近年来研究发现, 低分子量肝素还具有多种生物活性和临床用途, 包括抗血管生成及抗肿瘤作用等<sup>[5-9]</sup>。

大量的试验表明 LMWH 具有良好的抑制肿瘤生长和转移的作用<sup>[10]</sup>。低分子量肝素可通过改变肿瘤细胞的细胞和分子学环境而干预肿瘤的发展, 例如, 低分子量肝素具有抗肿瘤细胞增殖作用, 抑制血管

内皮细胞增殖和抑制血管形成, 通过抑制乙酰肝素酶、基质金属蛋白酶等酶的活性及作用阻止细胞外基质及基底膜的降解, 抑制肿瘤细胞黏附及其随后向组织的侵袭、迁移等<sup>[11]</sup>。

本文通过研究低分子量肝素 (low molecular weight heparin, LMWH) 对肺癌细胞 A549 的体外作用, 观察低分子量肝素对肺癌细胞 A549 体外作用的影响, 进一步阐明低分子量肝素抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡以及抑制肿瘤细胞侵袭的可能机制, 并探讨其用于肺癌治疗及化学预防的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

低分子量肝素 (法安明, 25000 IU/mL), 美国 Pfizer Inc; 胎牛血清, 杭州四季青生物工程材料有限公司; Annexin V-PI 细胞凋亡检测试剂盒, 北京润成生物技术有限公司; 高糖 DMEM 培养基, Gibco 公司; MTT, Sigma 公司; 台盼蓝, Sigma 公司; DMSO,

Sigma 公司; RPMI1640 培养基, Hyclone 公司; 胰蛋白酶, Sigma 公司; A549 人肺癌细胞, 上海天呈医流科技公司; 细胞培养 96 孔板, 北京索来宝科技公司。倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; Sunrise 酶标仪, 美国 ERMA 公司; 台式高速离心机, 德国 Hettich 公司; 高压灭菌器, 日本 Sanyo 公司; CO<sub>2</sub> 培养箱, 日本 Sanyo 公司; CX41 显微镜, 日本 Olympus 公司; 超净工作台, 苏州净化仪器厂; 流式细胞仪, 美国 BD 公司; XK96 型微量振荡器, 江苏江都市新康仪器厂。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 冻存细胞复苏方法

将肺癌细胞 A549 细胞株冻存管, 放入 37 °C 水浴中, 1 min 内迅速融解。低温离心 5 min, 转速 2000 rpm, 弃上层液体, 加入无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 2 mL, 低温离心 3 min, 转速 2000 rpm, 弃上层液体, 转入培养瓶中培养。

### 1.2.2 肺癌细胞 A549 传代培养方法

细胞培养 2 d 后, 成致密单层细胞, 将细胞瓶中原有培养液弃去, 加 0.5% 胰蛋白酶溶液 1 mL, 消化 3 min, 肉眼观察瓶壁, 形成的细胞层出现细针孔空隙时, 弃胰蛋白酶溶液, 加入到 RPMI 1640 培养基中, 轻摇将肺癌细胞 A549 从细胞瓶壁洗下, 按试验要求分入多瓶继续传代培养<sup>[12]</sup>。

### 1.2.3 低分子量肝素对肺癌细胞 A549 增殖的影响试验

选取 0、0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 mg/mL 七种不同浓度的 LMWH 分别作用于肺癌细胞 A549<sup>[13]</sup>, 分 6 组 ( $n=6$ ), 培养 1、2、3、4 d 后, 采用 MTT 法利用酶标仪测定肺癌细胞 A549 细胞培养液

的吸光值 (OD<sub>492</sub>) 和细胞生长抑制率<sup>[14]</sup>。

### 1.2.4 低分子量肝素对肺癌细胞 A549 细胞形态的影响试验

选取 0、0.5、1.0、1.5 mg/mL 四种不同浓度的 LMWH 分别作用肺癌细胞 A549, 分 6 组 ( $n=6$ ), 培养 2 d 后采用倒置显微镜观测肺癌 A549 的细胞形态。

### 1.2.5 低分子量肝素对肺癌细胞 A549 细胞周期的影响试验

选取 0、0.5、1.0、1.5 mg/mL 四种不同浓度的 LMWH 分别作用肺癌细胞 A549, 分 6 组 ( $n=6$ ), 培养 2 d, 经 PI 染色, 用流式细胞仪检测, 肺癌细胞 A549 的生长周期<sup>[15]</sup>。

### 1.2.6 低分子量肝素对肺癌细胞 A549 细胞凋亡的影响试验

选取 0、0.5、1.0、1.5 mg/mL 四种不同浓度的 LMWH 分别作用肺癌细胞 A549, 分 6 组 ( $n=6$ ), 培养 2 d, 经 Annexin V 和 PI 双染色, 采用流式细胞仪检测肺癌细胞 A549 的细胞凋亡情况<sup>[16]</sup>。

### 1.2.7 实验数据的处理

实验数据采用 SAS8.2 数据分析软件进行统计分析。数据表示格式为: 均值 ± 标准差。

## 2 结果与分析

### 2.1 低分子量肝素对 A549 细胞增殖的影响

不同浓度的 LMWH 作用于 A549 细胞后, 于 1、2、3、4 d 后, 用酶标仪测得的吸光值 (OD<sub>492</sub>) 和抑制率如表 1、表 2 所示。

表 1 低分子量肝素作用后 A549 细胞的吸光值  
Table 1 The absorbance of A549 cells treated by LMWH

剂量 Dose (mg/mL)	OD 值 OD value			
	1 d	2 d	3 d	4 d
0	0.867 ± 0.008 <sup>b,A</sup>	0.789 ± 0.009 <sup>c,A</sup>	0.863 ± 0.009 <sup>bc,A</sup>	0.899 ± 0.004 <sup>a,A</sup>
0.25	0.856 ± 0.009 <sup>a,AB</sup>	0.775 ± 0.008 <sup>b,B</sup>	0.850 ± 0.006 <sup>ab,AB</sup>	0.845 ± 0.006 <sup>* ab,B</sup>
0.50	0.784 ± 0.006 <sup>a,B</sup>	0.707 ± 0.006 <sup>* d,C</sup>	0.768 ± 0.009 <sup>* b,B</sup>	0.733 ± 0.008 <sup>** c,C</sup>
0.75	0.636 ± 0.009 <sup>* a,C</sup>	0.561 ± 0.003 <sup>** b,D</sup>	0.511 ± 0.010 <sup>** c,C</sup>	0.501 ± 0.006 <sup>** cd,D</sup>
1.00	0.352 ± 0.002 <sup>** a,D</sup>	0.297 ± 0.006 <sup>** d,E</sup>	0.326 ± 0.008 <sup>** b,D</sup>	0.311 ± 0.003 <sup>** c,E</sup>
1.25	0.210 ± 0.009 <sup>** a,E</sup>	0.210 ± 0.002 <sup>** ab,F</sup>	0.169 ± 0.007 <sup>** b,E</sup>	0.145 ± 0.007 <sup>** c,F</sup>
1.50	0.199 ± 0.011 <sup>** a,EF</sup>	0.197 ± 0.004 <sup>** ab,G</sup>	0.132 ± 0.007 <sup>** b,F</sup>	0.106 ± 0.005 <sup>** c,G</sup>

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; A-G 为组间差异,  $P < 0.05$ ; a-d 为组内差异,  $P < 0.05$ 。

Note: compared with control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; A-G indicated differences between groups,  $P < 0.05$ ; a-d indicated differences within groups,  $P < 0.05$ .

由表 1 可知,在同一时间内随着 LMWH 添加浓度的增加,A549 细胞活性成显著降低。可见 LMWH 能降低肺癌细胞 A549 的细胞活性,而且是呈时间和浓度依赖性的。对照组细胞 1 d 和 2 d 的细胞活

性基本一致,但 2 d 后细胞活性显著下降,这可能是由于培养基中营养耗竭所致,因此,可以认为 2 d 以前的细胞活性值能准确。

表 2 低分子量肝素作用后 A549 细胞的生长抑制率

Table 2 The inhibition effect of OMT on A549 cells

剂量 Dose (mg/mL)	抑制率 Inhibition rate (%)			
	1 d	2 d	3 d	4 d
0	0	0	0	0
0.25	2.21 ± 0.007 <sup>a,F</sup>	1.66 ± 0.004 <sup>* c,F</sup>	1.54 ± 0.001 <sup>* d,F</sup>	2.04 ± 0.007 <sup>* * b,F</sup>
0.50	11.38 ± 0.005 <sup>* d,E</sup>	13.46 ± 0.006 <sup>* * c,E</sup>	18.24 ± 0.006 <sup>* * b,E</sup>	20.14 ± 0.006 <sup>* * a,E</sup>
0.75	32.69 ± 0.001 <sup>* * d,D</sup>	34.87 ± 0.003 <sup>* * c,D</sup>	36.79 ± 0.009 <sup>* * b,D</sup>	39.48 ± 0.008 <sup>* * a,D</sup>
1.00	49.80 ± 0.006 <sup>* * d,C</sup>	52.37 ± 0.001 <sup>* * c,C</sup>	59.77 ± 0.003 <sup>* * b,C</sup>	64.90 ± 0.007 <sup>* * a,C</sup>
1.25	58.46 ± 0.003 <sup>* * d,B</sup>	60.39 ± 0.006 <sup>* * c,B</sup>	63.08 ± 0.003 <sup>* * b,B</sup>	71.53 ± 0.006 <sup>* * a,B</sup>
1.50	72.64 ± 0.008 <sup>* * d,A</sup>	75.67 ± 0.008 <sup>* * c,A</sup>	78.50 ± 0.004 <sup>* * b,A</sup>	85.46 ± 0.004 <sup>* * a,A</sup>

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;A-G 为组间差异, $P < 0.05$ ;a-d 为组内差异, $P < 0.05$ 。

Note: compared with control, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;A-G indicated differences between groups, $P < 0.05$ ;a-d indicated differences within groups, $P < 0.05$ .

由表 2 可以看出,随着时间的延长,A549 细胞活性的抑制率逐渐提高,可见低分子量肝素对 A549 细胞的活性有抑制作用。随着 LMWH 添加量的增加,A549 细胞的抑制率也随之提高,但这种抑制也可能与药物作用有关。由试验可知当 LMWH 的添加浓度为 1.00 mg/mL 时,A549 细胞的抑制率达

到 50% 以上,因此,为保证实验结果的可靠性,在后续试验中选择 1.00 mg/mL 的 LMWH 为干预浓度的中间值,测定干预 2 d 后的各项指标。

## 2.2 低分子量肝素对 A549 细胞形态的影响

不同浓度 LMWH 对 A549 细胞形态的影响,见图 1。

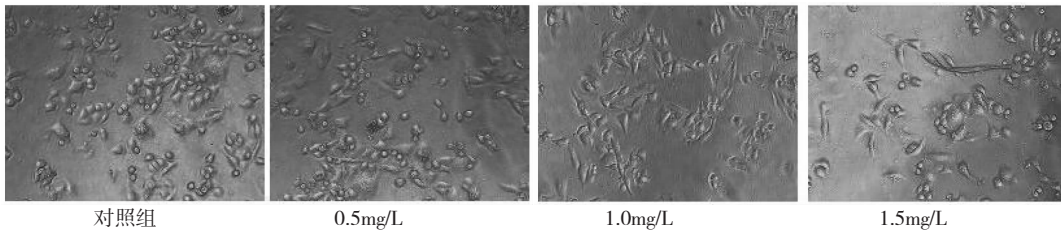


图 1 四种浓度的 LMWH 作用于 A549 细胞 48 h 后的细胞形态(倒置显微镜 × 200)

Fig. 1 Morphology of A549 cells after 48h treatment by four different concentrations of LMWH (inverted microscope × 200)

由图 1 可知,对照组活细胞个数多,细胞排列紧密,细胞呈规则的梭形,加药后细胞发生严重变形,并有一些 A549 细胞已经死亡,细胞个数变少随着 LMWH 作用浓度的增加,抑制效果越显著,超过 1.5

mg/mL 后,只有少数 A549 细胞存活。

## 2.3 低分子量肝素对 A549 细胞细胞周期的影响

LMWH 处理 2d 后的 A549 细胞经 PI 染色后,流式细胞仪的检测细胞周期分析结果如表 3 和图 2 所示。

表 3 LMWH 对 A549 细胞周期的影响

Table 3 The effect on cell cycle of A549 cells treated by LMWH

浓度 Concentration (mg/mL)	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期 G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> phase (%)	S 期 S <sub>p</sub> phase (%)	G <sub>2</sub> /M 期 G <sub>2</sub> /M phase (%)
0	54.39 ± 0.30 <sup>a,D</sup>	32.03 ± 0.39 <sup>b,A</sup>	18.58 ± 0.30 <sup>c,A</sup>
0.5	57.34 ± 0.16 <sup>a,C</sup> *	27.93 ± 0.43 <sup>b,B</sup> *	17.73 ± 0.24 <sup>c,B</sup> *
1.0	63.81 ± 0.23 <sup>a,B</sup> *	21.60 ± 0.38 <sup>b,C</sup> *	15.59 ± 0.37 <sup>c,C</sup> **
1.5	69.06 ± 0.12 <sup>a,A</sup> **	11.66 ± 0.23 <sup>c,D</sup> **	13.28 ± 0.15 <sup>b,D</sup> **

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;A-G 为组间差异, $P < 0.05$ ;a-d 为组内差异, $P < 0.05$ 。

Note: compared with control, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;A-G indicated differences between groups, $P < 0.05$ ;a-d indicated differences within groups, $P < 0.05$ .

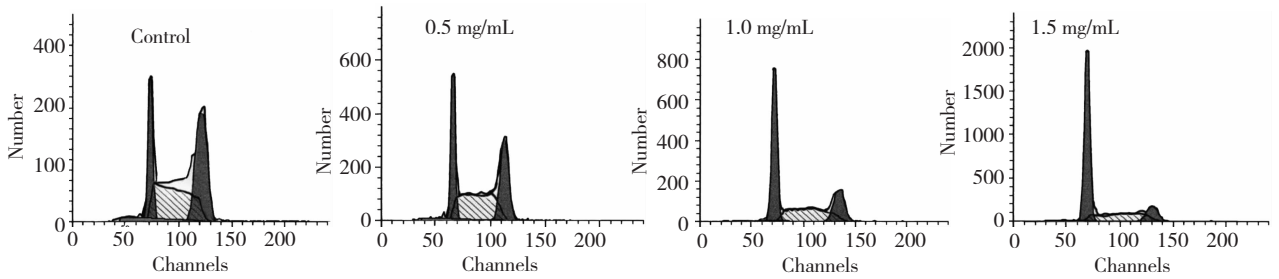


图2 四种浓度 LMWH 作用 48h 后 A549 细胞周期检测图

Fig. 2 The cell cycle of A549 cells after 48h treatment by four morphologys LMWH

由表 3 和图 2 可知,低分子量肝素试验组中肺癌 A549 细胞在 G1 期比率显著增加,在 S 期比率显著降低,G2/M 期比率增加但没有统计学意义。实验结果表明:LMWH 对肺癌 A549 细胞体外生长和

细胞周期的分布均有影响。

## 2.4 低分子量肝素对 A549 细胞细胞凋亡的影响

LMWH 处理 2 d 后的肺癌细胞 A549 经染色后,细胞凋亡分析结果如表 4 和图 3 所示。

表 4 LMWH 作用 2 d 后 A549 细胞的凋亡情况

Table 4 The apoptosis rate of A549 after 2d treatment by LMWH

浓度 Concentration (mg/mL)	凋亡率 Apoptosis rate (%)	正常率 Normal rate (%)	坏死率 Necrosis rate (%)
0	6.23 ± 0.06 <sup>b,D</sup>	92.68 ± 0.05 <sup>a,A</sup>	1.09 ± 0.07 <sup>c,AB</sup>
0.5	8.50 ± 0.04 <sup>b,C *</sup>	90.38 ± 0.04 <sup>a,B</sup>	1.12 ± 0.08 <sup>c,A</sup>
1.0	10.73 ± 0.01 <sup>b,B * *</sup>	88.17 ± 0.06 <sup>a,C</sup>	1.10 ± 0.09 <sup>c,AB</sup>
1.5	15.09 ± 0.08 <sup>b,A * *</sup>	83.80 ± 0.07 <sup>a,D</sup>	1.11 ± 0.03 <sup>c,AB</sup>

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;A-G 为组间差异, $P < 0.05$ ;a-d 为组内差异, $P < 0.05$ 。

Note:compared with control,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;A-G indicated differences between groups, $P < 0.05$ ;a-d indicated differences within groups, $P < 0.05$ .

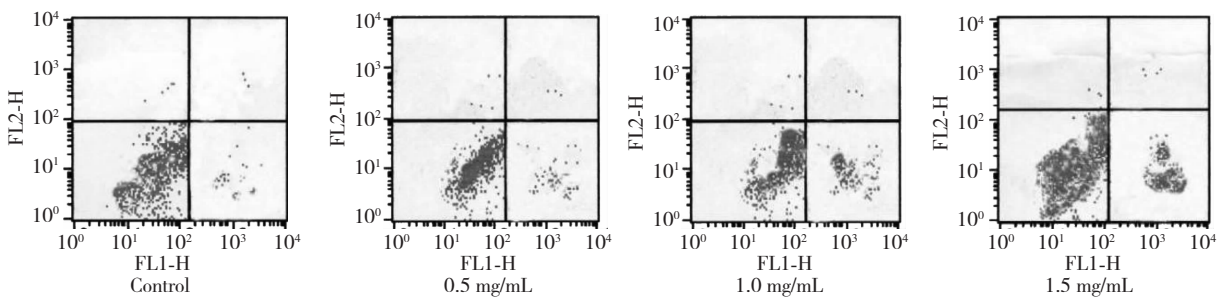


图3 LMWH 作用 48h 后流式细胞仪检测的 A549 细胞的凋亡情况

Fig. 3 The apoptosis rate of A549 after 48h treatment by LMWH detecting by FCM

由表 4 和图 3 可知,LMWH 能够影响肺癌细胞 A549 的凋亡。在干预细胞后 2 d 后,A549 肺腺癌细胞凋亡率明显上升,并在 1.5 mg/mL 时达到 15.09%,且随浓度的升高而增加。

## 3 讨论

目前,国内外肿瘤治疗的方法主要是选择性诱导肿瘤细胞凋亡,大多数化疗药物和生物治疗剂都是通过诱导癌细胞凋亡实现的<sup>[17-20]</sup>。本研究结果

表明 LMWH 能显著抑制 A549 细胞,并表现出时间依赖性和浓度依赖性。低剂量的 LMWH 会导致肺癌 A549 细胞发生严重变形,并有一些 A549 细胞已经死亡,细胞个数变少随着 LMWH 作用浓度的增加,超过 1.5 mg/mL 后,只有少数 A549 细胞存活,诱导肺癌 A549 细胞凋亡。通过流式细胞术观察到不同浓度的低分子量肝素处理 A549 细胞后 G<sub>1</sub> 期的细胞均显著增加,S 期细胞明显减少,说明低分子量肝素可以抑制处于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的 A549 细胞进入 S

期,引起细胞周期改变。肝素类化合物是一种抗凝血类物质,这类物质的抗癌机制主要是通过多种途径改善血液高凝状态,转移灶内新生毛细血管退化及改善循环中的免疫识别,其具体机理需要进一步探究。

#### 参考文献

- Naggi A, Casu B, Perez M, *et al.* Modulation of the heparanase-inhibiting activity of heparin through selective desulfation, graded N-Acetylation, and glycol splitting. *J Biol Chem*, 2005, 280:12103-12113.
- Di Y(狄岩), Zhang ZY(张增叶). Advances in heparin anti-tumor mechanism. *Clin Focus(临床荟萃)*, 2000, 15:381-382.
- Castelli R, Porro F, Tarsia P. The heparins and cancer: review of clinical trials and biological properties. *Vascular Med*, 2004, 9:205-213.
- Casu B, Vlodaysky I, Sanderson RD. Non-anticoagulant heparins and inhibition of cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2008, 36:195-203.
- Liu Y(刘岩). Study on the antimicrobial, anti-tumor and blood lipid reducing activities of low molecular weight heparin. Daqing; Heilongjiang Bayi Agricultural University, MSc. 2010.
- Zhang LP(张丽萍). Study on a novel extraction and purification technology of heparin and bioactivity of degraded heparin. Changchun; Jilin University, PhD. 2010.
- Zhang L(张琳). The relationship between structures of heparin-like glucosaminoglycans and tumor. Shandong; Shandong University, MSc. 2005.
- Chen XJ(陈小军). The effect of dalteparin on lung adenocarcinoma A549 cell line *in vitro* and the potential mechanism. Shandong; Shandong University, MSc. 2008.
- Wang P(王鹏). Effects and mechanisms of LMWH on human breast cancer cell line MCF-7. Shijiazhuang; Hebei Medical University, MSc. 2008.
- Lee AY, Rickles FR, Julian JA, *et al.* Randomized comparison of low molecular weight heparin and coumarin derivatives on the survival of patients with cancer and venous thromboembolism. *J Clin Oncol*, 2005, 23:2123-2129.
- Lazo A, Goss GD, Spaans JN, *et al.* The effect of low-molecular-weight heparin on cancer survival. A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Thromb Haemost*, 2007, 5:729-737.
- Kakkar AK, Levine MN, Kadziola Z, *et al.* Low molecular weight heparin, therapy with dalteparin, and survival in advanced cancer; the Fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS). *J Clin Oncol*, 2004, 22:1944-1948.
- Klerk CPW, Smorenburg SM, Otten HM, *et al.* The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy. *J Clin Oncol*, 2005, 23:2130-2135.
- Bobek V, Kovarik J. Antitumor and antimetastatic effect of warfarin and heparins. *Biomed Pharmacother*, 2004, 58(6):213-219.
- Shao ZM, Dawson MI, Li XS, *et al.* P53 independent G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest and apoptosis induced by a novel retinoid in human breast cancer cells. *Oncogene*, 1995, 11:493-504.
- Sato H, Sato Y, Ichimura K, *et al.* p27 (Kip 1)<sup>s</sup> detected on most gastric MALT lymphomas, but not large cell lymphomas. *Clin Exp Hematop*, 2006, 46(8):25-30.
- Rodriguez S, Zhivotovsky B. Role of alterations in the apoptotic machinery in sensitivity of cancer cells to treatment. *Curr Pharm Des*, 2006, 12:4411-4425.
- Coultas L, Strasser A. The molecular control of DNA damage-induced cell death. *Apoptosis*, 2000, 5:491-507.
- Ristorcelli E, Lombardo D. Targeting Notch signaling in pancreatic cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 2010, 14:541-552.